

Prof. dr hab. Halina Wiśniewska
Instytut Genetyki Roślin
Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Gryni

pt.: "Identyfikacja funkcjonalnych markerów molekularnych dla genów odporności na wybrane choroby grzybowe pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) oraz ocena ekspresji cechy w zależności od genotypu rośliny"

1. Podstawa formalno-prawna opracowania recenzji

Recenzja została opracowana na zlecenie Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu Pana prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka z dnia 31.08.2020 r. (pismo RNDRIO 43/4000/2000).

Przedstawiona praca została wykonana w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin, pod kierunkiem prof. UP dr hab. Jerzego Nawracały. Promotorem pomocniczym była dr inż. Agnieszka Tomkowiak.

Przewód został wszczęty w obszarze nauk rolniczych, leśnych i weterynaryjnych w dziedzinie nauki rolnicze, w dyscyplinie agronomia.

2. Ocena wyboru problematyki badawczej

Przedstawiona do recenzji praca Pani mgr inż. Joanny Gryni dotyczy bardzo ważnej problematyki – badania odporności pszenicy zwyczajnej na porażenie przez grzyby patogeniczne i znalezienia funkcjonalnych markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi odporność na grzyby patogeniczne: *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* i *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Markery molekularne mają coraz większe znaczenie w hodowli roślin. Identyfikacja genów warunkujących ważne cechy użytkowe np. odporność na patogeniczne grzyby przy pomocy markerów molekularnych ułatwia i przyspiesza proces tworzenia nowych odmian. Markery te mogą być przydatne do selekcji materiałów hodowlanych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.), która jest najpowszechniej uprawianym zbożem na wszystkich kontynentach. To ziarna zbóż, a szczególnie ziarna pszenicy dostarczają większości spożywanego białka w żywieniu człowieka. Ziarno ma duże znaczenie jako surowiec chlebowy i paszowy. O plonowaniu

i cechach jakościowych ziarna w największym stopniu decyduje czynnik genetyczny. Wysoki udział zbóż w strukturze zasiewów i ograniczone zmianowanie powodują wzrost zagrożenia ze strony grzybów patogenicznych. Choroby wywoływane przez grzyby patogeniczne obniżają ilość uzyskiwanych plonów i pogarszają ich jakość. W zintegrowanej ochronie roślin odporność genetyczna jest bardzo istotna, ważna i uzasadniona. Rozbudowany genom pszenicy i pojawiające się często nowe rasy patogenów utrudniają prace nad zidentyfikowaniem funkcjonalnych markerów umożliwiającymi prowadzenie efektywnej selekcji MAS. Najbardziej przyjazną dla środowiska metodą ograniczenia strat powodowanych przez patogeny jest hodowla odmian odpornych. Wprowadzenie do nowo tworzonych odmian genów odporności jest najskuteczniejszą metodą ograniczenia strat powodowanych przez patogeniczne grzyby. Hodowla i uprawa odmian mało wrażliwych, o podwyższonej odporności nabiera coraz większego znaczenia w ochronie zbóż. Stąd wybranie tej tematyki badań uważam za bardzo ważne i uzasadnione.

3. Formalna ocena pracy

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w formie monografii, zgodnie z wymogami stawianymi tego typu opracowaniom. Praca liczy 203 strony i została podzielona na 10 rozdziałów: Wstęp i Cel pracy (I), Przegląd literatury (II), Materiał roślinny (III), Metodyka (IV), Wyniki (V), Dyskusja (VI), Wnioski (VII), Streszczenie w języku polskim (VIII) i angielskim (IX) oraz Literatura (X).

W obrębie **Przeglądu literatury**, **Materiałów** oraz **Wyników** Autorka wyodrębniła liczne podrozdziały, które porządkują szeroki zakres prac prowadzonych w rozprawie. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty.

Materiał i Wyniki badań Autorka udokumentowała w 29 tabelach, 20 wykresach, dwóch rycinach i 25 fotografiach. Praca zawiera bogate i właściwie dobrane piśmiennictwo (313 pozycji literaturowych).

Przyjęty układ pracy jest właściwy i opracowanie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

4. Merytoryczna ocena pracy

Tytuł rozprawy doktorskiej odpowiada zakresowi wykonanych w pracy badań.

Autorka w syntetycznym **Wstępie** wprowadza w temat, przedstawia najpowszechniej występujące choroby pszenicy ozimej, takie jak mączniak prawdziwy zbóż i traw powodowany przez *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, rdzę brunatną wywoływaną przez

Puccinia recondita f. sp. *tritici* i rdzę żółtą, której sprawcą jest *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Informuje o aktualnie poznanych genach warunkujących odporność na te patogeniczne grzyby. Przedstawia również jakie korzyści dla selekcji i tworzenia nowych odmian stanowi wykorzystanie markerów DNA i w ten sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Cel pracy postawiony jest jasno i wydzielono w nim cztery cele szczegółowe, które autorka konsekwentnie realizuje w rozprawie doktorskiej.

W kolejnym rozdziale **Przegląd literatury** Autorka przedstawia faktyczny stan badań w zakresie zagadnień prowadzonych w pracy. Obszerny przegląd badań szeroko udokumentowany jest cytowaną literaturą i wskazuje na bardzo dobre rozpoznanie tematu i dużą wiedzę. Autorka dokonuje bogatego przeglądu piśmiennictwa i opisuje zagadnienia związane z pochodzeniem i znaczeniem pszenicy zwyczajnej, chorobami pszenicy powodowanymi przez patogeniczne grzyby, wzbogacając ten rozdział autorskimi fotografiami przedstawiającymi objawy porażenia liści pszenicy przez badane w pracy grzyby patogeniczne. Omawia również hodowlę odpornościową w ostatnich latach, źródła i rodzaje odporności, geny odporności na omawiane choroby. Zapoznaje czytelnika z znaczeniem piramidyzacji genów odporności w jednym genotypie. Kolejny podrozdział Przeglądu Literatury dotyczy markerów molekularnych (wykorzystywanych do badania zróżnicowania genetycznego odmian i materiałów hodowlanych), selekcję z wykorzystaniem markerów molekularnych-MAS, markery molekularne dla genów odporności na patogeniczne grzyby. Omawia również nowoczesne technologie w hodowli roślin.

Podzielenie **Przeglądu literatury** na rozdziały i podrozdziały jest zasadne przy tak bogatej literaturze i sprawia, że rozdział ten jest bardzo przejrzysty.

Rozdział **Materiał Roślinny** opracowany został właściwie i bardzo czytelnie. Charakterystyka materiału do badań została zamieszczona w tabelach. Materiałem do badań były polskie odmiany jakościowe o dużej wartości gospodarczej i wysokim potencjale plonotwórczym: Tonacja, Rywalka, Torpeda i Wydma - podatne na porażenie przez grzyby patogeniczne, oraz dwie odmiany niemieckie: Tobak z genami *Pm2* i *Pm3a* i odmiana Lear z genami: *Pm2*, *Pm4b*, *Pm6*. Odmiany niemieckie stanowiły źródło odporności na grzyby patogeniczne: *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* i *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Do badań włączono odmianę Torpeda o dużej wartości gospodarczej i odpornej na porażenie przez grzyby patogeniczne.

Z wykorzystaniem wymienionych odmian wykonano w latach 2012, 2013 i 2014 szereg przekrzyżowań. Materiał roślinny do badań molekularnych stanowiły odmiany referencyjne otrzymane z Banków Genów, posiadające znane geny odporności na *Blumeria graminis* f.

sp. *tritici* oraz *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* i *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Posłużyły one jako wzorce w analizach molekularnych do oceny prawidłowości przeprowadzonych reakcji PCR dla markerów molekularnych.

Podobnie rozdział **Metodyka** zredagowany jest również bardzo jasno i zrozumiale. Realizując założenia pracy przeprowadzono doświadczenia polowe i analizy molekularne. Sposób założenia doświadczeń polowych przedstawiono na rycinach, opisano przeprowadzone zabiegi uprawowo-pielęgnacyjne. Przedstawiono ocenę stopnia porażenia w warunkach naturalnych badanych genotypów pszenicy ozimej przez badane w pracy grzyby patogeniczne, stosując metodykę przyjętą przez Centralny Ośrodek Badań Odmian Roślin Uprawnych. Autorka badała rozkład zmienności porażenia pszenicy przez grzyby patogeniczne: *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* i *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* w warunkach polowych, naturalnych dla badanych genotypów pszenicy ozimej. Uzupełnieniem badań byłoby przeprowadzenie testów inokulacyjnych badanych genotypów pszenicy ozimej z wykorzystaniem szczepów *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* i *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* w kontrolowanych, optymalnych warunkach dla rozwoju patogenów. Środowisko naturalne mogło generować kilka zmiennych mających wpływ na ekspresję genów.

