

Dr hab. Ewa Mirzwa-Mróz
Instytut Nauk Ogrodniczych SGGW w Warszawie
Zakład Fitopatologii
Ul. Nowoursynowska 159 bud. 37
02-776 Warszawa

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Poniatowskiej pt.: „Identyfikacja i charakterystyka grzybów z rodzaju *Monilinia* porażających drzewa owocowe w Polsce”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pt.: „**Identyfikacja i charakterystyka grzybów z rodzaju *Monilinia* porażających drzewa owocowe w Polsce**” została wykonana w Instytucie Ogrodnictwa-PIB w Skierniewicach pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Puławskiej. Na pracę składa się cykl trzech powiązanych ze sobą tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2013-2021 w wysoko punktowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). Są to:

1. **Poniatowska A**, Michalecka M, Bielenin A, 2013. Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 135: 855–865 doi:10.1007/s10658-012-0130-2.

Punktacja wg MNiSW2013: 35

IF2013: 1,707

5-letni IF: 1,839

2. **Poniatowska A**, Michalecka M, Puławska J, 2016. Genetic diversity and pathogenicity of *Monilinia polystroma* – the new pathogen of cherries. *Plant Pathology* 65: 723–733 doi:org/10.1111/ppa.12463.

Punktacja wg MNiSW2016: 35

IF2016: 2,425

5-letni IF: 2,744

3. **Poniatowska A**, Michalecka M, Puławska J, 2021. Phylogenetic relationships and genetic diversity of *Monilinia* spp. isolated in Poland based on housekeeping- and pathogenicity-related gene sequence analysis. *Plant Pathology* 70: 1640–1650 doi:org/10.1111/ppa.13401

Punktacja wg MNiSW2021: 140

IF2020: 2,590

5-letni IF: 2,924

Prace te zostały wykonane we współpracy z doświadczonymi i cenionymi badaczami bardzo dobrze znającymi tematykę chorób roślin sadowniczych i wykorzystującymi nowoczesne techniki biologii molekularnej do identyfikacji i charakterystyki mikroorganizmów. Zakres prac jest bardzo szeroki. W trakcie przeprowadzania badań Doktorantka uzyskała 1208 izolatów grzybów zebranych z drzew owocowych rosnących w 62 sadach zlokalizowanych w różnych regionach kraju. We wszystkich przedstawionych pracach udział mgr inż. Anny Poniatowskiej jest znaczący. Doktorantka jest w nich pierwszym autorem, a w drugiej i trzeciej publikacji także autorem korespondencyjnym. W pierwszej publikacji udział Doktorantki wynosił 55% i był związany z wykonaniem przeglądu literatury, realizacją części eksperymentalnej pracy, udziałem w interpretacji wyników badań i przygotowaniu manuskryptu do publikacji. W drugiej publikacji udział mgr inż. Anny Poniatowskiej wynosił 63%, a w trzeciej 60%. W publikacjach tych Doktorantka współuczestniczyła w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu materiału biologicznego do badań, wykonaniu przeglądu literatury, przeprowadzeniu badań, wykonaniu analiz bioinformatycznych, interpretacji uzyskanych wyników i przygotowaniu manuskryptu do publikacji.

Czasopisma, w których opublikowano prace reprezentują tematykę odpowiadającą zakresowi prowadzonych badań wchodzących w skład przedłożonej dysertacji.

Łączna liczba punktów zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 210, a sumaryczny IF: 6,722

Rozprawa doktorska zawiera poprawną strukturę dla tego typu prac. W jej skład wchodzi: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, przegląd literatury, cel badań i hipotezy badawcze, materiał i metody, omówienie opublikowanych wyników, podsumowanie wyników i wnioski, spis literatury, wydruki publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia dotyczące udziału kandydata i współautorów w powstaniu publikacji. Cennym dodatkiem ułatwiającym czytanie pracy jest spis stosowanych w pracy skrótów zamieszczony na początku pracy.

Głównym celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja czynników sprawczych brunatnej zgnilizny drzew ziarnkowych i brunatnej zgnilizny drzew pestkowych w Polsce oraz

