



## Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin

Łódź, 2.03.2016 r.

## Ocena pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty

pt. „*Analiza wybranych czynników genetycznych i biochemiczno-fizjologicznych odporności pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*)*”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr **Marty Dmochowskiej-Boguty** została wykonana w Zakładzie Inżynierii Genetycznej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie pod kierunkiem Prof. dr hab. Wacława Orczyka.

Praca liczy 133 strony, 26 rysunków (zalecałbym używanie terminu wykres lub rycina) i 12 tabel, bardzo dobrze dokumentujących zagadnienia omawiane w rozprawie oraz 206 pozycji (w tym 14 stron internetowych) w spisie piśmiennictwa (właściwie dobrane prace doświadczalne i inne artykuły literatury światowej, w zdecydowanej większości opublikowanych w latach 2000-2014, w tym wiele pozycji pochodzących z ostatnich 5 lat). Chciałbym podkreślić, że w spisie piśmiennictwa znalazłem większość prac, które sam zaliczam do tych ważnych dla tematyki poruszanej w rozprawie doktorskiej. Z drugiej strony, rozprawa stała się dla mnie ważnym źródłem piśmiennictwa, które z różnych względów przeoczyłem.

Rozprawa została napisana w języku polskim, w klasycznym układzie i oprócz spisu treści, ilustracji i tabel oraz wykazu stosowanych skrótów zawiera *Wstęp* i *Cel pracy*, obszerny i bardzo interesujący *Przegląd literatury*, *Materiały i Metody*, bardzo szczegółowo przedstawione *Wyniki*, interesującą *Dyskusję*, *Wnioski*, *Suplement* i *Spis Literatury*. Oczywiście nie przeoczyłem umieszczonych na początku pracy streszczeń w języku polskim i angielskim. Układ pracy i jej opracowanie, sposób prezentacji i analizy wyników zrealizowane zostały przez Doktorantkę w sposób wzorowy. **Stąd, uprzedzając szczegółowe uzasadnienie, chciałbym już teraz wyrazić pogląd, że praca ta w mojej ocenie spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie wniosek**

o dopuszczenie mgr Marty Dmochowskiej-Boguty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

### Tematyka i cele pracy

Tematyka i cele pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty mieszczą się w jednym z niezwykle ważnych, bardzo aktualnych kierunków współczesnej biologii roślin, do których bez wątpienia należy zaliczyć molekularne/genetyczne mechanizmy odporności ważnych roślin uprawnych na patogeny. U podstaw nieustającego i stale rosnącego zainteresowania tą tematyką leży z jednej strony ogromny, niespotykany wcześniej rozwój warsztatu badawczego, technik, narzędzi pozostających do dyspozycji naukowców, z drugiej zaś, będące tego konsekwencją, osiągnięcia poznawcze w dziedzinie biochemii, genetyki i biologii molekularnej związane z poznaniem strukturalnej i funkcjonalnej organizacji genomu zarówno roślin wyższych jak i drobnoustrojów. Oczywiście, nadrzędną podstawą zainteresowań naukowców i praktyków tą tematyką jest potrzeba najpierw zidentyfikowania, scharakteryzowania i powiązania w logiczną, współgrającą całość mechanizmów odpowiedzialnych za odporność badanego gatunku na patogena, a w dalszej perspektywie, docelowo – doskonalenie odmian roślin uprawnych. Niech potwierdzeniem dla tej opinii będzie fakt, że praca doktorska mgr Marty Dmochowskiej-Boguty była realizowana w ramach projektu badawczego zamawianego „*Nowe metody genetyki molekularnej i genomiki służące doskonaleniu odmian roślin uprawnych*”, projektu badawczego „*Kinazy związane ze ścianą komórkową w pszenicy i jęczmieniu - nowa grupa genów zaangażowana w odporność na patogeny*” finansowanego przez NCN, w ramach Sieci naukowej „*Genomika i transgeneza roślin użytkowych*” a wreszcie tematu badawczego w ramach Działalności statutowej.

