Bydgoszcz, 20.07.2020 r.

Dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. uczelni
Pracownia Fitopatologii i Mykologii Molekularnej
Katedra Biologii i Ochrony Roślin
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Adriana Duby pt. „Zdrowotność wybranych gatunków rodzaju *Triticum* L. jako wynik morfologicznych i genetycznych mechanizmów obronnych roślin"

Praca została wykonana w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Urszuli Wachowskiej, promotor pomocniczy dr Katarzyna Głowacka

Podstawą przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej stanowi monotematyczny cykl czterech oryginalnych recenzowanych prac twórczych współautorstwa mgr Adriana Duby, ponumerowanych przez Doktoranta w kolejności od P1 do P4:

P1. Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U. 2018. A review of the interactions between wheat and wheat pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp. and *Parastagonospora nodorum*. International Journal of Molecular Sciences, 19(4), 1138.

P2. Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U. 2019. Trichothecene genotypes analysis of *Fusarium* isolates from di-, tetra- and hexaploid wheat. Agronomy, 9(11), 698.

P3. Duba A., Goriewa-Duba K., Wachowska U., Głowacka K., Wiwart M. 2019. The associations between leaf morphology, phenylalanine ammonia lyase activity, reactive oxygen species, and *Fusarium* resistance in selected species of wheat with different ploidy levels. Plants, 8(10), 360.

P4. Duba A., Wachowska U. 2018. Podatność diploidalnych, tetraploidalnych i heksaploidalnych gatunków pszenicy na porażenie przez *Zymoseptoria tritici* i *Blumeria graminis*. Progress in Plant Protection, 58(4), 270-274.

Zawartość merytoryczna publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska jest zgodna z tytułem rozprawy doktorskiej, w związku z czym spełniony został warunek formalny polegający na spójności tematycznej prac zgłaszanych jako osiągnięcie naukowe. Publikacje te dotyczą zdrowotności różnych genotypów pszenic oraz morfologicznych, biochemicznych i genetycznych mechanizmów warunkujących odporność tych roślin.

Publikacje Doktoranta, przedstawione jako rozprawa doktorska, ukazały się w czasopismach posiadających wysoką renomę naukową, o profilu w pełni odpowiadającemu tematyce osiągnięcia Doktoranta. Wybór tych czasopism stanowi dobrą rekomendację

wysokiej jakości wykonanych badań i ich wartości naukowej. Trzy pierwsze publikacje ukazały się w czasopismach posiadających Impact Factor (IF), którego sumaryczna wartość wynosi 9,074. Łączna wartość punktowa wszystkich czterech publikacji, według MNiSW stanowi 290 pkt.

Udział własny pana mgr A. Duby w poszczególnych publikacjach wskazanych jako osiągniecie naukowe jest znaczny. W dwóch pierwszych pracach wynosi on 65%, natomiast w pozostałych dwóch 70%. Udział Doktoranta polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji prac, wykonaniu badań, interpretacji uzyskanych wyników, zebraniu najważniejszych informacji w formie tekstu manuskryptu i tabel, opisaniu wniosków i dyskusji, przygotowaniu manuskryptu do druku. Wszyscy współautorzy powyższych publikacji złożyli stosowne oświadczenia o swym udziale w pracach, wskazanych przez Doktoranta jako cykl publikacji składających się na rozprawę doktorską, który wynosi od 5% do 30%.

Z oświadczeń Doktoranta oraz oświadczeń współautorów wyraźnie wynika, iż miał on znaczący udział na każdym etapie powstawania publikacji stanowiących osiągnięcie. We wszystkich pracach mgr A. Duba jest pierwszym autorem. Przedstawiony w cyklu publikacji dorobek jest oryginalny i bezsprzecznie posiada dużą wartość naukową. Jednocześnie dorobek ten stanowi niewątpliwie novum naukowe, dowodzące znacznego wkładu Doktoranta w rozwój badań dotyczących morfologicznych, biochemicznych i genetycznych mechanizmów obronnych roślin różnych genotypów gatunków rodzaju *Triticum* na porażenie przez grzyby rodzaju *Fusarium*, *Zymoseptoria tritici*, *Parastagonospora nodorum* i *Blumeria graminis*. Szczególną uwagę zwrócił na istotną rolę identyfikacji genów warunkujących odporność roślin oraz poszukiwanie i potencjalne wykorzystanie źródeł odporności, w tym linii reliktowych gatunków rodzaju *Triticum*, w dalszej hodowli odpornościowej odmian i wprowadzaniu ich do praktyki jako istotny element integrowanej ochrony pszenicy przed chorobami. Na tej podstawie uznaję, że wskazane osiągnięcie spełnia wszystkie wymogi stawiane obecnie rozprawom doktorskim. Przedstawione badania mieszczą się zarówno w obszarze badań podstawowych, jak i stosowanych, a ich wyniki przedstawiają istotne znaczenie praktyczne.

Zbiór czterech oryginalnych prac twórczych Doktorant poprzedził dość obszernym, liczącym 33 strony opracowaniem, które zaczyna się streszczeniem rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim. Następnie zamieścił wstęp. Na podstawie dotychczasowego stanu wiedzy Autor sformułował cztery hipotezy badawcze i wyróżnił 5 celów szczegółowych, które w toku badań zostały osiągnięte. Rozbudowany przegląd literatury zajmuje 7,5 stron opracowania a opis metod badawczych 4,5. Następnie dokonał opisu najważniejszych wyników przeprowadzonych badań przedstawionych w publikacjach. Opracowanie podsumowuje 12 wnioskami, a kończy je spisem najważniejszych pozycji literatury wykorzystanych przy wykonaniu rozprawy doktorskiej i wykazem publikacji składających się na pracę doktorską.

Pierwsza publikacja (P1), przedstawiona jako rozprawa doktorska, jest pracą przeglądową, uwzględniającą 150 pozycji literatury, zawierającą bardzo dobrze przeprowadzony przegląd dotychczasowych wyników badań dotyczących interakcji między roślinami pszenicy a jej najważniejszymi patogenami: *Z. tritici*, *P. nodorum* i *Fusarium* spp. Publikacja ta stanowi bardzo dobry wstęp dla całego opracowania. Przedstawiono w niej przebieg procesu infekcyjnego dla hemibiotroficznych grzybów rodzaju *Fusarium* i *Z. tritici*, oraz nekrotroficznego *P. nodorum*. Zwrócono uwagę na istotną rolę poszczególnych związków biorących udział w tym procesie, zarówno tych wytwarzanych przez roślinę, jak i przez patogeny. Scharakteryzowano znaczenie morfologicznych i anatomicznych barier warunkujących odporność roślin pszenicy na powyższe patogeny. Szczególną uwagę zwrócono na uwarunkowania na poziomie genetycznym decydujące o odporności roślin na wcześniej wymienione grzyby, w tym na zaangażowanie genów w kodowaniu odporności. Na koniec przedstawiono praktyczne możliwości wykorzystania mechanizmów obronnych pszenicy w jej ochronie przed chorobami. Informacje zawarte w publikacji nr P1 były cytowane tylko w przeglądzie literatury rozprawy doktorskiej. Dla podkreślenia, iż publikacja ta stanowi integralną część rozprawy doktorskiej warto było to wyraźnie zaznaczyć, np. podając „**P1**, Duba i in. 2018", czyli w takim samym stylu jak w dalszej części opracowania cytowano pozostałe prace stanowiące osiągniecie.

Pozostałe trzy prace stanowiące rozprawę doktorską bazują już na eksperymentach naukowych, realizowanych w warunkach polowych, szklarniowych i laboratoryjnych. Wykorzystany w nich materiał badawczy stanowiły liczne linie 6 taksonów pszenicy o różnym stopniu ploidalności: diploidalny takson *T. monococcum* ssp. *monococcum*, tetraploidalne taksony *T. turgidum* ssp. *polonicum*, *T. turgidum* ssp. *durum* i *T. turgidum* ssp. *dicoccum* oraz heksaploidalne taksony *T. aestivum* ssp. *aestivum* i *T. aestivum* ssp. *spelta*. Rośliny te posłużyły miedzy innymi jako materiał do pozyskania kolekcji izolatów gatunków grzybów *Fusarium* wykorzystywanych w opracowaniu.

Na szczególną pozytywną ocenę zasługuje poprawne postepowanie metodyczne, często wykorzystujące nowoczesne techniki i sprzęt badawczy, oraz wzorowe opracowanie bardzo bogatych wyników. Gatunki *Fusarium* identyfikowano mikroskopowo i molekularnie, wykorzystując technikę PCR, PCR-ITS oraz multiplex PCR. W pracy zastosowano także metodę mikroskopii skaningowej w celu scharakteryzowania barier morfologicznych liści pszenicy. Badano także zmiany w aktywności enzymu amoniakoliazy fenyloalaniny w reakcji tworzenia kwasu cynamonowego. Ponadto, wykorzystano mikroskop konfokalny do zobrazowania stopnia akumulacji reaktywnych form tlenu podczas procesu infekcyjnego *F. culmorum* w tkankach pszenicy.

Prawidłowe zaplanowanie i staranne wykonanie pracochłonnych badań, umożliwiło uzyskanie wielu interesujących, a zarazem cennych danych. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej doświadczenia polowe, szklarniowe i analizy laboratoryjne pozwoliły na kompleksowe zbadanie interakcji pomiędzy roślinami pszenic a infekującymi je patogenami.

W warunkach naturalnych, na analizowanych heksaploidalnych liniach *T. aestivum* ssp. *aestivum* zazwyczaj najwięcej obserwowano objawów porażenia przez *Z. tritici* i *B. graminis*. Mniej objawów chorobowych stwierdzono na *T. aestivum* ssp. *spelta* i *T. aestivum* ssp. *aestivum* odmianie Sumai 3. Na tetraploidalnych liniach *T. turgidum* ssp. *polonicum* i *T. turgidum* ssp. *dicoccum* odnotowano przeciętne nasilenie objawów powodowanych przez *Z. tritici* oraz znikome dla *B. graminis*. W warunkach naturalnych na diploidalnych liniach *T. monococcum* ssp. *monococcum* zazwyczaj nie obserwowano żadnych objawów porażenia przez analizowane patogeny lub objawy te występowały sporadycznie, natomiast znacznie więcej objawów porażenia stwierdzono po inokulacji zarodnikami *Z. tritici* roślin uprawianych w szklarni.

Doktorant udowodnił, iż ziarno oraz plewy analizowanych linii *T. aestivum* ssp. *spelta* i *T. monococcum* ssp. *monococcum* były częściej zasiedlone przez grzyby rodzaju *Fusarium* niż pozostałych gatunków *Triticum*. Wśród przeanalizowanych izolatów *F. culmorum* i *F. graminearum* wyróżnił duży odsetek izolatów należących do genotypów NIV i 3-ADON.

Autor opracowania stwierdził, że budowa i liczba barier konstytutywnych różniła się pomiędzy analizowanymi gatunkami pszenicy. Większość analizowanych linii gatunków reliktowych pszenicy cechowała się większą liczbą trichomów niż linie pszenicy zwyczajnej oraz większą liczbą aparatów szparkowych niż odporna odmiana Sumai3. Zaobserwowano również inną budowę kryształów wosku pokrywających liście pszenicy. Linie pszenicy zwyczajnej tworzyła jednorodną zbitą strukturę zbudowaną z kryształów wosku, natomiast u innych gatunków obserwowano pojedyncze kryształy wosku rozmieszczone na powierzchni liści.

Oceniając odpowiedź biochemiczną linii pszenicy zwyczajnej i pszenicy orkisz na stres biotyczny na poziomie komórkowym stwierdzono wzrost aktywności enzymu amoniakoliazy fenyloalaniny i wzmożoną syntezę reaktywnych form tlenu w początkowych etapach po infekcji *F. culmorum*. W komórkach odpornej linii pszenicy orkisz, zawartość reaktywnych form tlenu pozostawała wysoka przez pięć dni po inokulacji. Natomiast u odpornej odmiany Sumai3 stwierdzono niski poziom syntezy i akumulacji reaktywnych form tlenu oraz niewielki wzrost aktywności enzymu amoniakoliazy fenyloalaniny.

Osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych oryginalnych badań podsumowane zostały dwunastoma wnioskami, które w większości są trafnie osadzone w wynikach badań. Wnioski te na ogół są poprawnie sformułowane, jednak moim zdaniem warto by przeredagować wniosek pierwszy.

Lektura powyższych publikacji świadczy, iż Doktorant potrafi przeprowadzić analizę uzyskanych wyników i wyciągnąć na tej podstawie odpowiednie wnioski. Ponadto wyniki własne umiejętnie konfrontuje z rezultatami badań innych autorów, zawartych w przytoczonych licznych pozycjach piśmiennictwa. Rozdziały dotyczące dyskusji wyników są zawsze bardzo obszerne, czytelne i prowadzone w sposób konsekwentny. Wynika z nich, iż Doktorant posiada szerokie rozeznanie w literaturze naukowej a jednocześnie umiejętność

krytycznego podejścia, zarówno do uzyskanych rezultatów własnych, jak i perspektyw szerszego wykorzystania wykonanych badań.

