

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

Tatiana Maria Dolińska

**Grzyby z rodzaju *Cladosporium* jako
nadpasożyty grzybów rdzawnikowych
i mączniaków prawdziwych**

Fungi of the genus *Cladosporium* as hyperparasites
of rusts and powdery mildews

Praca doktorska
Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. Małgorzaty Schollenberger, prof. SGGW
Samodzielny Zakład Fitopatologii SGGW

Recenzenci:

Prof. dr hab. Czesław Sadowski
Zakład Fitopatologii Molekularnej
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Prof. dr hab. Wojciech Wakuliński
Samodzielny Zakład Fitopatologii
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2015

Streszczenie

Grzyby z rodzaju *Cladosporium* jako nadpasożyty grzybów rdzawnikowych i mączniaków prawdziwych

Przeprowadzone badania wykazały, że zebrane w warunkach *in vivo* izolaty *Cladosporium* spp. miały zdolność kolonizowania groźnych patogenów roślin tj. grzybów rdzawnikowe i grzyby z rzędu Erysiphales. Badaniami objęto 32 izolaty własne oraz 4 izolaty referencyjne, które reprezentowały 11 gatunków z rodzaju *Cladosporium*. Identyfikację gatunków przeprowadzono w oparciu o klasyczne metody mykologiczne uzupełnione technikami molekularnymi.

Wszystkie badane gatunki z rodzaju *Cladosporium* okazały się nadpasożytami, które jako nekrotrofy zasiedlały powierzchnię grzybów rdzawnikowych i doprowadzały do degradacji wytwarzanych przez nie zarodników. *Cladosporium* spp. wytwarzały appressoria oraz charakterystyczne strzępki owijające się wokół spor rdzy, a także produkowały enzymy lityczne ułatwiające im przedostanie się do wnętrza komórek zarodników. W przypadku sprawców mączniaków prawdziwych trudno było jednoznacznie potwierdzić zdolności mykopasożytnicze grzybów *Cladosporium* spp. rozwijających się na dojrzałych chasmotecjach.

Słowa kluczowe – mykopasożytnictwo, *Cladosporium* spp., rdze, grzyby z rzędu Erysiphales

Summary

Fungi of the genus *Cladosporium* as hyperparasites of rusts and powdery mildews

The conducted studies showed that isolates of *Cladosporium* spp. collected *in vivo* possessed abilities to colonize dangerous plant pathogens like rusts and fungi of order Erysiphales. The studies included 32 own isolates and 4 reference isolates, which represented 11 species of the genus *Cladosporium*. Species identification was based on the classical mycological methods complemented by molecular techniques.

It was proven that all tested *Cladosporium* spp. are hyperparasites, which as necrotrophs colonized the surface of rusts and led to the destruction of rust spores. *Cladosporium* spp. produced appressorium and characteristic hyphae which coiled around spores and also produced lytic enzymes simplifying the process of getting inside the spores. In case of powdery mildews it is very difficult to prove clearly that *Cladosporium* spp. which grew on mature chasmotecia possess mycoparasite abilities.

Keywords – mycoparasitism, *Cladosporium* spp., rusts, fungi of order Erysiphales

Warszawa, dnia 17.05.2015

Prof. dr hab. Wojciech Wakuliński
Samodzielny Zakład Fitopatologii
Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii
I Architektury Krajobrazu SGGW
Nowoursynowska 159, 02 – 787 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Tatiany Marii Dolińskiej pt „Grzyby z rodzaju *Cladosporium* jako nadpaszożyty grzybów rdzawnikowych i mączniaków prawdziwych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa została zrealizowana w Samodzielnym Zakładzie Fitopatologii SGGW pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Schollenberger prof. SGGW

Dysertacja obejmuje 8 rozdziałów (wstęp, przegląd literatury, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja, wnioski, spis literatury oraz aneks) zawiera 60 rycin, 15 tabel, 138 fotografii oraz 186 pozycji literatury, które zostały przedstawione na 169 stronach maszynopisu.

