

Poznań, 22 wrzesień 2017 r.

Prof. dr hab. Henryk Pospieszny

Zakład Wirusologii i Bakteriologii

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Poznań, ul. W. Węgorza 20

## O C E N A

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego pt.  
„Środki ochrony roślin i bakterie antagonistyczne w relacji z różnymi grupami genetycznymi i fenotypowymi *Pectobacterium* ssp.”

Dostępność środków ochrony roślin przeciwko poszczególnym grupom patogenów roślin jest tym mniejsza im patogen jest na niższym poziomie systematyki i ściślej powiązany z gospodarzem. Dobrym przykładem są grzyby, bakterie i wirusy, gdzie przeciwko grzybom fitopatogenicznym dysponujemy różnym i licznymi środkami ochrony roślin skutecznie ograniczającymi ich szkodliwość, z kolei w przypadku wirusów brak możliwości bezpośredniego ich zwalczania. Jeżeli chodzi o bakterie roślinne to badania *in vitro* dają często nadzieję na powodzenie jednak te same substancje lub środki ochrony roślin wprowadzone w złożone warunki polowe często wykazują niezadawalającą skuteczność. Znakomitym przykładem są bakterie z rodzaju *Pectobacterium* ssp. związane warunkami glebowymi, mogącymi modyfikować aktywność substancji oraz innych czynników w efekcie końcowym często obniżając ich efektywność przeciwbakteryjną. Generalnie, tej problematyce jest poświęcona rozprawa doktorska, przy czym stosunkowo duży nacisk położono na wpływ zróżnicowania fenotypowego i genetycznego bakterii z rodzaju *Pectobacterium* na efektywność ich zwalczania lub ograniczania. Badania tego typu były wcześniej prowadzone, często wyrywkowo i w odmiennych okolicznościach. Autor do problemu podszedł bardziej kompleksowo i na własnym materiale badawczym, między innymi poszerzył badania nad wpływem niektórych insektycydów i herbicydów na rozwój

bakterii. Podjęcie tych badań uważam za uzasadnione ze względu na ich aktualność. Ziemniak wciąż jest rośliną gospodarczo ważną .

## **OPIS FORMALNY ROZPRAWY**

Praca zawiera wszystkie formalnie wymagane dla rozprawy doktorskiej części tj. wstęp, cel i hipotezy, przegląd literatury, metodykę, wyniki, dyskusję, podsumowanie wyników i wnioski oraz streszczenia w językach polskim i angielskim. Jej objętość liczy 132 strony, w tym 15 tabel, 7 zdjęć i 16 wykresów. Doktorant powołuje się na ponad 110 pozycji literatury, zestawionych w rozdziale 8. Bibliografia. Wstęp wprowadzający Czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy, został nie potrzebnie zdominowany przez informacje o ważności uprawy ziemniaka. W części „Cel pracy i hipotezy badawcze” Doktorant mógł być bardziej precyzyjny w ich formułowaniu np. sens hipotez 1 i 3 , moim zdaniem są podobne. Praca dotyczy problemów związanych ze zwalczaniem bakterii z rodzaju *Pectobacterium* ssp. dlatego w przeglądzie literatury poświęciłbym opisowi chorób tylko tyle ile jest niezbędne dla przedstawienia badanej problematyki. W tymże przeglądzie literatury można było wspomnieć także o induktorach odporności i ich łącznym stosowaniu z fungicydami. W podrozdziale” 4.1. Materiały” opisałbym jedynie bakterie jakie zostały zastosowane i skąd pochodziły, a metody stosowane do ich identyfikacji oraz określania ich cech fizjologicznych i zróżnicowania genetycznego, i filogenetycznego powinny być raczej w podrozdziale „4.2. Metody”. Czy bakterie antagonistyczne były w jakimś stopniu zidentyfikowane (4.1.5.)?. Trochę więcej szczegółowych informacji o pochodzeniu tzw. bakterii antagonistycznych znajduję się w podrozdziale 5.6 (str. 53), które w części raczej powinny być w podrozdziale 4.1.5 (materiały). Brakuje także informacji o odmianie ziemniaka zastosowanego w testach na plastrach bulw. Czy wybór odmiany Satina był przypadkowy czy zmierzony ze względu na jej jakieś szczególne cechy. W rozprawie zastosowano bardzo liczne i różnorodne metody badawcze, od molekularnych do laboratoryjnych, i szklarniowych; budzi to pozytywne wrażenie. Należy podkreślić, że wyniki zostały obudowane niezbędną analizą statystyczną.

## **OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY**

Nadrzędnym celem recenzowanej rozprawy jest wpływ różnych środków ochrony roślin, substancji chemicznych oraz bakterii antagonistycznych a także innych czynników na zróżnicowaną genetycznie populację bakterii z rodzaju *Pectobacterium*

ssp., w aspekcie ich zwalczania lub ograniczania jako patogenów ziemniaka. Autor pozyskał szereg izolatów bakterii pektynolitycznych z rodzaju *Pectobacterium* ssp. z różnych polskich ośrodków badawczych i z pomocą technik molekularnych określił przede wszystkim ich zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe a także niektóre z cech fizjologicznych. Przeprowadzone badania potwierdziły zróżnicowanie nie tylko pomiędzy gatunkami ale i wewnątrz nich, szczególnie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Był to podstawowy wymóg realizacji założonych celów. Tak scharakteryzowane izolaty *Pectobacterium* ssp. zostały poddane testowaniu następującym czynnikom: 8 fungicydów, 1 insektycyd, 3 herbicydy, streptomycyna, siarczan miedzi, azotan srebra, 3 zawiesiny nanocząsteczek srebra oraz tytan w postaci cząsteczek i nanocząsteczek. W sumie, przeprowadzono wielopoziomowe badania w postaci bardzo licznych kombinacji. Zaświadcza to o znajomości przez Doktoranta licznych i różnych metodyk oraz o chęci wniesienia przez nie wielu danych dla przedmiotu pracy. Tą część rozprawy oceniam wysoko. Jednak niekiedy wielość kombinacji i wątków utrudnia w sposób uporządkowany interpretację wyników i redagowanie pracy. Przykładowo, istotną częścią rozprawy są badania nad genetycznym i fenotypowym zróżnicowaniem gatunków i izolatów *Pectobacterium* ssp., tym bardziej, że Autor wykazał i potwierdził związek pomiędzy ich zróżnicowaniem i wrażliwością na środki przeciwbakteryjne, i co ważne jest to zgodne z postawioną hipotezą nr 1. W „Dyskusji” temu problemowi Doktorant poświęcił 8 stron, ale w streszczeniu zagadnienie to ledwie co musnął. Dyskusja zaświadcza o dojrzałości młodego badacza. W ocenianej rozprawie liczy aż 22 strony i jeżeli nie brać pod uwagę załączników to stanowi ona ¼ rozprawy. Generalnie, jest to dobra część rozprawy, ale mam do niej jedną uwagę: dyskusja jest nadmiernie wysycona informacjami dotyczącymi problemów związanych z innymi bakteriami, co ją uczyniło miejscami nieklarowną. Jeżeli niektóre moje uwagi są dyskusyjne to biorą się one między innymi właśnie stąd. Dużo nie zawsze znaczy dobrze. Obszerna wiedza i znajomość literatury są dużym plusem dla Pana Przemienieckiego ale część jej powinna być umieszczona w przeglądzie literatury, gdzie np. wpływowi chemicznej ochrony roślin na bakterie przeznaczono niepełną stronę.

Hipoteza nr 2, zakłada, że „Niektóre substancje chemiczne stosowane w ochronie plantacji i przechowalnictwie ziemniaka sprzyjają rozwojowi *Pectobacterium* spp. ”. Doktorant nie ułatwił Recenzentowi oceny bo nie odpowiedział jednoznacznie na tak

postawioną tezę. Wpływ środków ochrony roślin lub innych substancji chemicznych na wzrost bakterii i rozwój choroby zależy od substancji czynnej i jej koncentracji, wrażliwości bakterii oraz sposobu stosowania. Z reguły efekty osiągnięte w warunkach kontrolowanych są nie do powtórzenia w złożonych warunkach polowych. Niektóre substancje są włączane w różne ścieżki degradacji i w efekcie końcowym nie tylko nie hamują wzrost bakterii, a wręcz przeciwnie- stymulują. Autor w swoich badaniach przeprowadzonych w warunkach glebowych wykazał, że insektycyd Karate Zeon 050 i herbicyd Titus 25 WG stymulowały wzrost bakterii *Pectobacterium* ssp. (str. 73), potwierdzając, że w naturze można się spodziewać takich zjawisk. Ocena środków pod tym kontem powinna być przeprowadzana nie w testach laboratoryjnych tylko w warunkach glebowych, naturalnym środowisku bakterii pektynolitycznych porażających ziemniak. Praca wnosi nowe elementy do badanego problemu pozyskane z szeregu eksperymentów często bardzo szczegółowych, mogących ułatwić ale także utrudnić interpretację wyników. W tym drugim przypadku, dobrym przykładem jest właśnie herbicyd Titus 25 WG, który w teście płytkowym (krążkowym) nie wykazywał właściwości przeciwbakteryjnych, z kolei na plastrach bulw ziemniaka w stopniu istotnym hamował macerację bulw przez bakterie, a w glebie wręcz stymulował wzrost bakterii. Więcej, 10 krotny wzrost substancji czynnej herbicydu Titus 25 WG jeszcze silniej symulował wzrost liczby bakterii w glebie. Tak więc w każdym teście herbicyd zachował się inaczej. Czy można to jakoś zinterpretować?

Jak wspomniałem wcześniej nie widzę różnicy pomiędzy hipotezą 1 i 3; zamieniono tylko kolejność w tezach. Dla mnie, w tej rozprawie określenia „....różnicowanie bakterii w obrębie rodzaju i gatunku” (teza 1) i „Różne gatunki i szczepy *Pectobacterium* ssp....” (teza 3.) znaczą to samo. Proszę o komentarz, może ja czegoś nie zrozumiałem.

Hipoteza 4, zakłada że, „, Stosowanie bakterie antagonistycznych wykazuje zbliżoną skuteczność w porównaniu ze środkami ochrony roślin”, w mojej ocenie, jednoznacznie nie potwierdziła się w przeprowadzonych badaniach. Z 87 szczepów bakteryjnych pochodzących z środowiska naturalnego i zurbanizowanego tylko 4 hamowały wzrost bakterii z rodzaju *Pectobacterium* ssp *in vitro.*, a na plastrach bulw ziemniaka jedynie jeden szczep nr 55 ograniczał rozwój patogenu ale znacznie słabiej niż fungicydy. Nie przeprowadzono eksperymentów w warunkach glebowych. Jest wątpliwe, czy użyte bakterie w ogóle można określić jako antagonistyczne, jeżeli tak

to wobec jakich patogenów czy mikroorganizmów. Pan Przemieniecki otrzymał bakterie z kolekcji i jest brak danych czy otrzymał także informacje dające Mu podstawy do ich wykorzystania w tego typu doświadczeniach.

Trudno było oczekiwać, że ten trudny problem *Pectobacterium* ssp. w uprawie ziemniaka uda Doktorantowi się rozwiązać. Raczej otrzymaliśmy dalsze, także nowe informacje uzyskane w innych i różnych okolicznościach, ale zagrożenie dla ziemniaka ze strony *Pectobacterium* ssp. wciąż pozostaje aktualne.

Ważnym zamknięciem rozprawy są „Wnioski” , które ze względu na ich redakcję uważam za mało udane.

Przy pisaniu pracy Autor nie ustrzegł się pewnych nieścisłości i usterek oraz dyskusyjnych zwrotów, z których na kilka chciałbym zwrócić uwagę:

- Str. 36, 11 wiersz od góry: jest – glebę homogenizowano na mieszadle; powinno być glebę wytrząsano
- Str. 36; 6 wiersz od dołu: jest – pomiar liczby bakterii; powinno być ...pomiar ilości DNA
- Str. 49, wiersz 5 od dołu: „...nie obserwowano istotnego zmniejszenia ilości DNA po zastosowaniu żadnego z testowanych środków” – niezrozumiałe
- Str. 51, 7 wiersz od dołu: jest- poziom zazielenia, powinno być – raczej się mierzy zawartość chlorofilu
- Stosunkowo liczne literówki, których nie wymieniam. Wygląda to jak niedoróbki z pośpiechu.
- Materiał pomocniczy czyli tabele, wykresy i zdjęcia powinny być tak opisane aby maksymalnie były niezależne od tekstu. Powinny żyć własnym życiem. Kilka przykładów:  
Tabela 3. Jest- „Ocena wzrostu kolonii bakterii w zależności od temperatury, Lepiej „Wpływ temperatury na wzrost bakterii na pożywce TSA”; załączona skala wzrostu kolonii bakterii jest nie pełna – co znaczy wzrost „5” –bardzo dobry; podobnie tabele 4 i 5.
- Tabela 15 - co Autor miał na myśli określając stan zdrowotny roślin ziemniaka jako dobry lub zły; aby zrozumieć trzeba wracać do tekstu.
- Pod Fot 1. – błędny podpis

- Fot. 2. „Zdjęcie elektroforezy....” Słowa Fot. i zdjęcie dublują się – lepiej: Polimorfizm szczepów *Pectobacterium* ssp. uzyskany techniką ERIC-PCR; podobnie Fot. 3.;

## PODSUMOWANIE

Podsumowując uważam, że recenzowana praca wnosi nowe dane do poznania uwarunkowań szeroko pojętego ograniczania występowania chorób powodowanych przez bakterie z rodzaju *Pectobacterium* ssp. Na podkreślenie zasługuje znajomość przez Doktoranta licznych, w tym nowoczesnych metod badawczych oraz ogromny wkład pracy włożony do przeprowadzenia badań. Wartości te przeważają nad uwagami i niedociągnięciami wskazanymi przeze mnie, niekiedy dyskusyjnymi.

Uważam, że przedstawiona rozprawa odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim określonym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'D. G. Przemieniecki', written in a cursive style.