Jak już wspominałem wcześniej, temat i cel ocenianej pracy doktorskiej mieszczą się, w moim przekonaniu, w bardzo aktualnym i niezwykle ważnym kierunku badawczym w dziedzinie współczesnej biotechnologii molekularnej, dotyczącym odporności roślin użytkowych na patogeny. Mogę, zatem stwierdzić, że temat pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty i jednoznacznie sformułowany, kierunkowy cel, spełniają wymagania stawiane obecnie przed autorami ambitnych projektów badawczych w dziedzinie współczesnej biotechnologii molekularnej roślin, w tym projektów dotyczących agrobiotechnologii.

Problematyka badawcza, a w szczególności omawiane w tej rozprawie zagadnienia są doskonałą ilustracją złożoności, wieloaspektowości prac badawczych niezbędnych do precyzyjnego ustalenia istotnych dla całości zagadnienia mechanizmów, ich wzajemnych oddziaływań i powiązań. Wiem, że oceniana praca doktorska mgr Marty Dmochowskiej-Boguty stanowi tylko pewien wycinek znacznie szerszych, poważnie zaawansowanych badań

prorowadzonych pod kierunkiem Profesorów Anny Nadolskiej-Orczyk i Wacława Orczyka – badań unikalnych na skalę krajową pod względem koncepcji metodycznych i rozwiązań technicznych. Wyniki badań zreferowanych w rozprawie stanowią, jak sądzę, uzupełnienie wiedzy zdobytej przez Zespół Profesora Orczyka w latach ubiegłych (czego wymiernym efektem są publikacje w renomowanych czasopismach naukowych) oraz kolejny etap poszerzania i pogłębiania wiedzy dotyczącej mechanizmów genetycznych rządzących metabolizmem roślin. Swój znaczący udział w realizacji badań prowadzonych w Zakładzie ma mgr Dmochowska-Boguta. Wyrazem tego są publikacje z Jej współautorstwem:

- **Dmochowska-Boguta M.**, Alaba S., Yanushevska Y., Piechota U., Lasota E., Nadolska-Orczyk A., Karłowski WM., Orczyk W., **2015**. Pathogen regulated genes in wheat isogenic lines differing in resistance to brown rust *Puccinia triticina*. BMC Genomics, 16:742;1-17. DOI 10.1186/s12864-015-1932-3.
- **Dmochowska-Boguta M.**, Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. **2013**. Roles of peroxidases and NADPH oxidases in the oxidative response of wheat (*Triticum aestivum*) to brown rust (*Puccinia triticina*) infection. Plant Pathol.62:993-1002. Doi: 10.1111/ppa.12009
- Kawalek A, **Dmochowska-Boguta M.**, Nadolska-Orczyk A, Orczyk W. **2012**. A new BSMV-based vector with modified  $\beta$  molecule allows simultaneous and stable silencing of two genes. Cell. Mol.Biol. Lett. 17: 107-123. DOI: 10.2478/s11658-011-0041-9, 17: 107-123.
- Orczyk W., **Dmochowska-Boguta M.**, Czembor H.J., Nadolska-Orczyk A. **2010**. Spatiotemporal patterns of oxidative burst and micronecrosis in resistance of wheat to brown rust infection. Plant Pathol. 59: 567-575. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02257.x

oraz współautorstwo zgłoszenia patentowego:

- Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., **Dmochowska-Boguta M.** 2011. Sposób wyciszania genu rośliny zbożowej oraz wektor wirusowy lub RNA do stosowania w tym sposobie. Wniosek Patentowy zgłoszony w Urzędzie Patentowym RP nr PK/1325/RW. Numer zgłoszenia: P.396949, data zgłoszenia: 2011-11-11.

