

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt. „Taksonomia i filogeneza molekularna mikrosymbiontów *Lembotropis nigricans* (L.) Griseb. (szczodrzyk czerniejący)” wykonanej przez mgr Magdalenę Wójcik

Rodzina *Fabaceae* jest grupą roślin o bardzo dużym gospodarczym i środowiskowym znaczeniu, wynikającym głównie z faktu, że ich bogata w białko biomasa, stanowi pod względem gospodarczym jedno z najważniejszych źródeł żywności dla ludzi i paszy dla zwierząt hodowlanych, a pod względem środowiskowym uprawa tych roślin przyczynia się do wzbogacania gleb w próchnicę i składniki odżywcze, zwłaszcza w azot. Powyższe zalety roślin bobowatych związane są przede wszystkim z ich samowystarczalnością pod względem zaopatrzenia w azot, dzięki symbiozie z bakteriami uzdolnionymi do transformacji (redukcji) azotu atmosferycznego do form przyswajalnych dla roślin. Szczodrzyk czerniejący jako przedstawiciel roślin bobowatych nie znalazł dotychczas istotnego wykorzystania pod względem gospodarczym, ale tworząc układy symbiotyczne z bakteriami brodawkowymi roślinina ta ma niewątpliwie duże znaczenie środowiskowe i ekologiczne, m.in. z tego względu, że części nadziemne szczodrzyka są głównym miejscem żerowania gąsienic motyla szlaczkonka szafranca, wpisanego do czerwonej księgi zwierząt zagrożonych w Polsce i w Europie. W omawianym zespole symbiotycznym szczodrzyk - bakterie brodawkowe, partner mikrobiologiczny nie był dotychczas badany i tę lukę doskonale wypełnia recenzowana praca doktorska mgr Magdaleny Wójcik.

Oceniana rozprawa jest obszernym, bo liczącym aż 209 stron opracowaniem formatu A4 i składa się ono z części wymaganych dla dysertacji naukowych, czyli zawiera rozdziały takie jak: Wstęp z przeglądem literatury, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Bibliografia. Jako krótkie rozdziały zamieszczono również streszczenia pracy w j. polskim i angielskim oraz spis rysunków i tabel. Materiał ilustracyjny i dokumentujący wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań obejmuje 18 tabel i 37 rysunków, czyli dendrogramów, schematów oraz zdjęć profili elektroforetycznych i roślin. Wszystkie one są klarowne i starannie opracowane, i wskazują, że Doktorantka przygotowując je myślała o tym, by czytelnik nie miał wątpliwości z ich interpretacją. Na przykład, niektóre prążki na

zdjęciach profili elektroforetycznych są zwykle niezbyt wyraźnie widoczne, dlatego obok zdjęć Doktoranta zamieszczała również rysunki ze wszystkimi prążkami z tych zdjęć. Tak więc pod względem formalnym i technicznym rozprawa doktorska mgr M. Wójcik nie budzi zastrzeżeń.

Wstęp w ocenianej rozprawie to ciekawy, 54-stronicowy rozdział zawierający ugruntowaną już, a także najnowszą, często dyskusyjną jeszcze, wiedzę dotyczącą następujących zagadnień:

- fundamenty taksonomii mikroorganizmów i koncepcja gatunku,
- metody taksonomii wielokierunkowej,
- charakterystyka roślin bobowatych, ich symbiontów bakteryjnych i procesu symbiozy pomiędzy tymi partnerami.

Godną pochwałą cechą tego przeglądu literatury jest to, że nie jest on monotonna wyliczanka wyników badań z zakresu ww. tematów. Doktorantka starając się uatrakcyjnić treść tego rozdziału prezentuje w nim również krytyczne podejście do różnych metod, w tym genomowych, charakteryzując ich zalety i wady, a także przedstawia ewolucyjny rozwój poglądów i osiągnięć badawczych dotyczących taksonomii mikroorganizmów i definicji gatunku. Literatura cytowana w tym i innych rozdziałach jest głównie angielskojęzyczna, w znacznej części najnowsza i pochodząca z czasopism naukowych o wysokiej renomie.

