

Kraków, 29 listopada 2018

Prof. dr hab. Marcin Rapacz

Katedra Fizjologii Roślin

Uniwersytet Rolniczy *im. Hugona Kollątaja* w Krakowie

ul. Podłużna 3, 30-239 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Mgr Mateusza Dydy pt. „Lokalizacja regionów QTL związanych z odpornością/tolerancją pszenżyta (*xTriticosecale* Wittm) na porażenie mączniakiem prawdziwym (*Blumeria graminis*)”

Tematyka rozprawy. Rozprawa doktorska Pana Mateusza Dydy obejmuje ważne gospodarczo zagadnienie jakim jest odporność pszenżyta na porażenie mączniakiem prawdziwym. Pszenżyto jest syntetycznym gatunkiem zboża, uprawianym bardzo krótko i przez lata uważanym za odporne na wiele patogenów. W ostatnim okresie areał uprawy pszenżyta wzrasta zarówno w Europie, jak i w Kanadzie, czy Australii. Niestety zboże to jest coraz intensywniej infekowane przez mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* (DC.) Speer). Wymusza to wzrost użycia fungicydów zwiększając koszty produkcji i obciążenie środowiska. Wzrost podatności pszenżyta na infekcję mączniakiem związany jest z pojawieniem się nowych ras patogena. Aby sprostać rosnącemu problemowi porażenia mączniakiem wyjściem najkorzystniejszym ekonomicznie i przyjaznym dla środowiska jest uprawa odmian odpornych. Wyhodowanie takich odmian, szczególnie w przypadku pszenżyta nie jest proste. Nawet jeśli znajdziemy źródła odporności (genotypy, w szczególnych przypadkach odmiany) to należy wziąć pod uwagę, że obecnie uprawiane heksaploidalne pszenżyto, które gromadzi ważne cechy pochodzące zarówno z puli genetycznej pszenicy i żyta charakteryzuje się niestabilnym genomem. Sprawia to, że cecha fenotypowa zmieniać może się w kolejnych pokoleniach, a wykorzystywanie selekcji wspomaganej markerami, czy selekcji genomowej w hodowli nowych odmian może nie być do końca skuteczne. Wspominana przez doktoranta we wprowadzeniu piramidyżacja genów odporności jest więc u pszenżyta niesłychanie trudna. Reasumując Doktorant podjął się w pracy bardzo ciężkiego zadania i, przyznać trzeba, wywiązał się z niego najlepiej jak to było możliwe.

Ogólna charakterystyka rozprawy. Przedstawiona rozprawa doktorska jest bardzo obszerna. Liczy 159 stron tekstu, 12 stron suplementu i dodatkowo dwie tabele uzupełniające pokazujące segregację wszystkich badanych markerów w obydwu populacjach mapujących dostępne jedynie w formie elektronicznej. W pracy umieszczono 25 rycin (histogramy danych fenotypowych oraz mapy QTL) i 21 tabel (w większości dane dotyczące QTL). Taki sposób prezentacji wyników uznać należy za bardzo dokładny, i szczegółowy. Prawdę powiedziawszy za zbyt szczegółowy. To analityczne podejście gubi możliwość łatwej syntezy przez czytelnika uzyskanych wyników. Syntezy tej wprowadzie dokonano w pracy podczas opisywania wyników, w dyskusji i we wnioskach, ale przy czytaniu pracy nie można oprzeć się wrażeniu, że jest ona przynajmniej w części subiektywna (dokonano jej przez porównywanie map i QTLi). Po dogłębnej analizie wyników należy uznać, że Doktorant zsyntetyzował wyniki szczegółowe w poprawny sposób. Przy czym moja opinia jest tu również po części subiektywna, gdyż nie odwołuje się do analiz statystycznych. Zastosowane przez Doktoranta podejście nie jest dużym błędem w pracy doktorskiej, ale na pewno utrudni dobrą publikację jej wyników.

