

Poznań 19.03.2019.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Zwolińskiej pt.:

„WYSTĘPOWANIE I CHARAKTERYSTYKA FITOPLAZM NA WYBRANYCH ROŚLINACH ROLNICZYCH”

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego pod kierunkiem: prof. IOR-PIB dr hab. Nataszy Borodynko-Filas, oraz promotora pomocniczego: dr Krzysztofa Krawczyka.

Doktorantka podjęła się trudnego zadania polegającego na scharakteryzowaniu pod względem genetycznym populacji fitoplazm z wybranych miejscowości zachodniej Polski. Poza badaniami patogena wykazała jego szkodliwość na wielu roślinach rolniczych, ważnych gospodarczo.

Bakterie fitopatogeniczne – fitoplazmy są niewielkich rozmiarów, namnażają się w łyku roślin, a także w hemolimfie owadów, które są ich wektorami. Dotyczy to głównie skoczków, owadów z rzędu piewików.

Ponieważ choroba powodowana przez fitoplazmy corocznie przyczynia się do strat w plonie nasion, w warunkach Polski, stąd słusznie doktorantka podjęła badania nad patogenem w polskim środowisku rolniczym.

Ponadto, jak podaje doktorantka, doniesienia o nasileniu występowania chorób fitoplazmatycznych w Europie południowej i zachodniej oraz przypadki infekcji obserwowane na grochu i rzepaku w Polsce, były przyczyną do podjęcia badań uwzględniających naturalne rezerwuary patogena – chwasty. Doktorantka podjęła także badania zróżnicowania oraz przynależności taksonomicznej fitoplazm.

Materiał badawczy obejmował głównie rośliny rolnicze z objawami infekcji fitoplazmatycznych, z wyróżnieniem: fyllodiów, staśmiej, żółknięcia, zaczerwienienia, karłowatego wzrostu, rośliny pokroju miotlastego, a także zwartego pokroju z gęstym ulistnieniem.

Materiał roślinny stanowiły zebrane podczas obserwacji polowych egzemplarze rzepaku, pszenicy oraz marchwi bez objawów porażenia fitoplazmami, a także rośliny dziko rosnące w otoczeniu pól *B. napus* z objawami lub bez widocznych objawów chorobowych.

Fitoplazmy badano głównie przy pomocy metod wykorzystujących techniki molekularne.

Identyfikację i ich charakterystykę przeprowadzono wg schematu: izolacja całkowite DNA roślin porażonych oraz kontrolnych, amplifikacja DNA z zastosowaniem specyficznych starterów, sekwencjonowanie uzyskanych fragmentów, porównanie otrzymanych sekwencji z sekwencjami zapisanymi w Banku Genów.

Zaszeregowanie fitoplazm, na podstawie grup rybosomalnych określono po analizie restrykcyjnej genu kodującego 16S rRNA.

Ponadto charakterystykę izolatów z rzepaku przeprowadzono w oparciu o gen kodujący białko homologiczne do białek efektorowych SAP54 i PHYL1, białek odpowiedzialnych za powstawanie fyllodiów.

Identyfikowano także izolaty z pozostałych roślin rolniczych namnażając gen *tuf* kodujący czynnik elongacji Tu.

Po przeprowadzonych badaniach na 79 polach rzepaku ozimego w zachodniej Polsce stwierdzono, że nasilenie występowania fyllodiozy na *B. napus* wynosi około 0,1%. W większości przypadków czynnikiem sprawczym choroby były fitoplazmy należące do gatunku '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-B, chociaż stwierdzono także porażenia szczepem 16SrI-(B/L)L, wcześniej nie opisanego jako patogen *B. napus*.

Obserwowano również objawy staśmionych pędów, ale nie zawsze identyfikowano w nich fitoplazmy, odnotowano to w większości przypadków. W pracy udokumentowano brak dodatniej korelacji dla podanej cechy.

Po analizach sekwencji genu kodującego 16S rRNA izolatów fitoplazm z rzepaku, wykazano obecność zmiennych nukleotydów w pozycjach 948, 969 i 1176 fragmentu P1/P7, ale nie odnotowano dodatniej korelacji pomiędzy tymi substytucjami dla fenotypowych typów fyllodiów.

Po reakcji PCR z zaprojektowanymi przez autorkę starterami, w genomie fitoplazmy fyllodiozy rzepaku (RP, izolat RzW14) zidentyfikowano gen SAP54_RP kodujący białko homologiczne do efektorów SAP54 i PHYL1. Obecność genu o identycznej sekwencji potwierdzono również w chromosomie fitoplazmy pochodzącej z marchwi, aksamitki i skoczka sześciorka.

Genotypowanie kolekcji izolatów z rzepaku ozimego z objawami fyllodiów ze starterami komplementarnymi do rejonów oskrzydających gen SAP54_RP wykazało, że rośliny pochodzące z różnych rejonów Wielkopolski porażone były zawsze przez fitoplazmę posiadającą wspomniany gen, niezależnie od typu wywoływanych fyllodiów.

Natomiast fitoplazmy zasiedlające *B. napus* bezobjawowo nie posiadały tego genu.

Autorka udowodniła, że sekwencja nukleotydów SAP54_RP była w 100% zgodna z homologiczną sekwencją efektora szczepu AY2192, z Niemiec. Sekwencje aminokwasów SAP54_RP wydzielanej części peptydu była identyczna z sekwencją białek szczepów '*Ca. Phytoplasma asteris*', a także różniła się jednym aminokwasem w przypadku szczepu '*Ca. Phytoplasma pruni*' lub dwoma aminokwasami w przypadku szczepu '*Ca. Phytoplasma phoenicium*' (PEY) czy fitoplazmy '*Ca. Phytoplasma asteris*' infekującej rzepak w Kanadzie.

Autorka wykazała także na podstawie układu drzewa filogenetycznego rozejście ewolucyjne homologicznych białek spokrewnionych szczepów grupy 16SrI do pięciu różnych klastrow, a otrzymane wyniki wskazują, że grupowanie homologów SAP54/PHYL1 jest niezależne od grupy rybosomalnej, do jakiej należą dane szczepy patogena.

Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły skuteczność zaprojektowanych starterów w powielaniu genu białka SAP54_RP, pozwalając na stwierdzenie obecności przypuszczalnego genu wirulencji w izolatach fitoplazm. Zaprojektowane przez autorkę startery pozwalają na odróżnienie patogenicznych od niepatogenicznych szczepów fitoplazm wobec rzepaku.

Praca obejmowała także obserwacje w doświadczeniach polowych wskazując, że porażenie fitoplazmami upraw *B. napus* może sięgać 0,28 % w systemie bezorkowym. Z kolei w systemie orkowym z poplonem gorczycy i roślinami strączkowymi, można w istotny sposób obniżyć wystąpienie patogena.

W ramach badań, po raz pierwszy na świecie, zidentyfikowano fitoplazmę '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-B na kalafiorze, gorczycy, grochu i łubinie oraz fitoplazmę '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-L na buraku cukrowym, grochu i kukurydzy.

Wykazano także, że uprawy pszenicy mogą być bezobjawowo zasiedlane przez fitoplazmy. Autorka rozprawy po raz pierwszy w Polsce wykryła fitoplazmę '*Ca. Phytoplasma asteris*' 16SrI-B na pszenicy i marchwi w Polsce, oznaczyła także patogena w roślinach ozdobnych.

Analiza wariantów genetycznych 16S rDNA fitoplazm infekujących marchew i buraki cukrowe wykazała zmienność pomiędzy dwoma operonami rybosomalnymi w badanych izolatach. Zarówno izolaty z marchwi, jak i buraka posiadały cztery warianty genu 16S rRNA, co wskazuje na mieszaną infekcję fitoplazm posiadających heterogeniczne operony rRNA.

Przeprowadzone przez doktorantkę badania dowiodły, że na utrwalenie populacji fitoplazm w agrocenozie *B. napus* mogą mieć duży wpływ chwasty z okolicznych upraw.

Fitoplazmy należące do podgrup 16SrI-B i 16SrI-(B/L)L, które powszechnie występują na rzepaku ozimym, zidentyfikowano u dziesięciu gatunkach chwastów:

- 1/ chwastnicy jednostronnej,
- 2/ życicy trwałej,
- 3/ rdeście ptasim,
- 4/ stulizmu lekarskim,
- 5/ fiołku polnym,
- 6/ marunie bezwonnej,
- 7/ rumianku bezłodygowym,
- 8/ powoju polnym,
- 9/ gwiazdnicy pospolitej
- 10/ maku polnym.

Po wykonaniu analiz molekularnych wykazano, że fitoplazmy były obecne w około 22% testowanych roślin dziko rosnących, a ponad 35% chwastów było nosicielami patogena bez widocznych objawów infekcji fitoplazmatycznej.

Na wspomnianych chwastach wykryto fitoplazmy należące do trzech blisko spokrewnionych podgrup.

W badaniach, po raz pierwszy w Polsce, zidentyfikowano fitoplazmy na następujących roślinach dziko rosnących: rdest ptasi, stulizm lekarski, powój polny, chwastnica jednostronna, kupkówka pospolita, miotła zbożowa, perz właściwy, wiechlina roczna, życica trwała, fiołek polny, bodziszek drobny, chaber bławatek, gwiazdnica pospolita, maruna bezwonna, mak polny oraz rumianek bezłodygowy.

W *Dactylis glomerata* L. wykryto nową podgrupę rybosomalną fitoplazm w obrębie taksonu '*Ca. Phytoplasma asteris*', różniącą się profilem restrykcyjnym (powyżej 9% zróżnicowania).

Na podstawie otrzymanych wyników bezobjawowych infekcji rzepaku, marchwi, pszenicy oraz licznych gatunków chwastów można stwierdzić, że fitoplazmy są znacznie bardziej rozpowszechnione środowisku rolniczemu w Polsce niż dotychczas sądzono.

Autorka w swojej bardzo obszernej dysertacji doktorskiej (185 str.), prawidłowo zapisała wszystkie rozdziały wymagane dla tego typu opracowań.

Wszystkie powyższe problemy zostały przez doktorantkę wzorowo opracowane poczynając od wstępu, poprzez: postawione cele, obszerny przegląd literatury (328 pozycji w tym dwie pozycje powtórzone 326), materiały, metody oraz wyniki. Następne rozdziały: dyskusja, wnioski, wspomniana bogata literatura i streszczenie, również opracowano bardzo dobrze.

Przy tak obszernej pracy, o czym wspomniano, trudno o uniknięcie błędów, których oprócz pomylek literowych i interpunkcyjnych było i tak bardzo mało.

Niektóre z nich przedstawiam:

Str. 13. Fot. 1. Jensen S. G. i in. 2009, brak w spisie literatury.

Str. 14. Brak autora „Ryciny 1.”

Str. 21. Brak autora Fot. 2.

Str. 25. Brak opisu fotografii (Fot. 2 A, B, C)

Autorka podaje, że cyt. „W toku wcześniejszych badań własnych wykazano, że fitoplazmy wykrywa się zarówno w roślinach z całkowitym przekształceniem kwiatów w fyllochia, prowadzącym do niezawijania łuszczyń, jak i w roślinach wykazujących deformacje typu staśmien. W pierwszym przypadku DNA fitoplazmatyczne wykrywano w blisko 100% badanych roślin, natomiast tylko w 30% roślin z objawami staśmienia. Dodatkowo w drugim przypadku wymagana była czulsza metoda detekcji oparta o dwie rundy reakcji PCR (zagnieżdżony-PCR). Oznacza to, że komórki fitoplazm bywają również obecne w staśmienach, jednakże w mniejszych ilościach, stąd potrzeba zastosowania czulszych metod diagnostycznych (Zwolińska i in., 2011b).”

Proszę o komentarz do stwierdzonej sytuacji i wytłumaczenie, dlaczego można uzdrowić porażone rośliny rzepaku in vitro stosując antybiotyki, a staśmione pozostają staśmione.

Oraz czy doktorantka posiada wiedzę na temat dziedziczenia staśmien u roślin rzepaku?

Str. 35. Fot. D. Przedstawione staśmienia to nie efekt zmian fenotypowych rzepaku charakterystycznych dla porażen fitoplazmami. Wymaga weryfikacji.

Str. 45. Kto wykonał schemat przedstawiający fragment operonu rybosomalnego.... podać autora.

Str. 58. Proszę zdecydować: czy podać autorów opracowania programów komputerowych, czy strony www. W dobie dostępności programów informatycznych pewniejszą drogą jest podanie stron internetowych.

Str. 59. W pracy podano cyt. „Łącznie przeprowadzono lustrację 79 pól z uprawą rzepaku i zebrano 70 próbek roślin. Ocenę nasilenia występowania fitoplazm na uprawach rzepaku prowadzono w oparciu o zliczanie widocznych, chorych roślin, w trzech prostokątach o wymiarach 10 x 50 m i wyliczenie średniej arytmetycznej.

A jak postępowano w sytuacji, kiedy fitoplazmy występowały miejscowo - placowo?

Str.79. cyt. „Podobieństwo sekwencji z sekwencjami homologicznymi badano stosując program BLAST oraz analizę filogenetyczną. Dopasowanie sekwencji utworzono w programie ClustalW, a następnie użyto je do budowy drzewa w programie MEGA7 stosując algorytm Neighbour-Joining.

Sekwencję nukleotydów genu SAP54_RP uzyskaną z izolatu Rz.W14 przepisano na sekwencję aminokwasów w programie ExPASy i wytypowano rejon peptydu sygnałnego za pomocą SignalP 3.0 **stosując model sieci neuronowych** oraz ukryte modele Markowa (ang. Neural networks, Hidden Markov models). Badaną sekwencję zestawiono z sekwencjami aminokwasów białek homologicznych w programie BioEdit, w celu oceny ich zróżnicowania.

Uzyskane sekwencje nukleotydów białka homologicznego względem SAP54/PHYL1 i rejonów oskrzydlających, posłużyły do zaprojektowania starterów umożliwiających przeprowadzenie genotypowania izolatów rzepakowych pod kątem występowania i zróżnicowania genu SAP54_RP

Proszę o komentarz do użytych SSN (sztuczne sieci neuronowe) w celu wytypowania peptydu sygnałnego. (np.: uczenie Kohonena czy sieć z nauczycielem lub bez lub użycie sieci warstwowej)

W spisie literatury w dwóch miejscach literatura została powtórzona (ten sam zapis)

Poz. 126 i 128 oraz poz. 159 i 160.

Str. 147 Lee i in. 1998 nie zapisano czy chodzi o pozycję „a” czy „b”.

Wnioski końcowe

Drobne błędy zaznaczono w rozprawie. Ilość i ich jakość w żaden sposób nie może mieć wpływu na ostateczną ocenę całej pracy, która jest bardzo dobra.

Oryginalność, wiedza teoretyczna, samodzielność i umiejętności wykonawcze doktorantki, wskazują na jej dużą dojrzałość naukową. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie agronomii. Powyższa ocena w pełni odpowiada wymogom stawianym przez USTAWĘ z dnia 18 marca 2011r., Art. 13. 1., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Ponadto za wzorowe opracowanie przez Panią mgr Agnieszkę Zwolińską rozprawy doktorskiej, która w pełni spełnia warunki nowatorstwa, stawiam wniosek do Rady Naukowej IOR-PIB o jej wyróżnienie i dopuszczenie mgr Agnieszki Zwolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. IHAR PIB dr hab. inż. Michał Starzycki

(Wybrane cyt. USTAWA z dnia 18 marca 2011r., Art. 13. 1. Rozprawa doktorska, przygotowywana pod opieką promotora albo pod opieką promotora i promotora pomocniczego, o którym mowa w art. 20 ust. 7, powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub oryginalne dokonanie artystyczne oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej lub artystycznej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej. 2. Rozprawa doktorska może mieć formę maszynopisu książki, książki wydanej lub spójnego tematycznie zbioru rozdziałów w książkach wydanych, spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki na podstawie przepisów dotyczących finansowania nauki, jeżeli odpowiada warunkom określonym w ust. 1.).