



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

Poznań, 10.09.2022

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

Recenzja pracy doktorskiej mgr Lidii Kowalskiej

pt.: „Selekcja genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew (*Parastagonospora nodorum*) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych”

Pracę wykonano w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie w Pracowni Hodowli Odpornościowej, w Zakładzie Fitopatologii, pod opieką dr. hab. Tomasza Górala oraz dr. Piotra Ochodzkiego.

Uzasadnienie wykonania recenzji

Uchwałą 1/XX/46 Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie, podjętą w dniu 7 czerwca w sprawie: wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej, na podstawie art. 29 ustawy z 30 kwietnia 2010 r. o instytutach badawczych (Dz. U. z 2022r., poz. 498), zgodnie 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) oraz ustawą z 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) a także zgodnie z Regulaminem Rady Naukowej z 12 października 2017 r. z późn. zm. – postanowiono o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej pani mgr Lidii Kowalskiej, o czym powiadomił mnie stosownym pismem Prof. dr hab. Marek Stefan Szyndel – Przewodniczący Rady Naukowej.

Finansowanie badań

Badania uzyskały finansowanie z budżetu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi z funduszy otrzymanych w ramach Programu „Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej na lata 2015-2020 w projekcie „Opracowanie i wykorzystanie metod biot-technologicznych skracających cykl hodowlany i zwiększających efektywność selekcji genotypów ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta o podwyższonej odporności i tolerancji na septoriozę liści i plew [czynnik sprawczy *Parastagonospora nodorum* (Berk.), Quaedvlieg, Verkley & Crous], projekt PB 4-1-03-4-05, numer zadania badawczego 81.

Struktura pracy – ocena formalna

Recenzowana praca doktorska składa się ze 191 stron, w tym 9 wykresów i 20 tabel w głównej części pracy oraz kolejnych 9 wykresów i 15 tabel umieszczonych jako załączniki i umieszczonych po spisie literatury, składającym się z 281 pozycji, głównie w j. angielskim. Rozprawę rozpoczyna streszczenie w j. polskim i j. angielskim, po których umieszczono spis treści i główne części pracy, poprzedzone wykazem skrótów. Anglojęzyczna wersja streszczenia odpowiada części polskojęzycznej. Wstęp i cel pracy obejmują 2 strony tekstu i, co bardzo ważne, zawierają hipotezę badawczą. Przegląd literatury jest obszerny i obejmuje 32 strony, z podziałem na sześć czytelnie sformułowanych rozdziałów dodatkowo podzielonych na podrozdziały. Materiały i metody obejmują 27 stron i opisują zarówno materiał roślinny jak też zastosowane izolaty, układ doświadczalny, dane meteorologiczne i metody statystyczne zastosowane do analizy. Wyniki przedstawiono na 34 stronach, zawierających wymienione wcześniej tabele i ilustracje, zaś Dyskusja wyników obejmuje 12 stron tekstu podzielonego na dwa podrozdziały. Na podstawie badań wyciągnięto dziewięć wniosków. Zdania formułowane są właściwe, opisy są zrozumiałe i napisane poprawną polszczyzną, choć Doktorantka nie ustrzegła się czasem od żargonu naukowego i kalek językowych, jak np. „kolaps tkanki” (str. 45, linia 17). Niezręcznie brzmi opis „wchodzenia z bezpośrednią interakcją z wieloma członkami rodziny białek” (str. 45, l. 20); choć stosuje się ten termin, sugeruję określać je opisowo jako białka należące do jednej rodziny. Doktorantka używa też określenia „całkowity kolaps transkrypcji” (także str. 45, l. 26). „Gen *Snn1* i efektor SnTox1 oddziałują bezpośrednio ze sobą” (str. 43); „kolejnym genem oddziałującym” (str. 43); „suchy mix” (str. 65); „zmieszano odpowiednie ilości suchych mas” (str. 65); „braki danych usuwano przypadkami” (str. 97, Tab. 11); „wielopokoleniowy charakter choroby” (str. 128). Znaleziona przeze mnie odmiana rzeczownika „efektor” podaje w dopełniaczu (kogo? czego?) słowo „efektora”, Doktorantka stosuje zaś odmianę „efektoru”.

Ryciny przedstawione w rozprawie doktorskiej są poprawne, estetyczne, z dużą inwencją własną (np. Rycina 5 przedstawiająca schemat cyklu życiowego patogenu; Rycina 6 przedstawiająca interakcję patogen-roślina podczas infekcji). Kolorystyka rysunków nie zawsze jest właściwa (np. Rycina 3 przedstawiająca schemat podziału na typy odporności ma za ciemne tło poszczególnych elementów wykresu, przez co nie jest czytelna).

Praca ma strukturę właściwą dla rozpraw doktorskich, wyniki są zestawiane w tabelach i prezentowane na wykresach, są też zawsze opracowane statystycznie. Poza wyżej wymienionymi potknięciami językowymi pracę czyta się z przyjemnością. Poszczególne etapy są opisywane po kolei a w rozdziałach o danej tematyce znajduje się poszukiwana tam treść. **Pod względem formalnym praca napisana jest poprawnie.**

Tematyka badawcza

Autorka opisuje pszenżyto ozime, jako ważną roślinę zbożową na świecie (str. 21) i przytacza powierzchnię 3,8 miliona hektarów. Zważywszy, iż uprawa pszenicy obejmuje 222 mln ha, a ogromne arealy obsiewane są ryżem, kukurydzą i licznymi innymi roślinami uprawnymi, trudno zgodzić się z takim opisem. Prawie cała uprawa pszenżyta koncentruje się w Europie. Polska to wiodący kraj z powierzchnią zasiewu pszenżyta wynoszącą ok. 1,3 mln ha. Jest to połowa arealu uprawy pszenicy, ale już jęczmień, żyto i mieszanki zbożowe zasiewane są na mniejszych powierzchniach, wynoszących około 1 mln ha dla każdego wymienionego typu zboża. Praca dotyczy zatem zboża, które jest szczególnie ważne w naszym kraju i z tego względu zasługuje na pochwałę. Jak następnie słusznie zauważa Autorka „pszenżyto nie jest w czołówce najczęściej uprawianych zbóż na świecie, jednak zainteresowanie tym gatunkiem wciąż rośnie” (str. 24) i także w Polsce powierzchnia jego uprawy ulega zwiększeniu, a produkcja jest najwyższa na świecie i wynosi około 6 mln ton. Polska jest też liderem w hodowli pszenżyta; 36 odmian pszenżyta ozimego i 16 odmian pszenżyta jarego (łącznie 52 odmiany na 62 zarejestrowane w Krajowym Rejestrze COBORU, 84%) to odmiany z krajowej hodowli. Wszelkie prace nad genetycznym doskonaleniem tego niezwykłego mieszańca pomiędzy pszenicą a żytem są wysoce wskazane.

Praca dotyczy selekcji genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew – ważną chorobę powodowaną przez chorobotwórczy grzyb *Parastagonospora nodorum*, z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. Tematyka związana z ochroną zbóż przed chorobami odpowiada na współczesne wyzwania stojące przed zrównoważonym rolnictwem. Zmieniający się klimat, zwiększająca się liczba ludności na świecie oraz zmniejszająca się powierzchnia upraw spowodowana urbanizacją, erozja

gleby, a ostatnio także całkowita destabilizacja gospodarki, w tym gospodarki żywnościowej i bezpieczeństwa żywności, związana z agresją Federacji Rosyjskiej na Ukrainę, powodują zapotrzebowanie na takie odmiany roślin uprawnych, które zapewnią wysokie i stabilne plonowanie, także w niesprzyjających warunkach spowodowanych wystąpieniem stresów biotycznych i abiotycznych. Wielkoobszarowe i monokulturowe powierzchnie upraw rolniczych, w tym zbóż, przyczyniają się do znacznych gradacji szkodników i patogenów. Jak wykazano w pracy autorstwa Chaloner, T.M., Gurr, S.J. & Bebbler, D.P. pod tytułem „Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change” opublikowanej w 2021 roku w czasopiśmie Nature Climate Change tom 11 na stronach 710–715 (<https://doi.org/10.1038/s41558-021-01104-8>) ocieplenie klimatu Ziemi powoduje wielkie zmiany w tym zakresie i spodziewane jest jeszcze większe nasilenie ich występowania, zwłaszcza w szerokości geograficznej, w której znajduje się Polska. Rolnictwo w Polsce ma niewiele czasu na przygotowanie się do tych gwałtownych zmian i wszelkie działania sprzyjające poprawie zdrowotności roślin są kierunkiem badań wysoce pożądanym i korzystnym dla rozwoju gospodarczego naszego kraju. Jednym z głównych kierunków działań jest prowadzenie prac hodowlanych skierowanych na genetyczne doskonalenie roślin uprawnych, w tym uzyskiwanie wyjściowych materiałów hodowlanych i odmian o podwyższonej odporności i/lub tolerancji na choroby. W przypadku zbóż grzyby chorobotwórcze dominują jako przyczyny chorób, a nekrotroficzny grzyb *Parastagonospora nodorum* ongiś uważany za powszechny lecz mało groźny, stał się przyczyną znacznych strat plonu. W warunkach intensywnej gospodarki rolnej z zastosowaniem dużych dawek nawożenia azotowego przy jednoczesnych uproszczeniach w uprawie, związanych z ograniczaniem naruszania gleby w celu zmniejszenia jej erozji i ugniatania. Celem jest zwiększenie rentowności gospodarstw poprzez minimalizację zabiegów agrotechnicznych i związanych z tym kosztów. Z drugiej strony pozostawianie ścierniska sprzyja gromadzeniu patogenów na powierzchni gleby, przez co zwiększa się ilość inokulum zdolnego do porażania roślin w kolejnych sezonach wegetacyjnych.

Jednym z możliwych i wysoko cenionych rozwiązań jest odporność genetyczna stanowiąca tarczę ochronną w roślinie uprawnej, bez potrzeby stosowania zabiegów chemicznych, zwykle szkodliwych dla środowiska i niepożądanych przez konsumenta. Niniejsza praca wpisuje się w ten aktualny i ceniony trend w hodowli roślin. Z tego względu podjęta **tematyka badawcza niniejszej rozprawy doktorskiej jest ważna z przyrodniczego, rolniczego i ekonomicznego punktu widzenia.**

Dodatkowym efektem pracy są genotypy pszenżyta z podwyższoną odpornością na septoriozę liści i plew oraz opracowanie sposobu ich uzyskiwania z zastosowaniem metod biotechnologicznych oraz testów przesiewowych z udziałem efektorów białkowych wytwarzanego przez badany grzyb chorobotwórczy.