Grzyb patogeniczny *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* poraża pszenice każdego roku, co wynika z dużych zdolności adaptacyjnych patogena do zmiennych warunków pogodowych, szczególnie do warunków wilgotnościowych, co potwierdzają wyniki recenzowanej pracy, w której wykazano, że różnice w stopniu odporności badanych genotypów występowały tylko pomiędzy poszczególnymi kombinacjami krzyżowania. Natomiast grzyb *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* nie wykazuje tak dużej tolerancji na warunki pogodowe. Zakażaniu roślin przez grzyb *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* sprzyja łagodna zima i jesień, wysoka wilgotność powietrza oraz temperatura od 10 do 20° Celsjusza. Badania prowadzone w prezentowanej pracy wykazały, że różnice w stopniu porażenia genotypów pszenicy w poszczególnych lokalizacjach wynikały ze zmiennych warunków pogodowych w poszczególnych latach. Jeżeli w 2014 roku w miejscowości Dłoń nie było warunków sprzyjających rozwojowi grzyba, to nie obserwowano na roślinach objawów rdzy brunatnej. Podobnie *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* charakteryzuje się największymi wymaganiami wilgotnościowymi oraz największą wrażliwością na wahania temperatury. Łagodna zima, chłodne i wilgotne lato sprzyja rozwojowi grzyba. Dlatego dla tych grzybów z rodzaju *Puccinia* zalecane jest również przeprowadzenie testów inokulacyjnych w kontrolowanych warunkach, optymalnych dla

rozwoju grzyba dla określenia ekspresji genów związanych z odpornością na patogeniczne grzyby.

W recenzowanej pracy badano również cechy morfologiczne i elementy struktury plonu. Wyniki otrzymane z przeprowadzonych obserwacji polowych poddano analizie statystycznej dla wykazania powiązań i współzależności pomiędzy analizowanymi cechami.

Przedstawiono szczegółowo analizy molekularne: metodykę identyfikacji markerów molekularnych, metodykę genotypowania, metodą sekwencjonowania DArTseq, mapowania asocjacyjnego z wykorzystaniem analizy GWAS i analizę BLAST zidentyfikowanych sekwencji SilicoDArT i SNP.

Rozdział **Wyniki** zawarty jest na 78 stronach. Wyniki przedstawiono na czytelnych wykresach (22), w tabelach (18) i na 25 fotografiach. Rozdział ten jest bardzo przejrzysty. Autorka przedstawia dane dotyczące warunków meteorologicznych, w czasie trzyletnich badań prowadzonych w dwóch lokalizacjach, co jest bardzo ważne i wskazane jeżeli prowadzono badania dotyczące chorób roślin wywoływanych przez grzyby patogeniczne. Dane z trzech lat i dwóch lokalizacji dotyczące temperatury i wilgotności zamieszczono na czytelnych wykresach. Autorka przedstawiła charakterystykę genotypów rodzicielskich i roślin pochodzących z kolejnych pokoleń (ocenę porażenia przez patogeniczne grzyby, charakterystykę cech morfologicznych i cech komponentów plonu). Wykonano badania molekularne związane z identyfikacją genów warunkujących odporność na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*Pm*), rdze brunatną (*Lr*) z wykorzystaniem specyficznych markerów molekularnych sprzężonych z genami *Pm2*, *Pm3a*, *Pm4b*, *Pm6* oraz *Lr 11*, *L313*, *Lr 16* i *Lr19*). Do analiz wykorzystano technologię DArTseq do poszukiwania markerów warunkujących odporność na rdzę żółtą (*Yr*).

Przedstawiono również wyniki genotypowania z wykorzystaniem metody DArTseq i mapowania asocjacyjnego. Wszystkie wyniki autorka zamieściła w tabelach oraz na fotografiach. Mimo licznych wyników badań zaprezentowanych w pracy, są one przedstawione bardzo jasno i zrozumiale.

W rozdziale **Dyskusja** zawartym na 34 stronach Autorka omawia uzyskane wyniki z wykorzystaniem właściwie dobranych pozycji piśmiennictwa polskiego i zagranicznego. Ten rozdział świadczy o dobrym przygotowaniu Autorki do prowadzonych badań.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Autorka zamieściła w rozprawie 8 syntetycznie sformułowanych wniosków. Jako najbardziej cenne uważam wnioski 1 i 2 związane z funkcjonalnymi markerami do identyfikacji genów *Pm2*, *Pm3a*, *Pm4b* i *Pm6* i *Lr*

11, Lr 13, Lr 16, Lr 19. Te markery mogą stanowić skuteczne narzędzie do selekcji roślin w hodowli nowych odmian z wykorzystaniem markerów molekularnych.

Dysertację zamyka rozdział **Literatura**. W monografii zacytowano 313 pozycji literaturowych, gdzie około 74% cytowanej literatury stanowią publikacje autorów zagranicznych, a 140 prac publikowanych jest w ostatnim dziesięcioleciu. Świadczy to o dobrej znajomości piśmiennictwa i prawidłowym dobraniu do tematyki i celów rozprawy.

Uwagi:

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o kilku niedociągnięciach, których nie ustrzegła się Autorka przesłanej do recenzji rozprawy doktorskiej. Moje uwagi dotyczą terminologii i redakcji:

1. Autorka w kilku miejscach w rozdziale Przegląd Literatury i Dyskusja (str. 45, 141, 143) np. strona 144 pisze: „... Porażenie roślin pszenicy ozimej rdzą brunatną było bardziej zróżnicowane w porównaniu do porażenia przez mączniaka prawdziwego traw i zbóż”.. Rośliny nie porażają się rdzą czy mączniakiem prawdziwym zbóż i traw. Roślinę poraża patogen np. *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* czy *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. W wyniku porażenia występują na roślinie objawy chorobowe: rdza brunatna, mączniak prawdziwy zbóż i traw, czy rdza żółta.
2. Brak w spisie literatury kilku cytowanych w tekście pozycji:
Castro i in. 2003, Wiersma i in. 2017, Williams i in. 1990, Blanco i in. 2008, McCartney i in. 2005, Wang i in. 2008, Somers i in. 2004, Smiałowski i in. 2006,
3. Uwaga dotyczy tytułów tabel i wykresów oraz fotografii prezentowanych w rozprawie. Tytuły rozdziałów, podrozdziałów, podpisy pod rysunkami, tytuły tabel nie powinny kończyć się kropką.

Podsumowanie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest opracowaniem bardzo wartościowym. Autorka zrealizowała postawione cele. Forma opracowania rozprawy doktorskiej świadczy o dobrym opanowaniu przez Autorkę warsztatu badawczego. Drobne uchybienia w pracy nie

umniejszają wysokiej wartości recenzowanej pracy i mogą być usunięte przed oddaniem pracy do druku.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Gryni pt.: **"Identyfikacja funkcjonalnych markerów molekularnych dla genów odporności na wybrane choroby grzybowe pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) oraz ocena ekspresji cechy w zależności od genotypu rośliny"** spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim z dziedziny nauk rolniczych w dyscyplinie Rolnictwo i Ogrodnictwo zgodnie z ustawą z dnia 18 marca 2011 o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw (Dz. U. 2011 nr 84, poz. 455) z późn. zm. oraz Rozporządzeniem MNiSW z dnia 20 września 2018 roku (Dz.U. z 2018 r. poz.1818). Całość pracy oceniam pozytywnie i bardzo wysoko. Autorka wykazała się dużą wiedzą, dobrą znajomością literatury i metod badawczych oraz starannością i poprawnością interpretacji wyników. Wnoszę więc do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Joanny Gryni do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, duże walory poznawcze, oryginalność zastosowanych narzędzi badawczych oraz możliwość wykorzystania w hodowli twórczej składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Halina Wiśniewska



Poznań, dnia 13 października 2020 r.