

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Dmochowskiej-Boguty pt. "Analiza wybranych czynników genetycznych i biochemiczno-fizjologicznych odporności pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*)", wykonana dla Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie.**

**Wprowadzenie**

Badania w mechanizmów odporności roślin na patogeny nieustająco cieszą się dużym powodzeniem ze względu na znaczenie gospodarcze konkretnych układów roślina-patogen i tym samym, możliwe aplikacje. Jednocześnie specyfika ras patogenów i mnogość możliwych interakcji z licznymi genami odporności znacząco komplikują badania, wymagając prowadzenia prac nad roślinami użytkowymi, a nie tylko na układach modelowych. Mgr Marta Dmochowska-Boguta wybierając temat dysertacji podjęła się więc niezwykle trudnego zadania. Podsumowując czynniki trudności tematu wymienię następujące:

- Trzecie zboże świata (trudna praca w warunkach laboratoryjnych) i jedna z najważniejszych chorób grzybowych pszenicy - światowa konkurencja w badaniach,
- Duży i skomplikowany genom gospodarza, jeszcze całkowicie niezsekwencjonowany przez publiczne konsorcja (pierwszy genom referencyjny pszenicy za ok. 2 lata),
- Liczne geny odporności ale i zmienny patogen potrafiący przełamywać naturalne odporności,
- Próba połączenia badań histochemicznych i badań molekularnych.

Recenzowana praca jest wynikiem działalności doktorantki w ramach kilku projektów: ministerialnego zamawianego, NCN, sieci naukowej i działalności statutowej Instytutu. Celem przedłożonej pracy jest badanie interakcji pszenicy i rdzy brunatnej poprzez obserwacje rozwoju patogenu, reakcji mikronekrotycznej rośliny, akumulacji nadtlenu wodoru i jego genetyki, odkładania kalozy i lignifikacji. Precyzyjnie rozłożone na osi czasu obserwacje mikroskopowe są połączone z analizami sekwencji i ekspresji 16 genów, w tym 8 nowo-zidentyfikowanych sekwencji pochodzących z biblioteki SSH.

**Dane formalne o rozprawie**

Rozprawa jest napisana w języku polskim i ma format standardowej pracy doktorskiej zawierając wszystkie wymagane elementy. Rozprawa liczy 110 stron, a dodatkowo suplement zawierający sekwencje i wyniki skanowania domen pięciu białek z wykorzystaniem bazy InterPro – 7 stron oraz spis literatury – 16 stron. W całej pracy znajdują się cytowania ponad 200 pozycji literaturowych, w tym 54 pozycje z ostatnich 5 lat i 14 linków do zasobów i narzędzi sieciowych. Zdaniem recenzenta cytowane prace dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy w interesującej tematyce, a ich dobór i ilość są odpowiednie. Proporcje ilościowe pomiędzy „przeglądem literatury” - 26 str., „materiałami i metodami” - 21 str., „wynikami” -

33 str. i „dyskusją” - 14 str. są dobrze wyważone. W tekst wkomponowano 12 Tabel i 24 Rysunki zaopatrzone w informatywne podpisy.

Język przejrzysty bez poważnych błędów językowych, terminologia naukowa profesjonalna, nieliczne literówki, a sekwencje można by zapisywać czcionką Courier New.

### **Ocena rozprawy**

Tytuł oddaje treść i cele rozprawy, chociaż jeśli miałby zainteresować szersze grono czytelników mógłby być bardziej precyzyjny. Recenzent jednak rozumie, że szerokość prowadzonych analiz (a tak jest w tym przypadku) nie sprzyja formułowaniu bardziej chwytliwych tytułów. Cel jest dokładnie przedstawiony we wstępie, a hipotezy robocze jasno wynikają z opisu realizowanych zadań, jednak ani we wstępie ani w dalszych częściach pracy autorka nie formułuje ich wprost.

Przegląd literatury jest dobrym omówieniem i usystematyzowaniem informacji z zakresu tematyki pracy. Rozpoczyna się opisem obiektu badań – pszenicy, zarówno od strony systematyki jak i aktualnego areału i plonu w różnych rejonach świata z uwzględnieniem innych gatunków pszenic – p. twardej i pszenic antycznych. Jedynie źródło informacji o systematyce gatunku *Triticum aestivum* – baza NCBI – wydaje się nieco wtórnym źródłem, gdyż stworzonym na potrzeby bazy danych sekwencji. Sugerowałbym powoływać się raczej na APG III, czyli Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121, które to źródło jest stworzone pod kątem właśnie systematyki. Nie zmienia to faktu, że dla większości gatunków roślin, w tym pszenicy, klasyfikacja systematyczna z obydwu źródeł pokrywa się. Na kolejnych 5 stronach przedstawione są patogen – *Puccinia triticina*, etapy infekcji, cykl rozwojowy oraz epidemiologia. Jest to wartościowa, podręcznikowa część przeglądu literatury. Następnie jest najważniejsza i zarazem najtrudniejsza część dotycząca odporności roślin. Trudność polega głównie na wielości opracowań dotyczących tej problematyki. Autorka z zadaniem poradziła sobie bardzo dobrze, cytując naprawdę najważniejsze publikacje źródłowe, a z ewentualnym zarzutem nieusystematyzowania koncepcji odporności poradziła sobie przytaczając za Chen (2013) tabelę z definicjami różnych typów odporności. W tej części zawarto również wnikliwy opis odporności pszenicy na rdzę brunatną wraz z opisem różnych fenotypów infekcji rdzy wg. McIntosh i in. (1995). W przeglądzie na zakończenie treściwie przedstawiono rolę i biogenezę reaktywnych form tlenu w reakcji roślin na patogeny, ze szczególnym uwzględnieniem pszenicy – opis ten jest doskonałym wprowadzeniem potrzebnym do zrozumienia znaczenia później przedstawionych analiz cytochemicznych, podobnie jak omówienie roli lignin i kalozy. Na zakończenie wyjaśniono genozę klonów SSH badanych w molekularnej części pracy, która jest przedmiotem oddzielnej publikacji doktorantki (BMC Genomics IF=3,986) i dotyczy wyników nie zamieszczonych w niniejszej dysertacji. Podsumowując, przegląd literatury w

przedstawionej do oceny pracy jest rodzajem dobrego i rozszerzonego „introduction” z publikacji wynikowej, dostarczając podstawowych informacji potrzebnych do zrozumienia pozostałych części. Nie jest to zarzut, a jedynie konstatacja pokazująca, że fragmenty tej części rozprawy mogłyby się stać publikacją przeglądową dopiero po gruntownym przeredagowaniu. Z drugiej jednak strony stworzenie oryginalnej przeglądownki w tak konkurencyjnej tematyce byłoby bardzo trudne.

Materiały i metody są napisane syntetycznie i odzwierciedlają dobrą znajomość wykorzystywanych metod i zrozumienie znaczenia wyników dzięki nim otrzymanych. Dobór badanych 8 linii (odmiana Thatcher i 7 linii izogenicznych różniących się obecnością naturalnych genów odporności) jest ze wszech miar właściwy. Brak jedynie informacji o poziomie izogeniczności. Ze względu na to, że do analizy reakcji wspomnianych linii na patogen zastosowano 5 metod histochemicznych, jedną złożoną z udziałem inhibitorów i jedną obejmującą qPCR, które często obejmowały różnie dobrane punkty czasowe od infekcji, autorka sporządziła rewelacyjną tabelkę (Rysunek 5) podsumowującą wszystkie punkty czasowe i zastosowane metody dla każdej badanej linii. Przy tym nie zapomniano o zamieszczeniu pod tabelą właściwego, skróconego opisu znaczenia każdej z metod, co jest ważne dla czytającego niespecjalisty. Następujący później opis właściwych metod, oprócz sposobu wykonania, uzupełniony jest w informacje o znaczeniu wyników każdej z nich. Zdaniem recenzenta, na szczególne podkreślenie zasługują jeszcze dwa aspekty tego rozdziału: do oceny działania inhibitorów wybuchu oksydacyjnego zastosowano oryginalny i prosty współczynnik inhibicji, który pozwolił na przedstawienie liczbowe w dużej mierze jakościowych obserwacji mikroskopowych oraz przy analizie ekspresji genów zaangażowanych w biogenezę reaktywnych form tlenu zastosowano rzadko używany kumulatywny współczynnik transkrypcji, pomocny przy ocenie znaczenia danego enzymu w generowaniu RFT. Strona wizualna tego rozdziału i tym samym jego czytelność znacznie zyskały dzięki wspomnianej wcześniej tabelce metod oraz schematowi żmudnego dochodzenia od klonu SSH – baza EST JG968933 (291pz) do klonu cDNA z odmiany Thatcher o pełnej długości Acc no KR815340 (2473pz) oraz genomowego kontigu (7695pz). Nie rozumiem jedynie dlaczego w całej pracy autorka posługuje się roboczym numerem rejestracyjnym JG968933, który odnosi się do krótkiego fragmentu z biblioteki SSH, zamiast używać numeru rej. ostatecznej sekwencji nukleotydowej w bazie GenBank KR815340 (występuje w pracy tylko raz) czy pochodnej sekwencji białkowej ALJ11037, albo choćby roboczej nazwy sugerującej tożsamość tej sekwencji – np. *TaWAK5R* (R jak Radzików) lub *TaWAK5\** (z gwiazdką; propozycje recenzenta). Metody molekularne są dobrze dobrane i opisane. Dobór metod bioinformatycznych jest właściwy, choć ich opis zdaniem recenzenta zbyt lakoniczny – np. jeśli nie wymienia się parametrów użytych przy poszukiwaniu podobieństwa etc., to należy choć wspomnieć, że użyto parametrów domyślnych (default parameters). W programach z rodziny Blast do takich podstawowych parametrów należą baza w której szukano

