

Prof. dr hab. Natasza Borodynko-Filas  
Instytut Ochrony Roślin-PIB  
Klinika Chorób Roślin i Bank Patogenów  
Ul. W. Węgorka 20  
60-318 Poznań

Poznań, 18.02.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Jurgi pt.: „Charakterystyka fitoplazm obecnych w pszenicy i kukurydzy oraz w potencjalnych wektorach”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana i napisana w Zakładzie Fitopatologii i Mykologii, w katedrze Ochrony Roślin na Wydziale Przyrodniczo-Technologicznym Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pod kierunkiem dr. hab. inż. Krzysztofa Matkowskiego, profesora uczelni. Promotorem pomocniczym w przewodzie była dr Agnieszka Zwolińska z Zakładu Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Opracowanie liczy 111 stron, w tym 24 ryciny, 13 tabel i 8 wykresów. Na całość dysertacji składają się: Wstęp, Cel pracy i hipoteza badawcze, Przegląd literatury, Materiały i metody badań, Wyniki i dyskusja oraz Wnioski. Dodatkowo w pracy zawarto cztery nienumerowane rozdziały, są to: Streszczenia, Literatura, Wykaz skrótów oraz Spis wykresów, tabel i rycin. Poszczególne rozdziały zostały w sposób właściwy pod względem merytorycznym podzielone na podrozdziały, a układ pracy jest zgodny z ogólnie przyjętym dla rozpraw naukowych. W numeracji poszczególnych podrozdziałów wkraść się drobny błąd. Do tych samych numerów rozdziałów przypisane zostały różne ich tytuły.

Rozdział 4.1. Materiał roślinny str. 20, a następnie rozdział 4.1. Izolacja DNA str. 23.

Rozdział 4.2 Owady str. 22 i ponownie rozdział 4.2. spektrofotometryczny pomiar stężenia oraz czystości DNA str. 24.

Fitoplazmy to pozbawione ścian komórkowych bakterie, które są sprawcami chorób licznych roślin. Dotychczasowe badania pokazują, że mogą występować we wszystkich strefach klimatycznych, porażając ponad 1 000 gatunków roślin, rośliny jednoroczne, jak i wieloletnie, w tym rośliny ważne gospodarczo oraz chwasty. Rola chwastów nie pozostaje bez znaczenia w epidemiologii wszystkich chorób. Rośliny dziko rosnące mogą być rezerwuarem wszelkich patogenów, które są z przenoszone przez wektory, mechanicznie czy

w trakcie zabiegów wykonywanych na polu, na rośliny uprawne. Obecność fitoplazm potwierdzono między innymi w uprawach rzepaku, winorośli czy palmy kokosowej; porażają one liczne warzywa, rośliny sadownicze i ozdobne. Fitoplazmy nie przenoszą się mechanicznie, a najefektywniej rozprzestrzeniają się poprzez wektory – owady z rzędu piewików.

Doktorantka podjęła się bardzo trudnego, a jednocześnie mało rozpoznanego zadania, mającego na celu scharakteryzowanie populacji fitoplazm zasiedlających pszenicę, kukurydzę oraz wektory owadzie. Wybór tematyki wydaje się jak najbardziej słuszny, ponieważ choroby powodowane przez fitoplazmy przyczyniają się do strat w plonach. Omawiane patogeny stanowią problem w produkcji roślinnej szczególnie w krajach Europy południowej, chociaż coraz częściej wykrywane są również w Polsce, gdzie mogą np. obniżać liczbę wydawanych przez roślinę nasion czy zniekształcać powstające owoce. Nasilenie występowania fitoplazm w ostatnich latach jest zapewne istotnie związane ze zmianami klimatycznymi, które obserwujemy (ciepła i długa jesień sprzyjająca zerowaniu owadów), ale może być również spowodowane mniej lub bardziej świadomym sprowadzaniem z zagranicy materiału roślinnego porażonego przez patogeny. Nie bez znaczenia pozostaje też fakt, że wykorzystywanie w badaniach diagnostycznych coraz czulszych technik przyczynia się do identyfikacji patogenów występujących w roślinach w skrajnie niskich koncentracjach.

Po krótkim wstępie przedstawiającym najważniejsze zagadnienia dotyczące biologii fitoplazm, znaczenia patogena w epidemiologii chorób roślin oraz ich występowania w Polsce, Autorka przedstawia cel badań oraz hipotezy badawcze. Celem badań była ocena zagrożenia przez fitoplazmy dla dwóch upraw (pszenicy i kukurydzy) oraz wskazanie potencjalnych wektorów. Przedstawione hipotezy stanowią, że: (1) fitoplazmy mogą być zagrożeniem dla wymienionych dwóch upraw; (2) podatność tychże upraw na zainfekowanie fitoplazmami jest zróżnicowana; (3) reakcje odmian na zakażenie są zróżnicowane; (4) skoczek sześciorek oraz zglobik smużkowany są wektorami fitoplazm w pszenicy i kukurydzy.

Kolejnym stosunkowo obszernym rozdziałem liczącym 13 stron jest przegląd literatury, który w sposób właściwy podzielony został przez Doktorantkę na 7 podrozdziałów, w których opisana została m.in. klasyfikacja patogena, jego przenoszenie, występowanie czy wykrywanie. Doktorantka w rozdziałach Przegląd literatury oraz Wyniki i dyskusja powołała się 248 pozycji literatury, zarówno starszych, jak i tych najnowszych. Odwołała się również do 3 stron internetowych. Znakomita większość publikacji jest anglojęzyczna, a tylko pojedyncze polskojęzyczne pochodzą z nielicznych ośrodków naukowych zajmujących się badaniami nad fitoplazmami, takich jak Instytut Ogrodnictwa-PIB oraz Instytut Ochrony Roślin-PIB. Można więc uznać, że zebrano całe najważniejsze krajowe i światowe piśmiennictwo związane

z tematyką badań. Przegląd literatury świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia oraz umiejętności zaprezentowania przez Doktorantkę najważniejszych wyników badań uzyskanych i zaprezentowanych przez innych naukowców. W rozdziale tym mgr Marta Jurga w sposób szczegółowy przedstawiła klasyfikację fitoplazm oraz ich wpływ na roślinę żywicielską. Wskazała jako objawy charakterystyczne dla tych patogenów przekształcenie kwiatostanu w liściaste struktury zwane fylloidiami, zdrobnienie i staśmienie łodyg oraz zmiany zabarwienia. Następnie przedstawiła wyniki najnowszych badań naukowych dotyczących efektorów i ich wpływu na roślinę żywicielską po porażeniu przez fitoplazmy oraz przedstawiła sposoby przenoszenia patogena wykazując jako najważniejsze przenoszenie przez owady. Ważnym i szeroko opisanym rozdziałem jest ten dotyczący wykrywania fitoplazm, wskazujący rozwój technik diagnostycznych, począwszy od symptomatologii poprzez mikroskopię elektronową i metodę serologiczną aż po techniki biologii molekularnej takie jak qPCR czy szeroko stosowana w ostatnich latach amplifikacja izotermiczna (LAMP) pozwalająca na wykrycie patogenów roślin w bardzo krótkim czasie i bez konieczności posiadania i stosowania specjalistycznych sprzętów.

Kolejny rozdział - Materiały i metody, został opisany w 24 podrozdziałach obejmujących: zbiór materiału roślinnego, zbiór wektorów, izolację, syntezę DNA w dwuetapowej reakcji PCR, klonowanie i analizę sekwencji uzyskanych fragmentów genomu oraz analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. Przedstawiony w ten sposób cały cykl doświadczeń wskazuje na szeroki warsztat badawczy Doktorantki. Część eksperymentalna pracy została zaplanowana w sposób logiczny, a przyjęte metody badawcze pozwalające na identyfikację fitoplazm w badanych próbkach nie budzą najmniejszych wątpliwości. Są obecnie powszechnie stosowane w identyfikacji tego patogena, jak również w określaniu występowania patogenów roślin w ogóle i zostały właściwie dobrane do realizacji celów, które wytyczyła sobie pani magister.

Z obowiązku recenzenta chciałam w tym miejscu wyrazić kilka wątpliwości i pytań, o których wyjaśnienie będę prosiła Doktorantkę w trakcie publicznej obrony:

1. w opisie zbieranego materiału brakuje informacji, czy rośliny pobrane do badań miały objawy porażenia czy też nie? Jeśli tak, to jakie. Jeśli nie – na jakiej zasadzie wytypowano fragmenty powierzchni pól uprawnych z których próbki były pobierane. Być może w ogóle nie brano pod uwagę występowania objawów chorobowych na roślinach. Informacje o możliwych występujących objawach znajdują się dopiero w wynikach. A tak naprawdę nie są wynikiem, ponieważ celem badań nie było ustalenie zmian powodowanych przez fitoplazmy na roślinach;

*JLW*

2. moim zdaniem, punkt 4.5 „Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym” powinien być umieszczony po rozdziale 4.3 „Synteza DNA”, jako logiczna całość;
3. podrozdział 4.3.1 wydaje się zbędny jako jedyny w rozdziale 4.3;
4. mam również zastrzeżenia co do wyboru „pochodzenia” zbieranych owadów, w celu stwierdzenia występowania w nich fitoplazm. Jak podaje sama Doktorantka, owady odłowiono w okolicach Poznania. Wydaje się logiczne, że badane powinny być owady z okolic Polski południowo-zachodniej, z której pobierano do badań pszenicę i kukurydzę. Automatycznie rodzi się kolejna wątpliwość, dlaczego nie badano pszenicy i kukurydzy rosnących w miejscach skąd pobierano owady? Proszę o wyjaśnienie.
5. strona 23 rozdział 4.2.2.3. „Do izolatora z rzepakiem ozimym (...) dołożono młode, zdrowe rośliny jęczmienia (...)”. Dlaczego z rzepakiem i dlaczego jęczmień a nie badane zboża?

Wysoko oceniam kolejny rozdział zatytułowany Wyniki i dyskusja. Takie podejście nie jest standardowe, zwykle dyskusja następuje po rozdziale wyniki, ale uważam, że Pani Marta Jurga bardzo dobrze poradziła sobie łącząc wyniki własne z tymi opublikowanymi w literaturze krajowej i światowej. Przeprowadzona dyskusja wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki oraz umiejętność właściwej analizy uzyskanych wyników.

Właściwe zaplanowanie i staranne przeprowadzenie doświadczeń zaowocowało uzyskaniem licznych i ważnych wyników, które poszerzają dotychczasową wiedzę na temat fitoplazm i ich występowania w środowisku rolniczym. W rozdziale tym, na 44 strona Autorka przy pomocy fotografii, tabel i rycin szczegółowo opisała i zaprezentowała rezultaty swoich badań oraz skonfrontowała je z wynikami uzyskanymi przez naukowców na świecie. Tak przeprowadzona dyskusja świadczy także o dobrej znajomości problemów badawczych dotyczących zarówno występowania fitoplazm, jak i ich przenoszenia przez wektory.

W trakcie badań prowadzonych w ramach niniejszej dysertacji Doktorantka zidentyfikowała obecność fitoplazm w 4 z 200 przebadanych roślin pszenicy oraz w 4 z 200 testowanych roślin kukurydzy:

- w pszenicy potwierdziła obecność fitoplazm z dwóch podgrup: 16SrI-R i 16SrI-S (dotychczas w uprawie tej rośliny stwierdzano obecność patogena z podgrup: 16SrI-B, 16SrI-C i 16SrXI-B)

- w kukurydzy potwierdziła obecność fitoplazm z dwóch podgrup: 16SrI-R i 16SrV-C.

Analiza porównawcza uzyskanych sekwencji z wykorzystaniem programów bioinformatycznych wykazała wysokie podobieństwo do tych dostępnych w Banku Genów, a pochodzących z różnych roślin oraz regionów świata.

*Blio*

Badając przenoszenie przez owady Doktorantka przetestowała 276 osobników odłowionych w uprawie pszenicy oraz 275 w kukurydzy, z czego obecność fitoplazm potwierdziła odpowiednio w 29 i 4 osobnikach. Przeprowadzone analizy sekwencji potwierdziły, że fitoplazmy wyizolowane z owadów są bardzo podobne do tych uzyskanych z wektorów, co potwierdza udział owadów w przenoszeniu patogena pomiędzy poszczególnymi roślinami czy uprawami. W kukurydzy dominującym gatunkiem był skoczek kukurydziany, którego obecność w Polsce wykazano po raz pierwszy w 1906 roku. W niniejszej pracy, w latach prowadzenia badań, wykazano po pierwsze jego masowe występowanie, a po drugie, stwierdzono, że jest on wektorem fitoplazmy z podgrupy 16SrV-C. Jest to pierwsze doniesienie o roli tego owada w przenoszeniu fitoplazm z tej podgrupy.

Badania wykazały, że fitoplazmy zarówno w pszenicy, jak i w kukurydzy występują sporadycznie, w związku z czym nie można mówić o epidemicznym występowaniu choroby. Jednak jeśli wziąć pod uwagę obecność wektorów owadzych i procent ich zainfekowania przez patogena należy rozważyć możliwość dalszego rozprzestrzeniania się choroby. Jednocześnie można założyć, że na przestrzeni lat znaczenie gospodarcze fitoplazm w uprawach zbóż czy traw będzie wzrastać.

Nie do końca są dla mnie jasne wyniki dotyczące występowania fitoplazm przy ich przenoszeniu w warunkach kontrolowanych. Na str. 67 znajdujemy informację, że 20% testowanych roślin pszenicy odmiany Tytanika wykazywało objawy chorobowe (jasne przebarwienia). Takich zmian nie stwierdzono ani na roślinach pszenicy odmiany Hondia ani na kukurydzy. Następnie na str. 70 mamy informację, że rośliny odmiany Tytanika uległy porażeniu w 66,7% a Odmiany Hondia – 3,3%. Zabrakło mi dyskusji nad korelacją bądź jej brakiem między obserwowanymi objawami a potwierdzonymi infekcjami. Nie znalazłam też informacji w metodyce, jak w testowanych roślinach potwierdzano bądź wykluczano obecność fitoplazm. Jest jedynie informacja o tym, że izolowano DNA. Zabrakło kolejnej, do czego otrzymane DNA wykorzystywano (PCR? RFLP?).

Otrzymane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie 9 wniosków. Są one zwięzłe i stanowią w miarę dobre podsumowanie pracy. Moim zdaniem jednak Doktorantka zbyt skromnie przedstawiła swoje osiągnięcia, unikając zwrotów typu „po raz pierwszy wykazano”. Ponadto, zmieniałabym kolejność wniosków uznając za najważniejsze te, które pozwoliły na identyfikację nowej choroby czy nowego wektora

Dlatego też, za duże osiągnięcie naukowe uważam:

- (1) wykazanie po raz pierwszy w Polsce i Europie obecności sprawcy błękitnej karłowatości pszenicy (Wheat blue dwarf);
- (2) wykazanie po raz w Polsce i na świecie, że *Arthaldes striifrons* i *Empoasca pteridis* są potencjalnymi wektorami fitoplazmy z podgrupy 16SrI-F;
- (3) stwierdzenie, że kukurydza może być infekowana przez fitoplazmy z podgrupy 16SrI-R oraz 16SrV-C, których obecności dotychczas nie notowano w Polsce;
- (4) stwierdzenie, że skoczek kukurydziany jest wektorem fitoplazmy z podgrupy 16SrV-C;
- (5) wykazanie po raz pierwszy zdolności przenoszenia fitoplazm przez poszczególne gatunki owadów, zarówno w uprawie pszenicy, jak i kukurydzy;
- (6) potwierdzenie występowania fitoplazm w uprawach pszenicy i kukurydzy, również w formie utajonej;

Według mnie zabrakło wniosku mówiącego o tym, że występowanie fitoplazm w omawianych uprawach jest na dzień dzisiejszy niewielkie. Podobnie, jak zabrakło zdania stwierdzającego czy podsumowującego całość badań, że coraz częstsze występowanie fitoplazm na różnych gatunkach roślin wskazuje na fakt, że ich znaczenie w epidemiologii roślin będzie coraz większe. Bądź jakie są zagrożenia ze strony fitoplazm biorąc pod uwagę zmiany klimatyczne. Całość pracy zamyka umieszczone na końcu krótkie streszczenie, w języku polskim i angielskim, podsumowujące uzyskane wyniki.

W trakcie pisania pracy Autorka nie uniknęła drobnych usterek językowych:

- str. 23: jest „całkowite DNA roślinne” powinno być „całkowity DNA roślinny”
- str. 30: jest „Po przeprowadzeniu reakcji polimerazy...” Brakuje słowa łańcuchowej
- str. 40 jest „analiza sekwencji nukleotydowej” powinno być analiza sekwencji nukleotydów
- część zdjęć/fotografii podpisana została jako ryciny. Rycina kojarzy się bardziej z grafiką.
- str. 51 jest „izolat S9.205 uzyskał najwyższe podobieństwo (...)” lepiej brzmi: wykazał
- str. 52 jest: „Izolat S9.323 pozyskany od *Euscelis incisus* (...)” powinno być wyizolowany z. To samo dotyczy np. ryciny 13 na stronie 56: „sekwencje izolatów uzyskanych od nosicieli fitoplazm” czy „sekwencje uzyskane od pszenicy”.
- str. 53 „Profil (...) zakwalifikował fitoplazmę jako członka grupy (...)”. Powinno być: na podstawie uzyskanego profilu fitoplazmę zakwalifikowano do grupy.

JKW

Jednak jak wspomniałam wyżej, są to pojedyncze drobne potknięcia. Pracę czyta się dobrze, została napisana poprawną polszczyzną, językiem zrozumiałym i przejrzystym, a drobne błędy pozostają bez wpływu na jej wartość naukową.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca została zaplanowana, wykonana i opisana w sposób właściwy dla tego typu rozpraw. Dokumentuje ona zarówno szeroką wiedzę Doktorantki, jak i bardzo dobre opanowanie warsztatu badawczego. Jednocześnie uważam, że oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uwagi zawarte w recenzji nie rzutują na pozytywną ocenę merytoryczną pracy.

Reasumując potwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Marty Jurgi pt. „Charakterystyka fitoplazm obecnych w pszenicy i kukurydzy oraz w potencjalnych wektorach” pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami; Dz.U. 2017 poz. 1789). W oparciu o przedstawioną opinię wnioskuję do Rady Wydziału Przyrodniczo-Technologicznego Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Jurgi do dalszych etapów ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Natana Bawodynko-Filas

