

Poznań, 30.08.2018r.

**Prof. dr hab. Marek Korbas**  
**Instytut Ochrony Roślin – Państwowy**  
**Instytut Badawczy w Poznaniu**  
**Zakład Mikologii**

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas pt: „Charakterystyka  
wybranych populacji *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i ocena odporności różnych  
typów odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na tego patogena”.**

Rzepak ozimy w Polsce jest najważniejszą rośliną oleistą uprawianą na dużej powierzchni gruntów ornyc. Z tego względu, że uprawa rzepaku ma duże znaczenie gospodarcze jest też przedmiotem intensywnych prac hodowlanych. Dzięki temu rejestrowane odmiany są coraz bardziej doskonałe. Ta doskonałość to nie tylko poprawa takich cech jak plenność i jakość nasion, ale również postęp w poprawie tak ważnych ze względu na jakość plonu nasion jak: zawartość i skład kwasów tłuszczowych oraz zawartość białka i tłuszczu.

Od roku 2014 w Polsce oraz w całej Unii Europejskiej obowiązuje dyrektywa dotycząca konieczności wprowadzenia do uprawy roślin zasad integrowanej ochrony roślin. Ma to na celu zmniejszenie stosowania środków ochrony roślin w technologii uprawy używanych w produkcji gatunków. W integrowanej ochronie roślin można to osiągnąć zastępując ograniczanie lub zwalczanie agrofagów poprzez stosowanie metod niechemicznych. Ważną metodą, która pozwala na ograniczanie stosowania środków chemicznych jest hodowla odmian odpornych na porażanie przez patogeny powodujące choroby. Dzięki długoletniej pracy prowadzonej przez hodowców w Krajowym Rejestrze można znaleźć odmiany odporne na kiłę kapusty (Alasco, Archimedes, Angusta, DK Platinum, Mentor, SY Alibaba, SY Alister), na suchą zgniliznę kapustnych determinowaną przez obecność genu Rlm7 lub innymi genami. Przykłady odmian zawierających gen Rlm7 to Absolut, Acapulco, Alvaro KWS, Amazon, Archimedes, DK Exotter, DK Exstorm, Barroco, ES Cesario, ES Imperio, Sergio KWS.

Rolnicy uprawiający rzepak mogą uprawiać odmiany rzepaku ozimego o genetycznej odporności na wirusa żółtaczkę rzepy (TuYV) wpisane do K.R. (np. Absolut, Albrecht,

Architekt, Chopin, Prince, Ragnar, Szmaragd). Do tej pory brakuje odmian zarejestrowanych o wysokiej lub całkowitej odporności na zgniliznę twardzikową i kilka innych ważnych chorób w uprawie rzepaku. Podobnie brakuje odmian odpornych na uszkodzenia przez szkodniki, które licznie występują w uprawie rzepaku ozimego. Problematyka, jaką zajęła się w tej pracy doktorantka jest bardzo potrzebna i aktualna, ponieważ istnieje potrzeba wprowadzenia do uprawy odmian odpornych na porażenie przez grzyb *Sclerotinia sclerotiorum* powodujący zgniliznę twardzikową.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Webera emerytowanego profesora Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowego Instytutu Badawczego. Promotorem pomocniczym w omawianym doktoracie był dr Marcin Matuszczak, który pomagał w opracowaniu wyników z zakresu badań molekularnych.

Opracowanie liczy 107 stron, 3 fotografie, 32 tabele i 32 ryciny (np. dendrogram podobieństwa i rozdział elektroforetyczny izolatów *S. sclerotiorum*). Rozprawa została podzielona na następujące rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Metody, Dane meteorologiczne, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, Streszczenie, Literatura. Zawiera załączniki 1, 2, 3 (Wyniki sekwencji ITS badanych 7 izolatów *S. sclerotiorum*, rozdziały elektroforetyczne DNA izolatów *S. sclerotiorum* oraz rozdziały fragmentów DNA dla markerów mikrosatelitarnych). Przedstawiony układ pracy jest zgodny z ogólnie przyjętymi zasadami przedstawiania przyrodniczo-rolniczych prac doktorskich.

We wstępie dokładnie i wyczerpująco opisano pochodzenie i systematykę rzepaku oraz między innymi kierunki hodowli rzepaku. W tej części pracy została opisana choroba, którą powoduje *Sclerotinia sclerotiorum* grzyb, który jest polifagiem, może on porażać setki roślin w tym wiele z rodziny kapustowatych i innych gatunków z innych rodzin należących do dwuliściennych i występuje również na niektórych gatunkach należących do jednoliściennych.

Na pochwałę zasługuje w mojej ocenie wybór tematyki badawczej dotychczas w Polsce słabo rozpoznanej i w perspektywie pozwoli rozwiązać problem uzyskania odmian odpornych na porażenie przez *S. sclerotiorum*.

Cel pracy badawczej został wnikliwie i precyzyjnie zrealizowany między innymi dzięki wykonaniu licznych badań molekularnych. Charakterystyka wybranych populacji *S. sclerotiorum* została wnikliwie i trafnie wykonana i opracowana w odniesieniu do rzepaku, który jest ważnym żywicielem dla tego patogena. Doktorantka opisała patogena przy pomocy

badania molekularnych, które pozwoliły grzyb *S. sclerotiorum* występujący na rzepaku rosnącym w różnych rejonach jego uprawy dokładnie scharakteryzować. Jak podkreślano *S. sclerotiorum* może porażać ok. 400 gatunków roślin dwuliściennych w tym *B. napus*. Stanowi on obiekt wielu badań mających na celu dokładne rozpoznanie patogenez, a także zróżnicowania fenotypowego i genetycznego grzyba. Autorka zaznaczyła w swojej dysertacji, że pod względem genetycznym grzyb *S. sclerotiorum* jest bardzo zróżnicowany. W pracy wykorzystano dwie odrębne analizy DNA patogena, wskazujące na jego polimorfizm. Użyła techniki RAPD, w której wykorzystano amplifikacje losowych fragmentów genomowego DNA stosując startery o długości 10 par zasad. Dzięki tej metodzie uzyskała zestaw ampikonów na żelu agarowym odpowiedni dla danego genotypu, które pozwoliły na wskazanie różnic na poziomie DNA między poszczególnymi obiektami.

Należy podkreślić, że na świecie podejmowane próby badań populacji *S. sclerotiorum* przy pomocy analizy RAPD najczęściej ukazują tylko duże zróżnicowanie izolatów patogena z brakiem powiązania z konkretną cechą, taką jak pochodzenie, czy patogeniczność. Opisanie wyniki na podstawie współczynnika podobieństwa o zakresie 0,18 - 0,87 stworzono dendrogram z głównymi czterema klastrami.

Bardzo zbliżone wyniki współczynnika podobieństw wg Nei & Li otrzymano w ocenianej pracy, który kształtował się na poziomie 0,2- 0,9 dla izolatów z lat 2012 i 2013 oraz 0,1 – 0,9 dla izolatów z 2014 roku. Stosując corocznie startery RAPD w pracy stwierdzano duże zróżnicowanie izolatów *S. sclerotiorum*, a dalsza analiza podobieństw według Nei & Li pozwoliła na pogrupowanie populacji patogena izolowanego z rzepaku zgodnie z jego pochodzeniem. W przedstawionej pracy autorka przy wykorzystaniu analizy AMOVA wykazała bardzo duże zróżnicowanie wewnątrz populacji z danej miejscowości na poziomie 87% w 2012 r., 96% w 2013 r. i 93% w 2014 r., a między populacjami z danych miejscowości tylko odpowiednio na poziomie 13%, 4% i 7%.

Następną metodą badań molekularnych, która została użyta w pracy, to analiza z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych (SSR). DNA mikrosatelitarne odznaczają się występowaniem krótkich sekwencji nukleotydów o powtórzeniach tandemowych, a markery takie są z reguły specyficzne dla danego gatunku. Analiza ta poprzez dobór odpowiednich starterów pozwala nie tylko na ocenę zróżnicowania badanych populacji grzyba *S. sclerotiorum*, ale także umożliwia odszukanie związku z innymi cechami patogena.

W przedstawionej pracy, podobnie jak w pracach innych autorów (np. Atallah i in., 2004 oraz Attanayake i in., 2012) wykorzystano markery mikrosatelitarne opracowane wcześniej przez Sirjusingh i Kohn w 2001.

Określona przez tych autorów duża liczba haplotypów *S. sclerotiorum*, po analizie statystycznej AMOVA, odpowiadała w 92% zmienności populacji patogena. Podobnie wyniki otrzymano w ocenianej pracy z izolatami *S. sclerotiorum* pochodzącymi z rzepaku ozimego, z trzech województw, w której uzyskano wiele haplotypów bez związku z miejscem pochodzenia, czy produkcją kwasu szczawiowego. Ponadto polimorfizm w obrębie populacji grzyba z danej miejscowości wyniósł 100% (tab. 23). Doktorantka jak wspomniano wcześniej bardzo dobrze przebadła i naukowo udokumentowała w Polsce odporność kilkunastu odmian rzepaku ozimego na porażenie powodowane przez *S. sclerotiorum*.

Uprawiane odmiany rzepaku ozimego są podwójnie ulepszone i w większości pochodzą z tych samych form wyjściowych, co skutkuje zawężeniem puli genowej gatunku. Z wyżej podanego powodu trudno jest odnaleźć źródła odporności u *B. napus* na porażenie przez *S. sclerotiorum*.

W związku z obecnym ograniczaniem liczby substancji biologicznie czynnych chemicznych środków ochrony roślin istnieje pilna potrzeba zidentyfikowania skutecznych źródeł odporności roślin *B. napus* na tego patogena.

Do obecnego czasu w rzepaku rozpoznano tylko częściową odporność na *S. sclerotiorum*. Potwierdza to wiele prowadzonych badań (Baswana 1991; Delourme 2011) prowadzonych na całym świecie łącznie z wynikiem ocenianej pracy, w której tylko kilka odmian wykazywało całkowitą odporność na dany izolat *S. sclerotiorum*, niestety bez powtarzalności w kolejnych latach.

Autorka w 2012 roku stwierdziła, że najodporniejszymi odmianami były: Poznaniak, który wykazywał całkowitą odporność wobec izolatów 31MAL/09 i 05BAK/09 oraz DK Example z całkowitą odpornością na izolat 05BAK/09. W następnym roku całkowitą odpornością na izolat 31MAL/09 charakteryzowały się odmiany: Poznaniak, Gladius, Vectra, Cabriolet, Monolit i Adriana, a także Bogart, DK Example i Monolit na porażenie przez izolat S.s.-3 (średnio patogeniczny wzorzec *S. sclerotiorum*) oraz odmiana Bogart na izolat 24BAK/09. W 2014 roku całkowicie odpornymi tylko na izolat 31MAL/09 były odmiany: Vectra i Adriana. Warto zwrócić uwagę, że dziesięć badanych odmian było w najmniejszym stopniu porażanych przez izolat 31MAL/09, który równocześnie charakteryzował się najsłabszą produkcją kwasu szczawiowego.

Doktorantka w innych dwuletnich badaniach (2008-2009) na terenie zachodniej Polski stwierdziła tylko częściową odporność odmian rzepaku ozimego na pojedynczy izolat *S. sclerotiorum* (S.s.-3) . Najniższymi indeksami porażenia *B. napus* (IP = 0, 55-0,62) charakteryzowały się takie odmiany, jak: Taurus, Libomir, Toccata i Hycolor.

Jak bardzo trudne są tego typu badania, świadczą o tym dane literaturowe. W badaniach odporności odmian obserwowane są często sprzeczne wyniki. Przykładem może być odmiana Mystic, która w jednym teście była częściowo odporna, a w innym podatna (Uloth 2013; Taylor 2015).

Wydaje się, że główną przyczyną takiej sytuacji może być brak standaryzacji między badaniami, a także różnice techniczne związane z inokulacją roślin rzepaku. Testy odpornościowe roślin często ograniczają się do inokulacji pojedynczym izolatem, co może przekładać się na różne wyniki. Jak potwierdzono w ocenianej pracy istnieje wiele genotypów *S. sclerotiorum* o różnym stopniu patogeniczności, dlatego badania odporności oparte na jednym patotypie często nie korelują ze stopniem odporności roślin w warunkach polowych, gdzie występuje wiele izolatów patogena należących do różnych patotypów.

Autorka na końcu rozprawy stwierdza, że stosunkowo niewielki postęp w hodowli odpornościowej rzepaku na *S. sclerotiorum* jest spowodowany nie tylko brakiem źródeł odporności, ale także wystandaryzowanych metod selekcji. Ponadto stwierdza, że otrzymane wyniki badań powinny zostać uzupełnione w przyszłości poprzez dodatkowe badania (cyt):

- stworzenia populacji mapującej dla wygenerowania loci QTL i opracowania markerów molekularnych specyficznych lub sprzężonych z cechą odporności;
- poszukiwania markerów fenotypowych dla genotypów posiadających podwyższoną odporność;
- wytwarzanie linii syntetycznych lub pół syntetycznych dla wprowadzenia genów z gatunków ancestralnych lub innych gatunków pokrewnych;
- zastosowania metody piramidyzacji genów odporności pochodzących z różnych źródeł.

