

Warszawa, dn. 17. 04. 2019

Prof. dr hab. Katarzyna Brzostek
Instytut Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii Stosowanej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Sabiny Żołędowskiej

pt. Characterization of the biodiversity and pan-genome of plant pathogenic bacteria from *Pectobacterium parmentieri* species (Charakterystyka bioróżnorodności i pan-genomu bakteryjnych patogenów roślin z gatunku *Pectobacterium parmentieri*)

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Sabiny Żołędowskiej została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem i opieką naukową promotora prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej oraz promotora pomocniczego dr. inż. Wojciecha Śledzia. Kopromotorem rozprawy jest prof. Alessio Mengoni z Uniwersytetu Florenckiego. Celem pracy była charakterystyka bioróżnorodności krajowej populacji fitopatogenów z gatunku *Pectobacterium parmentieri* oraz poznanie struktury genomu oraz pangenomu co jest kluczem do zrozumienia bioróżnorodności wewnątrzgatunkowej.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr S. Żołędowskiej jest naturalną kontynuacją i rozwinięciem badań realizowanych przez zespół prof. Ewy Łojkowskiej, który cieszy się uznaniem mikrobiologów na świecie, dostarczając wiele oryginalnych i wartościowych danych dotyczących molekularnych podstaw bioróżnorodności fitopatogenów z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*. Praca Doktorantki w tym zespole oraz możliwość korzystania z doświadczenia i bogatego warsztatu badawczego, zaowocowały rozprawą doktorską na wysokim poziomie naukowym i o dużych walorach poznawczych.

Na pracę doktorską składają się dwa, wspólne tematycznie artykuły naukowe, oba opublikowane w 2018 roku, w czasopiśmie indeksowanym w bazie JCR, tj. Plant Disease

(IF=2.941, 35 pkt MNiSW) oraz BMC Genomics (IF= 4.257, 35 pkt. MNiSW). W obu pracach Pani mgr S. Żołędowska jest pierwszym autorem. Dysertację uzupełniają: streszczenie (w jęz. angielskim i polskim), rozdział, w którym przedstawiono cel naukowy i omówiono otrzymane wyniki (w jęz. angielskim) oraz bibliografia. Do pracy doktorskiej dołączono oświadczenia współautorów publikacji, które jednoznacznie wskazują na dominującą rolę doktorantki w przeprowadzeniu części eksperymentalnej badań, opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji.

Ponadto, z informacji dołączonej do rozprawy doktorskiej wynika, że Pani mgr S. Żołędowska jest współautorką 9 publikacji, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej, ale które swoją ogólną tematyką badawczą korespondują z tą podjętą w dysertacji. Doktorantka swoje osiągnięcia prezentowała także, w formie ustnej lub plakatowej, na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (w sumie sześciu). Podczas studiów doktoranckich Pani mgr S. Żołędowska odbyła 4-miesięczny staż naukowy (w 2016 i 2018 roku) w laboratorium kierowanym przez prof. Alessio Mengoni, kopromotora rozprawy doktorskiej. Przekazane informacje świadczą o dużej aktywności i znacznym dorobku naukowym Doktorantki.

Doktorantka uczestniczyła w realizacji trzech międzynarodowych projektów badawczych, we współpracy z zespołem naukowców z Francji (w latach 2014-2016), Włoch (w latach 2015-2019) oraz Norwegii, (w 2014-2016). Fundusze na ich realizację pochodziły z dwóch grantów NCN Harmonia, których kierownikiem była prof. Ewa Łojkowska oraz NCBiR POTPAT, w ramach współpracy Polsko-Norweskiej, kierownikiem był dr hab. Robert Czajkowski z IFB UG i MUG. Ponadto, Doktorantka była wykonawcą w projekcie NCN OPUS, kierowanym przez prof. E. Łojkowską, a także beneficjentką rocznego grantu Uniwersytetu Gdańskiego dla młodych naukowców (2016). Wszystkie projekty dotyczyły fenotypowej i molekularnej charakterystyki fitopatogenów z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*, struktury i funkcji genomów szczepów/izolatów należących do tych rodzajów.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr S. Żołędowskiej, na którą składają się dwie, spójne tematycznie prace, jest udaną próbą kompleksowego zbadania bioróżnorodności krajowej populacji szczepów *Pectobacterium parmentieri*, izolowanych w 2013 i 2014 roku, a także dokonania charakterystyki pangenu tego gatunku. Cele badań postawione zostały w sposób jasny i przemyślany.