### Przegląd literatury

*Przegląd literatury* stanowi interesujące kompendium wiedzy dotyczącej zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy doktorskiej. W pierwszej części rozdziału Autorka przedstawiła informacje dotyczące pszenicy – jej uprawy i znaczenia. W kolejnych rozdziałach pracy mgr Marta Dmochowska-Boguta szeroko, szczegółowo i fachowo omówiła cykl rozwojowy i epidemiologię badanego grzyba – rdzy brunatnej (*Puccinia triticina*). Kolejne rozdziały mgr Marta Dmochowska-Boguta poświęciła odporności roślin na patogeny. Szczególnie interesujące wydają mi się właśnie te rozdziały. Sądzę, że Przegląd literatury mógłby stanowić kanwę dla bardzo interesującego artykułu przeglądowego.

## **Cel pracy**

W moim rozumieniu, w tej części rozprawy podane powinny być w formie najbardziej zwięzłej, lakonicznej główne i ewentualnie poboczne cele przeprowadzonych badań. I właśnie w takim ujęciu cel pracy został przedstawiony przez Doktorantkę.

Praktyczna realizacja celu pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty wymagała przeprowadzenia bardzo złożonych, trudnych, wieloetapowych, a także żmudnych i czasochłonnych doświadczeń z wykorzystaniem różnorodnych metod i technik biochemicznych i molekularnych.

Nie mam wątpliwości, że wskazane cele pracy doktorskiej należy uznać za ambitne a ich realizacja wymagała od Doktorantki obok opanowania i praktycznego zastosowania szerokiego zestawu metod, intensywnej pracy laboratoryjnej.

## **Materiały i metody**

Ogólnie, nie wnoszę zasadniczych zastrzeżeń do treści tego rozdziału, bowiem większość zastosowanych metod, technik i procedur uważam za odpowiednie, nowoczesne i właściwie dobrane by zapewnić wynikom wiarygodność i umożliwić realizację bardzo ambitnych, dalece wykraczających poza wymagania formalne celów.

Jako materiał roślinny w badaniach wykorzystana była pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) odmiana Thatcher (Tc) i izogeniczne linie odmiany Thatcher z określonymi genami odporności na rdzę brunatną: *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr25*, *TcLr26*, *TcLr29* i *TcLr34* oraz jednozarodnikowy izolat rdzy brunatnej (*Puccinia triticina*). Posłużyły one Autorce w badaniach molekularnych, biochemicznych, makroskopowych, mikroskopowych i z zakresu fitopatologii.

Jestem pełen uznania dla zakresu przeprowadzonych badań oraz różnorodności stosowanych technik/metod. Fakt ten stanowi o kompleksowości przeprowadzonych badań i wiarygodności uzyskanych wyników.

## **Wyniki i Dyskusja**

Jestem świadom faktu, że w tego rodzaju projektach, mając zróżnicowany materiał badawczy, a jako narzędzia badawcze liczne i zróżnicowane pod względem złożoności techniki cytochemiczne, biochemiczne, molekularne i analizy bioinformatyczne, osiągnięcie celu(ów) przedsięwzięcia uwarunkowane jest nie tylko wiedzą i posiadanym warsztatem badawczym, ale także takim cechami charakteru jak pracowitość, dyscyplina i swoistego rodzaju pedantyczność, drobiazgowość. Stwierdzone przeze mnie tylko nieliczne błędy czy niedociągnięcia dają jak najlepsze świadectwo o Doktorantce (i Promotorze).

Wyniki pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty zostały opisane i udokumentowane na 33 stronach rozprawy. Dokumentację wyników stanowią liczne wykresy, diagramy, doskonalej jakości barwne makro- i mikrofotografie, sekwencje nukleotydów – nie sposób wymienić wszystkie formy.

Tak obfita dokumentacja jest kolejnym potwierdzeniem ogromu wykonanej przez doktorantkę pracy eksperymentalnej.

