

Dr hab. Beata Myśków
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Noweiskiej,
pt. „Analiza ekspresji genów i analiza cytomolekularna form pszenicy (*Triticum aestivum* L.)
z introgresją chromatyny gatunków pokrewnych warunkującej odporność na rdzę brunatną”**

DANE O KANDYDATCE

Pani Aleksandra Noweiska ukończyła studia stacjonarne o profilu ogólnoakademickim na kierunku biotechnologia, na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, uzyskując tytuł zawodowy magistra inżyniera 25 czerwca 2020 roku. W tym samym roku rozpoczęła kształcenie w Szkole Doktorskiej UP w Poznaniu. Od 1 lipca 2024 roku pracuje jako asystent w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB.

Praca doktorska pt. „Analiza ekspresji genów i analiza cytomolekularna form pszenicy (*Triticum aestivum* L.) z introgresją chromatyny gatunków pokrewnych warunkującej odporność na rdzę brunatną” została wykonana na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Kwiatka. Kandydatka nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

TEMATYKA I MATERIAŁ BADAWCZY

Przedmiot naukowych zainteresowań mgr inż. Aleksandry Noweiskiej stanowi jeden z najważniejszych gatunków zbóż w Polsce i na świecie. Podjęta przez Doktorantkę tematyka dotycząca genów odporności pszenicy na rdzę brunatną (ang. leaf rust, *Lr*) wpisuje się w ważny obszar badań nad reakcjami roślin na stropy biotyczne. Rdza brunatna powodowana przez grzyb *Puccinia triticina* jest jedną z najgroźniejszych chorób pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.). Mimo, że dotychczas zidentyfikowano już kilkadziesiąt genów *Lr* to wieloletnie badania nie wyczerpują odpowiedzi na wszystkie pytania odnośnie podłoża genetycznego i mechanizmów odpowiedzi na atak patogenów. Szczególny problem w praktycznym wykorzystaniu wyników badań nad odpornością stanowi zjawisko przełamania odporności przez patogeny, które ma miejsce co kilka lat.

Naukowcy i hodowcy są zgodni co do tego, że najlepszą strategią ochrony pszenicy przed patogenami grzybowymi jest hodowla odpornościowa. Dzięki uprawie odmian odpornych można zarówno ograniczyć stosowanie pestycydów jak i obniżyć koszty uprawy.

Najważniejszym źródłem genów odporności na rdzę brunatną pszenicy są dzikie gatunki pszenic oraz gatunki im pokrewne. Dlatego Doktorantka podjęła się badań z wykorzystaniem licznych i zróżnicowanych genotypów pszenic i gatunków spokrewnionych (żyta, *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum elongatum*). Materiał roślinny został dobrany bardzo starannie, odpowiednio do szczegółowych celów badań, a duża jego część została wytworzona przez Doktorantkę na drodze krzyżowań i samozapylenia.

STRUKTURA PRACY, STRONA GRAFICZNA I JĘZYKOWA

Rozprawa doktorska ma charakter mieszany. Podstawę doktoratu stanowią dwie anglojęzyczne publikacje, które ukazały się w renomowanych czasopismach z przyznaniem wskaźnikiem wpływu IF (łącznie 5,6) i wysoką punktacją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (łącznie 240 punktów). W obu artykułach pani Aleksandra Noweiska jest pierwszą autorką (odpowiednio z trojga i pięciorga autorów). Według oświadczeń współautorów wkład Doktorantki w obu przypadkach był przeważający i znaczący.

Dodatkowo wyniki kolejnych badań zostały omówione w obszernym polskojęzycznym opracowaniu, przygotowanym na wzór monografii, podzielonym na typowe rozdziały, to jest: Wykaz skrótów, Streszczenie, Streszczenie w języku angielskim, Wprowadzenie, Hipoteza badawcza i cel pracy badawczej, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski (12 wniosków), Bibliografia (102 pozycje), Spis tabel oraz rycin (odpowiednio 29 i 15). Załączono także obie opublikowane prace wchodzące w skład zbioru oraz oświadczenia autorów.

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej to:

- **P1.** Noweiska A., Bobrowska R., Kwiatek M.T. (2022) Structural Polymorphisms of Chromosome 3Am Containing *Lr63* Leaf Rust Resistance Loci Reflect the Geographical Distribution of *Triticum monococcum* L. and Related Diploid Wheats. *Agriculture*, 12, 966 (IF: 3,6; 100 punktów)
- **P2.** Noweiska A., Bobrowska R., Spychała J., Tomkowiak A., Kwiatek M.T. (2023) Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Appl Genetics* 64, 55–64 (IF: 2,0; 140 punktów).

Doktorantka starannie zadbała o stronę graficzną rozprawy. Publikacje i monografia zostały opatrzone licznymi rycinami, w większości dobrej jakości. Drobna uwaga natury edytorskiej dotyczy zbyt małych czcionek na niektórych rycinach (ryc. 10-13). Wyniki badań zebrano w czytelnych tabelach. Spis skrótów zamieszczony na początku pracy stanowi ułatwienie dla czytelnika, chociaż zabrakło w nim kilku oznaczeń (np. hpi, *Pt*). W tekście pojawiało się też kilka skrótów, które nie zostały wyjaśnione (ABA, MeJA, *Pt*).

Doktorantka swobodnie posługuje się naukowym językiem, zarówno polskim jak i angielskim, wykorzystując stosowne, specjalistyczne słownictwo. Praca napisana jest poprawnie pod względem stylistycznym i na ogół nie zawiera błędów językowych, poza drobnymi, choć dość licznymi błędami literowymi (np. *P. triticinia* zamiast *P. triticina*; multilpeks zamiast multipleks itp.).

OCENA MERYTORYCZNA

Doktorantka wyznaczyła jako główny cel pracy piramidyzację genów odporności na rdzę brunatną (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* i *Lr63*) pochodzących z pierwszo- i trzeciorzędowej puli genowej, w podłożu genetycznym pszenicy. Sformułowała precyzyjnie dwie hipotezy, które zakładały, że „piramidyzacja genów odporności w porównaniu z odpornością warunkowaną przez jeden gen jest bardziej efektywna oraz istnieje związek między wielkością translokacji a jej dziedziczeniem”. Autorka wyznaczyła pięć szczegółowych celów, które zostały dobrane odpowiednio do weryfikacji nakreślonych hipotez.

Podjęte badania mają dużą wartość poznawczą, a jednocześnie wykazują aspekt praktyczny. Doktorantce i zespołowi przyświecał cel udoskonalenia programów hodowlanych pszenicy poprzez opracowanie metod diagnostyki oraz stworzenie odmian odpornych na rdzę brunatną. Jednym ze sposobów poprawy odporności jest piramidyzacja, czyli łączenie kilku genów w jednej roślinie. W niniejszej rozprawie doktorskiej, podjęto się pirymidyzacji genów odporności: *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr38* oraz *Lr63* w dwóch odmianach pszenicy jarej, co uważam za słuszną i przemyślaną strategię.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono szerokie spektrum analiz molekularnych i cytologicznych. Wszystkie prace badawcze charakteryzował wysoki poziom zaawansowania. Wykonane analizy dowodzą opanowania przez Kandydatkę specjalistycznego i zarazem trudnego warsztatu badawczego.

Doktorantka dokonała doboru metod adekwatnie do realizacji wyznaczonego celu. Zakres i poziom wykonanych analiz molekularnych zasługuje na pochwałę. Optymalizacja multipleksowego PCR jest trudną i żmudną procedurą, wymagającą wielokrotnych powtórzeń i modyfikacji przeprowadzanych reakcji. Wymagało to od Doktorantki zdolności analitycznych i dużej cierpliwości. W literaturze naukowej można znaleźć niewiele publikacji omawiających proces opracowywania protokołu multipleksowego PCR. Molekularne analizy z zastosowaniem RT-qPCR także nie należą do najłatwiejszych i wymagają znacznego doświadczenia, nieporównywalnego z tym, wystarczającym przy standardowym PCR.

Poziom badań został dodatkowo podwyższony dzięki zastosowaniu w pracy metod cytogenetycznych. Autorka wykazała się praktyczną znajomością techniki genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH), wraz z przygotowaniem preparatów, znakowanych sond i blokera, co jest rzadką umiejętnością wśród genetyków. Konieczna była także analiza mikroskopowa

z użyciem mikroskopu konfokalnego i fluorescencyjnego oraz komputerowe opracowanie wyników w Adobe Photoshop.

Niebagatelne znaczenie dla jakości badań miała także umiejętność prowadzenia prac natury hodowlanej, takich jak samozapylenia i krzyżowania odpowiednio dobranych komponentów rodzicielskich, poprzedzone kastracją kłosów. W przebiegu prac badawczych konieczna była także inokulacja materiału roślinnego zarodnikami grzyba *P. triticina* i ocena wizualna stopnia porażenia roślin przez patogen.

Dzięki połączeniu wszystkich tych zróżnicowanych metod badawczych Autorce udało się zrealizować szczegółowe cele, wyznaczone w ramach doktoratu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W ramach opublikowanej pracy P1 skupiono się na analizie genu *Lr63*, zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 3Am—3AmS. Przebadano różnorodność genetyczną różnych gatunków pszenic na poziomie cytologicznym i molekularnym. Przeanalizowano zmienność alleli w *locus Lr63*, z użyciem markerów *Xbarc321* oraz *Xbarc57*, równolegle z analizą cytogenetyczną (FISH). Wyniki prac wykazały, że oba markery mogą być wykorzystywane do identyfikacji genu *Lr63*, a ich obecność wiąże się z kierunkiem udamawiania pszenicy oraz polimorfizmem wewnątrz- i międzygatunkowym.

Efektom prac opisanych w publikacji P2 było opracowanie zestawów różnych kombinacji markerów i protokołów multipleksowego PCR dla głównych genów odporności na rdzę brunatną (*Lr19*, *Lr24*, *Lr26* i *Lr38*) oraz genu *Lr63*, które mogą zostać wykorzystane w procesie selekcji wspomaganej markerami (MAS). Zoptymalizowane reakcje multipleks PCR służyły jednoczesnej analizie od dwóch do czterech markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności.

Dodatkowo Doktorantka dokonała identyfikacji obcych segmentów chromatyny przy użyciu metody GISH i przeprowadziła analizę krótkiego ramienia chromosomu 3A diploidalnych gatunków pszenic. Jednoczesna identyfikacja obcych segmentów chromatyny umożliwiła śledzenie wielkości dziedziczonych fragmentów. Badania pozwoliły na potwierdzenie hipotezy, że im większa translokacja tym częściej dochodzi do eliminacji fragmentów pochodzących z obcych gatunków. Analiza polimorfizmów krótkiego ramienia chromosomu 3A pszenic diploidalnych dała podstawę do wnioskowania, że spowodowane są one rozproszeniem geograficznym i adaptacją do lokalnych warunków środowiska.

Niewątpliwym wyzwaniem podjętym w ramach pracy doktorskiej było wykonanie licznych krzyżowań i analiza kolejnych pokoleń mieszańców pod względem obecności różnych genów *Lr* oraz zależności między zestawem tych genów a poziomem zakażenia roślin przez inokulaty *P. triticina*. Dzięki uzyskanej piramidyzacji genów *Lr*, możliwe było wykazanie jej

wpływu na infekcję patogenem i wskazanie kombinacji genów najkorzystniejszych dla podwyższenia odporności roślin (były to geny główne, zwłaszcza *Lr24* i *Lr26*).

Ważnym aspektem pracy była analiza genów kodujących białka PR, które podczas interakcji gen - patogen rozpoznają cząsteczki efektorowe i zwiększają swoją ekspresję, uczestnicząc w mechanizmie obronnym roślin. Dokładne zrozumienie specyficznej reakcji genów *Lr* pszenicy w odpowiedzi na patogen wymaga poznania poziomów ekspresji całej sieci genów uaktywnianych w warunkach stresu.

Ta część pracy obejmowała analizę ekspresji czterech genów w 21 wybranych genotypach, w sześciu punktach czasowych. Imponująca liczba kombinacji przy tak dużej liczbie czynników była znaczącym wyzwaniem pod względem wykonania analiz laboratoryjnych a także pod kątem opracowania wyników. Doktorantka poradziła sobie z tym zadaniem z dobrym rezultatem.

Autorka wykazała, że poziom ekspresji genów kodujących białka PR po infekcji patogenem *P. triticina* różni się w zależności od genotypu i liczby genów *R* w roślinach. Najwyższe poziomy ekspresji genów *PR2*, *PRA2*, *PR5* i *PR9* obserwowano w szóstej godzinie po infekcji, co pozwoliło zakwalifikować je do grupy genów związanych są z szybką reakcją odpornościową na patogen.

Interesującą obserwacją było to, że u roślin z piramidyzacją genów *Lr* geny *PR2* i *PR9* wykazały wyższy -, podczas gdy gen *PR5* niższy poziom ekspresji. Wahania poziomu ekspresji genu *PRA2* i różnice między liniami z genami *Lr* sugerują, że odporność roślinna jest regulowana przez różne szlaki sygnałowe i geny związane z obroną. Wyniki badań nad genami *PR* nie tylko pozwoliły na sformułowanie ciekawych spostrzeżeń ale także wskazały Doktorantce możliwy kierunek dalszych badań dotyczących reakcji odpornościowej związanej z oddziaływaniem genów kodujących białka PR z genami głównymi odporności na rdzę brunatną.

UWAGI DO PRACY

W rozdziale Wprowadzenie znajduje się opis dotyczący zagrożeń w uprawie pszenicy (str. 13). Zastosowano interesujące zobrazowanie strat w plonach w przeliczeniu na liczbę bochenków chleba i ilość energii zużywanej przez gospodarstwa domowe. W tym samym podrozdziale znajduje się zdanie, w którym pojawił się błąd w opisie procentowego udziału poszczególnych chorób: „Cztery główne choroby: rdza brunatna, fuzarioza kłosów zbóż, septorioza paskowana liści pszenicy, rdza żółta - odpowiadają za ponad połowę strat, za ponad 90% odpowiada reszta chorób i szkodników.”

W części metodycznej dotyczącej wyprowadzania mieszańców (str. 31) znalazł się błąd o charakterze „skrótów myślowego”: „Uzyskane formy mieszańcowe F_1 w latach 2022 oraz 2023 poddano samozapyleniu otrzymując formy F_2 oraz F_3 ”. Samozapyleniu poddano pokolenie F_1 i F_2 , otrzymując odpowiednio formy F_2 oraz F_3 . Podobnej natury błąd pojawił się w zdaniu

z podrozdziału 7.4 (str. 42): „*Pokolenia roślin F_1 , F_2 i F_3 uzyskano za pomocą samozapyleń otrzymanych form mieszańcowych*”. Pokolenie F_1 to forma mieszańcowa, powstała ze skrzyżowania form rodzicielskich, a nie na skutek samozapylenia.

W opisie wyników analizy molekularnej pokoleń F_1 , F_2 i F_3 (podrozdziały 7.4), w tabelach (Tab. 9 - Tab. 13) przedstawiono obecność markerów genów *Lr* w różnych genotypach. Według mnie zabrakło informacji, czy w przypadku analizy dwóch loci sprzężonych z jednym genem *Lr* (dotyczy to genów *Lr38* i *Lr63*) wzór amplifikacji +/- lub -/+ traktowano jako obecność genu, czy jego brak.

Dla ułatwienia oceny i interpretacji wyników korzystne byłoby zamieszczenie w tabeli 14 i tabeli 15 informacji, które geny *Lr* są obecne w poszczególnych genotypach. Byłoby to pomocne w prześledzeniu efektu piramidyzacji.

Wśród licznych opisów współczynników korelacji związanych z ekspresją różnych genów *PR*, w analizie przeprowadzonej dla genu *PR2* (str. 78) niepoprawnie podano grupę a nie pary porównywanych linii izogenicznych Thatcher. Ponadto, wobec tak obszernej prezentacji rezultatów współczynników korelacji, w mojej opinii, w pracy zabrakło przeprowadzenia odpowiedniej dyskusji i wnioskowania.

PODSUMOWANIE

Praca Aleksandry Noweiskiej stanowi cenny wkład w rozwój nauk rolniczych. Charakteryzuje ją kompleksowy charakter, wysoki poziom badań i powiązanie tematyki badawczej z praktycznymi wymogami współczesnego rolnictwa i gospodarki żywnościowej prowadzonej z poszanowaniem środowiska naturalnego.

Szeroki zakres analiz został wykonany na bogatym, przemyślanym, odpowiednio dobranym i wytworzonym, materiale roślinnym, przy użyciu zróżnicowanych i zaawansowanych technik badawczych, wymagających specjalistycznych umiejętności analitycznych. Tekst pracy napisano z wykorzystaniem licznych, adekwatnych do tematyki źródeł literaturowych. Na wszystkich etapach realizacji badań i przygotowania treści rozprawy Doktorantka wykazała się dobrą znajomością i zrozumieniem omawianej tematyki badawczej.

Pewne pomyłki i niedociągnięcia, które wskazałam w „Uwagach do pracy” nie obniżają znacząco jakości rozprawy i są prawdopodobnie konsekwencją szerokiego zakresu danych uzyskanych w trakcie badań oraz presji czasu, przed którą często stawiani są młodzi naukowcy.

Pod względem merytorycznym praca doktorska stanowi wartościowe opracowanie zagadnienia genetycznego podłoża odporności pszenicy na rdzę brunatną. Kandydatka przeprowadziła liczne analizy molekularne i cytogenetyczne dotyczące różnych genów odporności z rodziny *Lr* i *PR*, skupiając się na piramidyzacji genów *Lr* i efektach fenotypowych łączenia genów. Opracowane protokoły multipleksowego PCR mogą znaleźć zastosowanie w praktyce hodowlanej.

Przy okazji recenzji dysertacji chciałabym pogratulować Doktorantce realizacji badań, które uważam za ważne dla rozwoju nauki o roślinach uprawnych. Wierzę, że uzyskane wyniki mogą przyczynić się do postępu hodowlanego. Doceniam warsztat naukowy Kandydatki i opanowanie przez nią różnych zaawansowanych metod badawczych. Cieszy mnie też fakt, że pani Aleksandra Noweiska zdecydowała się podjąć pracę w dziedzinie hodowli roślin, gdzie będzie mogła wykorzystywać swoje dotychczasowe umiejętności, zdobyte i rozwijane już od momentu realizacji pracy magisterskiej. Życzę, aby konsekwencja w wyborze ścieżki zawodowej przyniosła Pani satysfakcję, a także by była odpowiednio doceniana.

WNIOSEK KOŃCOWY

Zgodnie z wymogami art. 187 ustawy z dnia 20 marca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668) rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Noweiskiej przygotowana w formie dwóch artykułów naukowych i monografii prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie „Rolnictwo i Ogrodnictwo” i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. **Pracę opiniuję pozytywnie**, oceniając dysertację jako spójne tematycznie, a zarazem kompleksowe i wartościowe opracowanie zagadnienia dotyczącego genetycznego podłoża odporności pszenicy na rdzę brunatną.

Wnoszę do Rady Dyscypliny Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Noweiskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Szczecin, 4 lutego 2025