

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Pani mgr inż. Katarzyny Sikory

pt. „*Identyfikacja patogenów z rodzaju *Phytophthora* na podstawie analiz DNA*”.

Patogeny należące do rodzaju *Phytophthora* stanowią zagrożenie dla bioróżnorodności i zrównoważonego rozwoju ekosystemów leśnych na świecie. Obecnie, opisano ponad 120 gatunków rodzaju *Phytophthora*, z których większość to patogeny roślin. Porażają rośliny uprawne (ziemniak), ozdobne (rózaniecznik) oraz drzewa leśne (dąb szypułkowy, olsza czarna). Nazwa rodzajowa patogenu, wywiedziona z greki, oznacza „zabójcę roślin”, co dokładnie oddaje strategię życiową tych organizmów. W historii ludzkości szczególnie niechlubnie zapisał się gatunek *P. infestans*, wywołujący zarazę ziemniaka, sprawca klęski głodu w Irlandii w XIX w. Inne groźne gatunki, powodujące duże straty w uprawach rolniczych i w lasach to m.in. *P. cinnamomi* i *P. ramorum*. Rozprzestrzenianiu się patogenów sprzyja wzrost światowego handlu i turystyka oraz niekontrolowany obrót materiałem roślinnym. O randze problemu w leśnictwie wskutek strat powodowanych przez *Phytophthora* może świadczyć powstanie nowego czasopisma naukowego - „on line”, zatytułowanego „Forest Phytophthoras”. W tej sytuacji dysponowanie technikami oraz umiejętnościami pozwalającymi na zidentyfikowanie źródeł zakażeń (roślin-gospodarzy, gleby, wody) jest niezwykle istotne, aby ograniczać porażenie i zwalczać choroby roślin. Zastosowanie technik molekularnych zwiększa możliwości określenia tożsamości patogenów, a w przypadku *Phytophthora* zapewniło wzrost tempa wykrywania nowych gatunków.

Opracowanie metody identyfikacji gatunków *Phytophthora*, będącej jednocześnie szybką, skuteczną i wydajną jest obecnie kluczowym czynnikiem w zapobieganiu dyspersji infekcji. W niniejszej pracy, przedstawiono wyniki badań skuteczności metody opartej na analizie DNA przy zastosowaniu sond ligacyjnych, nazywanych w j. angielskim „padlock probes”. Wykazanie przez autorkę możliwości multipleksowej identyfikacji patogenicznych gatunków *Phytophthora*, zarówno z próbek glebowych, jak i roślinnych jest istotnym uzupełnieniem wiedzy nt. identyfikacji organizmów chorobotwórczych. Daje również

możliwość szerokiego wykorzystania metody w diagnostyce materiału sadzeniowego w szkółkach leśnych i roślin ozdobnych.

### **Ocena formy pracy**

Praca liczy 105 stron, z czego pierwsza część (94 strony) to właściwy tekst pracy. Pozostałe 11 stron to wykaz rycin i tabel zamieszczonych w pracy ze wskazaniem numeru strony oraz załączniki w postaci tabel, zawierających wykaz badanych izolatów *Phytophthora*, charakterystykę sond PLP i sekwencji DNA wzorcowych izolatów *Phytophthora*. Na ostatniej stronie (105) zamieszczono streszczenie pracy w j. polskim oraz j. angielskim.

