

dr hab. Edyta Paczos-Grzęda
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

Lublin, 31.08.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister inżynier Roksany Bobrowskiej
pt. „Przeniesienie loci genów warunkujących odporność horyzontalną
na rdzę brunatną z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)
do pszenżyta (\times *Triticosecale* Wittmack)”**

Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w oparciu o wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2021 r. poz. 478).

Podstawowe dane o Kandydatce

Pani mgr inż. Roksana Bobrowska jest absolwentką Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Tytuł zawodowy magistra inżyniera uzyskała 26 czerwca 2018 r. na podstawie pracy pt. „Identyfikacja genów odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) w wybranych odmianach pszenicy zwyczajnej oraz opracowanie warunków multiplex PCR”, którą wykonała pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Tomkowiak w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W roku 2018 Kandydatka rozpoczęła studia doktoranckie na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, podczas których pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Michała Kwiatka realizowała badania do pracy doktorskiej. Od 1 października 2021 r. jest zatrudniona jako asystent w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Jest współautorem 15 publikacji o sumarycznym IF 34,469 i wartości punktowej MEiN 1300. Indeks Hirsch’a Doktorantki wynosi 3. Pani mgr inż. Roksana Bobrowska nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

Informacje o ocenianej pracy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Roksany Bobrowskiej została zrealizowana pod kierunkiem Pana dr hab. Michała Kwiatka, profesora Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, podczas Studiów Doktoranckich UPP prowadzonych przy



Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii. Badania przeprowadzono częściowo w ramach projektu MRiRW pt. „Analiza molekularna genów warunkujących odporność poziomą u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* sp.”, którego kierownikiem jest Pan dr hab. Michał Kwiatek.

Rozprawa doktorska mgr inż. Roksany Bobrowskiej obejmuje polskojęzyczne opracowanie oraz cykl pięciu spójnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019-2022. Przedstawione do oceny publikacje ukazały się w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach umieszczonych w wykazie czasopism naukowych MEiN, z których trzy indeksowane są w bazie JCR (*Journal Citation Reports*). Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, *impact factor*) czasopism, w których opublikowano prace wynosi w chwili obecnej 11,933, natomiast suma punktów MEiN to 550. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a dodatkowo w jednej (publ.2) również autorem korespondencyjnym. Biorąc pod uwagę wymóg prawny oceny indywidualnego wkładu Doktoranta w powstanie publikacji (Dz U 2014, poz 1383; §6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014) i uwzględniając zarówno pisemne oświadczenia złożone przez wszystkich współautorów opublikowanych prac, jak i wkład poszczególnych autorów w proces powstawania prac określony w deklaracjach wkładu zawartych w tekstach publikacji, można stwierdzić, że rola Doktorantki w planowaniu, wykonywaniu i opracowaniu otrzymanych wyników badań była istotna. Procentowy udział Kandydatki w przygotowanie prac oceniony został w czterech z nich na 60%, zaś w jednej na 50%.

Wchodzące w skład rozprawy doktorskiej publikacje dotyczą wprowadzenia do genomu pszenżyta (\times *Triticosecale* Wittmack) z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) odporności horyzontalnej na rdzę brunatną wywoływaną przez grzyb *Puccinia triticina* Erikss. warunkowanej genami *Lr34* i *Lr46* (publ.4). Obejmują również opracowanie reakcji multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji markerów dla genów *Lr34* + *Lr46* (publ.1) oraz *Lr34* + *Lr46* + *Lr68* (publ.2) w pszenicy, a także identyfikację najlepszego markera molekularnego dla genu odporności *Lr46* w pszenicy (publ.5) oraz w pszenżycie ozimym i jarym (publ.3).

Rozprawa doktorska liczy 120 stron i została podzielona na sześć tematycznych rozdziałów poprzedzonych wykazem prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej. Rozdział I – Autoreferat rozprawy obejmuje: Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Hipotezę badawczą i cel pracy doktorskiej, Materiał i metody, Wyniki i dyskusję oraz Literaturę i liczy 50 stron. W rozdziale drugim przedstawiono pięć publikacji wchodzących w skład rozprawy. Kolejne wyodrębnione rozdziały to: III - Podsumowanie i wnioski, IV – Streszczenie w języku polskim, V – Summary – streszczenie w języku angielskim i VI – Oświadczenia autorów dotyczące udziału Doktorantki oraz współautorów w powstawaniu prac.

