

Poznań, 3.03.2020

Prof. dr hab. Małgorzata Jędrzycka  
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Urszuli Joanny Piechoty pt.: „Identyfikacja genów odporności na mączniaka prawdziwego zbóż (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) w odmianach miejscowych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.)”**

Pracę wykonano w Pracowni Genetyki Stosowanej w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin pod opieką dr hab. Pawła Czembora, prof. IHAR.

**Struktura pracy – ocena formalna**

Recenzowana praca składa się z 89 stron, 11 rycin, 6 tabel oraz 151 pozycji literaturowych. Pod względem edytorskim pracę wykonano dość starannie. Pracę napisano według struktury właściwej dla rozpraw doktorskich. Pracę rozpoczyna streszczenie w j. polskim i j. angielskim, co wprowadza czytelnika w istotę przedstawianego zagadnienia. Następnie w pracy umieszczono spis treści (1 strona), wykaz skrótów (2 strony) wstęp i cel pracy (1 strona) oraz przegląd literatury (16 stron). Opis materiałów i metod obejmuje 9 stron. Podrozdział przedstawiający wyniki badań obejmuje 20 stron, natomiast dyskusja wyników to 8 stron, po czym następuje podsumowanie pracy zawierające rycinę, na której na mapę genetyczną naniesiono dwa nowo zidentyfikowane geny odporności. Następnie wymieniono cztery wnioski sformułowane na podstawie wyników przeprowadzonych badań. W spisie literatury wymieniono 151 pozycji, w tym głównie publikacje anglojęzyczne a także odniesienia do baz danych wykorzystanych do badań..

Praca nie jest obszerna, być może z uwagi na jeden główny wątek, który jest konsekwentnie i dokładnie opisywany. Tekst został napisany zrozumiałym językiem, zdania są poprawnie konstruowane a przekaz jest czytelny. Z uwagi na brak podania lokalizacji odmiany miejscowej tytuł pracy sugeruje, że do prac hodowlanych wykorzystano materiały z Polski, gdy tymczasem są to odmiany z Maroko. W mojej opinii tytuł pracy powinien uwzględniać egzotyczne pochodzenie materiałów stanowiących źródła odporności oraz podstawę prac badawczych. Wykorzystanie takich zasobów genetycznych do celów badawczych i komercyjnych obłożone jest przepisami krajowymi i międzynarodowymi.

## **Istotność badanego zagadnienia**

Uprawa jęczmienia stanowi ważną część rolniczego wykorzystania gruntów uprawnych w Polsce, przy czym w strukturze zasiewów przeważa uprawa formy jarej. Jęczmień jary jest jednym z podstawowych składników mieszanek zbożowych. Formy ozime przeważają w zachodniej części kraju, z uwagi na lepsze warunki dla przetrzymywania roślin. Tak duża popularność uprawy jęczmienia wynika z jego wielorakich zastosowań w przemyśle spożywczym, paszowym i farmaceutycznym. W przypadku przemysłu spożywczego jęczmień wykorzystywany jest głównie do produkcji słodu, ale także na cele konsumpcyjne (płatki, otręby, kasze, mąka, dodatki do chleba i makaronów). Ponadto w ostatnich latach poleca się spożywanie kielków jęczmiennych w formie dodatków do żywności „funkcjonalnej”, dla podreperowania zdrowia i walki z chorobami cywilizacyjnymi. Ich właściwości energetyczne, sprzyjające zdrowiu i witalności znajdują częściowe potwierdzenie w badaniach naukowych. W przemyśle paszowym jęczmień jest składnikiem mieszanek treściwych, do skarmiania zwierząt gospodarskich, zwłaszcza trzody chlewnej, ze względu na wpływ na jakość słoniny. Przemysł farmaceutyczny wykorzystuje właściwości białka hordeiny i propaguje zastosowanie jęczmienia w preparatach pielęgnacyjnych do ciała, kremach, maskach odżywczych i odmładzających oraz oczyszczających. Tak wszechstronne wykorzystanie jęczmienia skłania do licznych prac badawczych poświęconych genetycznemu udoskonalaniu tej ważnej rośliny uprawnej oraz takiemu doborowi jej cech użytkowych, by wyhodowana odmiana spełniała warunki, dla których jest uprawiana. Mogą być one skrajnie odmienne, np. wysoka lub niska zawartość skrobi i białka w roślinach oraz zróżnicowany skład aminokwasowy białka, choć cechy te w znacznym stopniu zależą także od zastosowanej agrotechniki, w tym nawożenia azotowego.