podobieństw (np. nr), długość słowa „word size”, tablica punktacji podobieństw, kary za przerwy („gap insertion cost”, „gap extension cost”). Serwisy internetowe pozwalające na podstawowe analizy bioinformatyczne podają również cytowania literatury opisującej daną metodę - sugerowałbym ich umieszczenie oprócz linku URL (dla programów z rodziny BLAST ze strony NCBI cytowanie podane jest na każdej stronie z wynikiem – np. przy blastn w wersji megablast jest to Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14). Podobnie, dosyć skrótowo potraktowano analizę filogenetyczną – obok linku można było podać choćby nazwę metody analizy filogenetycznej implementowanej w programie ClustalW2 (zwykle Neighbour-joining w skrócie NJ). Podsumowując materiały i metody - doktorantka wykorzystała bardzo szerokie spektrum trudnych metod histochemicznych, molekularnych i bioinformatycznych i jak pokazuje następny rozdział pozwoliło to na uzyskanie wysokiej jakości wyników, co świadczy o osiągnięciu warsztatowego mistrzostwa.

Wyniki obejmują treściwy opis rezultatów poczynając od oceny patogeniczności izolatu jenozarodnikowego *P.triticina* na 41 liniach pszenicy, następnie dokładnej charakterystyki rozwoju grzyba na badanych 8 liniach pszenicy co pozwoliło na zsynchronizowanie fenotypowej skali objawów infekcji z mikroskopową oceną rozwoju grzyba i występowaniem mikronekroz, wyodrębniając trzy wzory interakcji pszenicy i rdzy brunatnej (tutaj recenzent docenia klarowne przełożenie obserwacji mikroskopowych na wartości liczbowe i wykresy). Dalej zaprezentowano dokładniejsze analizy obejmujące barwienie błękitem Evansa (na nekrozy), błękitem anilinowym (kaloza), floroglucynolem (ligniny), DAB (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – wszystkie te analizy poparte są dobrą dokumentacją fotograficzną i przekonywującą analizą ilościową w postaci tabel lub wykresów. Ta ostatnia metoda została również użyta do oceny działania czterech inhibitorów enzymów zaangażowanych w produkcję H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oksydazy NADPH, peroksydaz, oksydazy dwuaminowej, oksydazy poliaminowej), pozwalając na skonfrontowanie tych wyników ze wzorami transkrypcji genów je kodujących (dla 4 peroksydaz i 2 oksydaz NADPH). Dalej przedstawiono analizę ekspresji 8 genów reprezentowanych przez klony SSH z analiz wykonanych wcześniej w kierunku indukcji po porażeniu rdzą brunatną w 8 punktach czasowych, potwierdzając związek ich ekspresji z infekcją kontroli i linii z genem odporności (u 7 genów), jak i z infekcją oraz występowaniem genetycznej odporności (1 gen). Szersze analizy molekularne wykonano w na tym ostatnim kandydacie (JG968933, WAK) doprowadzając do określenia pełnej sekwencji cDNA (poprzez klonowanie brakujących fragmentów) i locus genomowego (złożenie z dostępnych w bazie danych kontigów). Na sekwencji cDNA wykonano analizy podobieństwa, występowania domen białkowych i zależności filogenetycznych. Ta ostatnia analiza wydaje się jednak wykonana w pośpiechu, gdyż dobór gatunków i sekwencji (7 z *A.taliana* i 5 z *T.aestivum*) nie pozwala na dalej idące wnioski.

Dyskusja jest bardzo rzeczowa. Rzetelnie konfrontuje wszystkie wyniki z danymi literaturowymi pokazując ich nowatorskość. Najbardziej nowatorska jest analiza zaangażowania poszczególnych enzymów (z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów) i genów je kodujących (qRT-PCR) w biosyntezę nadtlenu wodoru. Szczególnie interesująca jest pierwsza część dotycząca inhibitorów, pokazując dynamiczne zaangażowanie różnych aktywności enzymatycznych w czasie infekcji, która dodatkowo zależy od genu warunkującego odporność roślin i jej poziomu w interakcji z patogenem. Brakuje mi tutaj trochę swobodniejszej dyskusji, która zdecydowanie ożywiłaby rozprawę i wygenerowałaby kilka nowych hipotez do rozwinięcia w przyszłych badaniach. Rozumiem jednak ostrożność autorki ze względu na potrzebę powtórzenia analiz na liniach z innymi genami odporności i/lub liniach z tym samym genem ale w różnym tle genetycznym. Takie podejście świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki. Wyniki analizy ekspresji bardziej jednoznacznie wskazują na dominującą rolę peroksydazy *TaPrx112* i *TaPrx108*, a poziomy ich transkryptów korelują ze stopniem odporności zainfekowanych liści. Tutaj jednak trudność wnioskowania polega na niepełnej znajomości genomu i wielogenowej rodzinie peroksydaz roślinnych – analiza transkryptomowa w przyszłości pozwoliłaby na szersze spojrzenie. Analizy lignin i kalozy są zgodne z literaturą, a sama ich produkcja wydaje się zjawiskiem wtórnym, indukowanym przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dyskusję zamyka omówienie zmian ekspresji badanych klonów SSH w kontekście ich podobieństwa i potencjalnej roli w reakcji roślin na patogen. Jest to niezwykle ciekawy fragment wskazujący na możliwy udział trzech nowych, wcześniej nie badanych kinaz WAK z pszenicy w reakcji na infekcję rdzy brunatnej. Obok kinaz WAK dyskutowane są: nowy gen NB-LRR, białko wiążące wapń, oksydaza Rboh, kinaza serynowo-treoninowa i regulator 14-3-3, wskazując na aktywne procesy przekazu sygnałów poprzez fosforylację oraz reaktywne formy tlenu. Wszystkie uzyskane wyniki analiz zostały wszechstronnie skonfrontowane z danymi literaturowymi z zachowaniem dużej ostrożności w formułowaniu wniosków, które kończą pracę. W sumie autorka wysnuwa 11 wniosków – 3 metodyczne (2, 6 i 11) i 8 biologicznych (pozostałe). Wnioski są wyważone i uprawnione. Szkoda, że nie zawsze wypływają bezpośrednio z tekstu dyskusji, gdzie nawet kosztem powtórzenia pewnych sformułowań poprawiłyby jej odbiór.

### **Podsumowanie**

Recenzowana rozprawa jest wartościowym opracowaniem z zakresu molekularnej patologii roślin uprawnych. Opracowanie odzwierciedla wysokie umiejętności techniczne, ogromną pracę autorki i zawiera bardzo dobrej jakości wyniki, z których część jest wysoce nowatorska i powinna wkrótce zostać opublikowana. Recenzent nie dostrzegł istotnych błędów rzeczowych – nieliczne błędy czy nieściśłości nie zmieniają wysoce pozytywnego odbioru tej pracy, a krytycyzm recenzenta najczęściej wynika z odmiennego spojrzenia na problematykę pracy. Analiza tekstu dowodzi, że autorka jest dojrzałym naukowcem godnym awansu naukowego.

Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Marty Dmochowskiej-Boguty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na nowatorskie wyniki dotyczące analizy stopnia zaangażowania enzymów w biogenezę nadtlenu wodoru u linii pszenicy o zróżnicowanej podatności na rdzę oraz identyfikacji nowych genów indukowanych w odpowiedzi na patogen, wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.



Dr hab. Marcin Filipecki  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
marcin\_filipecki@sggw.pl