

Lublin, 08.10.2020

Prof. dr hab. Krzysztof Kowalczyk
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15
20-950 Lublin

R e c e n z j a

pracy doktorskiej pt. „Identyfikacja funkcjonalnych markerów molekularnych dla genów odporności na wybrane choroby pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) oraz ocena ekspresji cechy w zależności od genotypu rośliny” wykonanej przez mgr inż. Joannę Grynię w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Jerzego Nawracały prof. UPP oraz promotora pomocniczego dr inż. Agnieszki Tomkowiak

Ocena problematyki badawczej

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest jednym z najważniejszych zbóż uprawianych na świecie. Ogromne znaczenie ekonomiczne tego gatunku, tak dla wyżywienia ludzi, jak również dla przemysłu sprawia, że jest to obiekt intensywnych badań naukowców z różnych dziedzin i dyscyplin. Prowadzone prace badawcze zarówno o znaczeniu podstawowym jak i aplikacyjnym mają na celu poprawę wartości gospodarczej tego gatunku uwarunkowanej wielkością i jakością plonu oraz ograniczenie strat ziarna powodowanych przez czynniki stresowe. Do najważniejszych czynników biotycznych wpływających na redukcję plonu należą choroby grzybowe. Najgroźniejszymi chorobami grzybowymi, które występują powszechnie w wielu rejonach uprawy pszenicy zwyczajnej na świecie są: rdze, mączniak prawdziwy, septoriozy oraz fuzariozy. Proces hodowli nowych odmian pszenicy zwyczajnej, tolerancyjnych na choroby grzybowe jest długi i trudny. Wymaga identyfikacji efektywnych genów nadających odporność na populacje patogenów występujących w danym rejonie, poprzez ich introdukcję do materiałów hodowlanych i w kolejnym etapie wieloletnią selekcję. Usprawnienie i skrócenie procesu selekcji form odpornych można uzyskać poprzez zastosowanie markerów DNA. Jednak nie wszystkie markery opisane w literaturze mogą być aplikowane do praktycznej hodowli. Weryfikacja markerów z wykorzystaniem różnych materiałów hodowlanych pszenicy zwyczajnej jest niezwykle istotna i powinna być

wykonana przed zastosowaniem określonych markerów DNA w praktycznej hodowli. Bardzo ważne jest również poznanie ekspresji danej cechy w warunkach polowych, gdyż szereg genów odporności nie jest już efektywnych przeciwko obecnie występującym populacjom patogenów. Piramidowanie genów odporności jest wysoce efektywne, jednak wymaga pewności w identyfikacji wprowadzanych genów w materiałach hodowlanych. Te bardzo istotne problemy związane z praktycznym wykorzystaniem markerów DNA w selekcji pszenicy zwyczajnej były przedmiotem w pracy doktorskiej. Biorąc pod uwagę wyżej przedstawione problemy uważam, że temat pracy doktorskiej podjętej przez mgr inż. Joannę Grynię jest niezwykle ważny nie tylko dla weryfikacji wiedzy z zakresu oceny przydatności wybranych markerów DNA do identyfikacji wybranych genów odporności pszenicy zwyczajnej na choroby grzybowe, ale również dla praktycznej hodowli tego zboża.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 203 strony. Zawiera 36 tabel, 43 ryciny (w tym elektroforegramy obejmujące dokumentację analiz DNA) oraz cytowania 313 pozycji literaturowych z tego 229 anglojęzycznych. Pani Magister w pracy doktorskiej cytuje ważne opracowania pochodzące z ubiegłego wieku oraz znaczną część literatury najnowszej, spośród których 156 pozycji stanowią publikacje pochodzące z ostatniej dekady. Praca doktorska składa się ze streszczeń przedstawionych w językach: polskim i angielskim oraz rozdziałów: Wstęp, w którym zawarty jest również cel pracy, Przegląd piśmiennictwa, Materiał roślinny, Metodyka, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Rozdziały są podzielone na podrozdziały. Tabele i ryciny są czytelne i bardzo dobrze zredagowane. Kompozycja i treści zawarte w poszczególnych rozdziałach są typowe dla tego typu opracowań.

Ocena merytoryczna rozprawy

We wstępie Autorka odniosła się w zarysie do problemów stanowiących zakres dysertacji doktorskiej i zakończyła ten rozdział przedstawieniem celu pracy. W celach szczegółowych podała, że podjęła się identyfikacji markerów funkcjonalnych sprzężonych z genami warunkującymi odporność na wybrane choroby grzybowe. Po zapoznaniu się z treścią pracy doktorskiej i zakresem wykonanych badań sądzę, że bardziej Doktorantce chodziło o weryfikację przydatności markerów DNA do identyfikacji wybranych genów odporności na choroby grzybowe niż identyfikację markerów funkcjonalnych. Pozostałe cele szczegółowe są określone właściwie.

W rozdziale „Przegląd literatury” Pani Magister przedstawiła informacje dotyczące znaczenia gospodarczego pszenicy zwyczajnej, początki uprawy tego zboża, dane dotyczące taksonomii i pochodzenia. Rozdział ten wymaga pewnego uporządkowania. Doktorantka na stronie 11 podaje, że w wyniku „drugiej poliploidyzacji między *T. turgidum* a diploidalną trawą *Aegilops tauschii* (DD) dała przodka alloheksaploidalnego”, zaś na stronie 12 pisze, że dawcą genomu D był *Aegilops squarrosa*. Te dwie różne nazwy gatunkowe oznaczają ten sam gatunek. W pracy należy stosować ujednolicony zapis. Podobnie w innym miejscu Pani Magister używa określenia *Haynaldia villosa* i *Dasypyrum villosum*. Podobnie w tym przypadku nazwy te oznaczają ten sam gatunek. Według obecnie przyjętej systematyki należy używać nazwy gatunkowej *Dasypyrum villosum*. Bardzo dobrze jest opracowana część dotycząca charakterystyki grzybów powodujących choroby: mączniaka prawdziwego, rdzy brunatnej i żółtej oraz charakterystyka źródeł odporności na choroby powodowane przez te patogeny, a także rodzaje odporności i charakterystyka genów warunkujących odporność. Na stronie 26 Doktorantka pisze, że *Triticum spelta* należy do gatunków tetraploidalnych, co nie jest prawdą, gdyż jest to gatunek heksaploidalny. Pani Magister w przeglądzie literatury bardzo dobrze scharakteryzowała strategię hodowli odpornych odmian pszenicy zwyczajnej poprzez piramidowanie genów, podając liczne przykłady z piśmiennictwa oraz opisała selekcję wspieraną markerami DNA. Doktorantka scharakteryzowała różne typy markerów DNA zwracając szczególną uwagę na te, które są najbardziej przydatne w selekcji wspieranej markerami. Bardzo dobrze opisała również najnowocześniejsze techniki analiz molekularnych, które mają duże potencjalne zastosowanie w praktycznej hodowli.

W rozdziale „Przegląd literatury” występują jednak pewne nieprawidłowości. Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem Doktorantki, że pszenica ma największy genom spośród roślin, gdyż są rośliny posiadające większe rozmiary genomów. Pani Magister na stronie 32 niezbyt precyzyjnie odniosła się do testów fitopatologicznych wykorzystywanych do identyfikacji genów odporności na choroby grzybowe. Do poprawnej identyfikacji tą metodą potrzebny jest zestaw izolatów wyselekcjonowanych z pojedynczych zarodników wykazujących wirulencje i awirulencje. Zestaw wirulentnych izolatów jest niewystarczający do poprawnej identyfikacji genów odporności za pomocą testów fitopatologicznych. Opisując markery DNA nie należy utożsamiać techniki z typem lub rodzajem markera.

Rozdział „Materiał roślinny” został opracowany bardzo dobrze. Doktorantka scharakteryzowała badane odmiany pszenicy zwyczajnej zarówno te, które wykorzystwała do otrzymania mieszańców, jak również formy kontrolne zawierające określone geny odporności na choroby grzybowe. Rozdział „Metodyka” jest również opracowany właściwie. W kolejnych podrozdziałach Pani Magister szczegółowo opisała zastosowane metody badawcze,

które dodatkowo przedstawiła na schematach w postaci rycin. Metody te są dobrane właściwie i umożliwiły przeprowadzenie zaplanowanych badań. Moim zdaniem należy zmienić tytuł podrozdziału 3.7. gdyż jego treść nie koresponduje z identyfikacją markerów DNA, ale z identyfikacją genów odporności za pomocą markerów DNA

