

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29-Listopada 54, 31-425 Kraków
e-mail: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.:

Analiza ekspresji genów i analiza cytomolekularna form pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z introgresją chromatyny gatunków pokrewnych warunkującej odporność na rdzę brunatną

autor rozprawy:

mgr inż. Aleksandra Noweiska

PODSTAWOWE DANE O AUTORZE ROZPRAWY

Pani **Aleksandra Noweiska** ukończyła studia na kierunku *biotechnologia* w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu (UPP) 25 czerwca 2020 r. z wynikiem bardzo dobrym, uzyskując tytuł magistra inżyniera na podstawie pracy pt. Cytogenetyczna analiza porównawcza chromosomów pszenic diploidalnych *Triticum monococcum* L. i *T. urartu* Thumanjan ex Gandilyan, realizowanej pod opieką **prof. dr hab. Michała Kwiatka**. W tym samym roku rozpoczęła kształcenie w Szkole Doktorskiej UPP. Badania do swojej pracy doktorskiej prowadziła także pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Kwiatka. Z przedstawionej dokumentacji wynika, że Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora. Od 1 lipca 2024 r. jest zatrudniona na stanowisku asystenta w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy. W krótkim okresie swojej dotychczasowej aktywności badawczej (2020-2024) może pochwalić się bardzo bogatym dorobkiem publikacyjnym – stanowi go **10 artykułów** opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych o uznanej renomie w dziedzinie nauk o roślinach, znajdujących się w bazie *Journal Citation Report* (JCR) o sumarycznym IF = 29,15 i punktacji MNiSW = 1030. Te najwcześniejsze prace pochodzą z roku 2020 i 2021, co sugeruje, że obejmują wyniki badań wygenerowane jeszcze podczas studiów Autorki, świadcząc nie tylko o jej rzetelnym warsztacie laboratoryjnym, ale także o pasji naukowej i ogromnym zaangażowaniu w pracę badawczą.

INFORMACJE NA TEMAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

OCENA UKŁADU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę hybrydową tzn. obejmuje wyniki opublikowane w dwóch artykułach naukowych oraz wyniki nieopublikowane, przedstawione w rozprawie w postaci monografii. Całość stanowi spójne tematycznie opracowanie liczące 100 stron maszynopisu z wydzielonymi rozdziałami typowymi dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych, w tym 15 rycin i 29 tabel, ponadto kopie dwóch opublikowanych artykułów wchodzących w skład opracowania oraz oświadczenia autorów o współautorstwie. Zasadniczy tekst monografii poprzedzony jest wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim i zakończony bibliografią oraz spisem tabel i rycin. Część opisowa monografii obejmuje rozdziały: wprowadzenie, hipotezę badawczą i cele pracy doktorskiej, materiał i metody, wyniki, dyskusję oraz podsumowanie i wnioski. Od strony językowej praca napisana jest poprawną polszczyzną, w większości przypadków poprawnie zredagowana, choć w kilku miejscach w stosunku do rzeczowników policzalnych Autorka używa niepoprawnego zwrotu dla określenia ich stanu liczbowego tj. słowa ilość a nie liczba np. ilość ras (str. 14) czy ilość wykastrowanych kwiatów (str. 31).

OCENA ZASTOSOWANEGO PIŚMIENICTWA

Autorka odwołuje się do piśmiennictwa (w sumie 102 pozycje literatury) z zakresu prowadzonych badań zasadniczo w trzech rozdziałach swojej dysertacji: Wprowadzeniu, Materiale i metodach oraz Dyskusji. Rozdział Wprowadzenie liczy 11 stron, jest podzielony na sześć podrozdziałów i stanowi przegląd literatury nt. tematyki badawczej przedstawionej w pracy doktorskiej. Na wstępie Autorka przytacza dane nt. pochodzenia pszenicy i obecnych regionów jej uprawy na świecie. Następnie porusza zagadnienia ewolucji pszenicy jako gatunku, ze szczególnym uwzględnieniem pochodzenia genomów składowych (A, B i D) współcześnie uprawianej pszenicy zwyczajnej. W dalszej kolejności zostają przedstawione zagrożenia w uprawie pszenicy ze strony czynników biotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem rdzy brunatnej (wywoływanej przez grzyba *Puccinia triticina*), zidentyfikowanych genów odporności na rdzę brunatną oraz wskazaniem gatunków pokrewnych, które mogą być rezerwuarem genów odporności. Ostatnie zagadnienia poruszane w tym rozdziale obejmują informacje nt. hodowli odpornościowej oraz reakcji rośliny na patogen ze szczególnym uwzględnieniem białek związanych z patogenezą (PR). Treści przedstawione w tej części rozprawy uważam za właściwie dobrane i prawie wyczerpujące w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej. **Tekst został przygotowany w oparciu o liczną, w tym najnowszą, literaturę anglojęzyczną opublikowaną w uznanych czasopismach naukowych.** Wynika z niego, że Autorka jest dobrze zorientowana o stanie aktualnej wiedzy w zakresie poruszanej tematyki. **Brakuje** mi natomiast w tej części dysertacji **informacji nt. struktury kariotypu pszenicy**, np. poglądowego kariogramu czy idiogramu, pokazującego morfologię poszczególnych chromosomów – w kontekście analizy introgresji chromatynowych gatunków pokrewnych, co jest istotnym elementem niniejszego

opracowania, takie informacje ułatwiłyby weryfikację i zrozumienie wyników analiz cytogenetycznych. Wydaje mi się także, że oprócz informacji nt. strategii hodowli odpornościowej u pszenicy w tej części pracy powinny się znaleźć podstawowe **informacje nt. stosowanych obecnie metod/strategii w hodowli nowych odmian pszenicy** – liczę, że Autorka odniesie się do tych kwestii podczas publicznej obrony. Poniżej drobne uwagi/pytania jakie nasunęły mi się podczas analizowania do tej części pracy:

1. Str. 15 – drugi akapit: pierwszorzędowa i drugorzędowa pula genowa opisana jest tymi samymi rodzajami co nie zgadza się z ryc. 2; jakie manipulacje cytogenetyczne Autorka miała na myśli w kontekście transferu genów (to samo stwierdzenie na str. 16: transfer genów wymaga specjalnych technik cytogenetycznych)?
2. Ciekawa jestem czy wykorzystywano somatyczną hybrydyzację u pszenicy do wprowadzenia genów odporności na czynniki biotyczne? Czy ewentualne badania dały pozytywne wyniki i czy somatyczna hybrydyzacja u pszenicy jest powszechnie wykorzystywana w programach hodowlanych?
3. Czy są dostępne odmiany komercyjne pszenicy (krajowe/zagraniczne) z genami odporności badanymi przez Autorkę?

WSKAZANIE I OCENA CELU PRACY

Autorka **prawidłowo sprecyzowała hipotezę badawczą** oraz wskazała **6 logicznych i zasadnych celów badawczych**, w ramach których postawiona hipoteza była weryfikowana. Sformułowane cele badawcze nakreślają zakres działań, które pozwolą odpowiedzieć na pytanie czy piramidyzacja genów odporności w porównaniu z odpornością warunkowaną przez jeden gen jest bardziej efektywna oraz czy istnieje związek między wielkością translokacji a jej dziedziczeniem. **Szeroki zakres działań** nakreślony przez Autorkę obejmował: 1) analizę krótkiego ramienia chromosomu związanego z markerami *locus Lr63* u diploidalnych gatunków pszenic, 2) identyfikację genów odporności *Lr* w genotypach pszenicy zwyczajnej z wykorzystaniem markerów molekularnych, 3) identyfikację obcych segmentów chromatyny pochodzących z gatunków *Thinopyrum* i *Secale cereale*, 4) opracowanie protokołu multiplex PCR do jednoczesnej identyfikacji markerów sprzężonych z 4 genami rodziny *Lr* oraz 5) wyprowadzenie stosownych mieszańców (pokolenia F1-F3) oraz ich analiza molekularna, odporności po inokulacji patogenem (pokolenie F3) oraz poziomu ekspresji genów PR (pokolenie F3).

WSKAZANIE I OCENA ZASTOSOWANYCH METOD BADAWCZYCH

Rozdział Materiały i metody obejmuje 10 stron maszynopisu i standardowo opisuje materiał badawczy wykorzystany w badaniach i stosowane metody, łącznie dla wszystkich badań (tj. z uwzględnieniem tych opublikowanych w dwóch artykułach). W sumie do wszystkich analiz Autorka wykorzystwała bardzo liczną i różnorodną genetycznie i geograficznie kolekcję 41 obiektów *Triticum*. Obejmowała ona 25 genotypów pszenicy zwyczajnej jarej ze wskazaną w rodowodzie introgresją z gatunków pokrewnych warunkującą odporność na rdzę brunatną

oraz 16 form diploidalnych *Triticum* do analizy markerów genów sprzężonych z genami odporności. **Zestaw wykorzystanych metod jest szeroki i prawidłowo dobrany** do realizacji założonych celów. Autorka w swoich badaniach stosowała trzy typy technik badawczych tj.

- 1) **techniki analizy molekularnej** obejmujące m.in.: izolację genomowego DNA i RNA, reakcje amplifikacji DNA i cDNA w tym multiplex-PCR oraz RT-qPCR,
- 2) **techniki analizy cytogenetycznej** obejmujące: przygotowanie preparatów chromosomowych, przygotowanie sond DNA i DNA blokującego, przeprowadzenie genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) oraz analizy mikroskopowe uzyskanych wyników
- 3) **techniki hodowlane** obejmujące: krzyżowanie określonych form rodzicielskich (akceptorowych i donorowych) dla otrzymania mieszańców F1 oraz ich samozapylenia dla wygenerowania roślin pokolenia F2 a następnie F3; inokulację roślin pokolenia F3 zarodnikami rdzy brunatnej a następnie ocenę stopnia porażenia.

Tekst rozdziału pozwala wstępnie zapoznać się z przebiegiem wykorzystanych metod w sposób wystarczający dla zrozumienia przebiegu prowadzonych doświadczeń i wykonanych analiz. Niemniej jednak mam następujące drobne uwagi/komentarze/pytania do tej części:

1. str. 27 – tabela 3: zgodnie z powszechnie przyjętą praktyką wizualizacji różnych danych w opracowaniach tekstowych, zakładającą, że każda tabela czy element graficzny powinien być zrozumiały sam z siebie, bez konieczności rozkodowywania zamieszczonych kodów i skrótów poprzez przeszukiwanie tekstu opracowania, w przypisach/legendzie to tabeli 3 powinny zostać podane informacje o grupie/rodzinie białek kodowanych przez geny wskazane w pierwszej kolumnie tabeli
2. str. 29 – w zdaniu: "Genomowe DNA wyznakowano za pomocą fluorochromu Digoxigenin-11-ddUTP..." błędnie podano, że digoksygenina jest fluorochromem, podczas gdy w tym zestawieniu pełni funkcję haptenu
3. str. 30 – zakładam, że wspomniane w ostatnim zdaniu przeciwciało AntiDig było związane z fluorochemem (jakim?) - w przeciwnym wypadku fluorescencyjna lokalizacja sondy nie byłaby możliwa
4. w rozdziale 6.3.4 Analiza mikroskopowa i opracowanie wyników oprócz informacji o mikroskopach użytych w analizie cytogenetycznej powinno się podać dane o parametrach spektralnych filtrów wykorzystanych do wizualizacji trzech fluorochromów (w zasadzie z nazwy we wcześniejszych fragmentach tekstu zostały podane tylko dwa fluorochromy tj. rodamina i Atto-674N – jaki był trzeci fluorochrom?)
5. na ilu płytkach metafazowych/preparatach z danego obiektu potwierdzano wyniki analiz cytogenetycznych?
6. str. 32 – ryc. 3: zarodniki rdzy brunatnej powinny być pokazane w zdecydowanie większej skali dla uwypuklenia ich morfologii, ponadto na rycinie brak skali.

OCENA PRZEDSTAWIONYCH WYNIKÓW

Rozdział Wyniki obejmuje 47 stron maszynopisu z 24 złożonymi tabelami i 12 rycinami. W efekcie przeprowadzonych badań w ocenianych materiałach Autorka wygenerowała **dużo ciekawych wyników**, m.in.:

- 1) zidentyfikowała markery DNA sprzężone z genami odporności na rdzę brunatną
- 2) ustaliła parametry reakcji multipleks PCR do jednoczesnej identyfikacji markerów molekularnych sprzężonych z dwoma, trzema, czterema i pięcioma genami odporności
- 3) dla piramidyzacji genów odporności:
 - a. przeanalizowała formy donorowe i akceptorowe pszenicy pod kątem obecności markerów z nimi sprzężonymi; dodatkowo dla wybranych obiektów potwierdziła obecność segmentów chromatynowych z gatunków pokrewnych
 - b. następnie po przekrzyżowaniu wybranych obiektów otrzymała rośliny pokolenia F1 – genotypy charakteryzujące się ciekawym układem markerów sprzężonych z genami odporności zostały wykorzystane do otrzymania pokolenia F2 i odpowiednio F3
- 4) zidentyfikowała genotypy pokolenia F3 charakteryzujące się wyższą odpornością od obiektów referencyjnych
- 5) przeanalizowała poziomy ekspresji wybranych genów aktywowanych podczas kaskady reakcji odpornościowej po ataku patogena, kodujących m.in. białka PR.

Liczba jak i wartość, szczególnie aplikacyjna, uzyskanych wyników jest imponująca. Zostały one zebrane w zasadzie w czytelne tabele i ryciny oraz jasno omówione. Moje drobne zastrzeżenia do tej części pracy głównie dotyczą uszczegółowienia opisu elementów graficznych tj.:

- 1) w przypisach/legendzie do tabel 8-13 nie wyjaśniono co oznaczają pogrubione genotypy w kolumnie pierwszej, kod w postaci litery H oraz Nd.
- 2) ryc. 4-8:
 - a. w tytułach rycin dla fotografii b jest błędne odwołanie do dygoksygeniny, sugerujące, że jest ona wizualizowanym w tym kanale fluorochromem
 - b. na fotografiach scalających wszystkie kanały fluorescencji raczej wyciszyłabym niespecyficzną fluorescencję, tak aby po scaleniu wszystkich kanałów miejsca hybrydyzacji czyli obecności introgresji obcej chromatyny były uwypuklone – w obecnej postaci są słabo widoczne.

Jeśli dobrze analizę ryciny analizy GISH to miejsca introgresji chromatyny pochodzącej od *Thinopyrum intermedium* pokrywają się z *T. elongatum* – czy jest na to jakieś wytłumaczenie?

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW

W efekcie przeprowadzonych badań Autorka wytypowała markery DNA sprzężone z genami odporności na rdzę brunatną i zidentyfikowała je w testowanych genotypach *Triticum aestivum*. Jednocześnie **opracowała bardzo cenne i pomocne w pracach hodowlanych protokoły multipleks PCR** do jednoczesnej identyfikacji kilku markerów DNA sprzężonych z

genami odporności. Wytypowane genotypy skrzyżowała dla **piramidyzacji genów odporności**, a następnie otrzymała **unikalne populacje pokolenia F3 kumulujące geny odporności**, spośród których część wykazywała wyższy poziom odporności na rdzę brunatną niż formy referencyjne. W mojej opinii **są to bardzo cenne i unikatowe materiały wyjściowe do hodowli nowych, odpornych odmian pszenicy, które z pewnością zostaną włączone w nowe programy hodowlane**. Zatem otrzymane wyniki mogą przynieść wymierne zyski ekonomiczne dla polskiego rolnictwa a jednocześnie idealnie wpisują się w strategię zielonego ładu, zakładającą ograniczenie środków ochrony roślin w rolnictwie.

OCENA INDYWIDUALNEGO WKŁADU KANDYDATA W POWSTANIE PRACY

Ocena indywidualnego wkładu Autorki w powstanie niniejszej dysertacji dotyczy dwóch artykułów naukowych, które są jej integralną częścią. Artykuły zostały opublikowane w latach 2022-2023, w międzynarodowych czasopismach naukowych z zakresu nauk o życiu i charakteryzujących się znaczącymi wskaźnikami bibliometrycznymi tj.: *Agriculture* (IF₂₀₂₂=3.6, pkt._{MNISW}=100) oraz *Journal of Applied Genetics* (IF₂₀₂₃=2.0, pkt._{MNISW}=140). Oba artykuły są wieloautorskie i mają od 3 do 5 autorów. Doktoranka w każdym jest pierwszym autorem. Włączone do dokumentacji **oświadczenia współautorów wskazują na dominujący i merytorycznie istotny wkład Doktorantki** w ich powstanie tj. Doktorantka przeprowadziła wszystkie badania oraz przygotowała pierwsze wersje manuskryptów.

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Aleksandry Noweiskiej jest **wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego** nt. 1) analizy cytomolekularnej form pszenicy z introgresją chromatyny z gatunków pokrewnych warunkującej odporność na rdzę brunatną oraz 2) analizy ekspresji wybranych genów aktywowanych w kaskadzie reakcji odpornościowych w odpowiedzi na porażenie tym patogenem. Dodatkowo, w mojej opinii, otrzymane wyniki mają **dużą wartość aplikacyjną**. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych materiałów i metod w celu uzyskania zakładanych celów i zweryfikowania postawionych hipotez. Wyniki zostały poprawnie opracowane, zaprezentowane, omówione jak również zinterpretowane i poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki w zakresie prowadzonych badań w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując uważam, że **złożona rozprawa**, mimo przedstawionych powyżej drobnych uwag, **spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim** określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z póź. zm.).



Kraków, 3 lutego 2025

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK