

Dr hab. Mirosława Cieślińska, prof. nadzw.
Zakład Fitopatologii
Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice
e-mail: mirosława.cieslinska@inhort.pl
tel. 46 8345236

Skierniewice, 21.03.2019 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Agnieszki Zwolińskiej pt. „Występowanie i charakterystyka fitoplazm na wybranych roślinach rolniczych”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Zwolińskiej została wykonana w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Nataszy Borodynko-Filas, prof. nadzw. IOR-PIB jako promotora oraz dr Krzysztofa Krawczyka, który pełnił funkcję promotora pomocniczego.

Podjęcie tematyki badawczej dotyczącej fitoplazm różnych gatunków roślin uprawnych i dzikorosnących uważam za słuszne i uzasadnione. Patogeny te, są problemem w produkcji roślinnej szczególnie w krajach południowej Europy, lecz coraz częściej wykrywane są również w różnych gatunkach roślin w Polsce. Ma to związek nie tylko ze zmianami klimatycznymi i nieświadomym sprowadzaniem z zagranicy materiału roślinnego porażonego przez fitoplazmy, ale również z coraz powszechniejszym wykorzystywaniem czułych metod diagnostycznych.

Fitoplazmy ze względu na swoją szkodliwość stanowią poważne zagrożenie w nasadzeniach wielu gatunków roślin uprawnych, w tym ważnych gospodarczo dla niektórych rejonów świata. Przykładem może być epidemiczne występowanie '*Candidatus Phytoplasma palmae*' w uprawach palm kokosowych w krajach afrykańskich lub na Karaibach, będące przyczyną ogromnych strat ekonomicznych. W Europie, z kolei, problemem są fitoplazmy występujące w uprawach winorośli, w tym kwarantanna fitoplazma wywołująca chorobę flavescentia dorée lub też epidemicznie występujące ogniska fitoplazmatycznego zamierania gruszy i proliferacji jabłoni.

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Zwolińskiej obejmuje 185 stron i zawiera bardzo obszerną dokumentację składającą się z 35 rycin (w tym rysunki, wykresy, dendrogramy), 15 fotografii oraz 15 tabel. Praca została podzielona na rozdziały: wstęp, cele pracy, przegląd literatury, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz zawiera jeden załącznik.

Tytuł rozprawy jest niezbyt zręcznie sformułowany („wybrane rośliny” zamiast „wybrane gatunki roślin”). Ponadto sugeruje, że praca dotyczy tylko fitoplazm porażających gatunki

roślin rolniczych, a nie uwzględnia chwastów, które również były obiektem badań. Tytuł mógłby brzmieć: „Występowanie i charakterystyka fitoplazm porażających wybrane gatunki roślin uprawnych i dziko rosnących”.

We **wstępie**, w oparciu o literaturę, Doktorantka krótko przedstawiła najważniejsze zagadnienia dotyczące biologii fitoplazm, ich występowania i szkodliwości oraz metodach wykrywania i identyfikacji.

Celem badawczym pracy były:

- ocena występowania fitoplazm na wybranych roślinach rolniczych uprawianych w Polsce;
- identyfikacja i charakterystyka molekularna wykrytych izolatów fitoplazm;
- identyfikacja gatunków chwastów mogących być rezerwuarami fitoplazm;
- ocena skuteczności ograniczania występowania fyllodiozy rzepaku w integrowanej ochronie roślin;
- ocena wirulencji fitoplazm porażających rzepak na podstawie występowania i zróżnicowania genu SAP54_RP;
- opracowanie metody wykrywania szczepów fitoplazm wywołujących fyllodiozę rzepaku ozimego.

Przegląd literatury świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia oraz umiejętności przedstawienia przez Doktorantkę najważniejszych wyników badań prezentowanych w piśmiennictwie. Mgr A. Zwolińska zaprezentowała obszerny przegląd literatury dotyczącej fitoplazm rzepaku, marchwi, buraka cukrowego, ziemniaka i kukurydzy oraz krótko przedstawiła doniesienia na temat tych patogenów porażających inne gatunki roślin (gorczyca, kalafior, bób, groch, łubin, lucerna, pszenica), które były badane w tej pracy na obecność fitoplazm. W rozdziale tym Doktorantka uwzględniła również fitoplazmy występujące m.in. na brokule i koniczynie, które nie były przedmiotem badań zaprezentowanych w pracy doktorskiej, pominęła jednak informacje dotyczące występowania i charakterystyki fitoplazm porażających aksamitkę i jałowiec, które wykryła fitoplazmy w czasie realizacji prezentowanych badań.

W podrozdziale 3.6. należało podkreślić, że fitoplazmy przenoszone są przede wszystkim podczas wegetatywnego rozmnażania porażonych roślin. Informacja taka znajduje się w części 3.6.4., ale dotyczy przenoszenia fitoplazm w warunkach *in vitro*.

Rozdział **Materiały** został opisany krótko i dotyczył zarówno materiału roślinnego, szczepów referencyjnych wykorzystanych w analizach porównawczych, szczepu bakteryjnego użytego do klonowania, oraz odczynników chemicznych, enzymów, mieszanin reakcyjnych, gotowych zestawów do badań molekularnych, wzorców mas, składników podłoży hodowlanych, żelu do elektroforezy, roztworów i buforów oraz oligonukleotydów. W

rozdziale tym, Doktorantka wymieniła również bazy danych i programy bioinformatyczne, z których korzystała przy analizowaniu uzyskanych wyników badań.

Mam drobną uwagę do punktu 4.2, w którym powinny być również uwzględnione szczepy referencyjne fitoplazm z podgrupy 16SrI-B, gdyż były one przedmiotem analiz filogenetycznych (ryciny 22, 33 - szczep HM561990).

Rozdział **Metody** został opisany w 20 podrozdziałach obejmujących m.in.: zbiór prób do badań, izolację całkowitego DNA z zebranych prób roślinnych, amplifikację DNA fitoplazm w dwustapowej reakcji PCR, analizę sekwencji uzyskanych fragmentów genomu (gen 16S rRNA, a w przypadku rzepaku również gen *tuf*), analizę filogenetyczną, a dla genu 16S rRNA również wirtualną analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). W rozdziale tym, Doktorantka również szczegółowo opisała metodykę amplifikacji nieznanych sekwencji genomowego DNA fitoplazm oraz ocenę zróżnicowania genu SAP54_RP izolatów fitoplazmy wykrytej w rzepaku. Poza badaniami laboratoryjnymi, mgr A. Zwolińska wykonała doświadczenia polowe mające na celu ocenę wpływu zmianowania i agrotechniki na występowanie fitoplazm w uprawie rzepaku ozimego. Rozdział „Metody” został zilustrowany schematami i fotografiami pól, z których pobierano próby do badań.

Do tego rozdziału pracy doktorskiej mam kilka uwag.

Ani w podrozdziale 4.1. „Materiał roślinny”, ani w rozdziale „Metody” w części opisanej w punkcie 5.1.3. nie są wymienione gatunki roślin uprawnych oraz chwastów, z których pobierano próby do badań. Takie informacje znajdują się dopiero w rozdziale „Wyniki”. Można byłoby te dane przedstawić w tabeli (tabelach) i zamieścić je w części 4.1. „Materiał roślinny”, uwzględniając polskie i łacińskie nazwy gatunkowe roślin (nie trzeba byłoby podawać łacińskich nazw w kolejnych tabelach np. tab. 13, s. 123 i tab. 14, s. 125), ich przynależność do rodziny botanicznej, miejsce zbioru próby, liczbę pobranych prób. W rozdziale „Wyniki” z kolei, tabele takie mogłyby zawierać polskie nazwy porażonych roślin, nazwę izolatu, obserwowane objawy, liczbę prób pobranych i tych, w których wykryto fitoplazmę, klasyfikacji wykrytej fitoplazmy do grupy 16Sr oraz numery dostępu sekwencji zgłoszonej do GenBank (częściowo na wzór tabeli 9).

Nasuwa się pytanie czy próby do badań na obecność fitoplazm w marchwi pobierano w każdym z pięciu terminów z tych samych 50 roślin (dwa liście, z dwóch roślin w jednym punkcie) rosnących na plantacji w okolicach Środy Wielkopolskiej (podrozdział 5.1.2., s. 60-61)?

Nie jest wyjaśnione skąd w badaniach wzięły się matryce DNA do amplifikacji homologa białek SAP54/ PHYLL1 (tabele 4, 5 i 8, s. 76, 77, 81). Czy wszystkie wymienione tam izolaty fitoplazm (z roślin i skoczaków) były wykryte w ramach prezentowanych badań? Jaką metodę zastosowano do izolacji DNA z owadów?

Tabele 4, 5 i 8 zamieszczone w metodyce, nie powinny zawierać wyników dotyczących identyfikacji szczepów, które uzyskano w trakcie prowadzonych badań. Nie jest jasne, czy wszystkie wymienione w tych tabelach izolaty były pozyskane w trakcie prezentowanych badań, czy też były przedmiotem wcześniejszych prac.

W rozdziale **Wyniki**, Doktorantka szczegółowo opisała i zilustrowała przy pomocy fotografii, tabel i wykresów rezultaty swoich badań. Ich zakres był bardzo szeroki i obejmował szereg doświadczeń. Badania wykazały, że średnio ok. 0,1% roślin rzepaku na 79 lustrowanych plantacjach wykazywały objawy fyllodiozy. Chociaż trudno w tym przypadku wnioskować o epidemicznym występowaniu choroby, to jednak zważywszy na obecność skoczków, które są wektorami fitoplazm z grupy żółtaczki astra, istnieje zagrożenie dalszego rozprzestrzeniania choroby, a co za tym idzie, znaczenie gospodarcze tych patogenów w uprawach rzepaku może wzrastać. W próbach zebranych z chorych roślin rzepaku, Doktorantka identyfikowała '*Candidatus Phytoplasma asteris*', które zaklasyfikowała do dwóch podgrup 16SrI-B i 16SrI-(B/L)L. Ta ostatnia podgrupa fitoplazm nie była dotychczas opisywana jako patogeny porażający rzepak. Uzyskane wyniki wnoszą więc nową wartość do wiedzy dotyczącej zakresu roślin żywicielskich fitoplazm z podgrupy (B/L)/L grupy żółtaczki astra. Mgr A. Zwolińska, badając zależność między zróżnicowaniem genetycznym fitoplazm porażających rzepak a typem fyllodiów rozwijających się na chorych roślinach, nie stwierdziła związku między tymi czynnikami.

Przedmiotem wnikliwych i ciekawych badań był zidentyfikowany przez Doktorantkę gen SAP54_RP kodujący białko homologiczne do białek efektorowych SAP54 i PHYI.1, które prawdopodobnie mają związek z tworzeniem się różnego rodzaju fyllodiów u rzepaku. Mgr Agnieszka Zwolińska zaprojektowała specyficzne do tego regionu startery i wykazała ich przydatność do odróżniania izolatów patogenicznych i niepatogenicznych dla rzepaku. Z prób pobranych ze zdrowych roślin rzepaku, nie był amplifikowany ten fragment DNA, zaś jego obecność stwierdzano w niektórych (lecz nie we wszystkich badanych) roślinach wykazujących objawy staśmienia pędów.

Obecność genu o identycznej sekwencji, Doktorantka wykryła również analizując fragment genomu fitoplazmy znalezionej w marchwi, aksamitee i skoczku sześciorku, który jest wektorem '*Ca. Phytoplasma asteris*'. Na podstawie wykonanych analiz porównawczych, mgr A. Zwolińska nie stwierdziła zależności sekwencji nukleotydów genu SAP54_RP od gatunku rośliny i rejonu geograficznego, z którego pochodziły wykryte fitoplazmy. Ponadto, wykazała brak związku pomiędzy grupowaniem homologów SAP54/PHYI.1 różnych fitoplazm, a przynależnością tych patogenów do określonych grup rybosomalnych (16Sr).

Doświadczenia polowe mające na celu ocenę wpływu zmianowania i agrotechniki na występowanie fitoplazm wykazały, że uprawa rzepaku ozimego w systemie orkowym z poplonem gorczycy i włączeniem roślin strączkowych do zmianowania, w istotny sposób

obniżała wystąpienie fitoplazm. Jest to cenna wskazówka dla praktyki, szczególnie w rejonach zagrożonych wystąpieniem fitoplazm w uprawach rzepaku.

Badania innych gatunków roślin uprawnych wniosły nowe, dotychczas nie publikowane w literaturze światowej informacje o występowaniu fitoplazm z grupy żółtaczki astra, podgrupy 16SrI-B w kalafiorze, gorczycy, grochu i łubinie oraz podgrupy 16SrI-L w buraku cukrowym, grochu i kukurydzy. Rośliny tych gatunków wykazywały objawy charakterystyczne dla chorób wywoływanych przez fitoplazmy. Pomimo że nie obserwowano żadnych symptomów chorobowych na roślinach pszenicy, Doktorantka zidentyfikowała w niektórych z badanych prób fitoplazmę z podgrupy 16SrI-B, co również stanowi nową wartość naukową. Mgr A. Zwolińska wykryła również '*Candidatus Phytoplasma asteris*' z podgrupy 16SrI-(B/L)I. w aksamitce rozpierzchłej oraz fitoplazmę z podgrupy 16SrI-B w jałowcu i, w swoich rozważaniach zasugerowała, że gatunki tych roślin mogą być rezerwuarem fitoplazm.

Analizując region 16S rDNA fitoplazm, Doktorantka wykazała zróżnicowanie genetyczne pomiędzy dwoma operonami rybosomalnymi w badanych izolatach wykrytych w marchwi i buraku cukrowym. Stwierdziła obecność czterech różnych wariantów genu 16S rRNA tych izolatów, co wskazuje na mieszaną infekcję fitoplazm posiadających heterogeniczne operony rRNA.

Pomimo, że analiza genu *tuf* kodującego czynnik elongacji Tu, zazwyczaj umożliwia dokładniejsze zróżnicowanie izolatów fitoplazm, niż analiza genu 16S rRNA, Doktorantka stwierdziła, że sekwencje genu *tuf* były identyczne, niezależnie od tego do której podgrupy 16Sr zaklasyfikowano wykryte izolaty '*Ca. Phytoplasma asteris*'.

Mgr Agnieszka Zwolińska w swoich badaniach wykazała znaczenie chwastów jako potencjalnego źródła infekcji fitoplazmatycznych. Na podstawie wyników analizy sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA, Doktorantka, po raz pierwszy w Polsce zidentyfikowała fitoplazmy w 16 gatunkach roślin dzikorosnących, do których należały: rdest ptasi, stulisz 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 dziesięciu z nich (chwastnicy jednostronnej, życicy trwałej, rdeście ptasim, stuliszu lekarskim, fiołku polnym, marunie bezwonnej, rumianku bezłodygowym, powoju polnym, gwiazdnicy pospolitej oraz maku polnym) wykryła fitoplazmy z podgrup 16SrI-B i 16SrI-(B/L)I, które występowały w roślinach rzepaku ozimego, co pośrednio dowodzi roli tych chwastów jako rezerwuarów fitoplazm. Ponadto, Doktorantka zidentyfikowała fitoplazmy z innych podgrup grupy żółtaczki astra: 16SrI-C w wiechlinie rocznej i chwastnicy jednostronnej oraz 16SrI-L w chabrze bławatku, wiechlinie rocznej, miotle zbożowej, fiołku polnym, stuliszu lekarskim, życicy trwałej, perzu właściwym i rdeście ptasim. Ciekawym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę było zidentyfikowanie fitoplazmy z grupy stolburu, podgrupy 16SrXII-H, '*Ca. Phytoplasma convolvuli*' w powoju polnym.

Na wielu gatunkach chwastów, a także na roślinach marchwi, rzepaku i pszenicy porażonych fitoplazmami nie występowały objawy chorobowe, co, według Doktorantki, może być związane z występowaniem w niektórych z tych roślin izolatów, które nie posiadają genu SAP4_RP przypuszczalnie związanego z wirulencją.

Do tej części doktoratu mam pewne uwagi.

Z informacji zawartych w tabeli 9 (s. 89 i 90) wynika, że zsekwencjonowano 12 izolatów fitoplazm wykrytych w roślinach rzepaku ozimego. Czy któraś z odczytanych sekwencji została zgłoszona do bazy danych? Co oznacza ukośna kreska (/) w kolumnie „Fenotyp” tej tabeli? W legendzie oznaczenie to wyjaśnione jest określeniem „nie badano”, lecz nie jest ono zrozumiałe w kontekście rodzaju objawów obserwowanych na chorych roślinach.

W tabeli 12, powinny się znaleźć nazwy izolatów fitoplazm wykrytych w próbach pobranych z wymienionych gatunków roślin uprawnych, co znacznie ułatwiłoby śledzenie treści pracy bez konieczności wyszukiwania tych danych w innych miejscach rozprawy. W jednej z roślin kukurydzy (lokalizacja Skórzewo) wykryto fitoplazmę (wynik testu 1 pozytywna spośród 4 testowanych), lecz nie podano jaką fitoplazmę zidentyfikowano w badanej próbce.

Wyniki przedstawione na rycinie 17 są powtórzeniem tych znajdujących się w tabeli 12. Na stronie 108 błędnie podane jest odniesienie do ryciny 8 w zdaniu dotyczącym zmienności sekwencji w pozycjach 177, 267 i 1259 genu 16S rRNA.

Rycina 21 przedstawia wyniki analizy genów 16S rRNA szczepów fitoplazm z podgrupy 16SrI-B i blisko z nią spokrewnionych pochodzących z bazy danych. Analiza ta nie dotyczyła jednak żadnego z wykrytych w Polsce izolatów, dlatego nie powinna być zamieszczona w rozdziale „Wyniki”, a jedynie może stanowić bazę do dyskusji wyników.

W opisie ryciny 22 należy wyjaśnić co oznaczają kody GAA, GAG, GCG, AAG, ACA i ACG.

W legendzie rycin 22, 23, 24, 25 należałoby zaznaczyć czego dotyczy dendrogram (genu/białka jakich organizmów?).

W metodyce nie ma informacji o analizie *in silico* sekwencji nukleotydów (910 pz) genu *tuf* (s. 116, podrozdział 6.1.2.4.). Jakie narzędzie bioinformatyczne służyło temu celowi? Przedstawione na rycinie 24 drzewo filogenetyczne skonstruowano na podstawie sekwencji nukleotydów 367 pz tego genu. Czy różnica w długości analizowanej sekwencji wynikała z dopasowania długości sekwencji genu *tuf* polskich izolatów do analogicznych sekwencji szczepów zdeponowanych w GenBank?

W podrozdziale 6.1.2.5. „Monitoring porażenia fitoplazmami uprawy marchwi” przedstawione są wyniki reakcji PCR dotyczące wykrywania fitoplazm w marchwi, zatem tytuł tego podrozdziału nie jest adekwatny do jego treści.

W legendzie ryciny 28 przedstawiającej mapę oznaczono lokalizacje, z których pobierano próby z roślin wykazujących objawy chorobowe (o) i nie wykazujących żadnych symptomów

(b). Jednak na mapie nie ma tych oznaczeń, nie jest też zrozumiałe, co oznaczają liczby w nawiasach.

Dlaczego w tabeli 14 fitoplazma porażająca kupkówkę pospolitą została zaklasyfikowana do podgrupy 16SrI-B, skoro analiza genu 16S rRNA wskazywała na jej bliższe pokrewieństwo z fitoplazmami z podgrupy 16SrI-P?

W tekście, Autorka operuje nazwami polskimi roślin, podczas gdy w tabeli często prezentuje łacińskie ich nazwy (s. 126, 128 - polskie, a tab. 15 – łacińskie nazwy chwastów). Aby sprawdzić tożsamość tych nazw trzeba cofać się do tabeli 13, s. 123, co jest kłopotliwe.

W opisie rycin 33 i 34 brakuje informacji, jaki gen był analizowany. Na rycinie 33 zamieszczone są tylko izolaty z różnych podgrup grupy 16SrI, nie zaś "różnych grup rybosomalnych", jak w legendzie zaznaczyła Doktorantka. Brakuje też szczepów referencyjnych z grupy 16SrXII, chociaż w opisie są wymienione. Z kolei, legenda do ryciny 34 nie jest kompletna – brakuje objaśnienia oznaczeń figur geometrycznych i kolorów.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej przeprowadzonych badań, którą oceniam wysoko, lecz wymagają wyjaśnienia lub uzupełnienia.

Dyskusja jest bardzo dobrze przeprowadzona i świadczy o gruntownej znajomości problemów badawczych dotyczących występowania i charakterystyki molekularnej fitoplazm występujących na wielu gatunkach roślin. Mgr A. Zwolińska wykorzystała posiadaną wiedzę przy szczegółowej analizie uzyskanych wyników w zestawieniu z dostępną literaturą przedmiotu. Na szczególną uwagę zasługują rozważania Doktorantki dotyczące genu SAP54-RP związanego z wirulencją szczepów fitoplazm. Dużo miejsca w dyskusji Doktorantka poświęciła również zagadnieniom występowania wariantów genetycznych genu 16S rRNA i ich znaczenia w identyfikacji i klasyfikacji fitoplazm.

Do tej części pracy nie mam zastrzeżeń merytorycznych, a jedynie uwagi dotyczące drugiego akapitu na stronie 137, w którym przedstawiono opis objawów na roślinach rzepaku z odniesieniem do fotografii. Te informacje są już zamieszczone w rozdziale „Wyniki” i nie powinny być zamieszczone w „Dyskusji”. Tylko ostatnie zdanie z tego akapitu może zostać włączone do tego rozdziału.

Na zakończenie rozprawy, mgr A. Zwolińska sformułowała 20 **wniosków** wynikających z przeprowadzonych badań. Niektóre z nich wymagają poprawy.

We wniosku 5, Doktorantka stwierdziła, że rośliny marchwi porażone przez fitoplazmy nie wykazywały objawów. Jak podano na stronie 61 (5. Metody, 5.1. Zbiór próbek, 5.1.2. Inne rośliny rolnicze), podczas lustracji prowadzonych na polu marchwi w okolicach Środy Wielkopolskiej rzeczywiście nie obserwowano symptomów, które wskazywałyby na porażenie przez fitoplazmy. Jednak wyniki przedstawione na rycinie 16 C i 16 F oraz w tabeli 12 wskazują, że na trzech porażonych przez fitoplazmy roślinach tego gatunku obserwowano

objawy chorobowe (zdrobnienie liści, zółknięcie i nadmierny rozwój korzeni przybyszowych).

W przypadku tego wniosku oraz wniosku 4, zamiast słowa „jest” („Pszenica jest bezobjawowo zasiedlana przez fitoplazmy...”) lub „są”, lepiej byłoby użyć słów „mogą być” lub po prostu „były”. W rzeczywistości bowiem nie wiemy, czy marchew i pszenica są tylko i wyłącznie porażane „bezobjawowo” przez fitoplazmy.

Z kolei, we wniosku 6 Doktorantka wyraża opinię, że rośliny buraka, marchwi i łubinu porażane są przez kompleks heterogenicznych szczepów '*Ca. Phytoplasma asteris*' posiadających nieidentyczne geny 16S rRNA, a przecież nie można z całą pewnością stwierdzić, że gatunki te nie są zasiedlane również przez inne szczepy, czy wręcz inne gatunki fitoplazm. Podobnie, należałoby przeformułować wniosek 7 dotyczący porażenia rzepaku ozimego przez szczepy '*Ca. Phytoplasma asteris*' zaklasyfikowanych do dwóch podgrup: 16SrI-B i -(B/L)L oraz wniosek 16, bo przecież nie jest wiadomo, czy rośliny te nie są gospodarzami również innych, niż wykryte przez Doktorantkę fitoplazm.

Większość spośród 323 pozycji zamieszczonych w **spisie literatury** stanowią publikacje opracowane w ostatnich 10 latach, w przeważającej większości anglojęzyczne. Spis zamieszczonych w pracy cytowani świadczy o doskonałym i rzetelnym przygotowaniu pani mgr Agnieszki Zwolińskiej do podjęcia tematyki swojej pracy doktorskiej.

Niektóre z pozycji wymienione są dwukrotnie w spisie literatury (Bertaccini i in. 2002, Chen i in., 2015, Filippin i in. 2009, Kovacevic i in. 2014, Zwolińska i in. 2016).

W końcowej części pracy, Doktorantka zamieściła **Streszczenie** w języku polskim i angielskim zawierające skrócony opis tez badawczych oraz wyników przeprowadzonych badań.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe przedstawionych w rozprawie doktorskiej pani mgr Agnieszki Zwolińskiej uważam:

- zidentyfikowanie po raz pierwszy w świecie '*Ca. Phytoplasma asteris*' z podgrup:
 - 16SrI-(B/L)L w rzepaku, marchwi i łubinie oraz chwastach: fiołka polnego, stulisza lekarskiego, gwiazdnicy pospolitej, powoju polnym i życicy trwałej
 - 16SrI-B w grochu, gorczycy uprawnej, kalafiorze i łubinie oraz chwastach: bodziszk drobnym, rumianku bezłodygowym i marunie wonnej
 - 16SrI-C w wiechlinie rocznej i chwastnicy jednostronnej
 - 16SrI-L w buraku cukrowym, grochu i kukurydzy oraz w chabrze bławatku, fiołku polnym i stulisku lekarskim
 - '*Ca. Phytoplasma convolvuli*' z podgrupy 16SrXII-II w powoju polnym;
- wykrycie, po raz pierwszy w Polsce, '*Ca. Phytoplasma asteris*', podgrupy 16SrI-B w pszenicy;

- zidentyfikowanie fitoplazmy z grupy 16SrI w kupkowiec pospolitej i zaklasyfikowanie jej na podstawie wyników analizy restrykcyjnej (RFLP), do nowej podgrupy w obrębie gatunku '*Ca. Phytoplasma asteris*';
- zidentyfikowanie genu SAP54_RP kodującego białko homologiczne do efektorów SAP54 i PHYL1 oraz określenie jego potencjalnego znaczenia dla wirulencji szczepów '*Ca. Phytoplasma asteris*' porażających rośliny rzepaku;
- opracowanie metody PCR, z wykorzystaniem starterów specyficznych dla genu SAP54_RP, umożliwiającej odróżnienie szczepów fitoplazm związanych z powstawaniem fyllodiów od szczepów nie wywołujących objawów na roślinach rzepaku;
- wykrycie czterech różnych wariantów genetycznych w obrębie genu 16S rRNA heterogenicznych izolatów fitoplazm z marchwi (38-1) i buraka cukrowego (38-4), co według Doktorantki może być wynikiem wystąpienia kompleksu różnych szczepów fitoplazm posiadających różne operony rRNA;
- scharakteryzowanie fitoplazm występujących w chwastach stanowiących potencjalne źródło infekcji dla upraw rzepaku.

Podczas czytania przedstawionej do oceny pracy nasunęło się kilka dodatkowych uwag:

- czy tabela 1 była przygotowana na podstawie danych z literatury? - brakuje odniesienia do publikacji.
- przynależność taksonomiczna fitoplazm opisana jest dwukrotnie (s. 14 i s. 15).
- należy podać pełne nazwy łacińskie *M. quadrilineatus* (s. 19) oraz *R. panzeri* (s. 37), gdyż na podanych stronach są one użyte po raz pierwszy w pracy.
- cytowanie niektórych publikacji jest nieprawidłowe np.: s. 9: Hogenhout i in., 2008 – to nie była pierwsza publikacja, w której opisano system klasyfikacji fitoplazm oparty na sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA; s. 23 i 41: Kamińska, 2004 – w tym miejscu należałoby powołać się na oryginalne publikacje, gdyż cytowana publikacja jest pracą przeglądową.
- brak jest cytowania pracy dotyczącej wykrycia fitoplazm z grupy 16SrIII w malino-jeżynie (s. 23)
- w tekście, na stronach 25, 28-30 oraz 36 pomyłone są numery fotografii.
- brak jest w tekście odniesienia do Fot. 3 H, I, L, M, N, O, P.
- brak jest odniesienia do publikacji, w której prezentowano badania dotyczące zastosowania tetracyklin w zwalczaniu fitoplazm porażających drzewa pestkowe (s. 49).

Doktorantka nie ustrzegła się usterek o charakterze redakcyjnym oraz używania skrótów myślowych lub błędnie użytych pojęć np.: wzrost pojawień fitoplazmy (s. 9), ...fitoplazmy...mogą... ujawniać się w postaci charakterystycznych deformacji (s. 10), wybrane rośliny rolnicze (zamiast „wybrane gatunki roślin”, s. 11), chorób wirusopodobnych

(zamiast „chorób wirozopodobnych”, s. 22-23), pokazały silne utrwalenie choroby (s. 25), wykształciło objawy chorobowe (s. 32), obecność pięciu grup rybosomalnych fitoplazm na polach (s. 33), chloroz na liściach przypominających naturalne starzenie się roślin (s. 34), najistotniejsza ekonomicznie choroba (s. 34), wektorami choroby są owady (s. 36), poziom porażenia pola rzepakowego (s. 63), przetestowanie hipotezy (s. 74), na matrycach rzepakowych (s. 79), zniekształcone w liściaste fyllodia kwiatostany (s. 82), w miejscu 1259 wystąpiło A (zamiast „nukleotyd A”, s. 110).

Wskazane w recenzji komentarze i uwagi krytyczne nie mają wpływu na merytoryczną ocenę pracy i nie obniżają jej walorów naukowych, lecz mogą być wzięto pod uwagę podczas przygotowywania publikacji naukowych. Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Zwolińskiej zawiera wiele cennych danych i wskazuje na dobrze opanowany warsztat naukowy Doktorantki. Uzyskane wyniki wnoszą nowe wartości w dziedzinę wiedzy związanej z fitoplazmami, ich wykrywaniem i charakterystyką właściwości molekularnych. Obok aspektu poznawczego, niewątpliwie mają one również znaczenie użytkowe i dają możliwość dalszego udoskonalania metod diagnostycznych stosowanych w badaniach nad chorobami fitoplazmatycznymi. Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową i umiejętnością analizy i interpretacji uzyskanych wyników, a także dowiodła znajomości technik badawczych i programów bioinformatycznych wykorzystywanych w nowoczesnej fitopatologii.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi zawarte w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Zwolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Grzegorz Cicielewski