Merytoryczna ocena pracy

Wstęp

Wstęp napisany jest wyśmienicie, objaśnienia dotyczą wszystkich ważnych elementów pracy. Rozpoczyna go omówienie historii powstania i wartości gospodarczej pszenżyta, jego wszystkich charakterystyk, w tym informacja na temat czynników biotycznych ograniczających jego plonowanie. Następnie Doktorantka w przystępny sposób objaśnia typy odporności roślin i przedstawia modele interakcji między rośliną a mikroorganizmem chorobotwórczym, rozróżniając działanie patogenów bio- i nekrotroficznych. Po tych ogólnych opisach następuje charakterystyka badanego patogenu, jego cyklu życiowego, warunków sprzyjających infekcji i oddziaływaniu na roślinę, które przyczyniają się do ograniczenia jej plonowania. Dowiadujemy się od Autorki że *P. nodorum* jest polimertrofem o wąskim zasięgu żywiciela. Enzymy degradujące ściany komórkowe oraz białkowe efektorów nekrotroficznych tworzone przez badany patogen powodują natychmiastową śmierć komórek, dzięki czemu może odżywiać się związkami stanowiącymi ich zawartość. Doktorantka wymienia dziewięć poznanych oddziaływań efektorów nekrotroficznych z genami roślin, które warunkują wrażliwość na ich obecność oraz uzasadnia na podstawie niedawnych doniesień, iż niektóre z nich są tożsame. Autorka przytacza ponadto w czytelnej formie tabelarycznej jak znaczący jest udział trzech efektorów białkowych (SnToxA, SnTox1 oraz SnTox3 szczególnie wpływających na nasilenie septoriozy liści i plew) wśród izolatów *P. nodorum* w różnych państwach i regionach świata (m.in w Regionie Żywnego Półksiężyca, w stanach Dakota i Minnesota, w Australii a także w Europie) w odniesieniu do SnTox1 i SnTox3. Dziwnie kontrastuje to z izolatami znajdującymi się w światowej kolekcji. Proszę Doktorantkę o uzupełnienie mojej wiedzy skąd tak znaczny odsetek izolatów nieposiadających opisanych efektorów i gdzie na świecie są regiony, w których sytuacja nie jest tak dramatyczna oraz co jest powodem tak dużej odrębności tych regionów (komentarz do tabeli 2).

Reasumując, Doktorantka w zrozumiały sposób wyjaśnia dlaczego brak efektorów białkowych lub produktu genu wytwarzanego przez roślinę w celu rozpoznania tego efektorów wiąże się z odpornością rośliny, co wskazuje na odwrócony model „gen-na-gen” jako

właściwy dla scharakteryzowania interakcji nekrotroficznego grzyba *P. nodorum* z pszenżytem. Przykłady przytoczone przez Autorkę rozprawy doktorskiej sugerują, że w toku ko-ewolucji z roślinami żywicielskimi grzyb *P. nodorum* zaczął tworzyć unikalne efekторы, które obecnie pobudzają wrodzone mechanizmy obronne roślin i zmniejszają ich podatność na ten patogen. Patozystem *P. nodorum* - pszenżyto wart jest dalszych badań, poznano najprawdopodobniej tylko wierzchołek góry lodowej, nie są znane bowiem inne ważne czynniki np. organiczne związki lotne (VOCs).

Efektor białkowy SnTox3, stanowiący ważny element rozprawy doktorskiej, Doktorantka szczegółowo charakteryzuje w osobnym podrozdziale wstępu i przytacza doniesienia naukowe na jego temat. Niewątpliwie najważniejszym dowodem na działanie tego efektora jest nabycie zdolności do wywoływania choroby przez niepatogeniczny izolat *P. nodorum* po jego transformacji z zastosowaniem efektora SnTox3, względem roślin z genem *Snn3*. Gen ten ma dwie wersje homologiczne na krótkich ramionach chromosomów 5B i 5D, warunkujących fenotypowo różną wrażliwość roślin na porażenie przez *P. nodorum*. Ważnym elementem działania efektora SnTox3 jest też niezależność jego działania od światła a także brak negatywnych efektów w przypadku innych stresów biotycznych i abiotycznych. Badania, przeprowadzone w Polsce i opublikowane przed kilku laty przez zespół badawczy z Zakładu Fitopatologii IHAR wykazały wrażliwość polskich odmian pszenicy na działanie tego efektora. Z tego względu w niniejszej pracy Doktorantka przeprowadza badania zmierzające do selekcji genotypów odpornych na działanie efektora SnTox3. Nasuwa się zatem oczywiste pytanie czy aktualna populacja izolatów *P. nodorum* jest zdolna do tworzenia tegoż efektora. Wrażliwość materiału roślinnego jest bowiem tylko wtedy zmartwieniem, jeśli obecna lub przewidywana populacja izolatów tworzy ten efektor. Proszę Doktorantkę o komentarz na ten temat. W Tabeli 2 oraz w tekście wprowadzenia nie ma informacji na temat efektorów SnTox_x tworzonych przez izolaty *P. nodorum* porażające pszenicę i pszenżyto w Polsce. Informacje na temat struktury populacji *P. nodorum* w Polsce pojawiają się dopiero w Dyskusji, na str. 123 i niezrozumiałe jest dlaczego o wynikach badań Arseniuka i in. (2019) dowiadujemy się dopiero na końcowym etapie pracy. Informacja ta powinna być podana w Tabeli 2 (str. 41). Z opisu wynika, że najczęściej występującymi genami w populacjach *P. nodorum* w Polsce są SmTox1, SnTox3 i SnTox5. Kolejne informacje na temat genów odpowiedzialnych za tworzenie białek efektorowych są znane lecz jeszcze nie opublikowane, i polegają na niewielkiej częstości genów odpowiedzialnych za tworzenie efektorów SnTox2, SnTox6 i SnToxA oraz braku SnTox4 i SnTox7. Szkoda, że Doktorantka nie podzieliła się tą wiedzą we wprowadzeniu do badań.