We Wprowadzeniu, stanowiącym rozdział drugi autoreferatu, Autorka dokonuje przeglądu literatury dotyczącej filogenezy, wykorzystania i znaczenia pszenżyta, chorób grzybowych występujących w tym gatunku uprawnym ze szczególnym uwzględnieniem rdzy brunatnej oraz możliwości ograniczenia rozprzestrzeniania się chorób z wykorzystaniem hodowli odpornościowej, zwłaszcza wykorzystującej geny APR (*adult plant resistance*), wspomaganej technikami molekularnymi i cytogenetycznymi.

W kolejnym rozdziale autoreferatu Autorka przedstawia hipotezę badawczą postawioną w pracy oraz cele prowadzonych badań. Przyjęta w niniejszej pracy hipoteza zakładała, że istnieje możliwość poszerzenia puli genowej pszenżyta o geny typu *slow rusting*, zapewniające rasowo-niespecyficzną odporność na rdzę brunatną (powodowaną przez *Puccinia triticina* Erikss.) przy wykorzystaniu technik kontrolowanego krzyżowania. Nadrzędnym celem badań było więc wprowadzenie do genomu pszenżyta (\times *Triticosecale* Wittmack) loci genów warunkujących odporność horyzontalną na rdzę brunatną z pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum* L.) do pszenżyta. Cele pośrednie to: (1) ocena przydatności dostępnych w literaturze markerów molekularnych do identyfikacji genów *Lr* w pszenicy i pszenżycie oraz (2) opracowanie warunków reakcji typu multipleks PCR, które umożliwiłyby identyfikację wprowadzonych genów *Lr* w mieszańcach, a także odmianach i materiałach hodowlanych zarówno pszenicy, jak i pszenżyta dostarczając hodowcom informacji o ich potencjale w hodowli odpornościowej.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka zebrała w tabelach materiał badawczy wykorzystany w kolejnych etapach doświadczeń dokonując jednocześnie opisu pochodzenia materiałów, rodowodów i postulowanych loci genów typu *slow rusting*. Następnie przedstawiła wykorzystane metody badawcze: izolację DNA, analizy molekularne – PCR i multiplex PCR, identyfikację nekrozy wierzchołków liści jako markera morfologicznego obecności genów *Lr34* i *Lr46*, analizę płodności pyłku, krzyżowanie międzygatunkowe, analizę GISH mieszańców F_1 pszenżyta z pszenicą.

Rozdział piąty autoreferatu pt. Wyniki i dyskusja, zawiera przegląd wyników pochodzących ze wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy, z podziałem na poruszane w pracach zagadnienia, a więc: opracowanie metody multipleks PCR dla genów *Lr34 + Lr46*, *Lr34 + Lr46 + Lr68*, *Lr46 + Lr68*, *Lr34 + Lr68*, identyfikację genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* w pszenicy zwyczajnej oraz *Lr46* i *Lr68* w pszenżycie, porównanie przydatności różnych markerów molekularnych dostępnych w literaturze do identyfikacji alleli genu *Lr46* w pszenicy, identyfikację markera LTN, efekty krzyżowania, ocenę odporności pszenżyta w doświadczeniach porejestrowych COBORU, analizy cytologiczne płodności pyłku i cytogenetyczne wykonane metodą GISH. Rozdział ten kończy Dyskusja obejmująca ponad 7 stron. Autoreferat zakończony jest spisem literatury liczącym 126 pozycji.



Wchodzące w skład rozprawy doktorskiej publikacje stanowią logiczny i spójny układ, są napisane w sposób przejrzysty i zrozumiały, w poszczególnych pracach cele zostały jasno sformułowane, a metodyka i wyniki przedstawione z dbałością o szczegóły. Dyskusje i wnioskowanie przeprowadzone zostały prawidłowo.

Pierwsza praca (publ.1) wchodząca w skład rozprawy doktorskiej, opublikowana w czasopiśmie *Journal of Applied Genetics* ma charakter krótkiego komunikatu i prezentuje opracowany przez autorów test multiplex PCR do identyfikacji obecności genów odporności *Lr34* i *Lr46* z wykorzystaniem dwóch markerów *csLV34* i *Xwmc44*, który może być wykorzystany w programach hodowlanych do selekcji wspomaganą markerami. Analizy prowadzono na sześciu odmianach pszenicy.

W ramach kolejnej pracy (publ.2) opublikowanej w *Journal of Plant Protection Research* opracowano multipleks PCR do potwierdzania obecności genów typu *slow rusting* *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* za pomocą markerów: *csLV34*, *Xwmc44* i *csGS*, Walidację testu przeprowadzono na 40 odmianach i liniach pszenicy, u których na podstawie danych literaturowych można było postulować obecność poszczególnych genów.

Głównym celem pracy opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Applied Genetics* (publ.3) była identyfikacja pszenicznych markerów *Xwmc44* i *csLV46G22* dla genu odporności *Lr46* w 20 polskich odmianach pszenicy jarego i ozimego. Tego typu analizy mające na celu identyfikację genów *slow rusting* w pszenicy nie były wcześniej prowadzone. W pracy porównano dane otrzymane z obserwacji odporności odmian pszenicy w doświadczeniach porejestrowych COBORU z danymi z analiz molekularnych. Marker molekularny *csLV46G22* zidentyfikowano w odmianach 'Kasyno', 'Mamut' i 'Puzon', z kolei *Xwmc44* w odmianach: 'Dolindo', 'Fredro', 'Orinoko', 'Pizarro', 'Porto' i 'Trismart'. Jednocześnie cechą zamierania szczytowej części liści flagowych, będącą wskaźnikiem obecności genów *slow rusting* *Lr34* i *Lr46* zaobserwowano u odmian 'Belcanto', 'Dolindo', 'Kasyno', 'Pizarro' i 'Porto'. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że odmiana 'Kasyno' najprawdopodobniej posiada gen odporności *Lr46*, zaś w odmianie 'Belcanto' można spekulować obecność genu *Lr34*, niemniej jednak konieczne są dodatkowe badania.

W czwartej pracy opublikowanej we *Frontiers in Plant Science* (publ.4) celem było uzyskanie linii mieszańcowych pszenicy z pszenicą zawierających geny odporności typu *slow rusting* na rdzę brunatną *Lr34* i *Lr46*. W wyniku krzyżowań prowadzonych pomiędzy odmianami pszenicy 'Twingo' i 'Fredro' oraz 33 odmianami pszenicy otrzymano 34 rośliny mieszańcowe F₁ reprezentujące siedem kombinacji mieszańcowych. Tylko w jednej kombinacji wystąpiła odmiana pszenicy 'Fredro', zaś spośród zapylaczy w dwóch kombinacjach pojawiła się odmiana 'Frontana LF 321'. Na podstawie analiz GISH ustalono, że wszystkie mieszańce były heksaploidami zawierającymi po jednym genomie R z żyta i jednym genomie D z pszenicy oraz po dwa genomy A i B. Obecność loci genów *Lr34* i *Lr46*



w materiałach mieszańcowych potwierdzono wykorzystując markery *csLV34*, *Xgwm44* i *csLV46G22*. Aż u 29 spośród 34 uzyskanych mieszańców stwierdzono występowanie markerów wskazujących na obecność obu genów horyzontalnej odporności. Mieszańce te mogą zostać wykorzystane jako materiały wyjściowe w hodowli nowych odmian pszenżyta o poprawionej odporności na choroby grzybowe.

