

Lublin, dn. 30.05.2023

Dr hab. Agnieszka Jamiołkowska, prof. uczelni  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
Katedra Ochrony Roślin  
Ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **mgr Mileny Pietraszko nt "Epidemiologia bakteriozy pierścieniowej ziemniaka powodowanej przez *Clavibacter sepedonicus* comb. Nov."** wykonanej w Zakładzie Agronomii Ziemniaka Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie, oddział w Jadwisinie.

**Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Ewa Łojkowska**

**Promotor pomocniczy: Dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski**

Niniejszą recenzję sporządzono w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu dr inż. Michała Rokickiego z dnia 27 marca 2023 r. (RN-001-55/2023), informujące o powołaniu mnie przez Radę Naukową IHAR-PIB w Radzikowie na opiniodawcę w przedmiotowej sprawie.

### **Problematyka badawcza podjęta w pracy**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Mileny Pietraszko to wielostronicowe opracowanie naukowe o charakterze monografii. Problematyka badawcza podjęta w pracy dotyczy epidemiologii bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, wywoływanej przez *Clavibacter sepedonicus* (Cs) w zakresie określenia wpływu zróżnicowanych warunków pogodowych i glebowych na proces rozprzestrzeniania się choroby.

W świetle przepisów unijnych (Dz. Urz. UE L 169 z 10.7.2000. str. 1, z późn. zm.; Dz. Urz. UE, L 259 z 18.10.1993) i krajowych (Dz.U.2023.460) bakterioza pierścieniowa



ziemniaka jest chorobą kwarantannową podlegającą obowiązkowi zwalczania. Znaczenie gospodarcze bakteriozy jest szczególnie duże ze względu na fakt występowanie bakterii na ważnej roślinie użytkowej jaką jest ziemniak (*Solanum tuberosum*). Duże znaczenie gospodarcze bakterii Cs wynika również z szerokiego zasięgu jej występowania jakim jest obszar Europy oraz rozległe terytoria Ameryki Północnej i Azji. Kontrola rozprzestrzeniania się bakterii Cs i jej wykrywanie są bardzo trudne. Sprawca bakteriozy pierścieniowej ziemniaka posiada szereg unikalnych cech, które stwarzają wysokie ryzyko niekontrolowanego rozprzestrzeniania się choroby na nowe obszary. Bakterie Cs często wywołują bezobjawową (latentną) formę choroby, kłopotliwą do zdiagnozowania i widoczną zazwyczaj pod koniec okresu wegetacji lub dopiero w trakcie przechowywania bulw, co często mylone jest z objawami innych chorób (Dyrektywa Komisji WE 2006/56). Z tego powodu nie jest możliwe wczesne wykrycie choroby na podstawie objawów chorobowych i szybkie reagowanie. Jedyną skuteczną metodą walki z chorobą jest wówczas kwarantanna polegająca na całkowitej utylizacji chorego materiału roślinnego, co powoduje poważne straty ekonomiczne. Mimo wieloletnich działań, zmierzających do eliminacji bakterii *C. sepedonicus* z upraw ziemniaka walka z chorobą jest nadal bardzo trudna. Pomimo wielu badań prowadzonych w zakresie epidemiologii bakterii oraz sposobów ograniczania jej rozwoju nadal nie określono prawidłowości, które warunkują pojawianie się infekcji latentnych i objawowych. W świetle powyższych informacji konieczne jest prowadzenie badań naukowych zmierzających do szybszego i bardziej precyzyjnego wykrywania choroby, zwłaszcza jej form utajonych. W ocenianej rozprawie doktorskiej podjęto szczegółową próbę określenia wpływu zróżnicowanych warunków pogodowych i glebowych na rozprzestrzenianie się bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, a szczególnie ich wpływ na poziom infekcji utajonej, dynamikę rozwoju i nasilenie występowania Cs w różnych organach ziemniaka podczas wegetacji. Na szczególną uwagę zasługują badania dotyczące wpływu rodzaju gleb na rozwój infekcji latentnej bakteriozy. W związku z powyższym badania podjęte przez Doktorantkę są w pełni uzasadnione.