We wstępie rozprawy doktorskiej został sprecyzowany cel pracy, którym było określenie zdolności zasiedlania przez występujące na terenie Polski gatunki z rodzaju *Cladosporium* grzybów rdzawnikowych i gatunki z rzędu *Erysiphales*.

Ponadto Autorka wyróżniła trzy zadania szczegółowe:

- określenie relacji pomiędzy grzybami z rodzaju *Cladosporium* a ich gospodarzami z wykorzystaniem technik mikroskopowych,
- oznaczenie przystosowań grzybów *Cladosporium* spp., które decydują o ich zdolności do zasiedlania patogenów roślin tj. produkcji enzymów litycznych oraz określenie wpływu temperatury i warunków świetlnych na ich wytwarzanie,
- określenie zakresu żywicieli w obrębie grzybów rdzawnikowych i grzybów z rzędu *Erysiphales* z uwzględnieniem porażanej struktury tych grzybów

Temat rozprawy doktorskiej, jak też jej cele wpisują się w bardzo aktualny i nader potrzebny obszar badań z zakresu współczesnej fitopatologii. Wynika to z potrzeby implementacji na coraz szerszą skalę integrowanych metod ochrony roślin. Paradoksalnie, pomimo obiektywnego znaczenia problematyki jest to kierunek badań niezbyt chętnie podejmowany, głównie za sprawą trudności metodycznych występujących w układach trójtroficznych (roślina – patogen – nadpaszożyt).

W przypadku niniejszej pracy należy podkreślić, że:

1° mączniaki prawdziwe i rdze, to specyficzna grupa patogenów dla których przynajmniej współcześnie nie znane są metody prowadzenia ich w kulturach aksenicznych, co rodzi oczywiste problemy z utrzymaniem populacji badanych gatunków

2° rodzaj *Cladosporium* jest bardzo liczny, w jego obrębie wyróżnia się 630 gatunków (Index Fungorum 2015) co z punktu widzenia bioróżnorodności jest intrygujące, jest jednak powodem określonych trudności diagnostycznych

Rozprawa odbiega od przeciętnego stereotypu/schematu współczesnych dysertacji doktorskich (jeden gen – jedno białko - jeden doktorat lub coraz częściej jeden genom – jeden proteom – jeden doktorat) a koncentruje się na twórczej analizie otaczającej rzeczywistości. Łamanie stereotypów jest generalnie trudne, w nauce zwykle wiąże się z pasją, gruntowną wiedzą i znajomością warsztatu którym badacz się posługuje.

Przegląd literatury został przedstawiony na 30 stronach i stanowi bardzo rzetelne i wielowątkowe opracowanie na temat nadpasożytnictwa grzybów z rodzaju *Cladosporium*. Obejmuje on 7 zwartych tematycznie podrozdziałów w których zostały zawarte ogólne wiadomości o nadpasożytnictwie, cechy grzybów z rodzaju *Cladosporium* i ich występowanie w środowisku, wpływ warunków abiotycznych na wzrost tych grzybów, molekularne podstawy diagnostyki *Cladosporium*, rozpoznane nadpasożytnicze gatunki *Cladosporium* oraz patogenzę nadpasożytnictwa *Cladosporium*.

W przeglądzie literatury na podkreślenie zasługuje charakterystyka grzybów z rodzaju *Cladosporium* stanowiąca oryginalne kompendium wiedzy. W sposób rzeczowy i sprawny została przedstawiona historia tych grzybów od momentu opisanego pierwszego gatunku *Cladosporium herbarum* przez Linka w roku 1816 do czasów współczesnych. Przedstawiając rodzaj Doktorantka uwzględniła wszystkie kluczowe pozycje dotyczące *Cladosporium*, co umożliwiło przekrojową charakterystykę morf., warunków wzrostu tych grzybów oraz występowania w środowisku z uwzględnieniem zajmowanych nisz.

