

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Depta pt.:
„Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na
najważniejsze choroby wirusowe tytoniu”

1. Wprowadzenie

Niniejsza ocena została opracowana w odpowiedzi na pismo Z-cy Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach prof. dr hab. Janusza Podleśnego z dnia 23 sierpnia 2023 roku. Przedłożona rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Hodowli i Biotechnologii Roślin IUNG-PIB w Puławach pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Doroszewskiej oraz pod kierunkiem promotora pomocniczego - dr Anny Czubackiej.

2. Tytuł, forma i problematyka badawcza rozprawy doktorskiej stanowiącej podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora

Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Depta pt. „Ocena zasobów genowych rodzaju *Nicotiana* pod względem odporności na najważniejsze choroby wirusowe tytoniu” stanowi zbiór pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w języku angielskim (jedna w polskim) w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Pierwsza publikacja współautorska Kandydatki i jej Promotorki ukazała się w roku 2011 w nieistniejącym już czasopiśmie *Phytopathologia* (IF: 0, 0 pkt. MEiN), następna ukazała się drukiem dwa lata później w czasopiśmie *Euphytica* (IF: 0, 35 pkt. MEiN), kolejna w 2018 r. w czasopiśmie *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* (IF: 0, 20 pkt. MEiN), zaś czwartą pracę opublikowano w czasopiśmie *Polish Journal of Agronomy* w 2020 r. (IF: 0, 10 pkt. MEiN), ostatnią - rok później w czasopiśmie *Agronomy* (IF: 3,949, 100 pkt. MEiN). Tak więc zasięg czasowy powstawania prac był rozległy, stanowił wyzwanie i zasługuje na podkreślenie. Doktorantka jest pierwszym autorem trzech spośród pięciu prac ocenianego cyklu z potwierdzonym indywidualnym wkładem na poziomie 70-90%. W pozostałych pracach Jej wkład w powstanie publikacji podany został na poziomie 50-60%. W mojej ocenie, wymienione przez Kandydatkę formy aktywności związane z powstaniem cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz zadeklarowany wkład autorski, pozwalają na weryfikację ogólnej wiedzy teoretycznej z zakresu dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Depta wpisuje się w nurt badań nad niechemicznymi sposobami ochrony roślin i dotyczy hodowli odmian tytoniu odpornych na często pojawiające się w klimacie miarkowanym i powodujące ogromne straty finansowe choroby, takie jak: wirus Y ziemniaka PVY, przenoszony przez wciornastka tytoniowca wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu TSWV i wirus mozaiki tytoniu TMV. Badania tego typu mają duże znaczenie, gdyż tytoń odgrywa znaczną rolę gospodarczą w Polsce i w wielu krajach na świecie, bowiem stanowi ważny produkt eksportowy, źródło dochodu oraz formę utrzymania dla wielu gospodarstw rodzinnych (szczególnie ułożonych na glebach słabszych i w rejonach, gdzie trudno znaleźć pracę bądź przestawić się na produkcję alternatywną – woj. podkarpackie, małopolskie czy lubelskie). Roczna produkcja tytoniu przemysłowego w Polsce wynosi ok. 32,5 tys. ton, co stanowi 0,5% udziału w produkcji

światowej, a nasz rynek tytoniowy jest jednym z największych w Europie. Obecnie w Polsce wytwarza się 175 mld sztuk papierosów i 27 tys. ton innych wyrobów tytoniowych, co daje Polsce drugie miejsce w Europie. Coroczne wpływy podatkowe z produkcji i konsumpcji wyrobów tytoniowych sięgają 24,4 mld zł (w tym akcyza – 18,5 mld zł), stanowiąc niemal 9% ogółu dochodów podatkowych państwa. Z branżą tytoniową powiązanych jest 560 tys. miejsc pracy (z tego ok. 50 tys. osób zatrudnionych jest przy uprawie tytoniu, a dalszych 10 tys. przy produkcji wyrobów tytoniowych, zaś resztę stanowią osoby pracujące w handlu). Warto zaznaczyć, że tytoń to nie tylko roślina, która może potencjalnie szkodzić człowiekowi, ale też jest rośliną modelową wykorzystywaną w badaniach molekularnych i zielonym bioreaktorem, z którego można wyprodukować duże ilości rekombinowanych białek i biofarmaceutyków znajdujących zastosowanie w medycynie, farmacji, przemyśle i ochronie środowiska.

W tym kontekście podjęte przez mgr inż. Annę Depta badania nad hodowlą odpornościową tytoniu mają ogromne znaczenie, tak z naukowego, jak i poznawczego punktu widzenia.

Ważnym problemem w uprawie tytoniu jest brunatna nekroza nerwów wywoływana przez wirusa Y ziemniaka, hamującego transport wody i soli mineralnych w roślinie, zmniejszającego zdolności asymilacyjne liści, a w konsekwencji prowadzącego do spadku plonowania i pogorszenia jakości surowca. Mimo dostępności na rynku krajowych i zagranicznych odmian, z genami *va0*, *va1*, *va2* czy *VR* warunkującymi odporność na nekrotyczne szczepy PVY^N, problem występowania wirusa i strat przez niego powodowanych jest znaczny. Obserwuje się bowiem coraz częstsze pojawianie izolatów, przełamujących dostępne źródła odporności. Kolejną chorobą wirusową mającą duże znaczenie gospodarcze w naszym kraju jest brązowa plamistość pomidora (TSWV), atakująca ponad tysiąc gatunków roślin, należących do kilkudziesięciu rodzin botanicznych. Choroba objawia się chlorozą i nekrozą liści oraz karłowaceniem roślin. Źródła odporności na TSWV w świecie roślinnym są bardzo rzadkie. W rodzaju *Nicotiana* jedynie *N. alata* charakteryzuje się odpornością, lecz zastosowanie go jest trudne z powodu sprzężenia czynnika odporności z występowaniem deformacji morfologicznych roślin. W Polsce w latach 90. wyhodowano nieuprawianą obecnie odmianę typu papierosowego ciemnego Polalta z odpornością pochodzącą od *N. alata*. Z kolei gen *N* odporności na wirusa mozaiki tytoniu TMV powodującego m.in. nekrozy, zwijanie i żółknięcie mozaikowato zabarwionych liści wprowadzono do niektórych odmian uprawnych tytoniu np. Ambalema, lecz nie zabezpiecza roślin poddanych działaniu wysokich temperatur.

Mimo ogromnego znaczenia tego typu badań, w dostępnym piśmiennictwie brakuje publikacji na temat możliwości otrzymywania odmian tytoniu szlachetnego odpornych na groźne choroby wirusowe. Należy w tym miejscu podkreślić, że stosowane dotychczas metody chemicznego zwalczania roznoszącego wirus TSWV powodującego tzw. „chorobę lubelską” wciornastka tytoniowca (*Thrips tabaci*) nie są skuteczne, dzięki czemu niekiedy dochodzi do drastycznej obniżki plonowania, obniżenia jakości surowca a nawet zniszczenia plantacji i dodatkowo do zanieczyszczenia środowiska. Jak dotąd podejmowano próby wprowadzenia do genomu *N. tabacum* odporności m.in. na wirusa mozaiki tytoniu (TMV) korzystając z *N. glutinosa*, mączniaka rzekomego tytoniu i czarną zgniliznę korzeni z *N. debneyi*, zgniliznę korzeni z *N. plumbaginifolia* lub *N. longiflora*, PVY z *N. benavidesii*, *N. glauca*, *N. noctiflora*, *N. raimondii* lub *N. africana* oraz wirusa TSWV z *N. alata*.

Uzupełnieniem tej wiedzy poznawczo-praktycznej zajęła się w swojej pracy doktorskiej mgr inż. Anna Depta zakładając, że możliwe jest otrzymanie genetycznie odpornych na patogeny wirusowe odmian tytoniu typ Virginia o korzystnych cechach jakościowych surowca i zadowalającym poziomie plonowania. Introgresja genów odporności od dzikich odmian tytoniu wiąże się bowiem z wieloma problemami m.in. obniżoną

żywołnością siewek mieszańców a także wprowadzeniem niepożądanych cech jakościowych liści. Stąd kompleksowe dzieło jakiego podjęła się Kandydatka stanowi istotny wkład w rozwój innowacyjnych sposobów zwalczania chorób wirusowych tytoniu.

3. Formalna analiza rozprawy

Prezentowana dysertacja składa się, jak już wspomniano wcześniej, z pięciu powiązanych tematycznie, anglojęzycznych prac opublikowanych w latach 2011-2021 w czasopiśmie naukowym o łącznej liczbie punktów 165 wg punktacji MNiSW zgodnie z rokiem wydania (z sumarycznym IF wynoszącym 3,949), co jest zgodne z art. 187 pkt 3. ustawy (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Artykuły stanowiące recenzowaną rozprawę są opracowaniami współautorskimi (2 - 6 autorów), przy czym w trzech Doktorantka jest pierwszym autorem. Deklarowany wkład pracy Doktorantki w opracowaniach współautorskich wynosi 50-90%, co pokrywa się z zakresem i udziałem prac przedstawionych w oświadczeniach zamieszczonych w załącznikach. Wkład Doktorantki w powstanie publikacji polegał m.in. na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, prowadzeniu doświadczenia, interpretowaniu i opracowaniu wyników, przygotowaniu lub pomocy w przygotowaniu maszynopisu oraz odpowiedzi na recenzje. Tym samym spełnia Ona jeden z warunków stawianych kandydatom na stopień doktora – opanowanie umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (zgodnie z art. 187 pkt 1. ustawy (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Rozprawa obejmuje 151 stron maszynopisu. Dołączonych do niej zostało pięć oryginalnych publikacji bazowych oraz siedem stron oświadczeń współautorów prac i trzy strony oświadczeń promotora, promotora pomocniczego i autora rozprawy. Całość została podzielona na 12 głównych części, wyróżniając następujące rozdziały:

- Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim - co jest zgodne z art. 187 pkt. 4 ustawy (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.);
- Kilkustronicowy wstęp, zawierający syntetyczną charakterystykę problematyki poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy;
- Określenie hipotezy badawczej oraz celu rozprawy doktorskiej;
- Przegląd literatury zawierający krótką charakterystykę rodzaju *Nicotiana* i głównych patogenów wirusowych powodujących choroby tytoniu
- Bogato ilustrowany rozdział: Materiał i metody podzielony na kilka podrozdziałów pierwszego, drugiego i trzeciego rzędu opisujących przeprowadzone testy odpornościowe, serologiczne i molekularne;
- Wyniki badań i dyskusja podzielone na dalsze 3 podrozdziały;
- Podsumowanie i wnioski
- Literatura zawierająca 164 pozycje, głównie angielskojęzyczne;
- Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej
- Oświadczenia współautorów dotyczące wkładu w przygotowanie publikacji oraz oświadczenia promotora, promotora pomocniczego i autora rozprawy doktorskiej

Prezentacja cyklu 5. prac wchodzących w monotematyczny cykl – tj.:

P1. Doroszewska T., Depta A. 2011. Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia*, 59: 9-24. IF:0; 0 pkt. MEiN

P2. Depta A Doroszewska 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. IF: 0; 10 pkt. MEiN

P3. Depta A, Doroszewska 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 sources of resistance. *Agronomy*, 11(8): 1617. IF: 3,949; 100 pkt. MEiN

P4. Laskowska D., Doroszewska 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: 0; 35 pkt. MEiN).

P5. Depta A., Kursa K., Doroszewska 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: 0; 20 pkt. MEiN).

Bazę bibliograficzną rozprawy stanowią w przypadku pierwszej pracy – 27 pozycji, w drugiej – 42 pozycje, w trzeciej – 66 pozycji, zaś w pracy czwartej cyklu – 75 pozycji literaturowych, w piątej pracy – 9 pozycji z których *gros* to pozycje anglojęzyczne, pod względem formalnym cytowane w sposób właściwy. Pozytywnie oceniam, że cytowana literatura pochodzi w większości z ostatnich dwóch dekad, jest ściśle związana z poruszonymi problemami badawczymi i stanowi doskonale kompendium wiedzy dla czytelnika.

Z formalnego punktu widzenia rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim.

4. Merytoryczna analiza pracy

Metodyka wykonanych prac jest prawidłowa, wyniki badań są szczegółowo analizowane i dyskutowane, zarówno na tle bieżącej literatury krajowej, jak i zagranicznej, stąd wartość zaprezentowanych w rozprawie publikacji w mojej ocenie jest wysoka. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury, którą umiejętnie wykorzystwała w czasie planowania doświadczeń, opisywania wyników i prowadzenia dyskusji. Dyskusje w przedstawionych publikacjach są napisane właściwie i są wyznacznikiem dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Anny Depta. Podjęte przez mgr inż. Annę Depta badania nad hodowlą odpornościową tytoniu mają duże znaczenie, tak z naukowego, jak i poznawczego punktu widzenia.

Artykuły opublikowano w czasookresie od 2011 do 2021 roku. Tak znaczący przedział czasowy świadczy, że Doktorantka podjęła się rozwiązania złożonego problemu sprawdzenia możliwości wprowadzenia genów odporności na trzy choroby wirusowe tytoniu. Należy podkreślić, że uczyniła to z przemyśleniem i wizją badawczo-praktyczną.

W części opisowej dysertacji Autorka przedłożyła krótkie wprowadzenie w którym wprowadza czytelnika w zagadnienia gromadzenia zasobów genowych wykorzystywanych podczas hodowli odpornościowej oraz opisuje najważniejsze choroby wirusowe rodzaju *Nicotiana*. W dalszej kolejności przedstawia hipotezę badawczą i 3 cele badawcze, które realizowała podczas badań. Następnie przedstawia przegląd piśmiennictwa ukierunkowany na charakterystykę i hodowlę odpornościową rodzaju *Nicotiana* oraz opisuje trzy główne patogeny wirusowe będące przedmiotem badań.

Kolejna część pracy zawiera opis metodyki przeprowadzonych badań, która podzielona została w logiczny sposób na część dotyczącą charakterystyki zastosowanego materiału badawczego w postaci dzikich gatunków i odmian uprawnych *N. tabacum* i *N. rustica* oraz użytych izolatów wirusów. W dalszej kolejności Doktorantka szczegółowo opisuje metodykę zastosowanych testów odpornościowych, serologicznych oraz molekularnych (przy czym dodatkowe informacje nt. używanych metodok znajdują się w odpowiednich manuskryptach na których bazuje niniejsza rozprawa).

W kolejnej części: Wyniki badań i dyskusja Autorka umiejętnie sprawozdaje uzyskane rezultaty, zamieszczając krótki opis i wybiórcze tabele i rysunki przeniesione i opisane z publikacji bazowych, stanowiąc streszczenie badań opisanych w 5. artykułach na których

praca doktorska została oparta. Autorka starała się także odnieść do danych z literatury światowej. Wyniki badań są szczegółowo analizowane i dyskutowane, zarówno na tle bieżącej literatury krajowej, jak i zagranicznej, stąd wartość zaprezentowanych w powyższym cyklu publikacji w mojej ocenie jest wysoka. Podstawą tej oceny jest także poziom naukowy i potrzeba badań dotyczących hodowli odmian tytoniu odpornych na często pojawiające się w klimacie miarkowanym i powodujące ogromne straty finansowe choroby wirusowe, takie jak: przenoszony przez wciornastka tytoniowca wirus brązowej plamistości pomidora na tytoniu, wirusa Y ziemniaka czy wirusa mozaiki tytoniu.

Część opisowa kończy się dwunastoma rozbudowanymi wnioskami, dotyczącymi zarówno identyfikacji dzikich gatunków stanowiących źródło odporności, jak i badań molekularnych na obecność genu podatności *Va* na PVY lub genu *N* nadwrażliwości na TMV oraz wskazania odmian odpornych na TSWV, PVY i TMV.

Pierwsza praca z cyklu pt. „*Resistance of wild Nicotiana species to different PVY isolates*” przedstawia wyniki oceny odporności na PVY 68 gatunków, 7 form autotetraploidalnych i 12 odmian botanicznych *N. rustica* oraz 9 - *N. tabacum*. Testy obejmowały sześć izolatów, należących do trzech grup, PVY^{NW}, PVY^{NZ} i PVY^{NTN}, różniących się pod względem cech serologicznych i ich zdolności do łamania oporności. Analizowane gatunki *Nicotiana* różniły się pod względem odporności na stosowane izolaty, przy czym największą liczbę gatunków odpornych stwierdzono w sekcji *Paniculatae*. Immunię obserwowano w przypadku *N. raimondii*, diploidalnych i tetraploidalnych form *N. knightiana*, jak również u tetraploidalnego *N. glauca*. Wysoce odporne były także: *N. benavidesii*, *N. wigandioides* i *N. noctiflora*. Wśród gatunków podrodzaju *Petunioides* tylko *N. africana* wykazywał oporność na wszystkie izolaty PVY. Te dzikie gatunki *Nicotiana* mogą być zatem stosowane w hodowli tytoniu ukierunkowanej na tworzenie nowych odpornych na wirusa Y ziemniaka odmian. Odporność na trzy z sześciu izolatów PVY wykazały gatunki: *N. solanifolia*, *N. cordifolia*, *N. otophora*, *N. setchellii* i *N. petunioides*. W obrębie odmian botanicznych *N. rustica* zaobserwowano także znaczne zróżnicowanie odporności, a największą na 3 spośród sześciu izolatów wykazała *N. rustica* var. *brasilia*. Kolejnych 26 gatunków *Nicotiana* wykazało zaś objawy tolerancji na wszystkie badane izolaty, objawiające się przejaśnieniami nerwów, plamami i pierścieniami chlorotycznymi i deformacjami, bez nekrozy nerwów. Należy podkreślić, że do tej pory nie przeprowadzono tak szerokiego badania weryfikacji statusu odporności na PVY. Dzięki tym badaniom w naszym kraju podejmowane są próby otrzymania linii hodowlanych tolerancyjnych na wszystkie izolaty PVY.

W kolejnej pracy również traktującej o odporności na brunatną nekrozę nerwów i liści przebadano 25 odmian uprawnych *N. tabacum*. Odporność na wirus Y ziemniaka zależy od obecności pojedynczego recesywnego genu *va* powstałego w wyniku delecji w genie podatności *Va*. Odporność tę obserwuje się u wielu odmian uprawnych, niestety może być ona przełamana przez zjadliwe izolaty PVY, stąd należy poszukiwać nowych źródeł odporności lub łączenie czynników odporności już poznanych. W pracy przebadano głównie odmiany polskie z grupy tytoniu papierosowego jasnego. Badane odmiany tytoniu uprawnego wykazały zróżnicowany stopień podatności na PVY w zależności od użytego izolatu. U 16 odmian obserwowano delecję w obrębie genu podatności na wirus Y ziemniaka a tym samym obecność recesywnego genu odporności *va*, zaś u pozostałych stwierdzono obecność genu podatności na PVY. Najwyższą odpornością, warunkowaną dwoma genami recesywnymi *va* i *va2*, charakteryzowała się odmiana VAM, która nie została porażona słabszymi izolatami, chociaż izolaty silne spowodowały u niej nekrozę nerwów. Niższą odpornością cechowało się 6 odmian (Wiecha, Bachus, Wiktorja, Weneda, Wiślica i Virginia

SCR), które nie wykazały objawów chorobowych po zastosowaniu izolatu słabego. Pozostałe odmiany posiadające gen odporności *va* (Havana 307, Havana IIC, Wilga, Krak, Wiera, Warta, Wika, Wanda i Wisana) zostały porażone przez wszystkie izolaty. Kolejnych pięć odmian (Złotolistny IHAR, LB Koro, Virginia Gold Dolar, Virginia 278 oraz Zamojska 4), posiadających gen podatności *Va*, wykazało objawy tolerancji na zakażenie użytymi izolatami PVY. Niezależnie od użytego izolatu wirusa wykazywały one przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, ale bez nekroz, przy czym wzrost i rozwój roślin inokulowanych był zbliżony do zdrowych. Natomiast odmiany: Prezydent, Virginia Joyner i Samsun H z genem podatności *Va*, reagujące na inokulację wszystkimi użytymi izolatami PVY wystąpieniem nekrozy nerwów, określono jako podatne. Odmiana Węgierski Ogrodowy, pomimo obecności genu podatności (*Va*), nie została porażona przez izolaty słabe, natomiast izolaty bardziej zjadliwe spowodowały przejaśnienia nerwów i plamy chlorotyczne, zaś inokulacja izolatami silnymi skutkowała nekrozami nerwów. Badania pozwoliły ocenić wybrane polskie odmiany i wytypować te, które posiadają odporność warunkowaną obecnością genu *va*, a także określić jej poziom poprzez ocenę skuteczności w zetknięciu z różnymi izolatami PVY. Pozwoli to na optymalny dobór komponentów do hodowli odpornościowej.

Trzecia praca z cyklu dotyczy poszukiwania odporności na dwie choroby wirusowe tytoniu – wirusa Y ziemniaka i brązową plamistość pomidora. Materiałem badawczym były 4 gatunki *Nicotiana*: *N. alata*, niedawno odkryty *N. mutabilis* i *N. forgetiana* oraz jako kontrola: *N. tabacum* – odmiany Virginia A Mutant i Burley 21. Doktorantka przeprowadziła analizę molekularną w celu wykrycia genu *Va* określającego podatność na PVY i SCAR ACC/CCC 172 związanego z opornością na TSWV. Testy odporności przeprowadzono poprzez sztuczną inokulację jednym izolatem TSWV i dwoma izolatami PVY o różnej wirulencji, potwierdzając obecność wirusów za pomocą testów DAS-ELISA z użyciem przeciwciał przeciwko PVY i TSWV. Wyniki wskazują na brak markera Nsyl-eIF4E1, związanego z genem *Va* podatności na PVY i obecność genu odporności TSWV w genomie *N. mutabilis*. Gatunek ten został uznany za tolerujący dwa badane izolaty PVY, ponieważ pomimo pozytywnych wyników testu DAS-ELISA, na zakażonych roślinach obserwowano chlorotyczne plamy, bez nekrozy nerwów. W wyniku inokulacji TSWV *N. mutabilis* wykazał reakcję nadwrażliwości; jednak po czterech miesiącach 30% inokulowanych roślin wykazywało infekcję ogólnoustrojową. Gatunek ten rozszerza genetyczną różnorodność w rodzaju *Nicotiana* i, ze względu na jego tolerancję na PVY i częściową odporność na TSWV, może być potencjalnym źródłem odporności na te wirusy. W przypadku gatunków pokrewnych: *N. alata* i *N. forgetiana* obserwowano nieco inną reakcję po inokulacji szczepami PVY i TSWV. U *N. alata* notowane typowe objawy nadwrażliwości a wyniki testu DAS-ELISA przeprowadzone po ośmiu tygodniach i cztery miesiące po inokulacji wskazały, że rośliny nie były zakażone TSWV. U *N. forgetiana* zauważono także objawy nadwrażliwości w postaci nekrotycznych plam i dodatkowe pomarszczenie blaszek liściowych, a wyniki testów serologicznych były pozytywne.

W przypadku odmiany podatnej Burley 21, posiadającej gen podatności *Va* na PVY, po inokulacji notowano wystąpienie nekroz nerwów, natomiast odmiana VAM, posiadająca odporność typu *va*, została porażona jedynie przez silny izolat IUNG 20, posiadający zdolność przełamania tego typu odporności.

W kolejnej pracy Doktorantka wraz z zespołem przebadła reakcję 94 obiektów należących do 62 gatunków z rodzaju *Nicotiana* na *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). W doświadczeniu zastosowano markery SCAR związane z genem odporności na tego wirusa. Gatunki z sekcji *Alatae*: *N. alata*, *N. forgetiana*, i *Nicotiana x sanderae*, jak również odmiany uprawne ‘Polalta’ i ‘Wiktorja’ z genem odporności na TSWV wprowadzonym z *N. alata*, wykazywały reakcję nadwrażliwości na TSWV. Na roślinach w pierwszym tygodniu po inokulacji obserwowano żółte przebarwienia, przekształcające się w nekrotyczne plamy. W

niektórych obiektach, wirus rozprzestrzenił się wywołując ogólnoustrojową reakcję nadwrażliwości. Pięć obiektów z *N. alata* i trzy z *Nicotiana x sanderae* zawierało odpowiednio 16,7-50% i 6,3-50% roślin, u których pojawiły się objawy nadwrażliwości systemicznej. U *N. forgetiana* po reakcji nadwrażliwości w miejscu zakażenia następowały objawy nadwrażliwości ogólnoustrojowa. U odmiany 'Wiktoria' 21,1% roślin wykazało reakcję nadwrażliwości, podczas gdy pozostałe okazały się podatne. U wszystkich genotypów u których wystąpiła odpowiedź nadwrażliwości lub nadwrażliwości ogólnoustrojowej na TSWV stwierdzono obecność markerów SCAR, związanych z genem odporności. Pozostałych 80 obiektów oznaczono jako podatne na zakażenie TSWV. Badania potwierdziły, że gen pochodzący z *N. alata* (RTSW-al.) i który, oprócz *N. alata*, powoduje odporność na TSWV u *Nicotiana x sanderae*, odmiany 'Polalta' oraz, do pewnego stopnia, 'Wiktoria' jest jedynym znanym źródłem odporności na TSWV w rodzaju *Nicotiana*. Jednakże jego zastosowanie w hodowli tytoniu jest trudne ze względu na odległość genetyczną między dawcami odporności i odmianami uprawnymi *N. tabacum*.

W ostatniej pracy monotematycznego cyklu przebadano 62 odmiany tytoniu orientalnego, ciemnego oraz jasnego typ Burley i Virginia a także 11 gatunków dzikich *Nicotiana*, oceniając je pod kątem odporności na TMV. Do oceny odporności tytoniu użyto testów biologicznych, inokulując w dwóch zakresach temperatur (z niską temperaturą: dzień 22°C przez 14 godzin i noc 20°C przez 10 godzin oraz z wysoką temperaturą: dzień 30°C przez 14 h, a noc 28°C przez 10 godzin). Zaobserwowano cztery rodzaje reakcji na wirusa podatność, tolerancję, nadwrażliwość i systemiczną nadwrażliwość. Najczęstszą była podatność, co objawiało się mozaikowatymi przebarwieniami liści a także zahamowaniem wzrostu oraz żółknięciem roślin. Nieco mniej liczną grupę stanowiły obiekty wykazujące tolerancję polegającą na tym, że w tkankach następowało namnażanie wirusa, ale na roślinie nie obserwowano objawów chorobowych. W tym przypadku reakcja zależała od temperatury (przy niższych - nie notowano objawów, zaś przy wyższych obserwowano silne przebarwienia mozaikowe). Ten typ reakcji występował u odmiany 'Ambalema' oraz *N. glauca*, *N. wigandioides* i *N. africana*. U trzeciej grupy notowano reakcję nadwrażliwości, widoczną jako zamieranie tkanek wokół miejsca infekcji, uniemożliwiające wirusowi rozprzestrzenianie się po roślinie. Ten typ odporności znaleziono u 14 odmian tytoniu szlachetnego oraz u 7 dzikich gatunków *Nicotiana* a reakcja nadwrażliwości zależała od temperatury. Ostatnią była systemiczna reakcja nadwrażliwości na TMV, polegająca na przejściu od przejaśnień i drobnych nekroz na dolnych liściach do rozległych nekroz na całej powierzchni rośliny oraz zamieraniu wierzchołka wzrostu. Większość badanych gatunków tytoniu była wrażliwa na TMV, dwa były tolerancyjne, zaś pozostałe wykazywały reakcję nadwrażliwości. Przy czym nadwrażliwość, warunkowana przez gen *N*, występowała tylko w temperaturze poniżej 22°C. W temperaturze powyżej 28°C, wszystkie odmiany wykazywały przebarwienia mozaikowe lub rozległe nekrozy. Wyjątkiem był *N. gossei* u którego nadwrażliwość nie była warunkowana genem *N*, była trwała i nie zależała od temperatury, co sugeruje, że ten dziki krewniak tytoniu może być dodatkowym zasobem genetycznym dla hodowli tytoniu.

Artykuły naukowe wchodzące w skład pracy doktorskiej nie budzą zastrzeżeń, a wyniki tych prac podlegały wcześniej ocenie przez wysokiej klasy specjalistów, recenzentów i wydawców. Z tego powodu nie czuję się zobowiązana, żeby dodatkowo je oceniać.

Podsumowując, były to wszechstronne badania mające zarówno aspekt poznawczy, jak i praktyczny, bowiem ich efekty można bezpośrednio wdrożyć w praktyce rolniczej. Po

analizie tekstu rozprawy doktorskiej stwierdzam, iż Autorka zaprezentowała wysoki poziom wiedzy, umiejętność trafnego rozumowania oraz opracowania i prezentacji wyników badań. Jest to bardzo wartościowe studium naukowe wnoszące nowe informacje na temat poszukiwania nowych źródeł odporności, mogące prowadzić do konkretnych zastosowań podczas hodowli nowych odpornych odmian tytoniu na ważne gospodarczo patogeny. Należy także podkreślić umiejętność i swobodę korzystania z literatury naukowej i estetykę pracy.

5. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę rangę uzyskanych wyników, poziom naukowy rozprawy doktorskiej, jak również dojrzałość naukową Doktorantki, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Depta spełnia kryteria określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022 poz. 85 z późn. zm.). Zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi dotyczącymi szczegółowego trybu przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich, składam formalny wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr inż. Anny Depta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 17.10.2023 r.

Prof. dr hab. Barbara Kołodziej