

Warszawa, dnia 15.08.2022

Prof. dr hab. Wojciech Wakuliński
Instytut Nauk Ogrodniczych
SGGW w Warszawie
02-776 Warszawa, Nowoursynowska 159

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Lidii Anny Kowalskiej

pt „Selekcja genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew
(*Parastagonospora nodorum*) z wykorzystaniem metod biotechnologicznych”

Wprowadzenie

Formalną podstawą wykonania recenzji było pismo Dyrektora Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie dr inż. Michała Rokickiego (RN-001-103/2022) informujące o decyzji Rady Naukowej Instytutu w sprawie powołania recenzentów przedmiotowej dysertacji.

Rozprawa doktorska koncentruje się na możliwości uzyskania pszenżyta o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew. Znaczenie tematu wynika z oczywistego faktu, że Polska jest liderem w produkcji tego zboża na świecie oraz znaczenia septoriozy w uprawie pszenżyta. Poszukiwanie źródeł odporności na tę chorobę, poszerzanie zakresu zmienności oraz implementacja metod biotechnologicznych w hodowli odpornościowej jest jak najbardziej potrzebnym i wartościowym kierunkiem prac badawczych.

Dane formalne

Praca doktorska została napisana w układzie klasycznym, zawiera 8 rozdziałów obejmujących: wstęp i cel pracy, przegląd literatury, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis literatury oraz załączniki. Dysertacja zawiera 191 stron, 20 tabel 9 wykresów oraz 9 wykresów i 15 tabel przedstawiających dane wyjściowe, które zostały zamieszczone w załączniku rozprawy. Autorka cytuje 281 starannie dobranych pozycji literaturowych, istotnych z punktu widzenia realizacji tematu. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Ocena rozprawy

Wstęp ogólnie zarysowuje problem i znaczenie septoriozy liści i plew pszenżyta oraz podkreśla znaczenie hodowli odpornościowej jako metody ochrony roślin, zwłaszcza w kontekście ograniczania stosowania ochrony chemicznej. Rozdział ten przedstawia także cel dysertacji, którym była selekcja genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. W pracy wyróżnione zostały trzy cele szczegółowe precyzujące kierunek prowadzonych badań, były to:

- wyprowadzenie linii somaklonalnych i podwojonych haploidów pszenżyta ozimego;
- analiza fenotypowa odporności siewek w warunkach kontrolowanego środowiska i roślin dorosłych w warunkach polowych;
- analiza fenotypowa odporności badanych linii na efektor białkowy SnTox3, produkowany przez *P. nodorum*.

Postawiona hipoteza naukowa zakładała, że: zastosowanie metod biotechnologicznych oraz testów przesiewowych z wykorzystaniem efektora białkowego SnTox3 umożliwi wyprowadzenie linii pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew.

Należy stwierdzić, że cel pracy oraz cele szczegółowe jak również hipoteza badawcza zostały poprawnie sformułowane były konkretne i jednoznacznie wyznaczały zakres i kierunek badań.

Przegląd literatury obejmujący 33 strony, wzbogacony został 6 rycinami i 3 tabelami w sposób rzeczowy, spójny a jednocześnie kompleksowy odnosi się do symptomatologii, etiologii, epidemiologii, patogenezы oraz hodowli odpornościowej jako metody ochrony przed septoriozą liści i plew pszenżyta. Tę część dysertacji rozpoczyna podrozdział poświęcony pochodzeniu pszenżyta, historii hodowli i pozycji systematycznej gatunku. Jak podkreśla Autorka Polska jest liderem w produkcji tego zboża na świecie. W 2020 roku w Polsce wyprodukowano 6 mln ton co stanowiło aż 39% światowej produkcji tego zboża. Przytaczane dane GUS 2019 wskazują, że pod względem powierzchni uprawy zbóż w Polsce, pszenżyto zajmuje drugie miejsce, po pszenicy z 17% udziałem. Przegląd literatury podkreśla kluczowy wkład polskich hodowców w hodowlę twórczą pszenżyta w tym Tadeusz Wolskiego z Poznańskiej Hodowli Roślin (dzisiaj firma Danko), który zarejestrował w 1982 pierwszą w Polsce odmianę 'Lasko'. Odmiana ta była najbardziej rozpowszechnioną odmianą na świecie i odegrała decydującą rolę we wprowadzeniu pszenżyta do uprawy na szeroką skalę. Obecnie w Krajowym Rejestrze (KR) Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU) zarejestrowano 46 odmian pszenżyta ozimego, z czego 36 to odmiany krajowe. W Polsce uprawia się również odmiany pszenżyta jarego. Krajowy rejestr pszenżyta jarego liczy 16 odmian, wszystkie polskiej hodowli (COBORU 2021). Przegląd literatury podkreśla zalety pszenżyta, które łączy wiele pozytywnych cech pszenicy i żyta. Podkreślone zostały niższe wymagania klimatyczno-glebowe niż pszenicy co stwarza możliwość uprawy pszenżyta na glebach lekkich przy stosunkowo niskich kosztach produkcji przy jednoczesnym wysokim potencjale plonowania. Jak zaznaczono na atrakcyjność pszenżyta mają wpływ jego prozdrowotne cechy związane z zawartością błonnika, fitoestrogenów, związków fenolowych o charakterze przeciwutleniaczy, witamin i mikroelementów. Dodatkowym atrybutem pszenżyta jak podkreśla Autorka są niższe wymagania nawożenia oraz mniej intensywne środki ochrony chemicznej niż w przypadku pszenicy. Omówione zostały także najważniejsze choroby spotykane w uprawie pszenżyta wraz z oceną ich szkodliwości w oparciu o stratę plonu i strat finansowych z jakimi należy się liczyć w przypadku wystąpienia najczęściej występujących chorób, to znaczy: mączniaka prawdziwego, rdzy żółtej, septoriozy liści i plew, rdzy brunatnej, fuzariozy kłosów, łamliwości źdźbła pleśni śniegowej oraz rynchosporiozy liści. Autorka podkreśla, że pszenżyto było uważane za zboże charakteryzujące się wysokim stopniem odporności na szereg patogenów zbóż drobnoziarnistych jednak w ostatnim okresie obserwowany jest proces adaptacji szeregu patogenów do tego nowego gatunku, uprawianego na coraz szerszą skalę. Przedstawiając etiologię jako przyczynę septorioz wymienione zostały cztery gatunki to znaczy: *Zymoseptoria tritici* (Desm.), *Parastagonospora avenae* (A. B. Frank), *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) oraz *P. nodorum* podkreślając, że ostatni z wymienionych jest główną przyczyną choroby w uprawie pszenżyta. Przytoczona jest aktualna nazwa gatunku, która konsekwentnie jest stosowana w całej rozprawie a podana pozycja systematyczna patogenu nie budzi zastrzeżeń jednakże powoływanie się na prace z ubiegłego wieku z zastosowaniem ITS jako podstawą filogenetycznej analizy jest słabą rekomendacją. Jak zaznaczono *P. nodorum* jest gatunkiem heterotalicznym tworzącym obficie morfę mitotyczną i meiotyczną. Anamorfa jak też teleomorfa odgrywają istotną rolę w epidemiologii septoriozy będąc istotnym źródłem infekcji pierwotnych i wtórnych. Jak słusznie zaznaczono tworzenie się i uwalnianie ogromnej ilości zarodników konidialnych z piknidiów jest bezpośrednią przyczyną gwałtownego rozwoju choroby o epidemicznym nasileniu. Powszechne występowanie w cyklu rozwojowym patogenu teleomorfy ma wpływ na obserwowaną zmienność populacji grzyba. Przejawy zmienności wewnątrzgatunkowej Autorka dokumentuje w podrozdziale opisującym specjalizację pasożytniczą *P. nodorum*. Jest to gatunek charakteryzujący się wąskim zakresem żywicieli natomiast posiada zdolność biosyntezy szeregu (9.) białek efektorowych: SnToxA (Stagonospora nodorum Toxin A) SnTox1 (Stagonospora nodorum Toxin 1) SnTox2 (Stagonospora

nodorum Toxin 2) – SnTox3 (Stagonospora nodorum Toxin 3) SnTox4 (Stagonospora nodorum Toxin 4) SnTox5 (Stagonospora nodorum Toxin 5) SnTox6 (Stagonospora nodorum Toxin 6) SnTox7 (Stagonospora nodorum Toxin 7). Spośród 9. rozpoznanych efektorów pięć zostało sklonowanych: SnToxA, SnTox1, SnTox3, SnTox5 oraz SnTox267. Większość izolatów *P.nodorum* w Europie posiada geny warunkujące biosyntezę SnTox1 i SnTox3. Mając na uwadze, większą wrażliwość odmian pszenicy na SnTox3 niż SnToxA, powszechne występowanie wrażliwości ten efektor białkowy wśród odmian polskich oraz cele dysertacji przytoczona została szczegółowa charakterystyka efektora białkowego SnTox3. Jak podaje doktorantka SnTox3 jest niewielkim białkiem egzogenicznym 25,3kDa które wprowadzone do tkanek gospodarza Snn3 indukuje dwa typy zmian określanymi jako reakcja chlorotyczna i/lub nekrotyczna. Istotną część przeglądu literatury stanowi jego fragment poświęcony odporności roślin na patogeny streszczający ponad stu letnie osiągnięcia w tym zakresie. W ujęciu historycznym od prac Bifena z 1905 wskazujących na genetyczne podstawy odporności zbóż na *P. striiformis* po prace Flora a na modelu zigzag Jonesa i Dangla kończąc przedstawione zostały hipotezy opisujące interakcję patogenów i gospodarzy. Ta część przeglądu literatury stanowi tło wprowadzające czytelnika w szczegóły molekularnych podstaw patogenezy, odporności roślin na septoriozę liści i plew oraz stosowanych metod hodowlanych z zakresu hodowli odpornościowej na *P.nodorum*. Charakteryzując hodowlę odpornościową jako metodę ochrony oraz stosowane rozwiązania hodowlane szczególna uwaga została zwrócona na metody biotechnologiczne w tym somatyczną embriogenezę i androgenezę zastosowanie których przyspiesza proces hodowlany, poszerza zakres obserwowanej zmienności a tym samym gwarantują osiągnięcie postęp hodowlanego. Opisując metodę podwojonych haploidów jako punkt wyjścia dla tej metody przedstawiona została androgeniza jako rozwiązanie umożliwiające pozyskanie form o gametycznej liczbie chromosomów. Po przywróceniu somatycznej liczby chromosomów uzyskuje się regeneranty całkowicie homozygotyczne tzw. podwojone haploidy. Jak podkreślono technika posiada znaczący potencjał badawczy jak też aplikacyjny, znajduje zastosowanie m.in. w ilościowym i jakościowym mapowaniu cech zapewniając lepsze oszacowanie efektów QTL w badaniach asocjacji marker-cecha natomiast w hodowli umożliwia poprawę cech agronomicznych roślin uprawnych przy zredukowanym czasie, ograniczonej przestrzeni co bezpośrednio wpływa na wydajność hodowli. Somatyczna embriogeneza jest drugą techniką biotechnologiczną która w kontekście hodowli odpornościowej przybliży Autorka. Jak zostało podkreślone kluczowym z punktu widzenia hodowli i generowania zmienności jest obserwowane zjawisko zmienności somaklonalnej, które gwarantuje zmienność regenerantów w stosunku do form rodzicielskich.

W podsumowaniu przegląd literatury jest bardzo gruntownym kompendium wiedzy nt. *P. nodorum*. Obejmuje wszystkie zagadnienia istotne z punktu widzenia realizowanego doktoratu. Tekst jest merytorycznie przemyślany, napisany generalnie z dużą dbałością o czytelnika, wielowątkowy bez niedomówień świadczy o dobrej znajomości rozległej problematyki i stanowi bardzo dobre wprowadzenie w przedmiot pracy.

Rozdział Materiał i metody został przedstawiony na 26 stronach, uwzględnia wszystkie wykorzystywane w trakcie realizacji doktoratu materiały, techniki i metody. Doktorantka opisuje materiał roślinny wykorzystywany w realizacji doktoratu, metodykę otrzymywania linii somaklonalnych, i linii podwojonych haploidów, stosowane izolaty *P.nodorum*, sposoby uzyskiwania inokulum patogenu oraz otrzymywanie efektora białkowego. Przedstawiony został szczegółowy układ doświadczeń polowych. Dane meteorologiczne i metody zastosowane do statystycznego opracowania wyników. Zastosowane metody są właściwe, umożliwiały uzyskanie przewidzianych celów a przedstawiony opis jest wyczerpujący i precyzyjny.

Wyniki badań Autorka przedstawiła na 33 stronach w czterech podrozdziałach, które dokumentują odporność roślin na porażenie przez *P.nodorum* w doświadczeniach polowych, warunkach kontrolowanego środowiska, wrażliwość na efektor białkowy oraz analizę wpływu czynników meteorologicznych na rozwój epidemii. Wyniki zostały zawarte w tabelach (15), wykresach (7) oraz tabelach (10) i wykresach (9) stanowiące załącznik dysertacji.

W doświadczeniach polowych, przeprowadzanych w warunkach kontrolowanego środowiska oraz oceniających wrażliwość roślin na efektor białkowy *P.nodorum* wykorzystywano ten sam zestaw genotypów pszenżyta to znaczy: 19 linii podwojonych haploidów, 18 linii somaklonalnych, 2 odmiany wzorcowe (Fredro i Pigmej) oraz 7 odmian rodzicielskich (Alegro, Borowik, Borwo, Cyrkon, Meloman, Panteon i Tomko). Doświadczenie polowe założono metodą losowych bloków, które było realizowane w trakcie trzech kolejnych sezonów wegetacyjnych 2018, 2019, 2020. Rośliny były inokulowane zawiesiną zarodników *P.nodorum* trójrotnie tj. pod koniec stadium nabrzmiewania kłosa, 10 dni po pierwszej inokulacji oraz po wykłoszeniu roślin. Ocenę porażenia liści i kłosów roślin wykonywano przy zastosowaniu 9 stopniowej skali bonitacyjnej, w odstępach tygodniowych począwszy od pojawienia się pierwszych symptomów choroby. Ocenę stanowiła średnia z pomiarów zakażonych poletek. Ponadto ocenę stopnia porażenia liści wykonywano cyfrowo przy pomocy programu ImageJ pozwalającego określić powierzchnię blaszki z objawami chorobowymi.

W doświadczeniach polowych, średnio w ujęciu trzyletnim największą odpornością na porażenie liści przez *P.nodorum* charakteryzowały się odmiany (5,9 w 9^o) były one istotnie bardziej odporne na porażenie niż linie somaklonów (5,4 w 9^o). Stopień odporności linii podwojonych haploidów (5,6 w 9^o skali) nie różnił się istotnie od odporności odmian i somaklonów. Merytorycznie takie same wyniki uzyskano stosując do oceny stopnia porażenia liści program Image J. Średni stopniem porażenia kłosów badanych odmian, linii podwojonych haploidów i linii somaklonalnych, nie różnił się i był równy 5 w 9^o skali. W poszczególnych latach badań wartości stopnia porażenia liści wyrażane w skali % i bonitacyjnej (9^o) były bardzo zmienne zarówno w zakresie wartości bezwzględnych jak również relacji pomiędzy poszczególnymi grupami badanych genotypów (linii somaklonalnych, linii podwojonych diploidów oraz odmian). W każdym z trzech lat badan najsilniej były porażone linie somaklonalne natomiast przy zastosowaniu skali bonitacyjnej największą odpornością (najmniejszym porażeniem) niezależnie od roku charakteryzowała się populacja badanych odmian. Wyniki obrazujące stopień porażenia liści w wartościach procentowych po ich uprzednim transformacji logarytmicznej poddano jednoczynnikowej analizie wariancji i po stwierdzeniu występowania różnic istotnych przeprowadzono szczegółowe porównanie średnich z zastosowaniem testu Duncana co pozwoliło na wyróżnienie 9 grup jednorodnych (tabela 9). Było to następnie podstawą arbitralnego wyróżnienia czterech grup (odporne, średnio odporne średnio podatne i podatne) w obrębie badanych genotypów.

Ocenę stopnia porażenia prowadzono także w warunkach kontrolowanego środowiska. Ocenie poddawano po 8 siewek każdego z genotypów. Czternastodniowe rośliny mające w pełni wykształcony drugi liść były inokulowane zawiesiną zarodników *P.nodorum*. Stopień porażenia liści analizowano programem Image J w oparciu o obraz cyfrowy losowo zebranych liści. Jak przedstawiono na wykresie 3a istotnie najsłabiej były porażone linie somaklonalne natomiast najsilniej odmiany. W poszczególnych latach badań 2018, 2019, 2020 (wykres 2 str. 87) wartości bezwzględne stopnia porażenia badanych genotypów były zmienne natomiast niezależne od roku badań najmniejszą powierzchnią porażonej tkanki charakteryzowały się linie somaklonalne. Wyniki obrazujące stopień porażenia liści w wartościach procentowych po ich uprzednim transformacji logarytmicznej poddano jednoczynnikowej analizie wariancji i po stwierdzeniu występowania różnic istotnych statystycznie przeprowadzono szczegółowe porównanie średnich z zastosowaniem testu Duncana co pozwoliło na wyróżnienie 7 grup jednorodnych (Tabela 10 str. 95). Wykonana analiza statystyczna była podstawą arbitralnego wyróżnienia czterech grup genotypów odporne, średnio odporne średnio podatne i podatne.

Analiza korelacji pomiędzy porażeniem liści pszenżyta w warunkach kontrolowanego środowiska (TIn) i polowych (TIn) była statystycznie istotna z ryzykiem błędu (0,05) i wynosiła -0,59. Istotną korelację stwierdzono także pomiędzy porażeniem liści pszenżyta w warunkach kontrolowanego środowiska (TIn) a porażeniem liści w 9^o skali (0,37) oraz porażeniem kłosów w 9^o skali (0,29). Istotną korelację stwierdzono także pomiędzy parametrami przyjętymi do oceny stopnia porażenia liści w warunkach polowych tj 9^o skalą bonitacyjną i powierzchnia zniszczonej tkanki wyrażonej w % (-0,45).

Ocenę jakościową wrażliwości genotypów na efektor białkowy przeprowadzano poprzez infiltrację do tkanek 50 µl preparatu uzyskanego w wyniku wzrostu *Pichia pastoris* z genem Sntox3 pod plazmidem pGAPZA. W przeprowadzonym teście cechy wrażliwości wykazywało 73% linii dihaploidalnych, 38% linii somaklonalnych i 33% badanych odmian. W grupie obiektów odpornych i średnioodpornych wszystkie odmiany wykazywały brak wrażliwości w przeprowadzonym teście, natomiast wrażliwość na efektor wykazały wszystkie odmiany z grupy genotypów podatnych oraz pojedyncza linia dihaploidalna. W pozostałych przypadkach stwierdzono zróżnicowaną reakcję linii somaklonalnych i podwojonych haploidów oraz odmian w wyróżnionych grupach odporności. Wykonana analiza korelacji wykazała istotną statystycznie, dodatnią zależność między wrażliwością na efektor SnTox3 a porażeniem badanych linii pszenżyta ozimego w warunkach polowych w roku 2018 (0,35) i 2020 (0,27) oraz między wrażliwością na SnTox3 a porażeniem genotypów pszenżyta ozimego w warunkach kontrolowanego środowiska w 2019 roku (0,37). W poszczególnych latach dla poszczególnych grup genotypów (linii dihaploidalnych, odmian i linii somaklonalnych) korelacja pomiędzy porażeniem liści w warunkach polowych (TIn) i wrażliwością na efektor białkowy jak również korelacja pomiędzy porażeniem liści i w warunkach kontrolowanego środowiska (TIn) i wrażliwością na efektor białkowy była statystycznie istotna jak też nieistotna a współczynnik korelacji wykazywał znaczącą zmienność. W przypadku linii dihaploidalnych w roku 2019 wartość współczynnika korelacji pomiędzy porażeniem liści i w warunkach kontrolowanego środowiska (TIn) i wrażliwością na efektor białkowy wynosiła 0,55 natomiast -0,28 w roku 2020.

Na uwagę zasługuje przeprowadzona analiza skupień uwzględniająca wszystkie przyjęte miary porażenia warunki jak też badane obiekty (wykres 9). Wynika z niej dość jednoznaczna tendencja, że badane obiekty wrażliwe na efektor charakteryzowały się odpornością na porażenie w skali 0-9 oraz genotypy wrażliwe na badany efektor lokują się w grupie obiektów o silnym porażeniu % ocenianym w warunkach polowych i kontrolowanego środowiska. W przeprowadzonej analizie elementy składowe główne odpowiadały za 76 % obserwowanej zmienności wyników.

Wykraczając poza określone cele dysertacji Autorka przeprowadziła także wartościową analizę parametrów hydrotermicznych (średnia temperatura, wilgotność względna i suma opadów) mających wpływ na rozwój epidemii a tym samym stopień porażenia genotypów w warunkach polowych.

W podsumowaniu tej części dysertacji należy stwierdzić, że rzetelność przedstawionych wyników nie budzi wątpliwości. Autorka przedstawiła dane wyjściowe jak również ich starannie opracowaną syntezę z uwzględnieniem analizy statystycznej.

Dyskusja została przedstawiona na 11 stronach i odnosi się do wszystkich wyników zaprezentowanych w dysertacji. Omawiając odporność pszenżyta na *P.nodorum* w kontekście cytowanej literatury Autorka podkreśla, że występowanie odporności w tym odporności całkowitej jest cechą niezmiernie rzadką. Fakt ten znalazł także odzwierciedlenie w wynikach przeprowadzonych badań gdzie żaden z badanych genotypów spośród przebadanych 18 linii somaklonalnych i 19 linii podwojonych haploidów oraz 9 odmian nie wykazywał cech pełnej odporności. Niewątpliwie jednak somatyczna embriogeneza i androgeneseza jest źródłem zmienności, która może być wykorzystane w hodowli odpornościowej. Autorka badając 18 linii somaklonalnych o różnym pochodzeniu wykazała występowanie istotnej zmienności dotyczącej wrażliwości na porażenie przez *P.nodorum* oraz zastosowany efektor tego patogenu. Dyskutując to zagadnienie Autorka przytacza prace Aruna (2003), który wyselekcjonował

linie somaklonalne pszenicy o podwyższonej odporności na *P.tritici-repentis* jak również Górala i Arseniuka 2003, którzy uzyskali linie pszenżyta na drodze somatycznej embriogenezy o zmienionej reakcji na fuzariozę kłosów. Autorka podkreśla także przytaczany w literaturze fakt wskazujący na znaczenie pokolenia po przeprowadzonej embriogenezie na stopień porażenia. Odzwierciedleniem wyników przedstawionych w dysertacji jest cytowana literatura wskazująca na trudny do przewidzenia efekt somatycznej embriogenezy i adriogenezy. Efekt fenotypowy może być lepszy lub gorszy biorąc jako odniesienie formy wyjściowe. Autorka wskazuje na sukces hodowalany z zastosowaniem linii powojonych haploidów który doprowadził do uzyskania odmiany 'Borowik'. Odmiana ta odznaczała się wysokim plonem ziarna a także wysoką odpornością na mączniaka prawdziwego, rdzę brunatną, rhynchosporiozę, septoriozę liści i plew oraz choroby podstawy źdźbła. Autorka odnosi się w dyskusji do bardzo istotnego zagadnienia jakim jest odporność w różnych fazach rozwojowych. Jak udowodniono w dysertacji odporność w fazie siewek na *P.nodorum* i roślin w późniejszych fazach rozwojowych nie koreluje ze sobą, nie stwierdzono także związku pomiędzy porażeniem kłosów i liści. Podobny charakter zależności pomiędzy odpornością w fazie siewek i roślin dojrzałych ale w przypadku pszenicy stwierdzili m.in Rosielle i Brown 1980, Fried i Meister 1987, Bostwick i in. 1993, Czembor i in. 2003, 2019, Shankar 2008). Nie stwierdzono także zależności pomiędzy porażeniem liści i kłosów co może wynikać z różnego podłoża genetycznego i ekspresji odporności w tych różnych organach roślin a przynajmniej tak wynika z cytowanych prac (Fried i Meister 1987, Wicki i in. 1999, Aguilar i in. 2005). Szczegółowa dyskusja została także przeprowadzona w kontekście zebranych i uzyskanych wyników epidemiologicznych.

Merytoryczną część dysertacji kończy 9 wniosków. Są one poprawnie sformułowane znajdują uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach. Tym niemniej w opinii recenzenta wniosek drugi powinien zostać doprecyzowany. Autorka stwierdza, że "Zmienność linii somaklonalnych i podwojonych haploidów może być stosowana jako dodatkowe źródło odporności pszenżyta ozimego na patogeny" Przeprowadzone badania upoważniają do wypowiedzania się w kwestii *P.nodorum* a nie generalnie patogenów.