Odnosząc się do nadpasożytniczych cech grzybów Doktorantka scharakteryzowała:

1° znane mechanizmy pobierania substancji odżywczych przez nadpasożyty, które to kryterium jest podstawą do wyróżnienia biotrofów, nekrotrofów, biotrofów fakultatywnych, grzybów półsaprotroficznych oraz saprotrofów towarzyszących.

2° sposoby nawiązywania kontaktu pasożytniczego z żywicielem typowe dla biotrofów fuzyjnych, haustorialnych i wewnątrzkomórkowych oraz nekrotrofów inwazyjnych i kontaktowych.

Przegląd literatury kończy podrozdział w którym przedstawione zostały kolejne fazy rozwoju pasożytniczej interakcji pomiędzy *Cladosporium* spp a gospodarzem. Autorka wyróżniła trzy etapy tego procesu a mianowicie okres przedpenetracyjny, etap związany z penetracją komórek żywiciela oraz okres popenetracyjny. Każde ze stadiów jest precyzyjnie opisane z uwzględnieniem funkcji i aktywności struktur morfotycznych grzybów udziału enzymów oraz znaczenia metabolitów wtórnych w przebiegu zakażenia.

Materiały i metody zostały przedstawione na 18 stronach, gdzie w kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawia pochodzenie izolatów *Cladosporium*, sposób uzyskiwania kultur jednozarodnikowych nadpasożytów, stosowane metody diagnostyki mykologicznej *Cladosporium*, metody indukcji stadium doskonałego *Cladosporium*, metodykę analizy czynników różnicujących wzrost *Cladosporium*, przyjęty sposób określania zakresu żywicieli w obrębie *Erysiphales* oraz *Pucciniales*, wykorzystywane techniki badawcze charakteryzujące przebieg infekcji żywicieli przez *Cladosporium* spp., przyjętą metodykę analizy enzymów litycznych wytwarzanych przez *Cladosporium* spp., zastosowane przy analizie wyników metody statystyczne.

Zastosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń i są zgodne z zasadami i warsztatem badań mykologicznych, są one w pełni adekwatne do postawionych w doktoracie celów.

Wyniki badań zostały przedstawione przez doktorantkę w 12 podrozdziałach na 72 stronach i obejmują wszystkie zaplanowane zadania badawcze. Zgromadzony materiał faktograficzny jest bardzo obszerny, rzetelnie zewidencjonowany, dobrze opracowany i opisany.

Izolaty grzybów z rodzaju *Cladosporium* były pozyskiwane bezpośrednio z plechy *Erysiphales* i *Uredinales*. W tym celu Doktorantka przebadła gigantyczną liczbę prób (9140) liści 43 gatunków roślin z 12 rodzin botanicznych porażonych przez 22 gatunki rdzy i 20 gatunków mączniaków prawdziwych zebranych z 10 lokalizacji na terenie województwa dolnośląskiego, łódzkiego, mazowieckiego, podlaskiego, pomorskiego, i świętokrzyskiego.

Z pozyskanych prób Doktorantka wyprowadziła 32 izolaty *Cladosporium*, które po doprowadzeniu do form jednozarodnikowych szczegółowo opisała i poddała drobiazgowej analizie mykologicznej z uwzględnieniem metod klasycznych i molekularnych. Przeprowadzone badania dały podstawę do rozpoznania 11 gatunków *Cladosporium*, przy czym występowanie trzech z nich (*Cladosporium pseudocladosporioides*, *Cladosporium phyllactinicola* oraz *Cladosporium spongiosum*) zostało stwierdzone na terenie Polski po raz pierwszy. Po raz pierwszy stwierdzono także występowanie w Polsce na plesze grzybów rdzawnikowych i mączniaków prawdziwych obecność *C.cladosporioides*,

C.herbarum, *C.oxysporum*, *C.sphaerospermum*, *C.tenuissimum*, *C.pseudocladosporioides*, *C.phyllactiniicola* oraz *C.spongiosum*.

Zaprezentowany w dalszej części dysertacji obszar badań dotyczący morfy mejotycznej *Cladosporium* uważam za pasjonujący i z pewnością mógłby stanowić podstawę odrębnej pracy doktorskiej. Mało jest badań dokumentujących ten obszar biologii *Cladosporium* spp. Wśród zgromadzonych izolatów zdolność tworzenia stadium doskonałego Doktorantka stwierdziła w przypadku 6 z nich. Pięć izolatów reprezentowało gatunek *Davidiella tassiana* a jeden *Davidiella macrocarpum*. Uzyskane morfy zostały następnie szczegółowo opisane i scharakteryzowane z zastosowaniem klasycznych metod mykologicznych.

Analizując zakres żywicieli *Cladosporium* w obrębie *Uredinales* Doktorantka stwierdziła występowanie specjalizacji na poziomie gatunku a nawet poszczególnych izolatów *Cladosporium*, jak również zachodzenie preferencji związanych z możliwością rozwoju *Cladosporium* tylko na strukturach określonych stadiów rozwojowych rdzy. Podobne wnioski co do zasady płyną z analizy stopnia porażenia *Erysiphales*, z tym jednak, że porażenie tej grupy grzybów było zdecydowanie słabsze i dotyczyło jedynie dojrzałych chasmotecjów.

Jest to niezwykle ważne spostrzeżenie zarówno ze stricto naukowego jak też pragmatycznego - użytkowego punktu widzenia. Wyniki te jednoznacznie sugerują na występowanie pomiędzy żywicielem (grzybem) a *Cladosporium* (nadpasożytem) interakcji typu gen na gen opisanej przez Flora a występującej w przypadku porażenia roślin przez biotrofy. Oznacza to jednocześnie, że starania idące w kierunku uzyskania biopreparatu nie powinny być oparte na wyselekcjonowanym pojedynczym izolacie.

Przebieg interakcji pomiędzy strukturami *Uredinales/Erysiphales* a *Cladosporium* Doktorantka badała z zastosowaniem mikroskopu świetlnego, skaningowego oraz transmisyjnego. Analizując przebieg zachodzących interakcji pomiędzy strukturami *Uredinales* a *Cladosporium* stwierdzony został ukierunkowany wzrost strzępek kielkowych zarodników *Cladosporium* w kierunku struktur grzybów rdzawnikowych. Dodatkowo grzyby te tworzyły specyficzne struktury infekcyjne - apresoria, które stwierdzono w przypadku wszystkich testowanych gatunków *Cladosporium*. Konsekwencją zasiedlenia zarodników rdzy był rozwój morfy mitotycznej *Cladosporium* z widocznym zarodnikowaniem.

Badając możliwość porażenia przez *Cladosporium* mączniaków prawdziwych stwierdzono, że infekcji ulegają jedynie dojrzałe chasmotecja oraz przyczepki wtórne, odporna na porażenie pozostaje grzybnia, młode niedojrzałe chasmotecja oraz przyczepki pierwotne. Udokumentowana została także możliwość tworzenia apresorium. Tworzyły się one jednak jedynie w przypadku infekcji *E.palczewski* przez *C.herbarum*.

Wszystkie załączone zdjęcia (z mikroskopu świetlnego, skaningowego i transmisyjnego) stanowią wysokiej klasy materiał dokumentacyjny nadpasożytnictwa *Cladosporium*. Syntetyczny ich opis zawarty w dysertacji nie uwypukla i nie odzwierciedla w pełni ich wartości.

Dysertacja dokumentuje także możliwość wytwarzania przez grzyby z rodzaju *Cladosporium* glukonanazy, chitynazy i celulazy oraz wpływ na ten proces szeregu czynników biotycznych.

