

Bydgoszcz, 06.09.2017 r.

Dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. UTP
Zakład Fitopatologii Molekularnej
Katedra Entomologii i Fitopatologii Molekularnej
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego pt.:
„Środki ochrony roślin i bakterie antagonistyczne w relacji z różnymi grupami
genetycznymi i fenotypowymi *Pectobacterium* spp.” wykonanej w Katedrze
Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej Wydziału Kształtowania
Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tomasza P. Kurowskiego**

Bakterie fitopatogeniczne stanowią poważny problem w wielu uprawach roślin, w tym w uprawie ziemniaka oraz jego przechowywaniu. Szczególnie dużą szkodliwość przypisuje się bakteriom powodującym mokłą zgniliznę bulw ziemniaka i czarną nóżkę ziemniaka, które obecnie klasyfikowane są do rodzaju *Pectobacterium*, a zostały wydzielone z rodzaju *Erwinia*. W obrębie tego rodzaju występuje wyraźny polimorfizm, a identyfikacja gatunkowa, zwłaszcza metodami tradycyjnymi, nie jest jednoznaczna. Patogeny te są nekrotrofami i posiadają szereg mechanizmów przystosowawczych do kolonizacji i infekcji roślin. Zapobieganie chorobom powodowanym przez te bakterie sprawia duże trudności. Wynika to między innymi z niskiej skuteczności dostępnych na rynku substancji zwalczających, czy też ograniczających rozwój bakterii fitopatogenicznych. Mała liczba substancji aktywnych przeciw powyższym patogenom oraz związane z tym uodparnianie się bakterii na środki ochrony roślin, wymusza opracowanie skutecznych metod ochrony przed tą grupą patogenów. Wobec tego Doktorant dokonał słusznego wyboru podejmując się badań dotyczących środków ochrony roślin i bakterii antagonistycznych w relacji z różnymi grupami genetycznymi i fenotypowymi bakterii rodzaju *Pectobacterium*.

Przedstawiona do oceny rozprawa Pana mgr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego liczy łącznie 132 numerowanych stron, w tym obejmuje 15 tabel, 16 wykresów i 7 fotografii. Struktura rozprawy została opracowana w układzie klasycznym dla prac doktorskich, według ogólnie przyjętego schematu, typowego dla wieloaspektowej pracy empirycznej. Całość materiału opisowego podzielono na 8 numerowanych głównych rozdziałów merytorycznych: 1. Wstęp, 2. Cel pracy i hipotezy badawcze, 3. Przegląd literatury, 4. Materiał i metody, 5. Wyniki badań, 6. Dyskusja, 7. Wnioski, 8. Bibliografia oraz dodatkowo wyodrębniono 3 rozdziały nienumerowane: Załączniki, Streszczenie i Summary. Ponadto w ramach rozdziałów 3., 4. i 5. wyodrębniono szereg podrozdziałów oraz mniejszych jednostek redakcyjnych. Taki układ sprawia, iż praca jest czytelna.

Treść pracy odpowiada tematowi określone w prawidłowo zredagowanym tytule. We „Wstępie”, Doktorant w sposób jasny i zrozumiały wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań. W trafny sposób uzasadnia sensowność podjęcia badań. Cel pracy dobrze sformułowany i w toku badań został osiągnięty. Na podstawie dotychczasowego stanu wiedzy Doktorant sformułował cztery hipotezy badawcze.

W „Przeglądzie literatury” Autor słusznie wyodrębnił 4 podrozdziały, wykorzystując liczne pozycje literatury, starannie dobrane do studiowanego zagadnienia i właściwego tematu badawczego. Doktorant przedstawił charakterystykę bakteryjnych chorób ziemniaka oraz ich znaczenie. W dalszej kolejności scharakteryzował bakterie rodzaju *Pectobacterium*. Następnie omówił możliwości zwalczania i zapobiegania występowaniu chorób ziemniaka powodowanych przez bakterie pektynolityczne. Szczególną uwagę zwrócił na metody chemiczne, fizyczne a także ochronę biologiczną. Omawiając środki ochrony roślin Autor przede wszystkim skupił się na grupach środków uwzględnionych w badaniach własnych. Ponadto przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczący wpływu chemicznej ochrony roślin na bakterie. Rozdział ten, opracowany starannie, wnikliwie, oparty został na najnowszych doniesieniach literatury obiegu krajowego i międzynarodowego.

