

Kraków, 26 marca 2014

Prof. dr hab. Marcin Rapacz
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy *im. H. Kollątaja* w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Mgr Ewy Ciszkowicz zatytułowanej „Mapowanie genów odporności na mączniaka prawdziwego u odmian pszenżyta ozimego ‘Lamberto’ i ‘Grenado’ ”

W rozprawie doktorskiej Pani Ewa Ciszkowicz podejmuje ciekawą i istotną z punktu widzenia praktycznego tematykę związaną z odpornością pszenżyta na mączniaka prawdziwego. Celem pracy było mapowanie regionów grup sprzężeń (QTL) odpowiedzialnych za zróżnicowanie odporności na mączniaka pomiędzy dwoma odmianami pszenżyta. Są to pierwsze badania tego typu, a u pszenżyta zmapowano dotychczas jedynie odporność na septoriozę plew i pleśń śniegową. Porażanie pszenżyta przez mączniaka stało się w ostatnich latach istotnym problemem ekonomicznym w związku z obserwowaną szybką ewolucją grzyba, którego nowe szczepy przełamują odporność kolejnych form pszenżyta. Materiałem badawczym było potomstwo dwukierunkowych mieszańców pszenżyty odmian Lamberto (L) i Grenado (G). Wykorzystano 91 roślin F_2 populacji $G \times L$ i 91 roślin F_2 $L \times G$ oraz ich potomne rodziny F_3 . Przyjęta w pracy metodyka wykorzystuje najnowocześniejsze metody badawcze związane z wysokorozdzielczym genotypowaniem w systemie markerów DArT uzupełnionych markerami SSR (18 par starterów). Fenotypowanie przeprowadzono sprawdzonymi metodami testów inokulacyjnych (na roślinach pokolenia F_2) oraz, najbardziej wiarygodną i pewną metodą oceny odporności na porażenie jaką są polowe testy prowokacji infekcji (na rodzinach pokolenia F_3). Warto podkreślić, że do infekowania roślin użyto mieszaniny izolatów grzyba, co niestety jest często zaniedbywane w wielu pracach, nawet publikowanych czasem w renomowanych czasopismach naukowych. Dodatkowo, przy okazji konstruowania mapy genetycznej podjęty został szalenie interesujący wątek odstępstw od modelowej struktury genomu pszenżyta heksaploidalnego, który poza analizą porównawczą grup sprzężeń wsparto analizą cytogenetyczną określającą liczbę chromosomów.

Należy uznać, że rozprawa Pani Ewy Ciszkowicz stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań co jest warunkiem ustawowym stawianym rozprawom doktorskim.

Rozprawa napisana została poprawną polszczyzną w sposób typowy dla prac naukowych. Tabele i ryciny zamieszczone w pracy są wykonane starannie i, z wyjątkiem map w załączniku oraz krzywych LOD, czytelne. Praca liczy 116 stron oraz 28 stron aneksu zawierającego przydatną tabelę z charakterystyką polimorficznych markerów oraz mapy porównawcze grup sprzężeń wyznaczonych w pracy z mapami pszenicy zwyczajnej i pszenicy twardej (dla genomów A i B) oraz żyta i pszenżyta (dla genomu R).

W krótkim „Wstępie” doktorantka zwięźle wprowadza czytelnika w tematykę pracy i uzasadnia potrzebę wykonywania badań. W „Przeglądzie piśmiennictwa” doktorantka w sposób kompetentny charakteryzuje pszenżyto, ze szczególnym uwzględnieniem jego genetyki i cytogenetyki oraz celów przyświecających hodowli tego syntetycznego gatunku. Scharakteryzowano też patogena wywołującego mączniaka prawdziwego u pszenżyta oraz przebieg procesu chorobowego. Sporo uwagi poświęcono na wnikliwy opis podłoża genetycznego odporności na mączniaka prawdziwego u pszenicy i żyta. Wszystkie poznane i opublikowane geny odporności zostały zebrane w zbiorczej, dokładnej tabeli stanowiącej bardzo cenny materiał przeglądowy. Opisano też zagadnienie tworzenia map genetycznych i lokalizacji loci cech ilościowych.

Cel pracy został sformułowany w sposób jasny i zwięzły.

Opis materiału badawczego oraz zastosowanych metod badawczych i statystycznych jest pełny i dokładny.

Należy zdecydowanie uznać, że **problem badawczy postawiony w pracy został rozwiązany z użyciem poprawnie dobranej metodyki**, w tym z użyciem poprawnych metod statystycznych. Chciałbym zwrócić tu uwagę na wykonanie przez doktorantkę analizy struktury genetycznej badanej populacji, co w tego typu badaniach jest sprawą niezwykle ważną i równie niezwykle często zaniedbywaną.

W pracy skonstruowano mapę genetyczną o długości 1813.6 cM złożoną z 26 grup sprzężeń. Mapę skonstruowano na podstawie segregacji 547 markerów DArT i 7 markerów SSR w dwukierunkowej populacji F2 'Lamberto' i 'Grenado' liczącej łącznie 131 roślin. Gęstość tą uznać należy za wystarczającą, choć niezbyt imponującą, czego efektem jest po części wyróżnienie liczby grup sprzężeń większej niż liczba chromosomów. Nie do końca zgadzam się w tym miejscu z jednym z wniosków doktorantki, w którym pisze, że wysoka liczba zidentyfikowanych początkowo grup sprzężeń i duże między nimi odległości świadczą

(wyłącznie) o supresji rekombinacji niektórych chromosomów pszenżyta. Te, częściowo problematyczne grupy sprzężeń zostały zredukowane przy użyciu porównawczej analizy strukturalnej do 21 fragmentów odpowiadających chromosomom pszenżyta. Co interesujące w uzyskanej mapie genetycznej nie zidentyfikowano chromosomów 2R, 3R oraz 7R, zidentyfikowano natomiast translokacje niehomeologiczne 5BS.3BL oraz 7A.1A. Zaproponowano przy tym reprezentację brakujących chromosomów żytnich poprzez substytucje: 2A/2R, 7A.1A/7R oraz 5BS.3BL/3R. Wynik ten jest, jak już wspomniano bardzo interesujący. Inną ciekawą obserwacją genetyczną było stwierdzenie faktu zaburzonej segregacji aż 33% zmapowanych markerów wynikającej z oddziaływań jądrocytoplazmatycznych, w których preferowane są chromosomy dziedziczone po matce.

Kierunek krzyżowania miał też wpływ na odporność na mączniaka ocenianą w stadium siewki z pomocą testów inokulacyjnych. Stwierdzono, że w populacji $L \times G$ odporność warunkowana była przez 1 gen recesywny (loci zlokalizowane na chromosomie 6R, które wyjaśniało około 8% zmienności), a w populacji $G \times L$ przez współdziałanie dwóch genów recesywnych (loci z chromosomów 1R i 4R, które wyjaśniały odpowiednio 12% i 9% zmienności). W stadium rośliny dojrzałej (w ocenie polowej) zidentyfikowano na chromosomach 1R i 6R dwa główne loci odporności na *Blumeria graminis* dla których procent wyjaśnianej zmienności wynosił 15% oraz 33.4%. Wykazano, że obydwa wymienione loci pochodziły od odmiany 'Grenado' i miały, odpowiednio, 14 oraz 2 wspólne markery DArT z loci odporności efektywnymi w stadium siewki. Wykazano również, że odporność w stadium rośliny dojrzałej ma, choć tylko w niewielkim stopniu, związek z markerami sprzężonymi ze zidentyfikowanymi wcześniej genami odporności: *Pm4*, *Pm39* i *Pm50*.

Wyniki zostały w sposób prawidłowy i kompletny przedyskutowane z wykorzystaniem wszystkich ważnych pozycji literatury przedmiotu. Warte podkreślenia jest to, że w zakresie genetyki i cytogenetyki, ze względu na pionierskość prowadzonych badań doktorantka musiała miejscami dyskutować własne wyniki bez możliwości odniesień literaturowych. W dyskusji ujęto też uzupełniającą analizę porównawczą zidentyfikowanych QTL związanych z odpornością pszenżyta na mączniaka. Element ten w zasadzie można było zaprezentować w rozdziale „Wyniki” jako WYNIK wykonanej analizy bioinformatycznej.

Rozdział „Wnioski końcowe” na który składa się osiem punktów (jak uściśla to doktorantka „wniosków i stwierdzeń”) stanowi raczej podsumowanie istotnych wyników pracy niż klasyczne wnioski.

Praca zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim zwięźle charakteryzujące problem badawczy, cel pracy, przyjętą metodykę oraz najważniejsze wyniki pracy.

W pracy zacytowano 280 pozycji literatury oraz 8 stron internetowych. Są to zarówno publikacje, które ukazały się w ostatnich kilku latach w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym, jak i fundamentalne dla omawianych zagadnień publikacje dwudziestowieczne (najstarsza 1921). **Dobór i sposób omawiania literatury przedmiotu oraz rzetelne dyskutowanie z nią własnych wyników potwierdzają wysoki poziom ogólnej wiedzy teoretycznej Doktorantki.**

W pracy znalazły się drobne uchybienia na które muszę zwrócić uwagę:

1. W języku polskim znakiem oddzielającym części dziesiętne od liczb całkowitych jest przecinek, a nie kropka, konsekwentnie używana w całej pracy przez doktorantkę.
2. W wykazie skrótów umieszczono pozycje powszechnie używane, jak: DNA, czy RNA. Niektóre rozwinięcia skrótów są niewystarczające, np. LOD opisano jako „logarytm szans”, ale na co?.
3. Na stronach 6 i 7 w nagłówku figuruje „Przegląd piśmiennictwa” podczas, gdy na stronach tych znajduje się spis treści i wstęp.
4. Tytuł podrozdziału 3.2.1. to „Izolacja dna roślin” – przez chwilę zastanawiałem się co to jest dno roślin.
5. Powoływanie się (strona 38 i 39) na konferencyjny komunikat Wąsek i wsp. w aspekcie podstaw wykorzystania metod SMA i CIM w analizie QTL jest niewłaściwy. Należałoby zacytować publikację przeglądową lub oryginalną dotyczącą samej metody.
6. Str. 42 – użyte określenie „mieszance F_2 ” jest niepoprawne – mówić należy o pokoleniu F_2 mieszańców.
7. Ryc. 4.2. – sformułowanie „dla współczynników korelacji.” jest niezrozumiałe bez podawania o jakie korelacje chodzi.
8. Na rycinach przedstawiających mapy genetyczne z naniesionymi QTL-ami (np. 4.6) koloru niebieskiego i zielonego użyto zarówno do zaznaczania QTLi, jak i regionów o zaburzonej segregacji markerów DArT co jest mylące.
9. Rozdział „Dyskusja” w całości ma nagłówek „Wnioski końcowe”.
10. Str. 89 – początek drugiego akapitu – powtórzone wyrażenie „u pszenicy”.
11. Pozycja bibliografii nr 190: przekreślone zostało nazwisko pierwszego autora (w miejscu cytowania jest poprawne) a ponadto, jeśli nazwa czasopisma nie ma wersji skrótowej wykazanej na oficjalnej liście skrótów nazw czasopism należy pisać ją w całości (dotyczy

też np. pozycji 235). Również niektóre inne skróty nazw czasopism w wykazie bibliografii nie są zgodne ze wspomnianym wykazem

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim w Artykule 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Ewy Ciszkowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Marcin Rapacz