Dyskusja została przedstawiona na 16 stronach w trakcie której Doktorantka w dojrzały sposób odniosła się do uzyskanych wyników w kontekście literatury światowej. Na uwagę zasługuje wnikliwa porównawcza analiza właściwości *Cladosporium*, które umożliwiają i jak się wydaje decydują o porażeniu *Erysiphales* i *Uredinales*. Autorka komentuje poszczególne cechy *Cladosporium* w kontekście przystosowań do nadpasożytnictwa w obszarze przebiegu patogenyzy, etiologii jak również wybranych cech epidemiologicznych.

Doktorantka przedstawiła 11 wniosków co do których nie wnoszę zastrzeżeń

Poniżej przytaczam uwagi, związane z dysertacją, które w żaden sposób nie dyskredytują ani nie umniejszają wartości opracowania będącego przedmiotem recenzji.

Uwagi ogólne

- Jak zostało wspomniane przegląd literatury jest rzeczowy i merytorycznie dobry, natomiast brakuje niekiedy krytycznego stanowiska czy też komentarza do podawanych treści. Na przykład autorka wyszczególnia między innymi półsaprotrofy, oraz saprotrofy towarzyszące. Sens ich wyróżniania budzi moje wątpliwości a kryteria umożliwiające ich różnicowanie nie są do końca precyzyjne.
- Uważam, że nie należało pozostawić bez komentarza stwierdzenia, że grzybnia *Cladosporium/Davidiella* jest homotaliczna. Jak pokazuje przykład innych Ascomycota homotalizm jest indywidualną cechą pojedynczych gatunków, która pojawia się w trakcie ewolucji gatunków reprezentujących rodzaj niekiedy wielokrotnie i niezależnie. Przytoczona przez Autorkę sytuacja gdzie wszystkie gatunki w obrębie rodzaju są homotaliczne jest dość wyjątkowa, zwłaszcza przy rodzaju tak gatunkowo liczebnym.
- W rozdziale materiał i metody niezbyt precyzyjnie została przedstawiona metodyka „analiza enzymów litycznych wytwarzanych przez *Cladosporium*”. Czytelnik nie będący w temacie pogubi się w przedstawionej procedurze i mam wątpliwości czy będzie wiedział co było przedmiotem analizy. Opisując zagadnienie autorka używa różnych nietożsamyh określeń (np. ilość cukrów redukujących, aktywność enzymów oraz ilość enzymów) traktując te terminy jak synonimy.
- Przedstawiając wyniki nie rozumiem dlaczego osiągnięcia o dużej wadze naukowej nie zostały dostatecznie dobrze wyeksponowane. Dlaczego informacja o zidentyfikowaniu nowych gatunków w Polsce nie została przedstawiona w streszczeniu?
- Nie jestem także pewien czy rozwijanie tematu dotyczącego stadium doskonałego w kontekście nadpasożytnictwa było niezbędne. Podjęty wątek prowokuje szereg pytań które pozostają bez odpowiedzi. Dlaczego tylko 6 izolatów utworzyło stadium doskonałe? Czy aby na pewno wszystkie gatunki *Cladosporium* są homotaliczne? Jaki jest wpływ czynników abiotycznych na tworzenie tego stadium?, jakie jest podłoże genetyczne tworzenia teleomorfy *Cladosporium* w odniesieniu do innych workowców.

Uwagi szczegółowe

- Str. 23 „organów powstałych na grzybni homotalicznej” – grzyby nie tworzą organów
- Str 24 ryc. 6 i ryc.7 brak skali wielkości
- Str 25 „homogenizacji tkanek grzybów” – grzyby nie tworzą tkanek
- Str 96 ryc.16 - opis wykresu nie uwzględnia co przedstawiają „wąsy” wychodzące z poszczególnych punktów wykresu
- Str 97 ryc.17- opis wykresu nie uwzględnia co przedstawiają „wąsy” wychodzące z poszczególnych punktów wykresu
- Str 118 „zaobserwowano taksje dodatnie” w przypadku grzybów i strzępek rozważyłbym stosowanie terminu tropizm a nie taksja
- Str 120 fot.101- brak skali wielkości
- Str 121 „Taksji dodatnich nie zanotowano” w przypadku grzybów i strzępek rozważyłbym stosowanie terminu tropizm a nie taksja
- Str 129 ryc. 19 – 23- błędnie zostały opisane osie rzędnych. Zastosowana/opisana metodyka po prostu nie daje możliwości wyznaczenia stężenia poszczególnych enzymów a jedynie stężenie produktów reakcji enzymatycznej. Enzymy nie są produktami reakcji a jedynie ich katalizatorami. Ponadto wykresy nie zawierają odniesień do wykonanej statystyki. Ich brak

