

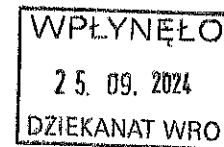
**Prof. dr hab. Marek Korbas**

**Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy**

**ul. Władysława Węgorka 20**

**60-318 Poznań**

**Zakład Mykologii**



### **Recenzja pracy doktorskiej**

**Pana mgr inż. Marcina Wieczyńskiego pt. „Charakterystyka wybranych izolatów grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary, sprawcy zgnilizny twardzikowej marchwi.**

#### **Ogólne omówienie pracy**

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje badania przeprowadzone na marchwi (*Daucus carota*). Gatunek ten botanicznie należy do rodziny selerowatych (*Apiaceae*). Cały cykl rozwojowy, który kończy się wytworzeniem kwiatostanu w formie baldachu z nasionami trwa dwa lata. W pierwszym roku uprawy marchew tworzy rozetę którą budują pierzaste liście, a w glebie tworzy korzeń spichrzowy. Marchew uprawiana jest w Europie, Azji i Afryce. Zapiski o marchwi jako roślinie jadalnej datowane są na około dwa tysiące lat przed naszą erą. Korzenie różnych odmian marchwi mają korzenie barwy pomarańczowo-czerwonej. Kształt korzeni też może być różny, od kulistego, owalnego, cylindrycznego do wrzecionowatego. Jest to gatunek o dużej wartości biologicznej ze względu na wysoką zawartość karotenoidów, cukrów, soli mineralnych itp. Ma dużą wartość spożywczą dla ludzi i zwierząt. Spożywana jest na surowo i po ugotowaniu w postaci soków i konserw. Cenny dodatek do surówek i wielu dań obiadowych. Niestety gatunek który badany był przez doktoranta jest porażany przez różne agrofagi powodujące choroby nadziemnej i podziemnej części marchwi. Korzenie które stanowią plon marchwi uzyskiwany w pierwszym roku uprawy porażany jest przez różne gatunki grzybów należących do różnych rodzajów. Szczególne znaczenie dla marchwi, która jest zebrana i przechowywana stanowi gatunek *Sclerotinia sclerotiorum*, który powoduje

chorobę znaną jako zgnilizna twardzikowa. Dla porządku warto też wskazać na to, że w czasie wegetacji i przechowywania jednocześnie na korzeniach marchwi występować może kilka ważnych gatunków grzybów należących m.in. do rodzaju *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis* itd. Zdarza się też porażenie korzeni przechowywanych przez bakterie powodujące gnicie korzeni. Jak podano w pracy materiał badawczy w postaci korzeni z objawami powodowanymi przez *Sclerotinia sclerotiorum* sprawcy zgnilizny twardzikowej zbierano przez dwa lata 2015-2016. Przypuszczam, że badania opisane w doktoracie przeprowadzono przez kilka lat. Zakres badań przedstawiony w recenzowanej pracy jest szeroki. Obejmują opis zebranych izolatów *Sclerotinia sclerotiorum* na podstawie cech morfologicznych, molekularną identyfikację uzyskanych izolatów oraz wpływ temperatury na zdolność wytwarzania przetrwalników badanego gatunku oraz jego zdolność do wytwarzania kwasu szczawiowego. Określono też w badaniach laboratoryjnych skuteczność fungicydów, na wzrost liniowy ww. grzyba. Oceniono też wpływ grzyba *Trichoderma harzianum* na wzrost *Sclerotinia sclerotiorum* w warunkach *in vitro* na pożywce agarowo-glukozowo-ziemniaczanej (AGZ). W warunkach dokładnie kontrolowanych w fitotronie oceniono patogeniczność sprawcy zgnilizny twardzikowej wobec siewek i korzeni marchwi.

Praca została napisana i zredagowana zgodnie z zasadami przyjętymi przy opracowaniu doktoratu w formie monografii. Składa się na nią 11 rozdziałów. Z licznymi podrozdziałami i pod podrozdziałami. Rozdziały to wstęp, cel pracy, przegląd literatury, materiał i metoda, wyniki, dyskusja, podsumowanie, spis rycin, spis tabel, literatura i streszczenie. Ryciny to również fotografie obrazujące patogen. W pracy umieszczono również wykresy. Ogólnie w pracy znajduje się 27 rycin i 24 tabele. Pracę kończy spis literatury ze 170 pozycjami i netgrafią. Literatura to pozycje głównie z pierwszej dekady roku 2000, ale są też w niej nowe pozycje literaturowe - aktualne. Zdecydowana większość to literatura w języku angielskim.

#### **Uwagi recenzenta dotyczące poszczególnych rozdziałów**

**Tytuł pracy:** Moim zdaniem bardziej oddawałby treść pracy i podnosił by rangę prowadzonych badań tytuł: Zmienność morfologiczna grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* i określenie patogeniczności izolatów dla siewek i korzeni marchwi. Sprawca zgnilizny

twardzikowej jest polifagiem. Może porażać setki gatunków roślin. Nowych prac dotyczących marchwi brakuje, co obrazuje np. dołączony przez doktoranta spis literatury. Praca to zajmująca się *Sclerotinia sclerotiorum* w uprawie i przechowywaniu marchwi dostarczy wiele informacji potrzebnych praktyce ogrodniczej i rolniczej.

**Przegląd literatury:** Jest szeroki i dobrze charakteryzuje gatunek rośliny – marchew, a w pełni podaje etiologię i epidemiologię zgnilizny twardzikowej. Właściwie została opisana przynależność systematyczna grzyba *Sclerotinia sclerotiorum*. Pożyteczne jest też podanie wielu nazw synonimów gatunku *Sclerotinia sclerotiorum*. Autor nie zapomniał o szkodliwości dla marchwi badanego patogenu. Zaznaczył, że straty podczas przechowywania wynosić mogą nawet 30%. Jest to wielkość o znaczeniu ekonomicznym. W rozdziale tym omówione zostały dostępne metody zwalczania grzyba *Sclerotinia sclerotiorum*. Przedstawione zostały metody niechemiczne (agrotechniczna, hodowlana, biologiczna) i chemiczna. Wskazano również na rozwój grzyba i choroby w zależności od warunków panujących w przechowalni i stosowanej ochrony w przechowalni.

**Metodyka:** Opisano szczegółowo metodykę badań laboratoryjnych i w warunkach ściśle kontrolowanych w fitotronie (komorze wegetacyjnej). Określono dokładnie korzystając z cech morfologicznych przynależność zebranych izolatów do gatunku *Sclerotinia sclerotiorum*. Identyfikacja izolatów potwierdzona została molekularnie z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Izolację wykonano według protokołu producenta zestawu ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep firmy Zymko Research. Dokładnie opisano metodykę wpływu temperatury na wzrost i zdolność wytwarzania sklerocjów - przetrwalników grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* oraz zdolność badanego patogenu do wytwarzania kwasu szczawiowego przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej HPLC i przy pomocy indykatora kwasowości (zieleń bromokrezolowa). Ocenę wpływu fungicydów na wzrost izolatów wykonano stosując różne izolaty pochodzące z marchwi, ale też innych gatunków. Do tego celu służyły standardowe metody stosowane w tego typu badaniach, które określają procent hamowania wzrostu grzybni lub wytwarzania (hamowania) sklerocjów. Podobnie oceniono wpływ grzyba *Trichoderma harzianum* na wzrost grzybni

*Sclerotinia sclerotiorum*. Do oceny użyto skali indywidualnego efektu biotycznego (IEB) według Mańki oraz Górskiego.

**Wyniki uzyskane w pracy:** Badania laboratoryjne pozwoliły na zidentyfikowanie 62 izolatów grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* pozyskanych z wielu roślin uprawnych rolniczych i warzywnych w tym z marchwi, pietruszki, selera i innych. Z rzepaku izolowano i identyfikowano najwięcej izolatów (22 izolaty). Identyfikacja potwierdzona została po przeprowadzeniu badania metodą molekularną za pomocą SCAR PCR. Wszystkie badane izolaty przynależały do *Sclerotinia sclerotiorum*. Szeroko w tabeli 5 Autor przedstawia wyniki wzrostu grzyba sprawcy zgnilizny twardzikowej w zależności od temperatury. Podobnie jest w przypadku wytwarzania przetrwalników. Za osiągnięcie tej pracy można zaliczyć wyznaczenie modelu regresji dla wzrostu grzybni i wytwarzania przetrwalników w zakresie temperatur 5-25°C (str. 25).

Interesującym wynikiem jest określenie współczynnika korelacji Pearsona – średnica kolonii *Sclerotinia sclerotiorum* do średnicy przebarwień wywoływanych przez indykator kwasowości pokazujący wynik wytwarzania kwasu szczawiowego. Współczynnik ten był wysoki  $R=0,81$ . Potwierdzono, że niektóre z użytych substancji czynnych skutecznie hamowały wzrost grzybni w warunkach *in vitro*. Najwyższą skuteczność uzyskano dodając do pożywki boskalid + piraklostrobina oraz fluopyram + tebukonazol. Ta pierwsza para substancji czynnych wykazywała silne ograniczenie produkcji sklerocjów w stężeniu 1ppm i 5ppm.

Ciekawym rezultatem badań jest określenie hamowania grzybni przy użyciu innego grzyba, a mianowicie zbadanie hamowania wzrostu grzybni *Sclerotinia sclerotiorum* przy użyciu *Trichoderma harzianum*. Procent hamowania w tym badaniu wynosił od 52,2% do 59,7%. Ta wielkość hamowania w metodzie biologicznej jest do zaakceptowania. Ważne informacje zawarte w doktoracie dotyczące zróżnicowania podatności odmian marchwi (Flakkse F1 i Darina), pokazują które odmiany mogą opierać się porażeniu przez *Sclerotinia sclerotiorum* w czasie przechowywania. W zależności od izolatu uzyskiwano różną śmiertelność siewek marchwi. Niską śmiertelność uzyskiwano dla odmiany Darina, a wyższą w odmianie Sclara.

