

prof. dr hab. Piotr Masojć
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Piotra Słowackiego

pt.: „Identyfikacja genów odporności na rdzę karłową (*Puccinia hordei* Otth.) w odmianach miejscowych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.)”

wykonanej w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Doktorant postawił sobie ambitne cele badawcze tj. identyfikację genów odporności z dwóch badanych linii jęczmienia w odniesieniu do opisanych w literaturze światowej i zmapowanych wcześniej 28 genów *Rph*. Zadania te realizował poprzez: testy fitopatologiczne źródeł licznych znanych genów odporności wobec kolekcji izolatów patogena, testy genetyczne sposobu dziedziczenia odporności, test BSA dający wstępną lokalizację chromosomową, testy alleliczności w odniesieniu do znanych sprzężonych genów oraz precyzyjną lokalizację loci genowych na nowo skonstruowanej silnie zagęszczonej markerami DArT-seq mapie genetycznej właściwych chromosomów jęczmienia. Ponadto podjął próbę wyłonienia tzw. genów kandydatów dla badanych genów odporności, przeprowadzając analizę *in silico* sekwencji jęczmienia w obszarach markerów genetycznych najsilniej sprzężonych z poszukiwanymi genami.

Aby sprostać tym zadaniom badawczym zastosował kompleksowy i nowoczesny warsztat metodyczny i właściwie dobrał pod względem genetycznym i fitopatologicznym szeroki zestaw materiałów jęczmienia jarego i rdzy karłowej. Analizy fitopatologiczne oparł na bogatej kolekcji znanych źródeł odporności reprezentującym co najmniej 21 zidentyfikowanych genów odporności oraz na liczącym 22 obiekty zestawie izolatów *Puccinia hordei*, z których część jest przechowywana w Uniwersytecie Minnesoty, USA i tam też dzięki współpracy przeprowadzone było ich testowanie. Szeroko zakrojone testy fitopatologiczne pozwoliły na uzyskanie profili odpornościowych wszystkich znanych źródeł odporności łącznie.

z badanymi w pracy dwoma nowymi źródłami w postaci linii Ph873 i Ph4974 oraz dwoma liniami wrażliwymi L94 i Gus. Analiza genetyczna bazowała na populacjach F_2 , F_3 i F_7 o liczebności ok. 195 osobników w przypadku mieszańca Ph873 z linią podatną L94 wobec izolatu Ph604 oraz na populacji DH o liczebności 109 roślin mieszańca Ph4974 z L94 wobec izolatu Ph604. Natomiast testy alleliczności przeprowadzone były na bazie sześciu populacji F_2 , każda dla odrębnego genu odporności, o liczebnościach przekraczających 500 osobników. Podkreślić tu należy jak bardzo ważne w tego rodzaju badaniach genetycznych jest zapewnienie wysokiej liczebności materiałów roślinnych i izolatów patogena bez czego nie byłoby możliwe poprawne dobranie komponentów do krzyżowań, testowanie odporności w segregujących potomstwach i wnioskowanie. Odrębne doświadczenie zaplanowano na dwóch pulach zbiorczych DNA otrzymanych z 10 wrażliwych i z 10 odpornych roślin F_2 mieszańca Ph873xL94, których stan homozygotyczny potwierdzono w pokoleniu F_3 . Tak przygotowany materiał posłużył do przeglądu łącznie 136 specyficznych markerów z wszystkich chromosomów jęczmienia dostępnych w bazach danych GrainGenes pod kątem związku między polimorfizmem markera a segregacją cechy odporności/podatności na patogena. Metoda ta określana jako analiza zbiorczych prób segregantów (skrót angielski BSA) jest powszechnie stosowana do wstępnej lokalizacji chromosomowej badanych genów. Jej wynik pozwala stosunkowo szybko zaplanować jakich komponentów należy użyć do krzyżówek testujących alleliczność badanego genu z dotychczas znanymi genami odporności. Moim zdaniem aby zminimalizować ilość przypadkowych wyników dodatnich w metodzie BSA lepiej by było zwiększyć liczbę segregantów w jednej puli do 12-14.

