

Wrocław, 04.02.2025

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Julii Spychały pt.:

„Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną”

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Tomkowiak, prof. UPP z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

1. Podstawa opracowania

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo RNDRiO444000.2024 z dnia 29.11.2024 roku skierowane przez Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo prof. UPP dr hab. Piotra Rybackiego. Podstawą przygotowania była papierowa forma dokumentów do postępowania obejmująca:

- Dysertację;
- Kwestionariusz osobowy - Wszczęcie postępowania o nadanie stopnia doktora;
- Raport z badania antyplagiatowego;
- Wykaz osiągnięć naukowych
- Życiorys;
- Opinię promotora;
- Opinię o przebiegu kształcenia w szkole doktorskiej UPP;
- Streszczenie pracy w języku angielskim;
- Dyplom ukończenia studiów drugiego stopnia.

Przedstawiona do oceny dokumentacja spełnia wymogi formalne do ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

2. Podstawowe informacje z życiorysu zawodowego Kandydatki

Tytuł zawodowy magistra inżyniera Pani Julia Spychała uzyskała w 2020 roku na podstawie pracy pt. „Analiza ekspresji genu *Lr34* odpowiedzialnego za odporność typu APR w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną” wykonanej pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Następnie Pani mgr inż. Julia Spychała podjęła studia w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. **Z przedłożonych dokumentów wynika, że Pani mgr inż. Julia Spychała nie ubiegała się uprzednio o nadanie tytułu naukowego stopnia doktora.** W trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej odbyła dwumiesięczny staż w ramach

programu Erasmus+ na Universitat Politècnica de València w Hiszpanii. Ponadto uczestniczyła jako wykonawca w projekcie SONATA finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki („Krótka historia o wielkiej roli małego RNA w procesie regulacji kwitnienia łubinu białego - kierownik projektu: dr Sandra Rychel-Bielska). Od 1 lipca 2024 roku została zatrudniona na stanowisku asystenta w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy.

Należy zaznaczyć, że Pani mgr inż. Julia Spychała jest współautorem 12 publikacji naukowych o sumarycznym współczynniku Impact Factor 34,059, a suma punktów zgodnie z listą czasopism MNISW z uwzględnieniem prac stanowiących rozprawę doktorską wynosi 1 180. Zgodnie z bazą Web of Science Indeks Hirsch'a wynosi 5, a publikacje zostały zacytowane 35 razy. Ponadto jest wykonawcą w projekcie finansowanym przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt. „Analiza molekularna genów warunkujących odporność poziomą u pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na porażenie przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Puccinia* sp.” (kierownik projektu: prof. dr hab. Michał Kwiatek).

3. Formalna analiza pracy

Przedłożona do oceny praca obejmuje 91 stron maszynopisu, w tym 14 tabel, 12 Rycin. Praca składa się z 8 głównych rozdziałów, które zostały uszeregowane w sposób logiczny i odpowiadający treści pracy. Zasadnicze rozdziały zamieszczono w następującej kolejności: „Wprowadzenie”, „Hipoteza badawcza i cel pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Podsumowanie i wnioski”, „Literatura”. Ponadto w pracy wyodrębniono część zawierającą wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład zbioru oraz oświadczenia Promotora i Autora oraz współautorów, co zamyka dysertację w 197 stronach. Generalnie można by zastosować bardziej precyzyjny ‘Spis treści’ - tym bardziej że na stronie trzeciej zamieszczono podziękowania, może lepiej gdyby znalazły się na stronie 2. Na stronie 4 i 5 znajdują się oświadczenia Autora oraz Promotora, których nie wyszczególniono w spisie. Wg mnie od strony trzeciej dysertacji powinno być zamieszczone: 1. Oświadczenia promotora pracy dyplomowej oraz autora pracy doktorskiej; 2. Źródła finansowania – warto by zasygnalizować; 3. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (w kolejności omawiania); 4. Wykaz skrótów; 5. Streszczenia; 5.1. Streszczenie w języku polskim; 5.2. Streszczenie w języku angielskim i w dalszej kolejności bez zmian.

Autorka podzieliła główne rozdziały na podrozdziały, co nadaje rozprawie dużą przejrzystość, zwłaszcza w kontekście jej wielowątkowości. Między poszczególnymi rozdziałami zostały zachowane właściwe proporcje. Układ pracy został opracowany w sposób logiczny i odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Odbiór pracy niewątpliwie poszerza zamieszczone przez Autorkę streszczenie w języku angielskim, w którym w skrótovej formie przedstawiła metodykę, cel i zakres badań oraz wyniki. Tytuł pracy „Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną” jest adekwatny do jej treści. Tematyka rozprawy jest aktualna, a problem badawczy ważny pod względem naukowym i praktycznym.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Julii Spychały obejmuje polskojęzyczne opracowanie wraz z załączonymi anglojęzycznymi odbitkami czterech recenzowanych artykułów wraz z dołączonymi oświadczeniami współautorów. Prezentowane w dysertacji wyniki zamieszczone są w cyklu czterech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacjach, które ukazały się w latach 2023-2024:

P1: Tomkowiak A., Bobrowska R., Kwiatek M.T., Spychała J., Kuczyński J., Tyczewska A., Kowalczewski P.L., Weigt D., Kosiada T. (2023) Analysis of miRNA expression associated with gene Lr34 responsible for resistance mechanisms to wheat leaf rust. Pak. J. Bot., 55(1). [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1\(6\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2023-1(6)) IF=0,90; MEIN=40 pkt

P2: Spychała J., Tomkowiak A., Noweiska A., Bobrowska R., Bocianowski J., Książkiewicz M., Sobiech A., Kwiatek M.T. (2023) Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes Lr34/Yr18 and Lr67/Yr46 in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. Genes, 14, 1376. <https://doi.org/10.3390/genes14071376> IF=2,80; MEIN = 100 pkt

P3: Spychała J., Tomkowiak A.*, Noweiska A., Bobrowska R., Rychel-Bielska S., Bocianowski J., Wolko Ł., Kowalczewski P.L., Nowicki M.*, Kwiatek M.T. (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* resistancetrait. PLoSONE19(9):e0309944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309944> IF=2,90; MEIN = 100 pkt

P4: Spychała J., Tomkowiak A.*, Noweiska, A., Bobrowska R., Bocianowski J., Sobiech A., Kwiatek M.T. (2024) 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. Curr. Issues Mol. Biol 2024, 46, 5511-5529. <https://doi.org/10.3390/cimb46060329> IF=2,80; MEIN = 70 pkt

Wyniki badań opublikowano w czasopismach o znacznych współczynnikach oddziaływania (ang. impact factor IF) wynoszących od 0,9 do 2,9 a punktacja wg MEiN waha się od 40 do 100 pkt. Łączny IF w/w prac wynosi 9,4 zaś sumaryczna liczba punktów wg MEiN osiągnęła 310 pkt., co świadczy o dobrym poziomie naukowym prac wchodzących w skład osiągnięcia i zostało pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów czasopism. W trzech ocenianych pracach Pani mgr inż. Julia Spychała jest pierwszym autorem a w jednej czwartym, przy czym pełniła w tej pracy funkcję autora korespondencyjnego. Biorąc pod uwagę wymóg formalny oceny indywidualnego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji (Dz.U.2014 Poz. 1383; 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014) spełnia ona to kryterium. Według oświadczeń dołączonych przez wszystkich współautorów, wkład Doktorantki w powstanie czterech publikacji obejmował między innymi: przeprowadzenie badań, zebranie wyników, analizę wyników i ich interpretację, sformułowanie wniosków oraz opracowanie finalnych wersji manuskryptów, co wskazuje na jej kluczowy udział zarówno w prowadzonych badaniach jak również w powstawaniu końcowej wersji artykułów. **Wyżej wymienione działania stanowią niewątpliwie o istotnym zaangażowaniu w prace badawcze osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora.**

4. Merytoryczna analiza pracy

Zredagowane przez Autorkę 'Wprowadzenie' odzwierciedla celowość podjętych badań dla ważnej gospodarczo rośliny jaką jest pszenica zwyczajna. Przedstawiony w nim przegląd literatury został bogato poparty cytatami, a ilość źródeł literaturowych, na które powołuje się Doktorantka, wskazuje na bardzo dobrą znajomość bieżącej problematyki badawczej u pszenicy obejmującej reakcje roślin na stresy z uwzględnieniem czynnika biotycznego jakim jest patogen *Puccinia triticina* Eriks, wywołujący rdzę brunatną u pszenicy. Zwraca też uwagę na rolę miRNA w odpowiedzi odpornościowej roślin na stresy abiotyczne i biotyczne. W rozdziale tym Autorka podkreśla złożoność genomu pszenicy, co z pewnością ma przełożenie na trudności w analizach molekularnych i jednoznaczną interpretację wyników oraz możliwość zastosowania technik molekularnych w hodowli roślin, tak aby proces introgresji i krzyżowania wstecznego dla utrwalenia korzystnych genów był efektywniejszy w doskonaleniu pszenicy zwyczajnej. Z uwagi na to, podjęte przez Doktorantkę badania wychodzą naprzeciw konieczności pogłębienia wiedzy na temat roli wybranych genów APR i powiązanych z nimi miRNA, co ma kluczowe znaczenie aplikacyjne w hodowli pszenicy. W mojej ocenie dobór cytowanych prac do poruszanych aspektów merytorycznych pracy jest właściwy. Autorka wykorzystwała najistotniejsze publikacje związane z tematem dysertacji, na które składają się artykuły zamieszczone w fachowych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym.

W kolejnym rozdziale - 5, Autorka przedstawiła jedną hipotezę badawczą oraz cel pracy, podzielony na 4 szczegółowe cele, które raczej bym określiła jako poszczególne etapy dysertacji. Sformułowana hipoteza badawcza i cel pracy są właściwe merytorycznie i wskazują na przeprowadzenie przez Autorkę wnikliwej oceny stanu wiedzy dotyczącej poruszanych zagadnień.

W rozdziale 'Materiał i metodyka badawcza' Doktorantka wyszczególniła i opisała wykorzystany w pracy materiał badawczy oraz metody jego analizy, w zależności od zakresu podjętych badań.

Dobór odmian czy też mieszańców do realizacji zamierzonych etapów badań jest kluczowy w tej dysertacji i świadczy o znajomości Doktorantki genotypów będących źródłami analizowanych genów bądź ich braku. Przy charakterystyce obiektów badawczych zabrakło mi informacji o wynikach oceny polowej na rdzę brunatną w warunkach naszego kraju. Nie znalazłam też takowej charakterystyki w publikacjach wchodzących w skład dysertacji. Taka informacja pojawia się tylko dla odmiany Glenlea na stronie 24 bez zasygnalizowania z jakiego przedziału czasowego pochodzi ten wynik. Sądzę, że w tabelach z zestawieniem badanego materiału powinna być zawarta informacja o odporności w warunkach polowych na *Puccinia triticina* Eriks podana w skali 9. stopniowej. W rozdziale tym nie podano informacji w jakich konkretnie latach prowadzono inokulacje zarodnikami *Puccinia triticina* Eriks w warunkach kontrolowanych. Przedmiotem badań było w pierwszej części 11 genotypów pszenicy zwyczajnej (Tabela 1), których ziarniaki otrzymano z Banku Genów z National Small Grains Collection (Agricultural Research Station w Aberdeen, USA): Myna'S', Sparrow, Pavon'S' Artigas, Artigas*, NP 846, Lerma Rojow, w tym jedna ozima - TX89D6435. W tabeli 1 warto by też zestawić informacje o obecności lub braku analizowanych genów, a także oprócz rodowodu analizowanych form z jakiego okresu wytworzenia pochodzą. Istotnym elementem

w podjętych badaniach jest również włączenie materiałów hodowlanych w tym pokoleń F1, F2, BC1F1 (Rycina 2) pochodzących z czterech różnych polskich spółek hodowlanych (Hodowla Roślin Strzelce sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Spółka z o.o., DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o. Hodowla Roślin Smolice sp. z o.o. Grupa IHAR), gdzie użyte odmiany do krzyżowań reprezentują kreacje z ostatniego 10., z najstarszą odmianą Harenda. Chciałam zasygnalizować, że w przypadku zbóż używamy terminu ziarniaki a nie nasiona.

Doświadczenia realizowane w ramach poszczególnych etapów pracy wskazują na znaczną pracochłonność zarówno podczas ich realizacji jak i gromadzenia danych empirycznych.

W celu sprawdzenia obecności alleli *Lr34*, *Lr46* oraz *Lr67* odpowiedzialnych za potencjalną odporność u badanych odmian i form mieszańcowych, wyizolowano genomowe DNA i przeprowadzono reakcje PCR. Dane dotyczące poszczególnych reagentów reakcji PCR sugerowałabym przedstawić w postaci stężeń końcowych, z podaniem ewentualnie koncentracji wyjściowych. Zebranie materiału do badań było związane z przeprowadzeniem inokulacji zarodnikami *Puccinia triticinia* pozyskanymi z zainfekowanych roślin w doświadczeniach polowych, zlokalizowanych w różnych częściach Polski. Mam pytanie czy zarodniki były zbierane w jednym sezonie wegetacyjnym i czy na roślinach występowały inne patogeny?

Autorka wyczerpująco przedstawiła opis izolacji materiału genetycznego (DNA, miRNA), selekcji genów referencyjnych, projektowania starterów do analizy RT-qPCR oraz ddPCR odpowiednio dla genów *Lr34*, *Lr67* i genów kandydujących *Lr46* a także cząsteczek miRNA, komplementarnych do sekwencji wybranych analizowanych genów - *Lr34* oraz kandydujących dla locus *Lr46*.

Ważnym etapem metodycznym było zweryfikowanie specyficzności zastosowanych starterów oraz amplifikacji właściwego fragmentu DNA poprzez sekwencjonowanie Sangera amplikonów dla wszystkich badanych genów. Dzięki temu można było wykryć potencjalne różnice w sekwencjach między odporną odmianą Glenlea a podatną Artigas*. Zastosowane metody statystyczne zostały odpowiednio opisane. Podjęty zakres analizowanych genów w kontekście celu pracy jest właściwy. Reasumując rozdział ten jest czytelny i dostarcza wystarczającą ilość informacji, co do sposobu i zakresu prowadzonych badań.

Opis wyników badań został przeprowadzony w sposób kompaktowy i klarowny. W pierwszym podrozdziale tej części dysertacji - 7.1. Autorka analizuje identyfikację markerów molekularnych sprzężonych z analizowanymi genami w badanych odmianach i analizowanych mieszańcach różnych pokoleń. Podczas czytania tego opisu wyników nasuwa się pytanie, dlaczego przeanalizowano 'losowo' tylko po kilka roślin pokoleń F2 czy BC1F1? Czy autorka dysponuje danymi z fenotypowania analizowanych mieszańców i form rodzicielskich pod kątem odporności na rdzę brunatną? Jak można zinterpretować wynik dla Harenda x Glenlea (Tabela 8)? Dlaczego w pracy zdecydowano się na wykorzystanie mieszańców z takimi odmianami jak: Jutrzenka, Harenda, Aura, Itaka, Merkawa? Jak można zinterpretować segregację markerów molekularnych *csLV34*, *csLV46G22*, *cf23* i *cf21* w pokoleniu F2 oraz BC1F1? W moim odczuciu rozdział 'Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z analizowanymi genami w badanych pokoleniach (P1, P2, P3, P4)' powinien się znaleźć na końcu omawianych wyników. Ponadto w publikacji P1 i P2 i P3 charakteryzowano zasadniczo odmiany a w P4 mieszańce wczesnych pokoleń, stąd tytuł rozdziału nie jest do końca adekwatny. Na podstawie wyników opublikowanych w artykułach oznaczonych w wykazie

jako P2 i P3 udokumentowano, że odmiana Glenlea jest donorem analizowanych genów warunkujących odporność na rdzę brunatną (7.2. Wybór formy donorowej pszenicy). Zastosowanie sekwencjonowania metodą Sangera udokumentowało, że sekwencje amplikonów są komplementarne zarówno do genu *Lr34* jak i *Lr67*, co jest istotne przy wykorzystaniu specyficznych starterów w praktyce hodowlanej. Zastosowane metody statystyczne pozwoliły na skuteczną weryfikację uzyskanych wyników z analiz ekspresji genów odporności na rdzę brunatną typu APR (*Lr34*, *Lr67* i genów kandydujących *Lr46*) oraz miRNA: *tae-miR9653b*, *tae-miR9773* i *tae-miR9677b* związanych z genem *Lr34* oraz *tae-miR5384-3p*, *tae-miR9780*, *tae-miR9775* i *tae-miR164*, związanych z badanymi genami kandydującymi. Badania dotyczyły wzorców ekspresji genów w różnych odmianach pszenicy oraz formach mieszańcowych uzyskanych w pokoleniach F1, F2 i BC1F1, biorąc pod uwagę fakt, że podłoże genetyczne nie jest dokładnie znane. W przypadku cząsteczek miRNA komplementarnych do genu docelowego *Lr34*, tylko w przypadku *tae-miR9653b* uzyskano wyniki pozwalające na wiarygodne wnioskowanie. W prezentowanym cyklu badań, cząsteczka *tae-miR9653b* wykazywała profil ekspresji sugerujący zaangażowanie w reakcję na stres biotyczny wywołany przez *Pt*.

W rozdziale 'Dyskusja' Doktorantka porównała rezultaty swoich badań z wynikami innych autorów i nie tylko potwierdziła znane z literatury zależności, ale wyjaśniła je poprzez analizę wyników badań. O dojrzałości naukowej i znajomości potrzeb hodowli twórczej pszenicy świadczy interesująco sformułowane podsumowanie oraz wyciągnięcie prawidłowych wniosków, choć bardzo szczegółowych i dlatego można by je przeredagować.

Ostatni rozdział 'Spis literatury' obejmuje 145 pozycji. Opracowania anglojęzyczne stanowią podstawę bibliografii. Dobór piśmiennictwa jest bardzo bogaty i związany z tematyką recenzowanej pracy.

Do najważniejszych osiągnięć w ocenianej dysertacji zaliczam:

- Rozpoznanie podłoża genetycznego pod względem występowania genów związanych z odpornością na rdzę brunatną u pszenicy zwyczajnej i wskazanie genu kandydującego *Lr46-Glu2* jako mającego prawdopodobną rolę w procesach odpornościowych pszenicy w badanej puli genetycznej.
- Wytypowanie dwóch (*TUBβ* oraz *ARF*) spośród czterech testowanych genów referencyjnych (*TUBβ*, *ARF*, *RLI*, *EF2-1*) jako przydatnych do właściwej analizy ekspresji badanych genów APR.
- Zaprojektowanie i przetestowanie starterów do analiz RT-qPCR, które mogą zostać zastosowane w badaniach selekcyjnych podczas dalszych prac nad mechanizmami odporności genów typu APR oraz w programach hodowlanych pszenicy, w celu piramidyacji genów.
- Potwierdzenie udziału w odpowiedzi odpornościowej na inokulację grzybem *Pt* oraz możliwą regulację ekspresji genu *Lr46-RLK3* przez cząsteczkę *tae-miR164*.
- Wskazanie udziału cząsteczek *tae-miR9653b* oraz *tae-miR5384-3p* w odpowiedzi na inokulację grzybem *Pt*.

5. Wniosek końcowy

Poddana ocenie rozprawa koncentruje się na istotnym zagadnieniu i stanowi interesujące wielowątkowe studium badawcze. Charakteryzuje się zarówno elementami poznawczymi jak i o wymiarze aplikacyjnym. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością warsztatu z zakresu biologii molekularnej, a także dzięki zastosowaniu odpowiednich narzędzi statystycznych umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników i formułowania kluczowych wniosków. Doktorantka ma szeroką znajomość zagadnień genetycznych u roślin użytkowych, wykazała się też samodzielnością w realizacji badań nie tylko prowadzonych w ramach ocenianej dysertacji, ale też w innych, które były podstawą kolejnych publikacji. Udział w licznych konferencjach oraz wykonawstwo w projektach naukowych świadczą o dużym zaangażowaniu i gotowości do dalszej pracy naukowej.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Julii Spychały pt.: **„Wielopłaszczyznowa analiza molekularnych mechanizmów odporności u pszenicy zwyczajnej w odpowiedzi na porażenie przez rdzę brunatną”** spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z póź. zm.). **Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Julii Spychały, ubiegającej się o stopień naukowy doktora, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

.....*Renata Galek*.....

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni