

Dr hab. Krzysztof Waleron  
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej  
Wydział Farmaceutyczny GUMed  
krzysztof.waleron@gumed.edu.pl  
Tel. 608409922

Gdańsk 22.08.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Adama Przepióry zatytułowanej „Istotność wybranych elementów pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek (DsbA, DegP, DegS i FkpA) dla wirulencji i przetrwania warunków stresowych patogenu ziemniaka, bakterii *Dickeya solani*”, wykonanej w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Skórko-Glonek.**

Praca doktorska była wykonana w ramach grantu NCN z konkursu Opus 7 oraz Projektów Młodych Naukowców przyznawanych przez Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

Mokra zgnilizna i czarna nóżka to choroby wielu gatunków roślin uprawnych i ozdobnych powodowane przez grupę mikroorganizmów powszechnie nazwanych Soft Rot Pectobacteriaceae (SRP). To dość liczna grupa pektynolitycznych gatunków bakterii zaliczanych obecnie do rodziny *Pectobacteriaceae* a opisywanych i intensywnie badanych już od ponad 120 lat. Bakterie te posiadają doskonale rozwinięty aparat enzymatyczny, którego aktywność skierowana jest na degradację polimerów wchodzących w skład ultrastruktur komórki roślinnej takich jak pektyny, kwas poligalakturonowy, celuloza oraz inne polimery cukrowe. Mikroorganizmy te powodują poważne straty w wielkoskalowych uprawach, ziemniaków warzyw i wielu gatunków roślin ozdobnych uprawianych na całym świecie. Oprócz czynników naturalnych aktywność człowieka przyczynia się do szybkiego rozpowszechniania się tych patogenów w środowisku, które w korzystnych dla siebie warunkach powodują straty sięgające nawet 20-25% plonów. Grupa bakterii SRP charakteryzuje się znacznym potencjałem adaptacyjnym stąd łatwo zasiedla nowe nisze ekologiczne mimo odmiennych warunków klimatycznych, dlatego też bakterie te znajdują się na liście dziesięciu najniebezpieczniejszych fitopatogenów. Obiekt badań pana mgr inż. Tomasza Przepióry – gatunek *Dickeya solani* to jeden z przedstawicieli SRP, który został poniekąd wypromowany przez człowieka dzięki masowej produkcji materiału siewnego sadzeniaków ziemniaka i szybko rozpowszechniony w środowisku. W Polsce pojawił się on dopiero po otwarciu granic UE wraz sadzeniakiem ziemniaka najprawdopodobniej z Holandii.

Autor ocenianej rozprawy podjął się interesującego wyzwania mającego na celu określenie znaczenia wytypowanych, na bazie wiedzy zdobytej na innych modelach bakteryjnych, elementów periplazmatycznego systemu kontroli jakości białek wpływającego na zdolność do wzrostu i wirulencję *D. solani* w warunkach stresowych. Badania obejmują takie enzymy jak



oksydoreduktaza disiarczkowa DsbA, dwie proteazy DegP i DegS oraz izomeraza peptydylowo-prolinowa FkpA.

Stres jest nieodłącznym zjawiskiem towarzyszącym komórkom bakterii wegetującym na roślinie czy w środowisku glebowym a zdolność do zaadaptowania się do takich zmiennych warunków stanowi klucz do sukcesu w przetrwaniu i rozprzestrzenianiu się mikroorganizmu. Do najistotniejszych czynników stresowych należą, stres temperaturowy, oksydacyjny, zasolenia, stres osmotyczny. Zwykle jest to kilka czynników działających jednocześnie. Stąd Autor postanowił w swoich badaniach zastosować kombinację kilku czynników stresowych w prowadzonych doświadczeniach. Biorąc pod uwagę brak danych na temat roli periplazmatycznego systemu kontroli jakości białek na zdolność do wzrostu i wirulencję w warunkach stresowych u bakterii fitopatogennych podjęcie tej tematyki przez Doktoranta było w pełni zasadne. Badania Doktoranta objęły zasługujący na uznanie niezwykle szeroki zakres eksperymentów, z których wyniki doprowadziły do wielu interesujących konkluzji końcowych.

Modelowym organizmem z grupy SRP wybranym do projektu był szczep typowy *Dickeya solani* IPO2222 wyizolowany w Holandii w 2007 r. z ziemniaka, na którym prowadzono już wiele badań w tym opisano sekwencję genomu co stanowi dogodny punkt do stawiania nowych hipotez i ich weryfikacji. Jest to obecnie jeden z dominujących w Europie gatunków *Dickeya*, izolowany z ziemniaka, ale również hiacynta i irysa. Mikroorganizm ten bardzo wydajnie infekuje rośliny i charakteryzuje się niską wrażliwością na bakterie saprofityczne, wykazuje też wysoką przeżywalność w bulwach potomnych i sadzeniakach co stanowi o jego sukcesie środowiskowym. Wykazuje też 12 miesięczną żywotność w warunkach szklarniowych.

W oparciu o ten modelowy organizm realizując zamierzony cel Autor uzyskał szczepy pozbawione funkcjonalnych genów kodujących białka DsbA, DegP, DegS, FkpA, poprzez przerwanie ich ciągłości kasetą warunkującą oporność na antybiotyki.

Określił zmiany wrażliwości otrzymanych szczepów na czynniki stresowe: podwyższoną temperaturę, wysokie stężenia osmolitów (jonowych i niejonowych), obecność H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i niskie pH oraz kombinacje tych czynników.

Zbadał zdolność zmutowanych szczepów do infekowania oraz wywołania efektów chorobowych na modelach roślinnych, cykorii i ziemniaku.

Określił zmiany zdolności zmutowanych szczepów do biosyntezy i sekrecji wyznaczników wirulencji takich jak ruchliwość, aktywność enzymów degradujących ścianę komórkową CWDE oraz sekrecja sideroforów.

Wykonał analizy proteomu komórkowego i sekretomu dla uzyskanych mutantów, u których mutacja istotnie wpłynęła na fenotyp, w celu zidentyfikowania procesów komórkowych zależnych od systemu kontroli jakości białek w tym gatunku fitopatogena.

Podjęte badania ze względu na skalę wymagały znaczącego nakładu pracy, dobrze opanowanego warsztatu inżynierii genetycznej, szerokiej wiedzy biochemicznej i biegłości w pracy z bakteriami fitopatogennymi co zasługuje na szczególne podkreślenie. Doktorant



opracował modele badawcze, które mogą inspirować do dalszych eksperymentów co również jest warte zauważenia.

Rozprawa liczy 273 strony i ma typowy układ dla publikacji naukowych podzielonych na wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wykaz wykorzystanej literatury oraz suplement. Wstęp pracy zilustrowano 10 rycinami a część eksperymentalną udokumentowano łącznie 40 rycinami i 14 tabelami. Całość uzupełniają dwie tabele dokumentujące wyniki badań proteomicznych załączone na nośniku elektronicznym

Obszerny wstęp pracy obejmujący 68 stron został podzielony na 7 rozdziałów głównych. Pierwszy z nich obejmuje kompendium wiedzy w zakresie chorób wywoływanych przez bakterie z grupy SRP i współczesnych metod ich zwalczania bądź ograniczania. Tu moja uwaga *Enterobacterales* to jest ranga rzędu a nie rodzaju w taksonomii (str. 26). Drugi rozdział wnosi informacje dotyczące rodzaju *Dickeya*, klasyfikacji i identyfikacji tych bakterii a następnie koncentruje się na charakterystyce gatunku *Dickeya solani*. W kolejnych częściach wstępu Autor omawia fazy cyklu życiowego tego gatunku bakterii, wyznaczniki jego wirulencji w postaci rozbudowanego aparatu enzymatycznego, aparatu sekrecyjnego, mechanizmów regulujących te procesy, system sygnalizacji komórkowej. Brakuje mi tutaj omówienia procesu wesykularyzacji jako elementu sekrecji, który to proces jest potem wspomniany w dyskusji. Ostatni rozdział wstępu omawia zagadnienia odpowiedzi na czynniki stresowe i mechanizmy regulacyjne tych procesów, koncentrując się w końcowej części na charakterystyce elementów zaliczanych do systemu kontroli jakości białek będących obiektem niniejszych badań. Omawiając białko DegP Autor wspomina, że w niektórych gatunkach bakterii, przytaczając *Helicobacter pylori* jako przykład, samo białko DegP jest eksportowane poza komórkę bezpośrednio do otoczenia bądź wewnątrz pęcherzyków błonowych, potwierdzam jego obecność w pęcherzykach *Pectobacterium zantadeskiae*.