Uzyskane wyniki badań są wysoce satysfakcjonujące. Udało się wykazać silną odporność linii Ph873 na większość izolatów patogena i odporność linii Ph4974 na prawie 50% izolatów, a także odrębność badanych genów pod względem reakcji na zestaw izolatów w odniesieniu do opisanych w literaturze genów odporności. Ustalono jednogenowy, dominujący charakter dziedziczenia cechy odporności u badanych linii oraz zlokalizowano gen odporności na krótkim ramieniu chromosomu 2H dla linii Ph873 i na krótkim ramieniu chromosomu 1H dla linii Ph4974. Ustalono precyzyjną lokalizację obu genów na silnie zagęszczonych mapach chromosomów 1H w sprzężeniu z genem *Rph4* i 2H w sprzężeniu z genem *Rph1*. Testy alleliczności nowo zidentyfikowanych genów dały wyniki pozytywne w stosunku do genu *Rph1* z chromosomu 2H i *Rph4* z chromosomu 1H. Analizując genom jęczmienia zidentyfikowano szereg sekwencji genowych zawierających sekwencje markerów flankujących nowo zmapowane geny. Niektóre z nich wykazują cechy charakterystyczne dla genów

odpowiadających za cechy odporności na choroby grzybowe u roślin, a więc spełniają kryteria genów kandydatów.

Bardzo wysoko oceniam rozdziały „Wstęp i cel pracy” oraz „Przegląd literatury”, w których dokładnie i we wszystkich obszarach wiedzy Doktorant naświetlił aktualny stan badań nad zagadnieniem odporności jęczmienia na rdzę karłową. Podał przy tym charakterystykę fizjologii porażenia tkanki jęczmienia przez *Puccinia hordei*, jej cykl życiowy, epidemiologię, problematykę zawężenia puli genowej współczesnych odmian jęczmienia i wreszcie obszernie objaśnienie historii odkryć poszczególnych genów odporności wraz z mapą lokalizacji chromosomowej i listą źródeł 28 dotychczas zidentyfikowanych genów odporności. Tekst ten bardzo dobrze wprowadza w zakres badawczy pracy doktorskiej i sam w sobie jest doskonałym materiałem do pracy przeglądowej. Jasno i syntetycznie ujęto efekty prac w rozdziale „Streszczenie” zarówno w języku polskim jak i angielskim.

Rozdział „Materiał i metody badań” podzielony na szereg podrozdziałów wyczerpująco przedstawia zastosowane w pracy metody badawcze, ilustruje, z wykorzystaniem dobrej jakościowo barwnej fotografii, typy infekcji i zastosowaną standardową skalę oceny od 0 do 4 stopni. Opisy stosowanych testów fitopatologicznych, jak i analiz genetycznych oraz badań molekularnych, a także materiałów są dogłębne i podane w sposób właściwy, umożliwiając ich wykorzystanie innym badaczom zainteresowanym podobną tematyką. Zastosowane przez Autora metody statystyczne są właściwie dobrane i pozwalają na uzyskanie mocnych podstaw naukowych do jednoznacznej interpretacji wyników. Cytowana w pracy światowa literatura przedmiotu badań jest bardzo bogata (175 pozycji), a odniesienia do źródeł informacji są szczegółowe i we właściwych miejscach zamieszczone w tekście.

Większość wyników badań jest przedstawiona w rozdziale „Wyniki” w sposób jasny i uporządkowany z podaniem danych tabelarycznych z testów fitopatologicznych, analiz genetycznych, czytelnych rycin sporządzonych map genetycznych w odniesieniu do map referencyjnych chromosomów jęczmienia, rozkładu wartości testu Kruskala-Wallisa na mapach wszystkich chromosomów w powtórzeniu dla markerów DArT-seq typu SilicoDArT i typu SNP. Przedstawiono także mapy fizyczne regionów chromosomów 1H i 2H z zaznaczonymi zgromadzeniami genów. Wyniki dotyczące opracowania markerów molekularnych najsilniej związanych z badanymi genami są podane w tabelach w załącznikach 3 i 4 na końcu pracy.

W pewnych miejscach tego rozdziału, np. na stronie 47, tekst jest jednak mało komunikatywny. Zbyt długie, zawile zdania sprawiają trudność w zrozumieniu wyводу. Ponadto, tok logiczny prezentacji wyników wymaga skorygowania. Najpierw bowiem należało zaprezentować wyniki świadczące o przypisaniu badanych genów odporności do chromosomów i ustaleniu ich możliwego sprzężenia ze znanymi genami, a dopiero potem podać informacje o testach alleliczności, które mogły być zaplanowane i zrealizowane po tych ustaleniach. Autor nie uniknął również błędów literowych, np. nazwisko drugiego autora wykorzystywanego w pracy testu Kruskala-Wallisa zapisywał w szeregu przypadków błędnie, podobnie jak nazwisko cytowanego autora Ullricha.

W opisie wyników badań zabrakło mi przedstawienia rezultatów analizy BSA która, jak autor podaje w „Dyskusji”, doprowadziła do wstępnego ustalenia lokalizacji chromosomowej genu odporności obecnego w linii Ph873. Z tego co zawarto w opisie metodyki BSA wynika, że opracowano na populacji mapującej liczącej 94 rośliny F₂ mapę genetyczną markerów, które w teście BSA wykazały związek z cechą odporności/podatności na *P. hordei*. Nie podano, które z nich wykazały bliskie sprzężenie z genem na chromosomie 2R. Z załączonych w Tabelach 1 i 2 list markerów użytych w metodzie BSA oraz z przedstawienia ich na referencyjnych mapach chromosomów jęczmienia (Ryc. 9) wynika, że są to markery SSR (mikrosatelitarne), jednak Autor nie używa tego określenia w tekście. A fakt ten jest godzien podkreślenia, gdyż markery SSR są najbardziej informatywne ze względu na kodominację alleli.

W rozdziale „Dyskusja” komentarze i ocena własnych wyników na tle opublikowanych wyników innych autorów są właściwe i świadczą o dogłębnej znajomości zakresu aktualnej wiedzy. Prawidłowo zinterpretowano wyniki oceny odrębności badanych genów sugerując możliwość, iż są one wariantami allelicznymi genów *Rph1* i *Rph4* lub są z nimi silnie sprzężone. Doktorant wyraźnie wskazał na bardzo obiecujące dla krajowej hodowli nowych odmian jęczmienia zastosowanie linii Ph873 jako źródła silnego genu odporności. Opracowane markery DArT-seq silnie sprzężone z genem odporności *Rph873-2* będą stanowiły podstawę dla zaplanowania metody selekcji MAS w obrębie wyprowadzanych nowych materiałów hodowlanych. Jest to niewątpliwie duże osiągnięcie pracy w aspekcie praktycznym.

W mojej ocenie w rozdziale „Wnioski” Autor nie ujął całości znaczenia otrzymanych przez siebie wyników. Pomiął tak ważny aspekt odkrycia jakim jest dominacja oraz lokalizacja chromosomowa genów i wiążące się z tym wskazanie na tożsamość, alleliczność lub sprzężenie z wcześniej odkrytymi genami *Rph1* i *Rph4*. Pierwszy i ostatni wniosek są

ogólne i nie wiążą się bezpośrednio z wynikami pracy, a raczej powtarzają tezy nasuwające się z wielu badań.

Pomimo pewnych uchybień w redakcji rozprawy doktorskiej całość pracy oceniam pozytywnie ze względu na jej wysoki walor naukowy i utylitarny oraz profesjonalny i rozbudowany nowoczesny warsztat badawczy z zakresu genetyki, fitopatologii, genetyki molekularnej i bioinformatyki. Doktorant wykazał się dużą wiedzą z zakresu swojej tematyki badawczej, znajomością bogatej literatury przedmiotu i umiejętnością właściwej interpretacji otrzymanych wyników. Praca stanowi niewątpliwie znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej agronomii w dziedzinie nauk rolniczych, a w szczególności znacząco poszerza naszą wiedzę na temat genetyki odporności jęczmienia na rdzę karłową.

W mojej ocenie praca doktorska mgr inż. Piotra Słowackiego spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz w związku z art.179 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669)

Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowego Instytut Badawczy w Radzikowie o dopuszczenie mgr inż. Piotra Słowackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 22 kwietnia 2022

prof. dr hab. Piotr Masojć