powoduje, że ogrom pracy związany z dużą liczbą powtórzeń (n=10) ginie, jest niewidoczny, także utrudnia wnioskowanie.

- Str 130 Ryc. 23- dwie ryciny posiadają ten sam numer - 23
- Str 132 zamiast „oraz grzybów powodujących mączniaki prawdziwe” proponowałbym np. Erysiphales lub mączniaki prawdziwe
- Str 140 „najlepszymi zdolnościami polifagicznymi” – ta cecha nie może być lepsza lub gorsza, raczej zakres żywicieli jest szerszy lub węższy.

W konkluzji, uważam, że praca wnosi istotny i oryginalny wkład w wiedzę z zakresu przedmiotu. Na podkreślenie zasługuje:

- stwierdzenie występowania w Polsce i opisanie trzech nowych gatunków: *Cladosporium pseudocladosporioides*, *Cladosporium phyllactiniicola* oraz *Cladosporium spongiosum*
- odkrycie, opisanie i udokumentowanie możliwość rozwoju szeregu gatunków *Cladosporium* na grzybach rdzawnikowych i mączniakach prawdziwych, w tym między innymi: *Cladosporium uredinicola* na przedstawicielach *Cumminsella*, *Gymnosporangium*, *Uromyces*, czy też *Cladosporium aecidiicola*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium spongiosum* i *Cladosporium tenuissimum* na gatunkach z rzędu *Erysiphales*.
- udowodnienie występowania specyficznej patogeniczności poszczególnych gatunków *Cladosporium* w stosunku do gatunków *Erysiphales* i *Uredinales*.

Są to wyniki ponadczasowe i rzucające nowe światło na pasożytnicze cechy grzybów z rodzaju *Cladosporium*.

Wnioski końcowe

W świetle przedstawionej powyżej recenzji rozprawy doktorskiej wnoszę do Rady Wydziału Ogrodnictwa i Biotechnologii SGGW o dopuszczenie Pani Tatiany Marii Dolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając merytoryczny poziom dysertacji (sprecyzowany i opisany szczegółowo w konkluzji opinii) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Wojciech Walubiński

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tatiany Marii Dolińskiej
„Grzyby z rodzaju *Cladosporium* jako nadpasożyty grzybów rdzawnikowych
i mączniaków prawdziwych”

Intensyfikacja produkcji roślinnej doprowadziła w wielu krajach do nadmiernego stosowania fungicydów. Coraz liczniejsze są opinie o konieczności ich ograniczenia. Jednak bez ograniczenia szkodliwości patogenicznych grzybów nie jest możliwe wyprodukowanie wystarczającej ilości żywności w skali globalnej. Choroby roślin powodują w zależności od gatunku, straty w produkcji sięgające kilkanaście i więcej procent, a w latach epifitozy nawet kilkadziesiąt procent. Do jednych z najgroźniejszych należą grzyby rdzawnikowe i powodujące mączniaki prawdziwe. Stosowanie środków ochrony roślin nie zawsze jest wystarczająco skuteczne i nie zawsze możliwe. Ponadto troska o środowisko naturalne skłania do poszukiwania nie chemicznych możliwości ochrony roślin przed chorobami. Aby ograniczyć ich szkodliwość, prowadzi się wielokierunkowe badania mające na celu zmniejszyć to ryzyko.

Rozprawa doktorska Pani Tatiany Marii Dolińskiej dotycząca określenia zdolność różnych gatunków *Cladosporium* do zasiedlania grzybów rdzawnikowych i grzybów z rzędu Erysiphales jest znakomitą próbą przebadania możliwości wykorzystania tych powszechnie występujących w środowiskach naturalnych mikroorganizmów pod kątem ich przydatności w biologicznej ochronie roślin. Jest to tym bardziej interesujące, że wśród gatunków rodzaju *Cladosporium* mogą być zarówno saprotrofy, patogeny jak i nadpasożyty. Tematyka wpisuje się w dyrektywę Unii Europejskiej wprowadzającą konieczność stosowania Integrowanej Ochrony Roślin.

W pracy doktorantka wyodrębniła 5 etapów, których celem było określenie, jakie gatunki rodzaju *Cladosporium* występują w Polsce i które z nich posiadają zdolność do zasiedlenia grzybów rdzawnikowych i grzybów powodujących mączniaki prawdziwe. Po określeniu gatunków, dalsza realizacja badań obejmowała przebadanie relacji między uzyskanymi izolatami *Cladosporium* a ich gospodarzami, określenie przystosowań *Cladosporium* spp. umożliwiających im zdolności do zasiedlania badanych grzybów

rozeznanie w literaturze światowej, dotyczącej metod badawczych, zarówno mikroskopowych jak i molekularnych.

Wykonane badanie przedstawiła w 12 podrozdziałach, umieszczając w nich 4 tabele, 13 rycin, 138 fotografii. Taki układ umożliwił doktorantce dokładne, ale jasne i przejrzyste przedstawienie ogromnej liczby uzyskanych wyników badań i obserwacji. Materiał roślinny obejmował 9 140 prób liści z 43 gatunków roślin, na których były widoczne objawy rdzy i mączniaków prawdziwych. W próbach tych zidentyfikowano 22 gatunki grzybów rdzawnikowych i 20 gatunków grzybów powodujących mączniaki prawdziwe. Z ecjów, spermogoniów, urediniów i teliów (rdzawnikowe) oraz chasmotecjów (Erysiphales) Doktorantka uzyskała 32 izolaty rodzaju *Cladosporium* i przedstawiła ich dokładną charakterystykę uwzględniając strzępki, trzonki konidialne, komórki konidiotwórcze, ramokonidia, zarodniki konidialne. Na podstawie cech morfologicznych zakwalifikowała je do 10 gatunków: *Cladosporium aecidiicola* (2 izolaty), *C. cladosporioides* (6), *C. herbarum* (8), *C. oxysporum* (3), *C. phyllactiniicola* (2), *C. pseudocladosporioides* (2), *C. sphaerospermum* (2), *C. spongiosum* (1), *C. tenuissimum* (3), *C. uredinicola* (4). Dodatkowo określiła cechy morfologiczne izolatów 4 gatunków referencyjnych pochodzących z Fungal Biodiversity Center w Utrechcie (*C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. oxysporum*, *C. macrosporum*). Identyfikacja morfologiczna uzupełniona została technikami molekularnymi przy użyciu ITS jako starterów a wyniki przedstawione w dendrogramie .

Na podkreślenie zasługuje wykazanie po raz pierwszy w Polsce występowanie trzech gatunków tego rodzaju: *C. pseudocladosporioides* , *C. phyllactiniicola* , *C. spongiosum*. Także po raz pierwszy w naszych warunkach wykazano nadpasożytnicze właściwości 8 gatunków: *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. oxysporum*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum*), *C. pseudocladosporioides*, *C. phyllactiniicola*, *C. spongiosum* .W stosunku do grzybów rdzawnikowych największą patogenicznością charakteryzowały się *C. aecidiicola*, *C. uredinicola* i *C. tenuissimum*.

