

Prof. dr hab. Stanisław Mazur
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin
Al. 29 Listopada 54
31-425 Kraków

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Darii Nowak pt. „Ocena możliwości chemicznego zwalczania *Oculimacula* spp.” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Tomasza Kosiady z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Biorąc pod uwagę powierzchnię upraw zboża należą do najczęściej uprawianych roślin w Polsce. W strukturze zasiewów tej grupy roślin wiodącą rolę odgrywa pszenica ozima. Sukces w uprawie zbóż zależy od kilku czynników, w tym od skutecznej ochrony przed patogenami grzybowymi. Choroby powodowane przez grzyby nie tylko mają negatywny wpływ na wysokość plonu ale są również odpowiedzialne za gorszą jakość ziarna. Jedną z takich chorób jest łamliwość źdźbła zbóż i traw wywoływana przez grzyby *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Jak wynika z doniesień zagranicznych i krajowych straty wynikające z porażenia pszenicy ozimej przez *Oculimacula* spp. mogą w skrajnych przypadkach sięgać do nawet 45 %. Ograniczenie występowania tej choroby metodami agrotechnicznymi nie jest wystarczające. Powodem są m.in. wprowadzone na rynek nowe odmiany pszenicy ozimej, które co prawda mają wysoki potencjał plonotwórczy ale wymagają intensywnej ochrony grzybobójczej. Aby ochrona chemiczna była skuteczna wymaga często wielu zabiegów, co wiąże się z ryzykiem uodparniania się patogenów na substancje aktywne zawarte w fungicydach. Powstanie odporności populacji patogena na dany fungicyd może często poważnie ograniczyć uprawę określonego gatunku rośliny. Zapobiec temu zjawisku można poprzez właściwy dobór fungicydów a zwłaszcza przemienne ich stosowanie z uwzględnieniem substancji aktywnych o odmiennym mechanizmie działania. Przedstawione przez Doktorantkę argumenty uzasadniające potrzebę badań nad możliwością stosowania ochrony chemicznej z uwzględnieniem preparatów wieloskładnikowych pozwoliły na realizację postawionego celu pracy, który później w logicznej kolejności realizowała. Pomimo długiej listy fungicydów zarejestrowanych do ochrony pszenicy nie wszystkie w jednakowym stopniu są skuteczne. Dlatego uważam, że

temat podjęty w ocenianej dysertacji przez mgr Darię Nowak jest nie tylko uzasadniony ale bardzo potrzebny dla praktyki. Mam tylko uwagę w tym miejscu co do zaproponowanego tytułu rozprawy, który nie do końca oddaje zakres przeprowadzonych przez Doktorantkę badań i odnosi się tylko do części wykonanej przez Nią pracy. Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi interesujące opracowanie dotyczące charakterystyki dwóch gatunków *Oculimacula* spp. oraz możliwości ich zwalczania z uwzględnieniem fungicydów o różnych mechanizmach działania. Analizując dysertację stwierdzam, że ma typowy układ i zawiera w kolejności 10 rozdziałów właściwych. Wstęp napisany jest syntetycznie, bez zbędnych opisów. Na podstawie literatury i obserwacji własnych Doktorantka uzasadnia potrzebę podjęcia badań objętych tematem pracy doktorskiej, wskazując na dominację pszenicy ozimej w strukturze zasiewów jako główną przyczynę zagrożenia łamliwością źdźbła zbóż i traw. W dalszej części nakreśla cel oraz zadania badawcze, którymi będzie zmierzała do jego osiągnięcia. Cel badań podjętych jest mocno uzasadniony. Założony program badawczy był bardzo szeroki i niewątpliwie jego realizacja wymagała od Doktorantki dużego wkładu pracy. Badania były podzielone na poszczególne etapy, w których Doktorantka m.in. oceniała zdrowotność pszenicy ozimej odmiany Cubus w doświadczeniach polowych, izolowała gatunki rodzaju *Oculimacula* i identyfikowała je korzystając z metod zarówno klasycznych jak i technik molekularnych, a także oceniała ich chorobotwórczość. W badaniach oceniła również podatność 37 odmian pszenicy ozimej na porażenie przez sprawców łamliwości źdźbła zbóż i traw oraz skuteczność fungicydów zastosowanych do ich zwalczania.

W przeglądzie piśmiennictwa i dyskusji wyników Doktorantka uwzględniła 128 pozycji literatury, zarówno polskiej jak i obcojęzycznej, dostarczając czytelnikowi pracy wiele interesujących informacji na temat badanych patogenów rodzaju *Oculimacula*. Poza ogólnymi informacjami dotyczącymi m.in. genezy rodzaju zamieściła szczegółowe informacje związane z biologią i morfologią gatunków tego rodzaju, historii ich odkryć i klasyfikacji systematycznej. W ujęciu chronologicznym opisała pojawiające się informacje związane z klasyfikacją systematyczną rodzaju *Oculimacula*, w którym ostatecznie wyodrębniono dwa gatunki *O. yallundae* i *O. aciformis* jako sprawców łamliwości źdźbła zbóż i traw. Na podstawie piśmiennictwa scharakteryzowała najczęściej pojawiające się symptomy chorobowe jakie wywołują u porażonych roślin zwracając uwagę na podobieństwo objawów wywołanych przez obydwie gatunki tego rodzaju. W dalszej części rozdziału odniosła się do etiologii i epidemiologii choroby oraz metod jej ograniczania. Brakuje natomiast w tym rozdziale przeglądu literatury informacji odnoszących się do metod

molekularnych, którymi można identyfikować gatunki rodzaju *Oculimacula* analizując DNA przy użyciu technik takich jak RAPD, SSR, ISSR czy też AFLP, opartych na reakcji PCR. Dzięki tym technikom możliwe jest rozróżnienie gatunków w obrębie rodzaju *Oculimacula* i określenie miejsc ich pochodzenia i dopiero w kolejnym rozdziale „Materiał i metody” dowiadujemy się o takiej możliwości. Przy przygotowaniu pracy do druku warto może uwzględnić te informacje. Tu chciałem zwrócić uwagę na dwie pozycje w spisie literatury: Bateman G.L. 1990 oraz Jaczevska-Kalicka A. 1998 B, które nie zostały zacytowane, co traktuję jako zwykłe przeoczenie. Ponadto wystąpił drobny błąd w numeracji od pozycji 11.

W następnym rozdziale "Materiał i metody" Doktorantka szczegółowo opisała warunki prowadzenia badań, charakteryzuje miejsce prowadzenia doświadczeń polowych, materiał roślinny, na którym prowadziła doświadczenia, zastosowane fungicydy. Obserwacje występowania łamliwości źdźbła zbóż prowadziła na polach doświadczalnych zlokalizowanych w dwóch oddalonych od siebie miejscowościach Tetyń (województwo zachodniopomorskie) i Cisy (województwo pomorskie), w których pszenica ozima była uprawiana w sezonach 2012/2013 oraz 2013/2014. Każdorazowo do oceny porażenia pobierała rośliny w fazie dojrzałości mleczej (BBCH 73). Ocenę porażenia roślin wykonała uwzględniając zgodną z metodyką EPPO skalę makroskopową. Dodatkowo ocena porażenia przez *Oculimacula* spp. została dokonana przy pomocy testu ELISA. Izolację mikroorganizmów z porażonego materiału prowadziła wykorzystując pożywkę PDA, a dla zróżnicowania morfologicznego gatunków *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* ich hodowlę prowadziła również na pożywkach SNA i MEA. Ta informacja jest zamieszczona dopiero w wynikach natomiast brakuje opisu sposobu oceny cech morfologicznych *Oculimacula* spp. w rozdziale „Materiał i metody”. Na podstawie cech morfologicznych kultur wzrastających na testowanych podłożach dokonała wstępnej identyfikacji do gatunku. Oprócz klasycznych metod identyfikacji bardzo obszernie w tym rozdziale została opisana metoda molekularna, którą Autorka zastosowała do weryfikacji wyizolowanych gatunków *Oculimacula* spp. W tym miejscu chciałbym zasugerować aby informacje potwierdzające przynależność zdiagnozowanych klasycznie izolatów do gatunków *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* zamieścić w rozdziale "Wyniki". Szczegółowo opisane przyjęte metody badań polowych oraz laboratoryjnych (izolacja patogenów, ich hodowla i identyfikacja, doświadczenia nad patogennością i próbami ich zwalczania) nie budzą zastrzeżeń, są ogólnie przyjętymi w badaniach fitopatologicznych. Poparte zaś dobrze dobranymi metodami obliczeń statystycznych sprawiają, że uzyskane wyniki stają się wiarygodne i dają podstawę

do wyciągnięcia prawidłowych wniosków, w tym przypadku ujętych w formie podsumowania wyników.

