

Radzików, 3.09.2022r.

Prof. dr hab. Jerzy H. Czembor

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Radzików, 05-870 Błonie

Recenzja rozprawy doktorskiej pn. „Przeniesienie loci genów warunkujących odporność horyzontalną na rdzę brunatną pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) do pszenżyta (*x Triticosecale* Wittmack)”

oraz dorobku naukowego mgr inż. Roksany Bobrowskiej

Pracę wykonano w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin, na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod opieką dr hab. Michała Kwiatka. Recenzję pracy wykonano na podstawie pisma Prof. dr hab. Andrzeja Biecharczyka, Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, zawierającego informacje o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej dla uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie agronomia, zgodnie z wymogami ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 poz. 1789).

Rozprawa doktorska Pani mgr. Roksany Bobrowskiej (Skowrońskiej) pt. „Przeniesienie loci genów warunkujących odporność horyzontalną na rdzę brunatną pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) do pszenżyta (*x Triticosecale* Wittmack)” zrealizowana w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo, jest cyklem pięciu spójnych tematycznie prac opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach. Została złożona wraz z następującymi dokumentami:

1. kopią dokumentu potwierdzającego posiadanie przez kandydatkę na doktora tytułu zawodowego,
2. streszczeniem rozprawy doktorskiej,
3. opinią promotora o rozprawie doktorskiej,
4. opinią kierownika Studiów Doktoranckich o przebiegu kształcenia na Studiach Doktoranckich UPP wraz z informacją o zaliczeniu wszystkich przedmiotów,
5. wykazem osiągnięć naukowych,
6. raportem z Jednolitego Systemu Antyplagiatowego,
7. życiorysem,
8. kwestionariuszem osobowym,
9. potwierdzeniem znajomości języka obcego nowożytnego, na poziomie co najmniej B2 po przeprowadzonym egzaminie.

Wymagane dokumenty zostały skompletowane w sposób właściwy.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska składa się z pięciu artykułów prezentujących oryginalne wyniki badań naukowych i opublikowane w czasopismach anglojęzycznych o wysokich wskaźnikach IF oraz punktacji na liście MEiN (o łącznej IF: 12,233 oraz sumarycznej liczbie punktów wg. MEiN: 550). Artykuły zostały wnikliwie ocenione i zrecenzowane przez osoby kompetentne w danej dziedzinie wiedzy. Jedna z publikacji opublikowana została w 2019 roku, trzy opublikowano w 2020 roku oraz jedną opublikowano w 2022 roku.

Są to:

1. Skowrońska R., Kwiatek M., Tomkowiak A., Nawracała J. 2019. Development of multiplex PCR to detect slow rust resistance genes Lr34 and Lr46 in wheat. *Journal of Applied Genetics*. 60:301–304. doi.org/10.1007/s13353-019-00520-z; IF: 3,240, pkt. wg MEiN: 140,00 (procentowy udział 60%); cytowania artykułu:
2. Skowrońska R., Tomkowiak A., Szwarc J., Nawracała J., Kwiatek M. 2020. Multiplex PCR assay for simultaneous identification of slow rust resistance genes Lr34, Lr46 and Lr68 in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research*. 60 (4): 388–398, doi.10.24425/jppr.2020.134914, pkt. wg MEiN: 100,00 (procentowy udział 60%)
3. Skowrońska R., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M.T. 2020. Molecular identification of slow rusting resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) cultivars. *Journal of Applied Genetics*, 60 (4): 359-366. doi: 10.1007/s13353-020-00562-8. IF: 3,240, pkt. wg MEiN: 140,00 (procentowy udział 60%)
4. Skowrońska R., Mariańska M., Ułaszewski W., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M.T. 2020. Development of Triticale \times Wheat Prebreeding Germplasm With Loci for Slow-Rusting Resistance. *Front. Plant Sci*. 11:447. doi: 10.3389/fpls.2020.00447, IF: 5,753, pkt. wg MEiN: 100,00 (procentowy udział 50%)
5. Bobrowska R., Noweiska A., Spychała J., Tomkowiak A., Nawracała J., Kwiatek M.T. 2022. Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the Lr46/Yr29 “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Biomolecular Concepts*. 13: 1–9. <https://doi.org/10.1515/bmc-2022-0002>. Pkt. wg MEiN: 70,00. (procentowy udział 60%)

Mgr. Roksana Skowrońska jest współautorem każdej z pięciu publikacji. Współautorami każdej z publikacji jest również kilkuosobowy zespół oraz promotor. W czterech z nich Pani Skowrońska jest wymieniona jako pierwszy autor. Podany opis wkładu Pani Roksany Bobrowskiej (Skowrońskiej) jest zgodny z informacją zawartą w klauzulach opublikowanych artykułów, oraz informuje o szacowanym wkładzie procentowym w publikacjach P1 – 3, 5 na poziomie 60,0%, a w publikacji P4 na poziomie 50,0%. Jest on komplementarny z opisanym wkładem podanym przez pozostałych współautorów publikacji. Informacje te potwierdzają

wiodącą rolę kandydatki we wszystkich etapach prowadzonych badań: planowaniu doświadczeń, prowadzeniu materiału roślinnego, przeprowadzeniu eksperymentów i wykonywaniu analiz, opracowywaniu wyników, interpretacji wyników oraz przygotowywaniu tekstów publikacji.

Rozprawa doktorska oprócz wymienionych artykułów została opatrzona autoreferatem, wprowadzeniem do tematyki badawczej, hipotezą badawczą i celem pracy doktorskiej, opisem wykorzystanych materiałów i stosowanych metod badawczych, opisem uzyskanych wyników i przedyskutowaniem wyników z wynikami opisanymi w dostępnej literaturze międzynarodowej oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Analiza wskazuje, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

➤ Ocena wyboru problematyki badawczej

Produkcja zbóż jest jednym z głównych kierunków produkcji rolniczej w Polsce. Zajmują one ważne miejsce w gospodarce kraju. W strukturze zasiewów w ostatnich latach zboża utrzymują się na poziomie około 75%. Struktura gatunkowa zbóż jest determinowana warunkami klimatycznymi i glebowymi. W krajowej produkcji zbóż dominuje pszenica, ale uprawa pszenżyta nabiera coraz większego znaczenia.

W skali świata, powierzchnia pszenżyta na świecie wynosi ok. 3,8 mln ha. Polska jest krajem o największej powierzchni uprawy tego zboża i stanowi ona 40,0% powierzchni uprawy w całej Europie (ponad 33,0 % powierzchni na całym świecie). Na 11,5 mln ton uzyskiwanego ziarna, 4 mln ton, czyli 34,8% wytwarzane jest przez producentów rolnych naszym kraju. Ziarno pszenżyta przeznacza się głównie na cele pastewne. Stanowi ono bardzo dobry surowiec paszowy, odpowiedni dla większości zwierząt gospodarskich. Wynika to z dobrej wartości pokarmowej ziarna pszenżyta uwarunkowanej wyższą zawartością białka, korzystnym składem aminokwasowym, wysoką wartością kaloryczną, lepszą strawnością i przyswajalnością w porównaniu do żyta.

Od niedawna odnotowuje się coraz większe zainteresowanie wykorzystaniem pszenżyta na cele energetyczne (produkcja bioetanolu). Dostępne są odmiany, których mąkę wykorzystuje się do wypieku chleba. Dzięki temu rolnicy produkują ziarno o wysokiej jakości na słabszych glebach.

Przez wiele lat pszenżyto uważano za gatunek stosunkowo odporny na patogeny. Jednak to uległo zmianie i obecnie obserwujemy coraz większe nasilenie występowania chorób na pszenżycie.

Odmiany odporne na choroby spełniają ważną funkcję w uprawie i ochronie roślin uprawnych. W najbliższych latach znacznie wzrośnie ich znaczenie, nie tylko ze względu na integrowaną ochronę roślin, ale także większego zapotrzebowania na nie systemów rolnictwa ekologicznego i niskonakładowego. Pełniejsze wykorzystanie odmian odpornych na stropy biotyczne i abiotyczne w praktyce produkcyjnej, w tym integrowanej ochronie roślin, wymaga coraz większej współpracy pomiędzy hodowcami roślin i fitopatologami i fizjologami roślin. Dzięki

tej współpracy możliwe jest wytworzenie odmian przydatnych dla integrowanej ochrony roślin w ramach rolnictwa zrównoważonego.