Główną cechą użytkową, na którą hodowla kładzie największy nacisk jest wysoki plon. Wpływ na plon mają liczne cechy, z których jedną z bardzo istotnych jest odporność na choroby i szkodniki. Jęczmień porażony jest przez szereg patogenów, w tym grzyby wywołujące plamistości liści. Jednym z nich jest mączniak prawdziwy jęczmienia *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, który w znacznym stopniu ogranicza plonowanie tej rośliny, a w przypadku wykorzystania roślin w stadium młodych siewek wpływa na drastyczne pogorszenie jakości uzyskiwanego materiału. Z uwagi na uprawę form jarych i ozimych patogen znajduje przez cały rok źródło pożywienia a jego znaczenie, przy obecnych zmianach klimatycznych sprzyja jego występowaniu i nasileniu. Szkodliwość patogenu jest znaczna, a straty plonu mogą być na tyle istotne, iż uprawa roślin jęczmienia porażonych przez *B. graminis* f.sp. *hordei* może być nieopłacalna.

Z tego względu tematyka podjęta przez Doktorantkę jest niezwykle cenna i wpisuje się w nurt badań ważnych nie tylko pod względem teoretycznym ale i jako badanie aplikacyjne, do ich bezpośredniego wykorzystania przez hodowców. Jako członek Komisji COBORU ds. Rejestracji Odmian Roślin Oleistych i Włóknistych zaświadczam, iż hodowla odpornościowa stanowi obecnie jeden z najbardziej pożądanых kierunków prac hodowlanych, a jej znaczenie jeszcze bardziej wzrośnie z uwagi na wycofywanie przez Komisję Europejską coraz to nowych grup substancji aktywnych. Jak słusznie podkreśliła sama Doktorantka, *B. graminis* zajmuje szóste miejsce w rankingu dziesięciu najważniejszych patogenów roślin należących do Królestwa Fungi. Populacja patogenu jest wyjątkowo liczna a jego poszczególne formy szybko adaptują się do odmiennych warunków środowiskowych. Wysoki współczynnik mutacji spontanicznych patogenu sprzyja tej adaptacji oraz powstawaniu nowych ras grzyba. Dodatkowym źródłem jego zmienności są liczne sekwencje powtórzone oraz transpozony zmieniające umiejscowienie w genomie. Rearanżacje genomu uzyskane tą drogą także sprzyjają powstawaniu nowych form i być może także prowadzą do powstawania nowych ras fizjologicznych. Walka z takim patogenem, zwłaszcza bez oręża w formie substancji o działaniu fungicydowym, jest niezwykle trudna, a jedną z najważniejszych metod ograniczania szkodliwości patogenu jest hodowla odpornościowa. Jej nieodzownym elementem jest identyfikacja genów odporności oraz znalezienie markerów dla tych genów oraz naniesienie ich na mapę genetyczną jęczmienia.

Reasumując znaczenie prac prowadzonych przez Doktorantkę jest duże i pod tym względem nie mam żadnych zastrzeżeń.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Pracę napisano syntetycznie, jednak w wielu miejscach niezwykle oszczędny opis rodzi wiele pytań, co do pochodzenia badanego materiału czy zastosowanej metodyki.

### **Material roślinny**

Zgodnie z opinią Biura Legislacyjnego Senatu RP Ustawa z dnia 19 lipca 2016 r. o dostępie do zasobów genetycznych i podziale korzyści z ich wykorzystania ma na celu zapewnienie stosowania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 511/2014 z dnia 16 kwietnia 2014 r. w sprawie środków zapewniających zgodność użytkowników w Unii z wymogami wynikającymi z Protokołu w Nagoi. Dokument ten dotyczy dostępu do zasobów genetycznych oraz uczciwego i sprawiedliwego podziału korzyści wynikających z wykorzystania tych zasobów. Odpowiednie rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady dotyczą rejestru kolekcji, monitorowania zgodności użytkowników i najlepszych

praktyk związanych z tą działalnością. Protokół z Nagoi stworzył międzynarodowy system, którego celem jest zapewnienie korzyści (finansowych i innych) z nowego sposobu wykorzystania tych zasobów w krajach dysponujących materiałami wartościowymi pod względem genetycznym. Dokumenty dotyczące różnorodności biologicznej mają zastosowanie do wszystkich zasobów genetycznych (roślin, zwierząt, drobnoustrojów) zarówno udomowionych jak też dzikich. Nie ma jednak zastosowania do zasobów genetycznych, w odniesieniu do których dostęp i podział korzyści są regulowane Międzynarodowym Traktatem o Zasobach Genetycznych Roślin dla Wyżywienia i Rolnictwa. W tym świetle bardzo proszę Doktorantkę o komentarz dotyczący dwóch linii jęczmienia jarego wykorzystanych do badań. W pracy doktorskiej pochodzenie tych linii opisane jest niezwykle skąpo na stronie 37. Czy wiadomo kto, kiedy i z jakiego źródła uzyskał ten materiał i czy został on wykorzystany do badań z zachowaniem wszystkich stosownych przepisów? Zakładam, że tak było, jednak z uwagi na istotę zagadnienia proszę Doktorantkę o komentarz w tej sprawie.

Do oznaczania profili wirulencji patogenu wykorzystano zestaw testowy jęczmienia składający się z m.in. z 22 blisko-izogenicznych odmian linii uzyskanych na bazie odmiany Pallas wyposażonych w różne geny odporności. Pochodzenie tego zestawu także nie jest podane w pracy. Proszę Doktorantkę o informacje w jaki sposób powstał ten zestaw, jak go uzyskano i czy stanowi on standardowy zestaw stosowany do oznaczania ras fizjologicznych patogenu. Moje pytanie ma swoje źródło w materiale roślinnym stosowanym w moich badaniach, związanych z odpornością roślin rzepaku na kiłę kapusty powodowaną przez pierwotniaki *Plasmodiophora brassicae*, kiedy to grupy badawcze pracujące w różnych laboratoriach oznaczają patotypy na odmiennych zestawach testowych, co prowadzi do nie kończących się nieporozumień.

### **Patogen**

Jak uzyskano izolaty jednozarodnikowe? W pracy nie podano sposobu przechowywania izolatów patogenu zdolnych do wywołania objawów chorobowych u linii z określonymi genami odporności *mlo*. Uprzejmie proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych informacji podczas obrony pracy doktorskiej. Czy w czasie testu zastosowano odmianę Manchuria jako podatną odmianę kontrolną? Bez odmiany kontrolnej brak porażenia niektórych form w badanej populacji mapującej mógł być błędnie interpretowany.

### **Testy fitopatologiczne**

Test inokulacyjny nie był wystandaryzowany, dlaczego? Nie podano stężenia zarodników ani dokładnej metody inokulacji. Strząsanie zarodników *B. graminis* f.sp. *hordei* (str. 38)

powoduje, że na każdym liściu znalazła się odmienna liczba zarodników (może czasem zbyt mała do wywołania objawów chorobowych?). Taka metoda inokulacji jest w mojej opinii niewłaściwa i należało ją zastąpić naniesieniem zarodników z pistoletu modelarskiego lub inną zbliżoną metodą stosowaną dla mączniaków i rdzy. Ocena '2' opisana jako "średnia odporność" została przypisana do grupy roślin odpornych, dlaczego? Czym charakteryzowała się „średnia odporność” i jaka była granica pomiędzy „średnią odpornością” a „średnią podatnością”? To rozgraniczenie jest bardzo ważne, bowiem na jego podstawie klasyfikowano obiekty do grup. W pracy powinien znaleźć się dokładny opis tej klasyfikacji.