opracowanie charakterystyki fenotypowej i molekularnej wybranych szczepów *Monilinia* spp. porażających różne gatunki drzew owocowych. Wyznaczono także sześć celów szczegółowych i założono cztery hipotezy badawcze. W badaniach zastosowano testy fenotypowe, test patogeniczności, analizy sekwencji regionu ITS (wewnętrznych sekwencji transkrybowanych obejmujących niekodujące odcinki ITS1 i ITS2 zawarte w rDNA), genów metabolizmu podstawowego *tub2* (gen kodujący β tubulinę) i *hsp60* (gen kodujący białko szoku termicznego) oraz genów związanych z patogenicznością *pac1* (gen kodujący palec cynkowy czynnika transkrypcyjnego) i *acp1* (gen kodujący proteazy wykazujące największą aktywność w niskim pH środowiska), a w przypadku *M. polystroma* także analizę zróżnicowania genetycznego izolatów grzybów technikami RAPD (polimorfizm losowo powielonych fragmentów DNA), ISSR (polimorfizm sekwencji znajdujących się między loci mikrosatelitarnymi) oraz PCR MP (selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych z dołączonymi do nich adaptorami oligonukleotydowymi). Cele pracy zostały zdefiniowane we właściwy sposób. Zakres przeprowadzonych badań i analiz pozwolił na osiągnięcie zamierzonych celów i potwierdzenie założonych przez Doktorantkę hipotez badawczych.

Wyniki badań niniejszej pracy doktorskiej zostały już pozytywnie ocenione przez anonimowych Recenzentów oraz Redaktorów uznanych czasopism fitopatologicznych i zostały opublikowane w formie trzech artykułów naukowych. Z tego względu moja opinia będzie głównie odnosić się do oceny wyboru tematyki badawczej, możliwości uzyskania wniosków, będących rezultatem analizy publikacji wchodzących w skład cyklu publikacji oraz najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez mgr inż. Annę Poniatowską.

Tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest zasadna i ważna zarówno z naukowego jak i z ekonomicznego punktu widzenia. Odnosi się do czynników sprawczych brunatnej zgnilizny drzew ziarnkowych i brunatnej zgnilizny drzew pestkowych. Choroby te występują w Polsce corocznie i są przyczyną znaczących strat ekonomicznych. Dlatego też, poszerzenie wiedzy na temat składu gatunkowego populacji grzybów z rodzaju *Monilinia* i poznanie ich genetycznego zróżnicowania ma bardzo duże znaczenie praktyczne i może przyczynić się do doskonalenia programów ochrony drzew owocowych przed tymi patogenami.

Pierwsza praca wchodząca w skład cyklu publikacji została opublikowana w 2013 roku. W trakcie prowadzenia badań Doktorantka uzyskała łącznie 670 izolatów grzybów z rodzaju *Monilinia*. Izolaty te zostały zidentyfikowane przy użyciu techniki multiplex PCR oraz w przypadku wybranych izolatów sekwencjonowania ich regionu ITS.

Na podstawie uzyskanych wyników zidentyfikowano 4 gatunki sprawców choroby: *Monilinia fructigena*, *M. laxa*, *M. polystroma* i *M. fructicola*. Na uwagę zasługuje fakt, że dwa ostatnie gatunki (*M. polystroma* i *M. fructicola*) zostały przez Doktorantkę zidentyfikowane po raz pierwszy w Polsce. Najliczniej reprezentowany był gatunek *M. fructigena*, do którego zaliczono ok. 65% wszystkich uzyskanych izolatów. O połowę mniej izolatów zaliczono do gatunku *M. laxa* (ok. 32%). Pozostałe gatunki odnotowywano rzadko. Do *M. polystroma* zaliczono ok. 3%, izolatów, a do *M. fructicola* tylko 0,75%.

Następnie określono relacje filogenetyczne w oparciu o sekwencje regionu ITS wybranych izolatów *M. polystroma* i *M. fructicola* uzyskanych w badaniach własnych i sekwencji izolatów grzybów z rodzaju *Monilinia* dostępnych w bazie NCBI. Na przedstawionym przez Doktorantkę dendrogramie izolaty grzyba *M. polystroma* i *M. fructicola* tworzyły 2 odrębne grupy.

Dokonano także charakterystyki morfologicznej badanych izolatów na pożywkach: APDA-F500 (pożywce ziemniaczano-glukozowej zakwaszonej kwasem mlekowym do pH3,6 z dodatkiem fosetylu glinu, PDA (pożywce ziemniaczano-glukozowej) i CHA (pożywce wiśniowej). Na pożywce z fosetylem glinu wzrost kultur *M. fructicola* i *M. laxa* był hamowany, natomiast nie odnotowano jego ujemnego wpływu na *M. fructigena* i *M. polystroma*.

Grzyby najlepiej zarodnikowały na pożywce CHA, a dodatkowo izolaty grzyba *M. polystroma* wytwarzały na niej sklerocja. Zaobserwowano również dwa rodzaje sporodochiów różniące się wielkością i kolorem w zależności od gatunku grzyba. Chciałabym zwrócić uwagę na stronę metodyczną pracy, w której izolaty grzybów (reprezentujące różne gatunki) zostały porównane do izolatów referencyjnych, a przy badaniu cech morfologicznych grzybów posługiwano się opisami zawartymi w standardzie EPPO PM 7/18 (2009).

