

dr hab. Sylwia Jafra, profesor nadzwyczajny
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG i GUMed
ul. A. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

Gdańsk, 2018. 05. 10

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Maciejewskiej pt.
Analiza zmienności wybranych izolatów z populacji bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp.
sepedonicus (Speieckermann & Kotthoff) Davis i in.**

Przedmiotem badań ocenianej rozprawy doktorskiej mgr A, Maciejewskiej są wybrane izolaty bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) pochodzące z zainfekowanych roślin ziemniaka z terenu Polski.

Bakterie te są czynnikiem sprawczym dewastacyjnej choroby zwanej bakteriozą pierścieniową ziemniaka. Bakterioza pierścieniowa jest chorobą kwarantannową podlegającą przymusowemu zwalczaniu. W Polsce podstawę prawną przymusowego zwalczania bakterii Cms stanowi ustawa z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin (Dz. U. Nr 11 z 2004 r., poz. 94 ze zm.) i rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 26 kwietnia 2017 r. (Dz. U. Nr 1, poz. 911). W przypadku wykrycia patogenu oraz stwierdzenia objawów chorobowych na roślinach ziemniaka z urzędu podejmowane są działania administracyjne skutkujące dyskwalifikacją uprawy, nałożeniem kwarantanny na producenta, a w konsekwencji zakazem dystrybucji ziemniaków w kraju i za granicą. Z tego względu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jest przyczyną znaczących strat ekonomicznych, zarówno ze względu na bezpośrednie obniżenie plonów wynikające z wędnięcia roślin i gnicia bulw, jak i pośrednie, poprzez zamykanie plantacji i zakaz obrotu ziemniaków wewnątrz kraju i ich eksportu zagranicę.

Bakterioza pierścieniowa jest chorobą trudną do wyeliminowania. Do tej pory nie opracowano skutecznych metod kontroli zakażeń ziemniaków bakteriami Cms, ani też nie wyhodowano odmiany ziemniaka odpornego na tę chorobę. Sytuacja taka jest wynikiem niewystarczającej wiedzy z zakresu ekologii bakterii Cms oraz biologicznych podstaw rozwoju choroby – bakterie na porażonych roślinach rozwijają się bardzo powoli, rzadko wywołując charakterystyczne objawy chorobowe w takcie wzrostu roślin w warunkach polowych. Ponadto, objawy chorobowe, jeśli występują, mogą być mylone z symptomami typowymi dla lęgniowca, *Phytophthora infestans*. Często przyczyną rozprzestrzeniania się patogenów są bulwy z infekcją latentną oraz skażone bakteriami maszyny rolnicze, przechowalnie i opakowania używane do transportu i przechowywania bulw. Z tego względu jedyną metodą zapobiegania rozprzestrzeniania się patogenu jak i samej choroby polega na prowadzeniu odpowiednich zabiegów higieny fitosanitarnej i wykorzystywaniu certyfikowanych ziemniaków sadzeniaków w całym systemie produkcji ziemniaka.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Agnieszki Maciejewskiej, wykonana pod kierunkiem pana prof. dr hab. Edwarda Arseniuka z Zakładu Fitopatologii Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy oraz dr hab. Aleksandra Masny z Narodowego Instytut Zdrowia Publicznego, Państwowy Zakład Higieny, jest oryginalnym, liczącym 159 stron

opracowaniem, podejmującym temat zmienności genetycznej oraz zmienności cech warunkujących wirulencję populacji bakterii *Cms* wyizolowanych z zainfekowanych roślin ziemniaka z terenu Polski.

Wyniki badań przeprowadzonych przez panią mgr A. Maciejewską jednoznacznie wskazują, że szczepy polskiej populacji *Cms* mają zróżnicowaną zdolność do wywoływania choroby (wirulencję) na roślinach bakłażana, jednocześnie nie wykazują istotnych różnic cech biochemicznych. Natomiast, wyniki badań wykonanych za pomocą udoskonalonej przez Doktorantkę metody PCR MP (reakcja łańcuchowa polimerazy DNA o obniżonej temperaturze denaturacji) pokazały możliwość zróżnicowania wybranych 50 szczepów polskiej populacji *Cms* na poziomie genetycznym. Co istotne, udoskonalona przez mgr Maciejewską metoda pozwoliła na jednoznaczną identyfikację i po raz pierwszy na genetyczne zróżnicowanie izolatów wewnątrz podgatunku, zatem może być wykorzystana do śledzenia źródła zakażenia bakteriami *Cms*. Ma to istotne znaczenie epidemiologiczne. Bakterie *Cms* charakteryzują się wysoką homogennością morfologiczną i biochemiczną, podobne obserwacje wysuwano pod kątem wysokiego wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego tych bakterii. Wyniki badań Doktorantki rzucają nowe światło na kwestię polimorfizmów wewnątrzgatunkowych w populacji *Cms*. Efektem pracy Doktorantki było także stwierdzenie braku korelacji pomiędzy genetycznym polimorfizmem, właściwościami biochemicznymi, wirulencją oraz pochodzeniem geograficznym badanych izolatów polskiej populacji *Cms*.

W formalnej ocenie rozprawy doktorskiej stwierdzam, że ma ona układ przyjęty dla tego typu opracowań doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Praca została przygotowana w języku polskim, i składa się z następujących rozdziałów: Streszczenie w j. polskim i j. angielskim, Wykaz stosowanych skrótów, Przegląd literatury, Założenia i cel pracy, Materiały i metody, Analiza wyników, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Literatura, Aneks oraz Załączniki 1-10.

Streszczenie Rozdział ten przedstawia przedmiot badań, prezentuje ogólnie uzyskane wyniki, które następnie podsumowuje. W rozdziale tym zawarto również słowa kluczowe rozprawy.

Streszczenie w j. angielskim jest tłumaczeniem streszczenia prezentowanego w j. polskim.

Wykaz stosowanych skrótów Rozdział taki zazwyczaj wzbudza wiele kontrowersji, gdyż nie jest jasne które skróty powinny być w nim wyjaśnione, a które wyjaśnienia można pominąć. Doktorantka postarała się wybrać te, które nie muszą być rozpoznawane przez szerokie grono odbiorców. W wyjaśnieniu niektórych użytych skrótów wkrały się drobne błędy edytorskie: EPPO to Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin, a nie Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin. Brakuje wyjaśnienia LMG Culture Collection – czyli Kolekcja Kultur **Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, Belgium**.

EPS to exopolymeric substance – czyli zewnątrzkomórkowe polimery (głównie polisacharydy, ale również białka i zewnątrzkomórkowy DNA), a nie jak napisano egzopolisacharydy.

Przegląd literatury, rozdział zwyczajowo określany mianem Wstęp lub Wprowadzenie obejmuje 35 stron maszynopisu i podzielony jest na 12 podrozdziałów, w których Doktorantka przedstawia problem bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, zasięg występowania choroby, sposoby rozprzestrzeniania się patogenu oraz straty gospodarcze będące wynikiem rozprzestrzeniania się bakterii i choroby. W następnym podrozdziale opisano uregulowania prawne i status choroby

kwarantannowej, dopiero w kolejnych podrozdziałach, przedstawiała przynależność taksonomiczną sprawcy bakteriozy pierścieniowej, charakterystykę morfologiczną, biochemiczną i genetyczną Cms oraz techniki związane z wykrywaniem patogenu. W ostatnich podrozdziałach Doktorantka skupiła się na czynnikach wirulencji oraz metodach zwalczania tych bakterii.

Rozdział Przegląd literatury został napisany poprawnym językiem i jest bardzo interesujący, jednak zawiera szereg powtórzeń, które niepotrzebnie go wydłużają i powodują wrażenie chaosu. Te same treści np. dotyczące statusu bakteriozy pierścieniowej jako choroby kwarantannowej, uregulowań prawnych związanych z zapobieganiem rozprzestrzeniania się patogenu i kontrolą choroby pojawiają się w kilku podrozdziałach. Rozdział ten byłby znacznie lepszy, gdyby treści w nim zawarte zostały uporządkowane i wzbogacone rycinami, fotografiami i schematami (np. mapa zakresu występowania Cms, fotografia prezentująca symptomy chorobowe występujące na roślinach ziemniaka czy schemat procedury identyfikacji Cms zalecanej przez EPPO i inne).

Ze względu na konieczność dostosowania polskich uregulowań prawnych do dyrektyw Komisji Europejskiej prawo polskie ulega wielu nowelizacjom, taka sytuacja dotyczy również rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie szczegółowego postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* przytoczonego w podrozdziale „Znaczenie i straty gospodarze” (Dz. U. 2007r. Nr 70, poz. 472) - w dniu 26 kwietnia 2017 zostało wydane nowe rozporządzenie w tej sprawie (Dz. U. 2017r. Nr 1. Poz. 911).

Na stronie 18 rozdziału Przegląd literatury Doktorantka zaprezentowała pozycję systematyczną bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. I taka rzeczywiście była do końca 2017, kiedy to w styczniu 2018, Li i współpracownicy zaprezentowali na łamach czasopisma *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (doi: 10.1099/ijsem.0.002492), nową klasyfikację taksonomiczną bakterii *Clavibacter michiganensis*, wynosząc wszystkie podgatunki *Clavibacter michiganensis* do rangi nowych gatunków. Obecnie bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* stanowią odrębny gatunek: *Clavibacter sepedonicus*.

W rozdziale Przegląd literatury zabrakło mi informacji o opisanym w 2016 roku patogenie papryki *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* (Oh et al. 2016. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66:4065–4070).

W rozdziale tym pojawia się także niewłaściwe cytowanie pracy przeglądowej (Waleron i in. 2010) w kontekście charakterystyki bakterii Cms (str. 20, 20/21, 24, 29, 30, 32, 33 ect) czy uwarunkowań prawnych (str 18). Jest to niewłaściwy dobór literatury, gdyż w takim kontekście Doktorantka powinna posłużyć się cytowaniem wyników prac oryginalnych.

Pomimo powyższych komentarzy rozdział Przegląd literatury zawiera szereg ważnych informacji, wskazujących na istotność podjętych przez mgr Agnieszkę Maciejewską badań.

Założenia i cel pracy W jednostronicowym rozdziale Doktorantka jasno przedstawiła problem badawczy, który stał się podstawą pracy. W mojej ocenie pierwsze dwa akapity tego rozdziału bardziej pasowałyby na zakończenie przeglądu literatury wprowadzając gładko czytelnika w główny cel pracy, który został jasno sformułowany w kolejnym akapicie, a cele szczegółowe pozwalają łatwo prześledzić plan badań.

Materiały i metody W prezentowanej rozprawie doktorskiej opisano materiały i metody wykorzystane w pracy w jednym rozdziale. Jednak sposób prezentowania zarówno materiałów jak i metod odbiega od przyjętego w publikacjach naukowych. Opis materiałów zawiera jedynie zestawienie szczepów bakteryjnych oraz informację o wykorzystanych do badań podłożach mikrobiologicznych. Niejasne jest dlaczego nie ujęto w tym rozdziale opisu – składu podłoży do hodowli bakterii i buforów wykorzystanych w badaniach, prezentując je w formie załączników (załącznik 2 i załącznik 10). W sekcji Materiał roślinny – nie zwarto informacji dotyczącej przygotowania materiału roślinnego do badań, ale przedstawiono połowiczny opis testu patogeniczności – którego szczegóły zawarto w sekcji Testy biologiczne na stronach 56-60. Wiele metod zaprezentowano jako protokoły laboratoryjne w formie załączników (załączniki 3-6). Nie jest to ogólnie przyjęta forma prezentowania metodyki np.: język opisu odbiega od języka naukowego, brakuje danych dotyczących składu i sposobu przygotowania poszczególnych buforów stosowanych w opisywanej metodzie, brakuje odnośników literaturowych, a przecież Doktorantka nie opracowała tych metod sama. Na stronie 134 w załączniku 3 pojawia się dawna nazwa bakterii *Corynebacterium sepedonicus* – w kontekście kultury referencyjnej w teście pośredniej immunofluorescencji (IFAS). Tutaj nasuwa się pytanie dotyczące szczepów Cms wykorzystywanych przez Doktorantkę jako kontrola pozytywna; w protokole ze strony 134 wynika, że w badaniu IFAS odpowiednią kontrolę pozytywną stanowią szczepy ATCC 33113 (NCPPB 2137) lub NCPPB 2140 opisane jako typowe dla podgatunku Cms, jednak żaden z tych szczepów nie pojawił się w zestawieniu szczepów bakteryjnych. *Który zatem szczep Cms z podanych na stronie 41 był wykorzystany w badaniach IFAS jako kontrola pozytywna? Co to znaczy szczep wzorcowy Cms BPRIOR 525? Proszę o komentarz wyjaśniający.*

W opisie metodyki badań na str. 43 przedstawiono diagram procedury badania diagnostycznego wykrywania i identyfikacji bakteriozy pierścieniowej. Nie jest jasne czy procedurę tę wykorzystywała Doktorantka w swoich badaniach. *Proszę o wyjaśnienie podczas publicznej prezentacji głównych tez rozprawy.*

Podsumowując, ta część pracy została przez Doktorantkę opisana dość chaotycznie, i w moim odczuciu, to najłabsza część prezentowanej do oceny rozprawy doktorskiej. Jednak mimo przytoczonych przeze mnie uwag, opis materiałów i metod wraz z odpowiednimi załącznikami spełniają warunek możliwości powtórzenia doświadczeń w oparciu o przedstawioną metodykę.

Analiza wyników Rozdział ten został przez Doktorantkę pogrupowany w podrozdziały przedstawiające uzyskane rezultaty. Pierwsze trzy podrozdziały dotyczą analizy wyników testów związanych z identyfikacją i charakterystyką serologiczną i biochemiczną 200 izolatów bakterii Cms pozyskanych z terenu Polski. Bakterie Cms nie są łatwym obiektem badań, wymagają odpowiednich warunków wzrostu, rosną powoli i długo. Co więcej, izolacja materiału genetycznego z komórek Cms może nastęrczać wiele trudności. Doktorantka pokazała za pomocą testu pośredniej immunofluorescencji (IFAS) oraz testu PCR ze starterami specyficznymi dla bakterii Cms, że wszystkie 200 izolatów należy do podgatunku Cms. Wszystkie testowane izolaty zostały przebadane pod kątem zdolności wywoływania objawów chorobowych na roślinach bakłażana. Analizy te pozwoliły na wykazanie, że badane izolaty posiadają zróżnicowaną wirulencję względem rośliny testowej. Badania Doktorantki są niezwykle istotne; w warunkach naturalnych trudno stwierdzić czy

dany izolat Cms jest mniej czy bardziej wirulentny niż inne izolaty. Zdolność do wywoływania choroby związana jest zarówno z warunkami środowiskowymi jak i z poziomem inokulum oraz zjadliwością patogenu. W kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, w których wszystkie rośliny testowe są w zbliżonym stadium rozwoju, poziom inokulum jest identyczny dla wszystkich badanych izolatów, a warunki środowiskowe prowadzenia doświadczeń są ściśle kontrolowane, możliwym stało się sprawdzenie zjadliwości 200 izolatów Cms. Uzyskane przez mgr Maciejewską wyniki jasno pokazują jak bardzo zróżnicowana pod względem wirulencji jest populacja polskich izolatów tej bakterii. Nakreśla to możliwość zaplanowania kolejnych badań dotyczących mechanizmów molekularnych związanych ze zróżnicowaną wirulencją szczepów Cms. Co ciekawe, zdolność do wywoływania choroby na roślinach bakłazana nie korelowała z charakterystyką biochemiczną, typem kolonii (płynna, śluzowata czy sucha) ani też z pochodzeniem geograficznym badanych izolatów. Wyniki tych badań pozwoliły na wybranie do dalszych badań 50 izolatów, jednak sposób prezentacji tych wyników jest niejasny. Nie są jasne opisy zawartości Tabel 3, 4 i 5. *Proszę o wyjaśnienie lub przedstawienie danych w sposób bardziej zrozumiały.* Tabela 5 mogłaby zostać przedstawiona jako załącznik na końcu rozprawy, w formie poziomej – byłaby bardziej czytelna.

W rozdziale tym znalazły się także opisy testów biochemicznych, które powinny znaleźć się w rozdziale Materiały i metody. Każdy z testów został opatrzony fotografią przedstawiającą wyniki dla wybranych izolatów. Jednak do żadnej z tych fotografii nie ma opisu ani odnośnika w tekście. Natomiast wszystkie wyniki testów biochemicznych odsyłają czytelnika do Rysunku 4, który jest nieczytelny. Analiza wyników powinna jednak zawierać informacje, które izolaty w danej reakcji dają wyniki pozytywny, a które pośredni lub negatywny.

Ostatnia część wyników dotyczy analizy polimorfizmu wybranych 40 izolatów w oparciu o analizę sekwencji repetytywnych (VNTR) oraz udoskonaloną przez Doktorantkę metodę PCR-MP. Doktorantka wykonała wstępna analizę VNTR dla dwunastu szczepów, jednak otrzymane wyniki pokazały, że metoda ta jest nieodpowiednia do genotypowania bakterii Cms ze względu na niską powtarzalność i nie nadaje się do badania zmienności izolatów Cms. Doktorantka nie kontynuowała tych badań dla pozostałych szczepów. *Proszę o wyjaśnienie z czego może wynikać niepowtarzalność tej metody.*

Natomiast analizy wykonane za pomocą metody PCR MP pozwoliły pani mgr Agnieszce Maciejewskiej zróżnicować populacje polskich izolatów Cms. W udoskonalonej przez siebie metodzie Doktorantka wykorzystwała pięć endonukleaz restrykcyjnych (ApaI, PstI, BamHI, HindIII i XmaI), co pozwoliło na uzyskanie specyficznych dla poszczególnych izolatów profili w obrazie elektroforetycznym po reakcji PCR MP. Jest to znaczące osiągnięcie Doktorantki, które pokazuje polimorfizm w obrębie populacji bakterii uznawanej dotychczas za bardzo homogeną.

W kwestii edytorskiej zastrzeżenia budzą opisy zdjęć żeli po rozdziale elektroforetycznym (str. 78, 79, 80). Zastosowana czcionka w opisie poszczególnych ścieżek żelu jest zbyt mała i zlewa się z tłem; opis ścieżek z użyciem czcionki w kolorze czerwonym jest również niewidoczny. Brakuje informacji o wielkości poszczególnych albo przynajmniej głównych prążków wzorca wielkości DNA.

Na Rys. 6 w obrazie żelu po rozdziale elektroforetycznym w ścieżce 1 oznaczonej jako Cl 616 nie występuje prążek na wysokości pomiędzy 900 a 1000 pz, który jest obecny w ścieżkach 6 i 11 również

oznaczonych jako CI 616 oraz niemal we wszystkich innych próbach oprócz Ref. 527 ze ścieżki 7. W tych samych liniach występuje również prążek na wysokości ok. 300 pz, który nie występuje w ścieżce 1. *Jak należy interpretować te wyniki?* Rysunek 7 jest nieczytelny, niemożliwa jest analiza tych wyników, natomiast fotografie poszczególnych żeli mogłyby znaleźć się na końcu rozprawy w formie załączników, jak to ma miejsce w przypadku wyników testu patogeniczności czy opisu izolatów Cms.

Dyskusja to przedostatni rozdział pracy zawierający krytyczne omówienie uzyskanych wyników w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. Rozdział ten jest napisany w sposób jasny i nie pozostawia wątpliwości w kwestii umiejętności Pani mgr Agnieszki Maciejewskiej do interpretacji i dyskusji wyników swoich badań. Rozdział ten to zdecydowanie najciekawsza część pracy, pozwalająca na zrozumienie uzyskanych przez Doktorantkę wyników w świetle danych literaturowych. Został podzielony na podrozdziały, w których mgr Maciejewska w sposób logiczny i spójny dyskutuje wyniki badań. Nie mam zastrzeżeń do tego rozdziału.

Podsumowanie to najbardziej spójny i najlepiej napisany rozdział pracy. Doktorantka, krytycznie i w sposób uporządkowany podsumowała uzyskane przez siebie wyniki w świetle wyników prac innych badaczy.

Rozprawę kończy rozdział **Wnioski** zbierające najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej Doktorantki.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawione wyniki badań prowadzonych przez Panią mgr Agnieszkę Maciejewską stanowią ważny i oryginalny wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej zróżnicowania wirulencji polskiej populacji szczepów Cms oraz ich zmienności genetycznej. Uzyskane wyniki podkreślają istotność poszerzenia badań epidemiologicznych o testy genetyczne umożliwiające różnicowanie badanych izolatów. Pani mgr Agnieszka Maciejewska wykazała się umiejętnym planowaniem eksperymentów i wykorzystaniem wielu technik badawczych, a także umiejętnością interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników.

Prezentowana praca jest napisana poprawnym językiem naukowym, na ogół z wykorzystaniem odpowiedniej terminologii. W pracy znalazły się jednak błędy edytorskie, a także niefortunnie sformułowane zdania. Doktorantka nie uniknęła użycia szeregu kolokwializmów oraz żargonu laboratoryjnego. Jednak powyższe usterki nie umniejszają wagi uzyskanych wyników i poziomu merytorycznego ocenianej rozprawy.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003, w związku z czym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani magister Agnieszki Maciejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

