

Prof. dr hab. Anna Tratwal

Poznań, 02.09.2025

Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Monitorowania i Sygnalizacji Agrofagów

Ul. Władysława Węgorka 20

60 – 318 Poznań

RECENZJA

Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Aleksandry Marii Sobiech

„Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium”

Podstawą formalną do wykonania recenzji jest pismo RNDRiO60.4000.2025 o powołaniu w wyniku głosowania Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Marii Sobiech.

Zapisy i wytyczne związane z Integrowaną ochroną roślin, które obowiązują w całej Unii Europejskiej od 1 stycznia 2014 r. (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów (Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009), Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (Dz. U. z 2020 r. poz. 2097), rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2013 r. w sprawie wymagań integrowanej ochrony roślin (Dz. U. z 2013 r. poz. 505), rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 16 grudnia 2010 r. w sprawie integrowanej produkcji (Dz. U. nr 256, poz. 1722) wyraźnie podkreślają wymóg stosowania wszelkich dostępnych metod pozwalających na ograniczanie stosowania środków chemicznych w ochronie roślin. W pierwszej kolejności zaleca się wykorzystanie metod niechemicznych

w ograniczaniu występowania organizmów niepożądanych (choroby, szkodniki, chwasty) do nieszkodliwego poziomu.

Ponadto, założenia i cele wprowadzanych strategii polityki rolnej UE, rewolucja rolnicza jaka odbywa się za sprawą wprowadzanego przez Komisję Europejską planu działania „Europejskiego Zielonego Ładu”, strategii „Od pola do stołu” oraz strategii „Na rzecz bioróżnorodności”, zakładają odejście od wykorzystania chemicznej ochrony roślin na rzecz, tej naturalnie występującej w świecie roślin, odporności genetycznej.

W tym kontekście, wykorzystanie precyzyjnych metod nad poszukiwaniem i wykrywaniem mechanizmów związanych z odpornością odmian roślin uprawnych na choroby są niezmiernie cenne i poszukiwane.

Uprawa kukurydzy w Polsce w ostatnich latach cieszy się coraz większą popularnością. Jest ceniona za wartości odżywcze, ma szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym oraz paszowym, a co najważniejsze, za stosunkowo dobrą opłacalność uprawy. Jednym z pierwszych, podstawowych elementów uprawy kukurydzy jest odpowiedni dobór odmiany dostosowanej do dalszych etapów wykorzystanie (kiszonka, ziarno) oraz do lokalnych warunków glebowo – klimatycznych. Jednak najważniejszym kryterium na tym etapie to odmiany odporne, które zapewniają dobry, stabilny plon, przy jednoczesnym zminimalizowaniu liczby kosztownych zabiegów chemicznych.

Wobec powyższego podjęte badania przez mgr inż. Aleksandrę Marię Sobiech uważam za słuszne, a ich wyniki mogą być cennym źródłem informacji i podejścia do programów hodowlanych ważnej uprawy, jaką jest kukurydza w Polsce, zwłaszcza w ostatnich latach.

Formalna ocena rozprawy

Pani mgr inż. Aleksandra Maria Sobiech była doktorantką Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w dyscyplinie *rolnictwo i ogrodnictwo*. Rozprawę doktorską „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium” przygotowała w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin UPP pod opieką promotorów, tj., prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak oraz prof. dr hab. Jana Bocianowskiego.

Rozprawa doktorska przedstawiona do mojej oceny liczy 106 stron. Skład dysertacji to: wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji rozprawy doktorskiej (wraz z punktacją), wymagane oświadczenia, jasny i przejrzysty spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, sześć rozdziałów stanowiących główną część dysertacji, bibliografię, spis tabel i rycin. Do pracy dołączona także wykaz pięciu monotematycznych oryginalnych prac będących przedmiotem rozprawy (kopie publikacji) oraz oświadczenia współautorów publikacji.

W oświadczeniach współautorów publikacji wchodzących w skład dysertacji zabrakło w mojej ocenie udziału procentowego doktorantki. Zakładam, że jest wysoki – w trzech publikacjach mgr inż. Aleksandra Maria Sobiech jest pierwszym, w przypadku jednego artykułu jedynym autorem, więc warto to podkreślić przy oświadczeniach współautorów.

Na początku pracy doktorantka, poprzez *Wyjaśnienia skrótów*, *Streszczenia*, wprowadza w zagadnienia będące przedmiotem jej badań i podstawą przygotowania rozprawy doktorskiej.

We *Wprowadzeniu* podzielonym na cztery podrozdziały, autorka przybliży kolejno zagadnienia związane z produkcją kukurydzy wraz ze wskazaniem zagrożeń związanych z występowaniem agrofagów i ograniczeń w stosowaniu chemicznych środków ochrony roślin. W tej części opisane są zagrożenia ze strony patogenów wywołujących objawy chorób fuzaryjnych (*Fusarium* spp.), typy odporności u roślin, wpływu fenotypu na genetycznie uwarunkowaną odporność, metody molekularne wykorzystywane w hodowli kukurydzy oraz postęp w hodowli odpornościowej dzięki wykorzystaniu selekcji wspomaganej markerami molekularnymi (MAS).

Powyższe rozważania pozwoliły doktorantce na sformułowanie hipotezy badawczej oraz celu rozprawy doktorskiej.

Hipoteza badawcza zakłada, że wielowymiarowa analiza genetycznych uwarunkowań wybranych genów i powiązanych z nimi regionów pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmu odporności na *Fusarium* spp. w kukurydzy zwyczajnej.

Głównym celem pracy była wielopłaszczyznowa analiza genetycznych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy na grzyby powodujące fuzariozę kolb kukurydzy. Ponadto, cele szczegółowe zakładały:

- Identyfikację nowych markerów silicoDArT i SNP sprzężonych z genami warunkującymi odporność roślin kukurydzy na w/w grzyby.

- Zaprojektowanie starterów służących do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów silicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi odporność na *Fusarium* spp.

- Optymalizację procedur diagnostycznych, służących do identyfikacji nowych markerów molekularnych na materiałach referencyjnych podatnych i odpornych na *Fusarium* spp.

- Określenie poziomu ekspresji wybranych genów kandydujących związanych z odpornością roślin kukurydzy na *Fusarium* spp.

- Wybranie potencjalnych genów niosących odporność na *Fusarium* spp. u kukurydzy spośród wytypowanych genów kandydujących.

W kolejnym rozdziale – *Materiał i metody* doktorantka szczegółowo opisuje materiał badawczy, metody – czyli doświadczenia polowe, metody i sposoby obserwacji, oceny przynależności gatunkowych analizowanych grzybów, identyfikację markerów molekularnych sprzężonych z potencjalnymi genami odporności na *Fusarium* spp., wykorzystanie zidentyfikowanych polimorfizmów silicoDArT i SNP do różnicowania genotypów referencyjnych podatnych i odpornych na fuzarium, analizę ekspresji wybranych genów kandydujących sprzężonych z istotnymi markerami silicoDArT i SNP oraz genów referencyjnych i analizy statystyczne. Ta część obejmuje 18 stron, zawiera czytelne tabele (4), ryciny (2) i zdjęcia (4), które ułatwiają odbiór tematyki.

Najbardziej obszerny rozdział – *Wyniki*, to część, gdzie na 34 stronach wzbogaconych 18 rycinami i 11 tabelami doktorantka przedstawia wyniki swoich badań, zaznaczając jednocześnie, w których publikacjach wchodzących w skład cyklu publikacji przeprowadzone badania i uzyskane wyniki są bardziej szczegółowo opisane.

W tej części pracy autorka w sposób przejrzysty i czytelny przybliżyła wyniki swoich badań, kolejno omawiając takie zagadnienia jak: wyniki obserwacji polowych pod kątem porażenia kukurydzy przez fuzarium, wraz z oceną ich przynależności gatunkowej. Następnie doktorantka opisuje wyniki z prac nad izolacją genomowego DNA z liści kukurydzy i identyfikacją markerów sprzężonych z potencjalnymi genami odporności na *Fusarium* spp. Kolejne dane dotyczą ekspresji genów kandydujących związanych z odpornością na *Fusarium* spp. Rozdział jest zakończony analizą danych

transkryptomicznych, która słusznie jest przedstawiona w formie łatwej w odbiorze tabeli.

Bardzo cenny rozdział - *Dyskusja* obejmuje 10 stron maszynopisu. Na podkreślenie zasługuje szerokie i wnikliwe opracowanie tego rozdziału, w którym autorka umiejętnie konfrontuje wyniki własne z rezultatami badań innych autorów zawartych w przytoczonych pozycjach bibliografii. Z rozdziału tego wynika, że mgr inż. Aleksandra Maria Sobiech posiada szerokie rozeznanie w literaturze z tej dziedziny. W mojej ocenie dyskusja przeprowadzona jest prawidłowo i wyczerpująco.

W części *Podsumowania i wnioski* Doktorantka przedstawia dziesięć logicznych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań i analiz. Wnioski są cennym źródłem informacji dla przyszłych programów hodowlanych. Dzięki przeprowadzonym badaniom praktyka rolna, hodowcy mają dostęp do bardzo istotnych wyników, mających wysoki aspekt użytkowy.

Bibliografia jest bogata i obejmuje, jak podaje Doktorantka, 184 pozycje, jednak jest ich nieco mniej (kilka pozycji w spisie literatury jest powtórzonych – uwagi na końcu Recenzji). Prace w zdecydowanej większości angielskojęzyczne i dotyczące najnowszych osiągnięć. Dobór literatury świadczy o dobrym rozeznaniu mgr inż. A.M. Sobiech w zagadnieniu.

Rozdział *Spis tabel i rycin* wraz z podaniem strony, na której znajduje się dana tabela czy rycina jest dobrym rozwiązaniem i sprawnie ułatwia odnalezienie konkretnych informacji i wyników z przeprowadzonych przez Doktorantkę badań.

Kolejna część pracy, to rozdział *Opublikowane prace wchodzące w skład zbioru*. W tym miejscu Doktorantka zamieściła kopie czterech prac wchodzących w skład cyklu publikacyjnego. Mgr inż. Aleksandra Maria Sobiech, przygotowując wcześniejszy rozdział - *Wyniki*, wyraźnie zaznaczała, jakie wyniki zostały wykorzystane przy pisaniu kolejnych, logicznie ułożonych publikacji.

Prace zostały już opublikowane w czasopiśmie z kolekcji Web of Science, trzy z nich posiadają o wskaźniku oddziaływania (Impact Factor – IF) 3,6 do 4,9. Sumaryczny wskaźnik oddziaływania prac wchodzących w skład cyklu wynosi 13,4, natomiast łączna liczba punktów wg klasyfikacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 420 (dane pochodzące z roku wydania publikacji). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w przypadku jednej – jedynym autorem.

Każda z publikacji stanowi część serii badań nad populacją 560 genotypów kukurydzy *Zea mays* L., w skład których wchodziło 252 linie wsobne (250 linii matczynych i dwie linie ojcowskie) oraz 308 mieszańców pokolenia F1 (mieszańce powstały w wyniku krzyżowania linii matecznych i ojcowskich).

W pierwszej pracy: „Associative and Physical Mapping of Markers Related to *Fusarium* in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation Sequencing (NGS)” opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, przedstawione zostały wyniki badań, w których wykorzystano 186 linii wsobnych kukurydzy pochodzących z dwóch spółek hodowlanych. W ramach badań przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), które pozwoliło na identyfikację 81 602 markerów molekularnych: 53 031 typu SilicoDArT i 28 571 typu SNP. Markery posłużyły do oceny podobieństwa genetycznego badanych linii. Przeprowadzono analizę wariancji, która wykazała istotny wpływ linii oraz interakcji linii z lokalizacją na stopień porażenia roślin, natomiast różnice między lokalizacjami nie były istotne. Do mapowania asocjacyjnego wykorzystano analizę GWAS, która wskazała na markery istotnie związane z odpornością na fuzariozę. Spośród nich, do mapowania fizycznego wybrano siedem markerów istotnych na poziomie 0,001. Dzięki kolejnym badaniom (analiz PCR), stwierdzono że dwa z siedmiu wybranych markerów, 15097-SilicoDArT (na chromosomie 2) i 58771-SNP (na chromosomie 3), zlokalizowane są wewnątrz genów. Na podstawie danych literaturowych stwierdzono, że oba te geny mogą być powiązane z odpornością roślin kukurydzy na fuzariozę.

Druga praca to: Application Marker-Assisted Selection (MAS) and Multiplex PCR Reactions in Resistance Breeding of Maize (*Zea mays* L.) opublikowana w *Agriculture*.

Wyniki badań przedstawione w tej pracy dotyczyły doświadczeń z 30 genotypami kukurydzy (15 odpornych i 15 podatnych na *Fusarium* spp.). Doświadczenie polowe, przeprowadzone w 2021 roku, polegało na obserwacji stopnia porażenia kolb fuzariozą. W publikacji opracowano reakcję PCR w celu identyfikacji 12 markerów molekularnych związanych z genami odporności oraz podjęto próbę opracowania warunków dla reakcji multiplex PCR, aby przyspieszyć proces identyfikacji markerów. Stwierdzono, że istnieje korelacja między liczbą zidentyfikowanych markerów a stopniem odporności na fuzariozę. Linie o najwyższej odporności (8-9 w skali COBORU) posiadały największą liczbę markerów. Analiza regresji wykazała, że wszystkie markery z wyjątkiem AD8 były

istotnie statystycznie związane z odpornością na *Fusarium* spp. Uzyskane wyniki badań polowych i molekularnych pozwalają na selekcję linii referencyjnych, które są odporne w warunkach polowych i mogą być wykorzystane w programach hodowlanych do tworzenia nowych, odpornych odmian kukurydzy.

Kolejna publikacja to: „Molekularne mechanizmy odporności na fuzariozę kolb kukurydzy” opublikowana we *Fragmenta Agronomica*. Jest to wartościowa praca, o charakterze przeglądowym. Jak słusznie podkreśla autorka, kukurydza staje się coraz bardziej popularną uprawą w Polsce, z uwagi na wiele różnych czynników poruszonych wcześniej w mojej Recenzji. Z drugiej strony wzrasta zagrożenia ze strony różnych agrofagów, min. chorób fuzaryjnych. Publikacja omawia takie zagadnienia, jak właśnie choroby fuzaryjne, problemy z ich zwalczaniem, interakcje patogen – gospodarz, genetyczne podstawy odporności na infekcje powodowaną przez grzyby z tego rodzaju. W podsumowaniu, autorka stwierdza, że przede wszystkim rozumienie podstaw genetycznych i mechanizmów molekularnych kontrolujących odporność jest kluczowym wymogiem dla wytworzenia odmian kukurydzy o podwyższonej odporności na fuzarium. Odporność na *Fusarium* jest cechą ilościową i opartą na rozproszonej architekturze wielu drobnych genów, więc zdaniem autorki najlepszym podejściem dla przyszłej hodowli molekularnej jest selekcja wspomagana markerami (MAS). Jest to cenna uwaga i wskazówka dla programów hodowlanych o wysokim utylitarnym charakterze.

Ostatnia, czwarta publikacja wchodząca w skład cyklu to: *Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Maize Fusarium Cob Resistance Using Next-Generation Sequencing Technology*” wydana w *International Journal of Molecular Sciences*.

W publikacji wykorzystano materiał roślinny, w postaci 64 linii wsobnych i 122 mieszańców F1 (materiał pochodzący z tych samych spółek hodowlanych jak w pracy pierwszej). Przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), które pozwoliło na identyfikację 92 614 markerów, w tym 60 436 typu SilicoDArT oraz 32 178 typu SNP. Analiza wariancji wykazała, że zarówno genotyp, lokalizacja, jak i ich interakcja miały statystycznie istotny wpływ na stopień porażenia fuzariozą. Do mapowania asocjacyjnego wykorzystano analizę GWAS, która wskazała na markery istotnie związane z odpornością na fuzariozę. Spośród nich, do mapowania fizycznego wybrano 10 istotnych statystycznie na poziomie 0,001. W tym celu zaprojektowano specyficzne

startery i przeprowadzono analizę PCR na 20 genotypach referencyjnych (10 odpornych i 10 podatnych). W wyniku analiz stwierdzono, że 2 markery (11801 i 20607) rozróżniły genotypy podatne i odporne, przy czym marker numer 11 801 okazał się najskuteczniejszy. Jest to cenny wniosek o charakterze użytkowym.

Uwagi do pracy:

Po przeczytaniu przedstawionej do recenzji rozprawy mgr inż. Aleksandry Marii Sobiech pt. „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium” chciałabym wnieść kilka uwag. Moje uwagi nie umniejszają wysokiej wartości pracy, która jest bardzo obszerna, ale przejrzyste omawia podjętą tematykę. Doktorantka podjęła się trudnego zadania, wielowątkowego i wymagającego wielu prac i analiz, które w efekcie końcowym przyniosły wiele cennych wniosków i wskazań dla przyszłych prac, zarówno dla naukowców oraz co ważniejsze, hodowców.

Moje sugestie/uwagi:

- tytuł: „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium”, zmieniałabym na Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays* L.) na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.”. Na tym etapie jest to oczywiście niemożliwe – ale sugestia do wykorzystania przy ewentualnych dalszych publikacjach.

- w części Materiały i metody – jest podana pełna nazwa dwóch spółek, od których pozyskano materiał roślinny wykorzystany do sekwencjonowania, tj., Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Na stronie 29 (ryciny z przebiegiem warunków meteorologicznych) pojawiają się już nazwy miejscowości - Smolice i Kobierzyce. Należałoby w tym rozdziale (w części doświadczenia polowe) uściślić, że doświadczenia było przeprowadzane na terenie w/w spółek, ale przypadku MHR Sp. z o.o. był to konkretnie Zakład Kobierzyce należący do tej spółki.

- na str. 26 jest drobna literówka – otrzymano, zamiast „otrzymano”, na str. 28 – sp., zamiast Sp.

- str. 30 – fotografie – w podpisach jest „...w Hodowli Roślin w Smolicach...”, uważam, że powinno się podać albo pełną nazwę – albo samą nazwę miejscowości –

Smolice. Trochę zabrakło mi zdjęć, dla porównania, z Kobierzyc – podejrzewam, że nie było możliwości ich zrobienia.

- bibliografia

- Poz. 32 i 33 – to ta sama publikacja
- Poz. 55 i 56 – j.w.
- Poz. 73 i 74 – j.w
- Uwaga ogólna – w przypadku cytowania publikacji dwuautorskiej – w tekście (str. 15) jest podawane jako np. Bode i Calvin (nazwiska ze spójnikiem „i”), a czasami jako Kapela, Majchrowska-Safaryan (nazwiska po przecinku) – należałoby to ujednolicić
- Nie znalazłam w tekście cytowania kilku publikacji np. poz. 4 An, X., Dong, Z., Tian, Y., Xie, K., Wu, S., Zhu, T., Wan, X. (2019); poz. 30 Bouwer, G.A. (2020). Framework for effective...; poz. 80 Ji, D., Li, L., Wang, Y., Zhang, J., Cheng, M., Sun, Y., Liu, Z., et al. (2014); poz. 143 Shendure, J., Ji, H. (2008).
- W tekście z kolei są publikacje (cytowania) których nie znalazłam w Bibliografii jak np. Zipfel, 2016 (w spisie jest tylko pozycja z 2014); Hetmann, Kowalczyk, 2019; Clements i in., 2004 (w spisie jest pozycja z 2003); Chen i in., 2021;

Pytania do Doktorantki

- Na jakiej podstawie były wybierane genotypy referencyjne (podatne i tolerancyjne)?
- Jakie są drogi zakażenia kukurydzy przez *Fusarium* spp. (pośrednie i bezpośrednie)?
- Jak wygląda mechanizm wnikania patogena do rośliny?

Podsumowanie

W podsumowaniu jeszcze raz chciaabym pokreślić dużą wartościowość przedstawionej do mojej oceny pracy Doktorantki. Uzyskane wyniki są cennym źródłem dla dalszych rozważań naukowych, jak i programów hodowlanych. Dzięki przeprowadzonym analizom z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji oraz mapowania asocjacyjnego zidentyfikowano nowe markery molekularne, sprzężone z genami kandydującymi związanymi z odpornością na grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. u kukurydzy.

Na podstawie szczegółowej oceny treści rozprawy pod względem merytorycznym, interpretacji wyników, sposobu przeprowadzenia dyskusji, a także formułowania wniosków stwierdzam, że praca jest poprawna, czytelna, łatwa w odbiorze i zrozumiała, interpretacja wyników jest logiczna, a wnioski są konkretne.

Tematyka i zakres badań w pełni kwalifikują pracę doktorską do ubiegania się Autorki o stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Po gruntownej ocenie, wskazaniu uwag, których nie sposób uniknąć w tak obszernej pracy, wystawiam pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej autorstwa mgr inż. Aleksandry Marii Sobiech „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium”, wykonanej w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin UPP pod opieką promotorów, tj., prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak oraz prof. dr hab. Jana Bocianowskiego.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Marii Sobiech w pełni spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) stawiane pracom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogródnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr. inż. Aleksandry Marii Sobiech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Monitorowania
i Sygnalizacji Agrofagów
Anna Tratwal
prof. dr hab. Anna Tratwal