Pod koniec rozprawy autorka umieściła dane meteorologiczne, które miały duży wpływ na porażenie rzepaku przez *S. sclerotiorum* podczas prowadzonych badań. Stwierdziła, że na stopień odporności roślin rzepaku miały duży wpływ: sumy opadów i temperatury w okresie siedmiu dni po inokulacji. Analiza korelacji wykazała bardzo wysoką dodatnią zależność między średnią indeksów porażenia inokulowanych roślin rzepaku wszystkich badanych odmian z sumą siedmiodniowych opadów ( $r = 0,79$ ). Natomiast w przypadku

związku średnich tygodniowych temperatur (od momentu inokulacji) ze średnią indeksów porażenia uzyskano ujemną, niemal pełną korelację ( $r = -0,98$ ), co oznaczało, że im wyższa temperatura tym występował niższy indeks porażenia.

W siódmym punkcie rozprawy doktorskiej autorka w rozdziale Podsumowanie i wnioski zawarła w 10 nienumerowanych punktach podsumowania wykonanych wyników badań. W części tego rozdziału występują stwierdzenia podsumowujące wyniki badań, a część z nich miało charakter wniosków dotyczących konkretnych badań. Całościowo, logicznie i poprawnie został wykonany i przedstawiony ten punkt. Literatura bardzo liczna (165 pozycji), odpowiednio wybrana i odpowiadająca tematyce doktoratu. Ponad 60% cytowanych pozycji literaturowych to pozycje z lat 2000-2016. Do niewątpliwych osiągnięć Autorki należy zaliczyć stwierdzenie istotnych różnic między izolatami pod względem wytwarzania kwasu szczawowego przez izobaty *S. sclerotiorum*. Po raz pierwszy stwierdzono bardzo wysoką korelację Pearsona pomiędzy wielkością średnicy 48 godzinnych koloni izolatów *S. sclerotiorum* (z roku 2014) i powstających przebarwień pod wpływem kwasu szczawowego. Populacje grzyba *S. sclerotiorum* w zależności od miejsca pochodzenia są często odległe genetycznie, co wskazano przy pomocy analizy RAPD i analizy podobieństwa wg Nei&Li. Potwierdzono zależność patogeniczności użytych izolatów *S. sclerotiorum* od zdolności do wytwarzania kwasu szczawowego oraz wpływ opadów i temperatury przez 7 dni od inokulacji rzepaku ozimego na stopień porażenia roślin.

Praca jest jak wspomniano wcześniej napisana bardzo poprawnie i nie budzi większych zastrzeżeń jednak autorka nie ustrzegła się kilku małych nieścisłości. Wydaje się, że w spisie treści można było dla ułatwienia zamieścić rozdział Spis tabel i Spis wykresów z podaniem stron, zamiast podanie po rozdziałach Załącznik 1, Załącznik 2 i Załącznik 3. W podrozdziale 1.1 opisujących rzepak zabrakło ekonomicznego znaczenia rzepaku i wpływu atrakcyjności ekonomicznej uprawy rzepaku na wielkość powierzchni uprawy tego gatunku w Polsce. Opisując objawy powodowane na rzepaku przez grzyb *S. sclerotiorum* autorka stwierdziła, że mogą one występować na wszystkich częściach rośliny. Literatura nie podaje, aby na korzeniach występowały objawy choroby, a to też jest ważna część rośliny.

Omawiając ochronę rzepaku przed zgnilizną twardzikową zamiast wymieniać substancje czynną azoksystrobinę można było napisać, że do walki chemicznej można używać kilka s.cz. z grupy chemicznej strobiluryn i triazoli oraz z innych grup chemicznych zarejestrowanych do zwalczania tej choroby. W tym rozdziale użyto (6 wiersz od dołu) słowo „w ziemi” a poprawniej byłoby w glebie. Są to mało istotne drobne błędy, które w żadnym stopniu nie wpływają na wartość recenzowanej pracy. Ze względu na dużą wartość naukową

pracy, która zawiera wyniki po raz pierwszy uzyskane w Polsce i których dotychczas brakuje w literaturze naukowej zwracam się z prośbą, aby Dyrekcja IHAR-PiB wyróżniła nagrodą ten doktorat.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas pt. „Charakterystyka wybranych populacji *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i ocena odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na tego patogena” odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Marek Korbas