Zweryfikowanie postawionych hipotez badawczych oraz osiągnięcie założonego celu wymagało zgromadzenia i przygotowania odpowiedniego materiału badawczego oraz wielu szczegółowych i wysoce specjalistycznych badań, których wykonanie Doktorant podał w rozdziale „Materiał i metody”. Oceniana rozprawa doktorska obejmuje badania laboratoryjne i szklarniowe. Z uwagi na szeroko zakrojone badania i związaną z tym konieczność zastosowania wielorakich metod, Autor wyodrębnił w tym rozdziale 2 podrozdziały i 14 mniejszych jednostek redakcyjnych. Dzięki takiemu podejściu materiał badawczy oraz sposób wykonania badań został przedstawiony przejrzysto.

Materiał badawczy stanowiła kolekcja 11 szczepów *Pectobacterium* spp., które pozyskano głównie z ziemniaka, a ich krótką charakterystykę przedstawiono w tabeli. Do

badan włączono także 4 szczepy bakterii antagonistycznych, wyselekcjonowanych spośród 87 szczepów bakterii wyizolowanych z różnych środowisk. Warto by było również dokonać krótkiej ich charakterystyki, uwzględniającej gatunek lub rodzaj poszczególnych szczepów antagonistycznych. Ponadto wymieniono i dokonano charakterystyki środków ochrony roślin użytych do badań. W podrozdziale „Materiał” podano także sposób określania cech fizjologicznych bakterii (4.1.2.) oraz określania zróżnicowania genetycznego i filogenetycznego pomiędzy szczepami (4.1.3.). Moim zdaniem informacje te można było zamieścić w podrozdziale „Metody”.

W pracy użyto prawidłowych metod badawczych, właściwie dobranych i zastosowanych, nie budzących zastrzeżeń merytorycznych. Autor opisał sposoby przeprowadzania eksperymentów, uwzględniając wszystkie niezbędne metodyki przez ich opisanie bądź podanie źródła literaturowego. W swych badaniach Doktorant stosował metody klasyczne, jak również nowoczesne, w tym związane z analizą sekwencji regionów ITS rybosomalnego DNA. Bardzo wartościowe jest również zastosowanie techniki Real-Time PCR, pozwalającej na określenie ilości patogenu w badanym środowisku. Moim zdaniem w przypadku tej techniki, jako stosunkowo nowej, można było nieco szerzej opisać sposób jej stosowania. Podjęcie takich badań świadczy o rzetelnym rozpoznaniu i dobrym opanowaniu przez Doktoranta nowoczesnych technik badawczych. Wskazuje wyraźnie, że posiada szerokie rozeznanie w literaturze światowej, dotyczącej metod badawczych. Dla odpowiedniej interpretacji uzyskanych wyników i wniosku konieczne było przeprowadzenie szeregu analiz statystycznych, co wymagało od Autora wiedzy i umiejętności praktycznych.

Prawidłowe zaplanowanie i staranne wykonanie badań, niejednokrotnie bardzo pracochłonnych, umożliwiło uzyskanie wielu interesujących, a zarazem cennych, wyników mogących znaleźć zastosowanie w praktyce. Wyniki przeprowadzonych obserwacji Doktorant przedstawił w 6 podrozdziałach. Zamieścił je w 14 tabelach i na 16 wykresach oraz zilustrował na 7 fotografiach, doskonale oddających charakterystykę badanych szczepów, stanowiących bardzo cenne uzupełnienie i udokumentowanie wykonanych obserwacji. Taki układ umożliwił Autorowi dokładne i zrozumiałe przedstawienie dużej ilości danych uzyskanych z przeprowadzonych eksperymentów.