W rozdziale czwartym Doktorantka syntetycznie opisała interesujące wyniki badań, które są przedstawione w czytelnych i dobrze opracowanych tabelach oraz na rycinach. Pani Magister rozpoczęła opis wyników badań od analizy czynników atmosferycznych, które mają zawsze bardzo istotny wpływ na stopień porażenia roślin pszenicy zwyczajnej w warunkach polowych. Następnie opisała wyniki badań dotyczące porażenia przez choroby badanych odmian, wykazując pewne różnice zarówno pomiędzy lokalizacjami jak i odmianami. Wykonała również analizę elementów plonu badanych form. Zasadnicza część treści tego rozdziału dotyczy oceny przydatności markerów DNA do identyfikacji wybranych genów odporności w analizowanych odmianach i mieszańcach. Uzyskane wyniki badań są opisane właściwie, jednak nie zawsze właściwie są powiązane z wynikami porażenia w warunkach polowych. Na przykład w tabeli 21 Doktorantka podaje, że dla odmian Tobak i Torpeda wykazano zbieżność oceny fenotypowej z wynikami analiz molekularnych. Jednak nie została wykonana analiza wpływu pojedynczego genu *Pm4b* na stopień porażenia badanych roślin. W odmianach Torpeda i Rywalka Pani Magister za pomocą markerów DNA zidentyfikowała te same geny odporności na mączniaka prawdziwego, ale polowa odporność tych odmian na ten patogen była istotnie różna. Czym należy tłumaczyć te różnice? Na 111 str. Doktorantka pisze, że wykazała obecność trzech tych samych genów odporności na rdzę brunatną w odmianach Tonacja i Torpeda „...co było zgodne z oceną stopnia porażenia w warunkach polowych...” , ale w tabeli 15 podała, że odmiany te istotnie różniły się pod względem wartości tej cechy. Ponadto w rozdziale „Wyniki” często Doktorantka używa określenia „rośliny porażały się”. Nie jest to poprawne określenie, gdyż rośliny były porażane przez badane patogeny. Dobrze opracowane i opisane są wyniki badań dotyczące analizy GWAS, silicoDArT i identyfikacji markerów SNP.

Kolejny rozdział pt. „Dyskusja” jest obszerny ale właściwie zredagowany. Doktorantka wykazała w nim dobrą znajomość omawianych w pracy problemów i umiejętność porównania ich z badaniami innych autorów. Pozycje piśmiennictwa są trafnie dobrane i cytowane w powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań własnych. W rozdziale tym występują nieliczne nieścisłości np. na 142 str. Doktorantka pisze, że „Wśród ocenianych odmian pszenicy ozimej były genotypy całkowicie odporne na porażenie ... przez patogeny grzybowe”. Jednak analizując wyniki badań uważam, że takich form nie było. Również z dużą ostrożnością należy podchodzić do stwierdzenia, iż wykazanie za pomocą markerów

DNA obecności w określonych genotypach genów odporności na choroby, potwierdza przydatność tych markerów w selekcji.

Wnioski są krótkie, logiczne i rzeczowe, ale nie wszystkie w pełni wynikają z przeprowadzonych badań. Moim zdaniem wniosek trzeci nie jest powiązany z przeprowadzonymi badaniami w pracy doktorskiej. Marker *Whs 350* może, co najwyżej wskazywać na potencjalną formę alleliczną genu odporności na mączniaka prawdziwego *Pm2*. Również wniosek 7 nie w pełni koresponduje z uzyskanymi w pracy doktorskiej wynikami polowej odporności na rdzę brunatną.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca jest interesująca. Założone cele badawcze przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały rozwiązane w wyniku przeprowadzonych badań. Osiągnięcia badawcze zastały porównane i przedyskutowane z danymi z literatury. Uwagi, które przedstawiłem w recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i jej dużej wartości aplikacyjnej w praktycznej hodowli odpornościowej pszenicy zwyczajnej. Uważam, że spełnia ona wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), oraz ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1668) i art. 179 ust. 1. ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669).

Stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Gryni pt. „Identyfikacja funkcjonalnych markerów molekularnych dla genów odporności na wybrane choroby pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) oraz ocena ekspresji cechy w zależności od genotypu rośliny” do publicznej obrony.

