



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, 09.01.2023

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

Recenzja pracy doktorskiej mgr Moniki Markiewicz
pt.: „Identyfikacja genów związanych z reakcją roślin z rodzaju *Brassica*
na infekcję przez *Plasmodiophora brassicae*”

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Stosowanej Instytutu Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy w Skierniewicach, pod kierunkiem. dr. hab. Małgorzaty Podwyszyńskiej, prof. IO oraz dr hab. Tadeusza Malinowskiego, prof. IO-PIB.

Uzasadnienie wykonania recenzji

Uchwałą 33/2022 Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa < Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach, podjętą w dniu 14 września 2022 r. zostałam powołana na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Moniki Markiewicz, o czym powiadomiono mnie pismem z dnia 18 października 2022 r. podpisanym przez dr Agnieszkę Marasek-Ciołkowską, sekretarza Rady. Recenzja dotyczy monografii pod w/w tytułem.

Podstawa prawna

Działania prowadzono 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).

Finansowanie badań

Praca została wykonana w ramach programu badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanego w latach 2015-2020 przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi podczas realizacji zadania badawczego nr 99 pt. „Badanie molekularnego mechanizmu odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica*”

Struktura pracy – ocena formalna

Pracę rozpoczyna streszczenie oraz jego tłumaczenie na j. angielski (Summary), których treść jest tożsama. Po nich następuje wykaz stosowanych skrótów, krótki wstęp i przegląd literatury, w ramach którego Doktorantka omawia dwa główne zagadnienia: kiłę kapusty – chorobę roślin rodzaju *Brassica* oraz ich odporność. W ramach pierwszego zagadnienia Doktorantka charakteryzuje patogen, opisuje objawy chorobowe, wymienia rośliny żywicielskie, przedstawia źródła infekcji i warunki rozwoju choroby a także skutki jej występowania i sposoby zwalczania. W podrozdziale dotyczącym odporności roślin omówiono molekularne podstawy odporności, wymieniono geny odporności i przedstawiono badania nad molekularnymi podstawami odporności wykonywane w różnych laboratoriach na świecie. Przegląd literatury, obejmuje 25 stron i zawiera trzy ryciny, w tym cykl rozwojowy patogena (rysunek własny na podstawie literatury), schemat reakcji odpornościowych zachodzących w komórkach roślinnych (interpretacja ilustracji z literatury) oraz trójkąt U pokazujący pokrewieństwo genetyczne pomiędzy gatunkami w obrębie rodzaju *Brassica*. W kolejności przedstawiono cel pracy a następnie obszernie opisano materiały i metody badawcze. Materiałem do badań były zarówno wybrane genotypy roślin rodzaju *Brassica* jak też jeden izolat *P. brassicae*. Opisano sposób przygotowania materiału roślinnego i zakażania roślin poprzez dodawanie inokulum do podłoża a także sposób oceny podatności genotypów na podstawie analizy mikroskopowej i molekularnej. W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała metodykę analiz transkryptomicznych, w tym izolację mRNA oraz syntezę i oczyszczanie cDNA. Badania prowadzono następnie metodą AFLP, opisano reakcje PCR, sposób rozdziłu w denaturującym żelu poliakrylamidowym, barwienie i analizę uzyskanych produktów. W kolejnych podrozdziałach opisano sposób walidacji wzoru ekspresji wybranych specyficznych znaczników ekspresji (etykiety EST) i analizy statystyczne oraz sposoby mapowania wybranych sekwencji na genom referencyjny *Brassica rapa* (genom AA).

Rozdział 'Materiały i metody' obejmuje 15 stron, w tym cztery ryciny i sześć tabel. Ryciny przedstawiają skalę oceny odporności oraz schematyczną reprezentację etapów poszczególnych rodzajów analiz, w tym analizy transkryptomów, analizy cDNA-AFLP oraz analizy amplikonów CDNA-AFLP. W tabelach umieszczono: 1) spis i podstawową charakterystykę genotypów *Brassica* wykorzystanych do badań, 2) sekwencje adapterów wykorzystanych do analiz cDNA-AFLP, 3) sekwencje starterów do preselekcyjnych reakcji PCR wykonanych podczas analiz cDNA-AFLP, 4) sekwencje starterów do różnicujących PCR, 4) kombinacje tych starterów, 5) sekwencje starterów do analiz Real-time PCR. Ponadto na stronie 49 przedstawiono formułę matematyczną wg Horiuchi i Hori (1980) z modyfikacją Strelkova i in. (2006), na podstawie której obliczano indeks chorobowy, określany także jako indeks porażenia roślin.

Wyniki opisano szczegółowo w poszczególnych rozdziałach odpowiadających metodom badawczym z podziałem na ocenę podatności genotypów, analizę transkryptomów, analizę ilościową ekspresji tych EST, które wykazywały podobieństwo do genów związanych z reakcją roślin rodzaju *Brassica* na porażenie przez *P. brassicae*. Ponadto zaprezentowano analizę względnej ekspresji EST, mapowanie na genom referencyjny i wybór potencjalnych markerów związanych z odpornością roślin rodzaju *Brassica* na kiłę kapusty. Część wynikowa pracy obejmuje 58 stron. W tym rozdziale umieszczono 55 rysunków i 12 tabel.

Dyskusję podzielono na podrozdziały podsumowujące wyniki uzyskane przez Doktorantkę na poszczególnych etapach pracy, w tym charakterystykę podatności genotypów na kiłę kapusty, analizę transkryptomów, walidację profili ekspresji genów kandydujących, związanych z reakcjami obronnymi, analizę korelacji i funkcjonalną oraz wstępne mapowanie genów kandydujących. Pod koniec dyskusji, na dwóch stronach zwięźle i przejrzystie podsumowano całość przemyśleń na temat wyników własnych na tle literatury światowej. Dyskusja obejmuje 24 strony, w tym dwie ilustracje podsumowujące. Pierwsza z nich przedstawia schemat sieci sygnałnej zachodzącej w czasie reakcji odpornościowych roślin rodzaju *Brassica* podczas ich porażenia *P. brassicae*, przy czym ilustracja inspirowana jest literaturą i wynikami badań własnych. Na drugiej ilustracji przedstawiono uproszczony schemat reakcji odpornościowych roślin, w których biorą udział geny zidentyfikowane w wyniku analiz transkryptomów a które Doktorantka zidentyfikowała jako ulegające zróżnicowanej ekspresji. Na rysunku oznaczono geny kandydujące, które mogą stanowić potencjalne markery funkcjonalne odporności *Brassica* na kiłę kapusty. Do utworzenia ilustracji wykorzystano schemat z literatury, zmodyfikowany i dostosowany do badań własnych. Na podstawie wyników tych badań Doktorantka wysnuła pięć wniosków.

Spis literatury jest bardzo obszerny i obejmuje 405 pozycji, w tym jedno odniesienie do strony internetowej. Większość prac jest anglojęzycznych. Autorka cytuje czasem artykuły z prasy branżowej, czego powinno się unikać. Ogółem w pracy znajdują się 64 rysunki i 18 tabel, których spis umieszczono w końcowej części manografii. Praca liczy 189 stron.

Reasumując, pod względem formalnym monografię opracowano poprawnie, jej struktura jest właściwa dla prac doktorskich. Praca przygotowana jest starannie, ma wszystkie niezbędne części, przedstawione we właściwej kolejności. Ilustracje i tabele są prawidłowo przygotowane, opisane i skatalogowane. Pod względem formalnym nie wnoszę uwag.

Tematyka badawcza

Praca dotyczy niezwykle ważnej z gospodarczego punktu widzenia choroby rzepaku, powodującej znaczne straty plonu oraz zdecydowane i wieloletnie pogorszenie stanowiska rolniczego – gleby w gospodarstwie rolnym i ogrodnictwie – trudne do usunięcia i skutkujące wieloletnią niezdolnością do pełnego użytkowania. Dyrektywa Komisji Europejskiej nakłada na wszystkie państwa członkowskie obowiązek powiększania w gospodarce narodowej zużycia źródeł energii odnawialnej. Rzepak, będący ważną rośliną kapustowatą, uprawianą w Polsce na około 0,9 mln hektarów, stanowi ważny składnik tego podejścia. Znaczenie roślin rodzaju *Brassica* dla gospodarki naszego kraju to efekt postępu w pracach badawczych i hodowlanych. Znaczący udział roślin kapustowatych w strukturze uprawy stanowi wielką przeciwwagę dla upraw zbóż i powoduje przerwanie lub osłabienie rozwoju patogenów tych upraw. W ogrodnictwie rola roślin kapustowatych, stanowiących podstawę wielu tradycyjnych potraw kuchni polskiej jest trudna do przecenienia, nawet w obliczu dostępności wielu nowych, czasem egzotycznych warzyw. Z tych względów utrzymanie znacznego areálu uprawy roślin kapustowatych jest nadal niezwykle istotne z gospodarczego punktu widzenia. Z drugiej strony należy jednak zawsze pamiętać o prawidłowym udziale tych roślin w płodozmianie, tak by zachować bezpieczeństwo i maksymalną zdrowotność roślin i unikać środków chemicznych służących do ograniczania choroby.

W ostatnich kilkunastu latach w Polsce obserwuje się narastanie porażenia roślin rodzaju *Brassica* przez patogeny gatunku *Plasmodiophora brassicae*. Jest to mikroorganizm należący do infrakrólestwa Rhizaria, będący pasożytem bezwzględny, rozwijającym się tylko w korzeniach żywych roślin z rodziny kapustowatych, podatnych na chorobę. Co prawda infekcja pierwotna dotyczy wielu gatunków i rodzajów roślin, lecz infekcję wtórną – zasadniczo wpływającą na rozwój i plonowanie roślin, stwierdzono wyłącznie u roślin

kapustowatych. Mikroorganizm wywołujący kiłę kapusty jest potencjalnym patogenem ponad 330 rodzajów i 3700 gatunków roślin z rodziny kapustowatych. Prawdopodobnie chrzan pospolity jest jedyną rośliną, na której nie stwierdzono objawów kiły. Rodzaj *Brassica* jest jednym z najważniejszych w rodzinie Brassicaceae i z uwagi na wspomniane wcześniej ogromne znaczenie gospodarcze zarówno dla ogrodnictwa (warzywnictwa) jak też rolnictwa, stanowi przedmiot wielu badań naukowych i intensywnych prac hodowlanych. W znacznej mierze interesuje też władze zajmujące się polityką rolną. Rośliny kapustowate są ważnym składnikiem bezpieczeństwa żywnościowego kraju, w tym dostępności olejów roślinnych do celów spożywczych i technicznych, wysokoenergetycznych pasz dla zwierząt i warzyw nadających się do spożywania na świeżo i wygodnych w przechowywaniu, zawierających cenne witaminy, minerały i wiele substancji prozdrowotnych przydatnych w fitoterapii.

Dbłość o środowisko stanowi obecnie jeden z priorytetów stojących w sprzeczności z dotychczasową chemizacją rolnictwa. W tym aspekcie kiła kapusty to choroba, która jest przykładem umiejętnego wykorzystania wiedzy na temat genetycznej odporności roślin. W przyrodzie zidentyfikowano liczne geny odporności i QTLy występujące w genomach A, B i C roślin kapustowatych wskazanych w trójkącie U. Umiejętne wykorzystanie tej wiedzy przynosi już pierwsze wielkie korzyści w uprawie roślin warzywnych i rolniczych należących do rodzaju *Brassica*. W tym aspekcie praca Doktorantki bardzo dobrze wpisuje się w nowoczesny trend hodowli roślin uprawnych bazujący na odporności genetycznej.

Zgodnie z deklaracją Doktorantki celem badań jest pogłębienie wiedzy na temat molekularnych mechanizmów odporności roślin na kiłę kapusty. Doktorantka analizuje w swojej pracy transkryptomy roślin zdrowych i zainfekowanych *P. brassicae*, identyfikuje geny, których ekspresja uległa zmianie podczas infekcji, zwłaszcza te które ulegają nadekspresji w roślinach odpornych, ustala funkcję tych genów i poszukuje funkcjonalnych markerów odporności na kiłę kapusty.

Tematyka badawcza poruszana w pracy wchodzi w zakres ważnych badań podstawowych, których celem jest wyjaśnianie mechanizmów odporności roślin rodzaju *Brassica* na kiłę kapusty - chorobę bardzo ważną z gospodarczego punktu widzenia. W tle tych badań jest jednak także istotny aspekt aplikacyjny, którym jest opracowanie markerów funkcjonalnych odporności roślin do wykorzystania w pracach selekcyjnych. Badania są istotne, z naciskiem na zdobycie nowej wiedzy i na aspekt teoretyczny, a zatem stanowią podstawę do uzyskania stopnia doktora nauk w dziedzinie 'rolnictwo i ogrodnictwo'.

Merytoryczna ocena pracy

Streszczenie / Summary

Streszczenie pracy napisano obszernie (3 ¼ strony) lecz w sposób bardzo konkretny; skrótowo są w nim zawarte wszystkie części pracy. Wyniki i wnioski stanowią większą część streszczenia (2 ¼ strony). Wersja angielska odpowiada wersji polskiej.

Wykaz stosowanych skrótów

W spisie zawarto 113 ważnych skrótów nazw chemicznych związków oraz procesów opisywanych w pracy. Niekonsekwencja Doktorantki polega na braku objaśnień angielskich we wszystkich miejscach, w których skrót pochodzi od angielskiej nazwy np. JA (*jasmonic acid*), GSNO (*S-Nitroso-L-glutathione*). Do zastanowienia czy warto byłoby podać nazwy wg kodów IUPAC (np. (2S)-2-Amino-5-({(2R)-1-[(carboxymethyl)amino]-3-(nitrososulfanyl)-1-oxopropan-2-yl}amino)-5-oxopentanoic acid dla GSNO); nazwy te są zwykle bardzo skomplikowane i trudne do wymówienia, ale odpowiadają respektowanemu kodowi Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC). Kod PIN zapewnia unikalną i jednoznaczną nazwę dla danej cząsteczki na podstawie wytycznych IUPAC dotyczących nomenklatury. Zapewne jednak w pracy o charakterze genetycznym dostosowywanie się do stosowania nazw IUPAC w tekście jest zbędne, a i wykaz skrótów straciłby na czytelności.

Przegląd literatury

Przegląd literatury podzielony jest na czytelne podrozdziały i wskazuje na bardzo dobrą znajomość poruszanego w pracy zagadnienia. Rozdział ten napisany jest czytelnie i zilustrowany trzema rycinami opartymi na literaturze naukowej w tym dwoma z istotnymi modyfikacjami własnymi Autorki. W odniesieniu do tego rozdziału mam poniższe uwagi.

Przynależność systematyczna badanego patogena to skomplikowana materia, wymagająca moim zdaniem znacznie obszerniejszego wyjaśnienia aniżeli przedstawiono to w niniejszej monografii doktorskiej na str. 20. Do pierwotniaków/protistów w poszczególnych systemach taksonomicznych zaliczano różne grupy organizmów a ich przynależność przez lata zmieniała się. Tradycyjnie pierwotniaki były rozumiane jako jednokomórkowe bezkręgowce i dzielono je głównie na podstawie kryteriów morfologicznych. Nie zawsze stanowiły takson, lecz często grupę umowną o różnej randze. W ostatnio stosowanych systemach rezygnujących z klasycznego podziału na rangi taksonomiczne grupa odpowiadająca pierwotniakom nie jest wyróżniana, a ich przedstawiciele są łączeni w infrakrólestwa, supergrupy i kłady obejmujące również organizmy inne niż pierwotniaki. Organizmy tradycyjnie zaliczane do pierwotniaków /

protistów, zawierały Rhizopoda (korzenionózki). W 2001 Cavalier-Smith włączył *P. brassicae* do Cercozoa – utworzonego przez siebie typu/gromady (*phylum*) pierwotniaków. System ten podchwycili Ruggiero i in. (2015), lecz sam Cavalier-Smith w 2018 roku wydzielił kolejną gromadę Retaria i tam przypisał *P. brassicae* (Cavalier-Smith, T., Chao, E.E. & Lewis, R. 2018. Multigene phylogeny and cell evolution of chromist infrakingdom Rhizaria: contrasting cell organisation of sister phyla Cercozoa and Retaria. *Protoplasma* 255, 1517–1574). W kolejnych klasyfikacjach (Burki i Keeling, 2014, Schwelm i in. 2015) infrakrólestwo Rhizaria wraz z dwoma innymi zebrano w supergrupę S-A-R, do której należą Stramenopiles, Alveolata i Rhizaria. Przy tak dawno powstałych mikroorganizmach jak plasmodiophoridy tradycyjne podejście taksonomiczne nie jest wystarczające. Uprzejmie proszę Doktorantkę o obszerniejszy komentarz na ten temat, zwłaszcza w obliczu niezwykłości genetycznej obserwowanej w podziale jądra u tej grupy patogenów, nazwanym podziałem krzyżowym. Przybliżenie tej kwestii jest niezwykle ważnym elementem zrozumienia zgłębianego zagadnienia, by dokładnie poznać patogen, którego badaniom poświęcona jest praca doktorska.

Drugim zagadnieniem, o którego przybliżenie proszę Doktorantkę jest kwestia patotypów *P. brassicae*. W pracy doktorskiej na stronie 21 przedstawiono głównie klasyfikację wg Williamsa (1966), pomijając inne metody klasyfikacji, elementy tych opisów pojawiają się dopiero w później przedstawionych fragmentach pracy. By nie wydłużać prezentacji merytorycznej poproszę o uzupełnienie wiedzy uczestników publicznej obrony pracy doktorskiej podczas odpowiedzi na pytania recenzentów.

Proszę także o szerszy komentarz na temat zwalczania patogena przy pomocy roślin ‘pułapkowych’ czego zwolennikiem był zespół z Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Czy w opinii Doktorantki zasadne jest wykorzystanie odpornych odmian rzodkwi oleistej do zwalczania *P. brassicae*? Czy i w jakim zakresie w produkcji ogrodniczej i rolniczej ma uzasadnienie fumigacja gleby? W Kanadzie stosowany jest do tego celu Vapam, N-metylo dwuthiokarmabinian sodu/sól sodowa metamu; czy korzyści z usunięcia patogena z gleby tłumaczą zastosowanie tej szkodliwej substancji i są uzasadnione i mogłyby wspomóc walkę z patogenem, którego szkodliwość jest tak duża a trwałość zarodników przetrwalnikowych i ich odporność na warunki środowiskowe jest znaczna.

Bardzo obszerny spis genów odporności przedstawiony na stronach 38-42 jest godny pochwały. Doktorantka przeczytała i omówiła w tym względzie dostępną literaturę, także najnowszą obejmującą rok 2021. W tekście wymieniono geny opisywane w poszczególnych publikacjach, jednak niektóre z nich u różnych autorów mają odmienne kody. Celowym

byłoby zapoznanie się z obecną klasyfikacją polecaną przez ‘International initiative on the nomenclature and curation of clubroot resistance loci’ kierowaną przez Dr Elke Diederichsen z Freie Universität Berlin-Dahlem w Niemczech. Jest to grupa inicjatywna, której celem jest sklasyfikowanie znanych genów odporności na kiłę kapusty i uporządkowanie chaotycznego nazewnictwa tych genów w jeden spójny system. Jeśli dalsza praca naukowa Doktorantki będzie podążała w tym samym kierunku to usystematyzowana i zaktualizowana wiedza w zakresie klasyfikacji genów odporności będzie bardzo pożądana.

Cel badań

Jako cel badań Doktorantka przedstawiła poszerzenie wiedzy w zakresie molekularnych mechanizmów odporności na kiłę kapusty oraz podała pięć celów szczegółowych precyzujących zakres pogłębianej wiedzy. Zabrakło hipotezy badawczej, którą naukowiec przyjmuje, a następnie potwierdza całkowicie / częściowo lub obala. Hipoteza badawcza wskazuje założenia, które posiada się przed przystąpieniem do badań. Czy takie założenie przyjęto czy też nie, a jeśli przyjęto to co stanowiło potwierdzenie hipotezy a co było największym zaskoczeniem i nieoczekiwanym wynikiem prowadzonych badań?

Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiło 11 genotypów *Brassica*, przy czym na wstępie Autorka informuje, że było ich osiem i powołuje się na tabelę 1, gdzie wymieniono 11 genotypów. Standard podatności *B. rapa* ‘Granaat’ i inne odmiany np. *B. napus* ‘Laurentian’ także stanowiły badany materiał roślinny. Niespójność pierwszego zdania w rozdziale ‘Material i metody’ (str. 47) powinna być skorygowana podczas publicznej obrony pracy doktorskiej. Do inokulacji wykorzystano jeden patotyp *P. brassicae*, scharakteryzowany w systemie Williamsa (1966) jako Pb2. Zgodnie z nowymi systemami oceny, w tym opisanym w 2018 r. przez Strelkova i współpracowników, przynależność do patotypu Pb2 jest opisem mało precyzyjnym jak na obecną wiedzę. Autorka mogła się pokusić o bardziej szczegółowy opis patotypu, oparty na czterech międzynarodowych systemach oceny, a nie tylko na jednym. Badania te można uzupełnić, by w publikacjach opracowywanych na podstawie pracy doktorskiej opis ten był już bardziej precyzyjny. Zastosowane stężenie patogena wynoszące 1×10^8 zarodników w 1 mL inokulum było bardzo wysokie. Zazwyczaj w badaniach odpornościowych stosowane jest $10 \times$ niższe stężenie patogena, by jego zbyt duże stężenie nie wpłynęło negatywnie na reakcje obronne rośliny. Ponieważ jednak w naturze tak znaczące stężenia się zdarzają, takie podejście jest dopuszczalne i zapewne stosowane było w zespole przez szereg lat z uwagi na znaczną dostępność patogena z pola testowego IO-PIB. Skąd

patogen ten oryginalnie pochodzi? Czy pierwotnie pozyskano go w Polsce? Jeśli tak to gdzie i kiedy? Tę informację proszę uzupełnić podczas publicznej obrony pracy doktorskiej. Na jakiej podstawie wyznaczono terminy 10, 20 i 35 dpi? Dlaczego nie 7, 14, 21, 28 dpi? Wyjaśnienie arbitralnie wybranych terminów powinno się znaleźć w tekście pracy.

Metody zastosowane w pracy szczegółowo przedstawiono w poszczególnych rozdziałach wymienionych powyżej w opisie formalnej części pracy. Protokoły do analiz cDNA-AFLP i łączenia z adapterami zostały pokrótce opisane, a nie tylko wymienione, co ułatwia śledzenie procedury badawczej. Jest to także ułatwione przez proste ale bardzo pomocne schematy. Wszystkie startery i ich kombinacje uporządkowano w tabelach. Podano na jakiej zasadzie wybierano amplikony, choć przydałby się przykład przedstawiający intensywność wybieranych i nie wybieranych produktów. Są to dane mierzalne, można się było pokusić o podanie zakresu, z którego produktów nie wybierano. Z pewnością pominięto w związku z tym produkty ważne z punktu widzenia odporności, choć powstałe w mniejszej ilości. Jaki jest zdaniem Doktorantki orientacyjny procent produktów, które mogłyby mieć znaczenie, a które pominięto? Oczywiście w pełni rozumiem, że w badaniach, w których uzyskano kilkanaście tysięcy amplikonów nie było ani fizycznych możliwości ani potrzeby by się skupić na wszystkim. Jak wytypowano gen referencyjny? Czy gen aktyny wybrano arbitralnie? Czasami dla każdej fazy rozwoju choroby i genotypu referencyjny może być inny gen. Wyznaczono krzywe topnienia i zoptymalizowano reakcje qPCR co jest postępowaniem właściwym i niezbędnym w tego typu analizach. Wyniki analiz biologicznych zazwyczaj można interpretować dopiero po zastosowaniu obliczeń statystycznych i tak Autorka postąpiła. Wykorzystanie programu CLC do mapowania sekwencji w genomie referencyjnym jest postępowaniem właściwym; tak samo jest z przypisywaniem funkcji białek z zastosowaniem bazy *geneontology.org*.

Metody zastosowane w części doświadczalnej były w pełni właściwe. Nie mam zastrzeżeń względem wybranych metodyk. Jest to ważne, bowiem wyniki oparte na niewłaściwych metodach nie byłyby prawidłowe; to jednak nie dotyczy niniejszej pracy.

Wyniki

Odmiana rzepaku Mendel F1 firmy hodowlanej Norddeutsche Pflanzenzucht założonej przez Hansa-Georga Lembke i skomercjalizowanej przez firmę Rapool, to pierwsza w świecie odmiana rzepaku odporna na kiłę kapusty. W badaniach Doktorantki odmiana ta charakteryzowała się indeksem porażenia przekraczającym 20%. Skąd taki wynik? Czy było to związane z rozszczepianiem się cechy odporności w odmianie mieszańcowej (np. podatny zapylacz) czy też słabym porażeniem wszystkich roślin? Z ilustracji na rysunku 9 wynika, iż

cecha odporności ulegała rozszczepieniu i badany materiał roślinny nie był jednolity pod względem odporności na kiłę kapusty. Jeśli tak, to które rośliny wzięto do kolejnych analiz? Czy była to mieszanina roślin odpornych i podatnych?

Z analizy 256 par starterów AFLP uzyskano ponad 12500 amplikonów a wynik zależał od genotypu i wahał się od 37,6% do 48,2% EST z nadekspresją i 31,8% do 42,4% EST z wyciszeniem. Średni procent produktów występujących zarówno u roślin porażonych jak i kontrolnych wynosił 19,4%; EST z nadekspresją było jedynie o 3,5% więcej aniżeli EST z wyciszeniem. Rycina 10 wskazuje na różnice między genotypami. W tej puli 150 amplikonów zawsze ulegało nadekspresji bądź wyciszeniu i nie było ich w grupie roślin kontrolnych. Te właśnie amplikony wybrano do dalszych analiz. Z tej puli dla 69,3% EST wykazano podobieństwo do genów kodujących białka związane z regulacją ekspresji genów, reakcjami odpornościowymi, transportem komórkowym, budową cytoszkieletu, transdukcją sygnałną, regulacjami cyklu komórkowego i potranslacyjnymi modyfikacjami białek. W badanej grupie białek znajdowały się także takie, których funkcji nie poznano (8%) oraz niepodobne do żadnej z sekwencji genów zdeponowanych w bazie NCBI (18,7%). Czy będą stanowiły przedmiot dalszych badań? Mogą one pełnić istotną rolę i wyróżniać rośliny kapustowate. Czy mogą być to amplikony uzyskane z patogena, a nie z rośliny?

Wyciszeniu uległo najwięcej genów związanych z regulacją ekspresji genów a następnie geny o nieznannej sekwencji lub funkcji (grupa 'inne'). Najwięcej genów ulegających nadekspresji stwierdzono w grupie związanej z reakcjami odpornościowymi oraz regulacją ekspresji. Z reakcjami odpornościowymi związane było 21 białek, w tym pięć z domeną TIR-NBS-LRR, związanych z reakcją nadwrażliwości (HR) i indukowaniem programowanej śmierci komórki (PCD). W przypadku wszystkich genów kodujących białka odpornościowe z domeną TIR-NBS-LRR obserwowano bardzo niski poziom ekspresji tych genów u genotypów podatnych na kiłę kapusty. Ponadto w grupie białek związanych z reakcjami odpornościowymi stwierdzono kinazy serynowo-treoninowe, enzymy zaangażowane w obronę komórek roślinnych przed stresem oksydacyjnym i kilka innych ważnych białek. Przykładem tych ostatnich jest białko z domeną SNARE, biorące udział w syntezie metabolitów wtórnych działających przeciwdrobnoustrojowo i owadobójczo. W licznych i dobrze uporządkowanych tabelach Doktorantka wymienia poszczególne białka i ich funkcje, z podziałem na 10 grup wymienionych na stronie 79. Autorka zanalizowała względny poziom ekspresji poszczególnych genów w materiałach roślinnych ośmiu genotypów opisanych w rozdziale o materiale roślinnym. Schematy opisów i wykresów są bardzo podobne co ułatwia poruszanie się czytelnika w tak obszernym materiale.

Wizualizacja zmian poziomu ekspresji pokazana jest także w skali barwnej na mapach cieplnych (rycina 58, str. 114). Dlaczego na rysunku 58 dominuje kolor zielony, skoro stwierdzono więcej przypadków wzrostu ekspresji genów w wyniku infekcji roślin przez *P. brassicae* co zaznaczano kolorem czerwonym? Jedynie 3 EST wykazywały dodatnią korelację między ekspresją analizowanych genów a stopniem porażenia, pozostałe EST cechowała negatywna korelacja, spadek wskaźnika DI czyli wzrost odporności rośliny związany był ze wzrostem ekspresji tych genów. W badanym zestawie 28 genów korelowało bardzo wysoko (>0,7) lub wysoko (0,6-0,7) negatywnie lub bardzo wysoko dodatnio (>0,7) z wartościami DI. Współczynniki korelacji Pearsona przedstawiono w skali barwnej na rysunkach 59-61. Rycina 62 jest nieczytelna, a można ją było znacznie uprościć.

Pomimo ogromu opisywanych białek monografia doktorska nie straciła na przejrzystości. Rozdział Wyniki jest obszerny lecz opisany systematycznie według tego samego schematu a wszystkie dane są rzetelnie objaśnione. Wymienione wyżej potknięcia edytorskie powinny być skorygowane podczas przygotowywania manuskryptu do druku.

Dyskusja

Dyskusja wyników podzielona jest na podrozdziały opisane powyżej, podczas omawiania formalnej części pracy. Rozdział ten nie powtarza części wstępu a podsumowanie wyników łączy z rzeczywistą ich dyskusją z danymi opisanymi w literaturze. Doktorantka przygotowała także podsumowanie w formie schematu (rysunek 63, str. 124). Autorka wymienia poszczególne grupy genów ulegające nadekspresji i wyciszeniu i komentuje ich obecność w procesie patogenezы w układzie *Brassica/Plasmodiophora brassicae*.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wysnuła pięć ogólnych wniosków. Wniosek pierwszy, o potwierdzeniu przełamывania odporności na kiłę kapusty przez nowe patotypy uważam za mało uzasadniony badaniami własnymi. Autorka stosowała tylko jeden patotyp Pb2 oznaczony w systemie Williama (1966) i nie opisała jego przynależności bardziej szczegółowo. Wniosek ten opiera się na porównaniu wyników własnych do literaturowych i jak rozumiem bazuje głównie na rozszczepianiu się cechy odporności u *B. napus* odm. Mendel F1. Wniosek ten z pracy wynika pośrednio i jest zbędny. Wniosek drugi, trzeci i czwarty są konkretne i wynikają z wykonanej pracy. Podsumowujący wniosek piąty zawiera nadzieję na wykorzystanie wyników projektu w przyszłości do celów aplikacyjnych. Czy rzeczywiście jest to realne oczekiwanie? Uprzejmie proszę Doktorantkę o opinię, które geny kandydackie są silnie związane wyłącznie z odpornością *Brassica* na kiłę kapusty i będą mogły służyć jako markery selekcyjne w hodowli odpornościowej?

Podsumowanie

Praca doktorska pani mgr Moniki Markowskiej znakomicie poszerza naszą wiedzę na temat puli genów *Brassica* ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem infekcji przez *Plasmodiophora brassicae*, groźny patogen wywołujący kiłę kapusty. Forma pracy jest prawidłowa, wszystkie elementy pracy charakterystyczne dla monografii doktorskiej zostały zawarte w monografii. W pracy rzadko pojawia się żargon naukowy i kalki językowe (np. kontaminowane podłoże, str. 48). Bardzo ujmujące są podziękowania złożone opiekunom naukowym oraz kolegom i koleżankom z dwóch zakładów naukowych IO-PIB; wykonanie części analiz we współpracy lub wręcz przez kolegów w niczym nie ujmuje pracy i jest przykładem uczciwego podejścia i uhonorowania pomocnych osób.

Dorobek Doktorantki

Opracowanie zawiera opis dorobku naukowego Doktorantki z podziałem na publikacje z wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych zgodnie z komunikatem Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. z podaniem współczynnika wpływu Impact Factor oraz punktacji. Na liście tej jest aż 5 prac z punktacją 140 pkt i IF wynoszącym trzykrotnie 4,556 (International Journal of Molecular Sciences), w których doktorantka jest drugą autorką, a także IF 4,046 (Soil Applied Ecology, trzeci autor) oraz IF 3,463 (Scientia Horticulturae, pierwszy autor). Ponadto Doktorantka jest współautorką czterech prac ocenianych na 100 pkt., w tym IF 3,417 (Agronomy, trzeci autor), dwóch prac z IF 1,907 (European Journal of Plant Pathology, pierwszy i drugi autor), IF 1,760 (Experimental and Applied Acarology, drugi autor). W spisie umieszczono także prace z punktacją 70, 40 i 5 punktów oraz bez IF i punktacji. Wymienione powyżej prace opublikowano w latach 2015-2022, wszystkie są wieloautorskie, w dwóch Doktorantka jest pierwszą autorką. Pani mgr Monika Markiewicz jest też współautorką dwóch prac popularnonaukowych, wygłosiła dwie prezentacje ustne na konferencjach krajowych i była współautorką aż 30 plakatów, w tym 16 z pierwszym autorstwem. Uczestnictwo Doktorantki w wielu projektach naukowych o zróżnicowanej tematyce wskazuje na wszechstronność jej zaangażowania, umiejętności i znajomości zagadnień badawczych. W tematyce projektów przez nią realizowanych jest technologia produkcji sadzonek rabarbaru, badanie mechanizmów molekularnych biosyntezy metabolitów roślinnych oraz odporności warzyw i owoców na patogeny czy indukowanie zmienności genetycznej jabłoni. W projekcie dla młodych naukowców IO-PIB dotyczącym poszukiwania markerów odporności u wybranych gatunków roślin sadowniczych i warzywniczych w tym

w projekcie z wykorzystaniem metody sekwencjonowania nowej generacji NGS – Doktorantka była kierownikiem. Ponadto w latach 2015-2020 kierowała zadaniem badawczym 99 w projekcie Postęp Biologiczny, w wyniku którego powstała niniejsza praca doktorska.

W 2017 r. Doktorantkę wyróżniono za prezentację najbardziej interesujących wyników prac genetycznych na konferencji w Wielkiej Brytanii (praca dwuautorska). Ponadto Doktorantka prowadziła prace naukowo-wdrożeniowe i popularyzatorskie.

Na podstawie wykonanej pracy doktorskiej przedstawionej w monografii pt.: „Identyfikacja genów związanych z reakcją roślin z rodzaju *Brassica* na infekcję przez *Plasmodiophora brassicae*” oraz dorobku naukowego Autorki wnioskuję, że jest ona dojrzałą, wszechstronną i wysoko wykwalifikowaną badaczką o dobrej znajomości licznych zaawansowanych technik molekularnych, badań prowadzonych metodami *in vitro* oraz klasycznych technik stosowanych w fitopatologii.

Wniosek końcowy

Monografia doktorska pani mgr Moniki Markiewicz stanowi ważny wkład w poznanie genów uczestniczących w mechanizmach odporności roślin rodzaju *Brassica* na kiłę kapusty. Doktorantka podjęła się trudu wyjaśnienia trudnego i złożonego zagadnienia odporności ośmiu genotypów *Brassica* na porażenie przez *P. brassicae*. Jest to stary ewolucyjnie patogen, który przystosował się do porażania roślin kapustowatych, a cały jego cykl życiowy nastawiony jest na wieloletnie przetrwanie niesprzyjających warunków w glebie, by móc ponownie zainfekować roślinę żywicielską. Tematyka pracy wpisuje się w badania podstawowe dla potrzeb hodowli odpornościowej, a zatem ważnej problematyki badawczej. Pracę wykonano pieczołowicie, przy zastosowaniu wielu metod molekularnych, bioinformatycznych i statystycznych. Warsztat badawczy Doktorantki jest nowoczesny i wszechstronny. Doświadczenia wykonano i opisano z wielką starannością. Z dorobku Doktorantki wynika także jej zainteresowanie wieloma innymi zagadnieniami z pogranicza nauk ogrodniczych i ogólnobiologicznych. Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Naukowej o przyjęcie omawianej pracy doktorskiej, umożliwienie obrony tej pracy oraz nadanie **stopnia doktora nauk rolniczych i ogrodniczych**.

Rozprawa doktorska pani mgr. Moniki Markowskiej pt. „**Identyfikacja genów związanych z reakcją roślin z rodzaju *Brassica* na infekcję przez *Plasmodiophora brassicae***” spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy w Skierniewicach o **dopuszczenie mgr Moniki Markowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Z uwagi na złożoność zagadnienia, zaawansowanie stosowanych technik badawczych wnoszę do Rady Naukowej IO-PIB o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej**.



Małgorzata Jędryczka