Badania *in vitro* wykazały, że na wzrost badanych gatunków *Cladosporium* istotny wpływ miała temperatura i rodzaj pożywki. Optymalna była temperatura 15 °C ; przy wyższych temperaturach wzrost grzybnii był wolniejszy, przy czym w 25 °C był najwolniejszy. Jest to ważna wskazówka przy ewentualnych próbach wykorzystania nadpasożytniczych uzdolnień w praktyce rolniczej/ogrodniczej. Z badanych pożywek istotnie najszybszy wzrost uzyskano przy hodowli na pożywce PDA, następnie kolejno pożywka MA, CMA , pożywka Czapka.

Kolejny etap badań obejmował określenie dynamiki wzrostu 11 gatunków *Cladosporium* na pożywce PDA w temperaturze 15 °C. Istotnie najszybszym wzrostem charakteryzowały się

umiejętność krytycznego podejścia zarówno do uzyskanych rezultatów własnych jak i perspektyw szerszego wykorzystania wykonanych badań.

Praca napisana jest przejrzysto, ładnym językiem, jasno przedstawione wyniki, uzupełnione oryginalnymi fotografiami. Ten niezwykle bogaty materiał dowodowy w postaci wręcz znakomitych fotografii, wymagających niezwykle starannego przygotowania preparatów mikroskopowych, jeszcze bardziej podkreśla wartość całej rozprawy.

Z obowiązku recenzenta podaję drobne uwagi zauważone w pracy:
na s. 130 podano, '...zwiększenie temperatury do 25°C spowodowało wzrost produkcji wszystkich badanych enzymów. Szczególnie wyraźnie zostało to zaobserwowane w przypadku grzyba *C. uredinicola*...', a dalej także "Pozostałe szczepy syntetyzowały enzymy na poziomie niższym w porównaniu do *C. uredinicola*." W następnym zdaniu autorka podaje jednak - „*Pomimo stwierdzonych różnic w liczbach bezwzględnych, analiza statystyczna wyników wykazała, że temperatura i warunki świetlne nie wpływają istotnie na wytwarzanie enzymów przez nadpasożyty.*” ?? Jeśli analiza statystyczna nie wykazuje różnic, to raczej nie można mówić o zróżnicowaniu, a tym bardziej o „szczególnie wyraźnym zróżnicowaniu.

W dyskusji s. 146 wiersz 6 autorka podaje „*Rdze oraz grzyby powodujące mączniaki prawdziwe należą do jednych z najgroźniejszych patogenów roślin....*,” Rdze to objawy chorób a patogenami są poszczególne gatunki grzybów rdzawnikowych, więc proponuję „*Grzyby powodujące rdze i mączniaki prawdziwe należą do jednych z najgroźniejszych patogenów roślin*”

Wiersz 14 ” *Zasiedlenie przez grzyby z rodzaju Cladosporium powierzchni rdzy oraz odżywianie się ich kosztem prowadzi do obumarcia struktur tych patogenów roślin...*
Zasiedlenie dotyczy raczej powierzchni grzyba a nie powierzchni choroby.

W podsumowaniu należy wyraźnie stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr T. Dolińskiej jest ważnym ogniwem w badaniach nad możliwością wykorzystania zjawiska nadpasożytnictwa w biologicznej ochronie roślin przed chorobami i stanowi próbę dalszego pogłębienia dostępnej wiedzy w tym zakresie.

Rzadko się zdarza, aby w opracowaniu tak wielokierunkowych badań nie było usterek czy drobnych nieścisłości lub niejasności. W tym przypadku, przedstawiła do recenzji pracę spójną, dobrze opracowaną, dokładnie, ale jasno przedstawioną w tabelach.

Wskazanie kilku, dyskusyjnych zresztą uwag, mogących łatwo być uwzględnionych przy redakcji prac do opublikowania, nie kwestionuje niewątpliwych wartości, jakie wnosi rozprawa do nauki. Zastosowane mikroskopowe metody badań i techniki molekularne