



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 24.06.2019 r.

Prof. dr hab. Katarzyna Lisowska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Motyki-Pomagruk

„Genotypic and phenotypic characterization of bacteria from *Dickeya solani* species and development of novel control methods against phytopathogens“

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska wykonana została pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej z Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku. Promotorem pomocniczym jest dr inż. Wojciech Śledź z tej samej jednostki, a kopromotorem prof. Alessio Mengoni z University of Florence. Praca mgr Agaty Motyki-Pomagruk mieści się w głównym nurcie prac badawczych prowadzonych przez Promotora pracy, prof. Ewę Łojkowską dotyczących wykrywania, identyfikacji i badania zróżnicowania genetycznego bakteryjnych patogenów roślin.

Celem badań podjętych w pracy był monitoring występowania mikroorganizmów z rodziny *Pectobacteriaceae* na terenie Polski w latach 2013-2014, a następnie analiza bioróżnorodności w obrębie jednego gatunku z tej rodziny *Dickeya solani*, na poziomie fenotypowym i genetycznym i propozycja efektywnych metod eradykacji tych fitopatogenów. Wśród patogenów bakteryjnych powodujących straty plonów roślin uprawnych kluczowe znaczenie mają właśnie bakterie pektynolityczne, obecnie zaliczane do rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Szczególnie gatunek *Dickeya solani* jest przedmiotem zainteresowania naukowego, m.in. ze względu na dużą wirulencję izolowanych szczepów. Bakterie z rodzaju *Pectobacterium* i *Dickeya* powodują powszechnie występujące choroby, takie

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ

tel. (48) 42 635-44-68; fax (48) 42 665-58-18

ul. Banacha 12/16, PL - 90-237 Łódź,

e-mail: katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

 www.biol.uni.lodz.pl

jak mokra zgnilizna, dotykająca różne rośliny uprawne oraz czarna nóżka ograniczona do ziemniaka. Bakterie pektynolityczne stanowią duże zagrożenie głównie dla plantacji ziemniaka sadzeniaka, zarówno w trakcie wegetacji roślin, jak i w czasie przechowywania plonów. Notuje się z tego powodu bardzo duże straty ekonomiczne, mogące sięgać nawet 20% plonu, nie tylko w Polsce, ale i innych krajach europejskich. Jak dotąd nie opracowano skutecznych metod ochrony roślin przed drobnoustrojami powodującymi czarną nóżkę i mokra zgniliznę. Stosuje się jedynie środki zapobiegawcze. Strategia ochrony ziemniaka przed bakteriami pektynolitycznymi polega głównie na wczesnym wykrywaniu tych drobnoustrojów i eliminacji materiału nasiennego. Biorąc pod uwagę, że Polska jest siódmym co do wielkości producentem tego warzywa na świecie, podjęte przez Doktorantkę badania dotyczące monitoringu występowania bakterii pektynolitycznych na terenie Polski, ich identyfikacji oraz szczegółowej charakterystyki izolatów *Dickeya solani*, a co najważniejsze zaproponowanie nowych, skutecznych metod ich eliminacji są celowe i w pełni uzasadnione. Mgr Agata Motyka-Pomagruk podjęła się realizacji tematu ważnego nie tylko w aspekcie poznawczym, ale i praktycznym. Należy zwrócić uwagę, że podjęta przez Doktorantkę tematyka wymagała zastosowania bogatego warsztatu metodycznego oraz współpracy z innymi jednostkami naukowymi, z czym mgr Agata Motyka –Pomagruk świetnie sobie poradziła.

Rozprawa doktorska mgr Agaty Motyki-Pomagruk jest napisana w języku angielskim i obejmuje 204 strony, z podziałem tekstu na rozdziały, o układzie typowym dla prac doświadczalnych. Praca ilustrowana jest 39 rycinami i 21 tabelami, zawiera cytaty z 414 pozycji literaturowych. Ponadto Doktorantka przedstawiła pozostały dorobek naukowy w postaci artykułów naukowych, zgłoszeń patentowych oraz wystąpień konferencyjnych, staży, a także realizacji projektów badawczych.

Pracę doktorską mgr Agaty Motyki-Pomagruk otwiera **Streszczenie** w języku angielskim i polskim, w którym Autorka bardzo dobrze podsumowała przeprowadzone wielokierunkowo badania i uzyskane najważniejsze wyniki.

Wstęp pracy jest logicznie zaplanowany i zawiera dobrze dobrany, aktualny materiał literaturowy (włącznie z pracami z bieżącego roku), na podstawie którego Autorka przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy z zakresu prowadzonych badań i co najważniejsze wykazała celowość ich prowadzenia. Doktorantka opisała szczegółowo aktualną taksonomię nowej rodziny *Pectobacteriaceae*. Scharakteryzowała drobnoustroje należące do tej rodziny, z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*, powodujące mokrą zgniliznę, określane jako SRP (Soft Rot *Pectobacteriaceae*), uwzględniając w szczegółowym opisie czynniki ich wirulencji i drogi transmisji. Szczególny nacisk położyła na opis, zarówno klasycznych, jak i nowoczesnych metod molekularnych wykrywania i identyfikacji tych patogenów. Następnie opisała dotychczasowe

badania w zakresie monitoringu występowania tych szczepów w Polsce, rozpoczęte i realizowane przez zespół prof. Łojkowskiej i wskazała kierunki rozwoju nowoczesnych metod kontroli tych fitopatogenów. Moim zdaniem Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą w zakresie przedstawionej problematyki badawczej, a zagadnienia przedstawione we wstępie są bardzo dobrym podkładem teoretycznym do przeprowadzonych badań.

Cele pracy zostały przez Doktorantkę przedstawione bardzo klarownie, sformułowane w trzech punktach i obejmują: a) izolację i identyfikację mikroorganizmów z rodziny *Pectobacteriaceae* na terenie Polski, b) szeroką charakterystykę bakterii w obrębie gatunku *Dickeya solani* (z różnych rejonów geograficznych), na poziomie fenotypowym i genetycznym w celu wyjaśnienia mechanizmu molekularnego warunkującego ich wirulencję, c) opracowanie innowacyjnych, przyjaznych środowisku metod eliminacji tych fitopatogenów.

Następne dwa rozdziały **Materiały** oraz **Metody** są przedstawione w sposób bardzo czytelny, zawierają pełen wykaz badanych szczepów bakteryjnych, odczynników, podłoży i sprzętu oraz opis stosowanych technik badawczych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykorzystwała w swoich badaniach różnorodne techniki z zakresu analizy biochemicznej, chromatograficznej i zaawansowane techniki molekularne i bioinformatyczne oraz nowatorską metodę eradykacji fitopatogenów opartą o wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym, z wykorzystaniem układu reakcyjno-wyładowczego, skonstruowanego na potrzeby tej pracy we współpracy z Politechniką Wrocławską. Świadczy to o wszechstronnym podejściu do badanego problemu, jak i wysokich umiejętnościach Doktorantki. Zaznaczyć także należy współpracę z innymi jednostkami w zakresie analizy chromatograficznej, GLC, GLC-MS i technik NMR, w celu określenia struktury LPS *D. solani*.

Zasadniczy rozdział pracy **Wyniki** zostały omówione wraz z **Dyskusją**, co ułatwia ich interpretację w bezpośrednim odniesieniu do innych prac. Liczne dane eksperymentalne zostały dobrze przedstawione graficznie lub tabelarycznie i wyczerpująco omówione.

W pierwszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła wyniki badań dotyczące izolacji bakterii pektynolitycznych (SRP) z materiału roślinnego w latach 2013 i 2014, odpowiednio z 248 i 283 próbek z terenu Polski. Izolaty te zidentyfikowano różnymi technikami PCR jako *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium parmentieri* i *Dickeya* spp.. Ciekawym elementem pracy było dokonanie przez Doktorantkę analizy porównawczej tych izolatów z izolatami bakterii SRP uzyskanymi przez zespół prof. Łojkowskiej we wcześniejszych latach, 1996, 2005 i 2011. Długoterminowy monitoring pozwolił na wskazanie gatunków bakterii pektynolitycznych na plantacjach nasiennych

ziemniaka na terenie Polski dominujących w poszczególnych latach. Analizując materiał z lat 2013 i 2014 Doktorantka wykazała wyższą populację bakterii z rodzaju *Pectobacterium* niż *Dickeya*. Następnie Autorka dokonała szerokiej analizy porównawczej szeregu czynników biotycznych i abiotycznych mogących mieć wpływ na obecność badanych grup bakterii pektynolitycznych, takich jak współwystępowanie poszczególnych gatunków SRP w pozyskanych materiałach roślinnych, obszar geograficzny, z którego pochodziły i związane z nim warunki klimatyczne, czas zbioru, rodzaj materiału roślinnego czy sposób nawożenia. Dane te dostarczyły cennych informacji dotyczących rozkładu populacji bakterii pektynolitycznych na terenie Polski, co może być wykorzystane w prewencji tych groźnych chorób ziemniaka.

W dalszej części Doktorantka skupiła się na szczegółowej charakterystyce na poziomie fenotypowym i genetycznym, 20 szczepów *Dickeya solani*, izolowanych na przestrzeni wielu lat na różnych obszarach geograficznych. Wybór tego gatunku był bardzo trafny, z uwagi na jego niedawne wyodrębnienie oraz słabo poznane mechanizmy patogenezy tego drobnoustroju. Wirulencja bakterii pektynolitycznych związana jest przede wszystkim z wytwarzaniem szerokiej gamy enzymów degradujących składniki roślinnych ścian komórkowych: pektynaz, celulaz i proteaz, ale także wytwarzaniem biofilmu i sideroforów oraz zdolnością do ruchu. Doktorantka zastosowała cały wachlarz metod analitycznych do charakterystyki fenotypowej, która obejmowała zarówno podstawowe procesy fizjologiczne np. tempo wzrostu czy ruchliwość, jak i cechy biochemiczne oraz kluczowe czynniki wirulencji m.in aktywność enzymów degradujących ścianę komórkową roślin, formowanie biofilmu i analizę struktury chemicznej części O-swoistej LPS.

Niewątpliwym osiągnięciem Doktorantki było zaproponowanie zoptymalizowanej procedury składowania genomów *D. solani* w oparciu o narzędzia bioinformatyczne dostępne *on line*. Przeprowadzone analizy pozwoliły na złożenie *de novo* 6 genomów *D. solani*. Ze względu na chęć porównania złożonych *de novo* genomów z genomami referencyjnymi, ich sekwencja została również pobrana w formacie FASTA i poddana analizie z zastosowaniem tych samych narzędzi bioinformatycznych. Autorka zastosowała, także program dedykowany do identyfikacji plazmidów (PlasmidFinder), nie wykazano jednak ich obecności w analizie badanych genomów. W pełni zamknięte genomy były następnie poddane analizie porównawczej BLAST. Uzyskane wyniki potwierdziły, że genomy badanych organizmów są wysoce konserwatywne, jak wcześniej przypuszczano na podstawie analizy MLST, PFGE i in. , pomimo zróżnicowanej wirulencji. Przeprowadzono także analizy pozwalające na wyznaczenie dystansu filogenetycznego pomiędzy analizowanymi szczepami. Na podstawie przeprowadzonych analiz Doktorantka zaproponowała także pangenom dla *D. solani* i przeprowadziła jego funkcjonalną

analizę. Wykazała, że struktura pangenu *D. solani* charakteryzuje się dominacją frakcji rdzenia, jak również relatywnie niewielkim udziałem genów pomocniczych oraz unikatowych. W oparciu o pełne sekwencje genomów przeprowadzono także po raz pierwszy analizy filogenetyczne. Godna podkreślenia jest nie tylko dogłębna analiza przeprowadzona na bazie sekwencji genomów 22 szczepów *D. solani*, ale także zaproponowanie zastosowania w tej analizie nowych narzędzi informatycznych.

W tym miejscu chciałam zapytać Doktorantkę czy nie rozważała zastosowania sekwencjonowania w technologii nanoporowej (MinION) w celu złożenia sekwencji kompletnych genomów? Proszę także o wyjaśnienie pojawiających się rozbieżności co do liczby zsekwencjonowanych przez Doktorantkę *de novo* genomów.

W ostatniej części pracy Doktorantka podjęła udaną próbę opracowania dwóch nowych metod eradykacji fitopatogenów, opartych o wyładowania jarzeniowe generowane pod ciśnieniem atmosferycznym (dc-APGD). Należy podkreślić, że obydwie metody są przedmiotem zgłoszenia patentowego, którego współautorką jest Doktorantka. We współpracy z Politechniką Wrocławską skonstruowany został nowatorski układ reakcyjno-wyładowczy do generowania wyładowań typu dc-APGD. Opracowany układ wykorzystano, zarówno do bezpośredniego działania na zawieszinę badanych fitopatogenów, jak i do syntezy sferycznych nanocząstek srebra stabilizowanych za pomocą pektyn lub SDS. Podjęto także próbę wyjaśnienia mechanizmu działania systemu opartego na wyładowaniach dc-APGD na te fitopatogeny. Ta strategia okazała się trafna, uzyskano bowiem prawie 100% stopień eliminacji bakterii, co uważam za szczególnie cenne osiągnięcie Doktorantki. Autorka dowiodła, że wysoka efektywność tego procesu wynika z aktywności reaktywnych form tlenu i azotu oraz emisji promieniowania UV. Podobnie w drugiej metodzie, uzyskane nanocząstki srebra, stabilizowane pektynami lub SDS, wykazały silne działanie antybakteryjne.

Do tej części pracy mam pytanie do Doktorantki o uzasadnienie doboru szczepów wykorzystanych w tych badaniach i wyjaśnienie dlaczego wykorzystano różne szczepy bakterii fitopatogennych w obydwu metodach. Ponadto ciekawi mnie czy Doktorantka próbowała, lub ma w dalszych planach, wyjaśnienie mechanizmów działania nowosyntetyzowanych nanocząstek np. metodami mikroskopii konfokalnej lub SEM, biorąc pod uwagę, że nanocząstki te mogą powodować zaburzenia w strukturze i przepuszczalności osłon komórkowych.

Mgr Agata Motyka-Pomagruk uzyskała w swoich badaniach wiele bardzo interesujących wyników, w podsumowaniu zwrócę uwagę tylko na najważniejsze osiągnięcia Doktorantki:

1. Stwierdzenie, na podstawie szeroko prowadzonego monitoringu występowania bakterii pektynolitycznych na terenie Polski w latach 2013 i 2014, że dominującymi bakteriami były szczepy *Pectobacterium* spp.
2. Przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki 20 szczepów *D. solani* pochodzących z różnych obszarów geograficznych i wykazanie ich zdolności do efektywnej produkcji czynników wirulencji i maceracji tkanek roślinnych. Pozwoliło to także na wytypowanie dwóch szczepów o znacząco niższym poziomie wybranych czynników wirulencji. Ponadto wykazanie, że struktura części O-swoistej LPS modelowego szczepu *D. dadantii* i 4 szczepów *D. solani* o zróżnicowanej wirulencji jest identyczna.
3. Opracowanie zoptymalizowanej metody składania genomów *D. solani* w oparciu o narzędzia informatyczne, co pozwoliło na złożenie *de novo* 6 genomów *D. solani*.
4. Opracowanie dwóch nowych, tanich i efektywnych metod eradykacji bakteryjnych fitopatogenów opartych na wyładowaniach typu dc-APGD, które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w eliminacji tych drobnoustrojów np. z płynnych odpadów poprodukcyjnych z sektora rolniczego.

Podsumowanie Autorka sformułowała w czterech punktach, w których wykazała, że wszystkie cele badawcze zostały zrealizowane.

Literatura jest wyjątkowo bogata, w liczbie 414 pozycji, została bardzo dobrze wyselekcjonowana ze światowego piśmiennictwa, zawiera zarówno prace oryginalne, jak i przeglądowe, pochodzące w dużej części z ostatnich dziesięciu lat.

Podsumowując moją ocenę, uważam, że praca jest bardzo wartościowa. Dodatkowo została napisana w języku angielskim, co podniosło stopień trudności jej przygotowania. O wysokim poziomie merytorycznym świadczy fakt, iż część uzyskanych przez Doktorantkę wyników została opublikowana w czterech bardzo dobrych czasopismach z listy JCR (z punktacją MNiSW odpowiednio 30, 40, 35 i 35 punktów), w dwóch z nich mgr Agata Motyka-Pomagruk jest pierwszą Autorką. Stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska mgr Motyki-Pomagruk zawiera istotne elementy nowości naukowej, a uzyskane wyniki poszerzą wiedzę z zakresu fitopatologii molekularnej. Pod względem celowości podjęcia tematu, a także wykorzystanych metod analitycznych i uzyskanych wyników praca w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora. Ponadto bardzo wysoko oceniam dorobek naukowy Doktorantki, która na tak wczesnym etapie kariery naukowej jest współautorką 18 publikacji, 46 doniesień konferencyjnych, dwóch zgłoszeń patentowych. Ponadto była kierownikiem projektu badawczego PRELUDIUM oraz brała udział w realizacji 13 (!) innych

7
projektów. Na podkreślenie zasługuje także odbycie przez Doktorantkę aż pięciu staży naukowych, na Uniwersytecie we Florencji, dwukrotnie na Uniwersytecie w Lyonie, w Norsk Institutt for Bioekonomi oraz Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach i Politechnice Wrocławskiej.

Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku o dopuszczenie mgr Agaty Motyki-Pomagruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Rozprawa doktorska spełnia wymagania przewidziane w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, a dorobek naukowy Doktorantki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Pragnę także dodać, że biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, nowatorskie koncepcje badawcze, zakres przeprowadzonych badań i ich potencjalne znaczenie praktyczne oraz uwzględniając bardzo dobry dorobek naukowy Doktorantki występuję do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku z wnioskiem o wyróżnienie Autorki recenzowanej rozprawy stosowną nagrodą.



prof. dr hab. Katarzyna Lisowska