Ogólnym celem badań przeprowadzonych w ramach przewodu doktorskiego mgr Magdaleny Wójcik było poznanie stopnia pokrewieństwa pomiędzy mikrosymbiontami szczodrzyka czerniejącego a innymi bakteriami brodawkowymi oraz określenie ich pozycji taksonomicznej na poziomie rodzaju i gatunku w oparciu o wyniki taksonomii wielokierunkowej, obejmującej analizy fenotypowe i genomowe badanych izolatów. W rozdziale 3. - Cel pracy - Doktorantka przedstawiła również szereg celów szczegółowych swoich badań, które można uznać za profesjonalny, logicznie zaplanowany i poprawny pod względem metodycznym program badawczy, składający się z następujących etapów:

- wyodrębnienie z brodawek korzeniowych szczodrzyka różnych izolatów bakterii symbiotycznych i ich fenotypowa charakterystyka,
- ustalenie stopnia podobieństwa fenotypowego pozyskanych izolatów oraz szczepów referencyjnych bakterii brodawkowych w oparciu o badania szeregu cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych tych mikroorganizmów,
- oznaczenie stopnia zróżnicowania genomowego (ERIC-PCR, BOX-PCR, AFLP) analizowanych izolatów bakterii symbiotycznych *L. nigricans*,

- określenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy mikrosymbiontami szczodrzyka i szczepami referencyjnymi ryzobiów metodą PCR-RFLP 16S rDNA,
- analiza zakresu gospodarza oraz efektywności wiązania N₂ badanych izolatów symbiontów szczodrzyka w układach symbiotycznych z innymi gatunkami roślin bobowatych,
- oznaczenie zawartości zasad azotowych (G+C) w DNA bakterii specyficznych dla *L. nigricans*,
- analiza filogenezy i przynależności gatunkowej symbiontów szczodrzyka na podstawie testu MLSA czterech konserwatywnych genów (*atpD*, *dnaK*, *gyrB* i *recA*),
- zakwalifikowanie do odpowiedniego gatunku ryzobiów specyficznych dla szczodrzyka czerniejącego na podstawie hybrydyzacji DNA-DNA,
- określenie symbiotycznego pokrewieństwa mikrosymbiontów szczodrzyka z innymi gatunkami ryzobiów na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych genów wspólnych, tj. *nodC* i *nodZ*.

Wszystkie materiały, podłoża i odczynniki oraz procedury i metody badawcze wykorzystywane podczas realizacji ww. programu badawczego zostały dokładnie i zrozumiale opisane przez Doktorantkę w kolejnym rozdziale Materiały i metody. Moje uwagi do tego rozdziału dotyczą tylko niewielkich usterek w paragrafach 4.2.5.1 i 4.2.5.2. W pierwszym przypadku lepiej byłoby zamiast „jąłowanie” użyć „wyjaławianie”, natomiast w drugim z wymienionych paragrafów nie podano wielkości probówek wykorzystywanych w biotestach z siewkami roślin bobowatych. O ile siewki roślin motylkowatych drobnonasiennych (lucerna, koniczyna) dobrze rozwijają się na skosach agarowych w zwykłych probówkach laboratoryjnych, to probówki te nie nadają się do hodowli siewek bobowatych grubonasiennych (fasola, soja).

Jednym z ważniejszych celów wszystkich przewodów doktorskich jest nabycie przez doktorantów możliwie jak najszerszej znajomości różnych metod badawczych i analitycznych. Mgr M. Wójcik wykazała w omawianym rozdziale, że jest mikrobiologiem o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym, doskonale posługującym się zarówno metodami konwencjonalnymi (testy fenotypowe i roślinne), jak i nowoczesnymi technikami molekularnymi, genomowymi i bioinformatycznymi.

Z brodawek korzeniowych *L. nigricans* poddanych odpowiedniemu procesowi wyjaławiania Doktorantka wyodrębniła 33 izolaty bakterii, które były głównym materiałem badawczym w Jej przewodzie doktorskim. Jako gatunki referencyjne w badaniach porównawczych Doktorantka wykorzystywała 20 szczepów bakteryjnych reprezentujących 14 gatunków bakterii symbiotycznych (ryzobiów) z następujących rodzajów: *Bradyrhizobium* (5

gatunków), *Ensifer* (2 gatunki), *Mesorhizobium* (5 gatunków), *Rhizobium* (2 podgatunki – biovary). Bakterie te pochodziły z kolekcji krajowych i zagranicznych (USA, Chiny). Wstępne badania izolatów wyodrębnionych z brodawek korzeniowych szczodrzyka wykazały, że wszystkie one są pałeczkami Gram -, o stosunkowo długim czasie generacji 6-6,5 godziny, co pozwoliło Doktorantce zakwalifikować je do ryzobiów wolno rosnących, prawdopodobnie należących do rodzaju *Bradyrhizobium*. W dalszych analizach cech fenotypowych, które są bardzo pracochłonne (91 testów), Doktorantka porównywała właściwości wyodrębnionych szczepów nie tylko z cechami pięciu referencyjnych gatunków *Bradyrhizobium*, ale także z właściwościami bakterii z pozostałych ww. gatunków ryzobiów. Analiza numeryczna cech fenotypowych porównywanych bakterii wykazała, że wszystkie izolaty mikrosymbiontów szczodrzyka oraz referencyjnych szczepów ryzobiów należących do rodzaju *Bradyrhizobium* tworzą wspólny fenon o współczynniku podobieństwa 82%, co wskazuje również na przynależność ryzobiów szczodrzyka do wymienionego rodzaju. W kolejnym etapie badań mgr M. Wójcik charakteryzowała zróżnicowanie genomowe mikrosymbiontów *L. nigricans* wykorzystując do tego celu 3 metody, tj. ERIC-PCR, BOX-PCR i AFLP. Analizy te potwierdziły duże zróżnicowanie genomowego DNA badanych izolatów szczodrzyka, a metodą najbardziej różnicującą okazała się technika AFLP z zastosowaniem startera PstI-GC, bowiem tylko w tej metodzie wszystkie porównywane mikrosymbionty szczodrzyka charakteryzowały się odmiennymi profilami genomowego DNA. Następnie stosując technikę RFLP do analizy zróżnicowania fragmentów restrykcyjnych 16S rDNA badanych izolatów *L. nigricans* Doktorantka wybrała do dalszych, bardziej szczegółowych badań genomowego DNA 11 izolatów reprezentujących siedem różnych genotypów. Zawartość zasad G+C w genomowym DNA 11 badanych mikrosymbiontów szczodrzyka wahała się od 61,24 mol% do 64,58 mol% i była bardzo zbliżona do zawartości tych zasad w DNA bakterii rodzaju *Bradyrhizobium* (61 – 65 mol%), wskazując wyraźnie, podobnie jak testy fenotypowe, że ryzobia *L. nigricans* należą do wymienionego rodzaju. Definitywną przynależność badanych przez Doktorantkę izolatów bakterii symbiotycznych szczodrzyka czerniejącego do rodzaju *Bradyrhizobium* potwierdziło wysokie podobieństwo (94,8 – 100%) sekwencji genu kodującego 16S rRNA tych izolatów z sekwencjami 16S rDNA (z GenBank) kilku gatunków ryzobiów należących do rodzaju *Bradyrhizobium*, podczas gdy podobieństwo sekwencji z gatunkami innych rodzajów bakterii symbiotycznych (*Mesorhizobium*, *Rhizobium*) było znacznie niższe (84,1 – 89,9%). Najwyższy stopień podobieństwa (99,7 – 100%) stwierdzono pomiędzy sekwencjami 16S rDNA badanych mikrosymbiontów szczodrzyka a gatunkiem *Bradyrhizobium japonicum*, co

wyraźnie wskazuje na przynależność identyfikowanych izolatów do *B. japonicum*. Także analiza wielolokusowa (MLSA) wykazała duży stopień podobieństwa (96,6% - 97,2%) sekwencji czterech genów metabolizmu podstawowego: *atpD* – *dnaH* – *gyrB* - *rpoB* mikrosymbiontów szczodrzyka z sekwencjami referencyjnego szczepu *B. japonicum* USDA 6. Ostatnim testem genomowym, którego wyniki utwierdziły mgr M. Wójcik w przekonaniu o przynależności badanych szczepów bakterii symbiotycznych *L. nigricans* do gatunku *Bradyrhizobium japonicum* była hybrydyzacja DNA-DNA, bowiem DNA wymienionych mikroorganizmów wykazywało wysoki stopień reasocjacji, mieszczący się w zakresie 77,5% - 83,3%.

Doktorantka przeprowadziła także doświadczenia wegetacyjne z jedenastoma gatunkami z 10 rodzajów roślin bobowatych, których jałowe siewki zaszczepiano płynnymi kulturami izolatów bakterii wyodrębnionych z brodawek korzeniowych szczodrzyka czerniejącego. Biotesty te wykazały, że wszystkie badane izolaty (33) tworzyły efektywne układy symbiotyczne (różowe brodawki na korzeniach) nie tylko z roślinami szczodrzyka czerniejącego, ale również z innymi gatunkami roślin bobowatych należących do plemienia Genisteeae, takimi jak: szczodrzeniec rozesłany, żarnowiec miotlasty, łubin żółty i łubin trwały. Na podstawie tych wyników Doktorantka określiła symbionty *L. nigricans* jako ryzobia o szerokim zakresie roślinnych partnerów symbiotycznych.

