



UNIwersytet Gdański



Dr hab. Krzysztof Hinc
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
ul. Dębinki 1; 80-211 Gdańsk
tel. +48 58 3491412
E-mail: krzysztof.hinc@biotech.ug.edu.pl

Gdańsk, 03.06.2015

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Doroty Krzyżanowskiej, pt. „Antagonizm szczepu *Pseudomonas* sp. P482 względem bakteryjnych patogenów roślin z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* w warunkach *in vitro* i *in planta*”, wykonanej w Pracowni Biologicznej Ochrony Roślin na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. UG, dr hab. Sylwii Jafry.

Ogólna charakterystyka pracy doktorskiej

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Doroty Krzyżanowskiej dotyczy wykorzystania danych genomowych i technik analizy danych (ang. *data mining*), do poznania mechanizmów warunkujących antagonizm pomiędzy szczepem *Pseudomonas* sp. P482 a bakteriami pektynolitycznymi z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* oraz określenia potencjału badanego szczepu do biologicznej ochrony roślin przed chorobami, powodowanymi przez w/w patogeny.

Tematyka pracy odpowiada bieżącym potrzebom nauki oraz zastosowań praktycznych. Wiele gatunków niepatogennych bakterii rodzaju *Pseudomonas*, należących do grupy PGPR (ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), skupia mikroorganizmy wywierające korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Przyczyny tego zjawiska mogą być związane z bezpośrednim lub pośrednim oddziaływaniem mikroorganizmów na rośliny. Bezpośrednie oddziaływanie mikroorganizmów ryzosferowych związane jest głównie ze wzbogacaniem gleby w składniki pokarmowe oraz zwiększaniem ich przyswajalności dla roślin, jak również syntezą fitohormonów i witamin. Z kolei oddziaływania pośrednie wynikają głównie z poprawy zdrowotności roślin przez inhibicję wzrostu fitopatogenów oraz indukcję odporności roślin na choroby, dzięki wytwarzaniu przez bakterie ryzosferowe biologicznie aktywnych metabolitów oraz regulatorów wzrostu.

W związku z powyższym, podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza, dotycząca scharakteryzowania, nie poznanego do tej pory, szczepu *Pseudomonas* sp. P482 pod kątem zrozumienia mechanizmów antagonizmu badanego szczepu względem bakterii pektynolitycznych i jego przydatności do ochrony roślin przed chorobami, jest jak najbardziej istotna. Uzyskane wyniki, oprócz aspektów typowo poznawczych, mogą okazać się również

przydatne w opracowaniu biologicznej strategii ochrony roślin, stanowiącej doskonałą alternatywę dla kosztownych, szkodliwych dla środowiska naturalnego, a czasem nieskutecznych pestycydów.

Ocena formalna i merytoryczna

Rozprawa doktorska Pani mgr Doroty Krzyżanowskiej ma typowy układ dla tego typu opracowań. Praca obejmuje 13 rozdziałów, liczy 210 stron, 22 rysunki i 21 tabel. Bibliografia obejmuje aż 402 pozycje, w większości publikacje anglojęzyczne.

Praca napisana jest przejrzysto, bardzo zwięzłym językiem, bez nadmiernego rozpisywania się. Została bardzo starannie wydana, posiada czytelną oprawę graficzną, bardzo dobrze opracowane rysunki i tabele. Wszystko to sprawia że pomimo dużej objętości, czyta się ją bardzo dobrze.

Układ pracy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń, co dowodzi umiejętności Doktorantki do właściwego przedstawienia problemu naukowego i sposobu jego rozwiązania.

Rozdział „Abstract” w sposób skondensowany w angielskiej wersji językowej przedstawia rezultaty pracy doktorskiej.

Cennym dodatkiem jest szczegółowo opracowany wykaz akronimów i skrótów.

Rozdział „Wstęp”, obejmujący 21 stron, poparty bogatym piśmiennictwem stanowi dobre wprowadzenie do części doświadczalnej pracy.

Dwa pierwsze podrozdziały „Wstępu,” opisujące mikroflorę bakteryjną i biologiczną ochronę roślin, stanowią ogólne wprowadzenie do podjętej tematyki badawczej. Dalsze podrozdziały przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości warunkujących potencjał szczepów *Pseudomonas spp.* do biologicznej ochrony roślin. Ostatnie dwa podrozdziały „Wstępu” opisują patogeny roślin z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* oraz wykorzystywanie sekwencjonowania następnej generacji NGS (*ang. next generation sequencing*) w naukach mikrobiologicznych.

Przejrzysto i logicznie przedstawiony „Wstęp” dobrze orientuje czytelnika w problematyce i podjętych badaniach oraz stanowi wartościowy fragment pracy, świadczący o tym że Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematu i jest zorientowana w bieżącym piśmiennictwie naukowym.

Cele pracy zostały wypunktowane i jasno sprecyzowane. Praca obejmuje szeroki zakres badawczy, począwszy od sekwencjonowania genomu badanego szczepu *Pseudomonas*, poprzez poszukiwanie *in silico* genów kodujących enzymy odpowiedzialne za syntezę przeciwdrobnoustrojowych metabolitów wtórnych, do doświadczeń laboratoryjnych mających na celu określenie potencjału ochronnego badanego szczepu w stosunku do tkanek roślinnych.

Obszerny zakres pracy wynikał z konieczności połączenia aspektów teoretyczno - bioinformatycznych z eksperymentalnymi. Na podkreślenie zasługuje fakt że Doktorantka starannie usystematyzowała wielowątkowy zakres pracy w rozdziale 6.

W rozdziałach metodycznych Doktorantka omówiła materiały oraz metody stosowane w trakcie realizacji badań. Materiały i metody obejmują 35 stron w tym 5 tabel. Rozdziały te zostały starannie zredagowane i stanowią wyczerpujące źródło informacji.

Wyniki badań przeprowadzone przez Doktorantkę przedstawione są w ciągu logicznie zaplanowanych etapów pracy. Ta najobszerniejsza część rozprawy obejmuje 71 stron w tym 20 rysunków i 16 tabel.

W pierwszej kolejności w podrozdziale 9.1 Doktorantka opisała doświadczenia, w których wykazano że szczep *Pseudomonas* sp. P482 zdolny jest do hamowania wzrostu 9 badanych szczepów bakterii pektynolitycznych należących do rodzaju *Dickeya* i *Pectynobacterium* oraz grzyba *Rhizoctonia solani*.

W kolejnych kilku podrozdziałach, Doktorantka przedstawiła wyniki sekwencjonowania genomu *Pseudomonas* sp. P482 oraz analiz bioinformatycznych. Na podstawie analiz oszacowano w przybliżeniu wielkość genomu badanego szczepu na 5,62 Mbp. Genom uzyskał status niekompletnego ze względu na to, że nie został całkowicie zamknięty. Wykorzystując narzędzia bioinformatyczne dokonano automatycznej anotacji zsekwencjonowanego genomu oraz przeszukano genom badanej bakterii pod kątem genów kodujących bakteriocyny oraz enzymy biorące udział w syntezie metabolitów wtórnych. Na podstawie obliczeń średniej identyczności nukleotydowej (ANI, ang. *Average Nucleotide Identity*) pomiędzy genomem P482 a genomami szczepów blisko spokrewnionych oraz innych badań biochemicznych, sklasyfikowano badany szczep do gatunku *P. donghuensis*. Dodatkowo uzyskano informację na temat genów unikatowych i wspólnych dla wszystkich szczepów z analizowanej puli. Ostatecznie, analizy *in silico* zaowocowały wytypowaniem 5 genów - kandydatów, których produkty białkowe mogą być zaangażowane w syntezę czynnika/ów o aktywności przeciwbakteryjnej szczepu P482.

Dzięki analizie *in silico* genomu szczepu P 482, wytypowano gen, którego produkt białkowy może być cząsteczką sygnałową, uczestniczącą w procesie formowania biofilmu.

Pytanie do Doktorantki: Jakie korzyści, z perspektywy biologicznej ochrony roślin, mogą wyniknąć z potencjalnej zdolności badanego szczepu *Pseudomonas* do formowania biofilmu.

W dalszej części pracy Doktorantka opisała wyniki badań, zmierzających do określenia właściwości szczepów z inaktywacją genów - kandydatów powstałych na drodze mutagenезы ukierunkowanej. Wykazano, że dwa z wybranych genów kodują białka kluczowe dla syntezy fluorescencyjnego sideroforu piowerdyny. Ostatecznie jednak, żaden z inaktywowanych genów nie okazał się kluczowy dla antagonizmu szczepu P482 względem *Pectobacterium* i *Dickeya* spp. *in vitro*.

W kolejnej części wyników, Doktorantka poświęciła kilka podrozdziałów na opisanie badań dotyczących potencjału badanego szczepu do ochrony bulw ziemniaka i liści cykorii, przed mokrą zgnilizną. Wykazano że szczep P482 jest w stanie hamować symptomy mokrej zgnilizny na bulwach ziemniaka tylko względem *Pectobacterium* spp. Z kolei antagonizm badanego szczepu wobec *D. solani* w warunkach *in planta* jest całkowicie odmienny. P482 był nieskuteczny wobec *D. solani* na bulwach ziemniaka jednakże efektywnie hamował objawy choroby powodowanej przez ten patogen na liściach cykorii.

Dalsze badania wykazały, że zdolność szczepu P482 do ochrony liści główek cykorii wiąże się z produkcją kwasu glukonowego, jednakże wydaje się że związek ten nie jest głównym czynnikiem warunkującym obserwowany efekt.

W kolejnym podrozdziale wyników przedstawiono dalsze analizy przeszukania genomu szczepu P482 w kontekście innych czynników potencjalnie istotnych z perspektywy ochrony roślin.

W ostatnim podrozdziale wyników Doktorantka opisała doświadczenia, mające na celu określenie zdolności szczepu P482 do kolonizacji korzeni roślin ziemniaka w glebie pochodzącej z pola. Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność badanego szczepu do kolonizacji ryzosfery ziemniaka, w stopniu który będzie umożliwiał badanie jego potencjału ochronnego w warunkach szklarniowych i/albo polowych.

Przeprowadzone badania i ich dokumentacja nie budzą zastrzeżeń.

W „Dyskusji”, obejmującej 35 stron, Doktorantka konfrontuje uzyskane wyniki z doniesieniami z najnowszego piśmiennictwa, uzasadniając celowość prowadzonych badań.

W mojej opinii dyskusja dotycząca poruszanych zagadnień została przeprowadzona w czytelny i interesujący sposób.

W rozdziale 11, Doktorantka w skrócie podsumowała uzyskane wyniki, następnie w kolejnym rozdziale przedstawiła zestawienie pozycji literaturowych wykorzystywanych i cytowanych w pracy doktorskiej.

Ostatni rozdział rozprawy zawiera szczegółowe informacje o dorobku naukowym Doktorantki.

Uwagi do pracy

Wypełniając obowiązki recenzenta, przedstawiam kilka uwag dotyczących ocenianej rozprawy doktorskiej:

- Str. 76, Rysunek 3, „Aktywność przeciwbakteryjna szczepu *Pseudomonas* sp. P482 względem wybranych patogenów roślin”. Doktorantka podaje, że odchylenia standardowe zostały obliczone dla wyników otrzymanych w dwóch niezależnych powtórzeniach biologicznych. Czy z tego wynika że obliczenia dokonano dla dwóch pojedynczych prób biologicznych? Czy może w obliczeniach zostały także uwzględnione powtórzenia techniczne wchodzące w skład prób biologicznych?
- Str. 102, Rysunek 6, „Hamowanie wzrostu *D. solani* IFB 0102 (Dsp2) w teście *in vitro* przez *Pseudomonas* sp. P482 i szczepy reprezentujące gatunki blisko spokrewnione”. Tutaj z kolei napisano, że odchylenia standardowe stanowią średnią z dwóch powtórzeń technicznych. Jak wiadomo odchylenie standardowe określa zmienność wyników w obrębie średniej arytmetycznej. Gdy zmienność wyników rośnie, zwiększa się odległość pomiaru od średniej, czyli im większe odchylenie standardowe, tym rozproszenie wyników większe i tym mniej precyzyjna informacja wynika z porównania analizowanego wyniku do średniej. Dlatego uważam, że obliczanie odchylenia standardowego dla tak małej próby nie niesie za osobą praktycznie żadnej istotnej informacji.

- Str. 109, Rysunek 9, „Produkcja sideroforów przez szczep *Pseudomonas* sp. P482 i wybrane mutanty tego szczepu – test na podłożu błękitnym CAS”. Podobnie jak w przypadku rysunku 3 dla niektórych szczepów graniczny poziom ufności wyliczono na podstawie 2 powtórzeń biologicznych. Czy próby biologiczne stanowiły średnie arytmetyczne z powtórzeń technicznych? Ta informacja jest ważna ponieważ w przeciwnym razie wyznaczanie granicznego poziomu ufności dla tak małej grupy mija się z celem.
- Doktorantka nie ustrzegła się pewnych uchybień. W tekście pojawiają się sformułowania upraszczające niektóre zagadnienia tzw. „skrótowy myślowe”. Pragnę jednak podkreślić, że jest ich niewiele. Na przykład: str. 105, „...przeanalizowano *in silico* genom *Pseudomonas* sp. P482 pod kątem obecności genów potencjalnie warunkujących aktywność przeciwbakteryjną tego szczepu”. *De facto* to nie geny warunkują aktywność przeciwbakteryjną tego szczepu tylko ich produkty białkowe.
- w tekście występują także nieliczne błędy typu pominięcie, wstawienie niewłaściwego znaku.

Wnioski końcowe

Należy podkreślić, że materiał zawarty w pracy doktorskiej jest bardzo obszerny, co wynika z połączenia wielu ważnych aspektów bioinformatycznych i eksperymentalnych mających składać się na osiągnięcie postawionego celu. Pomimo, że metody *in silico* mają wysoki potencjał do eksploracji genomów bakteryjnych pod kątem wyszukiwania genów kodujących białka odpowiedzialne za syntezę metabolitów wtórnych, to w przypadku związków/mechanizmów wcześniej nieopisanych stają się mniej użyteczne, głównie w wyniku niskiej przepustowości metod eksperymentalnych, służących do weryfikacji wytypowanych *in silico* genów. Molekularny mechanizm antagonizmu szczepu P482 względem bakterii pektynolitycznych z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* wydaje się unikalny i do tej pory nie opisany. W związku z tym uważam, że pomimo niepowodzenia w jednoznacznym wykryciu wyżej opisanych czynników/mechanizmów, wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej są bardzo wartościowe i dostarczają cennych informacji, czego potwierdzeniem jest ich opublikowanie przez Doktorantkę (pierwszy autor) w renomowanych czasopismach: *Journal of Plant Pathology* (2012), *Sensors* (2012), *Genome Announcements* (2014) i zaprezentowanie na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych w formie 21 referatów, w tym 4 wygłoszonych przez Doktorantkę i 17 plakatach konferencyjnych.

Poza publikacjami zawierającymi wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej Pani mgr Krzyżanowska jest pierwszym autorem jeszcze w dwóch publikacjach, w których przedstawiono wyniki nie zamieszczone w ocenianej rozprawie. Dorobek publikacyjny Pani mgr Doroty Krzyżanowskiej oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorantka:

- wybrała dobrą tematykę badawczą, w jej zakresie przestudiowała obszerną literaturę przyswajając wiedzę, którą należycie wykorzystywała formułując temat, cel i zakres pracy
- przedstawiła ciekawą i wartościową pracę, wnoszącą nowe elementy do tematyki biologicznej ochrony roślin.
- wykazała się umiejętnością wykorzystania i łączenia wiedzy teoretycznej z obserwacjami empirycznymi
- poprawnie zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty badawcze
- wykazała się umiejętnością analizy uzyskanych wyników
- przedstawiła wnioski końcowe, które dostarczają wszystkich informacji w czytelny i kompletny sposób
- dobrze zredagowała pracę doktorską, która napisana jest poprawnym językiem z należyтым nazewnictwem naukowym

Z pełną odpowiedzialnością mogę stwierdzić że niniejsza praca doktorska jest opracowaniem oryginalnym a przytoczone wcześniej uwagi nie umniejszają jej zasadniczych wartości merytorycznych.

W świetle wszystkich powyższych argumentów stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z obowiązującą ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani mgr Doroty Krzyżanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie pracy.



Dr hab. Krzysztof Hinc