

Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

Recenzja pracy doktorskiej mgr Magdaleny Wójcik pt.

**„Taksonomia i filogeneza molekularna mikrosymbiontów *Lembotropis nigricans*
(L.) Griseb. (szczodrzyk czerniejący)”**

Przedstawiona rozprawa, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Małek – promotora oraz dr. Michała Kality – promotora pomocniczego, jest obszernym opracowaniem badań nad wielokierunkową charakterystyką mikrosymbiontów wyizolowanych z roślin szczodrzyka czerniejącego. Obejmuje poznanie ich zróżnicowania fenotypowego, polimorfizmu genomowego, ustalenie pozycji taksonomicznej oraz pokrewieństwa filogenetycznego z innymi bakteriami, a także określenie efektywności wiązania azotu atmosferycznego. Uważam, że podjęcie tych badań było celowe, zarówno w aspekcie ściśle poznawczym, jak i aplikacyjnym. Przystępując bowiem do badań nad nierozpoznanym jeszcze zagadnieniem, niemal zawsze pojawia się perspektywa pozyskania szczepów bakterii, w tym wypadku z roślin szczodrzyka czerniejącego, wyróżniających się pod względem zdolności wiązania azotu z ukierunkowaniem na ich potencjalne zastosowanie w produkcji rolniczej.

Praca zawiera wszystkie formalnie wymagane dla rozprawy doktorskiej części, tzn. wstęp obejmujący przegląd literatury mającej głównie związek z przedmiotem badań, jasno sformułowany cel, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski. Na końcu pracy zamieszczono syntetyczne streszczenie w językach polskim i angielskim. Praca obejmuje 209 stron, w tym 18 tabel i 37 rysunków. W różnych miejscach Doktorantka powołuje się na ponad 240 pozycji literatury zestawionych na końcu pracy. Na uwagę zasługuje bardzo obszerny wstęp zawierający informacje nt. aktualnego stanu obowiązujących zasad identyfikacji, klasyfikacji i nomenklatury bakterii, zwłaszcza w odniesieniu do ryzobiów, ze zwróceniem uwagi na metody badań ich cech fenotypowych oraz analizy DNA. Autorka omówiła także zagadnienia związane z symbiozą ryzobiów z roślinami bobowatymi. Rozdział ten jest opracowany bardzo starannie, a wzbogacenie rysunkami, schematami, tabelami oraz fotografiami podnosi jego wartość informacyjną i

dydaktyczną. Praca jest napisana językiem klarownym i precyzyjnym z użyciem słownictwa zwyczajowo przyjętego w piśmiennictwie naukowym dziedziny będącej jej przedmiotem.

Rozdział 'Materiał i Metody' w sposób wyczerpujący prezentuje metody badawcze stosowane przez Autorkę. Został opracowany starannie i przejrzysto. W ramach opisu podano wszystkie informacje potrzebne do prawidłowego przeprowadzenia badań i interpretacji uzyskanych wyników. I tu mam pytanie do opisanych metod oraz materiałów np. pożywek. Czy Autorka sama je opracowała czy też korzystała z danych literaturowych?

Rozdział 'Wyniki' ma logiczny układ odnoszący się do odpowiednich części metodyki, co ułatwia studiowanie uzyskanych rezultatów. Ich opis jest rzeczowy, prowadzony w sposób wskazujący na bardzo dobrą orientację mgr Wójcik w przedmiocie badań. Uzyskane wyniki stanowią ciekawy materiał źródłowy.

W obszernym rozdziale 'Dyskusja' Autorka odnosi się do uzyskanych wyników na tle informacji dostępnych w światowej literaturze naukowej konfrontując je z danymi uzyskanymi przez innych autorów.

Niektóre informacje i uwagi szczegółowe

Pierwszy etap badań dotyczył poznania 91 cech fenotypowych 33 mikrosymbiontów szczodrzyka czerniejącego, pochodzących z jednego naturalnego stanowiska tych roślin w województwie lubelskim. Do badań włączono 15 szczepów referencyjnych, spośród których 5 reprezentowało rodzaj *Bradyrhizobium*, gatunki *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. yunnaningense*, *B. diazoefficiens* i *B. japonicum*. Określono m.in. zdolności bakterii do wykorzystania różnych źródeł węgla i azotu, ich aktywność enzymatyczną, tolerancję na różne pH pożywki, tolerancję na antybiotyki, zasolenie, zdolność syntezy melanin, alkalizację i zakwaszanie pożywki z mlekiem lakmusowym oraz wytwarzanie indolu. I tu chciałbym poprosić Panią doktorantkę o opinię nt. sposobu przedstawienia wyników testów w kontekście możliwości porównania każdego izolatu z wynikami analiz DNA i testów na roślinach. Chodzi mianowicie o pokazanie cech tych izolatów w taki sposób, aby czytelnik widział różnice między nimi w zakresie poszczególnych rodzajów zdolności czy aktywności bakterii. Informacja, że np. D-glukozę jako źródło węgla wykorzystywało 27 izolatów a maltozę 9, bez podania, które z nich posiadały te cechy zubaża analizę uniemożliwiając wspomniane porównanie. W pewnym stopniu

odpowiedź na tę uwagę daje dendrogram przedstawiający stopień podobieństwa badanych mikrosymbiontów (rys. 5.4.). Brak jest jednak szczegółów, co do konkretnego izolatu. Analiza numeryczna wyników dot. cech fenotypowych mikrosymbiontów szczodrzyka pozwoliła na stwierdzenie, że należą one do rodzaju *Bradyrhizobium*. Interesujące jest także udokumentowanie, że izolaty pochodzące z jednego stanowiska wykazywały zróżnicowanie fenotypowe.

Następny etap badań obejmował analizę zróżnicowania genomowego mikrosymbiontów z zastosowaniem trzech metod. Stosując metodę ERIC-PCR ze starterami Eric-1 i Eric-2 uzyskano 254 amplikony DNA o wielkościach od 171 do 4830 pz. Natomiast zastosowanie metody BOX-PCR dało 316 amplikonów o wielkości od 275 do 2446 pz. Trzecia metoda - AFLP z trawieniem DNA enzymem *Pst*I i użyciem startera *Pst*I-G pozwoliła na uzyskanie najwięcej, bo 380 amplikonów o wielkości od 245 do 1590 pz. Prawie wszystkie charakteryzowały się niepowtarzalnymi wzorami genomowymi. Na dendrogramie przy współczynniku podobieństwa wynoszącym 59% wyodrębniono dwie grupy, przy czym jedna obejmowała 30 szczepów, a druga trzy. Natomiast z użyciem startera *Pst*I-GC uzyskano 324 amplikony o wielkości od 184 do 1486. I tu wszystkie szczepy charakteryzowały się niepowtarzalnymi wzorami profili DNA. Na dendrogramie wyodrębniono również dwie grupy, w tym pierwsza obejmowała 10, a druga 23 szczepy.

W kolejnym etapie zbadano polimorfizm fragmentów restrykcyjnych 16S rDNA mikrosymbiontów szczodrzyka. Trawienie enzymami *Hin*fl, *Hin*6I lub *Taq*I skutkowało uzyskaniem dwóch profili 16S rDNA badanych szczepów dla każdego enzymu, a trawienie enzymami *Msp*I i *Rsa*I – po trzy profile. Wyniki te pozwoliły na zaklasyfikowanie badanych szczepów do 12 różnych genotypów, w tym siedmiu w przypadku szczepów szczodrzyka. Analizując utworzony dendrogram (rys. 5.28) widać, że wszystkie te szczepy zaliczono do rodzaju *Bradyrhizobium*, ale są pewne różnice między nimi przy czym niektóre znalazły się w jednej grupie z *B. japonicum*.

Badania nad zawartością zasad G+C w genomowym DNA 11 wybranych mikrosymbiontów szczodrzyka, reprezentujących różne genotypy, wykazały, że kształtuje się ona w przedziale 61,24 – 64,58%, co jest typowe dla *Bradyrhizobium*. Uzupełnieniem tej części badań była analiza filogenetyczna genu 16S rRNA tych 11 szczepów. Stwierdzono, że stopień ich wzajemnego podobieństwa wynosił od 99,6% do 100%. Najwyższy stopień podobieństwa badane szczepy wykazały do *B. japonicum*.

Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami numerycznej analizy fenotypowej i wskazują na przynależność gatunkową mikrosymbiontów szczodrzyka do gatunku *B. japonicum*.

W celu potwierdzenia tej klasyfikacji wykonano jeszcze analizę sekwencji fragmentów 4 genów metabolizmu podstawowego. W przypadku genu *atpD* wykazano, że jego sekwencja ma długość 429 nukleotydów, z czego 135 miejsc stanowiły miejsca polimorficzne. Na dendrogramie szczepy ze szczodrzyka utworzyły wspólną grupę z bakteriami *Bradyrhizobium* przy współczynniku poparcia 89%, a w stosunku do szczepu wzorcowego *B. japonicum* USDA 6^T współczynnik ten wynosił 95,8 -97,6%. Analiza zamplifikowanej sekwencji genu *dnaK* wykazała, że ma ona długość 204 nukleotydów i zawiera 61 miejsc polimorficznych. Również w przypadku tego genu najbliższym sąsiadem mikrosymbiontów szczodrzyka na filogramie był wymieniony wyżej szczep wzorcowy *B. japonicum*. Wielkość zamplifikowanej sekwencji genu *gyrB* wynosiła 563 nukleotydy przy 208 miejscach polimorficznych. Podobieństwo tego genu u mikrosymbiontów szczodrzyka do szczepu referencyjnego *B. betae* LMG 21987^T wynosiło 96,4%. (rys 5.32B). Analiza sekwencji ampliconu ostatniego z badanych genów – *rpoB* wykazała, że długość jego sekwencji nukleotydowej wynosi 563 przy 208 miejscach polimorficznych. Na dendrogramie szczepy te utworzyły wspólną grupę ze szczepem referencyjnym *B. japonicum* (stopień podobieństwa 97,7–98,6%).

Wartościową częścią badań nad zróżnicowaniem genetycznym mikrosymbiontów szczodrzyka jest analiza wielolokusowa połączonych sekwencji genów metabolizmu podstawowego, która wykazała ich podobieństwo między sobą na poziomie 98,9 – 99,8%, a podobieństwo do szczepu referencyjnego USDA 6^T *B. japonicum* od 96,6 – 97,2% a następnie do szczepu BTA-1^T *B. canariense* 94,8 - 95,3%. Analizując dendrogram na rys. 5.34. widać, że mikrosymbionty szczodrzyka tworzą wyraźnie odmienną grupę (bootstrap value 100%). Nasuwa się pytanie czy w tej sytuacji Autorka rozważała możliwość tworzenia przez nie oddzielnego taksonu?

W ramach przeprowadzonych badań oznaczono także metodą hybrydyzacji stopień podobieństwa genomowego DNA-DNA mikrosymbiontów między sobą oraz w stosunku do DNA szczepów referencyjnych rodzajów *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* i *Ensifer*. Wykazano, że stopień hybrydyzacji DNA-DNA symbiontów *L. nigricans* między sobą mieści się w zakresie od 86,6 do 98,6%, a z DNA *B. japonicum* – od 77,5 do 83,3%. Niższy stopień uzyskano w przypadku hybrydyzacji z DNA pozostałych szczepów

referencyjnych rodzaju *Bradyrhizobium* (50,1 – 64,5%) i dużo niższy z DNA szczepów *Mesorhizobium albiziae* i *Ensifer meliloti* (4,7 – 10,4%).

Podsumowując powyższe badania pragnę podkreślić ich dużą wartość, ale szczegółowe porównanie wyników badań cech fenotypowych i genetycznych mikrosymbiontów szczodrzyka byłoby cenną informacją o ich zróżnicowaniu. A jakie znaczenie może mieć to zróżnicowanie z punktu widzenia ich ewolucji, aktywności metabolicznej i najbardziej użytecznej cechy jaką jest wiązanie azotu? I jeszcze: czy zdeponowano sekwencje badanych genów mikrosymbiontów w bazie danych?

Z praktycznego punktu widzenia ważną częścią recenzowanej pracy były badania dotyczące zakresu roślin-gospodarzy mikrosymbiontów szczodrzyka czerniejącego. W testach laboratoryjno-szklarniowych określano zdolność do tworzenia ich symbiozy z 11 gatunkami roślin z rodziny bobowatych, zarówno uprawnych jak i dzikorosnących. Wskaźnikami efektywności tej symbiozy były występowanie i kolor brodawek korzeniowych oraz sucha masa nadziemnej części roślin. Autorka podaje, że wyniki dotyczące roślin, z którymi mikrosymbionty wchodziły w symbiozę zebrano w tabeli 5.12. Tabela ta zawiera jednak inne dane. Nie podano też jakie wyniki uzyskano z każdym z 33 szczepów, zamieszczając jedynie informację, że badane mikrosymbionty wchodziły w interakcję tylko z roślinami czterech gatunków spokrewnionych ze sobą (szczodrzeńcem rozesłanym, żarnowcem miotlastym, łubinem żółtym i łubinem trwałym). W tekście Autorka stwierdziła, że sucha masa tych roślin w wyniku zaszczepienia zwiększyła się przeciętnie 3–4-krotnie (tabela 5.13). I tu chciałbym jeszcze dopytać o efektywność poszczególnych szczepów i ich potencjalną przydatność dla praktyki. Czy wykazane w tym doświadczeniu zwiększenie suchej masy roślin można uznać za zadowalające, a jeśli tak to czy może być ono wskaźnikiem praktycznego wykorzystania danego symbiontu? Uzupełnieniem tego wątku badań były oznaczenia efektywności wiązania azotu atmosferycznego przez mikrosymbionty z zastosowaniem testu acetylenowego. Udowodniono, że aktywność nitrogenazy na roślinach szczodrzeńca była znacznie wyższa niż w układzie z czterema gatunkami, z którymi tworzyły one relację symbiotyczną.

Do interesujących należy zaliczyć także wyniki analizy filogenetycznej genów symbiotycznych *nodC* i *nodZ* na podstawie sekwencji 11 wybranych mikrosymbiontów. Długość sekwencji wymienionych genów wynosiła odpowiednio 412 i 387 pz, a liczba miejsc polimorficznych odpowiednio 226 i 197. Podobieństwo genu *nodC* między

szczepami ze szczodrzenia wynosiło 96,1-100%, a w stosunku do szczepów referencyjnych *Bradyrhizobium* od 71,3 do 98,7% (tab. 5.17). Natomiast w przypadku sekwencji genu *nodZ* o długości 387 pz, z czego 197 to miejsca polimorficzne, podobieństwo między mikrosymbiontami szczodrzyka wynosiło od 93,7 do 100%, a w stosunku do szczepów innych gatunków *Bradyrhizobium* od 72,3 do 92,5%. W kontekście możliwości horyzontalnego transferu tych genów chciałbym poprosić o opinię jak często taki transfer może zachodzić w warunkach naturalnych i ewentualnie jakie warunki występujące w danym biotopie mogą temu sprzyjać.

Rozdział 'Dyskusja' przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Jest to ważna część pracy. Dyskusja jest obszerna i poprowadzona logicznie. Zwraca uwagę swoboda z jaką Pani doktorantka porusza się w tej tematyce. Tu chciałbym podkreślić zwłaszcza wartościową część dyskusji dotyczącą zróżnicowania fenotypowego badanych mikrosymbiontów oraz ograniczeń zastosowanych analiz genu 16S rRNA oraz oznaczania zawartości zasad G+C w DNA. Zauważyłem też pewną nieścisłość w tekście. Na str. 161 stwierdzono, że mikrosymbionty szczodrzyka powodowały zakwaszenie pożywki z mannitolem, a na str. 102 (Wyniki), że alkalizowały pożywkę.

Natomiast wysnute przez Autorkę wnioski są w większości podsumowaniem wyników. Pragnę także zapytać o podaną w punkcie 1 'Wniosków' wartość 0,69 współczynnika podobieństwa fenotypowego. Tymczasem na stronie 107 podano, że współczynnik ten wynosi 82%, a na stronie 162 – 0,82. Ponadto w punkcie 5 podano, że mikrosymbionty szczodrzyka wykazują szeroki zakres gospodarza, a w dyskusji (str. 170) – że stosunkowo wąski.

Reasumując stwierdzam, że:

1. Praca odejmuje ambitny, ważny dla nauki i praktyki, temat poznania zróżnicowania fenotypowego i genomowego mikrosymbiontów szczodrzyka czerniejącego.
2. Doktorantka zrealizowała założony cel badawczy, poprawnie stosując wybrane metody, z ogromnym nakładem pracy.
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 kontynuacji badań i szerszego ich przeprowadzenia na roślinach.

Wniosek końcowy

Uważam, że praca doktorska Pani mgr Magdaleny Wójcik 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. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Wójcik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Świernie 21.11.2019

Piotr Sobiczewski
Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski