

Dr hab. inż. Dariusz Pańka
Pracownia Fitopatologii i Mykologii Molekularnej
Katedra Biologii i Ochrony Roślin
Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy
Ul. Ks. A. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz

Bydgoszcz, 17 września 2018 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas

**pt. „Charakterystyka wybranych populacji *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)
de Bary i ocena odporności różnych typów odmian
rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na tego patogena”**

wykonanej w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych Instytutu Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

Promotor pracy: prof. dr hab. Zbigniew Weber

Promotor pomocniczy: dr Marcin Matuszczak

Problematyka badawcza podjęta przez Autorkę w przedstawionej do recenzji pracy jest bardzo aktualna w dobie rosnącego zapotrzebowania na nasiona rzepaku, wykorzystywane szeroko w przemyśle spożywczym, paszowym czy energetycznym. Stabilność plonowania rzepaku jest uzależniona od wielu czynników, które w niesprzyjających warunkach mogą doprowadzić nawet do całkowitej redukcji plonu. Podczas uprawy producent ma możliwość ograniczenia strat w plonie poprzez dobór odpowiednich środków produkcji, prawidłową agrotechnikę, pielęgnację, itp. Pozwalają one w pełni wykorzystać potencjał odmiany uprawnej. Potencjał ten, uwarunkowany genetycznie, jest jednak jednym z kluczowych elementów wpływających na efektywność produkcji rzepaku. Dzięki pracom hodowlanym producenci mają możliwość wyboru odmian najlepiej dopasowanych do uprawy

w danym regionie, charakteryzujących się plonem o wysokich parametrach ilościowych i jakościowych, pożądanym w określonych kierunkach użytkowania, o wysokiej zimotrwałości, odporności na choroby, itd. Genetyczne uwarunkowanie wysokiej lub całkowitej odporności rośliny na porażenie przez najgroźniejsze patogeny jest jedną z najskuteczniejszych metod ograniczania strat w plonie spowodowanych występowaniem chorób. Zapewnia znaczne zmniejszenie nakładów na ochronę, czego wymiernym efektem jest ograniczenie ilości stosowanych fungicydów, a tym samym negatywnego wpływu na środowisko i konsumentów.

W tym kontekście, podjęcie przez Doktorantkę badań nad jednym z najgroźniejszych patogenów rzepaku jakim jest *S. sclerotiorum*, sprawca zgnilizny twardzikowej oraz poszukiwanie genotypów rośliny wysoce tolerancyjnych lub odpornych na tego patogena należy uznać za bardzo trafne i uzasadnione. Uzyskane wyniki charakteryzują się nie tylko wysoką wartością naukową, ale także praktyczną. Wzbogacają aktualną wiedzę na temat zróżnicowania populacji patogena w Polsce oraz odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego na porażenie przez *S. sclerotiorum*.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 107 stron tekstu przeplatane go tabelami, rycinami oraz fotografiami. Podzielona jest na 9 rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Dane meteorologiczne, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Literatura. Przeważająca większość rozdziałów posiada rozbudowaną strukturę podrozdziałów, nawet do pięciu poziomów, co doskonale porządkuje informacje zawarte w rozdziałach, ale jednocześnie nieco utrudnia czytelnikowi śledzenie wątków badawczych w kolejnych rozdziałach. Autorka zamieściła w pracy 3 barwne fotografie, 32 tabele i 32 ryciny, z których część, istotna dla bieżącej analizy treści, została zamieszczona w tekście, a pozostała część, stanowiąca raczej uzupełniający materiał faktograficzny, została ujęta na końcu pracy w postaci trzech załączników.

W pracy brak typowego wstępu wprowadzającego czytelnika we wszystkie zagadnienia niezbędne dla zrozumienia istoty i zakresu pracy, zakończonego sformułowaniem celów badawczych. „Wstęp” jest właściwie rozdziałem poświęconym przeglądowi piśmiennictwa z zakresu poruszanego w pracy. Jest syntetycznym kompendium wiedzy dotyczącym zagadnień badawczych w niej zawartych. Na 12 stronach Autorka przedstawia informacje nt. rzepaku ozimego, jego pochodzenia i systematyki, historii uprawy, kierunków hodowli oraz odporności na *S. sclerotiorum*.

W rozdziale tym znalazły się także informacje dotyczące zgnilizny twardzikowej, jej występowania i szkodliwości, objawów chorobowych, rozwoju patogena oraz ochrony roślin przed chorobą. W kolejnym podrozdziale Autorka charakteryzuje rolę kwasu szczawiowego jako kluczowej substancji w rozwoju procesu chorobowego. Informacji dopełnia krótki podrozdział dotyczący oceny polimorfizmu DNA sprawcy choroby z wykorzystaniem technik RAPD i SSR. Należy podkreślić umiejętne i trafne doboru pozycji bibliograficznych do konstrukcji tego rozdziału. Przeważająca większość to pozycje z ostatnich lat, co potwierdza wysoki poziom merytoryczny rozdziału poświęconego przeglądowi piśmiennictwa.

W kolejnym rozdziale: „Cel pracy” Autorka precyzyjnie prezentuje cele przeprowadzonych badań, którymi były:

- charakterystyka populacji *S. sclerotiorum* występujących na terenie Polski na przykładzie trzech miejscowości o zróżnicowanych warunkach agroklimatycznych, to jest w Borowie, w województwie wielkopolskim, Małyszynie w województwie lubuskim i Bąkowie w województwie opolskim,

- ocena odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego na *S. sclerotiorum*.

Rozdział zajmuje pół strony i zawiera w pierwszym akapicie informacje o charakterze ogólnym, np. powierzchni uprawy rzepaku w Polsce, znaczeniu zgnilizny twardzikowej oraz wynikającej z tego konieczności podjęcia założonych badań. Po pewnym rozwinięciu stanowiłby idealne wprowadzenie do tematyki badawczej pracy stając się wstępem w ujęciu tradycyjnym. Ostatni akapit w rozdziale jest uszczegółowieniem o charakterze metodycznym. Informacje w nim zawarte są następnie powtórzone w części poświęconej opisowi materiałów i metod badawczych. Zamiast wyszczególniania tak krótkiego rozdziału i podawania w nim informacji o różnym charakterze bardziej celowe byłoby zamieszczenie opisu celu w ramach rozdziału wprowadzającego w tematykę pracy.

Rozdział „Materiały i metody”, z bardzo rozbudowaną strukturą podrozdziałów, zawiera szczegółowy opis zastosowanych materiałów i metod badawczych, w tym analiz statystycznych, które zostały prawidłowo dobrane. Jednak w części dotyczącej opisu materiału badawczego, obok sposobu zebrania kolekcji izolatów *S. sclerotiorum*, Autorka zamieściła także część wyników z tego etapu badań (tab. 1). Powinny one znaleźć się w rozdziale poświęconemu wynikom. Z kolei, w przypadku podrozdziału 3.1.2. dotyczącego pochodzenia i charakterystyki izolatów *S. sclerotiorum* wykorzystanych do oceny stopnia odporności wybranych odmian rzepaku ozimego

mamy sytuację nieco niejasną. Pojawia się mianowicie pytanie czy kolekcja z 2009 roku była przedmiotem badań wchodzącym w zakres pracy, na co częściowo wskazują opis (cyt. „Zgromadzona w 2009 populacja *S. sclerotiorum* roku została wstępnie scharakteryzowana pod kątem wytwarzania kwasu szczawiowego”) i zamieszczone wyniki (tab. 2, zał. 1). Jeżeli tak, to należałoby wówczas uzupełnić materiał wynikowy, podając m.in. szczegółowe informacje dotyczące analiz molekularnych fragmentów ITS, np.: wykorzystane startery, warunki reakcji, sposób sekwencjonowania/zlecenie tego sekwencjonowania firmie zewnętrznej, itd. W przeciwnym przypadku, wystarczyłaby syntetyczna informacja dotycząca siedmiu (6 z 2009 r. i 1 z 1998 r.) wybranych izolatów i kryterium ich wyboru, z pominięciem części opisu i wyniku ich identyfikacji z wykorzystaniem regionów ITS (zał. 1). Ponadto, raczej trudno uznać zgodność sekwencji DNA izolatu 24BOR/09 ze wzorcem na poziomie 98% za potwierdzenie przynależności gatunkowej. Wyniki zamieszczone w tab. 2 i zał. 1 sugerują, że sekwencje z poziomem zgodności 98-99% nie zostały odpowiednio przygotowane do porównania z sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI lub sekwencjonowanie zostało przeprowadzone błędnie i wymaga powtórzenia. Świadczy o tym występowanie nukleotydów oznaczonych jako „N”. Pochodzenie izolatów z rzepaku praktycznie determinuje ich gatunek, zatem jest mało prawdopodobne, że analizowane izolaty nie należały do gatunku *S. sclerotiorum*, a niezgodności wynikają z nieprawidłowości w analizie sekwencji. Pojawia się także pytanie o kryterium wyboru starterów do analizy RAPD. Jest to kluczowa kwestia, która często decyduje o zawodności, a tym samym małej wiarygodności techniki RAPD i przypadkowości wyników.

Warunki pogodowe panujące podczas trzech sezonów prowadzenia badań Autorka omówiła w odrębnym rozdziale: „Dane meteorologiczne”. Zostały w nim szczegółowo przedstawione opady i temperatura, dwa najważniejsze czynniki mające decydujący wpływ na wzrost i rozwój roślin oraz przebieg procesu chorobowego zgnilizny twardzikowej.

Najobszerniejszą częścią dysertacji, zajmującą 21 stron jest rozdział „Wyniki”. Został on napisany poprawnie i przejrzysto. Charakteryzuje się logicznym układem podrozdziałów, nawiązującym do postawionych wcześniej celów badań. Wyniki są uporządkowane w 25 tabelach i na 8 rycinach w tekście. Materiał uzupełniający ujęto w załącznikach w tabeli i na 21 rycinach, co ułatwia analizę wyników oraz późniejsze wnioskowanie. Sposób opracowania materiału wynikowego świadczy niewątpliwie

o nabyciu przez Autorkę umiejętności przejrzystego i syntetycznego prezentowania danych. Pomimo wysokiego poziomu merytorycznego rozdziału występuje w nim także kilka błędów. W podrozdziale 5.1.3. Autorka nie podaje w jakich jednostkach dokonywała pomiaru wielkości kolonii oraz przebarwień pożywki. W części poświęconej metodyce również brak jednostek w jakich dokonywano pomiarów. Ponadto, zgodnie ze wzorem Townsenda-Heubergera, podanym w rozdziale 3.2.2.1. części metodycznej, indeks porażenia rzepaku ozimego powinien przyjmować wartości od 0 do 100%. Jednakże, w podrozdziale 5.2.1. rozdziału „Wyniki” Autorka podaje wartości indeksów porażenia w zakresie wartości od 0 do 1, co wskazuje na niezgodne z przytoczonym wzorem przekształcenie stopni porażenia na indeksy porażenia (brak ostatniego działania – iloczynu otrzymanej wartości i liczby 100). Pomimo zaistniałej sytuacji przeprowadzona analiza statystyczna i interpretacja wyników są prawidłowe i posiadają dużą wartość merytoryczną.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka przeprowadziła wnikliwą konfrontację otrzymanych wyników z dostępną literaturą przedmiotu. Dyskusja została przeprowadzona poprawnie z wykorzystaniem aktualnej i prawidłowo dobranej literatury. Doskonale koresponduje ze sformułowanymi celami. Tworzy logiczną całość z wcześniejszymi rozdziałami. Jest świadectwem dojrzałości badawczej Autorki potrafiącej również krytycznie spojrzeć na otrzymane wyniki. Potwierdza umiejętność prawidłowej analizy oraz syntezy uzyskanych wyników.

Rozdział „Podsumowanie i wnioski” zawiera 10 wyodrębnionych akapitów, w których Autorka zebrała uzyskane, najistotniejsze wyniki i płynące z nich wnioski. Stanowią one bardzo dobre podsumowanie efektów przeprowadzonych badań, choć w przypadku akapitów 3-6 i 8 próba interpretacji uzyskanych wyników i sformułowanie w ślad za tym wniosków natury ogólnej byłyby niewątpliwie cennym uzupełnieniem.

Zamieszczona przez Autorkę literatura przedmiotu stanowi bogatą listę 165, starannie dobranych pozycji. Większość stanowią najnowsze opracowania z ostatnich lat. Blisko jedna trzecia prac to publikacje z ostatniego dziesięciolecia. Na podkreślenie i uznanie zasługuje fakt korzystania przez Autorkę głównie z prac obcojęzycznych, które stanowią blisko 80% wszystkich pozycji literatury.

Rozprawa doktorska mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas została napisana poprawnie i posiada liczne walory merytoryczne. Za najważniejsze osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań należy uznać:

- zebranie pokaźnej kolekcji 228 izolatów *S. sclerotiorum*, stanowiących doskonałą bazę dla dalszych badań populacji tego patogena,
- wykazanie bardzo dużego zróżnicowania pomiędzy badanymi izolatami *S. sclerotiorum* pod względem wytwarzania kwasu szczawiowego, świadczącego o potencjalnie dużym zagrożeniu dla rzepaku ze strony patogena,
- wykazanie bardzo wysokiej, prawie pełnej korelacji pomiędzy średnicą kolonii izolatów *S. sclerotiorum*, a wielkością przebarwień powstających pod wpływem kwasu szczawiowego wytwarzanego przez te izolaty, co jak wskazuje analiza literatury przedmiotu jest pierwszym doniesieniem na ten temat,
- wykazanie dużego zróżnicowania izolatów *S. sclerotiorum* na podstawie analizy podobieństw polimorfizmu produktów amplifikacji techniką SSR oraz analizy wariacji molekularnej (AMOVA),
- wykazanie dużego zróżnicowania w podatności testowanych odmian rzepaku ozimego (0-100%) na porażenie przez *S. sclerotiorum*; część odmian wykazywała całkowitą odporność jednakże bez powtarzalności w kolejnych latach, co potwierdza ogromną złożoność kwestii uzyskania wysokiej odporności rzepaku ozimego na patogena, m.in. ze względu na jego dużą zmienność genetyczną i zróżnicowanie pod względem produkcji kwasu szczawiowego,
- potwierdzenie wysokiej, dodatniej korelacji pomiędzy poziomem produkcji kwasu szczawiowego przez testowane izolaty *S. sclerotiorum*, a ich chorobotwórczością wobec rzepaku ozimego,
- wykazanie dużego wpływu opadów i temperatury w okresie siedmiu dni po przeprowadzonej inokulacji rzepaku ozimego testowanymi izolatami *S. sclerotiorum* na porażenie roślin; wzrost sumy opadów i obniżenie średnich temperatur powodowały wyższe porażenie rzepaku.

Szczegółowa analiza pracy pozwala także dostrzec w tekście pewne błędy językowe i niedociągnięcia jakich Autorka niestety się nie ustrzegła podczas pisania, np. błędne rozwinięcie skrótu PCR – powinno być Polymerase Chain Reaction (str. 21), niepoprawna pisownia nazwy zestawu do izolacji DNA – powinno być DNeasy Plant Mini Kit (str. 21, 22), itd. W wielu przypadkach wynikają one zapewne z automatycznej korekty komputerowej. Nie umniejszają one merytorycznej wartości przeprowadzonych badań niemniej jednak, wymagają korekty lub uściślenia podczas przygotowywania pracy lub jej fragmentów do druku.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas stanowi oryginalny dorobek naukowy. Poszerza wiedzę i wnosi nowe elementy poznawcze do aktualnej wiedzy na temat zróżnicowania populacji *S. sclerotiorum* zarówno na poziomie fenotypowym, jak i molekularnym oraz odporności rzepaku ozimego na porażenie przez tego patogena. Praca została przygotowana poprawnie pod względem metodycznym oraz merytorycznym i może zostać oceniona pozytywnie.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja pt. „Charakterystyka wybranych populacji *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i ocena odporności różnych typów odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na tego patogena”, autorstwa mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzeniem Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 roku w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2004 nr 15 poz. 128.) i może stanowić podstawę do ubiegania się przez Autorkę o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie agronomia.

W związku z powyższym, składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie mgr inż. Elżbiety Starzyckiej-Korbas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Dariusz Pańka

