



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: centr. 61 6550200, sekret. 61 6550255 Fax: 61 6550301 E-mail: office@igr.poznan.pl
www.igr.poznan.pl NIP: 781-16-21-455 REGON: 000326204

dr hab. Łukasz Stępień, prof. IGR PAN
Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Emila Stefańczyka
zatytułowanej: „Zróżnicowanie chorobotwórczych patogenów ziemniaka:
Phytophthora infestans (Mont.) de Bary i *Fusarium* spp.”,**

wykonanej w Zakładzie Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka Instytutu Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Młochowie,
pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Jadwigi Śliwki.

Badania opisane w przedstawionej do recenzji rozprawie zostały wykonane w ramach pięciu projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, realizowanych w latach 2012-2018, których spis został załączony na wstępie rozprawy. Tematyka realizowanych projektów była ściśle powiązana z przedmiotem pracy doktorskiej.

Zasadniczą częścią rozprawy jest zbiór trzech oryginalnych prac naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach o uznanej renomie:

1. Stefańczyk E., Sobkowiak S., Brylińska M., Śliwka J. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *European Journal of Plant Pathology* 145: 871-884

2. Stefańczyk E., Sobkowiak S., Brylińska M., Śliwka J. 2017. Expression of the potato late blight resistance gene *Rpi-phul* and *Phytophthora infestans* effectors in the compatible and incompatible interactions in potato. *Phytopathology* 107: 740-748
3. Stefańczyk E., Brylińska M., Brurberg M.B., Naerstad R., Elameen A., Sobkowiak S., Śliwka J. 2018. Diversity of *Avr-vnt1* and *AvrSmiral* effector genes in Polish and Norwegian populations of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 67: 1792-1802

Wszystkie prace są wieloautorskie, mgr Emil Stefańczyk był w nich pierwszym autorem, a w jednej dodatkowo autorem korespondencyjnym. Łączny współczynnik wpływu (Impact Factor) czasopism zgodnie z rokiem ukazania się artykułów to 6,817, a IF 5-letni wyniósł 7,28. Łączna liczba punktów MNiSW wyniosła 100. Z załączonych oświadczeń Doktoranta oraz współautorów wynika, że Jego wiodący wkład w przeprowadzone badania oraz powstanie prac jest bezdyskusyjny. Deklarowane procentowe udziały w poszczególnych pracach wynoszą odpowiednio 55% dla pierwszej pracy zestawu, 65% dla drugiej i 45% dla trzeciej. Wkład własny kandydata polegał m.in. na współudziale w przygotowaniu koncepcji badań, izolacji DNA i RNA, analizie ekspresji genów, przygotowaniu testów patogeniczności, uzyskiwaniu i obróbce sekwencji badanych genów, analizach statystycznych oraz interpretacji wyników i przygotowaniu publikacji. Można zatem stwierdzić, że warsztat badawczy opanowany przez Doktoranta jest szeroki i dobrany adekwatnie do osiągnięcia założonych celów. Mimo, że nie jest to przedmiotem oceny, chciałbym nadmienić, że dotychczasowy dorobek Doktoranta w mojej ocenie jest zdecydowanie wyróżniający, według bazy Web of Science Jego prace były cytowane już ponad 100 razy, a aktualny współczynnik H wynosi 5. Biorąc pod uwagę etap kariery naukowej, są to wartości wysokie.

Prace stanowiące trzon rozprawy zostały dodatkowo opatrzone zgrabnym i logicznie nakreślonym autoreferatem, w którym Pan mgr Emil Stefańczyk przedstawia istotne aspekty podjętej problematyki badawczej. Oddział IHAR-PIB w Młochowie od lat stanowi bodaj najważniejszy ośrodek badawczy w kraju zajmujący się kompleksowo zagadnieniami związanymi z hodowlą ziemniaka. Zespół Pani prof. Jadwigi Śliwki od wielu lat zajmuje się genetyką odporności tego gatunku na najważniejsze choroby, a także zróżnicowaniem obserwowanym w populacjach patogenów je wywołujących, mogąc się poszczycić w tym zakresie znaczącymi osiągnięciami.

Uprawa ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) stanowi ważną część rolnictwa zarówno w Polsce, jak i innych krajach, dostarczając m.in. surowca do przetwórstwa żywności, na cele paszowe oraz do bezpośredniej konsumpcji. Duże znaczenie gospodarcze tego gatunku pociąga za sobą zainteresowanie hodowców i naukowców czynnikami wpływającymi na zdrowotność roślin, a co za tym idzie jakość plonu. Nie powinny zatem dziwić wysiłki w celu ograniczenia strat związanych z chorobami wywoływanymi przez najważniejsze z patogenów ziemniaka. Z tego względu realizacja celów postawionych sobie przez mgra Emila Stefańczyka podczas przygotowania przedstawionej rozprawy, polegających m.in. na charakterystyce populacji gatunków *Fusarium* powodujących suchą zgniliznę bulw, oraz grzybopodobnego organizmu *Phytophthora infestans* powodującego zarazę ziemniaka, wydaje się jak najbardziej uzasadniona i potrzebna, a naukowego z punktu widzenia niewątpliwie wartościowa.

Choć pozornie połączenie w jednej pracy organizmów tak odmiennych zarówno fizjologicznie, jak i ekologicznie, może się wydawać przedsięwzięciem dość karkołomnym, klamrą spinającą przeprowadzone analizy jest gatunek gospodarza. Dzięki takiemu podejściu czytelnik otrzymuje pełniejszy obraz zagrożeń, jakim podlega roślina tak w trakcie sezonu wegetacyjnego, jak i podczas przechowywania bulw, które często bywa długoterminowe i nierzadko przeprowadzane w warunkach sprzyjających rozwojowi patogenów. Podoba mi się również bezstronna i ostrożna ocena aktualnego stanu wiedzy na temat poszczególnych sprawców chorób przedstawiona na końcu rozdziału „Wstęp” Autoreferatu. Świadczy ona o dojrzałości Doktoranta w formułowaniu potencjalnych hipotez czy kierunków badawczych.

W dalszej części Autoreferatu mgr Emil Stefańczyk przedstawił podstawowe informacje z zakresu różnorodności gatunkowej grzybów *Fusarium* izolowanych z porażonych bulw, zwracając uwagę na najczęstsze i kładąc nacisk na te występujące na terenie Polski. Następne rozdziały poświęcone są przeglądowi dostępnych metod identyfikacji gatunkowej grzybów z rodzaju *Fusarium* wraz z omówieniem ich zalet i ograniczeń oraz czynnikom wpływającym na rozwój suchej zgnilizny bulw. Przegląd ten zresztą jest wszechstronny i pokazuje m.in. słuszość przyjętej metodyki badań do oceny patogeniczności analizowanych izolatów grzybów, a także potencjalne źródło problemów pojawiających się podczas porównania obserwowanych wyników z danymi literaturowymi.

Rozdział dotyczący mykotoksyn przybliży czytelnikowi realne zagrożenie związane z infekcją grzybami *Fusarium*, a jednocześnie pokazuje mnogość czynników wewnętrznych i zewnętrznych wpływających na efektywność biosyntezy metabolitów wtórnych, która w konsekwencji może stwarzać trudności w interpretacji wyników w zależności od przyjętego modelu eksperymentalnego. W dalszej części Doktorant zagłębia się w tematykę genetycznych podstaw zdolności toksynotwórczych grzybów *Fusarium*, omawiając szlaki biosyntezy trichotecenów, zearalenonu, fumonizyn i heksadepsipeptydów, czyli *de facto* najważniejszych grup mykotoksyn dla tego rodzaju. Omawia główne geny odpowiedzialne za przekształcenia poszczególnych związków w końcowe toksyczne metabolity i można odnieść wrażenie, że czuje się w tym obszarze pewnie. W tym miejscu chciałbym odnieść się do zakresu badań przedstawionych w pierwszej pracy zestawu (Stefańczyk i in. 2016, EJPP). W moim odczuciu aż się prosi o przeprowadzenie analiz efektywności biosyntezy przynajmniej najistotniejszych mykotoksyn potencjalnie syntetyzowanych przez zidentyfikowane gatunki *Fusarium* w warunkach *in vitro*. Prosiłbym Doktoranta o odniesienie się do kwestii podczas obrony rozprawy, a konkretnie czy takie analizy były przeprowadzone lub czy są one planowane.

Kolejny rozdział dysertacji dotyczy sprawcy zarazy ziemniaka – *Phytophthora infestans* i został nieco inaczej skonstruowany, ale można to zrozumieć, skoro w tej części rozprawy nacisk został raczej przeniesiony na stronę rośliny, czyli działanie konkretnych mechanizmów odporności. Opisane zostały typy odporności horyzontalnej i wertykalnej oraz dotychczas zidentyfikowane i zmapowane geny główne, najczęściej wprowadzone do *S. tuberosum* z gatunków nieuprawnych. Wspomniane zostały także uzupełniające modele „strażnika” i „przynyty”. Chętnie usłyszałbym kilka zdań rozwinięcia tej teorii podczas obrony rozprawy.

Czytając rozdział dotyczący efektorów Oomycetes odniosłem wrażenie, że mógłby on zyskać dzięki krótkiemu wprowadzeniu w zagadnienie, którego mi osobiście zabrakło. Być może wystarczyłoby w tym celu nawet zamienienie kolejności podrozdziałów 3.3.2. i 3.3.3, gdzie działanie efektorów opisano w przystępny sposób na kilku przykładach. Proszę to jednak potraktować jedynie jako luźną uwagę. Rozdział dotyczący zmienności efektorów przedstawia mechanizmy leżące u podstaw unikania rozpoznania efektora przez produkt odpowiedniego genu odporności R, uzasadniając podjęcie badań opisanych w trzeciej publikacji z zestawu (Stefańczyk i in. 2018, Plant Pathol) i przy okazji zwracając uwagę na

analogiczne mechanizmy u innych przedstawicieli klasy Oomycetes. Bardzo ciekawym jest zagadnienie poruszone przez Doktoranta w ostatnim akapicie tegoż rozdziału, dotyczące działania zróżnicowanej presji selekcyjnej działającej na populacje patogenów o szerokim i wąskim zakresie gatunków gospodarzy. Byłbym wdzięczny za krótkie rozwinięcie tej myśli podczas obrony rozprawy.

Cel rozprawy został określony jasno i zwięźle. Cele szczegółowe sformułowano już specyficznie w nawiązaniu do prac wchodzących w skład zestawu publikacji, co jest oczywiście zrozumiałe. Przydałoby się dodatkowe zdanie lub dwa wyjaśnienia w przypadku części poświęconej grzybom *Fusarium*, ale wspominam o tym jedynie z sentymentu, jakim je darzę. Miałbym pewne wątpliwości co do pierwszej sformułowanej hipotezy naukowej, gdyż wydaje się być oparta na zbytnim uproszczeniu. Mianowicie została w niej pominięta wewnątrzgatunkowa zmienność grzybów *Fusarium*, i to zarówno jeśli chodzi o patogeniczność, jak i zakres oraz poziom wytwarzanych mykotoksyn. Chętnie widziałbym tę kwestię jako temat do dyskusji podczas obrony rozprawy doktorskiej, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że w dalszej części rozprawy Doktorant stwierdza, że hipoteza ta nie została potwierdzona. Od czego zatem może zależeć patogeniczność grzybów *Fusarium*, jeżeli nie od agresywności genotypów i/lub poziomu syntetyzowanych toksyn?

Rozdział „Materiały i metody” ze zrozumiałych względów zostały opisane w sposób zwięźły, jednakże zawiera wszelkie niezbędne informacje dotyczące zarówno uzyskanych izolatów, materiału roślinnego, jak i metod wykorzystanych w poszczególnych pracach wchodzących w skład zestawu. Podobnie ma się rzecz w przypadku rozdziału „Omówienie wyników”. Pozwolę sobie odnieść się do poszczególnych prac w dalszej części recenzji.

Podsumowanie uzyskanych wyników budzi we mnie mieszane uczucia. Jest to rozdział, który moim zdaniem można by zgrabnie połączyć z kolejnym, zawierającym wnioski wyciągnięte na podstawie uzyskanych wyników (w moim odczuciu jest to bardziej podsumowanie wyników niż wnioski). Odnoszę wrażenie, że część zawartych tu informacji została powtórzona przy okazji formułowania rozdziału z wnioskami. Proszę jednak potraktować tę uwagę jako typowo redakcyjną. Część opisową rozprawy kończy imponujący spis cytowanej literatury, obejmujący prawie 150 pozycji, w przeważającej większości angielskojęzycznych. Pod względem redakcyjnym praca jest przygotowana niezwykle

starannie. Autor używa pięknej polszczyzny, stroni od żargonu laboratoryjnego i tylko sporadycznie zdarzają się tzw. skróty myślowe.

Przechodząc do merytorycznej oceny osiągnięć mgra Emila Stefańczyka zawartych w pracach wchodzących w skład rozprawy chciałbym zaznaczyć, że lista moich pytań jest krótka, ponieważ główny wysiłek leżał po stronie niezależnych recenzentów decydujących o dopuszczeniu prac do druku. Może być również prawdopodobne, że pytania te dotyczą tej części wyników, która w załączonych pracach nie zostały zamieszczone.

W pierwszej pracy badano potencjalną zdolność do syntezy mykotoksyn analizując obecność charakterystycznych sekwencji genowo-specyficznych dla szlaków biosyntezy trichotecenów i zearalenonu. Choć w Autoreferacie opisano szerszy wachlarz dostępnych markerów toksynotwórczości, w pracy nie zamieszczono wyników dotyczących np. bowerycyny i eniatyn, które są syntetyzowane m.in. odpowiednio przez *F. oxysporum* i *F. avenaceum*. Prosiłbym też o przybliżenie aktualnej taksonomii gatunku *Fusarium tabacinum*, który został opisany już dość dawno temu, a w ostatnich pracach identyfikujących środowikowe populacje *Fusarium* gatunek ten się nie pojawia. Jak wspomniałem wcześniej, brakuje mi potwierdzenia toksynotwórczości izolatów w postaci analiz metabolitów choćby w kulturach *in vitro*. Z ciekawości mam pytanie dotyczące niezidentyfikowanego izolatu *Fusarium* (M93). Czy przeprowadzono jakieś dodatkowe analizy, by ustalić jego przynależność taksonomiczną?

Mam jedno pytanie dotyczące wyników zamieszczonych w drugiej pracy zestawu. Mianowicie na Figurze 3 przedstawiono zmiany w ekspresji genów kodujących efekторы dwóch szczepów *P. infestans* w teście infekcyjnym trzech genotypów ziemniaka. Wydaje się, że zmiany mogą zachodzić wcześniej, niż w czasie objętym badaniami (czyli 1-5 dni po infekcji). Czy podjęto próbę sprawdzenia, co dzieje się w czasie pierwszej doby po infekcji?

Chętnie usłyszałbym słowo wyjaśnienia na jakiej podstawie wybierano markery mikrosatelitarne do analizy zróżnicowania sekwencji genów *P. infestans* w ostatniej pracy zestawu. W pracy nie ma na ten temat wzmianki, podobnie w „Autoreferacie”. Pytam z czystej ciekawości, bo mogło to znacząco wpłynąć na obserwowaną zmienność. Ponadto, w Dyskusji pracy stwierdzono, że genotyp gospodarza może wyjaśniać wyższą zmienność

sekwencji genów efektorowych w polskich izolatach, niż obserwowaną w izolatach norweskich. Chciałbym prosić o rozwinięcie tej myśli ponad podane możliwe wyjaśnienie przedstawione w pracy.

Przechodząc do podsumowania kilka moich uwag i pytań, które zawarłem w niniejszej recenzji, nie umniejsza w żaden sposób wartości pracy, która jest według mnie wysoka i przygotowana w sposób rzetelny i interesujący dla czytelnika zarówno orientującego się w podjętej tematyce, jak i z nią niezwiązanego.

Konkludując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie o dopuszczenie mgra Emila Stefańczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lukasz Stępień