### **Analiza genetyczna**

Metoda analizy genetycznej była poprawna, pod warunkiem, iż poprzednio opisana klasyfikacja na rośliny wrażliwe i odporne została wykonana prawidłowo.

### **Analiza DArTseq i analiza sprzężeń genetycznych**

O ile opisy fitopatologicznej części pracy zostały potraktowane dość zdawkowo, o tyle opis izolacji DNA oraz analizy molekularnej DArTseq są wystarczająco szczegółowe. Analizę tę wykonano na komercyjnej platformie DArTseq oferowanej przez Diversity Arrays Technology w Canberra, Australia. Jakie etapy pracy wykonała Doktorantka? Czy prace bioinformatyczne (wybór wiarygodnych markerów, przypisanie markerów do fizycznej lokalizacji w genomie referencyjnym jęczmienia) zostały wykonane przez Doktorantkę czy w formie usługi bioinformatycznej? Kto zaprojektował startery do reakcji allelo-specyficznego PCR na matrycy markerów DArTsnp oraz silicoDArT? Zakładając, że znaczną część analiz przedstawionych na rysunku 8 łącznie z analizą sprzężeń wykonała Doktorantka w pełni doceniam tę pracę. Badany materiał był wystarczająco obszerny i zróżnicowany, dla wyciągnięcia wniosków dotyczących lokalizacji nowych genów odporności, a zastosowane metodyki badawcze prawidłowe.

### **Wyniki**

Mało precyzyjne opisy metodyczne Doktorantka wynagradza czytelnym i syntetycznym podsumowaniem wyników z przeprowadzonych doświadczeń. Z analizy fitopatologicznej wynika odmienna reakcja genotypów z nowymi genami odporności. Analiza genetyczna pozwoliła na oznaczenie sposobu dziedziczenia (pojedynczy gen dominujący w populacji 255-3-3 × Manchuria oraz pojedynczy gen recesywny w populacji 173-1-2 × Manchuria. Wyniki testu  $\chi^2$  dla populacji mieszańcowych inokulowanych izolatami *B. graminis* f.sp. *hordei* potwierdzają prawidłowość wyciągniętych wniosków. W analizie molekularnej dla każdej z populacji uzyskano ponad 3,5 tys. markerów DArTsnp oraz ponad

8,7 tys. markerów silicoDArT. Spośród nich dla populacji 255-3-3 wyselekcjonowano 33 markery przeznaczone do konwersji na markery AS-DArT do allelo-specyficznego PCR, natomiast w populacji 173-2-1 były to 32 markery. Markery te zlokalizowano odpowiednio na chromosomach 2H (gen dominujący) oraz 6H (gen recesywny) genomu referencyjnego jęczmienia. Prawidłowość tej lokalizacji przedstawiają wyniki testu Kruskala-Wallisa ( $\alpha=0,01$ ) sprzężenia markerów DArTseq z cechą odporności, przy czym grupy sprzężeń były tożsame z chromosomami jęczmienia. Dzięki temu analiza map genetycznych pozwoliła na dokładne wskazanie regionów położenia nowych genów; był to dystalny koniec krótkiego ramienia chromosomu 2H oraz długie ramię chromosomu 6H. Dzięki analizie porównawczej otrzymanych map genetycznych Doktorantka mogła wskazać markery kosegregujące z cechą odporności w obrębie sekwencji przewidywanego genu.

Opisy wyników wykonano prawidłowo choć ponownie bardzo syntetycznie. Jest to w tym przypadku zaletą i pozwala czytelnikowi podsumować i zrozumieć główny wynik pracy, bez wczytywania się w zawiłe i szczegółowe opisy wyników poszczególnych analiz. Wnioski poparto testami statystycznymi właściwymi dla poszczególnych typów analiz.

## **Dyskusja**

W dyskusji wyników podkreślono istotę wykonanych badań polegającą na zlokalizowaniu na chromosomach jęczmienia dwóch nowych genów odporności na mączniaka prawdziwego nie reprezentowanych w zestawie testowym. Odporność niesiona przez linie 255-3-3- oraz 173-2-1 w dużej mierze zapewnia odporność na populacje *B. graminis* f.sp. *hordei* występujące obecnie na terenie Polski. Co więcej odporność ta jest także efektywna w stosunku do izolatów pochodzących z terenu Polski sprzed około 20 lat, a także z obszaru Europy Środkowej obejmującego Danię i Szwajcarię.

W ramach dyskusji Doktorantka szczegółowo opisała i scharakteryzowała znane geny odporności na mączniaka prawdziwego oraz koszty dla roślin związane z posiadaniem genów odporności odnosząc się do modelu amplitudy zmian częstości występowania genów *R* u roślin, korespondujących z genami *Avr* u patogenów. Ponadto Doktorantka opisała geny odporności w aspekcie ich wykorzystania w hodowli odpornościowej oraz poglądy dotyczące stosowania genów recesywnych w hodowli odpornościowej. Ciekawa jestem opinii Doktorantki na ten temat. Czy zdaniem Doktorantki należy wprowadzać recesywne geny odporności skoro odporność na dany patogen nie jest w tym przypadku całkowita, ale i koszt fizjologiczny dla rośliny jest mniejszy a ponadto można przedłużyć trwałość cechy odporności na geny dominujące?

Reasumując, pani mgr Urszula Joanna Piechota zajęła się wyjątkowo ważną i aktualną problematyką badawczą. Praca dotyczyła cennych gospodarczo grzybów chorobotwórczych, które przyczyniają się do strat plonu jednej z najważniejszych roślin zbożowych w Polsce i w Europie. Badania składały się z części fitopatologicznej i genetycznej. Silną stroną badań było zastosowanie technologii DArTseq, dzięki której Doktorantka zidentyfikowała i zlokalizowała na mapie genetycznej jęczmienia dwa nowe geny odporności na mączniaka prawdziwego i nazwała je zgodnie z przyjętą nomenklaturą. Gen dominujący uzyskał symbol *MIMor*, natomiast gen recesywny otrzymał symbol *mlmr*. Z badań przeprowadzonych przez Doktorantkę oraz wcześniej przez jej Promotora wynika, że geny te można wykorzystać w praktyce hodowlanej, pod warunkiem zastosowania ich do celów rolniczych i spożywczych. W przypadku wykorzystania na cele farmaceutyczne trzeba zapewne wziąć pod uwagę przepisy związane z Protokołem w Nagoi.

Wyniki badań pozwoliły Doktorantce na sformułowanie czterech wniosków wnoszących cenne nowe informacje do dotychczasowej wiedzy na temat odporności jęczmienia na *B. graminis* f.sp. *hordei*. Doktorantka naniosiła dwa zidentyfikowane geny na konsensusową mapę genetyczną jęczmienia, zawierającą 11 genów odporności na mączniaka prawdziwego, w tym 9 genów dominujących i 2 geny recesywne, co powiększa pulę zmapowanych genów do 13, w tym 10 genów dominujących i 3 recesywnych. Ponadto, Doktorantka wykazała jak wiele cennych genów odporności można znaleźć w odmianach miejscowych, pochodzących z egzotycznych względem Polski źródeł. Co więcej badania Doktorantki potwierdziły przydatność metody DArTseq pul homozygot przeciwstawnych do lokalizowania genów na mapach genetycznych oraz uzyskiwania allelo-specyficznych markerów PCR z przekonwertowanych markerów DArTseq.

W mojej opinii rozprawa mgr Urszuli Joanny Piechoty **spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym**. Wstęp dysertacji dostarcza wymaganej wiedzy o genach odporności i obecnym stanie wiedzy na ich temat. Syntetyczny opis wyników ułatwia zrozumienie pracy. Wyniki badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej wnoszą nową wiedzę na temat genów odporności na mączniaka prawdziwego. Wnioski są w pełni uzasadnione. **Do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB wnoszę wniosek o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie pani mgr Urszuli Joanny Piechoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Małgorzata Jędrzycka