

Lublin, 04.04.2014

dr hab. Magdalena Frąc, prof. IA PAN
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Anny Adamiak

pt. „Ocena porażen grzybowych jablek metodą biospeckli”

1. Ocena problematyki badawczej rozprawy

Grzyby strzępkowe stanowią jeden z ważnych czynników powodujących choroby przechowalnicze jablek, które mają duże znaczenie gospodarcze w Polsce i na świecie. Zanieczyszczone zarodnikami surowce mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów poprzez wytwarzane toksyczne metabolity (mykotoksyny). Dlatego też jednym ze sposobów zapobiegania rozwojowi tych mikroorganizmów podczas przechowywania jest prowadzenie monitoringu obejmującego jakość przechowywanego surowca oraz jego odpowiednie selekcjonowanie. Bezpieczeństwo konsumentów i środowiska związane z występowaniem porażen grzybowych jablek narzuca konieczność poszukiwania metod szybkiej oceny ich jakości. W tym celu niezwykle pożądane są przede wszystkim techniki proste i równocześnie niedestrukcyjne. Chociaż w ostatnich latach intensywnie rozwijane są techniki wykorzystujące światło laserowe (m.in. spektroskopowe i hiperspektralne oraz będąca przedmiotem niniejszej pracy, technika bazująca na zjawisku biospeckli) w celu monitorowania jakości surowców rolniczych, rozwój grzybowych chorób przechowalniczych stanowi nadal jeden z ważniejszych, wciąż nie rozwiązanych

problemów naszego kraju. Problem ten będzie narastał ze względu na wzrost produkcji i przechowywania jablek, zwłaszcza w celach eksportowych. Stawia to przed nauką poważne wyzwanie, dotyczące opracowania najlepszych i najskuteczniejszych w naszych warunkach metod szybkiej detekcji porażeń grzybowych, w celu zmniejszenia lub wyeliminowania strat ekonomicznych spowodowanych rozwojem tych patogenów.

Przedmiotem badań zaprezentowanych w dysertacji doktorskiej są zagadnienia dotyczące analizy porażenia grzybowego jablek przy użyciu metody biospeckli. Autorka testowała dwie hipotezy badawcze, z których pierwsza dotyczyła istnienia zależności między skalą rozwoju patogena na owocu a aktywnością biospeckli, druga zaś dotyczyła sprawdzenia, że metoda biospeckli umożliwia niedestrukcyjne i wczesne wykrycie porażenia grzybowego.

Biorąc pod uwagę powyższe względy oraz aktualne trendy jakości owoców uważam podjęcie przez Panią mgr Annę Adamiak badań ukierunkowanych na tą problematykę za celowe i w pełni uzasadnione.

2. Formalna analiza rozprawy

Tytuł ocenianej pracy doktorskiej jest precyzyjny i w pełni odpowiada jej treści. Praca stanowi opracowanie, zawierające 86 ponumerowanych stron tekstu łącznie z 32 rysunkami, zdjęciami i schematami, 4 tabelami oraz zestawieniem cytowanej literatury, obejmującej 109 pozycji (w większości z ostatnich 10-ciu lat), z czego większość to opracowania anglojęzyczne. Jej integralną częścią jest płyta CD zawierająca filmy biospecklowe oraz analizy LASCA dla jablek zdrowych i porażonych oraz grzybów. Praca ma postać klasycznej rozprawy naukowej, obejmującej 9 rozdziałów oraz dodatek i odpowiada układowi stosowanemu w rozprawach doktorskich. Dokumentacja wyników przygotowana została starannie. Wiarygodność dysertacji podnosi wszechstronna analiza statystyczna uzyskanych wyników.

3. Merytoryczna analiza pracy

Recenzowana praca dotyczy analizy porażenia grzybowego jablek przy użyciu metody biospeckli. Badania prowadzone były w warunkach eksperymentu

przechowalniczego i dwóch doświadczeniach modelowych, w których owoce inokulowane były zarodnikami grzybów patogenicznych w ściśle określonych miejscach. Ujęcie zagadnienia jest kompleksowe i wielowątkowe, co pozwoliło Autorce ocenić przydatność metody biospeckli w ocenie stopnia porażenia jablek oraz badaniach jakości tych owoców. Doktorantka wykonała również analizy zawartości związków fenolowych w tkankach porażonych jablek oraz określiła ogólną liczebność grzybów na podłożu Sabouraud z chloramfenikolem, oceniając skalę porażenia grzybowego jablek. Dodatkowe zastosowanie mikrospektroskopii Ramana oraz obrazowania biospecklowego umożliwiło ocenę mechanizmu porażenia owoców, wykazując szereg zależności pomiędzy porażeniem grzybowym a zmianami mikrostruktury tkanki jabłka.

W rozdziale „Wstęp” Autorka informuje o zagadnieniach stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej. Rozdział „Porażenia grzybowe jablek” składa się z 5 podrozdziałów, w których Autorka wykorzystując przegląd światowej literatury charakteryzuje wybrane choroby grzybowe, omawia ich patogenezę, zwraca uwagę na mechanizmy obronne i reakcje patofizjologiczne roślin, a także dokonuje oceny metod detekcji chorób roślin. W kolejnym rozdziale „Biospeckle”, składającym się z 4 podrozdziałów, Autorka opierając się na najnowszej literaturze bardzo dokładnie omawia teorie obrazowania plamkowego wraz z omówieniem układu pomiarowego, a także przedstawia ilościowe i jakościowe metody analizy danych. Koniec rozdziału stanowi omówienie zastosowania biospeckli w badaniach biomateriałów. Wymienione rozdziały świadczą, że Autorka zapoznała się z szeregiem wartościowych i ważnych dla Jej badań pozycji literaturowych i właściwie wykorzystala je do naświetlenia podjętej problematyki badawczej. Wymienione wyżej rozdziały zostały napisane starannie i uzasadniają celowość podjętych badań.

Cel i zakres pracy został jasno przedstawiony w odrębnym rozdziale, a zmierzał on do analizy porażenia grzybowego jablek przy użyciu metody biospeckli. Analizowane były 3 choroby przechowalnicze jablek (gorzka zgnilizna, mokra zgnilizna oraz porażenie grzybami *Alternaria* sp.). Cel badań postawiony został prawidłowo. Postawione hipotezy badawcze zweryfikowano w poprawnie pod względem metodycznym wykonanych 2 eksperymentach modelowych oraz jednym

doświadczeniu przechowalniczym. Mierzona aktywność biospeckli została odniesiona do zmian parametrów jakościowych jabłek, liczebności drobnoustrojów, zawartości związków fenolowych oraz zmian mikrostruktury porażonych tkanek.

Rozdział „Materiał i metody” jest napisany dość szczegółowo. W rozdziale tym scharakteryzowano schematy eksperymentów oraz omówiono zastosowane procedury badań: aktywności biospeckli, jędrności jabłek, indeksu jędrności, zawartości ekstraktu, zawartości suchej masy, liczebności mikroorganizmów, rozwoju mikroorganizmów na podłożu stałym, zawartości związków fenolowych oraz zmian mikrostruktury. W rozdziale zamieszczono również opisy wykonanych analiz statystycznych. Metody użyte w badaniach nie budzą zastrzeżeń oraz wskazują na dobre opanowanie przez Doktorantkę warsztatu badawczego i solidne przygotowanie do dalszej pracy.

Kolejny rozdział pracy to „Wyniki i dyskusja”, który jest na ogół napisany prawidłowo i precyzyjnie. Na podkreślenie zasługuje przejrzyste opracowanie wyników badań, w formie rysunków i czytelnych tabel oraz umieszczenie w pracy zdjęć obrazujących rozwój zmian chorobowych jabłek czy grzybów porażających owoce. Doktorantka w tej części pracy nie tylko skonfrontowała rezultaty badań z najnowszą literaturą przedmiotu, ale zauważyła również szereg zależności pomiędzy badanymi parametrami a rozwojem choroby grzybowej, wyjaśniła przyczynę wielu odnotowanych obserwacji oraz wysunęła przekonujące przypuszczenia i sugestie. Odpowiedziała na wiele pytań ważnych z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia, związanego z przechowywaniem owoców. Wszystko to wskazuje nie tylko na dobre przygotowanie literaturowe Doktorantki, ale również na umiejętność ustosunkowania się do uzyskanych rezultatów badań i ich przedyskutowania.

Autorka rozprawy trafnie sprecyzowała 5 wniosków, które kończą merytoryczną część pracy. Wnioski odpowiadają jednoznacznie na cel badań i są wyważone, co świadczy o dojrzałości naukowej Autorki rozprawy. Do najważniejszych wniosków zaliczam 1, 2 i 5. Rozprawę kończy staranne zestawienie piśmiennictwa.

Reasumując stwierdzam, że badania zostały wykonane prawidłowo pod względem metodycznym, a Doktorantka by je zrealizować musiała opanować

skomplikowaną technikę ich prowadzenia. Problematyka podjęta przez Doktorantkę jest ważna z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego. Wyniki są cenne i zasługują na ich szersze rozpropagowanie. Pod względem merytorycznym oceniam pracę bardzo wysoko. Niemniej jednak podczas czytania ocenianego opracowania nasunęło mi się kilka uwag, głównie natury dyskusyjnej, do których zaliczam:

- Niekonsekwencję w zapisie jednostek miar – nie zawsze stosowanie jednostek układu SI, np. zamiast „ml” powinno być „cm³”.
- Marginalne potraktowanie metod molekularnych we wstępnej kontroli surowców. Doktorantka podkreśliła, że nie mają one zastosowania „we wstępnej kontroli surowców, gdzie konieczna jest ocena dużej liczby próbek w jak najkrótszym czasie”, co nie jest prawdą ponieważ właśnie metody molekularne oparte na analizie DNA są bardzo czule, umożliwiają precyzyjną detekcję, nawet do gatunku patogennego mikroorganizmu, a przy tym są bardzo szybkie (wyniki możemy uzyskać w ciągu kilku godzin). Jediną wadą tych metod są koszty aparatury i odczynników, związane z opracowaniem metody, natomiast przy aplikacyjnym wykorzystaniu opracowanej metody i analizie znacznej liczby próbek np. w kontroli jakości surowca koszt wykonania badania jednej próbki jest znikomy, a nakłady pracy znacznie niższe niż przy stosowaniu tradycyjnych metod mikrobiologicznych.
- Brak powołania się na literaturę przy opisie niektórych metod analitycznych. Doktorantka zagadnienia te przedstawia wybiórczo.
- Badania przedstawione przez Doktorantkę dotyczą zmian liczebności grzybów na podłożu selektywnym Sabouraud z chloramfenikolem, dlatego też w tekście pracy sformułowania (zwłaszcza w odniesieniu do podrodziałów) takie jak: „liczebność mikroorganizmów” czy „liczebność drobnoustrojów” powinny zostać zastąpione powyższym sformulowaniem „liczebność grzybów” z podaniem informacji na jakim podłożu.
- Zastanawia także celowość użycia w doświadczeniu modelowym II innej odmiany jabłek niż w eksperymencie przechowalniczym i eksperymencie modelowym I. Dobrze byłoby opisując eksperyment modelowy II podać,

podobnie jak w doświadczeniu przechowalniczym, czym się kierowano dobierając odmianę jabłek do badań.

Powyższe uwagi są łatwe do usunięcia i nie wpływają na merytoryczną wysoką ocenę rozprawy doktorskiej, która pogłębia stan wiedzy z zakresu szybkiej detekcji porażeń grzybowych jabłek metodą biospeckli.

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawione dane dotyczące oceny formalnej, metodycznej i merytorycznej pracy doktorskiej Pani mgr Anny Adamiak, pt.: „Ocena porażeń grzybowych jabłek metodą biospeckli” stwierdzam, że rozprawa stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Duża znajomość literatury przedmiotu i opanowanie skomplikowanej techniki badawczej wskazuje na dobre przygotowanie Pani mgr Anny Adamiak do pracy naukowej. W świetle powyższych danych uważam, że praca doktorska autorstwa Pani mgr Anny Adamiak, wykonana pod kierunkiem dr. hab. Artura Zdunka, prof. IA PAN, spełnia ustawowe kryteria przypisane dysertacjom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na aktualność oraz rangę opracowanej problematyki i wyważone zaprezentowanie najważniejszych wyników stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. Magdalena Frąc, prof. IA PAN

Magdalena Frąc