Układ pracy jest standardowy, rozpoczyna ją 3. stronicowa część wstępna oraz 15. stronicowy przegląd literatury. Kolejny rozdział jest poświęcony celom i zakresowi pracy. Cel pracy został sformułowany w sposób precyzyjny – opracowanie niezawodnej techniki, umożliwiającej wczesne wykrywanie fytoftoroz oraz gatunkową identyfikację patogenów, przy jednoczesnym niskim nakładzie pracy i prostocie wykonania. Rozdział poświęcony materiałom i metodom badań obejmuje szeroki zakres zagadnień, w związku z czym został podzielony na 5 podrozdziałów. Podrozdział pierwszy, zaznaczony jako 4.1. zawiera charakterystykę badanych izolatów, pochodzących z banku i kolekcji kultur (Holandia i Polska) oraz charakterystykę prób środowiskowych. W kolejnym rozdziale, 4.2, opisano proces izolacji DNA z czystych kultur, prób środowiskowych i prób glebowych. W rozdziale 4.3 przedstawiono analizę sekwencji fragmentu genu małej podjednostki rybosomowej w celu identyfikacji izolatów na podstawie sekwencji DNA. W rozdziale 4.4 obszernie opisano proces identyfikacji gatunków *Phytophthora* przy zastosowaniu sond PLP. Ostatni podrozdział, 4.5. zawiera opis stosowanych analiz statystycznych. Rozdział wyniki badań liczy 27 stron i podzielony został na podrozdziały odnoszące się do zadań wykonywanych w trakcie izolacji, amplifikacji i sekwencjonowania DNA z materiału stanowiącego przedmiot badań. Wyniki, szczególnie te odnoszące się do identyfikacji wzorcowych i polskich izolatów *Phytophthora*, zostały przedstawione bardzo czytelnie i precyzyjnie. Kolejny rozdział to dyskusja wyników, którą przeprowadzono na 12. stronach. Rozdziały końcowe to podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Liczba wykorzystanych i przytoczonych w pracy publikacji wynosi 172 pozycje, co w znaczącym stopniu wydaje się wyczerpywać literaturę przedmiotu. Zdecydowana większość to współczesne prace obcojęzyczne.

## Ocena merytoryczna

Doktorantka w części wstępnej przedstawiła dokładny przegląd piśmiennictwa na temat *Phytophthora* w Europie i na świecie. Autorka w jasny sposób przedstawiła miejsce organizmów w spirali czynników prowadzących do zamierania drzew leśnych, różnorodność gatunkową rodzaju, warunki sprzyjające infekcji oraz szeroki wachlarz roślin, porażanych przez patogeny. W rozdziale tym w przystępny dla czytelnika sposób przedstawiono przegląd metod stosowanych w identyfikacji i analizie populacji *Phytophthora*, poczynawszy od analizy izoenzymów, przez reakcję łańcuchowej polimerazy- PCR, analizę polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów DNA-AFLP, metodę losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD) czy analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), sekwencjonowanie Sagnera oraz zastosowanie sond ligacyjnych.

Z zadań wymienionych w celach pracy, Doktorantka wywiązała się bardzo dobrze. Uznanie budzi wykonanie dużej ilości izolacji DNA z różnorodnego materiału biologicznego, znajomość detali ważnych dla usprawnienia reakcji chemicznych, a tym samym przeprowadzenia z sukcesem realizowanych analiz i metod genetycznych. Widoczna jest również sprawność w posługiwaniu się algorytmami, umożliwiającymi badanie pokrewieństwa gatunków *Phytophthora*. Autorka zastosowała algorytm największej wiarygodności (ang. Maximum likelihood).

Doktorantka wybrała 22 gatunki *Phytophthora*, powodujące największe straty w leśnictwie i rolnictwie. Wykazała, że identyfikacja patogenów w oparciu o analizę rybosomalnego DNA, obejmującego region ITS1 z wykorzystaniem sond ligacyjnych typu „padlock probs” może być z powodzeniem stosowana do identyfikacji najczęściej występujących w Polsce gatunków *Phytophthora*. Zaprojektowany zestaw sond nie sprawdził się w identyfikacji tylko trzech gatunków, takich jak: *P. gallica*, *P. polonica* i *P. quercina*. Natomiast region ITS1 jako marker genetyczny okazał się niewystarczający w identyfikacji blisko spokrewnionych gatunków, jak np. *P. andina* i *P. infestans*.

Analizę statystyczną wyników autorka przeprowadziła testem Fischera i RIR Tukey'a. Ponadto umiejętnie zastosowała macierz podstawiania nukleotydów za pomocą programu BioEdit w celu porównywania podobieństwa sekwencji ITS1 badanych gatunków *Phytophthora*.

Swoją pracą doktorską Autorka włączyła się w interesujący i ważny nurt badań prowadzonych obecnie na świecie, dotyczący opracowania i wykorzystania metod usprawniających identyfikację organizmów, powodujących straty w leśnictwie i rolnictwie.

Dyskusja została przeprowadzona w sposób profesjonalny i wnikliwy, poruszający szeroką gamę problemów związanych z stosowaniem metody PLP, z powołaniem się na wiele współczesnych prac naukowych. Autorka zwróciła uwagę na szereg czynników mających wpływ na wydajność ekstrakcji DNA. Podkreślić należy jedną z istotnych właściwości tej pracy, a tym samym umiejętności Doktorantki, mianowicie - kompleksowego przedstawienia badanej metody, z wszystkimi jej zaletami i ograniczeniami.

Przeprowadzone badania i ich przedstawienie świadczą o opanowaniu przez Doktorantkę zasad i metod naukowego poznania, ich racjonalnego wykorzystania oraz zastosowania w praktycznym działaniu. Potwierdzeniem tej oceny są również publikacje Autorki, w tym w czasopiśmie z listy JCR (Phytopathology), powstałe we współpracy z naukowcami z renomowanych ośrodków naukowych.

### **Uwagi krytyczne**

Jak niemal w każdej pracy, także i w tej znalazło się parę różnego typu usterek. W Wynikach niepotrzebnie założył się komentarz (str. 44) z powołaniem się na dane literaturowe. Ten fragment jest właściwy dla rozdziału Dyskusja. Ostatni rozdział rozprawy nazwano „Omówienie wyników i dyskusja”, zamiast po prostu „Dyskusja”. Taka konstrukcja to pleonazm, podobnie jak określenie „rok czasu”, na stronie 14.

Na stronie 40, w rozdziale analizy statystyczne test Tukey’a należałoby oznaczyć po polsku jako RIR (Rozsądnej Istotnej Różnicy).

Większość usterek ma charakter stylistyczny. I tak, na stronie nr 5 autorka pisze o zarazie ziemniaczanej, raczej należało użyć określenia zaraza ziemniaka. Gatunki *Phytophthora* są niekiedy wzmiankowane w tekście, w rodzaju żeńskim np. *P. ramorum* na str. 13., czy *P. alni* subsp. *P. alni* (str.15). Wydaje się to niepoprawne, gdyż w sytuacji kiedy mowa o gatunku mamy w języku polskim do czynienia z rodzajem męskim.

Zamiast o deszczowaniu lepiej byłoby napisać o nawadnianiu lub podlewaniu, jako że zabieg jest wykonywany przez człowieka.

Niepoprawne wydaje się określenie „adaptacja do porażania”, należało raczej napisać o zdolności do porażania, zaś o adaptacji do warunków środowiskowych, strona 14. Pisząc o funkcjonowaniu 10 kładów lepiej byłoby zaznaczyć, że je wyodrębniono (str. 21).

Drobnych lapsusów językowych jest w pracy więcej i wydaje się, że wynikają z bezpośrednich tłumaczeń z języka angielskiego. Literówki i brakujące znaki przestankowe oraz niepoprawne formy stylistyczne zaznaczono w tekście.

Przytoczone uwagi natury redakcyjnej nie podważają wysokiej wartości ocenianej pracy.

### Ocena końcowa

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Sikory stwierdzam, że Autorka zrealizowała zamierzony cel. Przedstawiona rozprawa jest opracowaniem oryginalnym i zawiera istotne „novum” w postaci rozwiązania problemu naukowego, jakim jest opracowanie metody opartej na analizie DNA, usprawniającej identyfikację patogenów *Phytophthora*. Ponadto rozprawa ujawnia ogólną wiedzę Doktorantki w zakresie fitopatologii i biologii molekularnej, wskazuje na Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a także jest rzetelnie uzasadniona źródłowo i poprawnie napisana.

Uznaję ocenianą pracę za spełniającą wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stosownie do odpowiednich przepisów „*Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym*” wnioskuję do Wysokiej Rady Instytutu Badawczego Leśnictwa o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Sikory do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

Jednocześnie, z uwagi na wysokie walory merytoryczne rozprawy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

