

Warszawa, 20.06.2013 r.

Dr hab. Marta Aleksandrowicz-Trzcńska prof. SGGW
Katedra Ochrony Lasu i Ekologii
SGGW w Warszawie

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Sikory
„Identyfikacja patogenów z rodzaju *Phytophthora* na podstawie analiz DNA”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Tomasza Oszako prof. IBL**

Podstawa: Uchwała Rady Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa z dnia 21 maja 2013

Wprowadzenie

Lęgniowce z rodzaju *Phytophthora*, chociaż znane były jako groźne patogeny roślin uprawnych już w XIX wieku, stały się w ostatnich 10-15 latach olbrzymim zagrożeniem również dla roślin ozdobnych, a także drzew leśnych, w różnym wieku. Obecnie wiadomo, że mamy do czynienia z inwazyjną grupą czynników chorobotwórczych, bardzo plastycznych, przystosowujących się do lokalnych warunków, zajmujących nowe nisze i poszerzających zakres swoich roślin żywicielskich. Przyszłe niebezpieczeństwo może być związane również z powstawaniem nowych gatunków *Phytophthora*. W efekcie hybrydyzacji międzygatunkowej, somatycznej fuzji lub rekombinacji genów mogą tworzyć się nowe organizmy bardziej zjadliwe niż ich rodzice.

Stale zwiększająca się liczba opisanych gatunków z rodzaju *Phytophthora*, ich polimorfizm i tworzenie hybryd, z jednej strony oraz rozwój badań struktury DNA i metod opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy, z drugiej strony, spowodowało, że tradycyjne metody identyfikacji gatunku polegające na analizie biometrycznej cech morfologicznych, jako czasami mało skuteczne, zastępowane są metodami opartymi o właściwości materiału genetycznego.

Tak, więc podjęcie przez Autorkę badań dotyczących opracowania prostej i szybkiej metody identyfikacji gatunków *Phytophthora*, ważnych z punktu widzenia fitopatologii leśnej, uważam za celowe i w pełni uzasadnione zarówno od strony poznawczej jak i praktycznej.

Ocena pracy

Przedłożona do recenzji praca doktorska liczy 105 ponumerowanych stron. W tekście znajduje się 12 tabel i 30 rycin. Właściwy tekst, bez stron tytułowych, spisów: treści, literatury, tabel i rycin, słowniczka, streszczenia oraz załączników liczy 75 stron. Jest to, więc objętość typowa dla prac doktorskich. Wskazuje na umiejętność zwięzłego i precyzyjnego prezentowania wyników badań naukowych oraz właściwego oceniania wagi zamieszczanych informacji.

Praca posiada klasyczny układ tekstu. Składa się z 12 ponumerowanych części, z których części 1-7 należy traktować jako rozdziały. W spisie treści brakuje części ósmej – „Literatura”. Pracę kończy część 12 – „Streszczenie”. Wydaje mi się, że korzystniej byłoby umieścić streszczenie na początku pracy, oraz dodać słowa kluczowe. Jest to jednak subiektywna ocena recenzenta. Spis literatury zawiera 175 pozycji, w tym trzy odesłania do strony internetowej. Większość cytowanych prac została napisana w języku angielskim (160). Literatura polska to 12 pozycji. Ponad 30% stanowią prace napisane po roku 2000. Na tej podstawie można wnioskować, że Autorka ma bardzo dobrą znajomość literatury dotyczącej zarówno rodzaju *Phytophthora*, jak i zagadnień związanych analizą DNA.

Obszar badań Doktorantki dotyczący analizy materiału genetycznego *Phytophthora*, powoduje, że praca nie jest łatwa w studiowaniu, szczególnie dla czytelnika nie zajmującego się na co dzień badaniami molekularnymi. Autorka dołożyła jednak wielu starań, aby praca była zrozumiała również dla takiego odbiorcy. Dobrym pomysłem jest umieszczenie słowniczka na początku pracy. Znacznie ważniejsze jest jednak jasne precyzowanie myśli i wyjaśnianie wielu używanych terminów. Dla mnie szczególnie pomocne okazały się opracowane przez Autorkę barwne schematy ilustrujące np. hybrydyzację sondy ligacyjnej do specyficznego fragmentu DNA (ryc. 5), czy przebieg metody identyfikacji gatunków *Phytophthora* za pomocą sond PLP (ryc. 6).

Pod względem redakcyjnym i stylistycznym praca została przygotowana bardzo starannie. W tekście jest niewiele usterek. W kilku miejscach Autorce nie udało się uniknąć „skrótów myślowych” np. str. 79 „...precyzyjna identyfikacja organizmów kwarantannowych, takich jak *P. ramorum*, która uniemożliwi rozprzestrzenianie się chorób wraz zainfekowanym materiałem roślinnym...”

Rozdział pierwszy „Wstęp” wprowadza w problematykę zagrożenia drzew leśnych ze strony *Phytophthora*. Autorka trafnie wskazuje potrzebę opracowania skutecznej, multipleksowej metody identyfikacji gatunków *Phytophthora* z różnych środowisk, dającej możliwość wczesnego, szybkiego i w miarę prostego diagnozowania zagrożenia.

Następny rozdział – „Przegląd literatury” podzielony został na trzy części. W pierwszej czytelnik poznaje charakterystykę gatunków z rodzaju *Phytophthora*, historię ich odkryć, rozmiary strat, jakie powodują, a także klasyczne metody oznaczania gatunków oparte na analizie cech budowy morfologicznej. W tej części przeglądu literatury znalazły się cytowania z okresu prawie 150 lat, czyli od momentu odkrycia pierwszego gatunku z tego rodzaju – *P. infestans*. Tę część „Przeglądu literatury” kończy rycina 3, przedstawiająca tempo odkryć nowych gatunków *Phytophthora*, pomyłkowo oznaczona przez Autorkę jako pierwsza. Na osi rzędnych tej ryciny powinno być napisane „liczba” a nie „ilość gatunków *Phytophthora*”. Dwie pozostałe części „Przeglądu literatury” pokrótce przedstawiają, obecnie już całkiem liczne, metody molekularne identyfikacji gatunków *Phytophthora*. Natomiast dokładniej Autorka charakteryzuje sondy molekularne, w tym sondy ligacyjne, które zastosowała w swoich badaniach. Omawiany rozdział w jasny i wyczerpujący sposób wprowadza czytelnika w problematykę badań.

Cel pracy został przedstawiony w trzeciej, jednostronicowej części, zatytułowanej „Cel i zakres pracy”. Autorka sprecyzowała tu cel nadrzędny i dwa cele określone jako pomocnicze oraz przedstawiła przyjętą hipotezę badawczą. Z rozdziału tego jasno wynika, że Doktorantka podjęła się ambitnego i niełatwego zadania opracowania i walidacji multipleksowej metody, wykorzystujące sondy ligacyjne typu *padlock probes*, do identyfikacji lęgniowców z rodzaju *Phytophthora*.

Rozdział „Materiały i metody”, liczący 14 stron, został podzielony na osiemnaście podrozdziałów drugiego, trzeciego i czwartego rzędu. Taka organizacja wewnętrzna tej części pracy w zasadniczy sposób ułatwia studiowanie, podobnie jak schematy pokazujące przebieg procesów czy też sposób działania urządzeń. Należy zaznaczyć, że ryciny objaśniające kolejne etapy realizacji prac zostały samodzielnie opracowane przez Autorkę. Rozdział ten Doktorantka rozpoczęła od charakterystyki badanych izolatów *Phytophthora*, a także izolatów blisko spokrewnionego rodzaju *Pythium* i *Phytopytium* oraz opisu izolacji DNA z czystych kultur i prób środowiskowych: zainfekowanych tkanek, liści pułapkowych i gleby. Podczas studiowania tej części pracy nasunęło mi się pytanie. Jaki był powód użycia różnych zestawów do izolacji DNA dla próbek pochodzących z kolekcji IBL i próbek z kolekcji holenderskich CBS i PRI. W kolejnych podrozdziałach zostały opisane procedury związane z analizą sekwencji fragmentu genu małej podjednostki rybosomowej oraz identyfikacji gatunków za pomocą sond PLP wraz z wizualizacją wyników dwoma metodami: analizy kolorymetrycznej mikromacierzy i fluorymetrycznej z wykorzystaniem cytometru

przepływowego Luminex xMAP. Rozdział ten kończy opis, poprawnie dobranych, analiz statystycznych.

Podsumowując, rozdział „Materiały i metody” ma dobrze zaprojektowaną strukturę. Zaplanowane do przeprowadzenia procedury badawcze zostały opisane jasno i wyczerpująco, umożliwiając powtórzenie badań przez innych autorów.

Rozdział „Wyniki” najobszerniejszy w opracowaniu, liczy 26 stron. Najwartościowsze wyniki uzyskane przez Autorkę odnoszą się, po pierwsze, do optymalizacji metody identyfikacji *Phytophthora*. Wysoką specyficzność i czułość metody uzyskano poprzez optymalizację stężenia: sond PLP, genomowego DNA jak i produktu amplifikacji regionu ITS1 ulegającego hybrydyzacji z sondami. Redukcja cykli ligacji do 10 skróciła o połowę czas hybrydyzacji sond bez straty wydajności, co przekłada się również na koszty. Z kolei redukcja liczby cykli amplifikacji sond (do 20) spowodowała eliminację niespecyficznych, fałszywie pozytywnych wyników. Ważną częścią metody jest wizualizacja wyników, szczególnie możliwość zastosowania mikromacierzy opisana, przez Autorkę, w prezentowanej formie po raz pierwszy. Równie ważnym wynikiem jest wykazanie przydatności zaprojektowanej metody do analizy prób DNA będących mieszaniną materiału genetycznego różnych gatunków mikroorganizmów, w tym należących do rodzaju *Phytophthora*, a także wykazanie, że stosowanie jedynie sekwencji ITS1, jako markera do identyfikacji blisko spokrewnionych ze sobą gatunków, jest niewystarczające.

Tabele i ryciny w tej części pracy są odpowiedniej wielkości, dobrze skomponowane i zrozumiałe. Drobnym błędem wystąpił w numeracji tabel. Tabela na stronie 47 powinna mieć numer 7 a nie 1. Wyniki podane są w sposób uporządkowany, jednoznaczny i potwierdzają uzyskanie przez Doktorantkę postawionych celów.

Rozdział szósty „Omówienie wyników i dyskusja” stanowi bardzo ważną część pracy, świadczącą z jednej strony o znajomości literatury związanej z tematem rozprawy, a z drugiej pokazuje umiejętność krytycznej oceny uzyskanych wyników jako konkluzji do formułowania wniosków. Pani mgr inż. Katarzyna Sikora wręcz wzorcowo opracowała ten rozdział. Przedstawiła kolejne reakcje biochemiczne składające się na opracowaną przez nią metodę identyfikacji *Phytophthora*, również w aspekcie jej optymalizacji i walidacji, na tle wyników uzyskiwanych przez innych autorów. Wskazała własne rozwiązania zastosowane w metodzie oraz ograniczenia w jej zastosowaniu. Z przeprowadzonej dyskusji jasno wynika, że Autorka ma pełną świadomość złożoności czynników wpływających na uzyskiwane wyniki w reakcjach biochemicznych składających się na opracowaną metodę identyfikacji

Phytophthora. Na koniec drobna uwaga edytorska. Zamieszczona w tym rozdziale rycina powinna mieć numer 30, a nie 1, a w jej podpisie zastosowano niewłaściwy przypadek.

Pracę kończy dwustronicowy rozdział siódmy – „Podsumowanie i wnioski”. Autorka zamieściła tu 5 logicznych, dobrze skonstruowanych wniosków. Treść poszczególnych wniosków jest wynikiem przeprowadzonych badań i wskazuje zarówno na przydatność metody identyfikacji *Phytophthora* za pomocą sond PLP jak i jej ograniczenia.

Wniosek końcowy

Uważam, że praca mgr inż. Katarzyny Sikory, przedstawiona jako praca doktorska stanowi samodzielny dorobek naukowy z zakresu leśnictwa. Doktorantka poprawnie przedstawiła problem badawczy, zaprojektowała i zrealizowała badania, wykazała się umiejętnością interpretacji otrzymanych wyników i znajomością literatury. Zrealizowanie badań świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym jak również posiadaniu kwalifikacji praktycznych wymaganych do prowadzenia badań naukowych.

Przedstawione w recenzji drobne usterki, w większości, mają charakter edytorski i można je bez trudu usunąć. Nie wpływają one na wysoką ocenę recenzowanej pracy. Samodzielnym osiągnięciem naukowym Autorki jest opracowanie techniki, wykorzystującej sondy ligacyjne, do wczesnego wykrywania *Phytophthora* w próbach środowiskowych i identyfikacji gatunków, jej optymalizacja i walidacja oraz zastosowanie metody odczytu wyniku na płytce mikromacierzy unikatowej pod względem wykorzystanych materiałów.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Sikory „Identyfikacja patogenów z rodzaju *Phytophthora* na podstawie analiz DNA” spełnia wymagania obowiązujących przepisów i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na kompleksowość opracowania oraz osiągnięcie wyników badań ważnych z poznawczego punktu widzenia jak i dla praktyki leśnej stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.