Kolejny rozdział, Materiały i Metody obejmuje standardowo wykaz wykorzystanych szczepów bakteryjnych, plazmidów, oligonukleotydów, roślin, antybiotyków oraz pożywek potrzebnych do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń. Część metodyczna pracy została opracowana szczegółowo. Opisana metodyka świadczy również o korzystaniu z wielu różnych technik mikrobiologicznych, biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwalających na weryfikację obserwowanych wyników i dokumentację dowodów potwierdzających obserwowane zjawiska. Było to spore wyzwanie wymagające pracowitości doświadczeń co zasługuje na dostrzeżenie.

Kolejny rozdział - Wyniki mimo, iż został opracowany szczegółowo i udokumentowany graficznie to czasem brak dokładniejszych opisów czy detali co zmusza czytelnika do poszukiwania informacji w innych częściach pracy. Przykładowo na str. 152 i 153 Autor pisze o – długotrwałej ekspozycji jednak nie podaje nigdzie czasu trwania tej ekspozycji.

W pierwszym podjętym zadaniu Autor wykonał optymalizację i kalibrację warunków doświadczeń prowadzonych w warunkach stresowych dla szczepu dzikiego tak by możliwa była w kolejnych etapach analiza porównawcza z wykorzystaniem szczepów zmutowanych. Wykonał analizy tempa wzrostu w warunkach normalnych i stresowych oraz określił żywotność komórek wyznaczając CFU, wykonał testy integralności błon komórkowych korzystając z testu rozróżniającego żywe i martwe komórki. Ta część eksperymentów pozwoliła na ustalenie zakresu temperatur dla dalszych doświadczeń, warunków stresu osmotycznego jonowego i niejonowego w hodowli płynnej i na podłożach stałych i płynnych



a następnie warunków dla badania stesu kwasowego i utleniającego jak również kombinacji obydwu tych czynników. Badania zostały wykonane dla bakterii będących w fazie wzrostu logarytmicznego oraz w fazie stacjonarnej i pozwoliły na określenie odpowiednich parametrów do testowania szczepów zmutowanych.

Do tej części mam kilka uwag technicznych. Wykresy ilustrujące pomiar gęstości optycznej jak również ilustrujące ilość CFU powinny być wykonane w tej samej skali co pozwoliłoby na łatwiejszą interpretację wyników. Ta uwaga właściwie dotyczy też wykresów kolejnych pomiarów w następnych rozdziałach. Porównując wzrost bakterii w kontrolach poszczególnych doświadczeń zaintrygowało mnie, że w eksperymencie badającym wpływ stresu oksydacyjnego udokumentowanym na rycinie 16, bakterie w kontroli, po piątej godzinie pomiarów, dzieliły się ewidentnie wolniej, delta OD w zakresie 0,04 do 0,1, niż w innych doświadczeniach np. dotyczących temperatur (rycina 12) delta OD w zakresie 0,35 do 0,7 czy podobnie rycina 21. Czy nie zaniepokoiło to Autora, że być może w tym doświadczeniu mamy jakiś dodatkowy nieoczekiwany efekt inhibicji podziałów komórkowych, który może wpłynąć na interpretację wyniku? W badaniu proteomu nie obserwowano deficytu białek eliminujących reaktywne formy tlenu. Prosiłbym o komentarz w tej kwestii.

Kolejna część pracy koncentrowała się na uzyskaniu szczepów pozbawionych białek oksydoreduktazy disiarczkowej DsbA, proteaz DegP i DegS i izomerazy peptydylowo-prolinowej FkpA poprzez przerwanie ich ciągłości kasetą warunkującą oporność na antybiotyki. Uzyskanie odpowiednich mutantów przebiegało dwuetapowo z wykorzystaniem jako gospodarza pośredniego szczepu innego gatunku *Dickeya dadantii*, w którym mutanty w wymienionych genach skonstruowano metodą rekombinacji homologicznej a następnie z wykorzystaniem procesu transdukcji fagiem litycznym  $\phi$ EC2 geny z przerwana ciągłością przeniesiono do szczepu *Dickeya solani* IPO2222. Dodatkowo dla szczepu *D. solani* dsbA::cm skonstruowano szczep komplementacyjny.

W tej części wyników zracam uwagę na błąd w opisie na rycinie 19 opisane wielkości plazmidów nie zgadzają się z wzorcem.

Dysponując zestawem szczepów z unieczynnionymi genami białek SKJB Autor przystąpił do zasadniczej części swojej pracy. Wykazał, że wprowadzone mutacje nie wpływają na profil wzrostu w warunkach normalnych w porównaniu do szczepu dzikiego a następnie zbadał jak poszczególne mutanty zachowują się w warunkach stresu termicznego, osmotycznego jonowego i niejonowego, stresu oksydacyjnego oraz kwasowego. Ta część doświadczeń doprowadziła do wniosku, że brak białek DsbA, FkpA DegP w komórce nie wpłynął na wzrost zmutowanych szczepów w warunkach stresu, co Autor tłumaczy kompensacyjnym działaniem pozostałych czynników SKJB.

Badanie wpływu mutacji na skuteczność infekcji i wywołanie objawów chorobowych prowadzono na modelach roślin: liścia cykorii, bulw ziemniaka oraz roślin ziemniaka hodowanych w kulturze *in vitro*. Ta część doświadczeń doprowadziła do wniosku, że najsilniejsze efekty wprowadzonych mutacji zaobserwowano na liściach cykorii. Wszystkie mutanty wykazywały obniżoną zdolność do macerowania liści cykorii a najsilniejszy efekt wykazywał mutant w genie *dsbA*. Obniżenie zdolności do macerowania bulw ziemniaka i spadek infekcyjności w testach *in planta* wykazały mutanty w genach *dsbA* i *degS*. W celu



wyjaśnienia przyczyny obserwowanego obniżenia wirulencji Autor określił zdolność zmutowanych szczepów bakterii do wytwarzania funkcjonalnych czynników wirulencji: obecność enzymów degradujących ściany komórkowe gospodarza, ruchliwości komórek oraz wytwarzanie sideroforów. Spośród zbadanych mutantów jedynie szczep *D. solani* DsbA::cm charakteryzował się spadkiem aktywności pektynaz i celulaz, co może świadczyć o ograniczonej zdolności do wydzielania tych enzymów poza komórkę. Szczep ten charakteryzował się również obniżeniem zdolności do pływania i pełzania, oraz obniżoną zdolnością do chelatowania jonów żelaza w testach płytkowych.

W tej części pracy według mnie brakuje doświadczenia badającego aktywność pektynaz i celulaz w lizatach komórek weryfikującego czy te enzymy były syntetyzowane w komórce na porównywalnym poziomie jak w typie dzikim a zaburzone było jedynie ich wydzielanie, czy też zmiana była już na poziomie syntezy enzymów. Badanie proteomu nie przyniosło odpowiedzi na to pytanie. Czy według Autora brak funkcjonalnego genu *dsbA* wpływa na aktywność białka czy na ilość wydzielanego enzymu? Proszę Autora o ustosunkowanie się do tej kwestii, bo nie jest to precyzyjnie określone w pracy.

W przypadku eksperymentów związanych z ruchliwością bakterii, interpretację opisywanych obserwacji utrudnia fakt słabej jakości dokumentacji fotograficznej, co sam Autor też komentuje. Obecnie powszechnie dostępny jest sprzęt fotograficzny umożliwiający wykonanie satysfakcjonującej jakości fotografii, tym bardziej że nie były to obserwacje labilnych oddziaływań czy krótkotrwałych efektów. Zatem można było dopracować warunki dla dobrej jakości fotografii.

Chciałbym w tym miejscu poprosić Doktoranta o skomentowanie i przedyskutowanie swojego doświadczenia w świetle niedawno opublikowanej pracy autorstwa Roberta Gatty z zespołu Prof. Michała Obuchowskiego zatytułowanej „Influence of glucose on swarming and quorum sensing of *Dickeya solani*” <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263124>, w której autorzy zauważyli, że objętość pożywki ma istotny wpływ na ruchliwość komórek w układach eksperymentalnych.

Bardzo ciekawą część doświadczeń wykonanych przez Doktoranta, stanowi analiza proteomu i sekretomu szczepu *Dickeya solani* pozbawionego funkcjonalnego genu *dsbA* w odniesieniu do szczepu dzikiego. Badanie to rzuciło nowe światło na poczynione do tej pory obserwacje i mechanizmy, w których uczestniczy białko DsbA.

W analizie proteomu Autor wytypował 45 białek o istotnie zmienionym poziomie w proteomie mutantu. W tej grupie znalazły się białka uczestniczące w chemotaksji i ruchliwości z dominującą tendencją spadkową natomiast obserwowano wyraźnie podwyższony poziom białek związanych z odpowiedzią na stres zależny od czynników sigma E, Cpx i Rcs a także wzrost poziomu niektórych białek związanych z metabolizmem, dostarczaniem energii, siły redukującej czy prekursorów biosyntezy. Interesującą obserwacją jest wzrost poziomu białek związanych z odpowiedzią na stres w obrębie cytoplazmy, który może dowodzić, że brak aktywnego białka DsbA ma wpływ na funkcjonowanie całej komórki. Oznaczałoby to, że komórka jest właściwie w stanie permanentnego stresu. O czym Autor pisze również w dyskusji. Zdziwiający jest fakt, że zaburzenie to właściwie nie wpływa znacząco na tempo podziałów komórek co było weryfikowane na początku pracy. Chciałbym dowiedzieć się czy Autor ma na to swoją hipotezę?



Doktorant obserwuje również, że brak białka DsbA powoduje spadek ruchliwości jak ta obserwacja ma się do obserwowanej obecności bakterii w wiązkach rośliny w eksperymencie *in vitro*, w którym analiza liczebności bakterii zlokalizowanych w górnych partiach roślin nie wykazała różnic pomiędzy mutantami a szczepem kontrolnym.

Dołączę tu jeszcze interesującą, do dyskusji w trakcie obrony, informację z pracy Kulp et al. (2015) Genome-Wide Assessment of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli*. PLoS ONE 10(9): e0139200. doi:10.1371/journal.pone.0139200. W pracy tej przebadano mutanty kolekcji KEIO *E. coli* pod kątem zaburzenia wesykularyzacji. Dla mutantów w genie *dsbA*, zanotowano spadek wesykularyzacji. Bardzo interesujące byłoby sprawdzenie jak to wygląda w szczepie *Dickeya*. Dodam też, że mutacja w genie *degP* powoduje wzrost, zaś w genach *dsbA* oraz *fkpA* spadek intensywności wesykularyzacji w badanym szczepie *E. coli*. W przypadku omawianej pracy pewnych informacji mogłaby udzielić mikroskopia elektronowa, ale też izolacja pęcherzyków błonowych i zbadanie ich zawartości białkowej. Byłby to wtedy pełniejszy obraz sekretomiu *Dickeya solani*.

Badanie sekretomiu *D. solani*, przyniosło równie interesujące obserwacje i wytypowanie znacznie większej liczby bo 183 białek, których poziom różnił się pomiędzy szczepem zmutowanym *D. solani dsbA::cm* a szczepem dzikim. Odnotowano spadek enzymów z grupy PCWDE takich jak liazy PGA, liazy pektynowej, metyloesterazy pektynowej i innych. Istotny był spadek poziomu białek zaangażowanych w budowę wici, a także wzrost poziomu białek cytoplazmatycznych. Obserwacje te Autor interpretuje jako zaburzenia integralności błon, co zostało poniekąd potwierdzone w odrębnym doświadczeniu badania wrażliwości komórek na niskie stężenia SDS. Mam jednak uwagę do tego doświadczenia. Pomiar spadku OD czyli efekt lizy komórek Autor wykonał w ciągu 10 minut w dwuminutowych odstępach czasowych, rycina 50 panel A i B. Wykresy te obrazują również lizę komórek typu dzikiego z mniejszą intensywnością, ale bakterie te również lizują. Niezrozumiałe dla mnie jest, dlaczego? Skoro liza następowała bardzo szybko, to dlaczego w kolejnym eksperymencie Autor dokonuje pomiaru po 1 godzinie i po 4 godzinach uzyskując już efekt podobnego wybarwienia komórek i zbliżonej skali uszkodzenia obydwu błon zarówno w kontroli jak i w komórkach szczepu zmutowanego - powyżej 80% komórek? Proszę Doktoranta o komentarz dotyczący interpretacji i wykonania tego eksperymentu.

Dyskusja wyników podsumowuje i scala wszystkie wątki pracy i świadczy o dobrej wiedzy Doktoranta w zakresie prowadzonych badań. Ta część pracy została przeprowadzona na tle bogatego zestawu literatury. Załączony w rozdziale Literatura wykaz cytowanych prac obejmuje ponad 300 pozycji dobrze dobranych dla przedyskutowania obserwowanych procesów i aktualnych dla opisywanej tematyki badawczej.

Chciałbym powrócić w tym miejscu do zagadnień związanych z sekretomem omawianych w dyskusji. A konkretnie do niestabilności błon, jeśli mutacja w genie *dsbA::cm* zwiększa niestabilność błon to powinno to wpłynąć pozytywnie na intensywność wydzielania pęcherzyków błonowych. Jednakże hipoteza ta jest sprzeczna z obserwacjami opisanymi dla mutantów w genie *dsbA E. coli*. Ciekawy jestem komentarza Doktoranta w tej kwestii.

Doktorant przedstawia kilka hipotez wyjaśniających obecność białek cytoplazmatycznych w sekretomie, ja skłaniałbym się do hipotezy, że są one wydzielane szlakiem pęcherzyków błonowych. Jeśli następuje liza komórek, jak sugeruje Autor, to miał on narzędzie, żeby to



zweryfikować. To czy białka w pęcherzykach błonowych są aktywne czy nie, w niektórych przypadkach jest także możliwe do zweryfikowania. Gorąco zachęcam do zbadania czy szlakiem pęcherzyków błonowych komórka może usuwać uszkodzone białka? Autor ma ciekawy model do zbadania tej hipotezy.

Odniosę się również do treści zawartych w podsumowaniu pracy.

Pierwsze zdanie jest nie precyzyjne, gdyż wrażliwość na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie została do końca udokumentowana. W mojej interpretacji można to odnieść jedynie do warunków kwasowych, gdyż w badaniach mutantów są nieco inne obserwacje niż w badaniach kalibracyjnych.

Natomiast odnosząc się do edycyjnej strony pracy, napotkałem trochę pomyłek literowych i drobne potknięcia edycyjne bądź nieścisłości językowe, z obowiązku recenzenta przytaczam kilka przykładów:

W streszczeniu Autor używa nieprecyzyjnych sformułowań pisze:

- „Podwyższenie” – czy to jest istotne statystycznie czy nie?
- „Nie wpływa znacząco” - istotnie czy nie istotnie?

Str 30: *Dickeya solani* po raz pierwszy w Polsce została wyizolowana i zidentyfikowana w 2005 a opisana w 2009, kiedy się pojawiła to dokładnie nie wiemy.

Wstęp str. 89: Innym przykładem pełnienia przez FkpA funkcji opiekuńczej jest wydzielanie przeciwciał. Co Autor miał na myśli?

Str 176: Jednostki aktywności enzymów oznaczane są dużą literą U.

Na stronie 184 zwrot dramatyczna redukcja zastąpiłbym bardziej pasującym sformułowaniem

Str 222: Biogeneza ściany komórkowej a integralność otoczki? otoczka jest inną ultrastrukturą co Autor miał tu na myśli?

Podsumowując przeprowadzone i opisane przez Doktoranta doświadczenia niewątpliwie wnoszą nowe informacje do ogólnej wiedzy na temat mechanizmów istotnych dla efektywnego funkcjonowania systemu kontroli jakości białek w komórkach fitopatogennej bakterii z gatunku *Dickeya solani*, znacząco też rozbudowują potencjał modelu badawczego.

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy zostały zawarte w publikacjach z pierwszym autorstwem Doktoranta w czasopiśmie branżowym *European Journal of Plant Pathology* oraz *International Journal of Molecular Sciences* w co potwierdza również jego wiedzę ekspercką w obrębie poruszanej tematyki badawczej.

## **Wniosek końcowy**

Na podstawie powyżej przeprowadzonej analizy pracy mogę stwierdzić, że Doktorant prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk biologicznych. Niewątpliwie wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska mgr inż. Tomasza Adama Przepióry stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Przedstawioną mi do oceny pracę doktorską oceniam wysoko, rozprawa spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 r., nr 65 poz. 595 z późn. zm.) a dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie mu stopnia doktora nauk biologicznych. Wnoszę więc do rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pana mgr inż. Tomasza Adama Przepióry do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