Stanowiące integralną cześć rozprawy doktorskiej opracowanie, w którym Doktorant dokonuje kompilacji czterech publikacji oryginalnych i podejmuje próbę przedyskutowania otrzymanych wyników, pomimo niewątpliwych walorów jakie praca ta posiada, jej lektura skłania do kilku uwag i sugestii, ze względu na stwierdzone uchybienia:

- W metodyce badawczej pojawiły się pewne rozbieżności dotyczące terminu oceny nasilenia porażenia. W rozprawie doktorskiej, powołując się na pracę nr P2, podano iż ocenę zdrowotności roślin wykonano w czterech terminach, tj.: w fazie strzelania w źdźbło (BBCH 31), w fazie kłoszenia (BBCH 61), fazie kwitnienia (BBCH 65) i fazie dojrzałości woskowej ziarna (BBCH 83), natomiast w oryginale tej pracy podano tylko fazy BBCH 75 i BBCH 89. Jeżeli te terminy ocen dotyczyły również innych prac należało je podać. Moim zdaniem wymienione terminy ocen dotyczyły pracy nr P3. Ponadto faza BBCH 61 to nie faza kłoszenia a początek kwitnienia.
- W rozprawie podano, iż oceniając obecność *Fusarium* spp. na ziarnie i plewach badanych pszenic ogólnie wyłożono 45 prób, natomiast w pracy nr P2 podano 52 próby (samples). W tym miejscu warto dodać, iż zamiast określenia „prób" należałoby stosować określenie „próbek".
- W rozprawie podano, że ilość i jakość wyizolowanego DNA sprawdzono za pomocą pomiaru absorbancji wykorzystując do tego celu NanoDrop 2000, Thermo Scientific, natomiast w pracy P2 podano NanoMaester Gen, Warsaw, Poland. Różnice dotyczyły również stężeń żelu agarozowego, na którym dokonywano reakcji rozdzielenia produktów.
- Zarówno w rozprawie doktorskiej, jak i w pracy P2, na którą się powoływano, w metodyce badań podano, iż tożsamość gatunkowa została potwierdzona poprzez zsekwencjonowanie konserwatywnego niekodującego regionu grzybów rodzaju *Fusarium*, który został amplifikowany z wykorzystaniem starterów ITS4 i ITS5. Z kolei w opisie wyników badań podano, że przeprowadzono amplifikację regionów ITS1 i ITS2.
- W pracy zdarzają się niezbyt trafne stwierdzenia. Miedzy innymi podano „Podczas pierwszych faz infekcji". Zapewne Doktorantowi chodziło o pierwsze etapy infekcji, gdyż infekcja jest jedną z faz przebiegu procesu chorobowego. Inne stwierdzenie to „bezobjawowej fazy infekcji". Oczywiście nie zawsze po infekcji obserwujemy objawy chorobowe, jednak objawy chorobowe można zaobserwować dopiero w fazie choroby właściwej, a nie podczas infekcji. Innym razem podano „w warunkach naturalnej infekcji na mikropoletkach". Infekcja jest procesem naturalnym, prawdopodobnie Autorowi chodziło o naturalną inokulację.
- W rozprawie doktorskiej zastosowano pewne uproszczenia. Brak objawów chorobowych nie zawsze oznacza, że nie doszło do infekcji i rośliny są odporne na infekcję. Warto pamiętać, iż rozwój patogenów może zostać zatrzymany również po fazie infekcji.

- Moim zdaniem warto unikać podawania polskich i łaciński nazw różnych gatunków pszenic w jednym zdaniu.
- Warto było doprecyzować stwierdzenie podane w streszczeniu (str. 3, ostatni wiersz) „Patogen *Z.* jest".

Powyżej wymienione sporadyczne, drobne uwagi i sugestie, często edytorskie, w żaden sposób nie umniejszają wartości ocenianej rozprawy doktorskiej. Całość ocenianego zbioru czterech monotematycznych publikacji stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które oceniam pozytywnie i wysoko. Rozprawa ta ma charakter pełnego opracowania, zawiera wiele cennych i nowych dla nauki wyników, mających dużą wartość poznawczą, a także praktyczną. W moim przekonaniu zamieszczone publikacje i ich podsumowanie wskazują, że Doktorant jest przygotowany do samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętność zespołowego prowadzenia pracy naukowej.

Opinia końcowa

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Adriana Duby spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. W związku z powyższym przedkładam wniosek do Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie pana mgr Adriana Duby do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

.....
dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. uczelni