

Poznań, 13.09.2023 r.

dr hab. Dorota Weigt  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Dojazd 11, 60-637 Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Cieplak pt.  
„Analiza wirulencji i charakterystyka populacji *Blumeria graminis* f. sp. *avenae*  
na terenie Polski w latach 2014-2020”  
wykonanej w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu  
Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Sylwii Okoń, prof. uczelni**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 5.07.2023 r.

Podstawę prawną stanowi art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20.07.2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

Tematyka badawcza podjęta przez Autorkę jest aktualna i ma duże znaczenie dla dyscypliny naukowej „Rolnictwo i Ogrodnictwo”. Dotyczy ona analizy wirulencji populacji *Blumeria graminis* f. sp. *avenae*, a także charakterystyki tego patogenu pod kątem zmienności genetycznej. Prace badawcze prowadzono na terenie Polski w latach 2014-2020. Do badań wykorzystywano kolekcjonowane w warunkach polowych, jednozarodnikowe izolaty grzyba pojawiające się na liściach owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) i powodującego mączniaka prawdziwego zbóż.

W ostatnich latach owies zyskuje na popularności nie tylko jako źródło wartościowej paszy, ale także ze względu na składniki odżywcze działające korzystnie na organizm ludzki. Owies jest wykorzystywany jako component diety bogatej w węglowodany oraz związki bioaktywne, a firmy farmaceutyczne i kosmetyczne wykorzystują go do produkcji preparatów prozdrowotnych. Gatunek ten charakteryzuje się dużą wrażliwością na choroby grzybowe, w tym mączniaka prawdziwego zbóż. Zainfekowane rośliny znacznie gorzej plonują, z powodu zaburzenia przemian metabolicznych oraz ograniczenia przez grzybnię powierzchnię fotosyntezy. Ze względu na trendy środowiskowe oraz w oparciu o dyrektywy unijne

dotyczące zintegrowanej uprawy roślin, hodowla odpornościowa owsa stanowi niezwykle ważny kierunek badawczy. Ograniczenie stosowania fungicydów jest kluczowe nie tylko ze względów ekologicznych, ale także z powodu zdolności adaptacyjnych patogenów i nabywania przez nie odporności na stosowane substancje chemiczne. Rozwiązaniem przyjaznym dla środowiska jest introdukcja genów odporności z gatunków pokrewnych do nowych odmian owsa. W tym celu konieczna jest dokładna charakterystyka wciąż zmieniającej się populacji patogenu, umożliwiająca identyfikację genów roślinnych, które efektywnie ograniczają rozwój grzyba. Ten problem badawczy został zgłębiany przez Doktorantkę i opisany w przedłożonej rozprawie.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Magdaleny Cieplak obejmuje polskojęzyczne opracowanie w formie autoreferatu oraz trzy spójne tematycznie artykuły naukowe opublikowane w roku 2021 (P1; P2) oraz 2022 (P3). Przedstawione do oceny publikacje ukazały się w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach, umieszczonych w wykazie czasopism naukowych MEiN i są indeksowane w bazie JCR (*Journal Citation Reports*). Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, *impact factor*) tych publikacji wynosi 10,928, a suma punktów ministerialnych to 240. W dwóch prezentowanych pracach mgr. inż. Magdalena Cieplak jest pierwszą autorką (P1; P3), która deklaruje wkład na poziomie 50% w powstanie każdej z nich, natomiast w artykule P2 jest drugim autorem, a jej udział w powstaniu publikacji wynosi 40%. Doktorantka była zaangażowana w opracowanie koncepcji badawczej (P1; P2; P3); prowadzenie doświadczeń w poszczególnych zadaniach badawczych tj.: przygotowanie i wykonywanie testów żywiciel-patogen (P1; P2; P3), ocenę stopnia porażenia roślin (P1; P2), przygotowanie pojedynczych izolatów patogenu (P3), izolację DNA i prowadzenie analiz molekularnych (P3); ponadto Doktorantka miała wkład w opracowanie otrzymanych danych (P3) oraz przygotowanie odpowiedzi na recenzje (P1). Biorąc pod uwagę wymóg prawny oceny indywidualnego wkładu doktoranta w powstanie publikacji (Dz. U. z 2014, poz.1383; &6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dn. 3.10.2014) oraz oświadczenia złożone przez współautorów zbioru prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i określające ich wkład w powstanie przedłożonych artykułów stwierdzam, że rola Doktorantki w planowaniu i realizacji badań oraz opracowaniu wyników i wnioskowaniu była istotna. Uważam, że udział współautorów w przeprowadzonych badaniach i przedłożonych artykułach świadczy o umiejętności współpracy Doktorantki w zespołach badawczych i nie umniejsza jej roli w powstaniu rozprawy i oryginalnym rozwiązaniu problemu naukowego.

Rozprawa doktorska składa się ze strony tytułowej, streszczenia w języku polskim i angielskim, listy powiązanych tematycznie trzech oryginalnych prac naukowych, autoreferatu

liczącego 26 stron wraz z bibliografią oraz z wydruków trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy z oświadczeniami o współautorstwie. W autoreferacie Autorka przedstawia kolejno rozdziały: 1. *Wstęp*, 2. *Hipoteza i Cel badań*, 3. *Material i metody*, 4. *Omówienie wyników*, 5. *Stwierdzenia i wnioski* oraz 6. *Bibliografia*.

We *Wstępie*, stanowiącym wprowadzenie w problematykę badawczą rozprawy, Autorka w sposób syntetyczny przedstawia przesłanki, które skłoniły ją do podjęcia badań. Informacje zawarte w tym rozdziale stanowią dobre uzasadnienie podjętego problemu naukowego o niewątpliwie aplikacyjnym zastosowaniu. Doktorantka podkreśla w tym miejscu rosnące znaczenie owsa jako rośliny pastewnej, a także gatunku coraz bardziej docenianego w diecie i profilaktyce zdrowotnej człowieka. Przedstawia także systematykę, ewolucję i cykl rozwojowy grzyba *Blumeria graminis* oraz skutki występowania powodowanej przez ten patogen choroby, zwanej mączniakiem prawdziwym zbóż. Wskazuje także metody, którymi można zapobiegać infekcji i jej rozprzestrzenianiu, podkreślając zasadność działań proekologicznych i prewencyjnych. W ten trend wpisuje się hodowla odpornościowa wraz z jednoczesnym monitorowaniem dynamiki zmian wirulencji oraz zróżnicowania genetycznego w populacji patogenu występującego na konkretnym obszarze. Doktorantka podkreśla wagę badań mających na celu poznanie potencjału ewolucyjnego patogenów w oparciu o geny odporności.

W kolejnym rozdziale *Hipoteza i Cel badań* Autorka ponownie uzasadnia podstawę podjętych badań i formułuje główny ich cel, którym jest charakterystyka zmian zachodzących w populacji *B.graminis* f. sp. *avenae* występującej w Polsce. Doktorantka wyjaśnia, iż cel ten został osiągnięty poprzez określenie wirulencji populacji patogenu w latach 2014-2020, ocenę struktury oraz dynamiki zmian zachodzących w populacji *B.graminis* f. sp. *avenae* oraz ocenę jej zróżnicowania genetycznego.

Rozdział *Material i metody* zawiera syntetyczny opis procedury pobierania i przygotowania izolatów *B.graminis* f. sp. *avenae* oraz charakterystykę wykorzystanych w doświadczeniu genotypów kontrolnych ze zidentyfikowanymi do tej pory genami odporności (*Pm1*, *Pm2*, *Pm3*, *Pm4*, *Pm5*, *Pm6*, *Pm7*, *Pm3+Pm8*, *Pm9*, *Pm10*, *Pm11*, *Pm12*). Przedstawiona została w nim także metodyka przeprowadzania testów żywiciel-patogen i analizy skali porażenia z wykorzystaniem uproszczonej 2-stopniowej klasyfikacji dzielącej izolaty na awirulentne bądź wirulentne. Na podstawie profili chorobotwórczości patogenu określono zmiany zachodzące w jego populacji. W celu charakterystyki populacji grzyba zastosowano parametry takie jak częstość i kompleksowość wirulencji oraz indeksy zróżnicowania: Nei (Hs), Simpsona (Si), Shannona (Sh) oraz Kosmana (KWm). Klasyfikację testowanych patotypów

prowadzono metodą Gilmour'a (Gilmour 1973) (P1) oraz metodą zmodyfikowaną przez Autorów i opisaną w publikacji P2 (P2; P3). Do analizy zróżnicowania genetycznego pobranych izolatów użyto po 30 starterów reakcji amplifikacji DNA markerów: ISSR oraz SCoT. Wykonano wieloparametryczną analizę wygenerowanych polimorfizmów i określono poziom zróżnicowania w obrębie populacji na podstawie wskaźnika Shannona. Ponadto obliczono dystans genetyczny między badanymi izolatami (Nei 1972) i przeprowadzono analizę PCoA (ang. *Principal Coordinates Analysis*).

Rozdział *Omówienie wyników* zawiera przegląd wyników opisanych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Autorka podzieliła tekst na analizę wirulencji oraz analizę zróżnicowania genetycznego w oparciu o markery DNA. W części pierwszej omówiono częstość wirulencji, kompleksowość wirulencji, zróżnicowanie populacji na podstawie wirulencji i liczbę identyfikowanych patotypów. Druga część rozdziału stanowi opracowanie wyników analizy markerów ISSR oraz SCoT wygenerowanych w badaniach izolatów *B.graminis* f. sp. *avenae*. Cały rozdział obejmuje 10 stron tekstu i stanowi syntetyczny zbiór najważniejszych rezultatów uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej.

W końcowej części autoreferatu Doktorantka sformułowała 10 szczegółowych wniosków odnoszących się do otrzymanych wyników. Autoreferat zamyka *Bibliografia* zawierająca 92 pozycje, w większości są to oryginalne prace naukowe w języku angielskim, aktualne i starannie dobrane pod względem merytorycznym.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią dość logiczny układ, a poruszane w kolejnych artykułach problemy badawcze świadczą o coraz głębszej analizie zagadnienia wirulencji i charakterystyki *B.graminis* f. sp. *avenae*. Pierwszy artykuł (P1) opublikowany w *Plant Pathology Journal* dotyczy badania struktury wirulencji tego patogenu w latach 2014-2015. Do badań pobrano 180 izolatów z 18 lokalizacji na terenie Polski. Analizy prowadzono na 9 genotypach kontrolnych owsa. Patotypy klasyfikowano systemem Gilmour'a. W zależności od roku badań, zidentyfikowano od 4 do 5 spośród 9 obowiązujących klas. Utworzyły one 3 grupy o podobnym wzorze wirulencji. Na tej podstawie Autorzy publikacji wskazują na niskie zróżnicowanie populacji *B.graminis* f. sp. *avenae* w badanym okresie. Za najistotniejszy wynik prezentowany w artykule P1, uważam stwierdzenie wirulencji zidentyfikowanych patotypów wobec genów *Pm1*, *Pm3*, *Pm6* i *Pm3+Pm8* wskazujące na przełamanie odporności warunkowanej przez te geny oraz wskazanie, że geny *Pm2*, *Pm4*, *Pm5*, *Pm7* mogą być nadal stosowane w hodowli odpornościowej.

W badaniach opisanych w kolejnym artykule (P2), opublikowanym w czasopiśmie *Agronomy*, poszerzono do 14 liczbę genotypów kontrolnych owsa wprowadzając do analiz odmiany z

genami *Pm9*, *Pm10*, *Pm11* oraz *Pm12*. Z kolei liczbę lokalizacji, w których pobierano izolaty, ograniczono do 4 oraz zmniejszono liczbę izolatów do 40 rocznie. Ponadto zmodyfikowano system klasyfikacji patotypów zastępując skalę 5-cio stopniową Gilmour'a przez 2-stopniową. W takim układzie doświadczenia w latach 2016-2019 zidentyfikowano 46 patotypów *B.graminis* f. sp. *avenae*. Patotyp TBBB, występujący we wszystkich analizowanych populacjach, był najliczniejszy i stanowił 30% izolatów. Potwierdzono przełamanie odporności warunkowanej genami: *Pm1*, *Pm3*, *Pm6* i *Pm8*. Obserwowano niską częstość wirulencji w stosunku do nowo badanych linii z genami *Pm9*, *Pm10*, *Pm11* i *Pm12* w wyniku czego uznano te geny za efektywne.

W ostatnim roku badań, Autorzy opublikowanego w czasopiśmie *Plants* artykułu (P3) opisali zróżnicowanie i wirulentność 40 izolatów *B.graminis* f. sp. *avenae* pobranych na terenie Polski oraz 40 pochodzących z Finlandii, Czech, Irlandii i Niemiec. Na podstawie analizy wirulencji sklasyfikowano 22 grupy patotypów. Zważywszy na temat recenzowanej rozprawy doktorskiej, który odnosi się do badań prowadzonych na terenie Polski, wyniki uzyskane z wykorzystaniem izolatów pobranych na terenie innych państw uznaję za mniej istotne. Odnosząc się do badań dotyczących obszaru Polski, za najważniejszy wynik uznaję ponowne potwierdzenie wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego zbóż genotypów z genami *Pm2*, *Pm4*, *Pm5* oraz *Pm7*. W drugiej części artykułu Autorzy wykazali, że badana populacja *B.graminis* f. sp. *avenae* charakteryzuje się wysokim polimorfizmem na poziomie DNA, jednocześnie wskazując na niską korelację tych wyników z poziomem wirulencji patogenu.

Edytorskie przygotowanie rozprawy, świadczy o dobrym opanowaniu przez Autorkę techniki redakcji tekstu naukowego. Również styl wypowiedzi i interpunkcja nie budzą większych zastrzeżeń, a drobne błędy językowe nie wpływają na aspekt merytoryczny rozprawy. Z obowiązku recenzenta wskazuję jedynie błędy, powtarzające się w tekście rozprawy:

- niepoprawna interpunkcja w nazwie grzyba *B.graminis* f. sp. *avenae*,
- niepoprawna deklinacja słowa „patogen”, które w dopełniaczu liczby pojedynczej powinno brzmieć: „patogenu” („Słownik języka polskiego” Wydawnictwa Naukowego PWN),
- stwierdzenie „ilość form” powinno zostać zastąpione przez „liczba form”,
- zamiast określenia „polimorfizmu startera” powinno być „polimorfizmu otrzymanych produktów”.

Wartość merytoryczna pracy w mojej ocenie jest wysoka, niemniej jednak zauważyłam kilka nieścisłości:

- Autorka podaje, iż mączniak prawdziwy wpływa na zmniejszenie plonu ziarna o 10-39% powołując się na publikacje z 1965 r. oraz 1987 r. – zważywszy na zmienność wirulencji patogenu oraz niestałość klimatu, informacja ta może być już nieaktualna,
- stwierdzenie, iż *B.graminis* f. sp. *avenae* stale ewoluuje poprzez migracje i rekombinacje nie jest ściśle – zjawiska te mogą przyczyniać się jedynie do zachodzenia zmian w genomie jeśli np. na skutek migracji dojdzie do rozmnażania płciowego z patotypem o innym składzie allelicznym,
- stwierdzenie „ekstremalne warunki pogodowe ułatwiają rozprzestrzenianie się grzybów *B.graminis* f. sp. *avenae* na duże odległości ...” wymaga wyjaśnienia, co oznaczają w tym kontekście „warunki ekstremalne”,
- proszę też o wyjaśnienie w jaki sposób zachodzące obecnie zmiany klimatyczne wpływają na „powstawanie nowych, agresywnych patotypów” zważywszy, iż obserwowany wzrost temp. i susza notowane w ostatnich latach nie sprzyjają rozwojowi grzybów *B.graminis*,
- wyniki z lat 2016-2020 dotyczące zmodyfikowanej nomenklatury patotypów przedstawione są w pracach P2 i P3, a nie P1 i P2,
- stwierdzenie „...p jest proporcją występowania prążków w genotypach ...” jest uproszczeniem – tzw. „prążki” będące markerami są wizualizowane (występują) na żelu,
- wniosek 2 oraz 4 Autoreferatu prowadzą do podobnej konkluzji dotyczącej przełamania odporności genów *Pm1*, *Pm3*, *Pm6* i *Pm3+8* i mogą zostać połączone,
- wniosek 6, dotyczący zwiększającej się w kolejnych latach liczby patotypów, nie jest prawdziwy jeśli weźmiemy pod uwagę wyniki otrzymane w roku 2014-15 (P1). Autorka sama stwierdza, że na tę liczbę wpłynęły: zróżnicowanie w poszczególnych eksperymentach przyjętej metodyki klasyfikacji patotypów oraz liczba testowanych genotypów kontrolnych (wniosek 7). Druga część wniosku 6 odnosząca się do warunków pogodowych, które nie były przedstawione w rozprawie, stanowi jedynie przypuszczenie Autorki.

W czasie publicznej obrony pracy doktorskiej chciałabym, aby mgr inż. Magdalena Cieplak rozwinęła temat wpływu badanego przez nią zróżnicowania genetycznego patotypów na możliwość określenia siły potencjału ewolucyjnego populacji patogenu. Problem ten zainteresował mnie szczególnie w kontekście opisanej przez Doktorantkę niskiej korelacji (58%) polimorfizmów wykrytych za pomocą markerów DNA z poziomem wirulencji. Proszę też o ustosunkowanie się do możliwości wykorzystania innych systemów markerowych celem podniesienia współczynnika korelacji między tymi parametrami. Proszę też o rozwinięcie wniosku 10, w którym Autorka stwierdza, iż potencjał ewolucyjny polskiej populacji *B.graminis* f. sp. *avenae* jest niski i nie należy spodziewać się szybkiego przełamania

odporności warunkowanej efektywnymi genami. Stwierdzenie to z punktu widzenia hodowli odpornościowej jest uspokajające, jednakże zmiany klimatyczne, rosnące parametry zróżnicowania patotypów występujących na terenie Polski, a także ich wysoki polimorfizm genetyczny nie prognozują tak optymistycznie.

Podsumowując, wskazane przeze mnie uwagi dotyczące oceny językowej i stylistycznej tekstu, a także aspektów merytorycznych nie wpływają zasadniczo na wartość naukową recenzowanej pracy doktorskiej. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego poszerzające aktualny stan wiedzy w dziedzinie naukowej „Rolnictwo i Ogrodnictwo”. Ponadto uważam, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę teoretyczną i aplikacyjną, która predysponuje ją do prowadzenia samodzielnych prac naukowych. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. „Analiza wirulencji i charakterystyka populacji *Blumeria graminis* f. sp. *avenae* na terenie Polski w latach 2014-2020” spełnia wymogi pracy doktorskiej określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20.07.2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami). W związku z pozytywną oceną zwracam się do Rady Naukowej Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z prośbą o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Cieplak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Dorota Leif".