

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Anny Depty**

pt. **”Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu ”** wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Teresy Doroszewskiej oraz promotora pomocniczego dr Anny Czubackiej w Zakładzie Hodowli i Biotechnologii Roślin IUNG –PIB w Puławach.

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzja została opracowana w odpowiedzi na pismo Z-cy Przewodniczącego Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach prof. dr hab. Janusza Podleśnego w sprawie uchwały Rady Naukowej Instytutu z dnia 10.08.2023 r. W piśmie zamieszczono informację o wyznaczenie mnie na recenzenta w postępowaniu nadania stopnia doktora i prośbę o wykonanie recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Depty. Przedstawiona rozprawa doktorska wchodzi w zakres dziedziny nauk rolniczych, dyscyplina rolnictwo i ogrodnictwo.

2. Znaczenie podjętej tematyki badawczej

Hodowla roślin ma na celu genetyczne doskonalenie roślin uprawnych, co pozwala na otrzymywaniu odmian plenniejszych, lepiej dostosowanych do zmieniających się czynników środowiska o lepszych parametrach jakościowych i zdrowotnych. Wiąże się to z efektywnych wykorzystaniem potencjału genetycznego dla otrzymywania nowych odmian jako postępu

hodowlanego. Niewątpliwie ważnym kierunkiem prac hodowlanych jest odporność na choroby zwłaszcza choroby wirusowe. Kierunek ten jest często kierunkiem priorytetowych, jednym z trudniejszych w pracach hodowlanych i jest określany jako kierunek ciągły. Reakcja roślina-patogen to szereg czynników mających wpływ na wystąpienie objawów chorobowych, a ich funkcjonowanie zależy także od wzajemnej reakcji zarówno rośliny jak i patogena oraz reakcji na układ czynników pogodowych, które są zmienne w latach. Wyhodowanie odmian odpornych ogranicza zabiegi chemiczne, tym samym zmniejsza koszty produkcji, chroniąc także glebę przed skażeniem chemicznymi środkami ochrony roślin. Hodowla odpornościowa musi być poprzedzona wiedzą na temat zmienności patogena, efektywnych genach odporności i ich identyfikacji w gatunkach uprawnych, a także w gatunkach pokrewnych oraz dzikich i wprowadzeniu ich do odmian lub materiałów hodowlanych.

Doktorantka wraz ze współautorami publikacji przedstawionych jako opracowanie rozprawy doktorskiej podjęli trudne badania dotyczące oceny zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* w poszukiwaniu źródeł odporności na ważniejsze choroby wirusowe tytoniu. W przeprowadzonych badaniach dokonano ocenę odporności poprzez analizę objawów chorobowych, obecności wirusa w badaniach immunoenzymatycznych i zróżnicowania genetycznego wykorzystując techniki badań molekularnych.

3. Ocena formalna rozprawy doktorskiej.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl pięciu spójnie tematycznych publikacji:

1. Doroszevska T., Depta A. 2011. Resistance of wild *Nicotiana species* of different PVY isolates. *Phytopathologia*, 59:9-24; punktacja MNiSW: 20 pkt.
2. Depta A., Doroszevska T., Czubacka A. 2020. Zróżnicowanie reakcji odpornościowej wybranych odmian tytoniu *Nicotiana tabacum* w zależności od użytego izolatu wirusa Y ziemniaka. *Polish Journal of Agronomy*, 42, 3-13; punktacja MNiSW: 20 pkt.
3. Depta A., Doroszevska T., Czubacka A. 2021 resistance response of the recently discovered species *Nicotiana mutabilis* to *Potato virus Y*(PVY) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) compared to other of resistance. *Agronomy* 11(8):1617; IF: 3,949; punktacja MNiSW: 100 pkt.

<https://doi.org/10.3390/agronomy11081617>

4. Laskowska D., Doroszevska T., Depta A., Kursa K., Olszak-Przybyś H., Czubačka A. 2013. A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica*, 193 (2):207-219. IF: 2,185; punktacja MNiSW: 70 pkt.
5. Depta A., Kursa K., Doroszevska T., Laskowska D., Trojak-Goluch A. 2018. Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to Tobacco Mosaic Virus and detection of the N gene that confers hypersensitive resistance. *Czech.J.Genet. Plant Breed.* 54 (3): 143-146. IF: 1,304; punktacja MNiSW: 40 pkt.

Przedstawienie rozprawy doktorskiej w oparciu o pięć opublikowanych prac jest zgodne z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 roku – przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, Art. 187, pkt. 3. Suma punktów za ww. publikacje według MNiSW po 2021 roku wynosi 230, a sumaryczny Impact Factor: 7,438. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie naukowych, takich jak: *Phytopathologia*, *Polish Journal of Agronomy*, *Agronomy*, *Euphytica*, *Czech. Journal Genet. Plant Breeding*. Treść pięciu artykułów naukowych została zamieszczona w rozdziale 12 rozprawy doktorskiej. Przedstawione publikacje są współautorskie, w trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, dlatego w rozdziale 13 zamieszczono oświadczenie autorów w tym Doktorantki z których wynika, że Jej wkład w ich powstawanie był bardzo znaczący. Doktorantka miała wysoki udział na wszystkich etapach powstawania publikacji tj. opracowanie koncepcji i metodyki badań, prowadzeniu doświadczeń, opracowaniu wyników badań i przygotowaniu manuskryptu, a także udzielaniu odpowiedzi na recenzje. W związku z powyższym znaczący udział Doktorantki w powstawaniu tych publikacji nie budzi zastrzeżeń.

Rozprawa doktorska składa się z poszczególnych wyraźnie wyodrębnionych rozdziałów i podrozdziałów, których układ tworzy spójną, logiczną całość. Wszystkie prace włączone do opracowania rozprawy doktorskiej dotyczyły oceny odporności na choroby wirusowe zasobów genowych rodzaju *Nicotiana*. W rozdz. 2 „**Wstęp**” Doktorantka przybliżyła problematykę której dotyczy rozprawa doktorska odnosząc się do znaczenia zasobów genowych jako źródeł odporności na choroby, potrzeby ich gromadzenia i badania oraz ochrony poprzez tworzenie kolekcji. Doktorantka odniosła się także do charakterystyki gatunku *Nicotiana tabacum* mającego najwięcej odmian i form w obrębie rodzaju *Nicotiana* i jest jedną z ważniejszych roślin przemysłowych wykorzystywanych do wyrobów tytoniowych, a także stosowany jako zielony bioreaktor do produkcji biofarmaceutyków. W dalszej kolejności Doktorantka odniosła się do problemu chorób wirusowych, ich charakterystyki i konieczności prowadzenia prac hodowlanych w tym kierunku. W rozdz. 3 „**Hipoteza i cel badań**” Autorka przedstawiła

hipotezę, która zakłada że w obrębie rodzaju *Nicotiana* występują obiekty posiadające odporność na choroby wirusowe. Przedstawiony zatem cel badań obejmował ocenę zasobów genowych pod względem odporności na trzy wirusy, które powodują największe zagrożenie dla uprawy tytoniu. Są to: wirus Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY), wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) oraz wirus mozaiki tytoniu (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Szczegółowe cele badawcze obejmowały: ocenę objawów chorobowych, obecności wirusa w badaniach immunoenzymatycznych oraz zróżnicowania genetycznego z użyciem markerów molekularnych. Rozdział 4 „**Przegląd literatury**” został podzielony na 2 podrozdziały: 4.1 Charakterystyka rodzaju *Nicotiana*, 4.2 Główne patogeny powodujące choroby tytoniu. W rozdz. 4.1 Autorka dość szczegółowo przedstawiła charakterystykę rodzaju *Nicotiana* wskazując na bardzo duże zróżnicowanie pomiędzy gatunkami, które dotyczy morfologii, cytogenetyki, badań biochemicznych, odporności na szereg chorób i szkodników oraz ich zastosowania. Rozdz. 4.2 przedstawia charakterystykę trzech badanych przez Doktorantkę wirusów powodujących choroby tytoniu. Opis obejmuje cechy biologiczne, serologiczne i molekularne wirusów, objawy chorobowe występujące na roślinach, a także wskazanie dotychczasowych źródeł odporności w odmianach i gatunkach dzikich. W rozdziale tym Autorka zamieściła szereg zdjęć, które wzbogacają przedstawione badania. W rozdz.5 „**Materiał i metody**” zamieszczono informacje o badanych obiektach, także o izolatach użytych do oceny odporności obiektów *Nicotiana*. Zamieszczona została metodyka testów odpornościowych, serologicznych i molekularnych. Kolejny rozdz. 6 „**Wyniki**” zawiera syntetyczny opis wyników badań zamieszczonych w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Doktorantka przedstawiła reakcję badanych obiektów na stosowane metody badawcze będące podstawą do wskazania źródeł odporności na badane rodzaje wirusów. Wyniki badań zobrazowane zostały na zamieszczonych w pracy rycinach. W rozdz. 7 „**Dyskusja**” Autorka przedstawiła badania zamieszczone w pracy doktorskiej na tle najnowszej literatury, odnoszą się one do poszczególnych rodzajów wirusów z określeniem źródeł odporności. W rozdz. 8 „**Podsumowanie i wnioski**” Doktorantka sformułowała 12 trafnych i interesujących wniosków, które stanowią zwięzłą syntezę podjętych badań zamieszczonych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział 9 „**Literatura**” zawiera wykaz literatury cytowanej w publikacjach składający się ze 164 pozycji, głównie anglojęzycznej. W kolejnych rozdziałach 10 i 11 Autorka zamieściła streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim. W ostatnich rozdziałach 13 i 14 Doktorantka zamieściła oświadczenia doktoranta i współautorów dotyczące wkładu w

przygotowanie publikacji oraz oświadczenie promotora, promotora pomocniczego i autora rozprawy doktorskiej.

Przedłożona rozprawa doktorska w mojej ocenie jest kompletna, a jej układ jest spójny i prawidłowy.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Składające się na rozprawę doktorską pięć publikacji są powiązane tematycznie zbiorem badań stanowiących spójną, logiczną całość odnoszącą się do oceny odporności na choroby wirusowe zasobów genowych rodzaju *Nicotiana*. Badaniami objęto dzikie gatunki rodzaju *Nicotiana* oraz wybrane odmiany tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*), jako gatunku reprezentującego najwięcej odmian uprawnych i form. Zgodnie z hipotezą badawczą zostały zrealizowane badania odporności wybranych obiektów na trzy ważniejsze choroby wirusowe, które stanowią największe zagrożenie dla uprawy tytoniu. Szczegółowy cel badawczy obejmował ocenę odporności poprzez wywołane objawy chorobowe na roślinach, zastosowanie badań immunoenzymatycznych potwierdzające obecność wirusa w roślinie. Do kompleksowej oceny włączone zostały badania molekularne, mające na celu stwierdzenie obecności i funkcjonowania genów, jako podstawowych czynników dziedzicznych warunkujących odporność roślin. Zatem przedstawione badania stanowią dość cenne i interesujące oraz nowatorskie aspekty badawcze.

Publikacje 1 i 2 przedstawiają ocenę odporności na wirus Y ziemniaka dzikich gatunków rodzaju *Nicotiana* oraz odmian gatunku uprawnego (*Nicotiana tabacum*), w których stwierdzono różną reakcję badanych genotypów na 11 zastosowanych izolatów o różnej zjadliwości. Doktorantka w sposób szczegółowy opisała źródła odporności, wskazując obiekty odporne na poszczególne izolaty oraz obiekty wykazujące tolerancję na wszystkie badane izolaty. Kolejna publikacja (3) przedstawi badania nowego gatunku *Nicotiana mutabilis* pod względem odporności na wirusa Y ziemniaka oraz wirusa brązowej plamistości pomidora na tytoniu. Interesujące są wyniki badań molekularnych nowego gatunku, wskazujące na tolerancyjność w odniesieniu do wirusa Y oraz nadwrażliwość w odniesieniu do wirusa brązowej plamistości pomidora na tytoniu, co stwarza możliwość wykorzystanie tego gatunku w pracach hodowlanych do poprawy odporności nowych odmian tytoniu. Ostatnie 2 publikacje obejmowały badania molekularne z uwzględnieniem testowania na wirusa mozaiki tytoniu, którego porażenie powoduje nie tylko obniżenie plonu, ale pogarsza znacznie jakość surowca.

Przeprowadzone testy analiz molekularnych pozwoliły na stwierdzenie obecności dominującego genu *Va* w badanych obiektach rodzaju *Nicotiana*, natomiast trwałość odporności warunkowana recesywnym genem *va* zależy od jego zmian strukturalnych typu delecja, a także temperatury otoczenia. Z tego względu alternatywnym źródłem odporności może być wykorzystanie tolerancji, która nie chroni przed porażeniem, ale objawy chorobowe nie obniżają wartości cech użytkowych.

Z uwagi na to, że stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej było pięć publikacji, które były przedmiotem oceny przez recenzentów i wydawców, mogę potwierdzić, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy związany z metodami badawczymi łącznie z analizą metod molekularnych stosowanych w badaniach oceny odporności na choroby wirusowe. Prowadzone badania wymagały zastosowania trudnych testów fizjologicznych, posiadania odpowiednich izolatów o określonym spektrum wirulencji, właściwego doboru izolatów do danej analizy, zapewnienia określonych warunków temperatury, wilgotności i natężenia światła w trakcie prowadzenia testu, a przede wszystkim dużego doświadczenia w interpretacji wyników, co należy podkreślić w ocenie Jej badań naukowych.

Bardzo ważnym aspektem w mojej opinii jest również fakt, że Doktorantka zamieszczone w rozprawie doktorskiej badania prezentuje w świetle licznej, trafnie i starannie dobranej pod kątem poruszanej problematyki, najnowszej literatury o zasięgu światowym, zamieszczone w rozdziale „Dyskusja”.

Za najważniejsze osiągnięcia przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej uważam:

- Ocenę odporności na choroby wirusowe przeprowadzono na licznej grupie obiektów dzikich gatunków *Nicotiana*, oraz odmian należących do gatunku *Nicotiana tabacum* zgromadzonych w kolekcji IUNG-PIB w Puławach. Badania wykazały duże zróżnicowanie badanych obiektów pod względem reakcji na badane wirusy, a także na konkretne izolaty. Ze względu na to, że kolekcje stanowią cenne źródła genetyczne dla wielu cech użytkowych roślin wykorzystywanych w pracach hodowlanych, a także w pracach badawczych, wskazanie takich źródeł jest bardzo cenne.
- Interesujące są badania molekularne, które wykazały obecność dominującego genu *Va* podatności na wirusa Y ziemniaka w odmianach tytoniu, zaś odmiany tolerancyjne na tego patogena posiadają recesywny allel tego genu *va*. Zróżnicowana reakcja odmian posiadających recesywny allel na infekcję wirusa Y, wskazuje na zmienną jego strukturę. Z przeprowadzonych analiz wynika także, że odmiany tolerancyjne mogą

mieć inne podłoże genetycznej tolerancji na wirusa Y ziemniaka, gdyż taka tolerancja wystąpiła u odmian posiadających gen podatności *Va*.

- Reakcja odpornościowa badanych obiektów na pozostałe wirusy była zróżnicowana, cenne są obiekty w których stwierdzono odporność typu nadwrażliwości i tolerancji.
- Przedstawione badania stanowią wieloaspektową ocenę odporności na choroby wirusowe tytoniu o dużym znaczeniu poznawczym, uzupełniają wiedzę dotyczącą reakcji badanych genotypów tytoniu na źródła zakażenia, a także podłoża genetycznego patogenów wpływającego na objawy chorobowe.

Uwagi o charakterze dyskusyjnym

- Badania przeprowadzono na licznej grupie obiektów kolekcyjnych zarówno form dzikich jak i odmian uprawnych wybranych z kolekcji IUNG-PIB w Puławach, czym zatem kierowano się przy wyborze tych obiektów?
- Odporność roślin na patogeny zwłaszcza choroby wirusowe ma ogromne znaczenie w hodowli nowych odmian, jest kierunkiem priorytetowym, a jednocześnie kierunkiem trudnym z uwagi na różną wzajemną reakcję rośliny i patogena. Układ tych dwóch organizmów zależy także od warunków klimatycznych, które są zmienne w latach. W pracach hodowlanych wykorzystuje się także tzw. "odporność polową". Brakuje mi odniesienia do oceny polowej, dlatego cenne by były przyszłościowe badania wykazanych w tym opracowaniu jako źródła odporności w warunkach wieloletnich polowych obserwacji.

5. Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani Anny Depty pt: „**Ocena zasobów genowych *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu**” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w zgodne z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 roku – przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, Art. 187, pkt. 3. Zakres badań, zastosowane metody badawcze oraz sposób opracowania i przedstawienia wyników w pełni spełniają wymogi stawiane tego typu opracowaniom. Po analizie przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, że

stanowi ona oryginalne opracowanie problemu naukowego oraz mieści się w dziedzinie „nauk rolniczych”, dyscyplinie „rolnictwo i ogrodnictwo”.

W związku z powyższym składam formalny wniosek do Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach o dopuszczenie mgr inż. Anny Depty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wanda Kociuba