W ocenie tego bardzo obszernego rozdziału ograniczę się do tych rezultatów, które uważam za najważniejsze:

- Potwierdzono, że wzory ekspresji peroksydaz i oksydaz NADPH, skorelowane z przebiegiem akumulacji nadtlenu wodoru, wskazują na udział tych enzymów w akumulacji nadtlenu wodoru i odporności;
- Wykazano, że akumulacja nadtlenu wodoru w pszenicy w czasie infekcji jest zależna od peroksydaz, oksydaz NADPH (Rboh), oksydazy diaminowej i oksydazy poliaminowej z tym, że względny udział tych enzymów jest różny w zależności od obecności określonego genu *Lr*.
- Wykazano, że wzór ekspresji klonu JG968933 (*TaWAK*) wskazuje, że gen ten jest silnie zaangażowany w odpowiedź pszenicy na infekcję rdzą brunatną;
- Sugeruje się, że wzór ekspresji sześciu z ośmiu badanych genów reprezentowanych przez klon SSH (JG968933, JG969003, JG968955, JG968944, JG968925 i JG968969) u rośliny odpornej w porównaniu do rośliny podatnej wskazuje na ich potencjalny udział w reakcji odporności.
- Na podstawie analizy ekspresji i analizy bioinformatycznej klonów SSH wskazuje się na udział tych genów w odpowiedzi na infekcję oraz funkcję w transdukcji sygnałów, wybuchu oksydacyjnym i reakcjach mikronekrotycznych (oksydaza Rboh) oraz sygnalingu (białko 14-3-3 i receptor LRR).

Wyniki pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty zostały podsumowane w postaci udokumentowanych doświadczalnie, w pełni uprawnionych wniosków końcowych.

Bardzo interesującą i ważną częścią pracy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty jest świetnie napisana Dyskusja. Z dużą przyjemnością odnotowałem w tej części pracy odpowiedzialne komentarze na temat jej własnych wyników oraz ich uprawnioną interpretację. Tę część pracy znamionują bardzo dobra znajomość przedmiotu, biegłość warsztatowa doktorantki, oraz sprawne posługiwanie się polszczyzną.

Podsumowując tę część swojej opinii pozostaję pełen uznania dla ogromu wykonanej przez Panią mgr Martę Dmochowską-Bogutę pracy, uzyskanych przez nią wyników i w pełni uprawnionej ich interpretacji.

### Końcowe uwagi ogólne

1. Wysoko pod względem merytorycznym i formalnym oceniam napisany przez mgr Martę Dmochowską-Bogutę Przegląd literatury. Uważam, że byłby on, po przeformatowaniu, wartościowym artykułem przeglądowym. Wśród niezbędnych modyfikacji widziałbym krytyczną redukcję, posiadającego już wyłącznie wartość historyczną, piśmiennictwa.
2. Mogę z przyjemnością stwierdzić, że mgr Marta Dmochowska-Boguta w czasie realizacji celów pracy doktorskiej opanowała bardzo bogaty, nowoczesny warsztat badawczy, który, jak sędzę, umożliwiłby Jej kontynuację pracy naukowej w wielu laboratoriach biologii molekularnej roślin.
3. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zasługują na najwyższą uwagę badaczy zajmujących się tą tematyką, ich interpretacja jest w pełni uprawniona, a cała rozprawa doktorska zasługuje na duże uznanie.

Na zakończenie chciałbym jeszcze raz powtórzyć: rozprawę doktorską mgr Marty Dmochowskiej-Boguty oceniam jako właściwą pod względem formalnym i bardzo wartościową pod względem merytorycznym, a wymienione przeze mnie w recenzji nieliczne uwagi krytyczne nie mają, z natury swojej, żadnego wpływu na moją ogólnie wysoką jej ocenę.

Wyrażając pogląd, że praca ta spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim wnoszę do Rady Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie wniosek o dopuszczenie mgr Marty Dmochowskiej-Boguty do dalszych etapów przewodu doktorskiego..

Chciałbym w tym miejscu wyrazić opinie, że biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy i więcej niż poprawność formalną, o ile spełnione są inne wymogi, praca ta zasługuje na stosowne, w ramach istniejących przepisów, wyróżnienie.



Andrzej K. Kononowicz