Doktorant stwierdził zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe występujące pomiędzy gatunkami *Pectobacterium*, a także w obrębie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Wykonanie analizy taksonomicznej, między innymi w oparciu o porównanie wybranego regionu ITS rybosomalnego DNA (16S rDNA), pozwoliło na ustalenie pokrewieństwa badanych szczepów a także na potwierdzenia ich przynależności gatunkowej.

Pośród wszystkich badanych substancji najskuteczniejszym działaniem antybakteryjnym cechowały się fungicydy, zwłaszcza mieszanina mankozebu z metalaksylem-M. Użyte

w badaniach szczepy bakterii o wysokiej agresywności odznaczały się też największą tolerancją na testowane środki chemiczne. Wykazano również dużą rozbieżność w oporności szczepów na antybiotyki. Nowum było zastosowanie do walki z *Pectobacterium* spp. nanocząstek. Większość badanych bakterii była inhibowana po ich zastosowaniu.

Doktorant określił również wpływ herbicydów, a także insektycydów, które do tej pory nie były badane, na bakterie rodzaju *Pectobacterium*. Udowodnił również, że niektóre związki stosowane w ochronie i przechowalnictwie ziemniaka sprzyjają rozwojowi wybranym szczepom *Pectobacterium*. W teście szklarniowym badane preparaty ograniczały rozwój choroby w wariantach z inokulacją agresywnymi szczepami bakterii. Żaden ze szczepów antagonistycznych bakterii nie ograniczał agresywności badanych gatunków *Pectobacterium*, a zróżnicowanie obserwowano jedynie na pożywce stałej.

Doktorant skupił się również na działaniu preparatów dostających się do środowiska i przetestował ich wpływ na bakterie pektynolityczne w środowisku glebowym i na sadzeniaki ziemniaka. Co bardzo cenne w badaniach tych wykorzystał technikę Real-Time PCR, która pozwoliła nie tylko na potwierdzenie obecności bakterii w badanym środowisku, ale także na określenie ilości fragmentów kwasu nukleinowego badanych bakterii.

Na szczególne podkreślenie zasługuje szerokie i wnikliwie opracowanie rozdziału „Dyskusja”, liczącego 22 strony, w którym Autor wyniki własne umiejętnie konfrontuje z rezultatami badań innych autorów, zawartych w przytoczonych pozycjach piśmiennictwa. Jako, że rozdział ten jest bardzo obszerny, można go było podzielić na podrozdziały. Jednak mimo braku formalnego wyeksponowania poszczególnych wątków dyskusja jest czytelna i prowadzona w sposób konsekwentny. Z rozdziału tego wynika, iż Doktorant posiada szerokie rozeznanie w literaturze naukowej a jednocześnie umiejętność krytycznego podejścia, zarówno do uzyskanych rezultatów własnych, jak i perspektyw szerszego wykorzystania wykonanych badań.

Osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych oryginalnych badań podsumowane zostały szesnastoma prawidłowo sformułowanymi wnioskami. Zaprezentowane wnioski wypływają bezpośrednio z dyskusji i są trafnie osadzone w wynikach badań.

Cytowana przez Doktoranta literatura stanowi 127 najnowszych pozycji, w tym 102 anglojęzycznych, związanych tematycznie z rozprawą. Dobór literatury jest właściwy, zawierający dobrze wyselekcjonowane pozycje, odzwierciedlające aktualny stan wiedzy dotyczący problematyki podjętej w pracy.