Dyskusja wyników powinna służyć konfrontacji własnych osiągnięć z rezultatami badań wykonanych przez innych badaczy w kraju i za granicą. Jest ona obszerna, obejmuje kilkanaście stron i odnosi się do 170 pozycji literatury. Doktorant w umiejętny sposób porównywał uzyskane własne wyniki badań z rezultatami innych autorów badających ten sam lub nieco różniący się, ponieważ badanie wykonano w odniesieniu do innego gatunku.

Dyskusja z wynikami innych autorów prac nie jest łatwa, a doktorant w mojej opinii dobrze poradził sobie z tym problemem. Wynika to z tego, że wykonał badania zgodnie z planem i przy pomocy dostępnych urządzeń i przyrządów. Bogata dokumentacja fotograficzna ułatwia zrozumienie uzyskanych wyników. Pewnym problemem jest w części dyskusji przedstawienie ważności uzyskanych wyników dla nauki i dla praktyki, a takie osiągnięcia są w tej pracy. Przykładowo wzór regresji dla wzrostu grzybni i wytwarzania sklerocjów. Wytypowanie substancji czynnych najskuteczniej hamujących wzrost grzybni, określenie które z odmian badanych marchwi jest mniej podatna na porażenie.

Podsumowania są dobrą metodą rekapitulacji wyników i w tym przypadku zastąpiły wnioski. Do tego punktu nie mam uwag.

**Techniczne uwagi dotyczące pracy:** Na wstępie recenzji miałem pewne uwagi dotyczące tytułu i swoje zdanie podtrzymuje, ale wiem, że tytuł doktoratu ustalony wcześniej nie jest łatwy do zmienienia ponieważ wymaga procedury, która nie ułatwia tego typu zmiany.

Szczegółowo opisano metody zwalczania *Sclerotinia sclerotiorum*. Zrezygnowałbym w spisie treści z podpunktów, które wymieniają metody. Zostawiłbym tylko podpunkt 3.5 Zwalczanie *Sclerotinia sclerotiorum*. W spisie treści używa się raz określenia wpływ fungicydów, wpływ preparatów chemicznych, środków chemicznych. Proponuje to ujednoczyć na wpływ fungicydów, a najlepiej wpływ substancji czynnych w fungicydach (str. 5, str. 28 – tabela 1) Substancje czynne wymienione w tabeli już nie są zarejestrowane np. chlorotalonil, iprodion. W czasie okresu badań były one legalne. Pragnę przypomnieć tylko obecne miejsce tych substancji czynnych (str. 28 i inne).

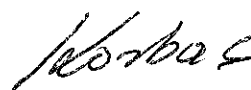
Stwierdzam braki w cytowaniu literatury str, 28 Sallan i wsp 2009 i ten sam autor 2019. Jest cytowany, a brakuje tego autora w spisie literatury. Są to tylko niektóre z drobnych błędów technicznych. Ogólnie język pracy jest dobry i tylko nieliczne szczegóły wystarczy poprawić.

### **Końcowe wnioski**

Praca jest dobrze zaplanowana i napisana poprawnym językiem. Drobne zauważone niedociągnięcia i użycie ujednolicenia formy powinno się skorygować, ale nie mają one wpływu na wartość pracy. Odczuwam brak podania czasu trwania badań. Wprawdzie podano czas i ilość izolatów *Sclerotinia sclerotiorum*, ale nie mam orientacji jak długo badano pozyskane grzyby aby uzyskać podane wyniki.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że został osiągnięty cel pracy, cele szczegółowe i zweryfikowano hipotezę badawczą. Utylitarne wyniki badań powinny zostać wyraźnie wyeksponowane, bo stanowią dużą wartość tej pracy. Doktorant wykonał wiele badań które są cennym wkładem do nauki, ale nie jest to wyraźnie zaznaczone w treści wyników w dyskusji i w podsumowaniu. Skromność doktoranta nie powinna tutaj mieć miejsca. Autor recenzowanej pracy potwierdza, że realizując jej założenia wykazał, że potrafi korzystać z metod badawczych, aby uzyskać odpowiedź dotyczącą roli, znaczenia i biologii sprawcy zgnilizny twardzikowej grzyba *Sclerotinia sclerotiorum*.

W związku z powyższym stwierdzam, iż rozprawa spełnia kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.) w zakresie sztuki, zgodnie z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 ze zm.) i w związku z tym **wniosuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



**Poznań 1.09.2024**

**Prof. Dr hab. Marek Korbas**