Odporność właściwa genotypu może być uwarunkowana genami dominującym ale jest dosyć łatwa do przełamania, ponieważ pojawiają się nowe rasy patogena wirulentne w stosunku do tych genów. Dlatego dużą uwagę należy przywiązywać do genów odporności typu *slow rusting*, które warunkują odporność rasowo niespecyficzną. Jest ona skuteczna względem różnych ras patogenu i charakteryzuje się względną trwałością, a efekt pojawiania się objawów może ulegać zmianom w zależności od warunków środowiska. Patogen potrzebuje dużo więcej czasu aby ją przełamać w stosunku do odporności pionowej, rasowo specyficzną. W procesie hodowli roślin można używać tych genów dodatkowo jako uzupełnienie genów specyficznych, głównych. Ostatnio coraz większa dostępność markerów molekularnych znacznie ułatwia proces piramidowania genów odporności, co uwzględnia również praca doktorska Pani mgr. Roksany Bobrowskiej (Skowrońskiej) dla trzech genów odporności pszenicy na typu *slow rusting*: *Lr34*, *Lr46*, *Lr68*.

Wobec wzrastającego znaczenia gospodarczego upraw pszenżyta, jak i wymogów stawianych rolnictwu w ramach integrowanej ochrony, wybór zakresu badawczego podjętego przez Panią mgr. Roksanę Bobrowską (Skowrońską) jest bardzo trafny. Jak słusznie podkreśla doktorantka, w ostatnich latach w uprawach pszenżyta notuje się coraz większe straty z powodu porażenia przez *Puccinia triticina*, a odporność warunkowana genami *slow rusting* stanowią ważne uzupełnienie odporności warunkowanej genami dominującymi.

➤ Wprowadzenie, hipoteza badawcza i cel pracy

Hipoteza badawcza została zdefiniowana w oparciu o treści omówione we wprowadzeniu, które obejmuje 19 stron i podzielone jest na podrozdziały, opisujące w sposób syntetyczny: (1) filogenezę, wykorzystanie i znaczenie pszenżyta, (2) znaczenie chorób grzybowych w uprawie pszenżyta, (3) hodowlę odpornościową zbóż, (4) techniki molekularne i cytogenetyczne w hodowli.

Wprowadzenie jest opracowane poprawnie, a na szczególną uwagę zasługuje podrozdział trzeci, który dobrze przygotowuje czytelnika do części badawczo-eksperymentalnej. W podrozdziale „Hodowla odpornościowa zbóż” doktorantka omawia bardzo wnikliwie opisane w doniesieniach literaturowych uwarunkowania genetyczne odporności pszenicy na rdzę brunatną w powiązaniu również do uwarunkowań genetycznych odporności pszenicy na rdzę żółtą. Podrozdział ten bezpośrednio uzasadnia cele podjętych prac. Wynika z niego jasno, że prace takie nie były dotychczas prowadzone oraz że tylko niektóre zespoły badawcze na świecie zajmują się tą problematyką.

Prowadzone badania zostały przedstawione w sześciu punktach, których uszczegółowienie o materiał badawczy i jakie geny obejmują ułatwiłaby wprowadzenie odbiorcy do dalszej części pracy podobnie jak fakt, że będą to formy ozime i jare zarówno pszenicy jak i pszenżyta. Podsumowaniem jest przedstawienie celu bezpośredniego pracy, w którym zabrakło uszczegółowienia jakie geny odporności będą wprowadzane do pszenżyta.

Podsumowując, zarówno wprowadzenie jak i hipoteza badawcza oraz cele pracy są zgodne z jej tytułem.

➤ Materiał badawczy

Materiał badawczy został skompletowany właściwie i był bardzo zróżnicowany, co zapewniało osiągnięcie założonych celów. Były to genotypy pszenżyta (20 odmian pszenżyta w tym 14 ozimego i 6 jarego) oraz genotypy pszenicy (2 genotypy ozimej i 71 jarej).

Tak liczną kolekcję pszenicy zwyczajnej stanowiły genotypy, dla których w doktorantka z doniesień literaturowych opisała pochodzenie oraz a w ramach własnych badań (publikacje P1, P2 i P4) określiła obecność specyficznych genów *slow rusting*, przez co jest ona unikalna w skali świata. Doktorantka pozyskała geotypy nawiązując kontakt z jednostkami prowadzącymi te kolekcje na całym świecie.

Genotypami referencyjnymi z genami *slow rusting* były ‘Lr34’ (dla genu *Lr34*), ‘Pavon 76V’ (dla genu *Lr46*) oraz ‘Parula’ (dla genu *Lr68*).

➤ Metody badawcze

Szczegółowy opis metodyki prowadzonych badań został opisany w publikacjach, które wchodzi w skład przedstawionego doktoratu. Doktorantka w rozdziale tym przedstawiła sumaryczny opis metod z odniesieniem do publikacji. Składa się on z 6 podrozdziałów.

Pierwszym podpunktem opisanym w rozdziale jest metodyka izolacji DNA. W każdym badaniach izolacja DNA do analiz molekularnych prowadzona była zgodnie z tym samym protokołem, co zapewniało uniknięcie często pojawiających się błędów technicznych.

Metodyka analiz molekularnych prowadzonych w trakcie badań opisanych w publikacjach opisana została w 4 podpunktach:

- Metodyka badań mających na celu jednoczesną identyfikację *locus* genów *Lr34*, *Lr46* oraz *Lr68* metodą multipleks PCR prowadzona była zgodnie z protokołami stosowanymi przez inne zespoły badawcze i w sposób szczegółowy opisane w publikacjach P1 i P2 (P1. Development of multiplex PCR to detect *slow rust* resistance genes *Lr34* and *Lr46* in wheat. *Journal of Applied Genetics*. 60:301–304 oraz P2. Multiplex PCR assay for simultaneous identification of slow rust resistance genes *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Protection Research*. 60 (4): 388–398). Modyfikacją własną był dobór temperatury dołączania starterów.
- Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami *Lr34* oraz *Lr46* w genotypach pszenicy oraz roślinach pokolenia F₁ uzyskanych na drodze krzyżowań pszenicy z pszenżytem opisana została w publikacji P4 (P4. Development of Triticale × Wheat Prebreeding Germplasm With Loci for Slow-Rusting Resistance. *Front. Plant Sci*. 11:447). Podkreślenia zasługuje fakt, że doktorantka posługiwała się nie tylko protokołem dostępnym w literaturze, ale wykazując inicjatywę nawiązała kontakt z wiodącym zespołem z CSIRO Plant Industry w Cannebery w Australii pracującym pod kierunkiem dr Evans’a Lagudah’a i dzięki jego uprzejmości pozyskała metodykę do realizacji tego etapu badań.

- Metodyka badań nad obecnością genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* w genomie pszenżyta została opisana w publikacji P3 (P3. Molecular identification of slow rusting resistance *Lr46/Yr29* gene locus in selected triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) cultivars. Journal of Applied Genetics, 60 (4): 359-366). Prace prowadzono na podstawie standardowych protokołów.
- Określenie przydatności markerów molekularnych metodą PCR do identyfikacji *locus* genu *Lr46* opisano w publikacji P5 (Diagnostic accuracy of genetic markers for identification of the *Lr46/Yr29* “slow rusting” locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) Biomolecular Concepts. 13: 1–9.)

W ramach badań opisanych w publikacji P3 obecność genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr68* w genomie 20 genotypów odporność na *Puccinia triticina* została opisana w doświadczeniu polowym uwzględniając marker morfologiczny LTN dla genów *slow rusting*.

Zakres prac opisanych ramach publikacji P4, która szczególnie koresponduje do osiągnięcia przez doktorantkę założonego celu pracy, obejmował nie tylko badania molekularne mające na celu identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami *Lr34* oraz *Lr46* w genotypach pszenicy oraz roślinach pokolenia F₁ ale również: analizę żywotności pyłku pszenicy, co warunkowało wskazanie genotypów do krzyżowań z pszenżytem; wyprowadzenie mieszańców pokolenia F₁ które były trudne od strony technicznej, ponieważ wykonanie krzyżowań wymagało zarówno dopasowania terminów kwitnienia form rodzicielskich jak i wykonania samych krzyżowań. Obejmowały one również badania cytogenetyczne. Prowadzono je według metodyki opracowanej we wcześniejszych badaniach i składały się z następujących po sobie etapów: wykonanie preparatów metodą trawienia enzymatycznego, izolacja genomowego DNA, przygotowanie sond molekularnych oraz blokera, genomowa hybrydyzacja in situ metodą GISH oraz analiza mikroskopowa za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

Dla badań molekularnych w każdej z publikacji wchodzącej w skład doktoratu przedstawiono rozdział elektroforetyczny oraz wizualizację wyników podobnie jak wizualizację analizy mikroskopowej.

