

Lublin, 01.09.2025 r.

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

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Marii Sobiech
pt.: „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z
odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium”

Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu nr XVII/1/2025 z dnia 26 czerwca 2025 r. w oparciu o 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).

Podstawowe dane o Kandydatce

Pani mgr inż. Aleksandra Sobiech jest absolwentką Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Tytuł zawodowy magistra inżyniera uzyskała 29 czerwca 2020 r. na podstawie pracy pt. „Indukcja embriogenezy mikrospor w kulturach pylnikowych pszenicy”, którą wykonała w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Doroty Weigt. W 2021 roku Kandydatka rozpoczęła kształcenie w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu realizując badania pod kierunkiem prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak oraz prof. dr hab. Jana Bocianowskiego.

Doktorantka jest współautorką 13 publikacji naukowych o sumarycznym IF 46,108 i wartości punktowej 1340. Jest również współautorką 9 doniesień prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Pani mgr inż. Aleksandra Sobiech nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

Informacje o ocenianej pracy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pt.: „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium” 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 oraz prof. dr hab. Jana Bocianowskiego. Stanowi ona zbiór czterech, spójnych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach przypisanych do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Prace naukowe, będące przedmiotem dysertacji tj.:

- Sobiech, A.; Tomkowiak, A.; Bocianowski, J.; Szymańska, G.; Nowak, B.; Lenort, M. Identification and Analysis of Candidate Genes Associated with Maize Fusarium Cob Resistance Using Next-Generation Sequencing Technology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24, 16712.
- Sobiech, A. Molekularne mechanizmy odporności na fuzariozę kolb kukurydzy. *Fragmenta Agronomica* 2023, 40(1), 14-24.
- Sobiech A, Tomkowiak A, Bocianowski J, Nowak B, Weigt D, Kurasiak-Popowska D, Kwiatek M, Mikołajczyk S, Niemann J, Szewczyk K. Application Marker-Assisted Selection (MAS) and Multiplex PCR Reactions in Resistance Breeding of Maize (*Zea mays* L.). *Agriculture*. 2022; 12(9):1412
- Sobiech A, Tomkowiak A, Nowak B, Bocianowski J, Wolko Ł, Spychała J. Associative and Physical Mapping of Markers Related to *Fusarium* in Maize Resistance, Obtained by Next-Generation Sequencing (NGS). *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(11):6105.

zostały opublikowane w latach 2022-2023 w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Trzy prace, prezentujące wyniki badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej ukazały się w czasopismach *International Journal of Molecular Sciences* i *Agriculture*, które są indeksowane w bazie JCR (*Journal Citation Reports*). Jedna praca ma charakter przeglądowy i prezentuje zagadnienia związane z problematyką odporności kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium*. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Z oświadczeń współautorów zamieszczonych w 13 rozdziale opracowania wynika, że Pani mgr inż. Aleksandra Sobiech brała udział w opracowaniu koncepcji badań i projektu doświadczeń, przygotowaniu krytycznego przeglądu literatury, zaplanowaniu założeń metodycznych i przeprowadzeniu badań. Brała również udział w analizie i interpretacji wyników oraz opracowaniu manuskryptów. Szeroki i aktywny udział w prowadzeniu prac i powstawaniu manuskryptów świadczy o dużej roli i zaangażowaniu Doktorantki w pracę naukową na wszystkich etapach, od planowania prac aż do opublikowania wyników.

Artykuły naukowe zawarte w rozprawie doktorskiej mgr inż. Aleksandry Sobiech zostały wcześniej poddane procesowi recenzji podczas ich akceptacji przez redakcje odpowiednich czasopism. W związku z tym, moja funkcja jako recenzenta ogranicza się do oceny formalnej autoreferatu opracowanego przez Doktorantkę, a także do analizy merytorycznej przeprowadzonych badań zawartych w rozprawie oraz ich spójności logicznej.

Praca doktorska Pani mgr Aleksandry Sobiech liczy 181 stron i jest uporządkowana według ogólnie przyjętego podziału dla tego typu opracowań. Zawiera takie elementy jak: *Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Hipoteza badawcza i cel pracy, Materiał i metody,*

Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Bibliografia, Spis tabel i rycin, Opublikowane prace wchodzące w skład rozprawy, Oświadczenia współautorów. Dodatkowo rozdziały *Wprowadzenie, Materiał i metody* oraz *Wyniki* są podzielone na podrozdziały, które ułatwiają analizę treści zawartych w pracy oraz ocenę jej spójności.

