

**Recenzja pracy doktorskiej Pani magister Marty Janiszewskiej  
„Zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe izolatów *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary z  
ziemniaka *Solanum tuberosum* L.”**

*P. infestans* od wielu lat znacząco wpływa na produkcję ziemniaków w większości rejonów uprawnych świata w efekcie prowadząc do obniżania plonów i zwiększania kosztów produkcji poprzez konieczność stosowania fungicydów. Identyfikacja czynników warunkujących rozwój choroby wraz z analizą zróżnicowania genetycznego jak i fenotypowego może przynieść kluczowe informacje w opracowaniu strategii minimalizującej wpływ tego patogenu na produkcję ziemniaków. Powyższa problematyka została podjęta przez Panią mgr Martę Janiszewską, która uzyskane w toku wieloletnich badań wyniki przedstawiła w trzech, recenzowanych artykułach naukowych opublikowanych w trzech różnych wysokiej rangi czasopismach naukowych. Badania przedstawione w przedłożonej rozprawie doktorskiej zostały zrealizowane w Zakładzie Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka, IHAR-PIB Oddział w Młochowie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Jadwigi Śliwki. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska zawiera poprawną strukturę dla tego typu prac. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, cel badań, omówienie i podsumowanie wyników, obserwacje i wnioski, spis literatury, trzy publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia dotyczące udziału kandydata i współautorów.

**Za główne osiągnięcia niniejszej pracy doktorskiej uważam:**

- 1. Ocena zróżnicowania fenotypowego i genetycznego izolatów *P. infestans* pozyskanych z różnych pól w Polsce.**
- 2. Wykazaniu wpływu sposobu uprawy ziemniaka oraz warunków pogodowych na zróżnicowanie *P. infestans*.**
- 3. Zweryfikowanie specyficzności markerów PCR w celu oznaczania typów kojarzeniowych *P. infestans*.**

Wyniki badań niniejszej pracy doktorskiej zostały ocenione pozytywnie przez anonimowych recenzentów i w efekcie zostały opublikowane w formie trzech artykułów naukowych w renomowanych czasopismach naukowych. Z tego powodu moje uwagi i komentarze nie mogą mieć wpływu na ostateczne przedstawienie wyników w formie publikacji naukowej. Uważam, że wyniki pracy doktorskiej są bardzo cenne i w znaczący sposób przyczyniają się do zrozumienia zmienności fenotypowej i genetycznej *P. infestans* w Polsce, jak i do mechanizmów ją kształtujących. Na uwagę zasługuje włączenie do badań dużej liczby izolatów *P. infestans*. Zastosowane metody badawcze są „historyczne” co z pewnością skutkowało dużą pracochłonnością i czasochłonnością analiz. Zastosowanie tego typu metod ma zalety jak i wady. Z jednej strony można (co zresztą zostało w publikacjach dokonane) porównać wyniki z danymi opublikowanymi we wcześniejszych publikacjach. Z drugiej strony zastosowanie nowatorskich metod badawczych daje możliwość pozyskania nowych danych, które mogą

znacznie pogłębić nasz dotychczasowy stan wiedzy. W pracy doktorskiej brakuje mi wzmianki na temat nowoczesnych i najbardziej obiecujących metodach badawczych, które już choć w nielicznych publikacjach, mają zastosowanie w badaniach zróżnicowania *P. infestans* (Arafa i in., 2020, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221604>).

Przegląd literatury”, „Omówienie wyników” i „Podsumowanie wyników” zostały napisane w bardzo przystępny sposób. Duża porcja informacji podana w „Przeglądzie literatury” w bardzo przejrzysty sposób świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki na temat zgłębianej tematyki badawczej. Ogólne cele badawcze, cele szczegółowe jak i hipotezy badawcze zostały sformułowane w prawidłowy sposób z jednym wyjątkiem. Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem, że „Oceniono czy mroźne zimy wpływają na ograniczenie przetrwania grzybni *P. infestans* w polu”, dlatego że przedmiotem badań nie były próby gleby czy resztek roślinnych pozyskiwanych z pola po zimie. Sprawdzenie przetrwania zimy *P. infestans* wymaga analizy tego rodzaju prób pod kątem sprawdzenia żywotności patogenu. Z uwagi na powyższe, wniosek nr 5 w rozdziale „Obserwacje i wnioski” uważam za błędnie sformułowany. Niejasny jest też wg mnie wniosek nr 6. W pracy nie wykazano w jakim stopniu tempo mutacji i rekombinacja wpływają na zmienność genetyczną *P. infestans*. Z uwagi na ten fakt nie rozumiem na jakiej podstawie jest informacja we wniosku o trudnościach związanych z genotypowaniem i identyfikacją rekombinacji, która ma miejsce w Polsce, chociaż nie mogłem znaleźć w wynikach jednoznacznych na to dowodów.

Poniżej zamieszczam uwagi i komentarze do części eksperymentalnej, wyników i dyskusji zawartych w trzech recenzowanych artykułach naukowych i oczekuję, że Doktorantka ustosunkuje się do nich podczas obrony pracy doktorskiej:

Komentarze do publikacji: „**Potato cultivation system affects population structure of *Phytophthora infestans***”, Brylińska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E., Śliwka J., *Fungal Ecology* 20 (2016) 132-143. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.01.001>

Pracę opublikowano w roku 2016 w czasopiśmie *Fungal Ecology*. Doktorantka jest pierwszym autorem publikacji w skład której wchodzi łącznie czterech autorów. Publikacja przedstawia wyniki badań dotyczących wpływu systemu produkcji ziemniaka na strukturę populacji *P. infestans*. W celu zrealizowania celu badań przeprowadzono analizy na kolekcji 365 izolatów *P. infestans*, które polegały na zidentyfikowaniu typów kojarzeniowych, haplotypów mitochondrialnych, odporności na metalaksyl, oszacowaniu wirulecji oraz oznaczeniu zmienności genetycznej z zastosowaniem markerów SSR. Rozdział „Introduction” przedstawia w klarowny sposób problematykę badawczą, jednakże pewne fragmenty tekstu nie są dla mnie do końca zrozumiałe. Np. na stronie 133 pojawia się wzmianka o tym, że Polskie i Niderlandzkie populacje *P. infestans* różnią się. Nie jest dla mnie jasne dlaczego akurat Autorzy pracy powołują się na populacje z Niderlandów nie wspominając o danych z Niemiec. Jeśli takich brakuje to warto to zaznaczyć. Dalej cytując „The Polish *P. infestans* population, similar to the Nordic one, can reproduce sexually” rodzi wiele pytań. Czy w oparciu o uzyskane wyniki badań można zdefiniować populację Polską *P. infestans*? Populacja Nordycka jest pojęciem mało precyzyjnym i nawet trudno po tej nazwie określić, jakiego rejonu geograficznego (kraju) dotyczy.

Izolaty *P. infestans* pozyskano w ciągu trzech lat z trzech różniących się sposobem uprawy ziemniaka rejonów Polski, określanych w pracy jako: Młochów, Buchwała i Siedlce. Moim zdaniem publikacja powinna zawierać mapę przedstawiającą rejon z których pobierano próby. Brakuje ważnej informacji jaka jest odległość pomiędzy wyszczególnionymi rejonami. Na stronie 137 można jedynie odnaleźć mało precyzyjną informację o tym, że „...the distances between the regions are not great...”.

Różnice w systemach uprawy ziemniaka charakteryzujące poszczególne rejony zostały w pracy opisane w bardzo klarowny sposób. Atutem pracy jest duża (365) liczba analizowanych izolatów, jednakże brakuje metadanych, w szczególności informacji o nazwie kolekcji, miejscu i sposobu przechowywania, numerach akcesyjnych. W badaniach zastosowano dwie dawki metalaksylu w celu oszacowania odporności izolatów na ten fungicyd. Brakuje moim zdaniem wyjaśnienia jakie było kryterium wyboru dawek zastosowanego fungicydu do badań. Pozostała część rozdziału „Materials and methods” została opisana w sposób zwięzły i klarowny. Nie mam uwag do rozdziału „Results”, w którym wyniki opisano w bardzo zwięzły i klarowny sposób. W rozdziale „Discussion” brakuje źródła informacji wskazującego o wielokrotnym stosowaniu metalaksylu w rejonie Młochów. Analogicznie, nie podano również źródła informacji na temat wspomnianej mniej intensywnej ochrony fungicydowej ziemniaka w pozostałych rejonach uprawnych. W rozdziale tym są dalej podane dane na temat wzrostu stosowania metalaksylu w Polsce nie podając źródła tych informacji. Brakuje moim zdaniem istotnej informacji od kiedy ten fungicyd jest w Polsce stosowany oraz jak długo stosowany jest w rejonie Młochów. Dyskusja w dalszej kolejności obejmuje porównanie uzyskanych wyników badań z wynikami z innych europejskich rejonów uprawnych a także ze starszymi wynikami krajowymi. W wyniku tego porównania można wyciągnąć wniosek, że ewolucja *P. infestans* jest głównie determinowana systemem uprawy ziemniaka. Duże podobieństwo uzyskanych w pracy wyników z zacytowanymi badaniami z innych regionów Europy czy Chin wskazuje, że różnice w odmiennych geograficznie populacjach *P. infestans* mogą być niewielkie w przypadku podobnego systemu uprawy ziemniaka. Wyniki badań zatem potwierdzają te wcześniej opublikowane. Jednym z najbardziej ciekawych wyników tej publikacji jest wykazanie wysokiej zmienności genetycznej *P. infestans* oraz wskazanie na rekombinację jako potencjalne źródło tej zmienności. Ostatnie zdanie w rozdziale „Discussion” nie jest do końca dla mnie zrozumiałe i kończy dyskusję w trochę dla mnie nieoczekiwany sposób.

Uwagi i komentarze do publikacji: „**Evaluation of PCR markers for *Phytophthora infestans* mating type determination**”, Brylińska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E., Śliwka J., *Eur J Plant Pathol* **152**, 33–44 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1445-4>.

Pracę opublikowano w roku 2018 w czasopiśmie *Eur J Plant Pathol*. Doktorantka jest pierwszym autorem publikacji w skład której wchodzi łącznie czterech autorów. Publikacja przedstawia wyniki badań dotyczących oceny wiarygodności markerów PCR zaprojektowanych w celu identyfikacji typów kojarzeniowych *P. infestans*. Testowane w pracy markery PCR są historyczne, oparte na weryfikacji wyników na żelach agarozowych co składa się na dość dużą pracochłonność i czasochłonność tego typu badań. Na uwagę zasługuje duża liczba izolatów (172 izolaty *P. infestans* oraz 1 *P. andina*). Celem badań była walidacja różnych markerów PCR. Moim zdaniem termin walidacja jest niepoprawnie przytaczany w publikacji. Walidacja markera dotyczy nie tylko wykazania specyficzności metody, ale również innych parametrów takich jak poziom detekcji, powtarzalność, wykazanie występowania wyników fałszywych pozytywnych/negatywnych, itd. Głównym celem publikacji było moim zdaniem zweryfikowanie wiarygodności czy specyficzności markerów PCR do identyfikacji dwóch typów kojarzeniowych *P. infestans*. Analogicznie do mojego wcześniejszego komentarza, w publikacji nie podano metadanych co do krajowych izolatów *P. infestans*. Nie podano cytowania markera za pomocą którego zidentyfikowano genotyp US1. W rozdziale „Sequencing” podano, że „The W16 PCR products that were homogenous

after initial amplification were purified ....” co jest niezrozumiałe. Czy to oznacza jeden produkt na żelu agarozowym? Rozdział „Results” jest opisany nieco w trudny do interpretacji sposób. Składa się na to zastosowany podział na izolaty krajowe, te pozyskane z innych niż Polska rejonów uprawnych, oraz podział z uwagi na rok izolacji w odniesieniu do krajowych izolatów. Najbardziej jednak trudnym w interpretacji jest rozdział „Nucleotide sequences of marker W16”. Nie rozumiem stwierdzenia, że powtarzano sekwencjonowanie w powodu „heterogeneity of the products”. Brakuje informacji na temat długości przyrównania w wyniku którego utworzono drzewo filogenetyczne. Trudno zrozumieć zasadność utworzenia drzewa filogenetycznego. Moim zdaniem niewiele ta forma przedstawienia wyników wniosła, gdyż w publikacji brakuje nawiązania do tego drzewa w dyskusji. Uważam, że określanie pozyskanych sekwencji amplikonów allelami jest niepoprawne. Moim zdaniem bardziej precyzyjny opis tej części badawczej powinien dotyczyć określenia polimorfizmu czy identyczności pomiędzy uzyskanymi sekwencjami w oparciu o zidentyfikowany w pracy polimorfizm SNPs oraz indeli i przede wszystkim podkreślić już w wynikach, że niektóre z uzyskanych sekwencji nie charakteryzowały się oczekiwanym polimorfizmem. W publikacji nie podano numerów akcesyjnych GenBank analizowanych sekwencji. Rozdział „Discussion” w szczegółowy sposób łączy uzyskane wyniki badań z badaniami opisanymi we wcześniejszych publikacjach, co daje możliwość pełniejszego wglądu w podjętą w pracy tematykę badawczą. Można jednak odnieść wrażenie, że rozdział ten zawiera już opisane w wynikach badań informacje. Moim zdaniem brakuje tu próby choćby wyjaśnienia przyczyny związanej z fałszywymi wynikami markerów PCR zaprojektowanych do określania typów kojarzeniowych. Czy tego rodzaju niezgodności są typowe również w przypadku innych grup taksonomicznych? Najważniejszy przekaz w podjętej dyskusji jakim jest ukazanie zalet i wad testowania typów kojarzeniowych markerami PCR jest nakreślony w sposób bardzo wyraźny.

Uwagi i komentarze do publikacji: „**Population structure of *Phytophthora infestans* from a single location in Poland over a long period of time in context of weather conditions**”, Janiszewska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E., Śliwka J. , *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01630-6>.

Pracę opublikowano w roku 2020 w czasopiśmie *Microbial Ecology*. Doktorantka jest pierwszym autorem publikacji w skład której wchodzi łącznie czterech autorów. Publikacja przedstawia ciekawe wyniki badań gdzie przedmiot analiz stanowiła duża liczba (237) izolatów pozyskanych przez okres 15 lat z jednego pola uprawnego gdzie nie stosowano ochrony fungicydowej. W badaniach zastosowano te same metody badawcze co we wcześniejszych publikacjach. Głównym celem pracy było zidentyfikowanie wpływu czynników pogodowych na strukturę populacji *P. infestans*. W celu zrealizowania celu badawczego różne czynniki pogodowe z okresu letniego jak i zimowego z 15 lat skorelowano z danymi na temat typów kojarzeniowych, haplotypów mitochondrialnych, odporności na metalaksyl, stopnia wirulencji oraz zmienności genetycznej. W streszczeniu pracy oraz w rozdziale „Introduction” pojawia się wzmianka o tym, że „...isolates were collected from single unprotected experimental field in the area with high late-blight pressure...”. Przypuszczam, że oznacza to, że na danym obszarze i polu od wielu lat zaraza ziemniaka jest poważnym problemem w produkcji ziemniaków. Nie zostało to jednak w publikacji dalej rozwinięte. Nie podano również źródła tej informacji. Analogicznie jak w przypadku wcześniejszych publikacji, nie zamieszczono metadanych na temat analizowanych izolatów. Szczegółowa charakterystyka izolatów jest zawarta w jednym z dodatkowych plików (S1), jednakże plik jak i kolejne 3 dodatkowe pliki z wynikami badań nie zostały dołączone do manuskryptu. Nie jest zrozumiałe stwierdzenie, sugerujące że na jednym polu uprawiano

różne odmiany ziemniaka: „The resistance to late blight of potato cultivars and breeding lines grown in this field ranged from susceptibility to high resistance”. Jeśli założyć, że izolaty pozyskiwano w różnych latach z różnych odmian o różnym stopniu odporności na zarazę ziemniaka to dlaczego nie uwzględniono tych danych analizując wyniki? Być może stopień odporności odmian na *P. infestans* miał tutaj istotne znaczenie w kształtowaniu struktury populacyjnej patogenu. Wyniki badań genetycznych są moim zdaniem bardzo interesujące, przede wszystkim z uwagi na zaobserwowaną zmienność w udziale poszczególnych trzech grup *P. infestans* w określonych sezonach wegetacyjnych. Udział poszczególnych genotypów w liczbie pozyskiwanych izolatów w poszczególnych latach był różny. Uważam, że dodatkowa informacja na temat stopnia porażenia roślin na polu przez *P. infestans* mogła stanowić kluczowe dane do pełniejszej interpretacji wyników badań. W rozdziale „Discussion” pada stwierdzenie, że „The genotyping results of SSR markers showed that *P. infestans* isolates of genotype 34\_A1 survived at least eight subsequent seasons”. Uważam, że na podstawie uzyskanych wyników nie można w żaden sposób potwierdzić „przetrwania zimy” tego genotypu na danym polu. Równie dobrze pojawienie się tego genotypu w kolejnym sezonie wegetacyjnym mogło być następstwem transportu zarodników wraz z sadzoniakami lub np. z wiatrem z mniej lub bardziej odległych geograficznie rejonów. Przemawia za tym fakt, że ten genotyp ponownie był zidentyfikowany w latach 2013 i 2014 po sezonie wegetacyjnym 2012 gdzie nie był zidentyfikowany w polu. W dalszej części dyskusji pada stwierdzenie: “We presumably observed some isolates that are a consequence of sexual reproduction of isolates of the 34\_A1 genotype (partially belonging to the green cluster) rather than a result of mutation.” Czy powyżej zasygnalizowany wynik nie mógł być wynikiem niekompletnego sortowania linii (incomplete lineage sorting)? W dalszej części dyskusji pada stwierdzenie: "It is likely that some isolates of miscellaneous genotypes clustered together with isolates of the 34\_A1 genotype are products of the sexual reproduction that takes place in Poland.” W tym punkcie powtarzam wcześniejsze pytanie o „dowody” na rozmnażanie płciowe *P. infestans* w Polsce. Czy wykazana w pracy proporcja typów kojarzeniowych wskazuje na rekombinację badanych izolatów? Chciałbym aby w prezentacji doktorantka wyjaśniła czy zjawisko rekombinacji można zidentyfikować poprzez inne metody badawcze. Jeśli tak to jakie?

Podsumowując, przedłożona rozprawa doktorska Pani mgr Marty Janiszewskiej posiada istotne walory poznawcze, a przedstawione w niej wyniki stanowią znaczący wkład w wiedzę na temat *P. infestans* w Polsce. Moje uwagi i komentarze nie mają większego wpływu na uzyskane wnioski uzyskane na podstawie wyników badań, które zinterpretowano prawidłowo. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Rady Naukowej IHAR-PIB w Radzikowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Marty Janiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tomasz Kulik