➤ Wyniki i Dyskusja

Podobnie jak rozdział Metody badawcze w rozdziale Wyniki doktorantka w sposób syntetyczny i przejrzysty omówiła wyniki badań opisanych w publikacjach stanowiących doktorat a w rozdziale Dyskusja syntetyczne odniosła się do wyników opisanych przez inne zespoły badawcze.

Doktorantka wykazała, możliwość wykorzystania metody multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji badanych genów *slow rusting* w jednym genomie pszenicy zwyczajnej w różnych kombinacjach (publikacja P1). Dla jednego genotypu stwierdzono jednoczesną obecność trzech genów *Lr34+Lr46+Lr68* oraz wskazano genotypy, dla których stwierdzono obecność genów w dwóch kombinacjach jak następuje: *Lr34+Lr46* w trzech genotypach, *Lr46+l68* w jednym genotypie oraz *Lr34+Lr68*. Informacja, że materiał roślinny to pszenica zwyczajna podobnie

jak w publikacjach gdzie pojawiała się już w ich tytułach, wprowadzałyby odbiorcę do dalszego zapoznania się z treścią.

Bardzo ważnym elementem badań doktorantki było wykazanie potencjalnych markerów fizjologicznych dla odporności warunkowanej genem *Lr46*.

Materiałem roślinnym do realizacji prac opisanych w publikacji P4, które są bezpośrednio powiązane z celami doktoratu było 31 genotypów pszenicy zwyczajnej z kolekcji tego gatunku opracowanej przez doktorantkę wraz z opisaniem pochodzenia oraz pokolenie F₁ pszenżyto x pszenica. Potwierdzenie mieszańcowego pochodzenia pokolenia F₁ wykonano poprzez analizy cytogenetyczne metodą GISH. Dla pszenicy zwyczajnej określono obecność genów *slow rusting Lr34* i *Lr46* wykorzystując markery określone w publikacjach P1 i P2. Otrzymane kombinacje pszenżyto x pszenica zawierały odporne markery alleli powiązanych z genami *slow rusting Lr34* oraz *Lr46*. Potwierdziło to, że cel pracy został osiągnięty.

Wniosek końcowy

Cel pracy jakim było wprowadzenie do genomu pszenżyta *loci* trzech genów typu *slow rust* na rdzę brunatną pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) do pszenżyta (x *Triticosecale* Witt.) został osiągnięty. Wymagało to wieloetapowych badań, które w sposób spójny opisano w pięciu publikacjach. Należy docenić tak szerokie badania dotyczących pszenżyta, które jest ważnym gatunkiem uprawianym w warunkach Polski na glebach, które dominują w Polsce i nie są odpowiednie do uprawy pszenicy. Dlatego uzyskane wyniki mają bardzo duży wkład w rozwój nauki na poziomie ogólnoswiatowym jak również mają bardzo duże znaczenie aplikacyjne. Wykazano, że ściśle sprzężony marker *csLV46G22* może służyć do identyfikacji genu *Lr46*. Po opublikowaniu sekwencji starterów i protokołów może być on użyty w do selekcji wspomaganą markerami w programach hodowli pszenicy. Mieszańce F₁ pszenżyto x pszenica do których wprowadzono geny odporności typu *slow rust*, które warunkują bardziej trwałą odporność pszenicy na rdzę brunatną niż geny dominujące, są cennym materiałem wyjściowym do dalszych programów hodowlanych pszenżyta.

Przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr. Roksany Bobrowskiej (Skowrońskiej) spełnia wymagania ustawowe wobec prac doktorskich [art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1668)].

Stawiam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr. Roksany Bobrowskiej (Skowrońskiej) do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Z uwagi na dużą rangę naukową i utylitarną wyników tej pracy doktorskiej oraz wzorcowo opracowaną metodologię badań, a także szeroki zakres prac badawczych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Jerzy H. Czembor