

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anity Krasieńskiej
pt.: Wpływ elicytorów (jasmonianu metylu i Z-jasmonu) na indukcję reakcji
obronnej kukurydzy

Recenzję wykonano na zlecenie dr hab. inż. Joanny Lemanowicz, prof. PBS, Przewodniczącej Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo oraz Uchwały nr 42/2021/2022 Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z dnia 30 września 2022 roku. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biologii i Ochrony Roślin, Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii, Politechniki Bydgoskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Piesika.

Uzasadnienie

Uprawa kukurydzy jest coraz bardziej popularna w naszym kraju. Wysokie i stabilne w latach plony ziarna oraz masy zielonej sprawiają, że jej produkcja jest również opłacalna. Najwięcej zasiewów tej rośliny znajduje się w Polsce południowej, ale coraz częściej, w tym na ziarno, uprawia się kukurydzę na północy kraju. Mankamentem jest, że szybko wzrastająca powierzchnia (ponad 1,7 mln ha w 2021 roku), szczególnie zasiewów kukurydzy ziarnowej powoduje, że większego znaczenia nabierają szkodniki i patogeny chorobotwórcze. Do najgroźniejszych obecnie zagrożeń należą: omacnica prosowianka, stonka kukurydziana, mszyce, ploniarka zbożówka, choroby fuzaryjne łodyg i kolb, głownia kolb. Zwalczanie agrofagów kukurydzy odbywa się często za pomocą chemicznych środków ochrony roślin, co niesie za sobą negatywne konsekwencje dla środowiska, zwierząt karmionych paszami z kukurydzy oraz dla człowieka. W tym kontekście wszelkie poszukiwania niechemicznych możliwości ograniczania szkodników i chorób kukurydzy są uzasadnione i doskonale wpisują się we współczesne trendy w ochronie roślin. Jest to zgodne również ze strategiami Europejskiego Zielonego Ładu, w ramach Wspólnej Polityki Rolnej prowadzonej przez Unię Europejską. W związku z tym, wybór tematu do badań uważam za właściwy, odpowiadający aktualnemu zapotrzebowaniu na nowe rozwiązania w ochronie roślin.

Struktura i formalna ocena rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi zwięzłe opracowanie liczące 126 stron, które zostało podzielone na następujące rozdziały: Wstęp, Przegląd literatury, Materiał i Metody badań, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Summary i Bibliografię. Na końcu pracy widnieje jeszcze spis wykorzystanych fotografii (16), schematów (4), rycin (32) i tabel (9) oraz aneks zawierający ryciny, będące graficznym przedstawieniem wyników badań. Przyjęty układ pracy uważam za klasyczny i prawidłowy. Kolejne rozdziały ułożone są przejrzysto i logicznie, zgodnie z wymogami przyjętymi w dysertacjach o podobnej tematyce.

We Wstępie mgr Anita Krasieńska uzasadnia celowość przeprowadzenia badań opisanych w rozprawie. Logicznie rozpoczyna od wątków bardziej ogólnych, a następnie nakierowuje czytelnika na zagadnienia szczegółowe, ściśle związane z tematem pracy. W niektórych

przypadkach należałoby jednak powołać się na stosowne cytowania, nawet jeśli udostępniana wiedza ma charakter ogólny. Przedstawione uzasadnienie jest zgodne z aktualnymi realiami w jakich funkcjonuje rolnictwo. Założenia wytyczone w Europejskim Zielonym Ładzie zdecydowanie ukierunkowane są na redukcję stosowania pestycydów. Poszukuje się więc nowych metod w ochronie roślin, wśród których wykorzystanie naturalnej odporności roślin na zerowanie szkodników indukowanej jasmonianami, wydaje się być bardzo obiecujące.

Cel pracy został jasno, zwięźle i prawidłowo sformułowany. Celem było określenie wpływu aplikacji syntetycznego cis-jasmonu i jasmonianu metylu na emisję lotnych związków organicznych. Szczegółowe badania obejmowały pojedynczą aplikację tych związków i zbieranie lotnych związków organicznych (LZO) w odstępie czasowym oraz podwójną aplikację tych komponentów (także w odstępie czasowym), aby uwidocznić efekt „primingu”. W tym miejscu należałoby tylko bardziej precyzyjnie dopisać jakiej rośliny dotyczyły badania.

W początkowej części Przeglądu literatury (pkt. 2.1), Autorka dokonuje rzeczowej oceny stanu produkcji kukurydzy w Polsce i na świecie. Wprowadzenie szerokiego kontekstu tematu pracy w jakim porusza się Autorka uważam za prawidłowe i niezbędne. Wydaje się nawet, że jeszcze lepiej byłoby, gdyby fragment ten był bardziej rozszerzony, a także podzielony na podpunkty, np. opis botaniczny i systematyka kukurydzy, przeznaczenie uprawy, znaczenie środowiskowe uprawy kukurydzy, itp. W dalszej części (pkt. 2.2), Autorka przechodzi do omawiania uszkodzeń kukurydzy powodowanych przez wybrane szkodniki. Wczytując się jednak w zawartość tego podrozdziału lepiej byłoby nazwać go jako „aktualne zagrożenia kukurydzy powodowane przez roślinożerców”. Opisano aż 13 gatunków, z których jednak tylko niektóre można nazwać szkodnikami, wymagającymi bezpośredniego zwalczania. Przykładowo, nie sądzę, aby zmieniki powodowały istotne szkody na plantacjach kukurydzy. Prawidłowym, wobec takich gatunków, byłoby określenie ich jako fitofagi. W tej części przeglądu pojawiają się liczne błędy wynikające zapewne z braku staranności w przygotowywaniu rozdziału niż z braku wiedzy Doktorantki. Rolnice bowiem z pewnością nie należą do pluskwiaków z rodziny mszycowatych, gdyż są motylami. Nie należy też pisać kursywą wszystkich nazw łacińskich. Obecnie w entomologii przyjęto kursywą pisać tylko nazwy gatunkowe i rodzajowe. W niektórych miejscach brakuje konsekwentnego, ujednoliconego sposobu pisania, przykładowo *Oscinella frit* raz jest pisana kursywą, a zaraz potem już nie. Ponadto, na zdjęciu nr 6 z pewnością nie są to larwy lenia ogrodowego, jak podaje podpis, ale pędraki i drutowce. Opisując poszczególne gatunki Autorka podaje podstawową, akademicką wiedzę o ich morfologii i rozwoju, następnie szkodliwości i zwalczaniu. Przydałyby się tutaj raczej informacje o rzeczywistej szkodliwości owadów w uprawie kukurydzy i analiza przyczyn licznego występowania, przynajmniej dla najważniejszych gatunków. Podana łacińska nazwa wciornastka zbożowego *Frankliniella intosa* (pkt. 2.2.11) dotyczy wciornastka kwiatowego. W treści tego samego podpunktu wciornastek zbożowy zmienił łacińską nazwę na *Limothrips cerealium* co też nie jest w pełni właściwe, bowiem nazwa ta przypisana jest wciornastkowi zbożowemu bezzębnemu. Zapewniam, że w przypadku zachodniej kukurydzianej stonki korzeniowej nie obowiązuje już rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 kwietnia 2007 roku, które utraciło moc prawną po czterech miesiącach, tj. 21 sierpnia 2007 roku. Wydawane w tamtym czasie rozporządzenia były powodowane koniecznością regulacji postępowania ze stonką kukurydzianą ze względu na jej obecność na liście szkodników kwarantannowych. Gatunek ten nie podlega obowiązkowemu urzędowemu zwalczaniu od 2014 roku. Uwagę w tym podrozdziale zwracają liczne błędy literowe, które nie powinny się zdarzać w takiej liczbie w pracy doktorskiej. Przykładowo, nieprawidłowo podawane są nazwy: zmienika lucernowca (str. 24), Miridae (str. 24), Chrysomelidae (str. 25), śmietki kielkówki (fot. 7), lyszczynkowate (str. 21), Aphidoidea (str. 16), itd.

W kolejnym podrozdziale (pkt. 2.3) Przeglądu literatury Doktorantka w kilku zaledwie zdaniach opisuje zagrożenie kukurydzy ze strony patogenów grzybowych. Nie zgodzę się, że patogeny m.in. z rodzaju *Trichoderma* czy *Ulocladium*, należą do zagrożeń, które należy wymienić w pierwszej kolejności jako najbardziej groźne dla upraw kukurydzy. W wykorzystanym przez Autorkę źródle (Rataj-Guranowska i Frąckowiak 2006) patogeny te były wyizolowane jako występujące na kukurydzy, co nie znaczy, że stanowiły poważne zagrożenie. Obok wspomnianych w następnej kolejności patogenów z kompleksu *Fusarium* do najważniejszych należałoby zaliczyć również *Pythium* sp., *Ustilago maydis*, *Sphacelotheca reiliana*, *Aureobasidium zeae*, *Helminthosporium* sp., *Puccinia sorghi*. Podobnie, nie do końca zrozumiałe jest dlaczego wymienione są tylko fumonizyny jako mykotoksyny pojawiające się na kukurydzy za sprawą grzybów, gdyż równie dobrze mogą to być aflatoksyny, ochratoksyny deoksynivalenol czy zearalenon.

W kolejnym punkcie 2.4, Doktorantka opisuje liczne wady i zalety stosowania chemicznych środków ochrony roślin. Rozumie potrzebę stosowania pestycydów, ale jednocześnie zwraca uwagę na szereg negatywnych konsekwencji np. wykształcanie odporności przez szkodniki na substancje czynne najpopularniejszych środków. W niektórych miejscach przydałoby się jednak nieco zaktualizować dane dotyczące zarejestrowanych środków. Zmiany jakie następują w tym zakresie zachodzą bardzo dynamicznie, a więc przykładowo podawane za Malinowską (2015 rok) dane dotyczące liczby zarejestrowanych środków zdecydowanie nie można już uznać za aktualne. Nieaktualne dane dotyczą również środków do zwalczania mszyc i omacnicy prosowianki. Nie bardzo wiadomo też o jakim unijnym przeglądzie substancji czynnych Autorka pisze w następnym akapicie, gdyż brakuje w tym miejscu stosownego cytowania.

W następnej części Przeglądu literatury Doktorantka nawiązuje do sedna tematu pracy, czyli do lotnych związków organicznych. Charakterystykę tych związków, a następnie cis-jasmonu i jasmonianu metylu, uważam za bardzo dobry fragment omawianego rozdziału. Widać, że Autorka, zapewne z racji przeprowadzonych badań, bardziej utożsamia się z naturalnymi mechanizmami obronnymi roślin niż z polową uprawą kukurydzy i zagrożeniami ze strony szkodników i patogenów chorobotwórczych. W interesujący sposób wskazuje na olbrzymią różnorodność naturalnych mechanizmów obronnych funkcjonujących w przyrodzie. Daje do zrozumienia, że chemia roślin i powiązania z owadami dają niezliczone możliwości na wykorzystanie tej wiedzy w praktyce. Uważam, że badania podjęte przez Doktorantkę poszerzają zasób wiedzy z tej dziedziny, a ośrodek bydgoski jest jednym z niewielu w kraju zajmujących się przedstawianą tematyką. Analiza interakcji biochemicznej między rośliną żywicielską a fitofagami pozwala wykorzystać poznane zależności w nowoczesnej ochronie roślin. W odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne rośliny wydzielają bukiety zapachów, które spełniają określone cele i często mają charakter obronny na przykład przyczyniając się do zwiększenia odporności roślin. Wykorzystanie lotnych związków organicznych do przywabiania wrogów naturalnych szkodników może być bezpośrednią korzyścią i alternatywą dla chemicznej ochrony roślin.

Generalnie, Przegląd literatury napisany został w sposób rzeczowy, z wykorzystaniem bogatej, aktualnej literatury tematu, wystarczająco przygotowując czytelnika do zrozumienia pracy badawczej, co wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki do prowadzenia badań. Rozdział Przegląd literatury liczy 28 stron i wzbogacony jest licznymi fotografiami.

W dalszej kolejności (pkt. 2.7), Doktorantka prawidłowo sformułowała hipotezy badawcze. Moim zdaniem, ten krótki fragment powinien jednak znaleźć się w jednym miejscu z celem badawczym w końcowej części Wstępu. Doktorantka na przemian używa nazwę cis-jasmon oraz Z-jasmon, a czasem także (Z)-jasmon, wkładając „Z” do nawiasów.

Powinna ujednoczyć nazewnictwo tego związku w całej pracy. W celu jest cis-jasmon, ale w hipotezach już (Z)-jasmon, może to być mylące dla niektórych czytelników.

Mgr Anita Krasieńska badania do swojej pracy doktorskiej przeprowadziła w warunkach laboratoryjnych, w latach 2013-2015, w laboratorium oceny jakościowej i ilościowej lotnych związków organicznych w Katedrze Entomologii i Fitopatologii Molekularnej ówczesnego Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Analizy chromatograficzne wykonano na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Poszczególne etapy badań obejmowały: uprawę laboratoryjną kukurydzy odmiany Proсна, ekspozycję roślin na działanie jasmonianu metylu (JM) i Z-jasmonu (Z-J) oraz zbieranie lotnych związków organicznych (LZO), a także oznaczenie pobranych LZO przy wykorzystaniu chromatografu gazowego ze spektrometrią mas. Uzyskane dane liczbowe zweryfikowano statystycznie używając właściwych do takich obliczeń m.in. wielowymiarowej analizy wariancji (MANOVA) oraz jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a wyniki przedstawiono na wykresach pudełkowych zamieszczonych w aneksie. Również pozostałe obliczenia wykorzystane do zweryfikowania hipotez uważam za odpowiednio dobrane.

Rozdział Materiał i metody badań został przygotowany właściwie, w sposób bardzo przejrzysty. Sposób postępowania został również wystarczająco zaprezentowany na podstawie informacji podanych w tabelach oraz na schematach. Na uznanie zasługuje własnoręczne stworzenie czytelnej infografiki pokazującej schemat przeprowadzonych działań. W ten sposób łatwiej jest zrozumieć przeprowadzone czynności nawet laikowi. Uważam, że zastosowana metodyka pozwoliła na realizację zamierzonego celu badawczego i uzyskanie miarodajnych danych weryfikujących przyjęte hipotezy.

Rozdział Wyniki jest stosunkowo krótki i liczy 3 podrozdziały obejmujące 15 stron, ale należy pamiętać o zamieszczonych w aneksie 32 rycinach ilustrujących zebrane wyniki. W pierwszej części – analizie chromatograficznej, Doktorantka zidentyfikowała 15 różnych lotnych związków organicznych, wymienionych łącznie zarówno w przypadku aplikacji jasmonianu metylu, jak i Z-jasmonu, dla wszystkich kombinacji doświadczenia. W kolejnych dwóch podrozdziałach, oddzielnie wykazała wpływ jasmonianu metylu oraz Z-jasmonu, którymi traktowała rośliny kukurydzy na wydzielanie LZO dla wszystkich kombinacji/dni, na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji. Jasno wypunktowane zostały kombinacje z istotnymi różnicami między poszczególnymi wariantami aplikacji tych związków, w określonych fazach rozwojowych roślin oraz w stosunku do roślin kontrolnych (nie poddanych testom). Brakuje bardziej dokładnego opisu uzyskanych wyników w poszczególnych podrozdziałach, w przypadku niektórych danych trzeba się domyślać o jakie czynności chodziło. Ogólnie, wyniki badań zostały szczegółowo i poprawnie opracowane oraz poparte bogatym materiałem dowodowym, przedstawionym na rysunkach i w tabelach.

Dyskusja wyników to dobrze opracowany fragment pracy, który pokazuje umiejętność analitycznego myślenia mgr Anity Krasieńskiej. Została ona przygotowana w oparciu o bogatą literaturę i prowadzi do właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Jest rzeczowa, bez szerokiego nawiązywania do poruszanego problemu. Doktorantka podaje bardzo dużo przykładów pozytywnego oddziaływania fitohormonów na zmniejszenie stresów u różnych gatunków roślin powodowanych m.in. patogenami chorobotwórczymi lub szkodnikami. Na tym tle pokazuje też pozytywną stronę wyników uzyskanych w badaniach własnych. W niektórych fragmentach tego rozdziału należy żałować tylko, że znalazła tak niewiele prac dotyczących kukurydzy, choć dopuszczam myśl, że takich badań po prostu jeszcze nie było.

Doktorantka prawidłowo sformułowała 7 wniosków płynących z przeprowadzonych przez siebie badań. Wskazała w nich precyzyjnie, że osiągnięciem pracy jest identyfikacja 15 lotnych związków organicznych po aplikacji elicytorów. Stwierdza, że LZO zielonego liścia były emitowane przez rośliny kukurydzy niemal natychmiast po pojedynczej aplikacji elicytorów, a największa emisja nastąpiła w trzecim dniu po aplikacji. Jasmonian metylu

powodował silniejszą reakcję roślin w porównaniu do Z-jasmonu, co objawiało się silniejszą produkcją LZO. Ponadto, ponowna aplikacja elicytorów w dniu poprzedzającym dzień „3”, „6” i „9” wpływała na zwiększoną emisję związków. W przypadku roślin kontrolnych, czyli bez aplikacji jasmonianu metylu i Z-jasmonu, stwierdziła tylko minimalne ilości lotnych związków. Na podstawie wzmożonej emisji LZO, zwłaszcza po ponownej aplikacji elicytorów Doktorantka dowodzi wystąpienia zjawiska primingu. W krótkim wniosku ogólnym stwierdza, że oba elicytory, JM i Z-J pobudzają mechanizm obronny kukurydzy. Na tej podstawie można zastanawiać się w jaki sposób pobudzony mechanizm obronny będzie chronił roślinę przed stresami powodowanymi przez czynniki różnego pochodzenia. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie w trakcie publicznej dyskusji, konsekwencji swoich odkryć dla roślin uprawianych na dużych plantacjach. Przeprowadzone badania wskazują, że naturalne mechanizmy obronne roślin można wzmocnić stosując jasmonian metylu i Z-jasmon. W dyskusji należy ocenić na ile jest to możliwe do zastosowania we współczesnym rolnictwie, mam bowiem wrażenie, że mimo licznych badań i jasnych wyników niewiele z nich udaje nam się spożytkować w praktycznej produkcji roślinnej.

Autorka w pracy powołuje się łącznie na 197 pozycji literatury. Właściwie wszystkie cytowania zaczerpnięte są z prac opublikowanych w XXI wieku. Wskazuje to, że podjęte badania są zgodne z najnowszymi trendami nauki. Zgromadzona bogata literatura, głównie zagraniczna, jest prawidłowo i trafnie cytowana. Można stwierdzić, że zebrano najważniejsze krajowe i światowe piśmiennictwo dotyczące tematu badań. Świadczy to dobrze o dociekliwości naukowej Doktorantki i pozwala na właściwą interpretację uzyskanych wyników.

W całej pracy Doktorantka nie ustrzegła się licznych drobnych błędów literowych, stylistycznych, technicznych. Można je łatwo zauważyć w każdym rozdziale. Oprócz wykazanych już wcześniej, można zauważyć błąd wydawniczy również w tytule pracy, gdzie zamiast elicytorów pojawia się słowo elitycitory. W tytule powtórzonym w streszczeniu (str. 68), cytowane słowo jest już napisane poprawnie, ale pojawił się nowy błąd, tj. brakło litery „n” w słowie indukcja. Niedociągnięcia te, nie wpływają na wartość merytoryczną osiągnięcia, ale w tego typu opracowaniu zdecydowanie powinno się włożyć nieco więcej staranności w jej przygotowanie.

PODSUMOWANIE I WNIOSK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Anity Krasieńskiej merytorycznie mieści się w obszarze nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Została wykonana poprawnie pod względem metodycznym, a wartość uzyskanych wyników oceniam wysoko. Rozprawa ma duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne w ochronie roślin, a założony cel badań został osiągnięty. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz dowodzi dużej wiedzy Doktorantki w zakresie nauk rolniczych. Wykazane niedociągnięcia nie zmniejszają wartości naukowej pracy. Uważam, że przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie naukowej rolnictwo i ogrodnictwo oraz spełnia warunki określone w art. 13.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami), w związku z art. 179.2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 rok Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Anity Krasieńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. inż. Jacek Twardowski, prof. uczelni

JTwardowski