Z wprowadzenia w temat pracy dowiadujemy się także o obecnie stosowanych metodach ograniczania septoriozy liści i plew, w tym metodach agrotechnicznych i chemicznych. W tych pierwszych podkreśla się znaczenie kwalifikowanego materiału nasiennego, wolnego od patogenu oraz prawidłowego zmianowania, z udziałem roślin, które nie są żywicielami dla *P. nodorum*, np. ziemniakami lub rzepakami. Brak uproszczeń w uprawach, łączący się z przyorywaniem resztek poźniwnych i zwalczaniem samosiewów znacząco przyczyniają się do ograniczenia septoriozy kłosów i plew. Do ochrony chemicznej stosowane są fungicydy z wielu grup chemicznych, w tym QoI, DMI, SDHI. Stwierdzono jednak odporność części izolatów na niektóre z tych substancji, np. mutacje w genie CYP51 powodujące niewrażliwość na propikonazol, substancję czynną fungicydu z grupy DMI, oraz przypadki niewrażliwości na substancje aktywne zawarte w fungicydach z pozostałych grup FRAC. Doktorantka zwraca jednak uwagę na wielkie znaczenie i przydatność hodowli odpornościowej w celu wyposażenia odmian pszenicy i pszenżyta w geny odporności. Dla przyspieszenia tego procesu i uniknięcia konieczności stosowania długich cykli hodowlanych stosowane są techniki *in vitro* takie jak embriogeneza i androgeneza somatyczna, które są źródłem roślin haploidalnych, a następnie wysoce pożądanym podwojonym haploidów a ponadto mogą także generować wartościową zmienność somaklonalną, zwłaszcza gdy rozwój zarodków nowego pokolenia nie jest bezpośredni lecz przebiega za pośrednictwem kalusa. Skrócenie cyklu hodowlanego przez wytworzenie stabilnych linii homozygotycznych jest cenną zaletą androgenezy. Z kolei regeneracja roślin z komórek somatycznych jest formą rozmnażania wegetatywnego w wyniku którego powstają linie somaklonalne. Różnice genotypowe i fenotypowe między regenerantami są faktem i były już do tej pory niejednokrotnie stosowane do generowania wariantów i nowych cech, także związanych z odpornością na stresy biotyczne.

W końcowym podrozdziale wstępu Doktorantka charakteryzuje odporność roślin na pszenicy na septoriozę liści i plew oraz interakcję gen-efektor białkowy w patosystemie *P. nodorum*-pszenica. Jak dotąd zidentyfikowano regiony QTL związane z odpornością lecz z uwagi na ich stosunkowo niewielki udział w wyjaśnianiu zmienności stawia ich przydatność pod znakiem zapytania. Autorka podaje przykłady krajów, w których nakazowo zlikwidowano odmiany pszenicy podatne na SnToxA i SnTox2. Pragnę powtórnie podkreślić znaczny profesjonalizm Doktorantki, jasność opisu oraz umiejętność syntetycznego ujęcia tak złożonych zagadnień.

Materiały i metody

Materiałem roślinnym było osiem odmian pszenżyta o zróżnicowanej odporności na septoriozę kłosów, które poddano krzyżowaniu a z pokolenia F₁ na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy wywiedziono linie somaklonalne i podwojone haploidy. Wykorzystano także dwie odmiany wzorcowe pszenżyta. Eksplantatami w androgenezie były pylniki form mieszańcowych.

W pracy bardzo dokładnie, krok po kroku opisano metody otrzymania linii somaklonalnych i podwojonych haploidów, pożywki zastosowane na poszczególnych etapach kultur in vitro. Składy pożywek oraz zastosowane metody nie budzą wątpliwości. Doktorantka podaje, że stosowała czynnik zestalający Gelrite. Proszę o objaśnienie co to za związek, kto go produkuje i dlaczego wybrano właśnie ten czynnik zestalający. W pracy brak informacji na ten temat, zwykle też podaje się firmę.

Inokulację przeprowadzano z wykorzystaniem dziesięciu izolatów *P. nodorum* pozyskanych z naturalnie porażonych liści pszenicy i pszenżyta z ośmiu lokalizacji oraz dwóch sezonów wegetacyjnych. Numery izolatów wymieniono i wskazano na mapie (Rycina 7) gdzie znajdują się wymienione miejsca ich pozyskania lecz zabrakło powiązania pomiędzy nazwą izolatu, miejscem jego pochodzenia, rośliną gospodarza oraz rokiem pobrania porażonego materiału roślinnego. Zapewne informacje te są znane i powinny być podane, nawet jeśli materiał infekcyjny uzyskał inny badacz. Izolaty do inokulacji w doświadczeniach polowych i fitotronowych dobrano na podstawie badań Jakuba Walczewskiego badającego strukturę populacji *P. nodorum* w Polsce (str. 63). Proponuję stosować to nazewnictwo zamiast „polska populacja” bowiem izolaty grzybów porażających rośliny na danym terenie nie mają narodowości. Nie podano gdzie zatrudniona jest w/w osoba; czy badania dotyczące struktury populacji *P. nodorum* zostały lub będą opublikowane i co było ich wynikiem? Nie ma o tym wzmianki w dysertacji, a być powinna. Do inokulacji zastosowano mieszaninę izolatów a tymczasem w całej wstępnej części dysertacji nie zauważyłam informacji o strukturze populacji oraz przesłankach, na podstawie których wybrano izolaty, a jest to w przedstawionej pracy kluczowe zagadnienie. Bardzo proszę Doktorantkę o uzupełnienie naszej wiedzy w tym zakresie.

Czy do przygotowania pożywki stosowano oryginalny sok V8? Jeśli nie, powinna być podana nazwa zastosowanego soku. Jak to się teraz popularnie mówi: „kto bogatemu zabroni?”; do pożywek mikrobiologicznych można stosować ten drogi sok firmy Campbell (USA), choć oszczędniejsze byłoby użycie jego polskich zamienników (soki wielowarzywne).

W pracy stosowano kultury jednozarodnikowe grzybów, raczej unikajmy nazywania ich monosporowymi (kalka językowa). Dlaczego w warunkach kontrolowanych nie inokulowano pojedynczymi izolatami jednozarodnikowymi a ich mieszaniną? Po co uzyskiwano i jako inokulum namnażano izolaty jednozarodnikowe, skoro potem i tak stosowano mieszaninę i nie wiadomo, które składniki tej mieszaniny powodowały porażenie roślin? W jakim stopniu wybrane izolaty są zdolne do tworzenia efektoru SnTox3?

Infiltrację liści prowadzono zdekantowanym płynem po hodowli drożdży *Pichia pastoris* zawierających plazmid z genem odpowiedzialnym za wytwarzanie białka SnTox3, Szczep ten zakupiono w firmie komercyjnej, a namnożenie drożdży prowadzono samodzielnie, na pożywce z zeocyną. Jest to związek uszkodzający DNA, bardzo proszę o przybliżenie idei zastosowania zeocyny w opisanym doświadczeniu, dlaczego stosowano ją na pierwszym etapie hodowli drożdży, a nie stosowano na drugim etapie? Sposób infiltracji opisano szczegółowo w osobnym podrozdziale.

Infiltracja z zastosowaniem preparatu zawierała poza badanym białkiem efektorowym także całą gamę innych związków. Co było kontrolą w tym doświadczeniu? Powinien być preparat uzyskany z tych samych drożdży lecz bez plazmidu z genem odpowiedzialnym za wytwarzanie efektoru białkowego SnTox3. Czy tak było w istocie? Jaki był efekt infiltracji preparatem kontrolnym? Czy był on identyczny z efektem obserwowanym dla genotypów pszenżyta niewrażliwych na działanie efektoru? Proszę także Doktorantkę o wyjaśnienie wyboru efektoru białkowego stosowanego do badań. Dlaczego nie wybrano efektoru SnTox1, skoro – jak wynika z Tabeli 2 (str. 41) odsetek genotypów podatnych na ten efektor jest w Europie i Polsce najwyższa?

Doświadczenia fitopatologiczne przeprowadzono w latach 2018-2020. Przebieg warunków pogodowych w poszczególnych sezonach doświadczalnych szczegółowo opisano w części metodycznej rozprawy doktorskiej a także przedstawiono na wykresach umieszczonych w załącznikach. W odpowiednich miejscach tekstu znajdują się stosowne odnośniki. W pracy przedstawiono schematy doświadczeń i wymieniono cechy oznaczane w stadium siewki i rośliny dorosłej. Oba określenia powinny być doprecyzowane poprzez podanie symbolu w skali BBCH/GS. Podano natomiast daty, opisy stadiów rozwojowych i ich symbole podczas inokulacji roślin (str. 72). W Tabeli 5 wykonanie pomiaru można było zastąpić symbolem „+” zamiast „x” a jego brak symbolem „-”. Nie wyjaśniono dlaczego nie przeprowadzono niektórych pomiarów (np. jeśli w stadium siewki oznaczono jedną cechę to dlaczego nie oznaczono drugiej).

Odmiany Pigmej i Fredro będące wzorcami podświetlono w Tabeli 5, dlaczego tak samo zaznaczono odmianę Borwo? Jeśli był to trzeci wzorzec, powinien być wymieniony na str. 55 i 67. Łącznie przebadano wystarczająco liczny materiał by móc przeprowadzić wnioskowanie, było to 19 linii DH, 18 linii somaklonalnych, 7 linii rodzicielskich oraz 2 wzorce. Ze względu na ograniczoną liczbę nasion zastosowano dwa powtórzenia inokulowano oraz jedno kontrolne. Nie jest to liczba satysfakcjonująca statystyka, jednak całkowicie mogę zrozumieć, iż materiał był ograniczony i nie można było postąpić inaczej. Jeśli odpowiedź roślin była wyrównana a błąd statystyczny stosunkowo niewielki, wtedy wnioskowanie z tak przeprowadzonego doświadczenia jest uprawnione.