W drugiej pracy opublikowanej w 2016 roku w czasopiśmie Plant Pathology po raz pierwszy w świecie stwierdzono że *M. polystroma* wywołuje brunatną zgniliznę drzew pestkowych wiśni i czereśni. Izolaty tego gatunku grzyba uzyskano z trzech spośród 46 przebadanych sadów czereśniowych i wiśniowych zlokalizowanych w centralnej Polsce. Przy identyfikacji gatunku podobnie jak w poprzedniej publikacji zastosowano technikę multiplex PCR oraz sekwencjonowanie regionu ITS.

Na podstawie wyników uzyskanych w badaniach molekularnych z zastosowaniem różnych technik genetycznego odcisku palca (RAPD, ISSR i PCR MP) stwierdzono niski poziom zmienności genetycznej polskich izolatów *M. polystroma* i ich duże podobieństwo do izolatu referencyjnego z Japonii. Jedynie izolat ND19 zawsze tworzył oddzielną grupę niezależnie od zastosowanej metody genotypowania.

Największe zróżnicowanie izolatów *M. polystroma* uzyskano przy zastosowaniu technik ISSR i RAPD, gdzie zaobserwowano odpowiednio 12 i 16 profili amplifikacji, podczas gdy PCR MP pozwoliło tylko na wykrycie 2 profili (jeden w przypadku izolatu ND19, a drugi dla pozostałych izolatów *M. polystroma*). Na skonstruowanych przez Doktorantkę dendrogramach na podstawie polimorfizmu produktów amplifikacji uzyskanych w przypadku każdej z technik nie stwierdzono zależności między pochodzeniem izolatów grzyba (miejsce i gatunek rośliny), a rokiem izolacji. Uzyskane wyniki badań wykazały bliskie pokrewieństwo izolatów gatunków *M. polystroma* i *M. fructigena*. Na dendrogramie utworzonym na podstawie PCR MP izolaty *M. fructicola* tworzyły najbardziej odległą filogenetycznie grupę.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że izolaty *M. polystroma* wywoływały objawy choroby nie tylko na czereśniach i wiśniach, z których zostały wyizolowane, ale także na śliwkach i jabłkach. Świadczy to o braku specjalizacji pasożytniczej w stosunku do roślin żywicielskich.

Celem badań przedstawionych w trzeciej pracy opublikowanej również w Plant Pathology w 2021 roku było zbadanie zależności filogenetycznych między izolatami *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. fructicola* i *M. polystroma* wyizolowanymi z różnych roślin żywicielskich. Badania te mają charakter nowatorski, gdyż dotyczą fragmentów genów (hsp60, acp1 i pac1) dotychczas niebadanych dla *Monilinia* spp. Jako genu referencyjnego użyto fragmentu genu tub2. Uzyskane wyniki pozwoliły na przyporządkowanie badanych izolatów grzybów do ww. gatunków. Nie odnotowano zależności pomiędzy izolatami grzybów należących do poszczególnych gatunków/klastrów, a ich pochodzeniem (miejsce i data izolacji oraz roślina żywicielska). Wykazano wysoki stopień podobieństwa izolatów grzybów w obrębie gatunków oraz stwierdzono bliskie pokrewieństwo gatunków *M. polystroma* i *M. fructigena*.

W przeprowadzonych testach nie wykryto zdarzeń rekombinacji dla żadnego z analizowanych loci (ani dla połączonych sekwencji genów metabolizmu podstawowego ani połączonych sekwencji genów związanych z patogenicznością) co sugeruje, że zmienność genetyczna u tych grzybów nie jest skutkiem wymiany materiału genetycznego, a wynikiem mutacji

zachodzących w ich genomach. Wyniki te mają kluczowe znaczenie w zrozumieniu potencjału epidemiologicznego badanych patogenów.

Mam jednak kilka uwag dotyczących części opisowej (komentarza) dysertacji:

1. Przy przedstawieniu systematyki grzybów z rodzaju *Monilinia* (str. 12) sugerowałabym, zmianę terminu „Gromada” na stosowany obecnie „Typ”. Według Kirk i in. (2008) grzyby są bliższe zwierzętom niż roślinom i dlatego zaproponowano używanie nazwy „typ” dla taksonu o rangę niższego od królestwa. Od tego czasu nazwa ta funkcjonuje w podręcznikach fitopatologicznych i mykologicznych (np. Kryczyński i Weber 2010, Marcinkowska i in. 2012) oraz publikacjach naukowych.
2. Pseudosklerocjum wg Kryczyńskiego i in. (2002) to twór złożony ze spasożytowanej, obficie przerośniętej strzępkami grzybni tkanki roślinnej. Dlatego też, w moim odczuciu zdanie „Patogeny zimują w formie grzybni w z mumifikowanych owocach pozostałych na drzewie” (str. 11) odnosi się też do pseudosklerocjum. W pracy natomiast przedstawiono, że pseudosklerocjum odnosi się tylko do owoców przerośniętych grzybnia opadłych na ziemię.
3. Szczep to wariant w obrębie gatunku wirusa, bakterii czy grzyba charakteryzujący się określoną odmiennością względem jakiejś cechy (Kryczyński i in. 2002). W moim odczuciu w większości przypadków przy opisach prac należałoby zamienić słowo szczep na „izolat”, gdyż w pracy grzyby te były dopiero badane i określone ich cechy nie zawsze były do końca znane.