Finalnym etapem badań Doktorantki była próba określenia filogenezy genów symbiotycznych *nodC* i *nodZ* występujących w genomie 11 badanych symbiontów szczodrzyka czerniejącego. Najwyższy stopień podobieństwa wynoszący 90,1% - 98,7% stwierdzono pomiędzy sekwencjami genów *nodC* i *nodZ* symbiontów szczodrzyka a sekwencjami tych genów u *Bradyrhizobium rifense* i *B. canariense* SEMIA 928. Równie wysokie współczynniki poparcia 91% - 100% uzyskano na drzewach filogenetycznych, skonstruowanych metodą „ML”, omawianych genów mikrosymbiontów *L. nigricans* oraz licznych referencyjnych szczepów *Bradyrhizobium* specyficznych dla roślin bobowatych z plemienia Genisteeae.

Przedstawione powyżej streszczenie rozdziału Wyniki wskazuje jednoznacznie, że Doktorantka stosując bardzo szeroki wachlarz technik i metod badawczych uzyskała oryginalne i ważne pod względem poznawczym wyniki, które omówiła w sposób dojrzały i klarowny, i które wyjaśniły jaki partner mikrobiologiczny tworzy niepoznany dotychczas układ symbiotyczny z korzeniami szczodrzyka czerniejącego. Po przeczytaniu Wstępu do rozprawy mgr M. Wójcik, w którym nie znalazłem zdjęcia brodawek korzeniowych szczodrzyka, miałem nadzieję, jak się okazało płonną, że znajdę je w rozdziale Wyniki. Ta

moja mało istotna uwaga bierze się stąd, że brodawki korzeniowe roślin bobowatych są nie tylko ważnymi, ale także ładnymi tworam, a u niektórych z tych roślin, np. u seradeli, są one wyjątkowo urocze. Być może takie są również u szczodrzyka?

Rozdział Dyskusja to zwykle najciekawsza część każdej pracy naukowej i taki też jest ten rozdział w ocenianej rozprawie doktorskiej. Wyniki otrzymane na każdym etapie swoich badań mgr M. Wójcik porównała w sposób ciekawy i dojrzały, oraz na ogół uważny, z wynikami pokrewnych badań innych autorów krajowych i zagranicznych. Napisałem „na ogół” dlatego, że na stronie 152. w rozdziale Wyniki symbionty *L. nigricans* zaliczone zostały do ryzobiiów o szerokim zakresie gospodarza, podczas gdy na stronie 170. w rozdziale Dyskusja są one scharakteryzowane jako symbionty o stosunkowo wąskim zakresie gospodarza. Ponadto na stronie 161. omawianego rozdziału, Doktorantka określiła, zapewne przez nieuwagę, badane izolaty mikrosymbiontów szczodrzyka jako zakwaszające podłoże stałe z mannitolem, w przeciwieństwie do alkalizacji tego podłoża przez inne znane gatunki *Bradyrhizobium*. Ta dyskutowana przez Doktorantkę niezgodność prawdopodobnie nie ma miejsca, ponieważ na stronie 102. w rozdziale Wyniki jest informacja, że badane symbionty szczodrzyka alkalizowały podłoże z mannitolem, podobnie jak inne gatunki *Bradyrhizobium*.

Wnioski, choć nieponumerowane, zostały opracowane w 7 punktach i uwypuklają one najważniejsze efekty kolejnych etapów badań, ale zachowanie takiej chronologii nie było konieczne. Na przykład wniosek 7. lepiej byłoby zamieścić po wniosku 3., natomiast wniosek 6. jako zbyt opisowy wydaje się zbędny.

W podsumowaniu mojej oceny rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Wójcik chciałbym podkreślić, że Doktorantka w toku realizacji dobrze zaplanowanego i nowoczesnego programu badawczego wykazała się dużą pracowitością, dociekliwością i naukową pasją, co zaowocowało poznaniem licznych właściwości nieopisanych dotychczas bakterii symbiotycznych szczodrzyka czerniejącego i w rezultacie określeniem pozycji taksonomicznej i filogenetycznej tej ważnej grupy bakterii. Mgr M. Wójcik jest więc mikrobiologiem o bardzo dobrych podstawach teoretycznych i praktycznych do pełnienia zawodu pracownika naukowego.

Stwierdzam niniejszym, że recenzowana praca w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie mgr Magdaleny Wójcik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stefan Martyniuk