Podjęcie tej tematyki uważam za zasadne z kilku powodów. Po pierwsze, *P. parmentieri*, po wielu taksonomicznych roszadach, został nowo wyodrębnionym gatunkiem bakterii pektynolitycznych, o specyficzności (zgodnie z istniejącym stanem wiedzy) ograniczonej do ziemniaka. Zmiany taksomiczne, które dokonały się w ostatnich latach, i które dotyczyły *P. parmentieri*, a także wyższych jednostek taksonomicznych tj. rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*, były możliwe dzięki zastosowaniu nowych narzędzi i metod diagnostycznych, opartych głównie o analizy genomowego DNA. Kolejnym, ważnym powodem do podjęcia badań o tej tematyce, to ekonomiczne aspekty związane z infekcjami materiału roślinnego szczepami *P. parmentieri*. *P. parmentieri* jest gatunkiem bakterii pektynolitycznych atakującym ziemniak, który pod względem znaczenia gospodarczego jest czwartą rośliną świata. Co więcej, infekcje *P. parmentieri* mają charakter globalny, a szczepy są wykrywane w Europie, Ameryce Północnej, Afryce, Azji i Nowej Zelandii. Dlatego też choroby, rozwijające się w efekcie infekcji tym gatunkiem, zwane zwyczajowo „czarną nóżką (ang. black disease) oraz „mokrą zgnilizną (ang. soft rot disease) i dotyczące odpowiednio pędów oraz bulw ziemniaka, mogą powodować ogromne straty w rolnictwie światowym. Mimo, że badania podjęte w rozprawie doktorskiej bezpośrednio nie rozwiążą problemu zakażeń ziemniaka, to pozwolą na monitorowanie populacji i lepsze zrozumienie patofizjologii i ekologii tego gatunku, co jest głównym motywem podjętych badań.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałam rozprawę i chciałam podkreślić wyjątkową spójność tematyczną badań, prezentowanych w obu publikacjach.

Pierwsza z prac wchodząca w skład dysertacji (opublikowana w Plant Disease) zawiera analizę bioróżnorodności oraz struktury populacji 85 szczepów *P. parmentieri*, wyizolowanych z materiału roślinnego, z objawami czarnej nóżki lub mokrej zgnilizny, pochodzącego z plantacji ziemniaka i zebranego w roku 2013 i 2014 przez odpowiednie służby fitosanitarne. Badania obejmowały ocenę potencjału patogenicznego szczepów *P. parmentieri*, analizę struktury genetycznej szczepów *P. parmentieri* oraz ich pokrewieństwa filogenetycznego. Ważnym etapem był usprawnienie diagnostyki poprzez opracowanie metody genotypowania pozwalającej na różnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów *P.*

parmentieri. W oparciu o analizę sekwencji REP, w obrębie gatunku wyodrębniono pięć genotypów (I-V). Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że genotyp I *P. parmentieri* jest najczęstszym wśród wszystkich analizowanych. Analiza filogenetyczna genu *recA* umożliwiła wyróżnienie dwóch kładów. Genetyczne różnice między izolatami *P. parmentieri* mogą stanowić podstawę do śledzenia rozprzestrzeniania poszczególnych wariantów do różnych krajów, czy regionów geograficznych.

Analizując rozprawę Pani mgr S. Żołędowskiej nasunęło mi się kilka pytań, na które nie znalazłam odpowiedzi.

1. W pracy nie ma informacji o geograficznej lokalizacji plantacji w Polsce, skąd pochodził materiał do badań i o odmianach ziemniaka (wczesna, średniowczesna, późna). Czy taka informacja nie pomogłaby w analizie otrzymanych wyników i ustaleniu zależności między czynnikami takimi jak odmiana ziemniaka, temperatura, wilgotność, rodzaj gleby a selekcją określonych patotypów, biotypów, a może ekotypów?

2. Jak wynika z badań, prewalencja zakażeń ziemniaka gatunkiem *P. parmentieri* wynosiła ~16% w 2013 roku i ~13% w 2014. Ponadto, *P. parmentieri* stanowi znaczną część populacji wszystkich bakterii pektynolitycznych izolowanych z ziemniaka. Jestem ciekawa czy na tym samym materiale roślinnym z objawami „czarnej nóżki” lub mokrej zgnilizny szczepy *P. parmentieri* występowały w kombinacji z innymi pektynolitycznymi patogenami? Jeśli tak, to jaką mamy pewność, że objawy chorobowe są wynikiem infekcji *P. parmentieri* ?

3. Sednem badań populacyjnych i epidemiologicznych jest analiza tzw. współzmienności czyli jak właściwości bakterii, obecność określonych czynników wirulencji, itp. mają wpływ na przebieg zakażenia i wystąpienie choroby. W tym kontekście mam pytanie, jak Pani wytłumaczy fakt, że wśród badanych izolatów *P. parmentieri* zidentyfikowano szczep JFB 5611, wyizolowany z pędu ziemniaka z objawami czarnej nóżki, który nie wykazywał aktywności pektynolitycznej, celulolitycznej oraz proteaz i nie był zdolny do maceracji tkanki ziemniaka *in vitro*. Czy taki izolat mógł wywołać chorobę - czarną nóżkę? Czy do gatunku *P. parmentieri* mogą należeć szczepy saprofityczne, podobnie jak to ma miejsce wśród niektórych gatunków bakterii patogennych dla ludzi i zwierząt.

4. Kolejne pytanie dotyczy badania polimorfizmu szczepów *P. parmentieri*. W dysertacji, w celu określenia zmienności gatunku *P. parmentieri* jak i populacji wykorzystano technikę REP-PCR opartą o różnice w wielkości oraz liczbie kopii pozagenowych powtórzonych sekwencji palindromowych. Czy siłę dyskryminacyjną REP-PCR weryfikowano względem innych metod? Jak wyglądały wyniki?

5. Sugerowałabym dla wyliczenia mocy różnicującej profili REP-PCR i polimorfizmu SNP zastosować indeks numeryczny dla każdej metody, tj. indeks GDI (genetic diversity index) oraz HGDI (Hunton and Gaston discriminatory index), wyliczony dla każdej metody osobno oraz wspólnie. Taka analiza pozwala na porównywanie różnych metod ze sobą i ich siły dyskryminacyjnej.

6. Jak Pani wytłumaczy obecność na tej samej roślinie szczepów *P. parmentieri* o różnym profilu REP-PCR i polimorfizmie SNP w sekwencji *recA* ??

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka nieścisłości które pojawiły się w tekście pracy.

1. Nie do końca wiadomo jaka liczba szczepów *P. parmentieri* izolowanych w latach 2013-2014) podlegała badaniom. W pracy pojawia się informacja, że z 85 izolatów 78 poddano szczegółowej analizie. Tymczasem z tabeli nr 1 wynika, że analizę REP-PCR przeprowadzono dla 85 izolatów, a SNP dla 77 (85-8 NT+NE). Liczba szczepów, które poddano ocenie fenotypowej wynosiła 77, tj. 39 w 2013 i 38 w 2014 (Fig. 4).

2. Przy opisie polimorfizmu SNP mylnie podano nazwy substytucji, tj. G-A i C-T to tranzycja zamiast transwersja, jak jest w pracy, a T-A to transwersja, a nie tranzycja.

3. Przy charakterystyce fenotypów (str. 158) podano, że szczep *P. parmentieri* SCC3193 charakteryzuje się największą ruchliwością typu swarming, tymczasem na Fig. 4 jest to *P. wasabiae* CFBP3304.

4. Brak w publikacji suplementu zawierającego Fig. 1-7. Na szczęście znalazłam te materiały dołączone do rozprawy doktorskiej. Duże trudności sprawiła mi analiza Fig. 4 i 5, ze względu są zbyt małą czcionką zastosowaną do opisu rycin.

Tematyka podjęta w drugiej pracy, opublikowanej w BMC Genomics (2018), dobrze koresponduje z zagadnieniami prezentowanymi w pierwszej omówionej publikacji i koncentruje się na poznaniu molekularnych podstaw wewnątrzgatunkowej zmienności *P. parmentieri*. Praca przynosi też odpowiedzi na niektóre pytania nasuwające się podczas lektury pierwszej publikacji.

Praca opublikowana w BMC Genomics jest obszerną, bardzo dobrze opracowaną prezentacją wyników sekwencjonowania i złożenia de novo 12 genomów *P. parmentieri*, w tym 10 kompletnych. Praca ta jest wymownym znakiem obecnych czasów, a więc możliwości przeprowadzenia sekwencjonowania nowej generacji NGS, zwiększenia dokładności odczytów oraz dostępności odpowiednich narzędzi bioinformatycznych, które pozwalają na złożenie mapy genowej od podstaw (bez odnoszenia się do sekwencji referencyjnej). Chciałam podkreślić fakt, że te nowatorskie, ale kosztowne badania mogły być zrealizowane dzięki finansowemu wsparciu (granty) oraz opiece promotorów z Polski i kopromotora, prof. Allesio Mengoni z Włoch.

Wybór szczepów *P. parmentieri* do zsekwencjonowania i złożenia de novo 12 genomów nie był przypadkowy ale poprzedzony analizą potencjału patogenicznego szczepów, która pozwoliła na wytypowanie tych, które wykazywały znaczące fenotypowe

różnice odnośnie stopnia maceracji tkanki roślinnej, aktywności enzymów PCDWE (Plant Cell Wall Degrading Enzymes), ruchliwości, produkcji sideroforów czy tworzenia biofilmu.

Złożenie de novo map genowych, było punktem wyjścia do analizy struktury i organizacji informacji genetycznej, umożliwiło odczytanie wielkości genomów, % par GC, zidentyfikowania ORFów, sekwencji niekodujących i regulatorowych czy sekwencji powtórzonych. Zdefiniowano także inne składowe, w tym jeden plazmid oraz ruchome elementy genetyczne, zintegrowane z chromosomowym DNA. Kluczem do zrozumienia wewnątrzgatunkowej zmienności były analizy porównawcze genomów. Do tej analizy oprócz 12 zsekwencjonowanych de novo genomów włączono trzy, dostępne w bazie danych GenBank, szczepu *P. parmentieri* z Francji i dwóch referencyjnych, z Finlandii oraz USA. Porównując 15 sekwencji genomowych zdefiniowano pangénom gatunku *P. parmentieri* wykazując przy tym że aż 47% pangénomowi stanowi zbiór genów pomocniczych i unikatowych. Bazując na ustaleniach o możliwościach nabywania egzogenego DNA oraz obecności dużej liczby rRNA wykazano, że pangénom ma charakter „otwarty” oraz charakteryzuje się dużą zmiennością. Jak sugerują badania, zmienność genomu jest w dużej mierze uwarunkowana obecnością ruchomych elementów genetycznych oraz ich udziałem w horyzontalnym transferze genów. Funkcjonalna adnotacja frakcji pangénomowi dostarczyła bardzo interesujących i wartościowych danych, które pozwoliły na poszerzenie wiedzy o *P. parmentieri* i wyciągnięciu wniosków, że ogromna plastyczność genomu może odpowiadać za obserwowane fenotypowe różnice, a także może być źródłem adaptacji do różnorodnych warunków środowiskowych, w tym także szerszego zakresu gospodarza.

Podczas analizowania wyników prezentowanych w BMC genomics nasunęło mi się kilka pytań, mam też kilka komentarzy:

1. Dlaczego wśród izolatów wytypowanych do sekwencjonowania nie znalazł się szczep JFB 5611, scharakteryzowany w publikacji w Plant Disease, i który w testach fenotypowych odbiegał od reszty analizowanych izolatów, tj. nie wykazywał aktywności enzymów PCDWE (pektynaz, celulaz i proteaz) oraz był niezdolny do maceracji tkanki ziemniaka *in vitro*?
2. Czy analiza SNP w rdzeniu pangénomowi nie byłaby bardziej dyskryminującą metodą w badaniach polimorfizmu i analizie filogenetycznej szczepów *P. parmentieri* niż analiza w oparciu o sekwencję nukleotydową genu *recA*?
3. Czy zamiast analizować „na mokro” wzory *fingerprinting* REP PCR nie lepiej sięgnąć do genomów i przeprowadzać analizę *in silico*.
4. Czy w świetle otrzymanych wyników fenotypowych i genotypowych, a także znacznej odległości ewolucyjnej, szczep *P. parmentieri* SCC3193 powinien być w dalszym ciągu uważany za szczep referencyjny, reprezentatywny dla gatunku *P. parmentieri*?

5. Wyniki analiz genomowych, prowadzonych przez wiele ośrodków naukowych na świecie, sugerują, że wirulencja niektórych bakterii patogennych może być efektem nie nabycia informacji genetycznej na drodze HTG, a delecji fragmentu genomowego DNA. Ciekawa jestem jaką informację genetyczną utraciło 8 analizowanych szczepów *P. parmentieri*, w porównaniu do 4 pozostałych (IFB 5605, IFB5486, IFB5427, IFB5408). Na Rycinie 1, przedstawiającej kształt genomów, jest to duża delecja w chromosomach, w pozycji ~1800 kbp.

6. Czuję pewien niedosyt informacji przedstawionych na Rycinie 1. Jeśli szczepem odniesienia był *P. parmentieri* CFBP 8475 (chyba na rycinie pomyłkowo zapisano CFBP 8457!) to powinno się znaleźć więcej informacji o tym chromosomie (więcej okręgów), a nie tylko ten, mówiący o zawartości par GC? Byłoby bardzo dobrze zaznaczyć, np. które regiony zawierają profagi, wskazać 4 loci CRISP itp. Ciekawa jestem czy geny, które np. kodują kluczowe determinanty wirulencji *P. parmentieri* występują koło siebie, tworząc grupy ulokowane w specyficznych pozycjach genomu?

Uwaga edytorska

W przygotowanej rozprawie doktorskiej nie znalazłam Tabeli S1 zawierającej dokładne dane genomowe na temat obecności genów związanych z określoną funkcją biologiczną, np. z wirulencją, ruchliwością, metabolizmem żelaza etc.

Podsumowując, wyrażam uznanie dla osiągnięć doktorantki, a wszystkie uwagi zawarte w recenzji nie obniżają mojej wysoce pozytywnej oceny tej rozprawy. Uważam, że przedstawione w rozprawie badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe, ważne treści, które są kluczem do zrozumienia molekularnych mechanizmów zmienności i bioróżnorodności wewnątrzgatunkowej *P. parmentieri*.

Zdefiniowanie pangenu 15 gatunków *P. parmentieri* to ogromny zasób informacji przekazany mikrobiologom i niezbędny w rozwiązywaniu dalszych problemów naukowych związanych z patofizjologią i ekologią tego gatunku.

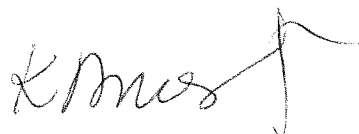
Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Sabiny Żołędowskiej przedstawiona w postaci dwóch oryginalnych, współautorskich prac, opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, reprezentuje wysoki poziom naukowy i wnosi oryginalny wkład do bardzo ważnego obszaru wiedzy jakim jest genomika, biologia i fizjologia fitopatogenów.

Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 13 Ustawy o stopniach 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 póź. zm.) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie

biochemia. Zatem, wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Sabiny Żołędowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres prowadzonych badań, wartość naukową uzyskanych wyników, walory poznawcze pracy, a także opublikowanie wyników badań w cenionych czasopismach naukowych i które na liście MNiSW uzyskały 35 punktów, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'K. M...' with a stylized flourish at the end.