Na podstawie uzyskanych wyników w pracy przedstawiono rozdział „Podsumowanie i wnioski”, do którego mam kilka pytań i prosiłabym o ustosunkowanie się do nich mgr inż. Anny Poniatowskiej:

1. Wniosek 2 byłby bardziej czytelny, gdyby przy wymienionych patogenach zaznaczono, który z nich powoduje brunatną zgniliznę drzew ziarnkowych i brunatną zgniliznę drzew pestkowych najczęściej, a który najrzadziej.
2. Wniosek nr 6 nie do końca jest zgodny z wnioskiem nr 2. Wniosek nr 6 sugeruje, że brunatną zgniliznę drzew ziarnkowych może powodować *M. fructigena* i *M. laxa*, podczas gdy we wniosku nr 2 stwierdzono, że *M. laxa* w ogóle nie powoduje brunatnej zgnilizny drzew ziarnkowych. Czy wiadomo na podstawie literatury kiedy po raz pierwszy w Polsce zidentyfikowano grzyby *M. laxa* i *M. fructigena*, gdyż tych informacji zabrakło mi w pracy?

3. Które z badań przedstawione w pracy potwierdzają „zdolność adaptacji grzybów z rodzaju *Monilinia* do warunków środowiskowych” o których jest mowa we wniosku nr 7? We wniosku tym sugeruję zamienić stwierdzenie „brakiem specjalizacji patogenicznej” na „brakiem specjalizacji pasożytniczej”
4. Jakie jest znaczenie wyników przeprowadzonych badań dotyczących zmienności genetycznej (wniosek nr 10) dla ochrony drzew sadowniczych?

Podsumowanie

Uzyskane przez mgr inż. Annę Poniatowską wyniki stanowią cenny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej grzybów z rodzaju *Monilinia* porażających drzewa owocowe w Polsce. Przedstawiona dysertacja wskazuje na opanowanie przez Panią mgr inż. A. Poniatowską warsztatu mykologicznego, zarówno na poziomie klasycznej mykologii jak i technik biologii molekularnej. Bardzo wysoko oceniam zaprezentowane w pracy publikacje. W Polsce, do czasu rozpoczęcia badań przez Doktorantkę nad etiologią brunatnej zgnilizny drzew ziarnkowych i brunatnej zgnilizny drzew pestkowych były zidentyfikowane tylko dwa gatunki sprawców tych chorób: *M. laxa* i *M. fructigena*, natomiast Doktorantka zidentyfikowała kolejne 2 gatunki *M. fructicola* i *M. polystroma*, co uważam za najważniejsze osiągnięcie rozprawy. Ponadto wykonano szereg badań na poziomie molekularnym, które pozwoliły na identyfikację badanych patogenów i ich charakterystykę. Niektóre z tych badań miały także charakter nowatorski. Wyniki z przeprowadzonych badań wnoszą więc nową wiedzę dotyczącą tego zagadnienia. Chciałabym podkreślić, że były to pierwsze badania przeprowadzone w Polsce w tak szerokim zakresie dotyczącym występowania i etiologii tych chorób na różnych gatunkach drzew owocowych. Pani mgr inż. Anna Poniatowska z dużą swobodą porusza się w temacie o czym świadczy sposób przygotowania dysertacji i opracowanie wyników badań. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki. Ponadto jeszcze raz należy podkreślić znaczenie praktyczne uzyskanych wyników badań dla ochrony roślin przed tymi patogenami.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja **spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa-PIB w Skierniewicach o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Poniatowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie wnioskuję o **wyróżnienie pracy** mgr inż. Anny Poniatowskiej jako bardzo interesującej, wartościowej i innowacyjnej rozprawy. Chciałabym jeszcze raz podkreślić, że Doktorantka biegle posługiwała się najnowocześniejszymi metodami badawczymi i uzyskała

Warszawa, 24.01.2022

liczne i bardzo ważne wyniki, podawane po raz pierwszy w Polsce, a niektóre w świecie. Dlatego też, uważam, że praca ta zasługuje na nagrodę.



Dr hab. Ewa Mirzwa-Mróż