Oceniając ogólnie stwierdzam, iż praca jest spójna, dobrze zredagowana, napisana przejrzysto, niebudząca zastrzeżeń pod względem stylistycznym i językowym. Doktorant nie ustrzegł się jednak drobnych błędów, które zauważono w pracy:

- Na stronie 6. wiersz 4. nastąpiła pomyłka. Podane jest „Największe plony” a powinno być „Największe zbiory”,
- Zdarzają się różne zapisy autorów np.: w niektórych miejscach jest „Rangannan” a powinno być „Ranganna”, ponadto jest „Galloiset” a powinno być „Gallois”,
- Na stronie 36. podane jest „Pomiar liczby bakterii wykonano za pomocą metody Real-Time”. Za pomocą techniki Real-Time można określić np. ilość określonego fragmentu kwasu nukleinowego. Ewentualnie można zastosować zwrot „Pomiar ilości bakterii”. Zwrot „liczba bakterii” zastosowano również w dalszej części pracy,
- Na stronie 40. w tytule podrozdziału 5.2.1. podane jest „Analiza filogenetyczna na podstawie fragmentu 16S rDNA” natomiast w tekście jest już „16S rRNA”. Wymaga to wyjaśnienia lub poprawy,
- Na stronie 48. ostatni wyraz, oraz na str. 70. – podane jest „wagi” a powinno być „masy”,
- Na stronie 84. podane jest „Progress in plant protection” a powinno być „Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin”,
- Przy podawaniu łacińskich nazw rodzajów/gatunków stosujemy kursywę, a przy ponownym podawaniu nazwy gatunkowej stosujemy ich skrócone nazwy. Zasady pisowni Doktorantowi dobrze znane, choć nie zawsze stosowane,
- Nie należy stosować zamiennie wyrazów „inokulacja” i „infekcja” w odniesieniu do przeprowadzanej sztucznej inokulacji. Infekcja jest to proces naturalny, a w prowadzonych badaniach jedynie nanoszono patogena na roślinę, czyli dokonywano inokulacji.

Sugestie dotyczące pracy:

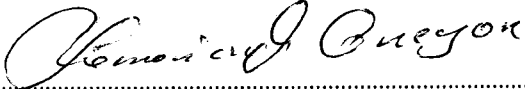
- Zamiast stosować zwrot „odmiany o podwyższonej odporności” lepiej użyć zwrotu np. „odmiany o obniżonej podatności”,
- W „Wynikach badań”, jak również w „Dyskusji” nie ma potrzeby ciągłego podawania nazw środków ochrony roślin i substancji aktywnych. Charakterystyka badanych preparatów została przedstawiona w podrozdziale „Materiał” i dlatego wystarczy podać nazwę preparatu lub substancji aktywnej,
- Tabela 2. Wskazane jest podanie pełnych nazw kodów badanych szczepów bakterii,
- Tabela 12. Wskazana jest korekta. W objaśnieniach pod tabelą wyjaśniono znaczenie „-”, jednak takie oznaczenie nie jest widoczne w tabeli,
- Tabela 13. Objaśnienia pod tabelą warto skorygować,
- Wykres 9. Wskazane podanie jednostek, ewentualnie dodatkowych objaśnień.

Powyżej wymienione drobne błędy, często edytorskie, nie umniejszają wartości ocenianej pracy. Wskazanie kilku, niekiedy dyskusyjnych uwag, mogących być

uwzględnionych przy redagowaniu pracy do opublikowania, nie kwestionuje niewątpliwych wartości jakie wnosi rozprawa do nauki. Pod względem formalnym, merytorycznym i metodycznym przedstawiona do oceny rozprawa doktorska nie budzi żadnych wątpliwości. W podsumowaniu należy wyraźnie stwierdzić, że rozprawa doktorska ma charakter pełnego opracowania, zwiera wiele cennych i nowych dla nauki wyników, mających dużą wartość poznawczą jak i aplikacyjną.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Przemienieckiego spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595) oraz Rozporządzenia Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2004 r., nr 15, poz. 128 z późn. zmianami). Wobec czego, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pana mgr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam, iż treść pracy kwalifikuje Kandydata do ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych w zakresie dyscypliny naukowej agronomia.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę tematykę badawczą, jej znaczenie naukowe i aplikacyjne, niezwykle szeroki jej zakres, zastosowane techniki badawcze, wnikliwe opracowanie wyników oraz ich interpretację, wnioskuję do Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa UWM w Olsztynie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego.


.....
dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. UTP