Ocenę porażenia prowadzono nie w skali fitopatologicznej (najwyższa ocena = największe porażenie) lecz w skali hodowlanej (najwyższa ocena = roślina całkowicie odporna). Ocena fenotypowa porażenia liści nie opierała się na ocenie wizualnej lecz została przeprowadzona przy zastosowaniu programu ImageJ a metodykę opisano szczegółowo w odrębnym podrozdziale. Doświadczenia wykonane w warunkach kontrolowanych i polowych co zilustrowano stosownymi zdjęciami. Pokazano także przykłady przetworzenia obrazu z zastosowaniem wspomnianego oprogramowania komputerowego. Znormalizowane dane poddano analizie statystycznej, której metodę opisano w osobnym podrozdziale pracy.

Podsumowując, Doktorantka **opis materiałów i metod przedstawiła poprawnie** i wystarczająco szczegółowo, zastosowała w doświadczeniach metody adekwatne do osiągnięcia celu, doświadczenia przeprowadziła w powtórzeniach a wyniki poddała analizie statystycznej i na ich podstawie wniosowała o zaobserwowanych mechanizmach i prawidłowościach.

Wyniki

Autorka rozprawy doktorskiej podzieliła wyniki badań na podrozdziały odpowiadające poszczególnym częściom prac badawczych, w tym: 1) analizie odporności siewek i roślin dojrzałych (określanych przez nią jako dorosłe) na septoriozę liści i plew; 2) analizie korelacji wyników badań w warunkach kontrolowanych i polowych; 3) analizie korelacji między fenotypowymi miernikami odporności a wrażliwością na efektor białkowy SnTox3; 4) analizie wpływu czynników meteorologicznych na podatność badanego materiału roślinnego (odmian, linii somaklonalnych i podwojonych haploidów) w warunkach polowych. Wyniki zestawiono w tabelach i zilustrowano na wykresach słupkowych, liniowych i pudełkowych. Opisano je także w tekście, syntetycznie podsumowując główne wyniki dla poszczególnych grup roślin jak też wyróżniono linie najbardziej odporne i podatne.

Zgodnie z oczekiwaniami zróżnicowanie odporności było istotne statystycznie. Długie opisy w tekstach można było zastąpić uporządkowaniem głównych wyników w formie tabelarycznej. Bez tego ich samodzielna analiza jest długotrwała.

Porównania wyników badań otrzymanych w warunkach polowych i kontrolowanych przedstawiano wyłącznie dla odmian i linii badanych w obu tych warunkach (14 linii). Wykazano, że w warunkach polowych podwojone haploidy były bardziej odporne od linii somaklonalnych, z wyjątkiem dwóch przypadków. W warunkach kontrolnych wynik był przeciwny. Na wykresach 3A i 3B na osi OY nie powinno być wartości 120, porażenie nie przekracza przecież wartości 100%. Porażenie w warunkach polowych wynosiło zwykle około 50% (połowa wartości maksymalnej), natomiast w warunkach kontrolowanych wartości wahały się między 10 a 25%. W warunkach kontrolowanych stwarza się warunki optymalne do rozwoju patogena; czym Doktorantka tłumaczy tak niewielkie porażenie? Czy jest to spowodowane krótkim czasem trwania testu? Czy w związku z tym warto prowadzić testy w komorach vegetacyjnych i czy osoby zajmujące się hodowlą odpornościową uzyskają wystarczająco duże zróżnicowanie materiałów badawczych by w odpowiedzialny sposób polegać na wynikach tych testów w odniesieniu do septoriozy liści i plew?

Po porównaniu wykresów 3A i 3B oraz zauważeniu wielkiej zmienności uzyskanej w warunkach polowych można sugerować, by testy przeprowadzać w komorach vegetacyjnych. Niewielka zmienność wśród linii DH i jeszcze mniejsza wśród linii somaklonalnych w porównaniu z odmianami sugeruje, że wyniki uzyskane w komorach były zdecydowanie bardziej wyrównane. A może wynika to po prostu z niewielkiego zróżnicowania stopnia porażenia roślin?

Na podstawie testu Duncana wyróżniono zachodzące na siebie grupy jednorodne z podobnym poziomem odporności na septoriozę liści i plew. Było ich 7 przy testach wykonywanych w warunkach kontrolowanych i 9 w przypadku testów w warunkach polowych. Analiza wykazała brak korelacji pomiędzy porażeniem liści i kłosów. Korelacje między wynikami uzyskanymi w warunkach polowych i kontrolowanych wahały się między 0,29 (korelacja pozytywna) a -0,59 (korelacja negatywna). Zakład pod moim kierunkiem wykonuje bardzo liczne testy odpornościowe i mogę zaświadczyć, że współczynniki korelacji na tym poziomie są częste, choć oczywiście zdarzają się przypadki wyższych wartości tego współczynnika (jednak zazwyczaj przy patogenach znajdujących się w glebie lub silnej odporności kodowanej dominująco).

Tabele 11 i 12 dotyczące korelacji mają identyczny tytuł, ale różnią się zawartością, bowiem w tabeli 12 analiza korelacji dotyczy poszczególnych lat z podziałem na typ

materiału roślinnego. Dwie tabele nie powinny mieć identycznego tytułu. Czy podany wynik to współczynnik korelacji dla danej grupy materiałów roślinnych z określanego roku ze wszystkimi innymi wynikami dla tej grupy z pozostałych lat? Opis w tekście jest krótki i niedokładny, a ponadto, nawet gdyby był obszerny, tabela powinna być w pełni objaśniona.

Bardzo ciekawe są wyniki porównań między odpornością materiału roślinnego na septoriozę liści i kłosów a wrażliwością na efektor białkowy SnTox3. Z tych badań dowiadujemy się więcej aniżeli można było dotąd wywieść z tradycyjnych testów w polu i warunkach kontrolowanych. Około połowy materiałów to formy wrażliwe na działanie efektora białkowego, przy czym takich form najwięcej jest w grupie podwojonych haploidów, a najmniej wśród odmian. Trochę mało logiczne, że formy wrażliwe oznaczono na Wykresie 6 kolorem zielonym, a niewrażliwe na czerwono, powinno być odwrotnie. Jest to mylące także przy porównywaniu wyników z analizą skupień przedstawionych na Wykresie 9, gdzie kolorem czerwonym zaznaczono formy wrażliwe. Taki opis przedstawiono w tekście na str. 103, natomiast na Wykresie 9 objaśnienie jest wyłącznie liczbowe (0; 0,5 i 1) i nie jest jasne, że wartość 1 oznacza wrażliwość na efektor SnTox3.

Interesujące jest zestawienie wyników testu polowego i testu z zastosowaniem efektora białkowego SnTox3 w grupie form DH. Odsetek form wrażliwych był tam największy (Wykres 6) ale w tej grupie znaleziono jednocześnie najwięcej form odpornych na septoriozę i niewrażliwych na działanie efektora (str. 99). Czym Doktorantka tłumaczy taki wynik? W grupie linii somaklonalnych wszystkie linie były wrażliwe na efektor, choć w warunkach polowych linii wrażliwych było nieco mniej niż 40%. Jest to zatem związane z populacją patogenu oraz zestawem izolatów wybranych do inokulacji. Proszę o obszerniejszy komentarz w tym względzie podczas obrony pracy, aby można było zrozumieć zachodzące tam zależności. Moja prośba dotyczy objaśnienia relacji pomiędzy Wykresem 6 a Wykresami 7 i 8.

Korelację między wrażliwością na efektor a wynikami testów odpornościowych wykazano w przypadku badań polowych w dwóch sezonach (2018 i 2020) na trzy badane oraz dla jednego roku badań w środowisku kontrolowanym (2019). Jaka jest zdaniem Doktorantki przyczyna braku korelacji wyników w 2019 roku w polu oraz w roku 2020 w warunkach kontrolowanych? Jak rozumiem wyniki analiz wykonanych w warunkach kontrolowanych w 2018 roku wykluczono z analiz statystycznych ponieważ danych było zbyt mało (str. 92)?

Do pełnego obrazu brakuje analizy obecności genów *Snn3* oraz identyfikacji obecnych wariantów tego genu (*Snn3-B1* oraz *Snn3-D1*) w badanym materiale. Można by natomiast porównać uzyskane wyniki stopnia porażenia i efekty widoczne na liściach i zanalizowane systemem ImageJ z typami reakcji (typ 2: chloroza czy typ 3: nekroza i całkowite zniszczenie tkanek liści). Boleję nad tym, że Doktorantka nie wykonała takich analiz.

Ostatnim analizowanym czynnikiem jest wpływ warunków hydrotermicznych na porażenie badanych genotypów pszenżyta na polu. Uwzględniono następujące czynniki: wilgotność względna powietrza, suma opadów oraz temperatura następujące od okresu po wykonaniu inokulacji. Istotne statystycznie współczynniki korelacji stwierdzono jedynie w przypadku sumy opadów przez 7 dni po inokulacji. Wykazano też statystyczną zależność między opadami w czerwcu i lipcu, lecz nie w maju. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie co oznacza wartość średnia w Tabeli 17, wahająca się od 0,15 do 0,25? Czy jest to wysokość współczynnika korelacji?

Analiza porażenia kłosów w 9^o skali hodowlanej wykazała bardzo silne zależności ze wszystkimi parametrami meteorologicznymi. Czym Doktorantka tłumaczy tak silny wpływ pogody na septoriozę kłosów a zdecydowanie słabszy wpływ w przypadku objawów na liściach? Czy słusznie odnoszę wrażenie, że warunki sprzyjające septoriozie liści nie służą septoriozie plew i odwrotnie? To tłumaczyłoby brak korelacji między wynikami porażenia liści i kłosów przez *P. nodorum*, wykazane w dysertacji.

Dyskusja

Doktorantka, jako jedna z niewielu, których rozprawy doktorskie oceniałam ustrzegła się od zasadniczego błędu wielu naukowców polegającego na rozpoczęciu Dyskusji od przypomnienia informacji, z którymi już zapoznaliśmy się na wstępie pracy. Tymczasem Dyskusja to część dysertacji, w którym wyniki własne konfrontuje się z uzyskanymi przez innych badaczy. Dyskusję zaczyna się od przedstawienia głównego sukcesu pracy i pani mgr Lidia Kowalska właśnie takimi stwierdzeniami rozpoczęła Dyskusję. Doktorantka potwierdziła uzyskanie zasadniczego celu pracy i podała, że było nim uzyskanie form pszenżyta odpornych na septoriozę liści i plew, jednocześnie niewrażliwych na działanie efektora białkowego SnTox3. Jest to niewątpliwie osiągnięcie aplikacyjne, które jednocześnie potwierdziło przyjętą na wstępie hipotezę badawczą zakładającą, że zastosowanie metod biotechnologicznych oraz testów przesiewowych z wykorzystaniem efektora białkowego umożliwi wyprowadzenie cennych materiałów hodowlanych.

W tym przypadku metodami biotechnologicznymi były kultury tkankowe, pozwalające na wyprowadzenie linii DH i linii somaklonalnych. Badania z wykorzystaniem efektor białkowego także stanowiły element biotechnologiczny pracy. Praca doktorska ma na celu uzyskanie stopnia naukowego. Istotne jest w związku, by za pośrednictwem dokonać praktycznych rozwiązań kwestie naukowe. Nie ma wątpliwości, że praca je zawiera; opracowano metodyki testowania i analizy danych, które mogą być stosowane i ulepszone zarówno przez naukowców jak i firmy hodowlane. W Dyskusji Autorka opisuje przydatność kultur tkankowych w pracach hodowlanych nad wieloma roślinami uprawnymi i pokazuje jak niniejsza praca wpisuje się w ten obraz. Jest też wyraźnie pokazane co jest wynikiem badań własnych a co wynikiem innego zespołu badawczego.

Wnioski

Z wyników badań Doktorantka wyciągnęła dziewięć jasno sformułowanych wniosków, z których każdy był dobrze uzasadniony. Nie mam uwag względem nich, wszystkie znajdują potwierdzenie w wykonanych badaniach i nie są przypuszczeniami lub efektami doświadczeń nie opisanych w dysertacji. Brawo!

Podsumowanie

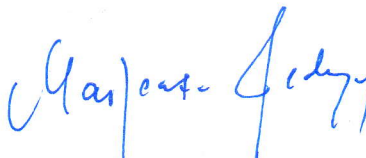
Praca doktorska pani mgr Lidii Kowalskiej poszerza naszą wiedzę na temat złożonych zależności związanych z septoriozą liści i plew powodowaną przez *P. nodorum* na pszenicy i wskazuje na potencjalne źródła zmienności, z których może czerpać hodowca działający w kierunku podniesienia odporności roślin. Niewątpliwą zaletą pracy jest sięgnięcie po nowy materiał roślinny jakim jest pszenżyto oraz charakterystyka nie tylko odmian ale też podwojonych haploidów uzyskanych z form mieszańcowych a także zwiększenie puli o zmienność somaklonalną.

Najciekawszym elementem pracy było zastosowanie nowego sposobu oceny odporności odmian przy użyciu białka efektorowego SnTox3. Otwiera to drogę do bardziej niż dotychczas wnikliwych sposobów oceny materiału roślinnego i jego przydatności w procesie hodowlanym, pod tym wszakże warunkiem, iż jednocześnie populacja patogenu jest na bieżąco monitorowana pod względem zdolności do tworzenia maksymalnej liczby znanych efektorów białkowych. W takim przypadku możliwe jest wskazanie obecności aktywnych kopii genów *Snn*. Obecność ich produktów transkrypcji i translacji w roślinach bezpośrednio wiąże się podatnością roślin. Jest to metoda zmierzająca nie tyle ku zastąpieniu ile ku wzbogaceniu i uzupełnieniu wiedzy o przyczynach odpowiedzi roślin na stres biotyczny, jakim jest całkowite lub częściowe porażenie roślin przez *P. nodorum* lub ich odporność.

Wyniki badań omówiono szczegółowo lecz nie drobiazgowo. Dysertacja doktorska jako całość potwierdza biegłość Doktorantki w analizowanym zagadnieniu. Moje liczne pytania wynikają z chęci doprecyzowania wszystkich zagadnień w trakcie publicznej obrony rozprawy. Rolą recenzentów jest wskazanie na słabsze lub mniej jasne dla postronnego czytelnika elementy pracy, stąd pewna doza uwag krytycznych i pytań. Chciałabym jednak wyraźnie zaznaczyć, że moja opinia o pracy doktorskiej pani mgr. Lidii Kowalskiej jest **zdecydowanie pozytywna**. Praca wkracza w nowe obszary wiedzy, ma elementy nowatorskie, badany jest ciekawy materiał roślinny, wytworzony przez doktorantkę. Życzę Doktorantce, by rozprawa nie była końcem, ale początkiem fascynującej drogi związanej z badaniami na styku fitopatologii i hodowli odpornościowej.

Doświadczenia zaplanowano właściwie i prawidłowo je wykonano, stosując rozmaite techniki badawcze. Eksperymenty obejmują badania prowadzone w laboratorium, szklarni i na polu. Wyniki są dobrze udokumentowane, a prawidłowo sformułowane wnioski wynikają z analiz statystycznych. Badania dotyczą ważnej tematyki i wpisują się obecnie preferowany nurt nowoczesnej hodowli odpornościowej i przyczyniają się zarówno do poszerzenia naszej wiedzy jak również jej wykorzystania w praktyce. Są to rzetelne prace o charakterze aplikacyjnym z wykorzystaniem tradycyjnej i najnowszej wiedzy na temat rozwoju septoriozy liści i plew pszenicy i pszenżyta.

Rozprawa doktorska mgr. Lidii Kowalskiej w istotny sposób przyczynia się do poszerzenia wiedzy na temat ważnej gospodarczo choroby pszenicy i pszenżyta i stwarza perspektywy do dalszych poszukiwań. Nie mam wątpliwości, że przesłana do oceny praca doktorska pani mgr. Lidii Kowalskiej pt. „Selekcja genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew (*Parastagonospora nodorum*) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych” **spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym**. Badania dotyczą **dziedziny nauk rolniczych, dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo**. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytut Badawczy w Radzikowie o **dopuszczenie mgr Lidii Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.


Małgorzata Jędryczka