

Dr hab. Małgorzata Schollenberger, prof. SGGW
Samodzielny Zakład Fitopatologii
Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii
i Architektury Krajobrazu SGGW w Warszawie

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

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską zrealizowano w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie pod kierunkiem prof. dr hab. Edwarda Arseniuka. Promotorem pomocniczym był dr hab. Aleksander Masny.

Praca obejmuje formalnie wymagane rozdziały tj. przegląd literatury, a w jego ramach wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, analizę wyników, dyskusję, podsumowanie, wnioski, literaturę, aneks, załączniki i skład buforów. Dysertacja zawiera 5 tabel, 14 rysunków, 15 fotografii w tekście pracy i 160 w załączniku nr 9, do jej opracowania Autorka wykorzystwała wg załączonego spisu 181 publikacji naukowych a całość zawarła na 159 stronach.

W rozdziale założenia i cel pracy jako cel główny postawiono zbadanie zakresu zmienności genetycznej jak i cech chorobotwórczych izolatów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* zebranych w różnych regionach geograficznych Polski i odniesienie uzyskanych wyników do danych ze światowej literatury.

W celu realizacji tego celu Autorka dodatkowo wyróżniła zadania szczegółowe:

- założenie kolekcji roboczej z izolatów bakterii *Cms* pozyskanych z plantacji ziemniaków na terenie kraju,
- określenie zróżnicowania patogeniczności zebranych izolatów *Cms* w stosunku do roślin bakłazana,
- określenie zakresu zmienności zebranej w Polsce populacji izolatów bakterii *Cms* z wykorzystaniem:

biotestów na patogeniczność izolatów *Cms*, testów biochemicznych,
testów molekularnych na bazie PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy)

Zarówno temat rozprawy doktorskiej jak i jej cele wpisują się w bardzo aktualny i nader potrzebny zakres badań w obrębie współczesnej fitopatologii a zwłaszcza metody ochrony roślin jaką jest kwarantanna. Bakteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* z pewnością zajmuje specjalny status wśród bakterii kwarantannowych ze względu na możliwość latentnego tj. bezobjawowego porażenia ziemniaków. Zdarza się, że partie sprawdzonego, kwalifikowanego materiału sadzeniakowego znajdującego się w obrocie handlowym są wycofywane z powodu ujawnienia zakażenia przez sprawcę bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. To pokazuje że wielkim problemem jest identyfikacja patogena w materiale roślinnym a co za tym idzie jak trudne jest wyeliminowanie choroby. Z jednej strony wydaje się to prostą sprawą, jako że w okresie wegetacji patogen może rozprzestrzenić się w bardzo ograniczonym zakresie a więc konsekwentne niszczenie porażonych sadzeniaków w przeciągu paru lat powinno przynieść sukces. A jednak tak się nie dzieje, pomimo wieloletniego statusu patogena kwarantannowego. Ambitne założenie Doktorantki znalezienie zmienności genetycznej wśród krajowych izolatów bakterii *Cms* z pewnością ułatwiłoby opracowanie skutecznych metod identyfikacji, usprawniłoby prace nad epidemiologią bakteriozy pierścieniowej ziemniaka jak i hodowlę odmian odpornych ziemniaka.

Przegląd literatury, przedstawiony na 30 stronach, obejmuje 12 podrozdziałów, w których, obok wstępu, zawarto informacje dotyczące zarówno patogenicznej bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* jak i powodowanej przez nią choroby począwszy od zasięgu geograficznego występowania bakterii, objawów choroby, rozprzestrzeniania się patogena, znaczenia gospodarczego choroby, statusu prawnego patogena, taksonomii i charakterystyki bakterii, metod służących do wykrywania i identyfikacji patogena, czynników warunkujących jego patogeniczność oraz metod zwalczania.

Rzecz, na którą w tym momencie chciałabym zwrócić uwagę to wielokrotne używanie przez Doktorantkę określenia choroba kwarantanna i to począwszy od wstępu. Takie pojęcie nie istnieje, chociaż w języku potocznym bywa błędnie używane, głównie w celu ominięcia łacińskiej nazwy patogena. Również błąd powtarzający się

w podrozdziałach przeglądu literatury to używanie liczby mnogiej w odniesieniu do nazwy podgatunku bakterii. Użycie w tekście słów ...bakterie *Cms* wywołują.. czy bakterie *Cms* mają kształt... jest błędne, w pierwszym przypadku należy użyć liczby pojedynczej, a w drugim - komórki bakteryjne z pominięciem nazwy własnej bakterii lub dodaniem ...podgatunku *Cms*.

Szkoda, że w podrozdziale 1.2 'Zasięg geograficzny występowania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka' Doktorantka nie pokusiła się o chronologiczne przedstawienie danych dotyczących występowania choroby w poszczególnych krajach co pokazałoby tempo i kierunki jej rozprzestrzeniania.

W przeglądzie literatury na podkreślenie zasługuje przedstawienie metod wykrywania a zwłaszcza wyczerpujący opis metod: PCR MP (PCR *melting profile*) oraz analizy sekwencji VNTR (zmiennej liczby tandemowych powtórzeń)

Rozdział materiał i metody to 20 stron, gdzie w kolejnych 5-ciu podrozdziałach Doktorantka przedstawiła metody pozyskiwania izolatów bakterii, opis testów służących do ich charakterystyki jak pośredniej immunofluorescencji, opis procedury związanej z charakterystyką molekularną izolatów *Cms* czyli opis reakcji PCR ze specyficznymi starterami PSA-1 i PSA-R, opis reakcji PCR MP z różnymi zestawami enzymów restrykcyjnych, opis analizy VNTR. W jednym z podrozdziałów wymienione zostały testy biochemiczne. W ramach opisu testu biologicznego podane zostały warunki uprawy oierzyny, przygotowanie inokulum, metody inokulacji roślin i przedstawione na zdjęciach skale oceny porażenia. Podane zostały także zastosowane przy analizie wyników testu biologicznego metody statystyczne.

Zastosowane metody badawcze są zasadniczo zgodne z zasadami i nie budzą większych zastrzeżeń, chociaż tradycyjnie w ramach tego rozdziału zamieszcza się opisy procedur testów biochemicznych. Także operowanie liczbą uzyskanych izolatów bakteryjnych jest odwoływaniem się do uzyskanych wyników. Dostyc tajemniczo brzmi określenie ekstrakty bakterii, które Doktorantka dostawała z WIORIN. Dlaczego nasiona bakłazana zaprawiano Miedzianem 50 WP?

Analizę wyników przedstawiono w 4 podrozdziałach na 23 stronach. Kolejność ich opisywania nie odpowiada kolejności opisów w rozdziale materiał i metody.

W celach cząstkowych sformułowanych w celu pracy było założenie kolekcji roboczej izolatów *Cms*. W wynikach brak jest opisu zebranej kolekcji. chociażby danych na temat frekwencji uzyskiwanych izolatów w kolejnych latach. Adnotacja, że spis kolekcji umieszczony został jako załącznik 1 znajduje się w rozdziale materiał i

metody. A swoją drogą co decydowało o kolejności izolatów na liście, bo nie był to rok izolacji?

Pierwszy podrozdział analizy wyników to wyniki identyfikacji izolatów z zebranej kolekcji bakterii przy użyciu testów pośredniej immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych, gatunkowo specyficznego PCR ze starterami PSA-1 i PSA-R oraz testu patogeniczności na roślinach bakłażana. Wszystkie te testy wykonano dla 200 izolatów a uzyskane wyniki potwierdziły ich przynależność do podgatunku *sepedonicum*. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, która pokazała istotne różnice w patogeniczności między poszczególnymi izolatami. Także struktura kolonii testowanych izolatów miała istotne znaczenie przy ocenie stopnia porażenia bakłażana.

Dla określenia cech biochemicznych izolatów *Cms* wykonano 11 testów, których opis podano wraz z wynikami. Wyniki przedstawiono w postaci fotografii prezentujących pozytywny i negatywny wynik. Analizę binarną wyników dla 50 wybranych izolatów przedstawiono na mało czytelnym rysunku. Szkoda, że w przypadku samych testów jak i zamieszczonych w załączniku podłoży brak jest miarodajnych odnośników źródłowych.

Użycie każdego z pięciu enzymów w metodzie PCR MP pozwoliło określić zróżnicowanie badanych izolatów bakteryjnych, wykazać ich zmienność genetyczną i pogrupować w różną liczbę klasterów co zobrazowano niezłej jakości dendrogramami.

Dyskusja została przedstawiona na 9 stronach, gdzie Doktorantka w wywarzony sposób odniosła się do uzyskanych wyników odnośnie identyfikacji bakterii *Cms* i molekularnego zróżnicowania izolatów tej bakterii w kontekście literatury światowej. Pomimo, że i w tym przypadku można napotkać w tekście pewne lapsusy, to w moim odczuciu jest to najlepsza część dysertacji. Zwykle na podstawie sposobu w jaki przeprowadzona jest dyskusja wyników ocenia się dojrzałość naukową Autora, co w tym przypadku dobrze rokuje na przyszłość Doktorantce.

W trakcie recenzowania poszczególnych rozdziałów pracy zwracałam uwagę na istotniejsze błędy, nieścisłości. Dodatkowe uwagi szczegółowe:

str. 5 EPPO pominięto Europejska

str. 5, 29, 33 HR to reakcja nadwrażliwości

str. 35 cyt...Zasady skutecznej kontroli bakteryjnych patogenów i chorób powinny być oparte na spełnieniu postulatów Roberta Kocha...?

str. 56 rośliny hodowano w fitotronie?

str. 58 w zasadzie określenia skala objawów i skala więdnienia sprowadzają się do tego samego, gdyż więdnienie jest typem objawu

str. 69 co oznacza próbówki otwarte i zamknięte przy teście O/F

Aneks – Ranking 50 wybranych izolatów *Cms* o zróżnicowanej wirulencji

wirulencja izolatów w białych, niezabarwionych kratkach ?

Załącznik 8 izolaty o różnym stopniu patogeniczności?

Załącznik 9 Ocena fotograficzna porażenia roślin bakłazana przez 50 izolatów *Cms* w trzech terminach. Słowa uznania za jakość prezentowanych 160 fotografii

Przedstawiony do recenzji doktorat można by uznać za bardzo dobry, gdyby nie źle napisany tekst i fatalnie przedstawiona literatura. W tego typu pracy nie może występować sytuacja, gdy ok. 13 prac podanych w spisie nie jest cytowanych w tekście a ok. 18 cytowanych w tekście nie ma w spisie. Piszę około bo ze względu na złe cytowania (jedno nazwiako gdy paru autorów itp.) utrudniona jest ich identyfikacja.

Doktorantkę czeka sporo pracy przy przygotowywaniu artykułów z doktoratu ale warto, bo biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, zwłaszcza te z wykorzystaniem metody PCR MP, mają one szansę być opublikowane w renomowanych, europejskich czasopismach.

Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie Pani magister Agnieszki Maciejak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

H. Juchacz