

Prof. dr hab. Sylwia Okoń
Instytut Genetyki, Hodowli I Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

Lublin, 31.01.2025 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Julii Dominiki Spychały
pt.: „Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u
pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną”

Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu nr IV/2/2024 z dnia 20 listopada 2024 r. w oparciu o wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z póź. zm.).

Podstawowe dane o Kandydatce

Pani mgr inż. Julia Spychała jest absolwentką Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Tytuł zawodowy magistra inżyniera uzyskała 25 czerwca 2020 r. na podstawie pracy pt. „Analiza ekspresji genu Lr34 odpowiedzialnego za odporność typu ARP w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną”, którą wykonała pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W roku 2020 Kandydatka rozpoczęła kształcenie w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu realizując badania pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak. Od 1 lipca 2024 r. jest zatrudniona na stanowisku asystenta w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- Państwowy Instytut Badawczy. Jest współautorem 12 publikacji o sumarycznym IF 34,059 i wartości punktowej 1180. Indeks Hirsch’a Doktorantki wynosi 5. Pani mgr inż. Julia Spychała nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

Informacje o ocenianej pracy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pt.: „Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie



przez rdzę brunatną” została wykonana w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak. Stanowi ona zbiór czterech, spójnych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach przypisanych do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Prace naukowe, będące przedmiotem dysertacji tj.:

- Tomkowiak, A., R. Bobrowska, M. Kwiatek, J. Spychała, J. Kuczynski, A. Tyczewska, P.L. Kowalczewski, D. Weigt and T. Kosiada. 2023. Analysis of miRNA expression associated with gene *Lr34* responsible for resistance mechanisms to wheat leaf rust. *Pak. J. Bot.*, 55(1):
- Spychała J, Tomkowiak A, Noweiska A, Bobrowska R, Bocianowski J, Książkiewicz M, Sobiech A, Kwiatek MT. Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. *Genes*. 2023; 14(7):1376.
- Spychała J, Tomkowiak A, Noweiska A, Bobrowska R, Rychel-Bielska S, Bocianowski J, et al. (2024) Expression patterns of candidate genes for the *Lr46/Yr29* “slow rust” locus in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and associated miRNAs inform of the gene conferring the *Puccinia triticina* resistance trait. *PLoS ONE* 19(9): e0309944.
- Spychała J, Tomkowiak A, Noweiska A, Bobrowska R, Bocianowski J, Sobiech A, Kwiatek MT. Diversity of Expression Patterns of *Lr34*, *Lr67*, and Candidate Genes towards *Lr46* with Analysis of Associated miRNAs in Common Wheat Hybrids in Response to *Puccinia triticina* Fungus. *Current Issues in Molecular Biology*. 2024; 46(6):5511-5529.

zostały opublikowane w latach 2023-2024, w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych w bazie JCR (*JournalCitationReports*). W trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w czwartej autorem korespondencyjnym. Z oświadczeń współautorów zamieszczonych w 12 rozdziale opracowania wynika, że Pani mgr inż. Julia Spychała brała udział w przeprowadzeniu badań, w tym zbieraniu danych, analizie i interpretacji wyników, formułowaniu wniosków oraz opracowaniu finalnych wersji manuskryptów. Doktorantka nie wykazała udziału w planowaniu doświadczeń i budowaniu koncepcji prac, jednakże biorąc pod uwagę pozycje pierwszego autora w trzech spośród czterech prac, jej wiodący udział w ich powstaniu jest niezaprzeczalny.

Artykuły naukowe wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej zostały już zrecenzowane na etapie zatwierdzania publikacji przez redakcje czasopism, dlatego moja rola jako recenzenta rozprawy sprowadza się do oceny przygotowanego przez Doktorantkę autoreferatu od strony formalnej, a także oceny merytorycznej badań zawartych w rozprawie oraz ich spójności.

Praca doktorska Pani mgr Julii Spychały liczy 188 stron i jest uporządkowana według typowego podziału dla tego typu opracowań. Zawiera takie elementy jak: *1. Wykaz stosowanych*



skrótów, 2. Streszczenie, 3. Streszczenie w języku angielskim, 4. Wprowadzenie, 5. Hipoteza badawcza i cel pracy, 6. Materiał i metody, 7. Wyniki, 8. Dyskusja, 9. Podsumowanie i wnioski, 10. Literatura, 11. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej 12. Oświadczenia współautorów.

Wybór tematyki badań i ocena rozprawy doktorskiej

Ze względu na konieczność stosowania wymogów integrowanej ochrony roślin, metody biologiczne, w tym te oparte o wykorzystanie genów odporności stają się coraz bardziej pożądane. Jednakże, aby uzyskać wysokie plony z utrzymaniem zdrowotności upraw należy z dużą starannością planować strategie ochrony, w szczególności wybór odpowiednich genów nadających długotrwałą i efektywną odporność. Z tego względu uważam, że tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest bardzo aktualna i ważna, badania przeprowadzone przez mgr inż. Julię Spychałę wpisują się doskonale w rozwój dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo, jak również mają ogromne znaczenie, nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne.

Streszczenie pracy rzeczowo i wyczerpująco przedstawia treści zawarte w rozprawie doktorskiej. Autorka wskazuje na duże znaczenie wybranej tematyki badawczej, przedstawia cel badań oraz metody, jakie wybrała do osiągnięcia tego celu. Nawiązuje również do najważniejszych wniosków płynących z przeprowadzonych badań.

Wprowadzenie jest rozdziałem o przejrzystej strukturze. Zostało podzielone na podrozdziały dotyczące: a) produkcji, utrzymania zasobów genetycznych i złożoności genomu pszenicy, b) zagrożeń w produkcji pszenicy, ze szczególnym uwzględnieniem *P. triticea*, c) mechanizmów odporności pszenicy i roli cząstek miRNA w reakcji odpornościowej. Rozdział ten bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Autorka podkreśla rolę pszenicy jako jednego z głównych gatunków zbóż będącego podstawą gospodarki żywnościowej oraz jednego z głównych źródeł kalorii spożywanych przez ludzi na całym świecie. Nawiązuje również do konieczności intensyfikacji prac hodowlanych ukierunkowanych nie tylko na uzyskanie wysokich plonów, ale również na zwiększenie odporności na stesy biotyczne i abiotyczne. Informacje zawarte we wprowadzeniu podnoszą również wagę złożoności genomu pszenicy, co niejednokrotnie utrudnia analizy genetyczne związane z identyfikacją i charakterystyką genów warunkujących ważne cechy użytkowe tego gatunku. W dalszej części rozdziału Doktorantka płynnie przechodzi do wskazania zagrożeń w produkcji pszenicy skupiając się na biotroficznym patogenie grzybowym jakim jest *P. triticea*. Charakteryzuje główne mechanizmy obronne roślin uruchamiane w wyniku infekcji



patogendem, podkreślając złożoność tych mechanizmów. Jednocześnie wskazuje, że w hodowli pszenicy odpornej na rdzę stosuje się dwie grupy genów. Pierwsza grupa to geny główne R, które warunkują odporność specyficzną, przeciwko jednej rasie patogena, jednakże odporność ta może być szybko przełamana przez ewoluujące patogeny. Drugą grupę genów stanowią geny wykazujące niespecyficzną odporność obejmująca wiele ras patogenów. W grupie tej znajdują się geny APR, które zapewniają częściową, ale trwałą odporność na patogeny. Do grupy tej zaliczane są geny *Lr34*, *Lr46* oraz *Lr67*, na których Doktorantka skupiła się w swojej pracy. Ponadto Autorka opisuje również potencjalną rolę cząsteczek miRNA w reakcji odpornościowej roślin, co skłoniło ją do ukierunkowania części swoich prac na poznanie powiązań pomiędzy wybranymi genami *Lr* a komplementarnymi do nich cząsteczkami miRNA. Badania tego typu są bardzo istotne, ponieważ pozwalają wyciągać wnioski na temat modulacji procesów odpornościowych uruchamianych przez rośliny w odpowiedzi na atak patogena, a dokładna charakterystyka procesu regulacji ekspresji genów może przyczynić się do bardziej efektywnego wykorzystania dostępnych źródeł odporności.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawia hipotezę badawczą, która zakłada, że analiza ekspresji wybranych genów APR i powiązanych z nimi miRNA pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmu odporności na *P. triticina*. Ponadto hipoteza zakłada, że analiza ekspresji genów kandydujących w locus *Lr46* pozwoli na wyselekcjonowanie potencjalnego genu odpowiedzialnego za odporność na rdzę brunatną. Poznanie mechanizmów działania genów odporności wpisuje się w aktualne trendy badań naukowych, a wykorzystanie coraz bardziej zaawansowanych narzędzi badawczych pozwala dokładniej poznawać te mechanizmy. Głównym celem prac podjętych przez Doktorantkę, jest zatem wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności pszenicy na *P. triticina* warunkowanych przez wybrane geny *Lr*. Cele pośrednie to: 1. Określenie poziomu ekspresji genów *Lr34*, *Lr46* i *Lr67* po inokulacji *P. triticina*, 2. Analiza poziomu ekspresji cząstek miRNA komplementarnych do sekwencji analizowanych genów, 3. Próba identyfikacji genu *Lr46* spośród genów kandydujących opisanych w doniesieniach naukowych, 4. Porównanie efektywności działania genów typu „*slow rust*” u różnych odmian pszenicy zwyczajnej oraz otrzymanych form mieszańcowych.

W rozdziale *Material i metody*, Autorka opisuje materiał badawczy, który stanowią wybrane odmiany pszenicy zwyczajnej oraz mieszańce pokoleń F1, F2 i BC1F1 odpornej odmiany Glenlea z wybranymi polskimi odmianami. Na uwagę zasługuje fakt analizy tak zróżnicowanego materiału oraz fakt uzyskania dużej liczby mieszańców, gdyż proces krzyżowania jest pracochłonny i wymaga dużego doświadczenia. Materiał badawczy został przedstawiony w tabelach, w których obok nazw znajdują się informacje dotyczące pochodzenia badanych odmian. Jednakże w opisie



materiału badawczego brakuje informacji dotyczących kryterium wyboru odmian do pierwszego etapu badań. Autorka wskazuje, że odmiana Glenlea posiada geny będące przedmiotem badań w pracy doktorskiej, nie podaje natomiast informacji jakie geny posiadają pozostałe badane odmiany, jakim poziomem odporności się charakteryzują i czy odporność odmian była analizowana za pomocą markerów molekularnych czy również za pomocą testów fenotypowych. Z opisu materiału oraz z opisu metod badawczych nie wynika jakie genotypy były wykorzystywane w poszczególnych etapach badań. Dla lepszego zrozumienia toku badań i spójności dysertacji takie informacje powinny być uwzględnione w opisie materiału badawczego.

W opisie metod badawczych Autorka przedstawia wszystkie metody jakie wykorzystywała w swoich badaniach dzieląc je na zadania związane z przeprowadzeniem reakcji PCR mających na celu identyfikację analizowanych genów w badanych genotypach, inokulację zarodnikami patogena, analizę ekspresji genów i analizę ekspresji cząstek miRNA. W ostatnim podrozdziale opisuje metody statystyczne wykorzystane w pracy. Metody badawcze przedstawione w autoreferacie należałoby uzupełnić o wskazanie markerów molekularnych (ich nazw i autorów) wykorzystanych do identyfikacji wybranych genów *Lr*. Ponadto tytuł podrozdziału 6.2.1.2 „Identyfikacja markerów molekularnych” wzbudza pewne wątpliwości, gdyż sugeruje, że Doktorantka podjęła próbę opracowania nowych markerów do identyfikacji genów. Moim zdaniem tytuł tego podrozdziału Powinien brzmieć „identyfikacja wybranych genów *Lr* w oparciu o markery molekularne”. Autorka opisuje metodykę inokulacji badanego materiału (odmian i mieszańców) zarodnikami *P. triticina*, jednakże w opisie wyników nie podaje informacji dotyczących poziomu odporności analizowanych genotypów w oparciu o obserwację porażenia. Zatem, czy testy fenotypowe były wykonywane tylko w celu wzbudzenia odporności roślin przed analizą ekspresji genów czy również do oceny poziomu odporności analizowanych form? Moim zdaniem zestawienie wyników obserwacji fenotypowych z wynikami analizy molekularnej pozwoliłoby na potwierdzenie efektywności działania wybranych genów.

W rozdziale *Wyniki* Autorka omówiła wyniki opublikowane w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz wyniki analiz wykonane w pokoleniach F2 i BC1F1 mieszańców. Wyniki identyfikacji markerów molekularnych sprzężonych z analizowanymi genami jasno wskazują, które mieszańce posiadają te geny, Autorka wskazuje również, na wyniki tych badań przeprowadzonych dla analizowanych odmian, jednakże opis „marker został zidentyfikowany u wszystkich odmian odpornych” nie daje jasnej odpowiedzi u których odmian został on zidentyfikowany, gdyż takich informacji zabrakło w opisie materiału badawczego. Dobrym rozwiązaniem byłaby przedstawienie tych wyników w tabeli. Bardzo dobrym uzupełnieniem wyników na tym etapie



badania byłoby wykonanie testów fenotypowych i wskazanie, które genotypy/geny warunkują efektywną odporność. Ponadto uważam, że opis wyników powinien być ułożony nieco inaczej. Po przedstawieniu wyników analiz molekularnych odmian i mieszańców Autorka opisuje wybór formy donorowej genów odporności wykorzystanej w procesie krzyżowania, zatem opis ten powinien znaleźć się przed opisem analizy mieszańców. W dalszej części Doktorantka opisuje wyniki dotyczące analizy ekspresji genów. Bardzo ważnym etapem tego typu analiz jest wybór stabilnych w danym doświadczeniu genów referencyjnych. Autorka przedstawia metodykę związaną z wyborem genów referencyjnych, jednakże nie opisuje wyników potwierdzających stabilną ekspresję tych genów w badanym materiale. Moim zdaniem, takie wyniki powinny być przedstawione w dysertacji, ponieważ stanowią podstawę do prawidłowej interpretacji poziomów ekspresji analizowanych genów *Lr*. Doktorantka opisuje również wyniki dotyczące projektowania starterów do sekwencji genów *Lr34*, *Lr67* oraz genów kandydujących dla *Lr46*. Prawidłowe zaprojektowanie starterów i analiza sekwencji amplikonów pozwala na wybór jedynie tych starterów, które inicjują amplifikację pożądanego produktu. Dalsza część wyników dotyczy analizy poziomu ekspresji genów odporności u odmian referencyjnych oraz analizy ekspresji komplementarnych miRNA. Doktorantka analizowała poziom ekspresji wybranych genów w pięciu punktach czasowych, co pozwala na dokładną analizę uruchamianych reakcji odpornościowych roślin i umożliwił lepszą analizę mechanizmów obronnych. Ponadto analiza miRNA komplementarnych do sekwencji analizowanych genów pozwoliła na określenie ich potencjalnej roli w odpowiedzi pszenicy na infekcję *P. triticina*, związanej z modulacją odpowiedzi obronnej roślin.

Dodatkowo w autoreferacie pracy doktorskiej Autorka przedstawiła wyniki dotyczące analizy ekspresji wybranych, na podstawie wcześniejszych badań, genów odporności oraz cząsteczek miRNA komplementarnych do badanych genów u mieszańców pokolenia F2 oraz BC1F1. Dzięki zróżnicowanemu zestawowi mieszańców możliwe było sprawdzenie, czy badane geny utrzymują swoje wzorce ekspresji. Podsumowanie tych wyników oraz przyrównanie ich do wyników uzyskanych dla badanych odmian oraz mieszańców F1 pozwoliłoby na wyciągnięcie wniosków o stabilności działania genów.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawia dyskusję uzyskanych wyników z wynikami innych autorów. Dyskusja napisana jest w poprawny sposób, pozwala odnieść wyniki Doktorantki do innych, opublikowanych prac badawczych, jednakże w wielu miejscach Doktorantka zbyt szczegółowo wraca do opisu wyników własnych, co sprawia, że dyskusja jest w dużym stopniu powieleniem rozdziału *Wyniki*.

W rozdziale dziewiątym Autorka podsumowała badania wykonane w ramach rozprawy i



przedstawiła 12 wniosków. Moim zdaniem wnioski powinny być uporządkowane zgodnie z kolejnością prowadzenia badań np. wniosek 5 odnosi się do pierwszej części badań – do wyboru formy donorowej genów odporności. Wnioski 7 i 8 wskazują na skuteczność starterów zaprojektowanych do analiz ekspresji genów, podczas gdy wniosek 9 odnosi się do wyboru genów referencyjnych, zaś wnioski dotyczące analizy ekspresji genów opisane są jako 1 - 4. Ponadto brakuje wniosków odnoszących się do analizy mieszańców pokoleń F2 i BC1F1 oraz ich przyrównania do wyników opublikowanych w pracach P1-P4. Wnioski płynące z przyrównania dodatkowo potwierdzałyby spójność wyników badań przedstawionych w dysertacji. Jasne powiązanie między badaniami a stwierdzeniami i wnioskami pomaga uniknąć nieporozumień i błędnych interpretacji. Gdy te elementy są dobrze zintegrowane, czytelnik może łatwiej zrozumieć, jak badania prowadziły do określonych wniosków, co minimalizuje ryzyko błędnej interpretacji.

Wnioski przedstawione w dysertacji odnoszą się do trzech spośród czterech celów szczegółowych przedstawionych w pracy. Przedstawiając cele pracy Autorka wskazała, że jednym z nich jest porównanie efektywności działania genów typu „*slow rust*” u różnych odmian pszenicy zwyczajnej oraz u form mieszańcowych. Opis prac prowadzących do odciążenia tego celu oraz wnioski dotyczące takie porównanie nie zostały przedstawione w dysertacji. W związku z tym, bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych informacji podczas publicznej obrony.

Ocenie poddałam również jakość strony edytorskiej oraz poprawność językową dysertacji. Praca została napisana z dużą starannością, jednakże z obowiązku Recenzenta wynotowałam kilka błędnych sformułowań jakie pojawiły się w pracy:

- „patogeny powodujące rdzę ograniczały uprawę pszenicy...” patogeny mogą ograniczać ilość i jakość plonów
- Odmiana Harenda × Glenlea – powinno być mieszaniec
- Gen *Lr46-Glu2* ... amplifikował fragment sekwencji – powinno być np. startery zaprojektowane dla genu inicjowały amplifikację...
- U genów zaobserwowano wzrost ekspresji - powinno być zaobserwowano wzrost ekspresji u roślin posiadających dany gen

Pragnę zaznaczyć, iż wymienione przeze mnie w niniejszej recenzji uwagi oraz komentarze mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując analizę merytoryczną wyników badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, stwierdzam, że dostarczyły one nowych danych dotyczących poznania



mechanizmów działania genów odporności typu APR na rdzę brunatną u pszenicy. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki mają istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmów odporności i procesu ich regulacji. Ponadto wyniki badań przedstawionych przez Doktorantkę wskazują na konieczność pogłębiania wiedzy dotyczącej działania i regulacji genów odporności, aby można je było z większą efektywnością wykorzystywać w programach hodowlanych.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Julii Spychały pt.: „Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną” spełnia wymagania 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.) stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Julii Spychały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sylwia Owaś

