

Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Kaczyńskiej pt.
„Molecular determinants in the interaction of plant pathogenic bacteria from
species *Dickeya solani* and *Pectobacterium atrosepticum* under different
temperatures”**

Przedstawiona praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej – promotora, oraz dr. hab. Roberta Czajkowskiego – promotora pomocniczego, w Katedrze Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w ramach projektu Iuventus Plus 2012, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Praca dotyczy poznania wybranych cech dwóch bakteryjnych patogenów ziemniaka, powodujących straty o znaczeniu gospodarczym, niemal we wszystkich rejonach uprawy tej rośliny na świecie. Posługując się układem modelowym Autorka przeprowadziła badania nad wpływem temperatury na ekspresję różnych genów, w tym kodujących produkty związane z zakażeniem roślin przez pektynolityczne bakterie z gatunków *Dickeya solani* i *Pectobacterium atrosepticum*. Temperatura, obok wilgotności, jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na przeżywalność tych bakterii w środowisku oraz powstawanie i rozwój powodowanych przez nie chorób. Przeprowadzone badania, prawie w całości podstawowe, stanowią próbę wyjaśnienia roli tego czynnika w obserwowanej w warunkach naturalnych zmienności nasilenia występowania bakteryjnych chorób ziemniaka, o czym decydują – w szerszym ujęciu – wielkość inokulum, podatność rośliny oraz czynniki środowiska, w tym klimat.

Podjęcie przedstawionych badań uważam za celowe, bowiem poznanie determinantów warunkujących zakażenie roślin ziemniaka przez wymienione bakterie, będzie bardzo pomocne w opracowaniu skutecznych metod ochrony upraw przed powodującymi je chorobami. Zdrowotność roślin, a co za tym idzie zwiększenie ich plonowania, mają ogromne znaczenie użytkowe, zarówno w żywieniu człowieka, jak i

szerzej – w produkcji rolnej. Wykonane i opisane przez mgr Kaczyńską badania są w dużej mierze nowatorskie.

Praca, napisana w języku angielskim, zawiera wszystkie formalnie wymagane dla rozprawy doktorskiej części, tzn. wprowadzenie obejmujące przegląd literatury mającej głównie związek z przedmiotem badań, jasno sformułowany cel, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski. Wymienione rozdziały poprzedza syntetyczne streszczenie w językach angielskim i polskim. Praca obejmuje 177 stron, w tym 8 tabel i 30 rysunków. Ponadto, w aneksie Autorka zamieściła 12 tabel zawierających wyniki szczegółowe z badań 47 mutantów szczepu IFB0099 *Dickeya solani* i 41 mutantów szczepu SCRI1043 *Pectobacterium atrosepticum*. W różnych miejscach pracy Doktorantka powołuje się na ponad 340 pozycji literatury zestawionych na końcu pracy.

W obszernym przeglądzie literatury omówiono zagadnienia dotyczące znaczenia i wielkości produkcji ziemniaka w Europie oraz główne aspekty epidemiologii dwóch chorób bakteryjnych – czarnej nóżki i mokrej zgnilizny. Przedstawiono także czynniki etiologiczne tych chorób oraz wpływ warunków środowiskowych na ich powstawanie, rozprzestrzenianie się i rozwój, ze zwróceniem szczególnej uwagi na elementy klimatu oraz efekt zmian klimatycznych. Oddzielną część wprowadzenia Autorka poświęciła temperaturze jako czynnikowi regulującemu metabolizm bakterii, z podkreśleniem jej roli w ekspresji genów związanych z wirulencją. Poza stroną opisową mgr Kaczyńska wprowadziła do tego rozdziału poglądowy materiał ilustracyjny w postaci fotografii, map, tabel, wykresów i rysunków, co istotnie podnosi jego wartość i to nie tylko z punktu widzenia przeprowadzonych badań własnych, ale także ze względu na znaczenie dydaktyczne w szerszym tego słowa znaczeniu.

Niektóre informacje i uwagi szczegółowe

Pierwszy etap badań dotyczył wykrywania genetycznych *loci* związanych z reakcją na temperaturę u szczepów IFB0099 *D. solani* oraz SCRI1043 *P. atrosepticum*. Autorka użyła tych szczepów do wykonania mutagenезы przypadkowej transpozonomem mini-Tn5*gusA* w wyniku czego uzyskała 8000 mutantów *D. solani* i 5775 *P. atrosepticum*. W celu ich wstępnej selekcji zastosowała test jakościowy metodą posiewu mutantów na pożywkę minimalną M9 z dodatkiem związku X-Gluc, używanego do wykrywania β-glukoronidazy. Mutanty *D. solani* inkubowano w temperaturach 18°C i 37°C, a *P. atrosepticum* w 18°C i 28°C. Prawie wszystkie (98%) nie wykazały różnic w aktywności

GUS, po inkubacji zarówno w niższej, jak i wyższej temperaturze. Do dalszej oceny wybrano pozostałe 2% mutantów, czyli 77 *D. solani* i 109 *P. atrosepticum* wykazujących wyższą aktywność GUS w obu temperaturach lub tylko w jednej z nich. Na podstawie spektrofotometrycznych i fluorometrycznych testów ilościowych dokonano kolejnej selekcji ostatecznie wybierając 46 mutantów szczepu IFB0099 *D. solani* i 40 mutantów SCRI1043 *P. atrosepticum*, wykazujących zmienną ekspresję genu reporterowego *gusA* w zależności od temperatury. Spośród wybranych mutantów szczepu IFB0099 *D. solani* 7 wykazało podwyższoną aktywność białka GUS w temperaturze 18° C, a 39 – w temperaturze 37° C. Natomiast w przypadku *P. atrosepticum* po 20 mutantów wykazało podwyższoną aktywność GUS w temperaturach 18° C lub 28° C.

W następnym etapie badań wykonano identyfikację genów z insercją transpozonu mini-Tn5 w komórkach 46 wybranych mutantów *D. solani* na podstawie porównania sekwencji DNA flankujących mini-Tn5 z dostępnymi w Banku Genów sekwencjami *D. solani*. Wszystkie mutanty miały pojedyncze insercje transpozonowe zlokalizowane w całym genomie *D. solani*. Geny ze znanymi funkcjami, które wykazały podwyższoną aktywność GUS w temperaturze 37° C, zaklasyfikowano do 14 grup, a w przypadku inkubacji mutantów w temperaturze 18° C wykryto 3 geny kodujące różne funkcje. Autorka zwróciła uwagę, że wiele spośród zidentyfikowanych genów reagujących na temperaturę kodowało białka o hipotetycznej lub nieznannej funkcji i wysnuła przypuszczenie, że chociaż biologiczne funkcje tych białek nie są znane, to mogą mieć one znaczenie w przystosowaniu bakterii do temperaturowych zmian środowiska. Wskazuje to na celowość kontynuacji badań.

Z praktycznego punktu widzenia cenną częścią recenzowanej pracy było opracowanie fenotypowej charakterystyki mutantów *D. solani* i *P. atrosepticum* z uwzględnieniem takich cech jak: patogeniczność wobec bulw ziemniaka i liści cykorii, produkcja enzymów pektynolitycznych, proteaz, celulaz, fosfolipaz, sideroforów, auksyn, a także tworzenie biofilmu i indukcja reakcja nadwrażliwości na tytoniu. W tej części badań określono także morfologię komórek mutantów, ich ruchliwość oraz poziom reprodukcji. Badania dotyczące 46 mutantów *D. solani* wykazały, że 18 z nich wykazało słabszą zdolność maceracji zainokulowanych bulw ziemniaka, przy czym sześć aż o 50% niższą w stosunku do formy dzikiej mutowanego szczepu. Natomiast po inokulacji liści cykorii 40 mutantów wykazało podobną wirulencję jak szczep dziki, a tylko dwa z nich obniżoną zdolność maceracji. Nasuwa się pytanie o chorobotwórczość pozostałych

czterech mutantów oraz o to, jakie czynniki mogły być przyczyną różnej wielkości uszkodzeń roślin przez tego patogena, z punktu widzenia środowiska naturalnego?

Do ważnych należy zaliczyć wykazanie, że wszystkie mutanty *D. solani* indukowały reakcję nadwrażliwości (HR) na tytoniu, ale powstaje tu pytanie o długość czasu od infiltracji liści do pojawu nekrozy. Czy był on podobny dla wszystkich mutantów i czy nasilenie nekroz było podobne? Dalej Autorka podaje, że trzy mutanty nie tworzyły biofilmu, pięć wytwarzało istotnie mniej tej struktury niż dziki szczep, a we wszystkich mutantach miejsca insercji Tn5 były różne. Natomiast cztery mutanty wytwarzały więcej biofilmu niż dziki szczep po ich hodowli w pożywce z dodatkiem glukozy. Tu z kolei nasuwa się pytanie o znaczenie materiału użytego do badania biofilmu – w tym wypadku Doktorantka zastosowała polipropylenowe probówki Eppendorfa. Wiadomo jednak, że do tego typu badań wykorzystuje się także inny materiał, np. polistyren czy polichlorek winylu i że uzyskiwane wyniki mogą być różne. To znowu rodzi pytanie o przełożenie wyników badań uzyskanych *in vitro*, tzn. tworzenia biofilmu przez bakterie hodowane na różnych pożywkach w probówkach czy płytkach ELISA wykonanych z różnych tworzyw., na sytuację w której patogeny tworzą biofilm na różnych organach roślin? Nie stwierdzono natomiast żadnych różnic między mutantami *D. solani* a szczepem dzikim w zakresie wytwarzania enzymów rozkładających ścianę komórkową (proteaza, pektynaza, celulaza), a także sideroforów i auksyn oraz ruchliwości bakterii.

Ważnym wynikiem badań jest również wykazanie braku różnic w długości czasu generacji między szczepem dzikim, a wybranymi mutantami, w tym charakteryzującymi się mniejszą zdolnością maceracji bulw ziemniaka i cykorii niż szczep dziki. Wynik ten wskazuje, że badany parametr, zwykle uważany za istotny z punktu widzenia wielkości inokulum w sensie ilościowym, nie miał tu większego znaczenia i że zdolności chorobotwórcze badanych bakterii są związane z całym szeregiem innych cech, przekładających się na ich wirulencję. Ciekawy wątek badań, o znaczeniu dla praktyki, dotyczył odpowiedzi na pytanie, czy zmiana temperatury inkubacji, w której 16 mutantów *D. solani* wykazało wyższą aktywność GUS, na temperaturę, w której pierwotnie nie wykazało tej aktywności, w tym przypadku zmiana z 18° C na 37° C, lub z 37° C na 18° C, negatywnie wpłynie na zwiększenie aktywności GUS i czy będzie ona trwała. Okazało się, że po powrocie do temperatury indukującej następowało powolne i stopniowe przywrócenie tej cechy u większości testowanych mutantów. Na złożony charakter badanych relacji wskazuje fakt, że mutanty te różniły się pod względem

niektórych cech fenotypowych od dzikiego szczepu, w tym wykazały mniejszą zdolność maceracji tkanek bulw ziemniaka i/lub liści cykorii oraz tworzeniu biofilmu.

Następny etap badań dotyczył charakterystyki wyselekcjonowanych 29 mutantów *P. atrosepticum*. I tu nasuwa się pytanie o kryterium wyboru tych mutantów, spośród 40 pierwotnie wyselekcjonowanych do badań. Podobnie, jak w przypadku mutantów *D. solani* także i tu wszystkie mutanty miały insercje transpozonowe zlokalizowane w całym genomie *P. atrosepticum*. Autorka zaklasyfikowała geny związane z termoregulacją do różnych grup funkcjonalnych i wykazała, że 6 mutantów miało insercje w genach kodujących białka o nieznanach funkcjach lub hipotetyczne białka. Cechy fenotypowe określone u 40 mutantów *P. atrosepticum*, w większości były takimi samymi cechami, jak w przypadku *D. solani*, za wyjątkiem testu patogeniczności na liściach cykorii i testu na indukcję reakcji HR na tytoniu oraz testów na wytwarzanie fosfolipazy i auksyny. Jako powód Autorka podała, że szczep dziki nie wykazał zdolności infekowania cykorii i indukcji reakcji HR. Powstaje więc kwestia, czym można wytłumaczyć brak zdolności *P. atrosepticum* do indukcji HR na tytoniu oraz jakie czynniki determinują tę cechę u fitopatogenicznych bakterii. Prawie wszystkie badane mutanty wykazały podobną zdolność maceracji tkanek bulw ziemniaka, jak szczep dziki. Podobnie zachowywały się przy tworzeniu biofilmu, przy czym stwierdzono pewne różnice w zależności od składu pożywki hodowlanej, tzn. dodatku do niej glukozy lub glicerolu, a także wytwarzaniu enzymów degradujących ścianę komórkową oraz ruchliwości komórek i czasu generacji. Na podkreślenie zasługuje wykazanie podobnych relacji, jak u mutantów *D. solani*, w zakresie wpływu zmian temperatury inkubacji na aktywność GUS. Podsumowując ocenę rozdziału dotyczącego wyników badań, które uważam za wartościowe, pragnę tylko zaznaczyć, że ich analiza byłaby w znacznym stopniu ułatwiona, gdyby udało się przedstawić w jednej tabeli wszystkie cechy fenotypowe mutantów.

Rozdział 'Dyskusja' przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Jest to ważna część pracy podejmująca, w miarę możliwości, próbę interpretacji otrzymanych wyników w oparciu o dostępne dane literaturowe. Autorka omówiła wyniki mutacji konfrontując je z wynikami innych autorów badających inne gatunki bakterii, ale stosujących podobne techniki badawcze. Wykazała, iż w przynajmniej kilku przypadkach te same *loci* są indukowane w tych samych temperaturach, pomimo innych stanowisk systematycznych badanych bakterii oraz innych atakowanych przez nie roślin-gospodarzy. Doktorantka

wykazała wpływ temperatur inkubacji mutantów na ekspresję zidentyfikowanych genów oraz zwróciła uwagę na możliwe różnice w ekspresji genów u bakterii hodowanych *in planta* oraz *in vitro*. Wyniki badań wskazały na potencjał biologiczny groźnych patogenów ziemniaka, ale podkreślono, że ujawnienie się określonych cech na roślinie będzie zależało od ich współdziałania z wieloma czynnikami występującymi w środowisku. Wartościową częścią dyskusji była analiza ekspresji genów związanych z wirulencją, a także analiza zdolności do maceracji tkanek bulw ziemniaka i liści cykorii oraz tworzenia biofilmu. Przeanalizowano, jak mutacje w różnych genach oddziałują na występowanie lub brak poszczególnych cech fenotypowych. Nie we wszystkich przypadkach jednak udało się wyjaśnić korelacje między wynikami analizy genetycznej a cechami fenotypowymi badanych bakterii. Jest to szczególnie cenna część dyskusji wskazująca jednocześnie, jak trudny problem badawczy został podjęty oraz w jakim kierunku badania powinny być kontynuowane. W tym kontekście warto zauważyć uwzględnienie aplikacyjnego znaczenia przyszłych badań.

Recenzowaną pracę zamyka 7 starannie opracowanych wniosków wyprowadzonych z najważniejszych wyników badań. We wnioskach 2 i 3 Autorka zwraca uwagę na wykrycie genów o jeszcze nierozpoznanej funkcji, których ekspresja jest regulowana temperaturą, a które mogą mieć związek z wirulencją *D. solani* i *P. atrosepticum*, w szczególności w początkowym etapie infekcji, a więc nawiązaniem pasożytniczego stosunku tych bakterii z rośliną. Niektóre z genów indukowanych temperaturą zostały zidentyfikowane po raz pierwszy.

Reasumując stwierdzam, że:

1. Praca podejmuje temat ambitny, ważny dla nauki i praktyki, poznania genetycznego podłoża zależności między ekspresją zależnych od temperatury genów a wybranymi cechami bakterii *Dickeya solani* i *Pectobacterium atrosepticum*, w szczególności tymi, które powodują rozwój choroby i straty gospodarcze w uprawach ziemniaka.
2. Doktorantka zrealizowała założony cel badawczy, poprawnie i z ogromnym nakładem pracy stosując wybrane metody,.
3. Literatura cytowana w pracy jest bardzo liczna i trafnie dobrana.
4. Interpretacja i dyskusja wyników są oparte na dobrej znajomości zagadnienia.
5. Rozprawa jest poprawnie przygotowana a dokumentacja naukowa – bardzo bogata i przejrzysta.

6. Zgromadzona wiedza stanowi podstawę do kontynuacji badań i szerszego ich przeprowadzenia na roślinach.

Na podkreślenie zasługuje fakt napisania rozprawy w języku angielskim, co sprawia, że będzie ona dostępna w całości dla szerokiego gremium odbiorców. Praktyka zamieszczania rozpraw doktorskich w internecie jest coraz częściej stosowana przez dobre ośrodki naukowe. Jest jeszcze inny aspekt, mianowicie znajomość światowego języka nauki przez Doktorantkę, stanowiący nie tylko Jej osobisty walor, ale także świadectwo macierzystej Uczelni.

Wniosek końcowy

Uważam, że praca doktorska Pani mgr Natalii Kaczyńskiej spełnia wszelkie formalne wymagania określone w artykule 13 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), a także inne zwyczajowo przyjęte kryteria oceny rozpraw doktorskich. Zarówno przedstawiona praca, jak i dorobek naukowy w postaci jednej publikacji w renomowanym czasopiśmie *Plant Pathology* oraz trzech wystąpień na międzynarodowych konferencjach i sympozjach, uzasadniają nadanie mgr Kaczyńskiej stopnia naukowego doktora w dyscyplinie biochemia. Wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kaczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Świer niewie 1.09.2018

P. Sobiczewski
Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski