



Dr hab. Janetta Niemann  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr inż. Tomasza Ociepy** pt.:  
**„Identyfikacja i charakterystyka nowego genu odporności *Pm11* na mączniaka prawdziwego owsa pochodzącego z *Avena sterilis* oraz opracowanie markera DNA dla tego genu”**  
zrealizowanej w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem Pani dr hab. Sylwii Okoń, profesor uczelni

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Tomasza Ociepy składa się z cyklu czterech anglojęzycznych publikacji dotyczących poszukiwania i identyfikacji nowego źródła odporności na mączniaka prawdziwego u owsa oraz 32 stronicowego autoreferatu w języku polskim. Artykuły naukowe będące przedmiotem rozprawy, z których trzy zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej są spójne tematycznie i stanowią podstawę dysertacji, co dopuszcza art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Prezentowane badania finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach projektu badawczego LIDER nr 325/L-5/2013, pt. „Identyfikacja nowych, efektywnych genów odporności na choroby grzybowe w owsie oraz opracowanie markerów DNA służących do ich identyfikacji”, którego kierownikiem była dr hab. Sylwia Okoń, profesor uczelni.

### **Ocena formalna rozprawy**

Prace naukowe będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej:

1. Okoń S., Paczos-Grzęda E., **Ociepa T.**, Koroluk A., Sowa S., Kowalczyk K., Chrząstek M. 2016. *Avena sterilis* L. genotypes as a potential source of resistance to oat powdery mildew. *Plant Disease*, 100, 2145-2151;
2. Okoń S., **Ociepa T.** 2018. Effectiveness of new sources of resistance against oat powdery mildew identified in *A. sterilis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125, 505-510;
3. **Ociepa T.** 2019. The oat gene pools – review about the use of wild species in improving cultivated oat. *Journal of Central European Agriculture*, 20, 251-261;
4. **Ociepa T.**, Okoń S., Nucia A., Leśniowska-Nowak J., Paczos-Grzęda E., Bisaga M. 2019. Molecular identification and chromosomal localization of new powdery mildew resistance gene *Pm11* in oat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1–7;



zostały opublikowane w latach 2016-2019, a ich sumaryczny wskaźnik wpływu Impact Factor wg Journal of Citation Reports wynosi 7,74 natomiast suma punktów wg punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 114 punktów lub też 230 punktów wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31 lipca 2019 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów. Tak wysoki sumaryczny IF wskazuje, że badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone przez Autora oraz reprezentują wysoki poziom naukowy, co zostało pozytywnie ocenione przez recenzentów tych czasopism.

Tytuł pracy doktorskiej odpowiada tematyce analizowanych publikacji. Spośród wymienionych powyżej prac, trzy są opracowaniami współautorskimi, w których wkład Autora niniejszej rozprawy został określony jako 10%, 50% i 60%, co znalazło potwierdzenie w oświadczeniach współautorów, które zostały zawarte na końcu rozprawy. Natomiast jedna publikacja jest artykułem przeglądowym, napisanym w 100 % samodzielnie przez Doktoranta. Praca doktorska Pana mgr inż. Tomasza Ociepy oprócz publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczeń współautorów przedstawionych w postaci załączników obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim oraz autoreferat rozprawy, w skład którego wchodzi następujące podrozdziały:

Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Stwierdzenia i wnioski oraz Piśmiennictwo.

Rozdział Wstęp zawarty na sześciu stronach tekstu prezentuje stan wiedzy dotyczący ogólnej charakterystyki rodzaju *Avena* oraz jednej z najgroźniejszych chorób owsa jaką jest mączniak prawdziwy, powodowany przez pasożytniczego grzyba *Blumeria graminis* DC. f.sp. *avenae* Em. Marchal. Ponadto, we Wstępie Autor wskazuje na potrzebę poszukiwania nowych genów odporności na mączniaka, a ich źródła upatruje w gatunkach dzikich rodzaju *Avena*. Ta część pracy napisana jest zwięźle i poprawnie, choć moim zdaniem niektóre wątki są opisane zbyt powierzchownie. Mam na myśli chociażby brak krótkiej charakterystyki poszczególnych mechanizmów odporności na choroby u roślin i podziału mechanizmów na tzn. odporność czynną i bierną oraz pionową czy poziomą. Mgr inż. Ociepa przedstawił co prawda teorię Flora znaną jako tzw. odporność „gen na gen”, jednak nie wskazał precyzyjnie do którego typu odporności jest ona zaliczana. Osobną kwestią, którą warto byłoby rozwinąć jest technika otrzymywania mieszańców pomiędzy owsem uprawnym, a dzikim gatunkiem *Avena sterylis*. Tematykę tą zawarł Doktorant w publikacji nr 3, jednak mimo to warto byłoby szerzej omówić to zagadnienie w Autoreferacie. W dalszej kolejności Autor bardzo przejrzysto opisał geny odporności zidentyfikowane i wykorzystywane do tej pory w programach hodowlanych owsa w Polsce i na świecie, z których tylko cztery uznaje się obecnie za efektywne, a mianowicie *Pm2*, *Pm4*, *Pm5* i *Pm7*. Końcowy fragment wstępu dotyczy identyfikacji źródeł odporności w genomie owsa na podstawie selekcji wspomaganej markerami (MAS). Pan mgr inż. Tomasz Ociepa skoncentrował się jednak głównie na zastosowanej w pracy metodzie DArTseq, opartej o sekwencjonowanie nowej generacji w





systemie Illumina. Warty wspomnienia byłyby również inne systemy markerowe takie jak np. AFLP, RFLP, RAPD, SSR oraz SNP, z powodzeniem stosowane w hodowli odpornościowej.

Wstęp pracy kończy jasno sformułowany cel, którym była identyfikacja i charakterystyka nowego genu odporności na mączniaka prawdziwego owsa *Pm11*, pochodzącego z *Avena sterilis* oraz opracowanie metody jego detekcji w genomie owsa.

Cel pracy został zrealizowany w oparciu o pięć przejrzyście nakreślonych i układających się w logiczną całość zadań badawczych dotyczących:

1. Identyfikacji potencjalnych źródeł odporności na mączniaka prawdziwego w dzikim gatunku *A. sterilis*.
2. Oceny efektywności wyselekcjonowanych źródeł odporności wobec obecnie występujących na terenie kraju patotypów *Blumeria graminis* f.sp. *avenae*.
3. Uzyskania segregującej względem odporności populacji F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub>, powstałych w wyniku krzyżowania genotypu CN113536 *A. sterilis* z odmianą wrażliwą na mączniaka prawdziwego.
4. Oceny sposobu dziedziczenia nowego źródła odporności na mączniaka prawdziwego.
5. Opracowania markera DNA pozwalającego na szybką identyfikację nowego źródła odporności w genomie owsa.

Podsumowując pierwszą część rozprawy doktorskiej muszę stwierdzić, że Autor kompleksowo i zwięźle przybliżył czytelnikowi podjęty przez siebie temat badawczy, choć rozdział ten mógłby być szerzej opisany oraz wzbogacony o informacje ogólne, dzięki którym lektura niniejszej pracy mogłaby być zrozumiała także dla osób mniej zorientowanych w tematyce badawczej poruszonej w rozprawie.

Rozdział Materiały i metody liczy sześć stron i w moim odczuciu jest opisany w sposób prawidłowy. Doktorant szczegółowo przedstawił materiał roślinny wykorzystany do badań, a także kolejne, zastosowane w pracy metody badawcze – od testów żywiciel-patogen, stosowanych w celu oceny odporności testowanych genotypów *A. sterilis*, aż po analizy molekularne, pozwalające na wytypowanie markerów typu silicoDArT, sprzężonych z nowym genem odporności na mączniaka prawdziwego u owsa oraz na opracowanie markerów SCAR umożliwiających identyfikację nowego genu *Pm11* w genomie owsa.

W opisie materiału roślinnego znalazłam jednak pewne nieścisłości metodyczne, które wymagają doprecyzowania. Pierwsza wątpliwość dotyczy zastosowanej w zrealizowanych badaniach wrażliwej odmiany owsa Fuchs, stosowanej jako odmiana kontrolna. Nie jest jasne dlaczego populacje F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub> były wyprowadzone z wrażliwą odmianą owsa Sam, a nie np. z odmianą Fuchs, podaną również w materiałach? Co przyczyniło się do wyboru właśnie tej odmiany do krzyżowań? Na stronie 21 autoreferatu w Tabeli 6 nie uwzględniono odmiany Sam, tylko odmianę owsa Fuchs natomiast w publikacji nr 1 scharakteryzowano obie odmiany tzn. Sam i Fuchs.



Kolejna kwestia dotyczy niezbyt precyzyjnego opisu dotyczącego przeprowadzonej oceny odporności poszczególnych genotypów owsa na mączniaka na podstawie obserwacji prowadzonych zwłaszcza w warunkach naturalnej infekcji, zawartego na stronie 16 Autoreferatu. Wiadomym jest, iż podstawą hodowli odpornościowej jest selekcja perspektywicznych genotypów przy dużym nasileniu czynnika chorobotwórczego. W warunkach polowych fenotypowa ekspresja odporności jest często modyfikowana przez występowanie patogenu oraz warunki środowiska. Polowa ocena odporności roślin na mączniaka prawdziwego powinna być więc prowadzona przynajmniej przez kilka sezonów, w zróżnicowanych warunkach środowiskowych aby selekcja była skuteczna. Szkoda, że Autor nie wskazał jasno liczby powtórzeń dla wykonanych ocen i zmienności czynników środowiskowych (temperatura, opady) w jakich prowadzone były obserwacje w warunkach naturalnej infekcji.

Wyniki i dyskusja zostały połączone przez Autora w jeden podrozdział obejmujący siedem stron. Jego treść w zasadzie w pełni oddaje istotę opublikowanych badań, które dostarczają odpowiedzi na zarysowane we wstępie problemy badawcze. W tej części pracy za najbardziej interesujący i zarazem najtrudniejszy problem badawczy uznaję skuteczną konwersję markerów silicoDART do markerów opartych o technikę PCR, który szczegółowo opisany został w publikacji nr 4. Pewną moją wątpliwość budzi jednak niska efektywność konwersji i otrzymana w jej efekcie niewielka liczba markerów (Pm11-21 oraz Pm11-48), których zastosowanie pozwala na skuteczne rozróżnienie osobników odpornych i wrażliwych w populacji mapującej.

Podsumowanie uzyskanych wyników podane jest w rozdziale Stwierdzenia i wnioski. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano 7 wniosków, z który pierwszy jest moim zdaniem zbyt ogólny, oczywisty i mógłby zostać doprecyzowany.

Rozprawa doktorska zawiera piśmiennictwo obejmujące 72 pozycje literatury (zarówno w języku polskim jak i angielskim) cytowane alfabetycznie. Bibliografia zawiera publikacje zarówno starsze (1965) jak i aktualne. Należy zaznaczyć, że ponad 25% pozycji piśmiennictwa stanowią publikacje z ostatnich pięciu lat (2015-2019). Dodatkowo piśmiennictwo zawarte jest w każdej z opublikowanych prac.

### **Uzyskane wyniki i główne walory rozprawy doktorskiej**

Przyjęta koncepcja pracy, w tym zastosowane metody od fitopatologicznych po nowoczesne techniki molekularne i analizy danych pozwoliły zrealizować wyznaczony cel rozprawy jakim była identyfikacja i charakterystyka nowego genu odporności na mączniaka prawdziwego owsa *Pm11* oraz opracowanie metody jego detekcji.

Wartość merytoryczną przedstawionej do recenzji pracy oceniam bardzo wysoko, a do jej najważniejszych osiągnięć zaliczam:





- wykazanie, że tylko cztery (CN67383, CN58106, CN 113536, CN 67349) spośród 350 testowanych genotypów *A. sterilis* charakteryzowały się odpornością zarówno w stadium siewki jak i w stadium rośliny dorosłej w warunkach naturalnej infekcji polowej,
- wykazanie, że genotyp *A. sterilis* CN113536 posiada nowe, nie opisane do tej pory źródło odporności na mączniaka prawdziwego owsa,
- identyfikację nowego genu odporności, oznaczonego jako *Pm11*, który warunkuje odporność monogeniczną oraz charakteryzuje się dominującym typem dziedziczenia,
- identyfikację genu *Pm11* w genomie owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) na podstawie samodzielnie opracowanych markerów SCAR,
- zaprojektowanie starterów pozwalających na identyfikację roślin odpornych oraz opracowanie metody pozwalającej na selekcję osobników homo i heterozygotycznych w badanej populacji, co znalazło odzwierciedlenie w odpowiednich zgłoszeniach patentowych.

Należy zaznaczyć, iż wyniki przeprowadzonych badań, poza wartością poznawczą, mają duże znaczenie praktyczne i w przyszłości mogą zostać wykorzystane przez firmy hodowlane i ośrodki badawcze zajmujące się wyprowadzaniem nowych odmian owsa z podwyższoną odpornością na mączniaka prawdziwego. Wyniki tych badań powinny przyczynić się do osiągnięcia szybszego postępu w hodowli odpornościowej owsa.

**Analiza tekstu autoreferatu oraz czterech publikacji naukowych, stanowiących niniejszą rozprawę doktorską pozwoliła mi sformułować następujące pytania:**

- W jaki sposób i gdzie rozmnożono mieszańce  $F_1$  oraz jaka była efektywność krzyżowania odmiany uprawnej owsa z dzikim gatunkiem *Avena sterylis*? Ile kwiatów wykastrowano i zapyłono? Ile ziarniaków otrzymano? W opisie dotyczącym wyprowadzenia populacji  $F_2$  i  $F_3$  nie podano ile roślin mieszańcowych  $F_1$  otrzymano? Podano tylko liczby roślin pokolenia  $F_2$ .
- Czy otrzymane rośliny  $F_1$  były oceniane pod względem stabilności cytogenetycznej? Czy potwierdzano mieszańcowość? Jeśli tak, to jakimi metodami? Takie wyniki byłyby przydatne także z punktu widzenia aplikacyjnego.
- Skoro oceny odporności genotypów *A. sterylis* na mączniaka prowadzone były w kilku etapach, to jak można wytłumaczyć zastosowanie różnej ilości izolatów mączniaka prawdziwego (6, 13 i 50) na każdym etapie badań?
- Czy obserwacje odporności genotypów *A. sterylis* w warunkach naturalnej presji patogenu prowadzono tylko w jednym roku badań? Jeśli tak, to czy na tej podstawie można postulować obecność genów odporności?



- Dlaczego do dalszych badań wybrano tylko jeden genotyp *A. sterylis* tj. CN113536? Mimo, iż jak podano w Tabeli 6 autoreferatu odporność na mączniaka zaobserwowano również dla numeru akcesyjnego CN67383?

Od strony językowej praca nie budzi moich zastrzeżeń poza sformułowaniem „analiza rozszczepienia populacji  $F_2$  i  $F_3$ 'Sam'  $\times$  CN113536 zastosowanym przez Autora na stronie 17 jako tytuł jednego z podrozdziałów w rozdziale Materiały i metody. Sugerowałabym zastąpienie tego określenia bardziej precyzyjnym np. analiza segregacji cechy odporności w populacji  $F_2$  i  $F_3$ 'Sam'  $\times$  CN113536 lub jego zastąpienie bardziej zrozumiałym tytułem tj. ocena sposobu dziedziczenia nowego genu odporności.

Pragnę zaznaczyć, iż przytoczone przeze mnie komentarze i wątpliwości mają charakter dyskusyjny i w niczym nie umniejszają wysokich walorów ocenianej pracy, a niektóre z nich mogą być inspiracją dla dalszych badań.

## Konkluzja

W podsumowaniu recenzji należy stwierdzić, że rozprawa doktorska Pana mgr inż. Tomasza Ociepy, przedstawiona w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorat został oparty na wiarygodnym materiale i przygotowany w sposób przemyślany i dojrzały. Koncepcja pracy oraz sposób jej realizacji w pełni potwierdzają ogólną wiedzę Autora oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. W świetle powyższych wniosków, zgodnie z właściwymi przepisami [art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669)], stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Ociepy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową i aplikacyjną uzyskanych wyników, wnoszę do Wysokiej Rady o stosowne wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

Poznań, dnia 20 listopada 2019 roku