## Merytoryczna ocena pracy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi wartościowe opracowanie naukowe. Autorka pracy podjęła próbę określenia wpływu zróżnicowanych warunków pogodowych (temperatury i wilgotności) i glebowych oraz ich współdziałania na poziom infekcji latentnej w liściach i bulwach ziemniaka, jak również ocenę wpływu zakażenia sadzeniaków przez bakterię Cs na rozwój roślin i wielkość plonu. Autorka oceniała również dynamikę rozwoju i nasilenia występowania Cs w różnych organach roślin w celu określenia optymalnego czasu wczesnego wykrywania bakterii. Opisane powyżej zagadnienia zostały przedstawione przez Autorkę jako cztery zadania badawcze:

Zadanie 1. Określenie wpływu zróżnicowanych warunków pogodowych (temperatury i wilgotności) i glebowych (z uwzględnieniem rozkładu granulometrycznego gleby) oraz ich współdziałania na poziom infekcji latentnej w liściach i bulwach ziemniaka.

Zadanie 2. Określenie wpływu środowiska glebowego na poziom infekcji Cs w bulwach potomnych.

Zadanie 3. Określenie wpływu zakażenia sadzeniaków przez Cs na rozwój roślin oraz liczebność bulw ziemniaka i wielkość plonu.

Zadanie 4. Ocena dynamiki rozwoju i nasilenia występowania Cs w poszczególnych organach roślin ziemniaka (korzenie, łodygi i bulwy) w okresie wegetacji, w kontekście określenia optymalnego czasu wczesnego wykrywania bakterii.

W rozdziale Przegląd literatury Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy z zakresu morfologii, biologii i sposobów zwalczania patogenu, starannie analizując większość dostępnych źródeł naukowych. W sposób bardzo obszerny scharakteryzowała czynniki warunkujące rozwój bakteriozy pierścieniowej ziemniaka oraz czynniki wpływające na wirulencję bakterii. Ponadto opisała sposoby diagnozowania choroby i metody identyfikacji bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem tych metod, które pozwalają na wykrycie bakterii w początkowym okresie wegetacji roślin (w stadium bezobjawowym). Trudności we wczesnej i szybkiej diagnostyce patogenu związane są z różnym przebiegiem procesu chorobowego, który w zależności od różnych warunków środowiskowych przebiega w sposób zmienny



i zależny od bardzo wielu wypadkowych. Badania podjęte przez Doktorantkę, dotyczące określenia wpływu zróżnicowanych warunków pogodowych i glebowych na rozwój oraz rozprzestrzenianie się bakterii zostały zaplanowane z wykorzystaniem wielu zmiennych doświadczalnych, co miało na celu lepsze poznanie wzajemnych zależności warunkujących rozwój bakteriozy pierścieniowej ziemniaka i bardzo dobrze wyjaśnia zasadność podjętych badań naukowych. Mimo, iż badania nad bakteriozą pierścieniową ziemniaka prowadzone są już od ponad wieku nadal nie określono szczegółowo prawidłowości, które warunkują pojawianie się infekcji latentnych. Niedostatecznie poznane są również zależności patogen-roślina-środowisko, które mają decydujący wpływ na rozwój procesu chorobowego oraz nasilenie porażenia.

W celu uzyskania odpowiedzi na postawione cele badawcze Doktorantka przeprowadziła wieloletnie i bardzo interesujące badania poletkowe (2014-2020) oraz szereg badań laboratoryjnych. Badania były prowadzone na polach doświadczalnych IHAR-PIB w Jadwisinie. W celu zrealizowania zaplanowanych zadań badawczych założono 430 mikropoletek o różnym rozkładzie granulometrycznym gleby (6 profili glebowych), w różnym układzie płodozmianu i zastosowaniem zróżnicowanej dawki nawożenia azotowego (2 dawki nawożenia azotowego). Obiektem badawczym było 13 odmian ziemniaka i 5 szczepów bakterii *C. sepedonicus* wykorzystanych w badaniach infekcyjnych bulw. Badania polowe zostały założone w różnym układzie bloków losowych i zaplanowane jako 4 oddzielne zadania badawcze prowadzone przez sumaryczny okres 6 lat.

W okresie wegetacji roślin Doktorantka określała poziom zainfekowania różnych organów roślin bakteriami Cs pobierając materiał roślinny do badań laboratoryjnych (w różnych stadiach rozwojowych rośliny). Dla przykładu w celu realizacji zadania 1 tylko w jednym roku badań Doktorantka pobrała aż 288 prób z liści i taką samą liczbę prób z bulw potomnych ziemniaka, aby następnie przebadać je w laboratorium. Podczas badań polowych Doktorantka prowadziła pomiary temperatury i wilgotności gleby na różnych profilach glebowych oraz wykonywała niezbędne zabiegi pielęgnacyjne. Należy zaznaczyć, że takie badania wymagały czasu oraz ogromnego zaangażowania Doktorantki, a wymiernym efektem



tych działań są zaprezentowane w pracy cenne dane liczbowe.

W celu określenia poziomu zainfekowania roślin Doktorantka pobierała żywy materiał roślinny do analizy w laboratorium, gdzie zgodnie z odpowiednią metodyką przygotowywała preparaty mikroskopowe do testu immunofluorescencji pośredniej IF. Należy zaznaczyć, że Doktorantka wykonała ogrom pracy związanej z liczbą pobranych prób roślinnych i ilością przeprowadzonych testów IF. Materiał roślinny do badań pobierała w różnych terminach, zależnie od zaplanowanego zadania badawczego z uwzględnieniem różnej liczby kombinacji doświadczalnych (w zad. 1 – jeden termin obserwacji i poboru liści i bulw; w zad. 2 - dwa terminy obserwacji i poboru roślin i jeden termin poboru bulw do badania; w zad. 3 - dwa terminy poboru prób roślin i 1 termin poboru bulw; w zad. 4 w zależności od roku badawczego 4 lub 6 terminów poboru różnych fragmentów roślin). Taka ilość pobranego i przeanalizowanego materiału roślinnego wymagała ogromnej pracy Doktorantki. W 3 zadaniu badawczym dodatkowo oceniała ona wybrane cechy morfologiczne roślin (liczbę, długość i masę łodyg, masę liści i korzeni) oraz prowadziła ocenę plonu bulw (liczba i masa bulw) w różnych kombinacjach doświadczalnych. Zastosowane w pracy metody badawcze zostały prawidłowo dobrane, analizy laboratoryjne i statystyczne przyczyniły się do wnikliwej oceny badanych parametrów. Zebrane przez Doktorantkę dane są bardzo obszerne i czasem nawet trudne do analizy ze względu na ogrom czynników zmiennych zaplanowanych w doświadczeniach. Doktorantka starała się jasno i zrozumiale zaprezentować otrzymane wyniki, co przy tak dużej liczbie danych nie było łatwe. Na szczególną uwagę zasługują analizy statystyczne, w których Doktorantka wykazała zależność wielu zmiennych doświadczalnych, co pozwoliło na wyciągnięcie pogłębionych wniosków przy tak obszernych i zróżnicowanych wynikach badań. Do najcenniejszych osiągnięć recenzowanej pracy zaliczam:

- wykazanie na podstawie przeprowadzonych badań polowych i testu IF, iż największy wpływ na rozwój infekcji latentnej w roślinach ziemniaka miała podatność odmiany na *Clavibacter sepedonicus* (Cs) oraz warunki środowiskowe,
- infekcji latentnej liści wywoływanej przez Cs, sprzyjało również podłoże glebowe



charakteryzujące się niższą temperaturą i wyższą wilgotnością.

Takie wnioski wskazują w jakich warunkach środowiskowych należy spodziewać się szybszej infekcji latentnej i przeprowadzać testy diagnostyczne, aby jak najlepiej określić optymalny czas wczesnego wykrywania bakterii.

### Formalna ocena pracy

Poruszane w pracy zagadnienia badawcze są ważne ze względu na wciąż istniejący problem ze skutecznym zwalczaniem bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, co związane jest między innymi z wiarygodną i skuteczną diagnostyką tkanek roślin i bulw ziemniaka, charakteryzujących się zazwyczaj niską koncentracją bakterii Cs.

Z formalnego punktu oceniana praca doktorska ma formę klasycznej rozprawy doktorskiej z podziałem na 8 części: wstęp, przegląd literatury, cel i zadania badawcze, materiał i metody, wyniki i dyskusja, wnioski, literatura, streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca została napisana poprawnym stylistycznie językiem i obejmuje 134 strony. Wyniki badań polowych i laboratoryjnych zostały przedstawione w postaci licznych tabel (28), wykresów (17) oraz dokumentacji fotograficznej (9). Wyniki zostały omówione i przedyskutowane poprawnie (choć Autorka nie uniknęła pewnych błędów), oddzielnie dla każdego zadania badawczego, co ułatwia analizę bardzo dużej liczby danych. Praca została napisana w sposób przejrzysty i poprawną polszczyzną. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka zamieściła 11 syntetycznie sformułowanych wniosków. Dysertację zamyka rozdział Literatura, gdzie zamieszczono 133 pozycje bibliograficzne, z czego około 90% cytowanej literatury stanowią publikacje anglojęzyczne.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr Mileny Pietraszko nasuwają się jednak pewne uwagi i pytania:

### Uwagi

1. W treści pracy Autorka używa zamiennie określenia warunki pogodowe lub warunki klimatyczne. Należy ujednoclić stosowany termin używając określenia *warunki pogodowe*, ponieważ zgodnie z definicją „warunki pogodowe to chwilowy stan



atmosfery w danym miejscu (np. temperatura i wilgotność powietrza, prędkość i kierunek wiatru, ciśnienie atmosferyczne, występowanie opadów itp.), podczas gdy warunki klimatyczne odnoszą się do klimatu czyli statystycznego stanu atmosfery i są charakterystyczne dla danego regionu, obszaru i typów pogody w cyklu rocznym”. A zatem Doktorantka badała warunki pogodowe a nie klimatyczne.

2. W rozdziale Metody, w części dotyczącej opisu doświadczeń mikroplotkowych (4.2.1.; 4.4.; 4.5.) brak informacji na temat rodzaju preparatów stosowanych do ochrony roślin przed chorobami i szkodnikami podczas wegetacji.
3. W rozdziale Metody, podrozdziały 4.2.4. i 4.2.5. opisujące monitorowanie warunków termiczno-wilgotnościowych gleb brak cytowania pozycji literatury, z której zaczerpnięto wzory do obliczania wilgotności objętościowej, wagowej i procentowej gleby.
4. W rozdziale Metody podczas opisu realizacji zadania badawczego nr 3 w latach 2015-2017 (rozdział 4.6.) prowadzono ocenę cech morfologicznych roślin w dwóch terminach: 45 dni i 65 dni od sadzenia. Podobnie w zadaniu badawczym nr 4 (rozdział 4.7.) w okresie wegetacji pobierano tkankę korzeni, podstaw i wierzchołków łodyg oraz bulw do badania testem IF podając, którego dnia od wschodów/ sadzenia wykonywano badanie. W metodyce bardziej poprawne byłoby określenie najpierw fazy rozwojowej rośliny, w której prowadzono obserwacje tj. BBCH, a dodatkowo podanie informacji, którego dnia od momentu wysadzenia bulw prowadzono obserwacje/analizy.
5. W rozdziale Wyniki i dyskusja w rozdziałach 5.2., 5.5, w części dotyczącej opisów zadań badawczych 1- 4 Doktorantka powtarza treści opisane w poprzednim rozdziale tj. Metodyka, co nie powinno mieć miejsca.
6. W pracy Autorka używa terminu „plonowanie roślin” podczas gdy bardziej poprawne byłoby określenie „plon roślin”. Plonowanie jest procesem rozciągniętym w czasie przy sukcesywnych zbiorach i pozwala dodatkowo na ocenę dynamiki plonowania,





wówczas plon jest sumą plonów cząstkowych. Przy ziemniakach oceniano końcowy plon bulw.

7. Uwagi edytorskie dotyczące całej pracy: nie należy stawiać kropek po tytułach rozdziałów, podrozdziałów, tytułach tabel oraz zdjęć ponieważ nie są to zdania.
8. Brak legendy pod tabelami nr 11, 12, 16, dotyczącej oznaczeń profili glebowych: II, III, VI; wyjaśnienie takie ułatwia czytanie danych.
9. W tabeli 17 figuruje błąd w nazwie odmiany w roku 2015, zamiast Owacja powinno być Tetyda
10. Rys. 10, 11, 12 - pod wykresami brak informacji o tym, że analiza statystyczna została wykonana w obrębie każdej badanej cech morfologicznej oddzielnie, a nie pomiędzy wszystkimi cechami zamieszczonymi na wspólnym wykresie (wyj. Rys. 10c, 11c, 12c). Taka prezentacja danych utrudnia odczyt i wprowadza w błąd. Czy przedstawione średnie wartości zostały obliczone w przeliczeniu na 1 roślinę, ponieważ Autorka nie podaje tej informacji na osi Y?
11. Rys. 13 – w tytule brak informacji czy średnia masa i liczba bulw jest średnią wartością z lat badawczych? Taka informacja powinna być zaznaczona w tytule wykresu.
12. Rys. 14 i 15 - w tytule rysunku brak informacji dotyczący lat badawczych.
13. Rys. 16 i 17– w legendzie brak informacji, że wartości oznaczone tą samą literą były porównywane w obrębie kombinacji doświadczalnych w danym roku badawczym, a wartości średnie w latach porównywane oddzielnie.
14. Rys. 17 - dlaczego wartości przedstawiające stopień infekcji Cs mają oznaczenia literowe od a do h przy niewielkiej liczbie danych?
15. Wnioski: należy dopracować ten rozdział pracy zwracając szczególną uwagę na poniższe uwagi:
  - Wniosek 1: Zdanie „Rozpoznano i scharakteryzowano czynniki klimatyczne i glebowe mające wpływ na rozwój populacji bakterii Cs w liściach i bulwach” nie jest zdaniem wnioskującym i jest powtórzeniem treści zawartych we wniosku 1. Ponadto