Celem piątej pracy (publ.5), opublikowanej w czasopiśmie *Biomolecular Concept*, było porównanie użyteczności diagnostycznej markerów molekularnych *Xwmc44*, *Xgwm259*, *Xbarc80* i *csLV34G22* do identyfikacji locus genu *Lr46* w genotypach pszenicy. Marker *Xwmc44* pojawił się w 38 spośród 73 badanych genotypów, przy czym 29 odmian zostało pozytywnie zidentyfikowanych. Uzyskano jednocześnie 29 fałszywie negatywnych odczytów i 9 fałszywie pozytywnych. Marker *csLV34G22* okazał się najlepszy, pojawił się w 60 spośród 73 odmian i linii pszenicy, przy czym fałszywie pozytywne wyniki uzyskano czterokrotnie, zaś fałszywie negatywne trzykrotnie. Stwierdzono, że najbardziej wiarygodne informacje na temat obecności/braku warunkującego odporność allelu genu *Lr46* uzyskać można przy jednoczesnym zastosowaniu markerów *Xwmc44* oraz *csLV34G22*.

Bezpośrednio po tekstach publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej znajduje się rozdział III, w którym zaprezentowano 8 wniosków uzyskanych w efekcie przeprowadzonych badań. W rozdziale IV - polskojęzycznym streszczeniu, przedstawiono w skrócie najważniejsze aspekty poruszone w pracy, rozpoczynając od problemu coraz częstszego występowania chorób grzybowych na pszenżycie, które z założenia miało być bardziej odporną na choroby alternatywą dla pszenicy. Jako bardzo efektywny sposób poprawy odporności pszenżyta przedstawiono wprowadzanie genów warunkujących *slow rusting* – trwałą odporność roślin dorosłych na wiele ras patogenów. W pszenicy zidentyfikowano 8 tego typu genów, z których szczegółowej analizie poddano w pracy trzy: *Lr34*, *Lr46* i *Lr68*. Obecność tych genów w odmianach pszenicy i pszenżyta postulowano na podstawie wyników analiz molekularnych, które opracowano w oparciu o dostępne dane literaturowe. Oprócz oceny możliwości pojedynczego wykorzystania różnych markerów molekularnych do identyfikacji tych genów w materiale badawczym opracowano również multipleks PCR umożliwiający ocenę obecności markerów dla kilku genów w jednej mieszaninie reakcyjnej. Opisano również efekty przeprowadzonych krzyżowań międzygatunkowych. Streszczenie w języku polskim odpowiada streszczeniu w języku angielskim. Opracowanie zamyka rozdział VI zawierający oświadczenia autorów prac.

Z obowiązku recenzenta odnotowałam kilka uwag dotyczących rozprawy doktorskiej:

1. W rozprawie nie udało się uniknąć błędów, głównie stylistycznych. Użyto sformułowań:
 - ‘odporność przed wieloma rasami patogenów’ – odporność na
 - ‘patogena’ – w dopełniaczu formą prawidłową jest ‘patogenu’
 - ‘wiele markerów (...) zostało zaadoptowanych do analiz’ - zaadaptowanych.



- ‘w Canberry w Australii’ – w Canberrze w Australii
- ‘analizowano na obecność markerów’ – raczej pod kątem obecności, pod względem obecności
- ‘odmiana ‘Lerma Rojo’ charakteryzuje się długą żywotnością ze względu na odporność’
- ‘oczekiwany produkt markera (...) wynosi’
- ‘przy użyciu 70 odmian i linii z chińskich regionów pszenicy ozimej’

Użyto również słów ‘kit’ czy ‘skrining’, które są zapożyczeniami z języka angielskiego. Nie umniejsza to jednak w żaden sposób wartości merytorycznej pracy.

2. Zarówno w publikacjach, jak i ich opracowaniu zamiast ilości substancji wyrażonych w molach podawane są objętości. Dotyczy to zarówno analiz PCR, jak i GISH.
3. Ponadto optymalizacja warunków reakcji polegająca na zmianie objętości starterów, bez dostosowywania stężeń pozostałych składników mieszaniny również budzi wątpliwości i jest akceptowalna z praktycznego punktu widzenia, ale w konsekwencji powinny zostać przeliczone stężenia pozostałych składników w mieszaninie. Nieprawidłowe jest stwierdzenie, że ‘optymalizacja metody multipleks PCR opierała się o dobór odpowiedniej objętości startera dla wszystkich genów w obrębie każdego wariantu’.
4. Genomowa hybrydyzacja *in situ* GISH nie jest nowoczesną techniką hodowlaną tylko metodą diagnostyczną.
5. Opis wyników w rozdziale 5.1.5 dotyczy publikacji nr 5, a nie jak podano nr 3.

Podkreślam raz jeszcze, że zauważone przeze mnie błędy są mało znaczące i nie wpływają na moją wysoce pozytywną opinię na temat rozprawy.

W trakcie obrony chciałabym usłyszeć od Kandydatki odpowiedzi na poniższe pytania dotyczące pracy:

1. Czy markery molekularne uzyskiwane przy udziale starterów, które oprócz produktów specyficznych, będących znacznikiem obecności konkretnych alleli genów, inicjują syntezę produktów niespecyficznych powinny być wykorzystywane w reakcji multipleks PCR? Czy nie lepiej w takim przypadku wykorzystać sondy np. TaqMan lub KASP?
2. Czy odporność warunkowana genem *Lr46* jest skuteczna w warunkach Polski i czy przeprowadzono wieloletnie badania w warunkach polowych dla innych genów warunkujących odporność horyzontalną?
3. Czy nie warto na etapie opracowywania markerów molekularnych prowadzić równoległe testów fizjologicznych potwierdzających obecność poszczególnych alleli genów? Ewentualnie czy nie lepiej jest wykorzystywać materiały, na których takie testy zostały przeprowadzone? Postulowanie obecności genów na podstawie rodowodów jest wielce ryzykowne.
4. Ocena odporności polskich odmian pszenżyta jarego i ozimego w doświadczeniach PDO wskazuje na wysoką odporność badanych odmian na rdzę brunatną i rdzę żółtą. Czy można powiedzieć, że polskie odmiany pszenżyta są odporne na porażenie?



Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Roksany Bobrowskiej uznaję: (1) Opracowanie warunków multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji genów *Lr34*, *L46* i *Lr68* przy użyciu markerów *csLV34*, *Xwmc44* i *csGS*, (2) postulowanie na podstawie testów LTN i markerów molekularnych obecności genu *Lr46* w pszenzycie odmiany 'Kasyno', które może zostać bezpośrednio wykorzystane jako źródło tego genu w programach hodowlanych pszenżyta, (3) uzyskanie mieszańców międzygatunkowych o stabilnej liczbie chromosomów będących potencjalnymi posiadaczami spiramidyzowanych genów odporności typu *slow rusting* *Lr34* i *Lr46*, (4) wybór markera *csLV46G22* jako najbardziej wiarygodnego narzędzia molekularnego do identyfikacji genu *Lr46*. Szczególnie ważny jest aspekt aplikacyjny prowadzonych badań, czyli możliwość wykorzystania opracowanych testów molekularnych w selekcji wspomaganey markerami (MAS) w programach hodowli pszenicy i pszenżyta, a otrzymanych form mieszańcowych pszenżyta z pszenicą jako materiału wyjściowego w hodowli odpornościowej pszenżyta.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr inż. Roksany Bobrowskiej oceniam bardzo pozytywnie. Stanowi ona oryginalne, kompleksowe rozwiązanie problemu naukowego poszerzające aktualny stan wiedzy. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę Kandydatki w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane wyniki przedstawiają nie tylko wartość poznawczą, ale też mogą mieć praktyczne zastosowanie w hodowli pszenicy i pszenżyta w Polsce i na świecie.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Roksany Bobrowskiej pt. „Przeniesienie loci genów warunkujących odporność horyzontalną na rdzę brunatną z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) do pszenżyta (\times *Triticosecale* Wittmack)” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2021 r. poz. 478) stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z prośbą o dopuszczenie Pani mgr inż. Roksany Bobrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Edyta Penuś-Gusła