Wybór tematyki badań i ocena rozprawy doktorskiej

Kukurydza jest jednym z podstawowych gatunków zbóż uprawianym na świecie. Jest to gatunek szeroko wykorzystywany i mający ogromne znaczenie gospodarcze. Jednakże jest on, podobnie jak inne zboża narażony na atak patogenów, które w znacznym stopniu ograniczają jakość i ilość uzyskiwanych plonów. Jednym z głównych patogenów atakujących kukurydzę są grzyby z rodzaju *Fusarium*, które mogą wywoływać różne choroby, takie jak zgnilizna korzeni, siewek, łodyg czy kolb. Ponadto grzyby te produkują mykotoksyny stanowiące duże zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi i zwierząt. Uzyskiwanie wysokich plonów, wolnych od zanieczyszczeń grzybowych jest zatem ogromnym wyzwaniem dla hodowców kukurydzy, zwłaszcza przy ograniczeniach dotyczących środków chemicznych dopuszczonych do użytku w uprawie. Dużego znaczenia nabiera zatem wprowadzanie do uprawy genotypów odpornych. Z tego względu uważam, że tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest bardzo aktualna i ważna, badania przeprowadzone przez mgr inż. Aleksandrę Sobiech wpisują się doskonale w rozwój dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo, jak również mają ogromne znaczenie w hodowli kukurydzy, nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne.

Streszczenie pracy wprowadza w problematykę badawczą poruszoną w rozprawie doktorskiej. Autorka wskazuje na duże znaczenie wybranej tematyki, przedstawia cel badań oraz wskazuje metody, jakie wybrała do osiągnięcia tego celu. Przedstawia również najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań.

Rozdział *Wprowadzenie* ma przejrzystą strukturę, został podzielony na podrozdziały dotyczące: a) produkcji kukurydzy, b) charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium* i zagrożeń związanych z ich występowaniem, c) mechanizmów odporności roślin na patogeny, d) charakterystyki metod molekularnych wykorzystywanych w hodowli kukurydzy. Informacje zawarte w tym rozdziale bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej. Autorka podkreśla rolę kukurydzy jako jednego z głównych gatunków zbóż będącego podstawą gospodarki żywnościowej. Nawiązuje również do zagrożeń i wyzwań w hodowli i uprawie kukurydzy, wskazując grzyby z rodzaju *Fusarium* jako jeden z głównych czynników biotycznych ograniczających ilość i jakość plonów. Doktorantka opisuje również mechanizmy obrony roślin przed patogenami wskazując na ich różnorodność i złożoność. Wskazuje również, że w

przypadku porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium* duże znacznie dla zwiększenia odporności roślin odgrywają cechy fenotypowe np. wczesność kwitnienia czy grubsza owocnia. W dalszej części rozdziału Doktorantka płynnie przechodzi do wskazania metod molekularnych wspierających hodowlę kukurydzy. Opisuje sekwencjonowanie nowej generacji jako metodę pozwalającą na dokładne i precyzyjne analizy genomu roślin, skupia się na markerach DArTseq, które wykorzystwała w swojej pracy doktorskiej. Przedstawia również analizy GWAS i mapowanie QTL jako narzędzie do identyfikacji genów powiązanych z odpornością o wielogenowym podłożu. Doktorantka wskazuje również, że w hodowli zbóż, w tym kukurydzy ważne jest przyspieszanie procesu selekcji form odpornych poprzez zastosowanie narzędzi biologii molekularnej w postaci markerów powiązanych z daną cechą, które umożliwiają precyzyjny i szybki wybór odpowiednich genotypów.

Opisane we wstępie zagadnienia pozwoliły na sformułowanie hipotezy badawczej i celu pracy doktorskiej. Hipoteza badawcza przedstawiona przez Doktorantkę zakłada, że wielowymiarowa analiza wybranych genów i powiązanych z nimi regionów pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmu odporności kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium*, oraz wyselekcjonowanie genów odpowiedzialnych za odporność. Zatem głównym celem rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Sobiech jest wielopłaszczyznowa analiza genetycznych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium* powodujące fuzariozę kolb. Cele szczegółowe przedstawione przez Doktorantkę to: 1. identyfikacja nowych markerów silicoDArT i SNP sprzężonych z genami warunkującymi odporność roślin kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium*, 2. zaprojektowanie starterów służących do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów sprzężonych z genami kandydującymi warunkującymi odporność, 3. optymalizacja procedur diagnostycznych służących do identyfikacji nowych markerów molekularnych na materiałach referencyjnych, 4. określenie poziomu ekspresji wybranych genów kandydujących związanych z odpornością, 5. wybór potencjalnych genów niosących odporność na *Fusarium* spp. u kukurydzy spośród genów kandydujących.

W rozdziale *Materiał i metody*, Autorka opisuje materiał badawczy wykorzystany w przedstawionych badaniach. Doktorantka analizowała 560 genotypów kukurydzy, wśród których znajdowało się 252 linie wsobne i 308 mieszańców pokolenia F₁. Materiałem badawczym były również 52 genotypy referencyjne podatne i odporne na grzyby z rodzaju *Fusarium*.

W opisie metod badawczych Autorka przedstawia wszystkie metody jakie wykorzystwała w swoich badaniach dzieląc je na zadania związane z prowadzeniem doświadczeń polowych i oceną porażenia badanych form przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, identyfikacją markerów molekularnych sprzężonych z potencjalnymi genami odporności na *Fusarium* spp. oraz analizą ekspresji wybranych genów kandydujących. W opisie doświadczeń polowych Doktorantka



zawarła bardzo szczegółowy opis warunków meteorologicznych wpływających na rozwój analizowanych patogenów, moim zdaniem takie dane, łącznie z wykresami można umieścić w opisie wyników związanych z oceną porażenia kukurydzy przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, gdyż mają one duży wpływ na rozwój patogenów i nasilenie objawów chorobowych. W podrozdziale „Fenotypowanie” Autorka przedstawia jedynie metodykę oceny odporności kukurydzy, zatem tytuł rozdziału powinien być zmieniony adekwatnie do opisu. W analizie wyników znajdują się informacje dotyczące korelacji między stopniem odporności a cechami plonotwórczymi – jeśli takie cechy były analizowane, należy bardziej uszczegółowić metodykę badań. Ocena stopnia porażenia roślin przez patogeny grzybowe powinna być odniesiona do poziomu porażenia obserwowanego w próbach kontrolnych. Czy w przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentach zostały uwzględnione odpowiednie genotypy kontrolne, które umożliwiłyby wiarygodne określenie stopnia porażenia w badanych próbach?

Kolejna część metod badawczych dotyczy identyfikacji markerów molekularnych. Metodyka z tego zakresu jest dokładnie opisana, powinna być jedynie uzupełniona o sposób przeprowadzenia analizy GWAS, która umożliwiła wybór markerów molekularnych powiązanych z analizowaną cechą. W dalszej części Autorka przedstawia metody wykorzystane do konwersji markerów silicoDArT i SNP w markery bazujące na PCR. Ta część opisu metod powinna być uzupełniona o następujące dane: 1. parametry jakie zastosowano do zaprojektowania starterów, 2. wartości T_m dla zaprojektowanych starterów (w tabeli 3 podany jest jedynie skład mieszaniny reakcyjnej). Ponadto Doktorantka przedstawia skład mieszaniny dla reakcji multiplexPCR, jednakże w opisie wyników nie znalazłam informacji o przeprowadzeniu takich analiz, proszę zatem Doktorantkę o wyjaśnienie tej rozbieżności podczas obrony.

W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawia metodykę dotyczącą analizy ekspresji wybranych genów kandydujących począwszy od uzyskania prób po inokulację w odpowiednich punktach czasowych, izolację RNA, wybór genów referencyjnych i przeprowadzenie reakcji RT-qPCR.

W ostatnim podrozdziale opisu metod badawczych Doktorantka przedstawia wszystkie metody statystyczne wykorzystane w rozprawie.

W rozdziale *Wyniki* Autorka omówiła wyniki opublikowane w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (Publikacje 1,2 i 4) oraz wyniki analiz wykonanych dla 186 mieszańców F1. Wyniki obserwacji polowych dotyczących stopnia porażenia analizowanych genotypów są bardzo dokładnie opisane, jednakże w celu poprawy spójności opisu należałoby ująć wszystkie wyniki na wspólnych wykresach lub zestawić takie wykresy obok siebie. Odnośniki do publikacji utrudniają porównanie wyników. Opis wyników powinien być uzupełniony o krótkie

przedstawienie danych z tabeli 8 np. dotyczący wskazania, które genotypy referencyjne uznano za odporne, a które za wrażliwe. W opisie wyników Doktorantka dużo miejsca poświęca analizie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi liniami. Wyniki te mają duże znaczenie, ze względu na możliwość bardziej precyzyjnego wyboru form rodzicielskich w programach hodowlanych, dlatego uważam, że ta część pracy powinna być również uwypuklona w celu badań. Ponadto, wizualizacja wyników tej części badań powinna być ujednolicona. Fizyczne mapowanie markerów istotnie powiązanych z odpornością umożliwiło Doktorantce wybór tych, które zlokalizowane były wewnątrz genów. Markery te były przedmiotem dalszych prac związanych z projektowaniem starterów na potrzeby selekcji MAS. W opisie wyników w podrozdziale 7.4.4 oraz tabeli 11 Doktorantka przedstawia wyniki dla markerów SSR, ISSR i STS zaczerpniętych z literatury, jaki był cel stosowania tych markerów? Bardzo proszę Doktorantkę o rozwinięcie tej części pracy podczas obrony. Proszę również o doprecyzowanie, dlaczego analizowano markery molekularne związane jedynie z odpornością kukurydzy na *F. verticillioides* (tabela 12 i 13).

Analiza poziomu ekspresji wybranych genów po inokulacji patogenem potwierdza ich udział w odpowiedzi rośliny na infekcję. Dobrym uzupełnieniem wyników a zakresu funkcji genów była by analiza szlaków metabolicznych, w które zaangażowane są zidentyfikowane geny np. z wykorzystaniem baz GO (*Gene Ontology*) lub KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), rozszerzenie dysertacji o takie wyniki zwiększyłoby jej spójność z postawioną hipotezą i założonym celem badań. Biorąc pod uwagę przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki, hipoteza badawcza powinna być przeredagowana, gdyż przeprowadzone badania nie nawiązują do mechanizmów odporności, a wskazują jedynie na potencjale geny zaangażowane w odpowiedź roślin kukurydzy na infekcję grzybami z rodzaju *Fusarium*. Nie mniej jednak przedstawione wyniki mają bardzo duże znaczenie zarówno poznawcze jak i aplikacyjne, a na uwagę zasługuje fakt szerokiego podejścia do analizy genów zaangażowanych w odpowiedź obronną roślin oraz wskazanie genotypów o wysokiej odporności, jak również opracowanie metody pozwalającej na ocenę tej odporności na poziomie analiz DNA.

W kolejnym rozdziale autoreferatu Doktorantka przedstawia obszerną dyskusję uzyskanych wyników z wynikami innych autorów. Dyskusja napisana jest w poprawny sposób, pozwala odnieść wyniki Doktorantki do innych, opublikowanych prac badawczych.

W rozdziale dziewiątym Autorka podsumowała badania wykonane w ramach rozprawy i przedstawiła 10 wniosków. Związek między przeprowadzonymi badaniami a wyciągniętymi wnioskami i spostrzeżeniami działa jak klarowna ścieżka, która zapobiega nieporozumieniom i błędnym interpretacjom, wyjaśniając każde odkrycie i zapewniając spójność przekazu. Dlatego też uważam, że rozdział ten powinien być uzupełniony o wnioski płynące z prowadzonych



doświadczeń polowych. Ponadto kolejność przedstawiania wniosków powinna być spójna z kolejnością przedstawiania wyników w całej dysertacji, na przykład wnioski 9 i 10 powinny być przedstawione wcześniej niż wnioski dotyczące ekspresji genów.

Wnioski przedstawione w dysertacji powinny być odpowiedzią na postawione cele badawcze. W jednym z nich Doktorantka zakłada optymalizację procedur diagnostycznych służących do identyfikacji nowych markerów powiązanych z odpornością. Opis prac prowadzących do osiągnięcia tego celu oraz wnioski dotyczące tego zakresu 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 poprawnym językiem, jednakże zawiera liczne błędy stylistyczne i literowe, których nie da się uniknąć przy tak dużych opracowaniach. Chciałbym wyraźnie zaznaczyć, że wszystkie uwagi i komentarze, które prezentuję w ramach tej recenzji, mają charakter konstruktywnej dyskusji i są jedynie propozycjami do ewentualnych rozważań czy ulepszeń. Nie zmienia to faktu, że oceniam tę pracę bardzo wysoko i doceniam jej wartość naukową oraz wkład, jaki wnosi do dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo.

Podsumowując analizę merytoryczną wyników badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, stwierdzam, że dostarczyły one nowych danych z zakresu odporności kukurydzy na grzyby z rodzaju *Fusarium*. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki mają istotne znaczenie dla lepszego zarządzania zasobami genetycznymi i wykorzystania ich w programach hodowlanych w celu podnoszenia odporności kukurydzy, a tym samym uzyskiwania lepszych plonów. Ponadto wyniki badań przedstawionych przez Doktorantkę wskazują na konieczność pogłębiania wiedzy dotyczącej mechanizmów odporności na grzyby z rodzaju *Fusarium*, aby można było z większą efektywnością prowadzić hodowlę tego gatunku.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa mgr inż. Aleksandry Sobiech pt.: „Wielowymiarowa eksploracja molekularnych mechanizmów związanych z odpornością kukurydzy (*Zea mays*) na fuzarium” spełnia 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 rozprawom doktorskim, dlatego też wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogródnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Sobiech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sylvie Olsz