Uwagi i pytania

1. W przeglądzie literatury, w kompleksie patogenów odpowiedzialnych za septoriozę liści i plew Autorka wymienia *Pyrenophora tritici-repentis*. Trudno zaakceptować powyższe stanowisko. Nazwa choroby „septorioza” związana jest z nazwą anamorfy patogenu (Septoria). W bogatej historii *P.tritici-repentis* aczkolwiek występują różne synonimy gatunek nie był nigdy opisany z zastosowaniem nazwy rodzajowej Septoria. Nie ma zatem podstaw aby gatunek ten włączać do kompleksu septorioz.
2. Wiedza na temat efektorów patogenów w tym efektorów *P.nodorum* jest nieustanie poszerzana. Wiele uwagi poświęcono między innymi SnToxA, który jest przykładem efektora białkowego występującego także w przypadku *P.tritici-repentis*. W jaki sposób można wytłumaczyć jego obecność u dwóch niespokrewnionych ze sobą gatunków?
3. Na stronie 43 rozprawy znajduje się stwierdzenie, że „Efektory białkowe *P. nodorum* uważane są za czynnik wirulencji tzn. wpływają na stopień rozwoju choroby” a jednocześnie przytaczane są wyniki doświadczeń (str. 45) wskazujące, że efektor SnTox3 wprowadzony do niepatogenicznego szczepu *P. nodorum* czyni go patogennym dla rośliny posiadającej gen Snn3. Czy zatem efektory na gruncie współczesnej wiedzy należy traktować jako czynniki patogeniczności czy też czynniki wirulencji?
4. Wykres 2 (str. 87) który przedstawia porażenie liści i kłosów przez *P.nodorum* nie podaje niestety liczbowej wartości porażenia liści i kłosów w skali 9^o, należy je aproksymować na podstawie wartości przypisanych do osi rzędnych zastosowanego układu kartezjańskiego. Nie

jest to rozwiązanie ani łatwe ani jednoznaczne dla przyjętej skali i porównywanych obiektów. Wykres 2 nie zawiera oznaczeń pozwalający stwierdzić czy różnice pomiędzy poszczególnymi wynikami są istotne statystycznie.

5. Aczkolwiek przedstawione wyniki stanowią merytorycznie i objętościowo znaczącą część doktoratu uważam, że wizerunkową szkodą dla dysertacji było pominięcie w wynikach efektów prac prowadzących do uzyskania linii somaklonalnych i podwojonych haploidów pszenżyta ozimego. Ich wyprowadzenie było przecież jednym z celów szczegółowych, tym samym pokazanie wyników obrazujących wydajność poszczególnych etapów uzyskiwania linii somaklonalnych i podwojonych haploidów byłoby cenne.
6. Dane szczegółowe pokazujące reakcję poszczególnych genotypów na efektor białkowy były niekiedy zmienne. W warunkach kontrolowanych ten sam genotyp w jednym roku charakteryzował się wrażliwością w kolejnym roku brakiem wrażliwości, jak taki fakt należy interpretować i co jest jego przyczyną?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu przedstawiona dysertacja doktorska jest oryginalnym, wartościowym i bardzo rzetelnym opracowaniem o charakterze wdrożeniowym. Należy docenić, że powstała idea takiego tematu, z sukcesem został podjęty trud zdobycia środków finansowych na jego realizację a wielowątkowy temat został wykonany. Aplikacyjny charakter doktoratu jest oczywisty i widoczny w możliwości wykorzystania wyników w hodowli twórczej. Jednocześnie pozytywne z punktu widzenia celów dysertacji wyniki otwierają drogę do dalszych prac z wykorzystaniem embriogenezy i andriogenezy w hodowli. Widzę także możliwość wykorzystania danych epidemiologicznych do opracowania systemu wspomagania decyzji z zastosowaniem tradycyjnych metod ochrony. Pod względem językowym stylistycznym i edytorskim praca przygotowana w zasadzie nienagannie a żargon naukowy obecny jest sporadycznie. Uwagi, które zostały przedstawione w recenzji w żaden sposób nie deprecjonują wartości rozprawy, która w mojej opinii spełnia wszelkie wymagania ustawy z 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również ustawy z 3 lipca 2018 - Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Mając powyższe na uwadze wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr Lidii Kowalskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.


Prof. dr hab. Wojciech Wakuliński