Doktorantka w sposób ogólnie przyjęty w fitopatologii tabelarycznie (21) lub w formie wykresów (10) oraz na oryginalnych makro- i mikro fotografiach (10) przedstawiła i zinterpretowała otrzymane wyniki z licznych badań ściśle fitopatologicznych oraz związanych z wpływem badanych fungicydów na zdrowotność roślin i wzrost grzybni *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Zamieszczenie wyników również w formie graficznej sprawia, że bardzo łatwo można zinterpretować zawarte tam dane z tekstem, bez szukania ich w załącznikach. Mam pewne uwagi do tabel 9,10,11,12, w których wymienione są substancje aktywne zawarte w testowanych fungicydach, dlatego też w kolumnie dotyczącej tych związków należałoby zmienić podpisy z „Fungicyd” na „Substancja czynna” tak jak w tabeli 13. Uważam, że obok podanych wartości liczbowych na wykresach 5 i 6 dotyczących skuteczności badanych fungicydów warto zamieścić informacje statystyczne, co w tym przypadku pozwoli poprawnie interpretować uzyskane wyniki. Ta część rozprawy jest bardzo rozbudowana ale dzięki dobrze zaplanowanemu i spójnemu układowi śledzenie tego wątku badawczego na następcza trudności. Na podkreślenie zasługują zwłaszcza te wyniki badań, które oprócz aspektu naukowego wnoszą wiele informacji przydatnych w praktyce rolniczej. W analizie wyników zastosowano nowoczesne, poprawne i adekwatne metody statystyczne. W badaniach polowych prowadzonych w pierwszym i drugim roku Doktorantka oceniała porażenie pszenicy ozimej przez *Oculimacula* spp. oraz testowała fungicydy zastosowane do ochrony przed łamliwością źdźbeł zbóż i traw. W zależności od miejsca doświadczenia oraz roku badań wykazała, że nasilenie choroby w miejscowości Tetyń było wyższe niż w Cisach w obu latach badań. Próbuąc wyjaśnić tę zależność Doktorantka wskazała na kilka przyczyn, tym bardziej, że opinie innych autorów zajmujących się tą problematyką nie są jednoznaczne. Próba uzasadnienia większego nasilenia łamliwości źdźbła zbóż większą ilością opadów w okresie wegetacji w tym przypadku nie koreluje z tym poglądem, gdyż przeczy temu wyliczony dla obu miejscowości przez doktorantkę współczynnik Selianinowa wskazujący, że okresy suche częściej występowały właśnie w Tetyniu. W podsumowaniu w punkcie 1 Doktorantka sugeruje, że wpływ na takie zróżnicowanie w porażeniu pszenicy ozimej mogły mieć różne warunki pogodowe podczas sezonów wegetacyjnych, w których prowadzono doświadczenia, ale czy tylko? Co jeszcze według Doktorantki mogło być przyczyną większego nasilenia łamliwości źdźbeł zbóż i traw w Tetyniu?

Nasilenie objawów chorobowych na poletkach traktowanych fungicydami wskazuje, że najsłabsze działanie ochronne wykazują fungicydy zawierające jako substancję aktywną

karbendazym i prochloraz, gdyż porażenie roślin w tych kombinacjach niekiedy nie różniło się istotnie statystycznie od kontroli. Wyniki tej części badań potwierdzają dobrą skuteczność preparatów dwuskładnikowych zawierających boskalid z epoksykonazolem, protiokonazol ze spiroksaminą jak również cyprodynil i metrafenon. Skuteczność ta przejawiała się niższymi wartościami stopnia porażenia i procentu porażonych roślin. Również dodatkowa ocena porażenia pszenicy wykonana przy pomocy testu ELISA potwierdziła takie zależności między kombinacjami doświadczenia, gdyż zawartość jednostek antygeny grzybów *Oculimacula* spp. była najwyższa w porażonych roślinach kontrolnych oraz opryskiwanych w sezonie wegetacyjnym fungicydami zawierającymi karbendazym i prochloraz. Potwierdzeniem słabej skuteczności fungicydów zawierających karbendazym i prochloraz są również wyniki plonu ziarna, który był najniższy właśnie w tych kombinacjach i nie różnił się statystycznie istotnie od kontroli. Natomiast uśrednione wyniki plonu z dwóch lat doświadczeń potwierdzają dobre działanie ochronne fungicydów zawierających protiokonazol ze spiroksaminą, boskalid z epoksykonazolem, gdyż również i w tym przypadku plon ziarna był najwyższy i różnił się istotnie od pozostałych kombinacji doświadczenia.

Zależności pomiędzy zdrowotnością roślin wyrażoną indeksem porażenia, procentem porażonych roślin, liczbą jednostek antygeny dla *Oculimacula* spp. oraz plonem ziarna zostały przez Doktorantkę przedstawione w formie oddzielnych dla każdego roku badań i miejscowości biplotów, a które potwierdzają wiarygodność uzyskanych w doświadczeniach danych. Zależności te są w dużym stopniu zgodne z wynikami tradycyjnej analizy statystycznej i dają podstawę do właściwego wnioskowania. Następnym etapem badań w pracy doktorskiej p. mgr Darii Nowak to ocena wpływu fungicydów na wzrost kultur *Oculimacula aciformis* i *O. yallundae* w warunkach *in vitro*. Do badań tych wykorzystano 9 fungicydów z różnych grup chemicznych, które były stosowane również w badaniach polowych, poza jednym. Doktorantka zrezygnowała w tej części badań z fungicydu zawierającego prochloraz, a w jego miejsce zastosowała fungicyd zawierający metrafenon z epoksykonazolem. W tym miejscu chciałbym aby Doktorantka wyjaśniła czym było to spowodowane? Wydaje się, że bardziej uzasadnione byłoby wykluczenie z tych badań fungicydu zawierającego karbendazym, gdyż substancja ta została w Polsce wycofana z obrotu w 2016. W badaniach laboratoryjnych zastosowane preparaty hamowały wzrost liniowy *O. aciformis* od 30% do 90%, natomiast *O. yallundae* od 18% do 64%. Przy czym ostatni gatunek większą wrażliwość wykazywał w stosunku do fungicydów zawierających jako substancję aktywną związki z grupy triazoli. Jednak jak zauważyła Doktorantka na podstawie własnych obserwacji, większe różnice w zahamowaniu wzrostu grzybni obu gatunków wystąpiły w przypadku metrafenonu,

cyprodynilu i karbendazymu. O ile stężenie zastosowanego w badaniach fungicydu miało istotny wpływ na procent zahamowania wzrostu liniowego grzybni dla obu badanych gatunków, to jednak bardziej wrażliwy na zastosowane fungicydy był *O. aciformis* i to niezależnie od zastosowanego stężenia. Uzyskane wyniki w tej części badań w powiązaniu z wynikami badań polowych pozwoliły Doktorantce wskazać praktyce rolniczej, które z zalecanych fungicydów dają najlepsze efekty w ochronie pszenicy ozimej przed grzybami wywołującymi łamliwość źdźbeł zbóż i traw i te informacje powinny być wykorzystane do zaleceń ochrony pszenicy ozimej przed tą chorobą. Również kolejny etap badań związany z podatnością wybranych odmian pszenicy ozimej na porażenie przez grzyby *Oculimacula* spp. może być traktowany jako ważna wskazówka dla producentów zbóż, tym bardziej, że Doktorantka uwzględniła aż 37 odmian pszenicy ozimej. W większości przypadków brak jest informacji ze strony hodowców o ich podatności na łamliwość źdźbła zbóż i traw, stąd uzyskane w tej części wyniki mają dużą wartość dla praktyki rolniczej. Testując te odmiany oddzielnie dla każdego gatunku grzyba Doktorantka wykazała, że najmniej podatnymi na *O. yallundae* okazały się odmiany Praktik oraz Kilimangaro, Matrix, Patras i Skagen. Odmiany te okazały się również najmniej podatne na porażenie grzybem *O. aciformis* podobnie jak odmiana Famulus. Istotnie wyższe porażenie stwierdzono natomiast u pozostałych odmian dla obydwu testowanych gatunków *Oculimacula*. I to powinno być uwzględnione w podsumowaniu (wnioskach końcowych), gdzie doktorantka zbyt ogólnikowo odniosła się do tej części badań. Informacje te jak wcześniej napisałem są istotne dla praktyki rolniczej, gdyż mogą być zaleceniem szczególnie w rejonach, gdzie występują problemy z łamliwością źdźbła zbóż i traw. Wprowadzenie do uprawy na większą skalę odmian pszenicy ozimej mniej podatnych na tę chorobę może obniżyć z jednej strony nakłady na produkcję (ogranicza zwalczanie chemiczne do niezbędnego minimum, przez co spadają koszty), a ponadto eliminuje niekorzystną chemizację środowiska. Szkoda, że w tej części badań Doktorantka pominęła odmianę Cubus, która była wykorzystana w badaniach polowych.

„Dyskusja”, podobnie jak poprzednie rozdziały pracy napisana jest w sposób kompetentny i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w literaturze naukowej i o umiejętności krytycznego konfrontowania samodzielnie otrzymanych wyników badań z danymi opublikowanymi przez innych badaczy. Z dyskusji wynika, że nie można podać jednoznacznych przyczyn wpływających na dominację danego gatunku w populacji *Oculimacula*. Jak słusznie zauważyła Doktorantka konfrontując własne wyniki z doniesieniami innych autorów, w tym również z Polski, na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się dużą zmienność występowania gatunków *Oculimacula aciformis*

i *O. yallunadae*. W badaniach własnych Doktorantka stwierdziła przewagę *Oculimacula aciformis* wśród zidentyfikowanych izolatów *Oculimacula* spp. co mogło być spowodowane intensywnym stosowaniem do ochrony fungicydów bazujących na prochlorazie, na który to związek większą wrażliwość wykazuje *O. yallundae*. Ponadto wpływ na zmienność populacji *Oculimacula* spp. mogą mieć, jak słusznie zauważyła uprawiane odmiany i płodozmian. W dyskusji znajdziemy również ważne informacje dla innych badaczy zajmujących się grzybami *Oculimacula* spp. Na podstawie własnych wyników i konfrontacji z innymi autorami Doktorantka wykazała, że grzyby *Oculimacula* charakteryzują się zbyt dużą zmiennością, stąd bazując tylko na cechach morfologicznych i fizjologicznych nie zawsze można dokonać prawidłowej ich identyfikacji. Dlatego obecnie wykorzystuje się w tym celu dostępne techniki biologii molekularnej (PCR).

Na zakończenie swojego opracowania Doktorantka przedstawia podsumowanie, raczej powinny być to Wnioski. Wyciągnięte na podstawie tak obszernych badań są może zbyt oszczędne i nie odzwierciedlają całości uzyskanych wyników ale zostały sformułowane w sposób poprawny (poza zbyt ogólnikowym pkt. 9, który należy uściślić) i w pełni znajdują uzasadnienie w uzyskanych wynikach, świadcząc jednocześnie, że postawione cele pracy zostały przez autorkę osiągnięte.

Najważniejsze według mojej oceny wyniki uzyskane przez Doktorantkę to wykazanie, że kultury *O. aciformis* i *O. yallundae* różnią się zabarwieniem grzybni, co może ułatwić wstępną identyfikację do gatunku ale do ostatecznej weryfikacji, ze względu na ograniczone zarodnikowanie tylko na pożywce PDA niezbędne są metody molekularne. Wykazanie, że najlepszą skuteczność w warunkach polowych wykazują fungicydy zawierające boskalid z epoksykonazolem, protiokonazol ze spiroksaminą oraz cyprodynil i metrafenon, a także określenie podatności dla 37 odmian pszenicy ozimej.

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej mgr Darii Nowak pragnę podkreślić jej wysoki poziom merytoryczny, bardzo dobre rozeznanie w opracowywanej tematyce badań, umiejętność doboru metod badawczych i posługiwania się nimi. Doktorantka wykazała w rozprawie doktorskiej pełne przygotowanie do samodzielnego prowadzenia badań naukowych w reprezentowanej przez Nią dyscyplinie. Chciałbym zwrócić również uwagę, że praca doktorska, oprócz uzyskanych wielu interesujących wyników poznawczych ma dużą wartość użyteczną, a zatem z możliwością wykorzystania jej w praktyce.

Pomimo zamieszczonych w recenzji kilku drobnych uwag pracę pani mgr Darii Nowak oceniam wysoko. Założyła ona szeroki program badawczy, który w pełni zrealizowała. Sposób opracowania wskazuje na zdolność doktorantki do pracy naukowo-

badawczej oraz jej szeroką wiedzę. Tych kilka uwag, które zawarłem w swojej recenzji doktorantka może uwzględnić podczas przygotowywania tego materiału do znaczących publikacji naukowych.

Na podstawie przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej stwierdzam, że w pełni odpowiada ona warunkom stawianym przez „Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki” i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Darii Nowak do publicznej obrony pracy doktorskiej.

Kraków. 20.04.2020 r.



.....

Prof. dr hab. Stanisław Mazur