

Bydgoszcz, 04.09.2020 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 inż. Aliny Milewskiej pt. „Zdrowotność ziarna wybranych odmian pszenicy ozimej uprawianych w różnych regionach Polski z wykorzystaniem metod klasycznych i molekularnych”

Praca została wykonana w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Pszczółkowskiej, promotora pomocniczego dr hab. Adama Okorskiego, prof. UWM

Grzyby patogeniczne przyczyniają się do powstawania chorób na różnym etapie wzrostu i rozwoju rośliny, a tym samym wpływają bezpośrednio na wielkość i jakość plonu ziarna zbóż. Zasadlając ziarniaki niejednokrotnie powodują ich zanieczyszczenie mykotoksynami. Oprócz grzybów uznawanych za patogeniczne do zanieczyszczenia toksynami mogą przyczynić się także gatunki niepatogeniczne. U podstaw skutecznej ochrony pszenicy przed chorobami, stoi jej odmiana, której wybór ma istotny wpływ na intensywność stosowanych zabiegów agrotechnicznych. Rozwój, a tym samym szkodliwość grzybów zależy jednak od zmieniających się warunków atmosferycznych. Warunki te w dużym stopniu determinowane są lokalizacją uprawy. Dla uzyskania satysfakcjonującego plonu ważne jest szybkie rozpoznanie patogenów atakujących uprawy. Tradycyjna identyfikacja sprawców chorób roślin w warunkach polowych prowadzona jest w oparciu o ocenę objawów chorobowych. Często takie rozwiązanie jest niewystarczające i konieczne jest zastosowanie metod polegających na wyizolowaniu z tkanek roślinnych sprawców chorób i określenie ich przynależności gatunkowej. Duże podobieństwo morfologiczne grzybów stwarzają jednak trudności w tradycyjnej identyfikacji gatunków. W ostatnich latach zaobserwować można szybki rozwój metod diagnostycznych opartych na technikach biologii molekularnej. Dzięki zastosowaniu różnych technik PCR można poprawnie identyfikować nie tylko gatunki patogenów, ale także wykrywać obecność genów odpowiedzialnych za syntezę mykotoksyn.

Problematyką oceny zdrowotności ziarna wybranych odmian pszenicy ozimej uprawianych w różnych regionach Polski z wykorzystaniem metod klasycznych i molekularnych zajęła się mgr inż. Alina Milewska. Wybór tematu uważam za bardzo trafny, celowy, a jednocześnie trudny w realizacji ze względu na czasochłonność badań, wymagających dużych umiejętności praktycznych, w tym opanowania oznaczania grzybów z wykorzystaniem kluczy mykologicznych i obsługi nowoczesnej aparatury badawczej.

Przedstawiona do oceny rozprawa pani Milewskiej liczy łącznie 124 numerowane strony maszynopisu, włączając w tę liczbę 36 tabel i 17 rysunków. Struktura rozprawy została opracowana w układzie klasycznym dla prac doktorskich, według ogólnie przyjętego schematu, typowego dla wieloaspektowej pracy empirycznej. Od strony formalnej praca jest zredagowana poprawnie. Zawiera 10 logicznie następujących po sobie głównych rozdziałów merytorycznych: 1. Wstęp i cel pracy, 2. Przegląd literatury, 3. Materiał i metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja wyników, 6. Wnioski, 7. Spis literatury, 8. Streszczenie, 9. Abstract, 10. Suplement. Ponadto w ramach rozdziałów 2., 3. i 4. wyodrębniono szereg podrozdziałów oraz mniejszych jednostek redakcyjnych. Taki układ sprawia, iż praca jest czytelna.

Treść pracy odpowiada tematowi określoneemu w prawidłowo zredagowanym tytule. We „Wstępie i celu pracy” Doktorantka w sposób jasny i zrozumiały wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań, uzasadniając sensowność ich prowadzenia. Cele pracy zostały odpowiednio sformułowane i w toku badań osiągnięte.