We wstępie doktorant scharakteryzował w sposób wyczerpujący zagadnienie poruszane w rozprawie. Bardzo dokładnie i w sposób kompetentny opisał mączniaka prawdziwego oraz pszenżyto. Scharakteryzował mechanizmy interakcji roślina – patogen oraz genetyczne podłoże odporności/tolerancji pszenicy i żyta na mączniaka prawdziwego. Opisane zostało też wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli zbóż.

Głównym **celem pracy** było poszukiwanie rejonów genomu pszenżyta związanych z odpornością/tolerancją na mączniaka prawdziwego i wskazanie potencjalnych jej markerów molekularnych. Jako szczegółowe cele pracy zdefiniowano:

1. Skonstruowanie wysoko wysyczonej mapy genetycznej populacji 168 linii DH pszenżyta ozimego „Grenado × Zorro” w oparciu o markery DArT, DArTseq i SNP w celu stworzenia wysokorozdzielczej platformy do poszukiwania QTL.
2. Lokalizacja rejonów QTL określających obszar genomu kodujący stopień porażenia mączniakiem prawdziwym u pszenżyta w oparciu o dane fenotypowe u dwóch populacji mapujących linii DH pszenżyta ozimego „Hewo × Magnat” (dostępna wcześniej mapa dla populacji 89 linii DH) i „Grenado × Zorro”.
3. Wskazanie stabilnych w różnych środowiskach i latach oraz w różnym tle genetycznym, a więc użytecznych w selekcji, markerów odporności lub tolerancji na infekcję pszenżyta mączniakiem prawdziwym.

Powyższy sposób sformułowania celów pozwala ściśle określić zakres wykonanych prac. Wydaje się jednak, że bardziej odpowiednie byłoby opisanie celów szczegółowych jako zestawu hipotez roboczych (np. „Weryfikacja hipotezy, że markery tolerancji związane są z fenotypem zależnie od środowiska i podłoża genetycznego, jednak niektóre z nich wykazywać mogą opisywać fenotyp w sposób częściowo niezależny od wyżej wymienionych czynników dzięki czemu mogą być użyte w hodowli pszenżyta”).

Materialy i metodyka. Zastosowana w pracy metodyka nie budzi większych zastrzeżeń. Jej niewątpliwą silną stroną jest przebadanie dwóch populacji mapujących. Użycie populacji linii DH, z czego osoby bliższe praktyce hodowlanej nie do końca zdają sobie sprawę, może budzić pewne kontrowersje ze względu na zawężanie zakresu naturalnej zmienności do subpopulacji podatnych na generowanie linii DH. Jednakże w badaniach mających służyć hodowli roślin nie ma to aż takiego znaczenia i może być nawet uznane za mocną stronę, jeśli wybrane markery używane będą do selekcji linii DH.

Obserwacje stopnia porażenia populacji mapujących przeprowadzono w warunkach polowych w trzech lokalizacjach (Choryń, Laski i Modzurów), w trzech sezonach wegetacyjnych - 2012/2013, 2013/2014 i 2014/2015 (nie wszystkie terminy we wszystkich lokalizacjach). Ocenę stopnia porażenia wykonano w oparciu o 9-cio stopniową skalę w terminach uzależnionych od fazy rozwojowej roślin. Problem zróżnicowania genetycznego mączniaka w poszczególnych latach i miejscach prowadzenia doświadczeń nie był w rozprawie podnoszony a może on tłumaczyć bardzo różne wyniki uzyskiwane w poszczególnych latach i lokalizacjach. Szkoda, że nie zdecydowano się na inokulację roślin standaryzowanym zestawem izolatów lub kilkoma odrębnymi izolatami. Takie podejście zwiększyłoby zakres uzyskanej wiedzy podstawowej, ale ponownie, z punktu widzenia hodowli roślin wartościowsze wyniki uzyskuje się obserwując interakcję z naturalnie zmieniającymi się populacjami mączniaka. Tak postąpiono w pracy.

W jednej z lokalizacji, w jednym z sezonów wegetacyjnych przeprowadzono też analizę mikroskopową rozwoju *Blumeria graminis* na pszenżycie. Zagadnienie to jest bardzo interesujące, szkoda, że obserwacji takich nie wykonano równolegle do wszystkich badań stopnia porażenia oraz, że ich wyników nie uwzględniono w dalszych analizach.

Dane fenotypowe stopnia porażenia posłużyły do lokalizacji rejonów QTL związanych z odpornością / tolerancją pszenżyta na porażenie mączniakiem prawdziwym. Analizę rejonów QTL przeprowadzono z pomocą prawidłowych i wystarczających metod: regresji

liniowej (SMA) i złożonego mapowania interwałowego (CIM) wykorzystując program Windows QTLCartographer 2.5.

Wyniki. W pracy uzyskano szereg bardzo interesujących i wartościowych wyników.

W oparciu o genotypowanie populacji mapującej DH „Grenado × Zorro” opracowano mapę genetyczną o całkowitej długości 7527,1 cM, składającą się z 1891 markerów (w tym 326 DArT, 1443 DArTseq i 122 SNP). Mapa ta znajdzie zapewne zastosowanie do analiz innych cech fenotypowych pszenżyta. Dane do mapowania zostały już zresztą wykorzystane do tworzenia mapy konsensusowej w publikacji Tyrka i wsp. 2018, *Molecular Breeding*, 38:46.

W wyniku analizy QTL dla linii populacji DH „Grenado × Zorro” zidentyfikowano 40 rejonów QTL (11 QTL na chromosomach z grupy sprzężeń A, 15 dla grupy B i 14 dla grupy R), wyjaśniających 1,1 - 23,7% zmienności fenotypowej stopnia porażenia mączniakiem. W przypadku populacji „Hewo × Magnat” zidentyfikowano 25 rejonów QTL (8 QTL na chromosomach z grupy sprzężeń A, 7 dla grupy B i 10 dla grupy R) wspólnych dla obserwacji z trzech lokalizacji i trzech sezonów wegetacyjnych, wyjaśniających 2,3 - 30,1% zmienności fenotypowej. W obrębie tych rejonów wytypowano na chromosomach 1A, 5A, 1B, 3B, 4B, 3R i 5R 9 loci wspólnych dla obu populacji mapujących, wyjaśniających od 1,16 do 22,6% zmienności fenotypowej.

Wytypowano 57 markerów molekularnych, które zdaniem autora po dokładnej weryfikacji mogą zostać wykorzystane w selekcji materiałów hodowlanych pszenżyta pod kątem tolerancji / odporności na porażenie mączniakiem prawdziwym. W tym przypadku autor jest nadmiernym optymistą jeśli chodzi o możliwość wykorzystania w hodowli roślin aż 57 markerów dla określenia potencjalnego podłoża genetycznego jedynie jednej cechy fenotypowej. Chodzi tu oczywiście o względy finansowe.

Interesujący jest też wynik porównania map genetycznych nowo-utworzonej mapy genetycznej dla populacji „Grenado × Zorro” z opublikowaną mapą „Hewo × Magnat” wskazujący na obecność translokacji w wielu chromosomach co potwierdza hipotezy o dużej niestabilności genomu pszenżyta.

Dyskusja napisana jest w sposób zwięzły, usystematyzowany i dowodzący znakomitej orientacji w literaturze przedmiotu. Podjęto w niej wszystkie istotne wątki wynikające z uzyskanych wyników. Szczególnie wnikliwie przedyskutowano najciekawszą część uzyskanych wyników, czyli charakterystykę rejonów QTL związanych z odpornością /

tolerancją pszenżyta na porażenie mączniakiem prawdziwym.

W pracy sformulowano siedem wniosków. Wnioski te są na ogół merytorycznie poprawne i znajdują oparcie w wynikach badań doktoranta. Nieco inaczej jest w przypadku dwóch wniosków, które uznać należy za oparte na zbyt spekulatywnym podłożu. Doktorant twierdzi we wniosku 4, że w wytypowanych, wspólnych dla obydwu populacji regionach QTL z dużym prawdopodobieństwem wskazano obecność dotychczas znanych genów odporności na mączniaka prawdziwego, pszenicznych: Pm3a, Pm4b, Pm5, Pm6 i Pm41 i żytnich: Pm3 oraz Pm4. W rzeczywistości stwierdzenie to nie znajduje podstaw w uzyskanych wynikach. Doktorant spekuluje na ten temat w rozdziale dyskusja, spekulacje te wydają się logiczne, lecz bez odpowiednich analiz bioinformatycznych, czy genetycznych pozostają nie posiadającą one rangi wniosku. Podobnie jest w przypadku wniosku numer 5, który odnosi się do zidentyfikowania rejonów QTL, których nie udało się przypisać znanym wcześniej genom.

W rozprawie cytowanych jest 246 pozycji literatury, znaleźć też można odwołania do 6 stron internetowych. Zacytowano wszystkie istotne z punktu widzenia prezentowanych zagadnień pozycje literatury, zarówno te najnowsze, jak i nieco starsze. Świadczy to o dobrej znajomości przez doktoranta literatury przedmiotu.

Zdecydowanie pozytywnie należy ocenić redakcyjną stronę pracy. Praca została napisana w sposób zwięzły i bardzo staranny. Ryciny i tabele są profesjonalnie przygotowane, czytelne i zrozumiałe. Używany język jest poprawnym językiem naukowym.

Ilość drobnych błędów i lapsusów językowych jest mniejsza niż przeciętna w rozprawach doktorskich z zakresu nauk przyrodniczych. Oczywiście można je znaleźć, dla przykładu:

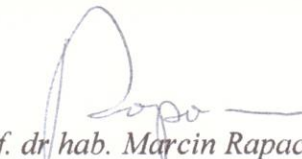
- We wprowadzeniu doktorant pisze, że spontanicznie krzyżowały się izolaty żytnie i pszeniczne mączniaka, podczas gdy pojęcie to zarezerwowane jest dla grzyba hodowanego *in vitro*.
- O ile w tytule rozprawy doktorant poprawnie pisze o mechanizmach tolerancji/odporności to już we wstępie (patrz też tytuły podrozdziałów) i w wielu miejscach rozprawy pojęć tych nie rozdziela i raczej posługuje się nie do końca adekwatnym określeniem „odporność”.
- Formułując cel pracy doktorant wspominał o wskazaniu potencjalnych „markerów alleli odporności” co nie do końca precyzuje co miało być efektem pracy.

- Nazwy odmian pisane są niepoprawnie w cudzysłowach i to zresztą oznaczonych znakami niepoprawnymi w polskiej typografii (poprawne, choć niekonieczne byłoby natomiast użycie cudzysłowu dla określenia populacji mapującej, np. „Grenado × Zorro”).

Podsumowując, dysertację Pana Mateusza Dydy uznać należy za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymaganiem stawianym rozprawom doktorskim. Dość liczne krytyczne uwagi zawarte w recenzji mają w większości charakter dyskusyjny i odmienne zdanie mogą prezentować tu różni specjaliści z dziedziny. Reszta uwag dotyczy spraw mniejszej wagi jak nieprecyzyjne sformułowania, kwestie terminologiczne, czy błędy redakcyjne. Również zarzuty dotyczące nieuprawnionego sformułowania dwóch wniosków nie są krytyczne, gdyż użyte stwierdzenia są prawdopodobnie poprawne, ale wobec braku ścisłej weryfikacji, zbyt spekulatywne, żeby mogły być uznane za wnioski. Powyższe uwagi nie podważają więc wartości uzyskanych wyników i poprawności ich interpretacji.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, że spełnia ona kryteria stawiane w Artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Mateusza Dydy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z tym, że doktorant podjął się bardzo trudnego, praktycznie niewykonalnego zadania i uzyskał przy tym wiele wyników o wysokiej wartości merytorycznej, wykonał ogrom pracy z użyciem całego wachlarza trudnych do opanowania metod oraz wykazał się doskonałą znajomością literatury przedmiotu wnoszę dodatkowo o wyróżnienie rozprawy.



Prof. dr hab. Marcin Rapacz