Autorka pisze „W przypadku bulw stwierdzono istotny wpływ warunków klimatycznych (temperatury i wilgotności powietrza) na rozwój infekcji latentnej **i brak wpływu rodzaju podłoża glebowego**”. Podczas gdy na str. 92 Autorka pisze „W podsumowaniu [...]. Na piasku gliniastym (V profil glebowy) odnotowano wyższy indeks zainfekowania bulw potomnych roślin inokulowanych Cs w pierwszym roku badań, dwa razy więcej pozytywnych prób oraz wyższy indeks odglebowego zainfekowania bulw w drugim roku badań, w porównaniu do wyników uzyskanych na piasku (I profil glebowy)”, co sugeruje wpływ rodzaju podłoża na infekcję bulw”.

- Wniosek 2 nie jest w mojej opinii wnioskiem, ale ogólnym stwierdzeniem dotyczącym trudności wynikających z prowadzonych badań.

- Wniosek 4 – we wnioskach nie podajemy wartości liczbowych.

#### 16. Literatura:

- 20% pozycji literatury to literatura z lat 1914 -1989;
- brak w tekście następujących pozycji literatury: De Boer 1987; De Boer et al. 1992; De Boer and McNaughton 1986; EFSA PLH Panel; Gudmestad et al. 1991; Nelson and Kozub 1992;
- poniższe pozycje powinny być oznaczone jako 1992 a i 1992b, ponieważ mają ten sam rok wydania:
  - De la Cruz A.R., Poplawsky A.R and Wiese M.V. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. Applied and Environmental Microbiology 58: 1986-1991. <https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1986-1991.1992>
  - De la Cruz A.R., Wiese M.V. and Schaad N.W. 1992a. A semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissues. Plant Disease 76: 830-834.



## Pytania

1. Metody: dlaczego podczas realizacji zadania 1 nie liczono precyzyjnie bulw potomnych z objawami porażenia tylko je odrzucano? Autorka podaje, że stanowiły one około (?) 7%, w tym z objawami Cs 0,5%? Podobnie w zad. 2 bulwy z objawami Cs nie podlegały testowaniu.
2. Metody: dlaczego podczas realizacji zadania 3 brano pod uwagę szczep Cs NCPPB 4053 pochodzący ze Szwecji, a nie jeden z rodzimych szczepów Cs? Badanie ze szczepem rodzimym Cs byłoby bardziej uzasadnione, a wyniki miarodajne. Podobnie w zadaniu 1 przeprowadzono m.in. badanie podatności wielu odmian ziemniaka na Cs z uwzględnieniem izolatu Cs NCPPB 4053 a nie szczepu Cs izolowanego w Polsce?
3. Czy podczas realizacji zadania 3 prowadzono zmianowanie w kolejnych latach badawczych?
4. Dlaczego w zadaniu 4 w drugim roku badań, użyto odmianę Lawenda zamiast Owacja, jak w pierwszym i trzecim roku?

## Wnioski końcowe

W końcowej ocenie stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska nt "Epidemiologia bakteriozy pierścieniowej ziemniaka powodowanej przez *Clavibacter sepedonicus* comb. Nov." jest oryginalnym rozwiązaniem postawionego problemu naukowego, wnosi istotne elementy do nauki oraz spełnia kryteria formalne i merytoryczne. Recenzowaną pracę doktorską oceniam bardzo pozytywnie. Należy podkreślić aplikacyjny charakter pracy, która przyczyniła się do bardziej precyzyjnego określenia wpływu warunków pogodowych i glebowych na rozwój infekcji latentnej w liściach i bulwach ziemniaka, co w efekcie pozwoli na udoskonalenie metodyki badawczej do wczesnego wykrywania formy ukrytej bakterii Cs. Przeprowadzone badania wskazują, że Doktorantka ma bardzo dobre przygotowanie merytoryczne do prowadzenia badań naukowych. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi art. 14 ust. 2 pkt. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i



tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. W związku z powyższym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB wniosek o dopuszczenie Pani mgr Mileny Pietraszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Agnieszka Jamiołkowska, prof. uczelni