W Przeglądzie literatury Autorka słusznie wyodrębniła 5 podrozdziałów, wykorzystując liczne pozycje literatury, dobrane odpowiednio do studiowanego zagadnienia i właściwego tematu badawczego. Przedstawiła znaczenie i uwarunkowania uprawy pszenicy ozimej w Polsce. Dokonała charakterystyki fuzariozy kłosów zbóż, jako elementu kształtującego jakość ziarna, którą przedstawiła w rozdziale 2.2. W ramach tego podrozdziału wyróżniła tylko jedną mniejszą jednostkę redakcyjną (2.2.1.), co moim zdaniem nie było najlepszym rozwiązaniem. Przedstawiła w niej charakterystykę wybranych grzybów toksynotwórczych i mykotoksyn. Część omawianych w niej grzybów nie należy jednak do rodzaju *Fusarium*, dlatego jednostka ta mogła równie dobrze stanowić kolejny podrozdział (np. 2.3.). W dalszej kolejności zwróciła uwagę na oddziaływanie grzybów i mykotoksyn na ludzi i zwierzęta. Omówiła czynniki wpływające na porażenie ziarna. Ponadto przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący wybranych metod identyfikacji grzybów i wykrywania mykotoksyn.

Osiągnięcie założonych celów wymagało zgromadzenia i przygotowania odpowiedniego materiału badawczego oraz szczegółowych i wysoce specjalistycznych badań, których sposób wykonania Doktorantka podała w rozdziale Materiał i metody. Oceniana rozprawa doktorska obejmuje badania laboratoryjne przeprowadzone w oparciu o dwuletnie doświadczenia polowe realizowane w latach 2014-2016, w ramach Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego (PDO), których koordynacją na szczeblu centralnym zajmuje się Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych. Materiał badawczy stanowiły próbki ziarna czterech odmian pszenicy ozimej ('Artist', 'KWS Ozon', 'Patras', 'RGT Kilimanjaro') pozyskane z siedmiu Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian COBORU zlokalizowanych w różnych regionach Polski: ZDOO Białogard, ZDOO Bezek, ZDOO Kościelna Wieś, SDOO Pawłowice, ZDOO Ruska Wieś, SDOO Sulejów i ZDOO Tomaszów Bolesławiecki.

Z uwagi na specyfikę badań i związaną z tym konieczność zastosowania różnych metod, Autorka wyodrębniła w rozdziale Materiał i metody 6 podrozdziałów i 9 mniejszych jednostek redakcyjnych. Dzięki takiemu podejściu, rozdział ten jest łatwiejszy w odbiorze. Moim zdaniem nie było jednak konieczności podawania w każdym podrozdziale lat badań prowadzenia analiz, tym bardziej, że wszystkie prowadzone były w tym samym okresie i podano to we wcześniejszym podrozdziale. Ponadto dwukrotnie zastosowano tę samą

numerację podrozdziałów, tj. 3.6.2, zarówno dla podrozdziału Białogard lata 2014-2016, jak i Kościelna Wieś lata 2014-2016.

Dyskusyjne wydaje się zbytnie rozbudowanie podrozdziału poświęconego opisowi warunków meteorologicznych. Niewątpliwie warunki te miały istotny wpływ na występowanie grzybów, co udowodniono w pracy, jednak szczegółowe dane w czytelny sposób podano w tabelach. Brakuje natomiast pełniejszych informacji, np. różnic pomiędzy poziomami agrotechniki A1 i A2, będących poziomami czynnika w doświadczeniach. Moim zdaniem podane ogólnikowe informacje są niewystarczające. Brakuje między innymi informacji o fungicydach i terminach ich zastosowania w poszczególnych lokalizacjach. Ze względu na specyfikę badań PDO stosowano różne fungicydy, zawierające różne substancje aktywne, znacząco różniące się skutecznością ochrony przed *Fusarium* spp. i innymi grzybami. Pozostałe dane dotyczące agrotechniki też mogły okazać się istotne. Dla większości analizowanych Stacji informacje te są ogólnodostępne i nic nie stało na przeszkodzie żeby to uczynić, np. zestawiając dane w tabeli. Zapewne podanie tych informacji ułatwiłoby interpretację uzyskanych danych i wnioskowanie.

W badaniach laboratoryjnych zastosowano prawidłowe metody badawcze, właściwie dobrane i zastosowane, nie budzące zastrzeżeń merytorycznych. W swych badaniach Doktorantka zastosowała metody klasyczne, jak również nowoczesne. Przedstawiła sposób izolacji grzybów zasiedlających ziarniaki oraz sposób ich identyfikacji. Bardzo wartościowe jest zastosowanie technik molekularnych, pozwalających na określenie ilości DNA poszczególnych grzybów znajdujących się w analizowanych próbkach ziarna pszenicy. Analizy real-time PCR, którym poddano całościowe DNA wyizolowane z tych próbek, przeprowadzono przy użyciu zestawów odczynników Applied Biosystems w aparacie ABI Prism 7500 FAST. Warto było jednak doprecyzować informacje dotyczące określania stężenia DNA poszczególnych grzybów w ziarnie pszenicy. Przy omawianiu wyników podawane są wartości wyrażone w pg, jednak nie wiadomo dokładnie jakiej wielkości próbki to dotyczy, czyli jakie jest stężenie DNA poszczególnych gatunków grzybów. Wprawdzie podano, iż izolacje wykonywano dla 20 g próbek ziarna, jednak później podane informacje są nieprecyzyjne. Ważny jest również czas wykonywania poszczególnych czynności (mielenia, ucierania), czy dla każdej próbki był on jednakowy. To wszystko w dużym stopniu decyduje o wydajności izolacji całkowitego DNA, a tym samym także o wyniku stężenia DNA badanego grzyba w analizowanej próbce.

Dla wybranych próbek ziarna pszenicy określano zawartość mykotoksyny DON, wykorzystując w tym celu metodę HPLC z zastosowaniem detektora UV-Vis. W pracy podano, iż materiał do badań stanowiły próbki ziarna 4 odmian pszenicy pobrane w latach 2015 i 2016, pochodzące z poziomu uprawy A1 z 7 Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian COBORU. Jednak już w Wynikach podawano dane dla dwóch odmian pszenicy ('Artist', 'RGT Kilimanjaro').

Podjęcie powyższych badań świadczy o rzetelnym rozpoznaniu i dobrym opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnych technik badawczych, jak i tych już sprawdzonych. Wskazuje wyraźnie, że posiada duże umiejętności praktyczne i szerokie rozeznanie w literaturze światowej, dotyczącej metod badawczych. Dla odpowiedniej interpretacji uzyskanych

wyników i wnioskowania konieczne było przeprowadzenie szeregu analiz statystycznych, co wymagało od niej dodatkowej wiedzy i umiejętności praktycznych.

Zasadniczą część pracy stanowi omówienie wyników badań. Prawidłowe zaplanowanie i staranne wykonanie bardzo pracochłonnych badań umożliwiło uzyskanie wielu interesujących a zarazem cennych danych, zamieszczonych na 16 rysunkach i 31 tabelach, mogących znaleźć zastosowanie w praktyce. Rozdział Wyniki cechuje się rozbudowaną strukturą. Autorka opis wyników badań przedstawiła w 20 podrozdziałach i 24 mniejszych jednostkach redakcyjnych. Zauważyć jednak można brak konsekwencji w numerowaniu podrozdziałów, ich stopniowaniu i pisowni, np. po rozdziale głównym określonym jako „IV” pierwszy podrozdział posiada nr „4” a kolejny „4.1”. Ponadto ze względu na fakt, iż w nazewnictwie poszczególnych podrozdziałów i mniejszych jednostek sporo informacji się powtarza, można było zastosować pewne uproszczenia w ich nazewnictwie.

Doktorantka w wyniku przeprowadzonych analiz mykologicznych ziarna badanych odmian pszenicy łącznie uzyskała 6477 izolatów i oznaczyła ich przynależność gatunkową. Ponadto uzyskane izolaty grzybów podzieliła na trzy grupy: gatunki patogeniczne, saprotroficzne i toksynotwórcze. Dominowały grzyby saprotroficzne zwłaszcza *Alternaria alternata*, *Epicoccum purpurascens*, *Cladosporium cladosporioides*. Grzyby o potencjalnych zdolnościach toksynotwórczych reprezentowane były przez grzyby rodzajów *Fusarium* i *Penicillium*. Wśród nich dominowały *Fusarium avenaceum* i *Fusarium poae* natomiast gatunki *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* oraz *Penicillium verrucosum* występowały nielicznie. Analizy mykologiczne są tym cenniejsze, że zostały poparte obliczeniami statystycznymi, co dowodzi o dobrym warsztacie badawczym Doktorantki. Umożliwiło to jej wyciągnąć prawidłowe wnioski z badań, w tym określić wpływ różnych czynników na skład zbiorowisk grzybów. Najwięcej izolatów gatunków patogenicznych wyizolowano z próbek pochodzących z Ruskiej Wsi, najmniej natomiast z ziarna z Tomaszowa Bolesławieckiego oraz Pawłowic. Stwierdziła iż badane odmiany pszenicy różniły się zasiedleniem ziarna przez patogeny. Najwięcej uzyskała ich z ziarna odmiany KWS Ozon, a najmniej z RGT Kilimanjaro. Ponadto wskazuje, że zastosowanie pełnej ochrony chemicznej (A2) wpłynęło na redukcję występowania w ziarnie gatunków patogenicznych.

Wartość przeprowadzonych badań podniosło zastosowanie techniki real-time PCR, pozwalającej na określenie ilości DNA patogenów bezpośrednio w ziarnie. Najwyższy poziom średniej sumy ilości DNA analizowanych grzybów stwierdzono w ziarnie pochodzącym z Ruskiej Wsi, a najniższy w ziarnie z miejscowości Bezek. Dzięki wykorzystaniu techniki qPCR stwierdzenie, iż spośród analizowanych grzybów w badanym ziarnie najwięcej było DNA *F. avenaceum*, następnie *F. poae*, *P. verrucosum*, *F. graminearum*, zaś najmniej - *F. culmorum*. Ponadto udowodniono istnienie związku pomiędzy ilością DNA *F. avenaceum/F. tricinatum* i *F. poae*, oznaczoną metodą qPCR, a liczbą uzyskanych kultur grzybowych wyizolowanych z ziarna pszenicy. Zależność ta była bardzo silna, ponieważ współczynnik korelacji wynosił odpowiednio $r=0,58$ i $r=0,77$. Zarówno dzięki zastosowaniu techniki qPCR, jak również analizom mykologicznym, stwierdzono redukcję występowania grzybów toksynotwórczych w ziarnie pszenicy w przypadku zastosowania technologii wysokonakładowej (A2) w porównaniu do

niskonakładowej (A1). Dane te mają również istotny wymiar praktyczny, ponieważ na ich podstawie można stwierdzić, iż w przypadku analiz dotyczących tych patogenów omawiane metody diagnostyczne mogą być stosowane zamiennie. Nie zawsze istnieje konieczność stosowania drogich, wymagających wysoce specjalistycznego sprzętu, metod z wykorzystaniem techniki real-time PCR.

Doktorantka wskazuje, iż poziom porażenia ziarniaków przez grzyby zależał między innymi od warunków pogodowych. Udowodniła dodatnią korelację pomiędzy zawartością w ziarnie pszenicy DNA genotypu *F. avenaceum*/*F. tricinatum*, a średnią dobową temperaturą panującą w pierwszej dekadzie maja ($r=0,54$) oraz pomiędzy ilością DNA *F. avenaceum*/*F. tricinatum* i *F. poae* w warunkach wilgotnościowych w pierwszej dekadzie lipca (odpowiednio $r=0,58$ i $r=0,64$).

W badaniach udowodniono, że zanieczyszczenie ziarna mykotoksyną DON zależało od odmiany, lokalizacji doświadczenia oraz porażenia przez niektóre grzyby. Więcej tej toksyny było w ziarnie odmiany Artist niż odmiany RGT Kilimanjaro. Najwięcej DON było w ziarnie pozyskanym z SDOO w Sulejowie, a najmniej w próbkach z Kościelnej Wsi. Wykazano związek pomiędzy ilością DNA *F. culmorum* i *F. graminearum* oraz grzybów produkujących trichoteceny, a ilością DON oznaczoną w badanych próbkach ziarna. Zależność ta była bardzo wysoka ponieważ współczynnik korelacji dochodzi aż do 0,94.

W Dyskusja wyników, liczącej 12 stron, Autorka wyniki własne umiejętnie konfrontuje z rezultatami badań innych autorów, zawartych w przytoczonych pozycjach piśmiennictwa. Z rozdziału tego wynika, iż posiada ona szerokie rozeznanie w literaturze naukowej, a jednocześnie umiejętność krytycznego podejścia do uzyskanych rezultatów własnych badań.

Osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych oryginalnych badań podsumowane zostały siedemnastoma wnioskami, które wypływają bezpośrednio z dyskusji i są osadzone w wynikach badań. Ze względu na dużą ich liczbę warto jednak zastanowić się nad ograniczeniem ich liczebności, między innymi poprzez połączenie niektórych z nich, skupiając się na najważniejszych konkluzjach. Ponadto wniosek 17. jest nieprecyzyjny, ponieważ w badaniach nie określano zasiedlenia kłosów przez *F. avenaceum*/*F. tricinatum* i *F. poae* a określano ilość DNA tych grzybów w ziarnie zbóż.

Cytowana przez Doktorantkę literatura stanowi 248 pozycji, w większości anglojęzycznych, związanych tematycznie z rozprawą. W spisie jedną pozycję podano dwukrotnie (nr 41 i 42), a innym razem podano tylko samą nazwę wydawnictwa (nr 241). Dobór literatury jest właściwy, zawierający dobrze wyselekcjonowane pozycje, odzwierciedlające aktualny stan wiedzy dotyczący problematyki podjętej w pracy. Warto jednak było ujednolicić formatowanie poszczególnych pozycji znajdujących się w spisie literatury. Ponadto należałoby ujednolicić sposób cytowania literatury w tekście, gdyż w ocenianej pracy raz jest podawana od pozycji najstarszych do najmłodszych a w innym razem alfabetycznie.

Pomimo niewątpliwych walorów jakie praca ta posiada, jej lektura skłania do kilku uwag i sugestii:

- Przy podawaniu łacińskich nazw rodzajów/gatunków stosujemy kursywę – zasada ta nie zawsze była stosowana, zwłaszcza w spisie literatury;

- Podając pierwszy raz łacińską nazwę gatunkową grzybów stosujemy ich pełną nazwę a przy ponownym ich podaniu stosujemy skróconą nazwę. Zasada ta nie zawsze była stosowana, np. pierwszy raz pełna nazwa gatunkowa grzyba *Penicillium verrucosum* pojawia się dopiero w spisie literatury;
- Należy podawać poprawne (pełne) nazwy chorób i grzybów;
- Zamiast określenia „próba” należałoby stosować określenie „próbka”;
- W tabelach/pod tabelami zalecane jest podawanie wartości NIR z większą dokładnością niż wartości analizowanych danych wynikowych, tj. z dokładnością większą o jedną cyfrę znaczącą;
- W pracy stosowano dużo skrótów, których znaczenie przy pierwszym ich podaniu warto wyjaśnić. Jest to standard w pracach naukowych;
- Proszę unikać akapitów jednozdaniowych;
- Brak objaśnień dla wzorów zamieszczonych na str. 28.;
- Opisy rysunku nr 15 powinny być w j. polskim;
- „Poland” podajemy z dużej litery (str. 119).

Powyżej wymienione drobne błędy, często edytorskie, nie umniejszają wartości ocenianej pracy. Wskazanie kilku, niekiedy dyskusyjnych uwag lub sugestii, mogących być uwzględnionych przy redagowaniu pracy do opublikowania, nie kwestionuje niewątpliwych wartości jakie wnosi rozprawa do nauki. Należy wyraźnie stwierdzić, że rozprawa doktorska ma charakter pełnego opracowania, zawiera wiele cennych i nowych dla nauki wyników, mających dużą wartość poznawczą, a także praktyczną.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Aliny Milewskiej 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 mgr inż. Aliny Milewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. uczelni