

Lublin, 25 czerwca 2019

Dr hab. Monika Janczarek, prof. UMCS
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Ul. Akademicka 19
20-033 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Motyki-Pomagruk

Tytuł rozprawy: Genotypic and phenotypic characterization of bacteria from *Dickeya solani* species and development of novel control methods against phytopathogens (Charakterystyka genotypowa i fenotypowa bakterii z gatunku *Dickeya solani* oraz opracowanie nowatorskich metod ochrony roślin przed patogenami bakteryjnymi)

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Motyki-Pomagruk została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej oraz opieką naukową promotora pomocniczego dr. inż. Wojciecha Śledzia. Kopromotorem rozprawy jest prof. Alessio Mengoni z Uniwersytetu we Florencji.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr A. Motyki-Pomagruk jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych od wielu lat z dużym powodzeniem przez zespół prof. Ewy Łojkowskiej, który uzyskał wiele istotnych danych dotyczących molekularnych podstaw interakcji bakterii fitopatogennych z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* z ich roślinnymi gospodarzami. Bakterie te wywołują objawy chorobowe, zwane „czarną nóżką” i „mokrą zgnilizną” na ziemniakach i innych roślinach uprawnych, co powoduje duże straty ekonomiczne w sektorze rolniczym. Z tych powodów podjęty temat badawczy jest stale aktualny i bardzo ważny dla globalnej produkcji żywności.

Mgr Agata Motyka-Pomagruk podczas realizacji celu swoich badań mogła z powodzeniem korzystać z ogromnego doświadczenia i bogatego warsztatu metodycznego

zespołu, co przyczyniło się do uzyskania rozprawy doktorskiej na bardzo wysokim poziomie naukowym i o dużych walorach poznawczych oraz aplikacyjnych.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa została napisana w języku angielskim i ma dość typowy układ dla tego rodzaju prac. Zasadnicza część pracy liczy 198 stron i zawiera następujące części: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki i dyskusja, wnioski oraz bibliografia. Ponadto, dołączono do rozprawy tabelę z dodatkowymi danymi, spis stosowanych skrótów oraz życiorys naukowy Doktorantki. Rozprawa została przygotowana w sposób bardzo staranny i drobiazgowy; szczegółowo zostały opisane poszczególne jej rozdziały. W pracy zamieszczono liczne rysunki i tabele (łącznie 39 rysunków oraz 21 tabel). Wstęp pracy zawiera obszerny opis (35 stron) poszczególnych zagadnień związanych z tematem pracy, logicznie uporządkowanych i właściwie wprowadzających w tematykę badawczą. Cel pracy został sformułowany przez Autorkę precyzyjnie, a w rozdziałach Materiały i Metody zostały bardzo szczegółowo opisane szczepy i inne materiały wykorzystane do badań oraz zastosowane metody (43 strony). Pragnę w tym miejscu podkreślić bardzo bogaty warsztat badawczy Doktorantki, obejmujący szeroki wachlarz technik z zakresu mikrobiologii, biochemii, biologii molekularnej, genomiki i bioinformatyki. Rozdział obejmujący wyniki został bardzo szczegółowo opisany przez Doktorantkę (77 stron), a uzyskane przez Nią dane stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i oprócz walorów poznawczych, mają duży potencjał aplikacyjny. Wyniki zostały opisane w sposób logicznie uporządkowany i omówione w odniesieniu do najnowszych danych literaturowych z tego zakresu. Ze względu na bardzo dużą ilość różnorodnych wyników i złożoność tego tematu badawczego rozdzielenie tego długiego rozdziału na dwa odrębne rozdziały zawierające wyniki i dyskusję byłoby zasadne i ułatwiłoby recenzentowi analizę uzyskanych wyników.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr A. Motyki-Pomagruk zawiera obszerny rozdział Wstęp, w którym Autorka szczegółowo opisała zagadnienia związane z tematem pracy. Najpierw Doktorantka podała najważniejsze dane dotyczące taksonomii i ogólnej charakterystyki bakterii pektynolitycznych (soft rot *Pectobacteriaceae*, SRP). Następnie scharakteryzowała czynniki wirulencji bakterii SRP, w tym enzymy degradujące ścianę komórkową roślin (PCWDE), siderofory, lipopolisacharydy (LPS) i inne struktury powierzchniowe. Ostatnia część Wstępu została poświęcona charakterystyce chorób wywoływanych przez SRP i ich



znaczenia ekonomicznego oraz aktualnego stanu wiedzy na temat sposobów detekcji i identyfikacji tych bakterii. Opis poszczególnych zagadnień we Wstępie prowadzi w jasny sposób do sformułowania celu pracy.

Celem rozprawy było ustalenie częstości występowania różnych gatunków bakterii pektynolitycznych w Polsce w latach 2013-2014 oraz ocena bioróżnorodności wyizolowanych w tym okresie szczepów *Dickeya solani*. Dodatkowo, Doktorantka podjęła się próby wykorzystania uzyskanych wyników do opracowania nowych metod ochrony roślin przed tymi fitopatogenami. Cel pracy został w pełni zrealizowany, a otrzymane wyniki mogą zostać z dużym powodzeniem wykorzystane do eradykacji tych bakterii z różnych płynnych odpadów pochodzenia rolniczego. Cel pracy został osiągnięty poprzez realizację trzech głównych zadań badawczych.

Pierwsze zadanie dotyczyło ustalenia częstości występowania bakterii SRP w Polsce w okresie dwóch lat (2013-2014) i określenia przynależności gatunkowej wyizolowanych szczepów. Doktorantka przebadła bardzo dużą liczbę próbek roślinnych otrzymanych z różnych regionów Polski (z 11 województw, łącznie 581 próbek), z których wyizolowała blisko 200 szczepów pektynolitycznych. Analiza molekularna tych izolatów wykazała, że najczęściej występującymi gatunkami SRP na obszarze Polski były: *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. parmentieri* i *Dickeya* spp. Spośród nich najliczniejsze były izolaty należące do gatunku *P. atrosepticum* (26% w 2013 i 38% w 2014), *P. carotovorum* (36% i 31%) i *P. parmentieri* (32% i 22%), natomiast najmniej liczne były szczepy *Dickeya* spp. (7% i 8%). Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka po raz pierwszy dokonała identyfikacji szczepów SRP wyizolowanych w Polsce i zaklasyfikowania ich do gatunku *P. parmentieri*, gdyż wcześniej stosowane techniki detekcji nie pozwalały na rozróżnienie gatunków *P. carotovorum* i *P. parmentieri*. Ponadto, Doktorantka zaobserwowała ciekawe i dość często występujące zjawisko koinfekcji roślin przez bakterie SRP, przy czym, co ciekawe, nie wykryto koinfekcji przez gatunki *P. atrosepticum* i *Dickeya*. Co zdaniem Doktorantki może być przyczyną tego zjawiska? Autorka wykazała również, że liczebność bakterii SRP na polach uprawnych charakteryzowała się sezonowością (najwięcej izolatów uzyskano w lipcu 2013 i 2014 r.), natomiast warunki klimatyczne nie miały znaczącego wpływu na profil populacji tych bakterii.

Drugie zadanie badawcze dotyczyło szczegółowej charakterystyki molekularnej i fenotypowej szczepów należących do gatunku *Dickeya solani*, uzyskanych podczas realizacji pierwszego zadania. Doktorantka przeprowadziła analizę porównawczą szczepów z regionu Polski oraz innych krajów Europy (przebadano łącznie 20 szczepów, w tym 11 krajowych i 9



szczepów zagranicznych). Autorka wykazała, że liczebność szczepów *Dickeya* na obszarze Polski była na dość stałym poziomie w badanym okresie i stanowiła mniejszość populacji bakterii SRP, podobnie jak w innych krajach europejskich. Doktorantka scharakteryzowała szereg własności fenotypowych tych szczepów (m.in. efektywność maceracji tkanek roślinnych, zdolność syntezy różnych enzymów, w tym pektynaz, celulaz i proteaz, tworzenia biofilmu, dynamikę wzrostu i ruchliwość bakterii). Większość badanych szczepów *D. solani* charakteryzowała się podobnymi własnościami fenotypowymi, jedynie w przypadku oznaczeń ruchliwości typu „swarming” oraz tworzenia biofilmu zaobserwowano większe zróżnicowanie w obrębie populacji. Wyjątek stanowiły szczepy IFB0223 pochodzący z Niemiec i IFB0455 pochodzący z Izraela, których efektywność maceracji tkanek była niska i zbliżona do efektywności szczepu kontrolnego *D. dadantii*. Szczepy te wykazywały również dużo niższą aktywność enzymów PCWDE (szczególnie proteaz), wytwarzały znacznie mniej biofilmu oraz sideroforów i charakteryzowały się najmniejszą dynamiką wzrostu spośród badanych izolatów. Dlatego można przypuszczać, że niższe wartości badanych parametrów uzyskane dla tych szczepów mogą wynikać z ich wolniejszego tempa wzrostu. Prosiłabym o wyjaśnienie co może być przyczyną tego zjawiska (m.in. w oparciu o dane uzyskane przez Doktorantkę w wyniku przeprowadzonych analiz porównawczych genomów *D. solani*)? W odniesieniu do zastosowanej metodyki, prosiłabym o informację dlaczego oznaczenie tworzenia biofilmu zostało wykonane w temperaturze 18°C, podczas gdy oznaczenia innych cech fenotypowych tych bakterii zostały wykonywane w 28°C?

Mgr A. Motyka-Pomagruk uzyskała również bardzo ciekawe wyniki dotyczące struktury chemicznej OPS LPS tych bakterii. Wykazano zadziwiająco jednorodność budowy tych makromolekuł, co zostało udowodnione dla czterech szczepów (IFB0099, IFB0123, IFB0158 i IFB0223), różniących się pochodzeniem oraz efektywnością maceracji tkanek roślin. OPS tych szczepów jest identycznie zbudowany jak w szczepie referencyjnym *D. dadanti* 3937 i składa się z monomerów 6-deoksy-D-altrozy. Czy zdaniem Doktorantki taka budowa OPS może mieć znaczenie w adaptacji tych bakterii do środowiska glebowego i/lub ich interakcji z gospodarzem roślinnym?

W dalszej części badań Doktorantka przeprowadziła bardzo szczegółową analizę sekwencji 22 genomów *D. solani* i uzyskała szereg bardzo interesujących i wartościowych wyników. W ramach niniejszej pracy opracowano również metodę składania i anotacji genomów, której zastosowanie umożliwiło złożenie dziesięciu oraz zamknięcie sześciu składanych *de novo* sekwencji genomowych tych bakterii. Tą część wyników uważam za



szczególnie cenną, gdyż przyczyniły się one do scharakteryzowania i zamknięcia pangenomu *D. solani*. Ponadto, został określony profil genetyczny pangenomu tego gatunku bakterii. Doktorantka wykazała, że największą część pangenomu stanowią geny należące do grup funkcjonalnych COG: R, K, E i G, związanych z ogólnymi funkcjami bakterii, transkrypcją, transportem i metabolizmem cukrów oraz aminokwasów. Zidentyfikowane zostały również geny unikatowe pangenomu *D. solani*. Mgr A. Motyka-Pomagruk wykazała bardzo dużą jednorodność genomów bakterii należących do tego gatunku (niemal 100% identyczność sekwencji genomów i bardzo wysoką syntenię) oraz brak plazmidów. W tym miejscu chciałabym zapytać Doktorantkę jakie to może mieć znaczenie dla wirulencji i/lub konkurencyjności tych bakterii w środowisku?

Kolejnym zagadnieniem badawczym było opracowanie nowych metod eliminacji bakterii SRP z płynnych odpadów pochodzących z sektora rolniczego. Doktorantka opisała w pracy dwie metody wykorzystujące wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym (direct current atmospheric pressure glow discharge, dc-APGD). W pierwszej metodzie zastosowano specjalnie skonstruowany przepływowy układ reakcyjno-wyładowczy, zaś w drugiej metodzie wykorzystano nanocząsteczki srebra stabilizowane za pomocą pektyn lub SDS, uzyskane z zastosowaniem wymienionych powyżej wyładowań jarzeniowych. Wysoką skuteczność pierwszej metody potwierdzono dla bakterii *Clavibacter michiganensis*, *D. solani*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* oraz *Xanthomonas campestris* i wykazano, że wynikała ona z aktywności powstających reaktywnych form tlenu i azotu oraz emisji promieniowania UV. W drugiej metodzie przebadano antybakteryjne właściwości dwóch form nanocząsteczek srebra i ustalono, że cząsteczki stabilizowane SDS (SDS-AgNPs) były bardziej skuteczne w hamowaniu wzrostu fitopatogenów od form stabilizowanych pektynami (PEC-AgNPs).

Podsumowując, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr A. Motykę-Pomagruk. Doktorantka w trakcie realizacji badań zgromadziła dużą ilość bardzo wartościowych wyników i poczyniła wiele ciekawych obserwacji.

Za najważniejsze osiągnięcia tej rozprawy uważam:

- wykazanie dużej stabilności populacji szczepów SRP na obszarze Polski w badanym okresie (lata 2013-2014) oraz wykazanie, że szczepy *D. solani* stanowią dość stały i nieznaczny odsetek tej populacji



- ustalenie struktury chemicznej OPS LPS dla 4 szczepów *D. solani* (IFB0099, IFB0123, IFB0158 i IFB0223) i wykazanie identyczności ich budowy w porównaniu do OPS szczepu referencyjnego *D. dadantii* 3937
- opracowanie metody składania i anotacji genomów, której zastosowanie umożliwiło złożenie 10 i zamknięcie 6 składanych *de novo* sekwencji genomów *D. solani*; wykazanie bardzo dużej jednorodności genomów bakterii należących do tego gatunku (niemal 100% identyczność sekwencji genomów, bardzo duża syntenia oraz brak plazmidów)
- scharakteryzowanie i zamknięcie pangenu *D. solani*
- opracowanie dwóch metod skutecznych w usuwaniu SRP z płynnych odpadów lub innych cieczy będących nośnikami tych bakterii.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt bardzo dużej aktywności naukowej mgr A. Motyki-Pomagruk. Doktorantka jest współautorem 18 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR, 46 komunikatów zjazdowych oraz 2 patentów krajowych. Była również wykonawcą w kilkunastu projektach badawczych oraz kierownikiem projektu Preludium 11. Badania przeprowadzone w ramach tej rozprawy były finansowane z funduszy dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki (Harmonia 6 i Preludium 11) oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) (stypendium za wybitne osiągnięcia oraz w ramach Polsko-Włoskiej współpracy). Część wyników zawartych w prezentowanej rozprawie doktorskiej zostało opublikowanych w kilku prestiżowych czasopismach zagranicznych, z których w dwóch mgr A. Motyka-Pomagruk jest pierwszym autorem (New Biotechnology 2017, 39:181-189; Biotechnology and Bioengineering 2018, 115/96/0, 1581-1593). Prace te posiadają wysoki współczynnik oddziaływania i wysoką liczbę punktów MNiSW, co wskazuje na ich znaczącą wartość naukową.


Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi w pełni oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę mgr Agaty Motyki-Pomagruk i Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Wartość naukowa rozprawy doktorskiej mgr A. Motyki-Pomagruk przyczyniła się do znaczącego wzbogacenia wiedzy na temat genetycznych i fenotypowych cech populacji szczepów *Dickeya solani*. W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz.



595, z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Agaty Motyki-Pomagruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres prowadzonych badań, wartość naukową uzyskanych wyników, ich potencjał aplikacyjny oraz opublikowanie części z wyników w prestiżowych czasopismach zagranicznych, wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Monika Janczarek, prof. UMCS

