

AUTOREFERAT

dr Michał Kalita

Katedra Genetyki i Mikrobiologii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Lublin 2020

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	4
4.1. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.....	5
4.1.1. Wprowadzenie	5
4.1.2. Cel badań	8
4.1.3. Osiągnięte wyniki	9
4.1.4. Podsumowanie najważniejszych wyników badań opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe.....	21
4.1.5. Bibliografia.....	21
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	23
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	26
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej, nieomówione w punktach 4-5.....	28

1. Imię i nazwisko

Michał Kalita

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2002 – Magister biologii

Praca magisterska pt.: „Oznaczanie stopnia podobieństwa DNA mikrosymbiontów żarnowca miotlastego (*Sarothamnus scoparius* L.) do DNA szczepów referencyjnych z rodzaju *Bradyrhizobium* metodą hybrydyzacji DNA-DNA”

Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Wanda Małek

2008 – Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii

Rozprawa doktorska pt.: „Taksonomia i filogeneza molekularna mikrosymbiontów janowca barwierskiego (*Genista tinctoria* L.)”

Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Wanda Małek

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2003 – 2008 Asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (później przemianowanym na Zakład Genetyki i Mikrobiologii), Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

2008 – do chwili obecnej – Adiunkt w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 5 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 – 2020 i powiązanych tematem:

Filogeneza molekularna bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe wybranych gatunków roślin plemienia Genisteeae z rodziny Fabaceae

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi następujące publikacje:

A1. Kalita, M.*, Małek, W. (2017) Molecular phylogeny of *Bradyrhizobium* bacteria isolated from root nodules of tribe Genisteeae plants growing in southeast Poland. *Systematic and Applied Microbiology* 40, 482-491.

IF₂₀₁₇ = 3.899; punkty MNiSW₂₀₁₇ = 35

A2. Kalita, M.*, Małek, W. (2019) The *ftsA* gene as a molecular marker for phylogenetic studies in *Bradyrhizobium* and identification of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Applied Genetics* 60, 123-126.

IF₂₀₁₈ = 1.725; punkty MNiSW₂₀₁₉ = 70

A3. Wójcik, M., **Kalita, M.***, Małek, W. (2019) Numerical analysis of phenotypic properties, genomic fingerprinting, and multilocus sequence analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lembotropis nigricans* of the tribe Genisteeae. *Annals of Microbiology* 69, 1123-1134.

IF₂₀₁₈ = 1.431; punkty MNiSW₂₀₁₉ = 70

A4. Kalita, M.*, Małek, W. (2019) Root nodules of *Genista germanica* harbor *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* bacteria exchanging *nodC* and *nodZ* genes. *Systematic and Applied Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126026>

IF₂₀₁₈ = 2.808; punkty MNiSW₂₀₁₉ = 100

A5. Kalita, M.*, Małek, W., Coutinho, T. (2020) Putative novel *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* species isolated from root nodules of *Chamaecytisus ruthenicus*. *Systematic and Applied Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126056>

IF₂₀₁₈ = 2.808; punkty MNiSW₂₀₁₉ = 100

* autor korespondencyjny

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania (dla publikacji z roku 2019 i 2020 podano IF za rok 2018):

12.671

Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania:

375

4.1. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

4.1.1. Wprowadzenie

Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego (N₂) jest głównym sposobem wprowadzania tego pierwiastka w formie zredukowanej do wielu ekosystemów. W rolnictwie proces ten jest nieocenionym, odnawialnym źródłem azotu. W trakcie rozwoju ewolucyjnego tylko ograniczona liczba organizmów, należących do domen *Bacteria* i *Archaea*, nabyła zdolność do przekształcania N₂ do formy zredukowanej. Organizmy te określa się wspólnym mianem diazotrofów. Ich zdolność do wiązania azotu cząsteczkowego związana jest z obecnością w ich komórkach kompleksu enzymatycznego nitrogenazy [12]. Spośród mikroorganizmów zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego, tylko nieliczna grupa, nazywana potocznie ryzobiami, może przeprowadzać ten proces w układzie symbiotycznym z roślinami bobowatymi (Fabaceae), w specjalnych strukturach – brodawkach korzeniowych, a w nielicznych przypadkach w brodawkach zlokalizowanych na łodydze. Według różnych szacunków, ilość azotu wprowadzona do gleby w wyniku symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi może stanowić od 30 do nawet 50% całkowitej ilości azotu związanego przez wszystkie organizmy diazotroficzne. Znaczący udział symbiozy ryzobiów z roślinami bobowatymi w globalnym obiegu azotu przyczynił się do wzrostu zainteresowania zarówno samym mechanizmem symbiotycznej interakcji jak

i partnerami biorącymi w nim udział, tj. makrosymbiontem – rośliną i mikrosymbiontem – bakterią [16,20].

Do wczesnych lat 80-tych XX wieku, wszystkie gatunki bakterii brodawkowych klasyfikowano do jednego rodzaju, tj. *Rhizobium*. Według aktualnej klasyfikacji, bakterie zdolne do wiązania azotu w symbiozie z roślinami bobowatymi należą do 20 rodzajów, z czego 16 - *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Pararhizobium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella* oraz *Ensifer* (synonim *Sinorhizobium*), należy do klasy *Alphaproteobacteria*, a cztery pozostałe – *Cupriavidus*, *Herbaspirillum*, *Paraburkholderia* i *Trinicia* do klasy *Betaproteobacteria* [15].

Do końca roku 2019 opisano 180 gatunków ryzobiów [15] a lista ta wydaje się być otwarta, tym bardziej, że do tej pory scharakteryzowano mikrosymbionty pochodzące tylko z około 25% gatunków roślin bobowatych [19]. Na przykład spośród ponad 600 gatunków roślin plemienia Genisteae, jednego z najliczniejszych plemion rodziny Fabaceae, pod kątem bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe przebadano tylko 78 gatunków [14], z czego pięć to gatunki, których symbionty były przedmiotem badań w pracach stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe.

W badaniach taksonomicznych i filogenetycznych bakterii brodawkowych stosuje się szeroki zakres metod, począwszy od technik obejmujących badanie cech fenotypowych, poprzez techniki służące badaniu stopnia zróżnicowania genetycznego analizowanej populacji bakterii do analizy porównawczej sekwencji genu kodującego rRNA małej podjednostki rybosomu (16S rRNA), genów metabolizmu podstawowego bakterii oraz genów symbiotycznych, których produkty zaangażowane są w nawiązanie oddziaływania o charakterze symbiozy między bakterią a rośliną, jak i w sam proces wiązania azotu atmosferycznego.

Sekwencja genu 16S rRNA w badaniach taksonomicznych

Analiza porównawcza sekwencji nukleotydowej 16S rDNA pozwala na ustalenie pozycji rodzajowej badanych szczepów bakteryjnych. Ogólnie przyjętym kryterium klasyfikacji bakterii do tego samego rodzaju jest stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA badanej bakterii do sekwencji gatunków referencyjnych równy lub wyższy niż 94.5% [18]. Wysoki stopień konserwatywności sekwencji 16S rDNA, który między

innymi wykazałem w przypadku bakterii będących przedmiotem moich badań, nie pozwala na wskazanie takiej granicznej wartości stopnia podobieństwa tego markera między badanymi bakteriami, powyżej którego można by uznać je za przedstawicieli tego samego gatunku. Obecnie stosowana wartość 98.7% może być używana jako kryterium negatywne co oznacza, że jeśli dwa szczepy wykazują stopień podobieństwa sekwencji 16S rDNA niższy od wspomnianego, to reprezentują dwa odrębne gatunki bakterii [18]. Mając na uwadze to, że wymienione wcześniej wartości 94.5% oraz 98.7% stopnia podobieństwa sekwencji 16S rDNA zostały ustalone na podstawie sekwencji dostępnych w bazach danych dla opisanych gatunków, mogą one z czasem ulec zmianie wraz ze wzrostem ilości informacji pochodzącej na przykład z sekwencjonowania całe genomów bakteryjnych.

Analiza MLSA w badaniach filogenetycznych bakterii

Zastosowanie w analizach filogenetycznych bakterii sekwencji genów kodujących białka, które są na tyle konserwatywne, że pozwalają grupować szczepy należące do jednego gatunku we wspólne grona, a jednocześnie są na tyle zróżnicowane, że umożliwiają szczepom gatunków blisko spokrewnionych tworzyć odrębne grupy na drzewach filogenetycznych, jest powszechnie stosowanym podejściem w badaniach populacji bakterii brodawkowych. W tego typu analizach wykorzystuje się najczęściej sekwencje tzw. genów rdzeniowych, inaczej nazywanych genami metabolizmu podstawowego do których należy m.in. gen *atpD*, kodujący jedną z podjednostek ATPazy, *dnaK* kodujący jedno z białek szoku cieplnego, *glnII* kodujący syntetazę glutaminową, *gyrB* kodujący gyrazę DNA, *recA* kodujący rekombinazę oraz *rpoB* kodujący podjednostkę polimerazy RNA. Analiza połączonych sekwencji kilku takich genów, tzw. MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) pozwala na ustalanie pozycji gatunkowej badanych szczepów bakteryjnych jak i na wyodrębnianie linii filogenetycznych mogących reprezentować nowe gatunki.

Sekwencje genów *nod* i *nif* w badaniach bakterii brodawkowych

W badaniach nad zróżnicowaniem i filogenezą organizmów diazotroficznych wykorzystywane są sekwencje genów kodujących kompleks enzymatyczny nitrogenazy (geny *nif*). Z kolei geny symbiotyczne *nod*, których produkty biorą udział w syntezie chitoooligosacharydów, tzw. czynników Nod, niezbędnych w procesie infekcji rośliny i tworzeniu brodawki, są cechą charakterystyczną tylko dla ryzobiów.

Ich analiza filogenetyczna ujawnia w wielu przypadkach odmienną historię ewolucyjną niż omówione w poprzednim paragrafie geny metabolizmu podstawowego. Geny symbiotyczne zlokalizowane są na elementach genetycznych, potencjalnie zdolnych do przenoszenia się między mikroorganizmami. U większości ryzobiów tymi elementami są plazmidy oraz tzw. wyspy symbiotyczne zlokalizowane na chromosomie a opisane np. u *Mesorhizobium loti* i *Bradyrhizobium japonicum*. Niektóre spośród genów *nod*, takie jak *nodABCD*, nazywane genami wspólnymi, obecne są u zdecydowanej większości ryzobiów i biorą udział w syntezie podstawowej struktury czynnika Nod. Pozostałe (np. *nodZ*, *nodH*), których produkty odpowiadają za przyłączanie różnych podstawników do czynników Nod, zidentyfikowano tylko u niektórych gatunków. Analiza porównawcza sekwencji genów wspólnych *nod* ujawnia ich wysoce konserwatywną naturę, sugerując ich monofiletyczne pochodzenie i możliwe rozprzestrzenienie się drogą transferu horyzontalnego [6]. Struktura czynników Nod ma duże znaczenie w zakresie gospodarza roślinnego z jakim dany szczep ryzobiowy tworzy symbiozę. Pod tym względem między ryzobiami istnieją znaczne różnice, tzn. szczepy tworzące brodawki na tej samej roślinie mogą należeć do odległych filogenetycznie grup ryzobiów i odwrotnie, gatunki blisko spokrewnione mogą infekować różne rośliny. Analiza filogenetyczna genów symbiotycznych jest podstawą przy wyodrębnianiu symbiowarów, czyli wariantów symbiotycznych ryzobiów – grup bakterii brodawkowych należących często do różnych gatunków, natomiast charakteryzujących się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji genów *nod* i *nif* oraz zbliżonym zakresem gospodarza roślinnego, z którym tworzą efektywną symbiozę [13].

4.1.2. Cel badań

Prowadzone przeze mnie badania miały na celu:

- ustalenie pozycji taksonomicznej oraz pokrewieństwa filogenetycznego bakterii wyizolowanych z brodawek korzeniowych pięciu gatunków roślin bobowatych należących do plemienia Genisteae - *Genista germanica* (janowiec ciernisty), *Chamaecytisus ratisbonensis* (szczodrzeniec rozestłany), *Cytisus scoparius* (żarnowiec miotlasty), *Chamaecytisus rurhenicus* (szczodrzeniec ruski) i *Lembotropis nigricans* (szczodrzyk czerniejący);

- ustalenie pokrewieństwa symbiotycznego badanych szczepów poprzez analizę sekwencji genów *nod* i *nif* oraz porównanie filogenezy genów metabolizmu podstawowego i genów symbiotycznych w celu wykazania ich ewentualnego transferu horyzontalnego;
- rozwinięcie analizy filogenetycznej bakterii rodzaju *Bradyrhizobium* poprzez zastosowanie nowego markera umożliwiającego różnicowanie gatunków tego rodzaju bakterii brodawkowych (cel ten przyjąłem w oparciu o wyniki moich wcześniejszych badań oraz opublikowanych doniesień innych autorów wyraźnie wskazujących, że dominującym rodzajem identyfikowanym wśród bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych roślin plemienia Genisteeae są właśnie bradyryzobia a w szczególności gatunek *Bradyrhizobium japonicum*).

4.1.3. Osiągnięte wyniki

A1. Kalita, M., Małek, W. (2017) Molecular phylogeny of *Bradyrhizobium* bacteria isolated from root nodules of tribe Genisteeae plants growing in southeast Poland. *Systematic and Applied Microbiology* 40, 482-491.

Wyniki zaprezentowane w powyższej publikacji zostały uzyskane w trakcie realizacji projektu pt. „Genetyka ewolucyjna bakterii tworzących układy symbiotyczne z roślinami plemienia *Genisteeae* rosnącymi w Polsce”, którego byłem kierownikiem. Projekt był finansowany przez MNiSW w ramach konkursu Iuventus Plus.

Badaniami objęto 16 szczepów bakteryjnych wyizolowanych z brodawek korzeniowych czterech gatunków roślin plemienia Genisteeae rosnących w południowo wschodniej Polsce – *Genista germanica* (janowiec ciernisty), *Genista tinctoria* (janowiec barwierski), *Chamaecytisus ratisbonensis* (szczodrzeniec rozestany) i *Cytisus scoparius* (żarnowiec miotlasty). W badaniach zastosowano powszechnie przyjęte podejście w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych bakterii brodawkowych, czyli analizę porównawczą sekwencji 16S rDNA, sekwencji genów kodujących białka oraz analizę genów symbiotycznych.

Analiza porównawcza sekwencji 16S rDNA badanych izolatów z sekwencjami dostępnymi w publicznej bazie danych GenBank pozwoliła na zaklasyfikowanie mikrosymbiontów roślin plemienia Genisteeae do rodzaju *Bradyrhizobium*. Jednocześnie ustalono bardzo wysoki stopień konserwatywności sekwencji 16S rDNA

między badanymi szczepami. Wszystkie izolaty brodawkowe wykazywały 99.6 – 100% podobieństwo sekwencji nukleotydowej genu 16S rRNA a różnice dotyczyły zaledwie pięciu nukleotydów na 1238 porównywanych pozycji w analizowanej sekwencji. Podobny stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA (>99.5%) badane szczepy wykazywały do kilku gatunków referencyjnych: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Bradyrhizobium ottawaense*, *Bradyrhizobium canariense*. Na drzewie filogenetycznym skonstruowanym w oparciu o sekwencje 16S rDNA badanych izolatów i szczepów referencyjnych, mikrosymbionty roślin plemienia Genisteeae, poza dwoma wyjątkami, utworzyły wspólną grupę ze szczepem *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T. Dwa izolaty z brodawek korzeniowych *Chamaecytisus ratisbonensis* utworzyły wspólne grono z innymi gatunkami – *Bradyrhizobium canariense* i *Bradyrhizobium lupini*. Dokładna analiza sekwencji nukleotydowej 16S rDNA wykazała, że wspomniane dwa mikrosymbionty *Chamaecytisus ratisbonensis* różniły się od pozostałych polskich izolatów dwoma pozycjami nukleotydowymi, w których to pozycjach były identyczne z sekwencjami *Bradyrhizobium canariense* i *Bradyrhizobium lupini*. Biorąc pod uwagę wysoki stopień konserwatywności sekwencji 16S rDNA, w dalszych etapach badań wykorzystano sekwencje kodujące białka i niosące więcej informacji filogenetycznej.

Analiza pojedynczych sekwencji genów *atpD*, *glnII* i *recA*, jak również analiza MLSA w oparciu o połączone sekwencje tych markerów jednoznacznie wykazała przynależność badanych szczepów do gatunku *Bradyrhizobium japonicum*. Badane mikrosymbionty roślin plemienia Genisteeae wykazywały względem siebie stopień podobieństwa sekwencji połączonych trzech genów na poziomie 99% – 100% a do czterech szczepów reprezentujących *Bradyrhizobium japonicum* – 97.9% – 100%. Na drzewie filogenetycznym skonstruowanym w oparciu o połączone sekwencje trzech analizowanych genów, wszystkie badane szczepy utworzyły wspólne grono z czterema włączonymi do analizy szczepami referencyjnego gatunku *Bradyrhizobium japonicum*. Grupa ta była wyraźnie odrębna w stosunku do pozostałych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* i charakteryzowała się wysokim (99%) współczynnikiem bootstrap, szeroko stosowanym w analizach filogenetycznych w celu statystycznego poparcia dla tworzonych przez analizowane sekwencje wspólnych grup na drzewach filogenetycznych.

W omawianym artykule przedyskutowana została kwestia doboru markerów filogenetycznych, ich różny stopień konserwatywności i jaki ma to wpływ na

grupowanie się badanych szczepów na drzewie filogenetycznym, a co za tym idzie na ustalenie ich pokrewieństwa. Na przykład, analiza bioinformatyczna sekwencji genów użytych w opisywanych badaniach wykazała, że najwięcej miejsc informatywnych filogenetycznie niesie sekwencja genu *glnII* a najmniej – *atpD*, co miało wpływ na wyniki analizy filogenetycznej kilku blisko spokrewnionych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* i ich różne grupowanie się na drzewach pojedynczych genów (niezgodność filogenetyczna). Wyniki swoich analiz przedyskutowałem z rezultatami opublikowanymi przez innych autorów wykazując, że różnice w pozycjonowaniu badanych szczepów na drzewach filogenetycznych skonstruowanych w oparciu o połączone sekwencje kilku genów wynikają z doboru tych markerów do badań.

Wyniki analizy filogenetycznej genów symbiotycznych *nodC*, *nodZ* i *nifH* dały jednoznaczną informację wskazującą na przynależność wszystkich badanych mikrosymbiontów roślin plemienia Genisteeae do symbiowaru genistearum. Podobieństwo między sekwencjami badanych genów polskich szczepów a referencyjnymi ryzobiami należącymi do symbiowaru genistearum i tworzącymi układy symbiotyczne z innymi roślinami plemienia Genisteeae wynosiło 90% – 99.2% (*nodC*), 88.9% - 96.9% (*nodZ*) oraz 93.5% - 98.7% (*nifH*) i było wyraźnie wyższe od stopnia podobieństwa sekwencji tych genów między szczepami symbiowaru genistearum a pozostałymi bradyryzobiami, które nie tworzą brodawek korzeniowych na roślinach plemienia Genisteeae (*nodC* - od 77.9% do 82%, *nodZ* – od 77.5% do 80.7% i *nifH* - od 87.1% do 88.8%). Na drzewach filogenetycznych wszystkich trzech genów symbiotycznych, polskie izolaty tworzyły wspólną grupę z bradyryzobiami symbiowaru genistearum, która była wyraźnie odrębna w stosunku do pozostałych szczepów *Bradyrhizobium* i charakteryzowała się w każdym z trzech przypadków maksymalnym (100%) współczynnikiem poparcia bootstrap.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazały na zgodność filogenezy genów rdzeniowych i symbiotycznych badanej grupy bakterii, co z kolei sugeruje ograniczenie zjawiska horyzontalnego transferu genów do blisko spokrewnionych bakterii.

A2. Kalita, M., Małek, W. (2019) The *ftsA* gene as a molecular marker for phylogenetic studies in *Bradyrhizobium* and identification of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Applied Genetics* 60, 123-126.

Część wyników opisana w powyższej publikacji została uzyskana w trakcie realizacji projektu pt. „Genetyka ewolucyjna bakterii tworzących układy symbiotyczne z roślinami plemienia *Genisteeae* rosnącymi w Polsce”, którego byłem kierownikiem. Projekt był finansowany przez MNiSW w ramach konkursu luventus Plus.

Wyniki moich wcześniejszych badań jak i doniesienia innych autorów wskazywały, że bakterie rodzaju *Bradyrhizobium* dominują wśród izolatów z brodawek korzeniowych roślin plemienia *Genisteeae*. Analiza filogenetyczna sekwencji genu 16S rRNA jak i większości genów metabolizmu podstawowego ujawnia istnienie dwóch supergrup w obrębie rodzaju *Bradyrhizobium* – supergrupy *B. japonicum* i spokrewnionych z nim gatunków oraz supergrupy *B. elkanii* i gatunków wykazujących bliskie pokrewieństwo z tym taksonem [11]. Moje poprzednie analizy pokazały, że wszystkie mikrosymbionty przebadanych roślin *Genisteeae* rosnących w Polsce infekowane są szczepami należącymi do *B. japonicum*. Podjąłem próbę opracowania metody badań filogenetycznych bradyryzobiów opartej na nowym markerze, niestosowanym do tej pory w filogenezie bakterii brodawkowych, który pozwoliłby na równie dobre różnicowanie opisanych gatunków bradyryzobiów jak stosowane z powodzeniem sekwencje genów rdzeniowych, a jednocześnie posiadałby unikalne cechy dla gatunku *B. japonicum* (lub gatunków z supergrupy *B. japonicum*), pozwalające na jego szybką identyfikację w populacji badanych bakterii brodawkowych. Swoje poszukiwania zawęziłem do genów kodujących białka uczestniczące w podziale komórki bakteryjnej, a analizy bioinformatyczne z wykorzystaniem dostępnych sekwencji genomów gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* pozwoliły mi na ostateczny wybór sekwencji genu *ftsA*. Zaprojektowałem startery do reakcji PCR i przetestowałem je z wykorzystaniem DNA szczepów referencyjnych rodzaju *Bradyrhizobium* będących w kolekcji Katedry Genetyki i Mikrobiologii oraz izolatów z brodawek korzeniowych roślin plemienia *Genisteeae* opisanych w poprzedniej publikacji. W reakcji amplifikacji otrzymałem jeden produkt o oczekiwanej wielkości, który został zsekwencjonowany. W analizie filogenetycznej genu *ftsA* wykorzystałem również sekwencje pozyskane ze wszystkich genomów bakterii rodzaju *Bradyrhizobium* dostępnych w bazach danych. W swoich analizach wykorzystałem łącznie 176 sekwencji genu *ftsA*. Przeprowadzone badania wykazały

użyteczność tego markera w analizach filogenetycznych bakterii rodzaju *Bradyrhizobium*. Badane szczepy grupowały się na drzewie genu *ftsA* podobnie jak na drzewach typowych markerów filogenetycznych używanych w badaniach bakterii brodawkowych, tj. *glnII* i *recA*. Ponadto sekwencja genu *ftsA* niesie więcej informacji filogenetycznej w porównaniu do sekwencji *glnII* i *recA*, co ustaliłem zliczając pozycje zmienne i konserwatywne w zestawie dopasowanych sekwencji użytych w rekonstrukcji ich filogenezy. Analizując polimorfizmy jednonukleotydowe wykazałem, że wszystkie szczepy zaliczane do gatunku *B. japonicum* posiadają resztę guaniny w pozycji 561 pełnej sekwencji genu *ftsA*, podczas gdy wszystkie inne gatunki *Bradyrhizobium* – resztę cytozyny lub tyminy. Zidentyfikowany polimorfizm dotyczy trzeciej pozycji 187 kodonu i ma charakter substytucji niesynonimicznej. W kodowanym białku u przedstawicieli gatunku *B. japonicum* w pozycji odpowiadającej kodonowi 187 znajduje się kwas glutaminowy, natomiast u pozostałych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* – kwas asparaginowy. Polimorfizm ten wydaje się silnie zakonserwowany w szczepach *B. japonicum*, czyniąc z niego potencjalne narzędzie do identyfikacji tego gatunku w populacjach badanych bakterii. Przeprowadzone analizy dostarczyły dodatkowego dowodu potwierdzającego przynależność mikrosymbiontów roślin plemienia Genisteeae, opisanych na wcześniejszym etapie moich badań, do gatunku *B. japonicum*.

A3. Wójcik, M., Kalita, M., Małek, W. (2019) Numerical analysis of phenotypic properties, genomic fingerprinting, and multilocus sequence analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lembotropis nigricans* of the tribe Genisteeae. *Annals of Microbiology* 69, 1123-1134.

Przed podjęciem badań, których wynikiem jest powyższa publikacja, w literaturze naukowej nie było doniesień o bakteriach izolowanych z brodawek korzeniowych szczydryka czerniejącego (*Lembotropis nigricans*). W badaniach taksonomicznych 33 mikrosymbiontów *L. nigricans* zastosowano podejście wielokierunkowe, łączące informację pochodzącą z analizy cech fenotypowych, polimorfizmu genomowego badanej populacji bakterii i analizy filogenetycznej. Analiza numeryczna 86 cech fenotypowych, obejmujących m.in. wykorzystywanie różnych związków jako jedynych źródeł węgla i azotu, badanie oporności na antybiotyki, zasolenie i różne wartości pH

podłoża, pozwoliła na wstępne przypisanie badanych szczepów do rodzaju *Bradyrhizobium*. W obrębie populacji badanych szczepów wykazano duże zróżnicowanie pod względem cech fenotypowych. Na przykład 11 spośród 33 badanych izolatów tolerowało 3% zasolenie podłoża, co nie jest cechą typową dla referencyjnych gatunków *Bradyrhizobium*. 7 szczepów przeżywało w pożywce o odczynie zasadowym (pH = 10). Kilka opisanych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* również posiada tę cechę. Mimo zróżnicowania fenotypowego badanej populacji mikrosymbiontów szczodrzyka czerniejącego, tworzyły one spójną grupę na dendrogramie skonstruowanym w oparciu o wszystkie analizowane cechy. Grupa ta była blisko spokrewniona z referencyjnymi gatunkami rodzaju *Bradyrhizobium*, z którymi badane szczepy utworzyły większe wspólne grono wyraźnie odrębne w stosunku do bakterii rodzaju *Rhizobium*, *Mesorhizobium* czy *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*).

Badania stopnia zróżnicowania genomowego izolatów z brodawek korzeniowych *L. nigricans* przeprowadzono z zastosowaniem dwóch technik – BOX-PCR i AFLP. Pierwsza z nich opiera się na zastosowaniu w reakcji PCR starterów komplementarnych do sekwencji powtórzonych (sekwencji BOX), rozproszonych w genomie bakteryjnym. Zakładając, że nawet w obrębie jednego gatunku mogą występować różnice w rozmieszczeniu sekwencji powtórzonych w genomie, metoda ta umożliwia różnicowanie i identyfikację szczepów w badanej populacji. Z kolei metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), czyli polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów, opiera się na różnicach w rozmieszczeniu w genomach badanych szczepów miejsc rozpoznawanych przez zastosowany enzym restrykcyjny. Badany DNA poddaje się cięciu enzymem, następnie do powstałych fragmentów przyłącza się w reakcji ligacji adapter komplementarny do sekwencji rozpoznawanej przez endonukleazę i posiadający kilkunastonukleotydowy fragment komplementarny do sekwencji startera reakcji PCR, stosowanego w kolejnym etapie. Zamplifikowane fragmenty są rozdzielane elektroforetycznie (podobnie jak w metodzie BOX-PCR), a uzyskane wzory DNA poddawane są analizie numerycznej.

Obie techniki zastosowane w badaniach polimorfizmu genomowego mikrosymbiontów szczodrzyka czerniejącego różniły się zdolnością różnicowania analizowanych szczepów. Technika AFLP ujawniła istnienie 32 genotypów wśród 33 badanych szczepów (tylko dwa izolaty posiadały identyczne wzory DNA), natomiast przy zastosowaniu techniki BOX-PCR, aż jedna trzecia szczepów posiadała

identyczne profile DNA. Wyniki analizy numerycznej wzorów DNA przedstawiono w formie dendrogramów, na podstawie których wyselekcjonowano 11 szczepów, reprezentujących różne genotypy, do dalszych etapów badań zmierzających do ustalenia pozycji gatunkowej badanych izolatów.

Analiza porównawcza sekwencji genu 16S rRNA mikrosymbiontów szczodrzyka czerniejącego, podobnie jak w przypadku izolatów z brodawek korzeniowych wcześniej opisanych roślin plemienia Genisteeae, wykazała ich bliskie pokrewieństwo z bakteriami rodzaju *Bradyrhizobium*. Część badanych izolatów posiadała identyczną sekwencję 16S rDNA z sekwencją szczepu BGA-1 gatunku *B. japonicum*. Co ciekawe, typowy szczep *B. japonicum* USDA6^T, na drzewie filogenetycznym genu 16S rRNA zajmował odrębną gałąź w stosunku do szczepu BGA-1 i badanych izolatów z brodawek korzeniowych *L. nigricans*. To kolejny dowód na poważne ograniczenia jakimi charakteryzuje się ten marker w badaniach pokrewieństwa filogenetycznego bakterii rodzaju *Bradyrhizobium*.

Do ustalenia najbliższej spokrewnionych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* z naszymi szczepami zastosowano analizę połączonych sekwencji czterech genów tj. *atpD*, *dnaK*, *gyrB* i *rpoB*. Mikrosymbionty szczodrzyka czerniejącego wykazały najwyższy stopień podobieństwa połączonych sekwencji czterech genów do sekwencji typowego szczepu gatunku *B. japonicum* (96.7% – 97.2%), a do sekwencji pozostałych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium* stopień podobieństwa zawierał się w przedziale od 87.7% do 95.3%. Drzewo filogenetyczne skonstruowane w oparciu o połączone sekwencje badanych genów wyraźnie wskazuje na przynależność badanych szczepów do gatunku *B. japonicum*, z którym to mikrosymbionty *L. nigricans* utworzyły wspólną grupę o wysokim współczynniku poparcia bootstrap (93%), odrębną względem pozostałych gatunków rodzaju *Bradyrhizobium*.

A4. Kalita, M., Małek, W. (2019) Root nodules of *Genista germanica* harbor *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* bacteria exchanging *nodC* and *nodZ* genes. *Systematic and Applied Microbiology*
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126026>

Część wyników przedstawiona w powyższej publikacji została uzyskana w trakcie realizacji projektu pt. „Horyzontalny transfer genów symbiotycznych między bakteriami

rodzaju *Bradyrhizobium* i *Rhizobium*”, w którym byłem kierownikiem, a sam projekt finansowany był przez NCN w ramach konkursu Miniatura1.

Niebadana wcześniej populacja bakterii wyizolowanych z brodawek korzeniowych janowca ciernistego (*G. germanica*) poddana została oznaczeniu stopnia zróżnicowania genomowego metodą BOX-PCR oraz analizom taksonomicznym w oparciu o opisany wcześniej schemat, czyli ustalenie pozycji rodzajowej bakterii na podstawie analizy porównawczej sekwencji 16S rDNA, ustalenie najbliższych spokrewnionych gatunków z zastosowaniem analizy MLSA oraz określenie pokrewieństwa symbiotycznego poprzez analizę sekwencji genów *nod*.

Wstępnie przyjąłem założenie, że bakterie izolowane z brodawek korzeniowych *G. germanica* należą do rodzaju *Bradyrhizobium*. Założenie to oparte było na wynikach moich wcześniejszych badań mikrosymbiontów roślin plemienia Genisteeae jak i licznych doniesieniach innych autorów, które wyraźnie wskazywały, że bakterie które nie należą do rodzaju *Bradyrhizobium* są rzadko izolowane z brodawek korzeniowych wspomnianej grupy roślin, a geograficzna dystrybucja tych bakterii jest ograniczona do krajów basenu Morza Śródziemnego [8]. Dlatego interesującym okazał się wynik analizy porównawczej sekwencji genu 16S rRNA wskazujący, że 6 spośród 18 przebadanych szczepów należy do rodzaju *Rhizobium*, a pozostałe 12 szczepów do rodzaju *Bradyrhizobium*. Na drzewie filogenetycznym genu kodującego 16S rRNA szczepy zidentyfikowane jako bradyryzobia nie tworzyły jednorodnej grupy i były rozmieszczone w dwóch gronach, jednym obejmującym siedem badanych izolatów i *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T oraz drugim z pięcioma izolatami i referencyjnym szczepem *Bradyrhizobium canariense*. Szczepy zaklasyfikowane do rodzaju *Rhizobium* również tworzyły dwa grona, jedno zawierające trzy badane izolaty i referencyjne szczepy *Rhizobium leguminosarum* oraz drugie, również z trzema izolatami z brodawek korzeniowych *G. germanica* i referencyjnymi szczepami *Rhizobium lusitanum*, *Rhizobium rhizogenes* i *Rhizobium tropici*. Więcej informacji o przynależności gatunkowej dostarczyła analiza połączonych sekwencji pięciu genów: *dnaK-glnII-gyrB-recA-rpoB*. Badane szczepy *Bradyrhizobium* sp. wykazywały najwyższy stopień podobieństwa połączonych sekwencji analizowanych genów do sekwencji typowego szczepu *Bradyrhizobium japonicum* USDA6^T (97.0 – 97.3%), z którym na drzewie filogenetycznym skonstruowanym w oparciu o sekwencje pięciu genów tworzyły wspólną grupę przy współczynniku poparcia bootstrap wynoszącym 100%. Dodatkowym potwierdzeniem przynależności badanych bradyryzobiów do

B. japonicum był wynikiem analizy polimorfizmu jednonukleotydowego sekwencji genu *ftsA*. Badania te wykazały, że tylko szczepy zidentyfikowane jako *B. japonicum* i typowy szczep referencyjny tego gatunku posiadają w 561 pozycji nukleotydowej sekwencji genu *ftsA* resztę guaniny. Pozostałe gatunki bradyryzobiów posiadają w tej pozycji tyminę lub cytozynę. Wyniki te potwierdziły użyteczność analizy sekwencji genu *ftsA* w identyfikacji szczepów gatunku *B. japonicum*, co zaproponowałem w jednej z wcześniej omawianych prac.

Pozycja gatunkowa szczepów rodzaju *Rhizobium* była jednoznaczna tylko w przypadku jednej grupy bakterii, które wykazały stopień podobieństwa połączonych sekwencji analizowanych genów na poziomie 99.4% do sekwencji typowego szczepu *Rhizobium leguminosarum* USDA2370^T. Druga grupa badanych izolatów zaklasyfikowanych do rodzaju *Rhizobium* wykazała najwyższy stopień podobieństwa sekwencji analizowanych genów, wynoszący 96.2 - 96.6%, do szczepu *Rhizobium lusitanum* P1-7^T. Obliczony stopień podobieństwa oraz sposób grupowania się tych szczepów na drzewie filogenetycznym genów *dnaK-glnII-gyrB-recA-rpoB* sugeruje, że ta grupa trzech szczepów *Rhizobium* sp. może reprezentować nowy gatunek, blisko spokrewniony z *R. lusitanum*.

Interesujące wyniki otrzymałem analizując sekwencje genów symbiotycznych *nodC* i *nodZ*. O ile wyniki tej analizy dla szczepów zaklasyfikowanych do rodzaju *Bradyrhizobium* nie były zaskakujące i potwierdziły ich spodziewane bliskie pokrewieństwo ze szczepami symbiowaru genistearum, to rozmieszczenie na drzewach filogenetycznych sekwencji genów *nodC* i *nodZ* szczepów rodzaju *Rhizobium* było nietypowe. Sekwencje genów *nodC* i *nodZ* szczepów blisko spokrewnionych z *R. lusitanum* zlokalizowały się w obrębie grona zawierającego sekwencje szczepów rodzaju *Bradyrhizobium* z symbiowaru genistearum, wskazując na zajście horyzontalnego transferu tych genów z bakterii rodzaju *Bradyrhizobium* do *Rhizobium*. Mimo, że zjawisko horyzontalnego transferu genów symbiotycznych jest opisywane między bakteriami należącymi do tego samego rodzaju, rzadziej między rodzajami (np. z *Bradyrhizobium* do *Ensifer*, czy z *Ensifer* do *Rhizobium* [2,17]), w literaturze nie było doniesień o transferze genu *nodC* z *Bradyrhizobium* do *Rhizobium*. Postawiłem hipotezę, że transfer genów *nodC* i *nodZ* od naturalnych mikrosymbiontów *G. germanica* z rodzaju *Bradyrhizobium* do szczepów rodzaju *Rhizobium* umożliwił tym drugim poszerzenie zakresu gospodarza, z którym mogą tworzyć efektywne układy symbiotyczne. Wyniki testów roślinnych nie potwierdziły

słuszności tej hipotezy, ponieważ tylko szczepy *Bradyrhizobium* były zdolne do infekcji i zasiedlenia brodawek korzeniowych *G. germanica*. Szczepy *Rhizobium* sp. pierwotnie wyizolowane z brodawek korzeniowych janowca ciernistego nie dały pozytywnego wyniku w testach roślinnych z tym gatunkiem sugerując, że inne czynniki, jak np. III system sekrecji białek, czy specyficzne egzopolisacharydy rozpoznawane przez gospodarza roślinnego są niezbędne do nawiązania efektywnej symbiozy z *G. germanica*.

Na podstawie wyników wszystkich omówionych analiz uznałem, że badane szczepy *Rhizobium* należą do niesymbiotycznych endofitów zasiedlających brodawki korzeniowe *G. germanica* razem z ich naturalnymi mikrosymbiontami, czyli szczepami rodzaju *Bradyrhizobium*.

Część wyników dotycząca analizy filogenetycznej genów symbiotycznych prezentowana była w formie doniesienia posterowego pt. „Filogenetyczny dowód transferu genów symbiotycznych między bakteriami glebowymi rodzaju *Bradyrhizobium* i *Rhizobium*” na II Ogólnopolskim Sympozjum Mikrobiologicznym „Metagenomy Różnych Środowisk” w roku 2017, za które otrzymałem I nagrodę.

A5. Kalita, M., Małek, W., Coutinho, T. (2020) Putative novel *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* species isolated from root nodules of *Chamaecytisus ruthenicus*. *Systematic and Applied Microbiology*
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126056>

Szczodrzeniec ruski (*Chamaecytisus ruthenicus*) jest interesującym przedstawicielem roślin plemienia Genisteeae ze względu na to, że przez Polskę przebiega zachodnia granica występowania tego gatunku w Europie, czym różni się od pozostałych roślin wybranych do analiz i opisywanych we wcześniejszych moich publikacjach. Poza tym, jedyne doniesienia literaturowe na temat bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych *Chamaecytisus ruthenicus* pochodzą z południowego Uralu [3], czyli południowo wschodniej granicy występowania tego gatunku.

Filogeneza szczepów wyizolowanych z brodawek korzeniowych szczodrzenia ruskiego rosnącego w Polsce, zrekonstruowana w oparciu o sekwencję genu 16S rRNA wykazała, że należą one do dwóch rodzajów bakterii brodawkowych - *Bradyrhizobium* i *Phyllobacterium*. Co ciekawe, zidentyfikowane szczepy rodzaju *Bradyrhizobium* nie grupowały się na drzewie filogenetycznym genu 16S rRNA

w obrębie supergrupy *B. japonicum*, tak jak wszystkie opisane wcześniej bradyryzobia będące mikrosymbiontami roślin plemienia Genisteeae rosnących w Polsce. Szczepy *Bradyrhizobium* sp. specyficzne dla *C. ruthenicus* utworzyły wspólną grupę z typowym szczepem gatunku *Bradyrhizobium algeriense* należącym do supergrupy *B. elkanii*. *B. algeriense* jest mikrosymbiontem rośliny *Retama sphaerocarpa* należącej do plemienia Genisteeae [1]. Co ciekawe, w tej samej grupie znalazła się sekwencja szczepu *Bradyrhizobium* wyizolowanego z brodawek korzeniowych *C. ruthenicus* z południowego Uralu.

Po raz pierwszy w swoich badaniach udało mi się zidentyfikować wśród izolatów z brodawek korzeniowych szczepy należące do rodzaju *Phyllobacterium*, które na drzewie filogenetycznym genu 16S rRNA utworzyły wspólne grono z referencyjnymi bakteriami dwóch gatunków – *Phyllobacterium catacumbae* i *Phyllobacterium ifriqiyense*. Tylko bakterie drugiego gatunku zostały wyizolowane z brodawek korzeniowych, ale z rośliny nienależącej do plemienia Genisteeae, tj. *Astragalus algerianus* [10]. Polskie szczepy sklasyfikowane w rodzaju *Phyllobacterium* należą do odrębnej grupy filogenetycznej w stosunku do izolatów z brodawek korzeniowych *C. ruthenicus* z południowego Uralu, które zostały zidentyfikowane jako *Phyllobacterium trifolii*.

Wyniki analizy porównawczej sekwencji trzech genów – *atpD*, *gyrB* i *recA*, oraz drzewa skonstruowane w oparciu o pojedyncze jak i połączone sekwencje tych genów, dostarczyły dowodów wskazujących na to, że brodawki rosnące w Polsce *C. ruthenicus* są zasiedlane przez nieopisane do tej pory gatunki rodzaju *Bradyrhizobium* i *Phyllobacterium*. Na drzewie filogenetycznym genów *atpD-gyrB-recA* badane bradyryzobia tworzyły wyraźnie odrębne, zarówno względem siebie jak i pozostałych gatunków *Bradyrhizobium*, dwie linie filogenetyczne, jedną złożoną z 12 badanych izolatów i drugą reprezentowaną przez pojedynczy szczep. Stopień podobieństwa połączonych sekwencji trzech genów między tymi dwoma grupami wynosił 94.7% – 95.1%. Badane izolaty rodzaju *Bradyrhizobium* były najbardziej podobne, pod względem analizowanych sekwencji, do *B. algeriense*. Dla szczepów liczniejszej grupy stopień podobieństwa wynosił 94.7% - 95%, a dla pojedynczego szczepu – 95.6%. Chociaż do wyodrębniania nowych gatunków bakteryjnych oficjalnie nie używa się stopnia podobieństwa sekwencji genów kodujących białka, jak to ma miejsce w przypadku sekwencji genu 16S rRNA, to wartości równe lub niższe od 97% były używane przez wielu autorów opisujących nowe gatunki rodzaju *Bradyrhizobium*

jako wskaźnik, że badane szczepy mogą stanowić odrębny takson, co następnie zostało potwierdzone w analizach hybrydyzacji DNA-DNA lub poprzez porównanie sekwencji kompletnych genomów [4,5,7,8,9]. Ustalone przeze mnie wartości stopnia podobieństwa sekwencji trzech badanych genów między polskimi izolatami a najbliższym spokrewnionym z nimi szczepem *B. algeriense* RST89^T wyraźnie wskazują na ich przynależność do nowych gatunków.

Podobne wnioski wyciągnąłem z analizy porównawczej sekwencji genów *atpD*, *gyrB* i *recA* szczepów zaklasyfikowanych do rodzaju *Phyllobacterium*. Polskie izolaty wykazywały podobieństwo sekwencji badanych genów do odpowiadających im sekwencji opisanych gatunków *Phyllobacterium* w zakresie od 78.2% (*Phyllobacterium salinisoli*) do 90.8% (*Phyllobacterium ifriqiense*). Na drzewie filogenetycznym skonstruowanym w oparciu o analizowane geny, badane szczepy utworzyły odrębną grupę co wskazuje, że mogą one reprezentować nowy gatunek rodzaju *Phyllobacterium*.

Analiza sekwencji genów symbiotycznych *nodC*, *nodZ*, *nifD* i *nifH* miała mi dać odpowiedź na pytanie, czy szczepy *Bradyrhizobium* specyficzne dla *C. ruthenicus* rosnącego w Polsce należą do symbiowaru genistearum, tak jak zidentyfikowane we wcześniejszych badaniach szczepy *B. japonicum* izolowane z brodawek korzeniowych czterech pozostałych roślin plemienia Genisteeae, co z kolei wskazywałoby na zajście horyzontalnego transferu genów *nod* i *nif*. Alternatywną hipotezą była przynależność polskich izolatów szczodrzeńca ruskiego do symbiowaru, do którego należą bakterie najbliższym spokrewnionego z nimi gatunku *B. algeriense*. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że alternatywna hipoteza jest tą właściwą. Na drzewach filogenetycznych wszystkich analizowanych genów symbiotycznych, badane szczepy rodzaju *Bradyrhizobium* tworzyły wspólną grupę z referencyjnymi szczepami gatunków *B. algeriense*, *B. valentinum* i *B. retamae*, które są zdolne do nawiązywania efektywnych interakcji symbiotycznych z roślinami plemienia Genisteeae, ale pod względem filogenezy genów *nod* i *nif* reprezentują odrębny względem symbiowaru genistearum wariant symbiotyczny bakterii brodawkowych, tj. symbiowar *retamae*. Wynik ten jest o tyle ciekawy, że do tej pory szczepy należące do symbiowaru *retamae* izolowano z brodawek roślin rosnących w krajach basenu Morza Śródziemnego, a szczodrzeniec ruski nie występuje w tym regionie. Tym samym opublikowane wyniki są pierwszym doniesieniem na temat szerokiego zasięgu geograficznego bradyryzobii reprezentujących ten wariant symbiotyczny.

Wykorzystując startery reakcji PCR specyficzne dla genów symbiotycznych badanych mikrosymbiontów *C. ruthenicus* z rodzaju *Bradyrhizobium*, nie udało mi się uzyskać produktów amplifikacji na matrycy DNA szczepów rodzaju *Phyllobacterium*. Uznałem, że badane izolaty *Phyllobacterium* nie są naturalnymi mikrosymbiontami szczodrzenia ruskiego, natomiast bytując w ryzosferze tej rośliny mogą zasiedlać brodawki korzeniowe przy okazji infekcji zainicjowanej przez efektywne szczepy *Bradyrhizobium*.

4.1.4. Podsumowanie najważniejszych wyników badań opublikowanych w artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe

1. Ustalenie pozycji filogenetycznej bakterii wyizolowanych z brodawek korzeniowych trzech gatunków roślin motylkowatych z plemienia Genisteae, które wcześniej nie były badane pod tym kątem, tj. janowca ciernistego (*Genista germanica*), szczodrzenia rozestanego (*Chamaecytisus ratisbonensis*) oraz szczodrzyka czerniejącego (*Lembotropis nigricans*).
2. Identyfikacja nowych linii filogenetycznych w obrębie rodzajów *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* i *Phyllobacterium*, które mogą stanowić nowe, nieopisane gatunki bakterii wyizolowanych z brodawek korzeniowych.
3. Zastosowanie sekwencji nukleotydowej genu *ftsA* jako nowego markera w badaniach filogenetycznych bakterii rodzaju *Bradyrhizobium* i wykazanie jego użyteczności w identyfikacji szczepów gatunku *Bradyrhizobium japonicum*.
4. Opisanie po raz pierwszy zjawiska horyzontalnego transferu genu symbiotycznego *nodC* między bakteriami rodzaju *Bradyrhizobium* i *Rhizobium*.
5. Opisanie szczepów będących przedstawicielami symbiowaru retamae, poza znaną dotychczas geograficzną granicą jego zasięgu.

4.1.5. Bibliografia

- [1] Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J.M., Rey, L., Ruiz-Argüeso, T., Boulila, A., Imperial, J. (2018) *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Syst Appl Microbiol* 41, 333-339.
- [2] Barcellos, F.G., Menna, P., da Silva Batista, J.S., Hungria, M. (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol* 73, 2635-2643.

- [3] Baymiev, An.Kh., Ivanova, E.S., Ptitsyn, K.G., Belimov, A.A., Safronova, V.I., Baymiev, Al.Kh. (2012) Genetic characterization of wild leguminous nodular bacteria living in the South Urals. *Mol Genet Microbiol Virol* 2012, 33–39.
- [4] Costa, E.M., Guimarães, A.A., Carvalho, T.S., Rodrigues, T.L., Ribeiro, P.R.A., Lebbe L., Willems, A., Moreira, F.M.S. (2018) *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch Microbiol* 200, 743-752.
- [5] Costa, E.M., Guimarães, A.A., Vicentin, R.P., Ribeiro, P.R.A., Leão, A.C.R., Balsanelli, E., Lebbe, L., Aerts, M., Willems, A., Moreira, F.M.S. (2017) *Bradyrhizobium brasiliense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. *Arch Microbiol* 199, 1211-1221.
- [6] Debelle, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarié, J., Boivin, C. (2001) nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonica* 48, 359-365.
- [7] Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Martínez-Romero, E., Ormeño-Orrillo, E. (2014) *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2072-2078.
- [8] Grönemeyer, J.L., Hurek, T., Bünger, W., Reinhold-Hurek, B. (2016) *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 62-69.
- [9] Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Hungria, M. (2017) *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 1827-1834.
- [10] Mantelin, S., Saux, M.F., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., de Lajudie, P., Cleyet-Marel, J.C. (2006) Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 827-839.
- [11] Menna, P., Barcellos, F.G., Hungria, M. (2009) Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2934–2950.
- [12] Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21, 541-554.
- [13] Rogel, M.A., Ormeño-Orrillo, E., Martínez Romero, E. (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol*. 34, 96-104.
- [14] Stępkowski, T., Banasiewicz, J., Granada, C.E., Andrews, M., Passaglia, L.M.P. (2018) Phylogeny and phylogeography of rhizobial symbionts nodulating legumes of the tribe Genisteae. *Genes* 9, 163.
- [15] Wang, E.T., Chen, W.F., Tian, C.F., Young, J.P.W., Chen, W.X. (2019) Ecology and evolution of rhizobia. Springer Nature, Singapore.
- [16] Wang, E.T., Martínez-Romero, E. (2000) Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. W: Prokaryotic nitrogen fixation. A model system for analysis of a biological process. Ed.: Triplett E. W. Horizon Scientific Press, UK.
- [17] Xu, K.W., Zou, L., Penttinen, P., Zeng, X., Liu, M., Zhao, K., Chen, C., Chen, Y.X., Zhang, X. (2016) Diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Desmodium* spp. in Panxi, Sichuan, China. *Syst Appl Microbiol* 39, 33-40.
- [18] Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12, 635 – 645.
- [19] Zakhia, F., de Lajudie, P. (2001) Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21, 569-576.
- [20] Zahran, H.H. (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 968-989.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałem badania bakterii izolowanych z brodawek korzeniowych dziko rosnących roślin plemienia Genisteeae. Ponieważ wszystkie szczepy, które badałem w trakcie wykonywania pracy magisterskiej i doktorskiej należały do rodzaju *Bradyrhizobium* i były blisko spokrewnione z gatunkiem *B. japonicum*, zainteresowany byłem współpracą z naukowcami zaangażowanymi w badania tej grupy bakterii symbiotycznych. W 2009 roku nawiązałem kontakt z dr. Chinnaswamy Appunu z Zakładu Mikrobiologii Fundacji Naukowej M. S. Swaminathan w Indiach. Dr Appunu był w tym czasie autorem licznych publikacji dotyczących różnorodności genetycznej szczepów gatunku *Bradyrhizobium japonicum* i innych bradyryzobiów izolowanych z brodawek korzeniowych głównie roślin użytkowych. W wyniku prowadzonej korespondencji elektronicznej, nawiązaliśmy współpracę dotyczącą badań prowadzonych przez dr. Appunu nad mikrosymbiontami *Macrotylum uniflorum* – jednym z gatunków ciecierzycy. Wykorzystując doświadczenie zdobyte w trakcie wykonywania badań związanych z pracą doktorską, zostałem zaangażowany przy analizie bioinformatycznej sekwencji nukleotydowych genów *glnII* i *recA* uzyskanych dla badanych szczepów. Przeprowadziłem analizy porównawcze z sekwencjami pochodzącymi z baz danych oraz przygotowałem zestawienia sekwencji dopasowanych. Wyniki wykonanych przeze mnie analiz zostały włączone do publikacji :

A6. Appunu, C., Ganesan, G., **Kalita, M.**, Kaushik, R., Saranya, B., Prabavathy, V.R., Sudha, N. Phylogenetic diversity of rhizobia associated with horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.] grown in south india based on *glnII*, *recA* and 16S-23S intergenic sequence analyses (2011) *Current Microbiology*, 62, 1230-1238.

W związku z tym, że wkrótce po opublikowaniu powyższej pracy dr Appunu zmienił miejsce zatrudnienia i model badawczy na trzcinę cukrową, nasza współpraca naukowa dotycząca badań filogenetycznych bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych nie była kontynuowana.

W roku 2011 podjąłem współpracę z dr. Adamem Waśko z Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Propozycja współpracy wyszła od dr. Waśko, który dowiedział się

o posiadanym przeze mnie doświadczeniu w prowadzeniu badań taksonomicznych bakterii, opartych m.in. na analizie numerycznej elektroforetycznych profili DNA. Nasza współpraca dotyczyła prowadzonych przez dr. Waśko badań nad bakteriami rodzaju *Bifidobacterium*. Moją rolą w realizowanych badaniach była analiza numeryczna wyników rozdziału elektroforetycznego białek analizowanych szczepów bakteryjnych. Opracowałem wyniki przeprowadzonych analiz w postaci dendrogramu i macierzy podobieństw między badanymi szczepami. Wyniki te zostały włączone do publikacji: **A7.** Waśko, A., Polak-Berecka, M., **Kalita, M.** Protein profiles from intact cells as a tool in *Bifidobacterium* characteristics (2012) *Polish Journal of Microbiology*, 61, 305-310.

W roku 2018 nawiązałem współpracę z prof. Teresą Coutinho z Uniwersytetu w Pretorii w Republice Południowej Afryki. Impulsem do skontaktowania się z prof. Coutinho było ogłoszenie przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, II konkursu na wspólne polsko-południowoafrykańskie projekty badawcze. Pierwszy kontakt z prof. Coutinho nawiązała dr hab. Sylwia Wdowiak-Wróbel, z którą współpracuję w ramach zespołu badawczego w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii. Dr hab. Wdowiak-Wróbel pozyskała z Uniwersytetu w Pretorii szczepy bakteryjne gatunków opisanych przez prof. Coutinho. Wykorzystując ten kontakt, zainicjowałem korespondencję elektroniczną z prof. Coutinho dotyczącą możliwości wspólnego aplikowania we wspomnianym konkursie na polsko-południowoafrykańskie projekty badawcze. Podjęta współpraca zaowocowała złożeniem wniosku do NCBiR oraz National Research Foundation w RPA. Projekt pt. "Skład i funkcja mikrobiomu brodawek korzeniowych *Trifolium rubens* i *Trifolium africanum*" uzyskał finansowanie i jest realizowany od maja 2019 roku (szczegóły dotyczące projektu podano w części 9.2. Załącznika 4; skan decyzji o przyznaniu finansowania znajduje się pod pozycją A8. Załącznika 7). W projekcie tym pełnię funkcję kierownika zespołu po stronie polskiej. Współpraca naukowa w ramach realizowanego projektu opiera się na zasadzie synergii. Zespół prof. Coutinho nie ma doświadczenia w badaniach ryzobiów, natomiast dysponuje wiedzą i doświadczeniem w badaniach metagenomowych, które są zaplanowane do realizacji w ramach omawianego projektu. Z kolei nasz zespół może się wykazać bogatym doświadczeniem w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych bakterii brodawkowych. W trakcie wizyty na Uniwersytecie w Pretorii na przełomie września i października 2019 roku, uczestniczyłem w dwudniowych warsztatach "Metagenomics Workshop",

podczas których mogłem zapoznać się od strony praktycznej z metodami bioinformatycznej analizy metagenomu.

Niezależnie od rozpoczęcia realizacji projektu we współpracy z Uniwersytetem w Pretorii, zaprosiłem prof. Coutinho do zaangażowania się w równoległe prowadzone przeze mnie badania and bakteriami izolowanymi z brodawek korzeniowych szczodrzeńca ruskiego (*Chamaecytisus ruthenicus*). Wynikiem podjętej współpracy, wykorzystującej doświadczenie prof. Coutinho w badaniach nad bakteriami związanymi z roślinami, ale nie należącymi do grupy ryzobiów, a właśnie taką grupę bakterii udało mi się zidentyfikować wśród izolatów z brodawek korzeniowych szczodrzeńca ruskiego, jest publikacja:

A5. Kalita, M., Małek, W., Coutinho, T. (2020) Putative novel *Bradyrhizobium* and *Phyllobacterium* species isolated from root nodules of *Chamaecytisus ruthenicus*. *Systematic and Applied Microbiology* <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126056>, wchodząca w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

Od początku swojej pracy zawodowej jako nauczyciel akademicki prowadziłem ćwiczenia laboratoryjne z genetyki dla studentów biologii i biotechnologii oraz ćwiczenia z mikrobiologii dla studentów biologii, biotechnologii, ochrony środowiska, chemii środków bioaktywnych i kosmetyków.

Jestem współkoordynatorem trzech kursów – bioinformatyki dla studentów II roku II stopnia biologii, analizy bioinformatycznej dla I roku II stopnia bioanalitiky oraz bioinformatyki – analizy sekwencji DNA i białek dla I roku II stopnia biotechnologii ogólnej. Brałem udział w przygotowaniu programów zajęć dla wymienionych kursów.

Prowadzę zajęcia w języku angielskim z bioinformatyki, genetyki i mikrobiologii dla studentów przyjeżdżających na Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w ramach programu Erasmus+. Brałem udział w opracowaniu programu ćwiczeń wymienionych kursów w języku angielskim. Prowadziłem zajęcia laboratoryjne w języku angielskim z mikrobiologii dla studentów kierunku 'Medical Biology'.

Byłem zaangażowany w przygotowanie i prowadzenie wykładów i ćwiczeń z przedmiotu mikrobiologia z genetyką dla słuchaczy studiów podyplomowych kierunku 'Nauczanie biologii w szkołach ponadpodstawowych'.

Od roku 2011 byłem promotorem 20 i recenzentem 14 prac licencjackich. Od roku 2004 pełniłem rolę opiekuna naukowego 17 magistrantów wykonujących prace magisterskie w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii. Jestem promotorem pomocniczym przewodu doktorskiego Pani mgr Magdaleny Wójcik.

Od roku 2015 jestem koordynatorem programu Erasmus+ na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS. W czasie pełnionej funkcji byłem zaangażowany w poszerzenie oferty programu Erasmus+ dla studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii poprzez bezpośredni udział w zawarciu dwóch umów z uniwersytetami z Turcji i Hiszpanii.

W latach 2008 – 2019 byłem członkiem Rady Naukowej Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii, a w latach 2012 – 2019 członkiem Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS. Od roku 2019 jestem członkiem Wydziałowego Zespołu ds. Jakości Kształcenia

Moja aktywność popularyzatorska przejawiała się poprzez zaangażowanie w następujące działania:

Aktywny udział w Dniach Otwartych UMCS w roku 2008 i 2014 – wygłoszenie wykładu dla młodzieży odwiedzającej Wydział Biologii i Biotechnologii.

Aktywny udział w XII i XIII Lubelskim Festiwalu Nauki (2015, 2016) – przygotowanie i realizacja autorskiego projektu „Jak gry komputerowe pomagają w rozwiązywaniu problemów nauk biologicznych”.

W listopadzie 2015 roku przeprowadziłem ćwiczenia z bioinformatyki dla uczniów szkoły partnerskiej Wydziału Biologii i Biotechnologii.

W roku 2013 brałem udział w sesji wykładowej lubelskiej edycji warsztatów ‘DNA Encyklopedia Życia’.

W roku 2011 udzieliłem wywiadu dla internetowej telewizji Lublin, w którym opowiadałem o projekcie finansowanym przez MNiSW w ramach programu Iuventus Plus (dane dotyczące tego projektu znajdują się w Załączniku 4, punkt II.9).

W roku 2014 moje wypowiedzi na temat bioinformatycznych baz danych wykorzystano w dwóch artykułach na portalu Biotechnologia.pl.

Na spotkaniu w ramach Forum Młodych Naukowców na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w roku 2019 przedstawiłem prezentację dotyczącą projektu realizowanego we współpracy z Uniwersytetem w Pretorii, RPA.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej, nieomówione w punktach 4-5

Poza aktywnością naukową omówioną w punkcie 4. i 5. niniejszego Autoreferatu, po uzyskaniu stopnia doktora byłem zaangażowany, jako jeden z wykonawców, w realizację dwóch projektów badawczych, których efektem były wymienione poniżej publikacje.

Mierzwa, B., Wdowiak-Wróbel, S., **Kalita, M.**, Gnat, S., Małek, W. Insight into the evolutionary history of symbiotic genes of *Robinia pseudoacacia* rhizobia deriving from Poland and Japan (2010) *Archives of Microbiology*, 192, 341-350.

Powyższa publikacja powstała jako efekt realizacji jednego z zadań w ramach projektu "Taksonomia i filogeneza molekularna mikroorganizmów *Robinia pseudoacacia* [L.] (grochodrzew, robinia akacjowa)", finansowanego przez MNiSW (nr N303 057 32/1922). Analiza filogenetyczna sekwencji genów symbiotycznych *nodA* i *nodC* pozwoliła na ustalenie symbiotycznego pokrewieństwa izolatów z brodawek korzeniowych *R. pseudoacacia* z bakteriami reprezentującymi mikrosymbionty *Phaseolus* sp. oraz gatunkiem *Mesorhizobium amorphae*. Filogeneza genu *nifH* bakterii specyficznych dla grochodrzewu była zgodna z historią ewolucyjną genu kodującego 16S rRNA. Na drzewach filogenetycznych obu genów badane mikrosymbionty *R. pseudoacacia* tworzyły wspólną grupę z referencyjnymi bakteriami rodzaju *Mesorhizobium*. W genomie badanych bakterii zidentyfikowano gen *nodH*, kodujący sulfotransferazę, co sugeruje że bakterie te mogą produkować sulfonowane czynniki Nod niezbędne w symbiotycznych interakcjach z gospodarzem roślinnym. Mikrosymbionty grochodrzewu tworzyły efektywne układy symbiotyczne z przedstawicielami rodzaju *Amorpha* sp. oraz naturalnym gospodarzem, czyli *R. pseudoacacia*. Analiza mikroskopowa brodawek korzeniowych *R. pseudoacacia* wykazała, że są to brodawki typu niezdeteminowanego.

W ramach realizacji zadań badawczych innego projektu pt. „Pozycja taksonomiczna i filogeneza mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* oparta na charakterystyce fenotypowej, analizie sekwencji genów rdzeniowych i adaptacyjnych

bakterii”, finansowanego przez NCN (2011/03/B/NZ8/02142) powstały poniższe publikacje:

Gnat, S., Małek, W., Oleńska, E., Wdowiak-Wróbel, S., **Kalita, M.**, Rogalski, J., Wójcik, M. Multilocus sequence analysis supports the taxonomic position of *Astragalus glycyphyllos* symbionts based on DNA-DNA hybridization (2016) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1906-1912.

Gnat, S., Małek, W., Oleńska, E., Trościańczyk, A., Wdowiak-Wróbel, S., **Kalita, M.**, Wójcik, M. Insight into the genomic diversity and relationship of *Astragalus glycyphyllos* symbionts by RAPD, ERIC-PCR, and AFLP fingerprinting (2015) *Journal of Applied Genetics*, 56, 551-554.

Gnat, S., Małek, W., Oleńska, E., Wdowiak-Wróbel, S., **Kalita, M.**, Łotocka, B., Wójcik, M. Phylogeny of Symbiotic Genes and the Symbiotic Properties of Rhizobia Specific to *Astragalus glycyphyllos* L (2015) *PloS One*, 10, e0141504.

Gnat, S., Wójcik, M., Wdowiak-Wróbel, S., **Kalita, M.**, Ptaszyńska, A., Małek, W. Phenotypic characterization of *Astragalus glycyphyllos* symbionts and their phylogeny based on the 16S rDNA sequences and RFLP of 16S rRNA gene (2014) *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 105, 1033-1048.

Podsumowanie wyników opublikowanych w powyższych publikacjach:

Analiza numeryczna cech fenotypowych mikrosymbiontów *Astragalus glycyphyllos* (traganek szerokolistny) wykazała bliskie pokrewieństwo badanych szczepów z przedstawicielami rodzaju *Mesorhizobium*, przy współczynniku podobieństwa wynoszącym 75%. Bliskie relacje filogenetyczne mikrosymbiontów traganek szerokolistnego z gatunkami referencyjnymi rodzaju *Mesorhizobium* zostały potwierdzone analizą porównawczą sekwencji genu 16S rRNA. Na drzewie filogenetycznym badane izolaty utworzyły wspólną grupę z bakteriami rodzaju

Mesorhizobium, wykazując podobieństwo sekwencji 16S rDNA do tych bakterii na poziomie 95 - 99%. Analiza porównawcza sekwencji genów metabolizmu podstawowego (*atpD*, *dnaK*, *glnA*, *recA*, *rpoB*) pozwoliła na ustalenie bliskiego pokrewieństwa części badanych izolatów z bakteriami *Mesorhizobium ciceri*, natomiast druga grupa badanych szczepów była bliżej spokrewniona z bakteriami gatunków *Mesorhizobium amorphae* i *Mesorhizobium septentrionalae*. Oznaczenie stopnia podobieństwa DNA badanych izolatów traganika szerokolistnego do DNA referencyjnych szczepów rodzaju *Mesorhizobium* metodą hybrydyzacji, jednoznacznie potwierdziła przynależność badanych mikrosymbiontów do gatunków *M. ciceri* i *M. amorphae* (poziom podobieństwa DNA:DNA powyżej 70%). Analiza porównawcza sekwencji genów symbiotycznych *nodA*, *nodC* i *nifH* i skonstruowane na jej podstawie filogramy wykazały, że badane mikrosymbionty traganika szerokolistnego tworzą oddzielną linię filogenetyczną w stosunku do pozostałych bakterii rodzaju *Mesorhizobium*, co było podstawą do zaproponowania wyodrębnienia nowego symbiowaru – ‘glycyphyllae’ dla bakterii tworzących efektywne układy symbiotyczne z *Astragalus glycyphyllos*.

Poza współpracą naukową związaną z wykonywaniem zadań badawczych w ramach omówionych powyżej projektów, zaangażowany byłem w powstanie poniższych publikacji.

Marek-Kozaczuk, M., Wdowiak-Wróbel, S., **Kalita, M.**, Chernetsky, M., Deryło, K., Tchórzewski, M., Skorupska, A. Host-dependent symbiotic efficiency of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strains isolated from nodules of *Trifolium rubens* (2017) *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110, 1729-1744.

Do chwili opublikowania powyższej pracy, w literaturze naukowej nie było informacji o ryzobiach specyficznych dla *Trifolium rubens* (koniczyny długokłosowej). Analiza porównawcza sekwencji genu 16S rRNA pozwoliła na ustalenie pozycji taksonomicznej badanych izolatów z brodawek korzeniowych *T. rubens*. Wszystkie szczepy zostały sklasyfikowane w obrębie rodzaju *Rhizobium*. Wyniki analizy filogenetycznej sekwencji genów metabolizmu podstawowego (*atpD* i *recA*) wskazują na to, że część badanych szczepów należy do gatunku *Rhizobium leguminosarum* natomiast kilka izolatów tworzyło odrębne linie filogenetyczne mogące stanowić

nieopisane dotychczas gatunki. Na podstawie wyników analizy porównawczej sekwencji genu symbiotycznego *nodC* wykazano, że badane izolaty są najbardziej spokrewnione ze szczepami gatunku *Rhizobium leguminosarum* należącymi do symbiowaru 'trifolii'. W testach roślinnych badane szczepy tworzyły bardziej efektywne układy symbiotyczne z innymi gatunkami koniczyny, niż z naturalnym gospodarzem, z którego zostały wyizolowane. Wyniki te sugerują na małą specyficzność *Trifolium rubens* w wyborze partnera symbiotycznego. Brodawki *T. rubens* mogą być zasiedlane przez niespecyficzne i nieefektywne w wiązaniu azotu bakterie bytujące w ryzosferze.

Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., **Kalita, M.**, Karaś, M., Wójcik, M., Małek, W. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia isolated from root nodules of *Ononis arvensis* (2017) *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110, 1087-1103.

Powyższa praca jest pierwszym doniesieniem w literaturze naukowej dotyczącym bakterii wyizolowanych z brodawek korzeniowych wilżyny ciernistej (*Ononis arvensis*). Mikrosymbionty wilżyny ciernistej przebadano pod względem cech fenotypowych oraz zróżnicowania genetycznego metodą BOX-PCR. Analiza porównawcza sekwencji 16S rDNA wykazała przynależność badanych szczepów do dwóch rodzajów bakterii brodawkowych – *Rhizobium* i *Mesorhizobium*. W genomach badanych izolatów, w oparciu o reakcję PCR zidentyfikowano obecność genu *acdS* kodującego deaminazę ACC, co sugeruje potencjał analizowanych szczepów w promowaniu wzrostu roślin w warunkach stresowych.

Janczarek, M., **Kalita, M.**, Skorupska, A.M. New taxonomic markers for identification of *Rhizobium leguminosarum* and discrimination between closely related species (2009) *Archives of Microbiology*, 191, 207-219.

W oparciu o sekwencje genów kodujących enzymy zaangażowane z biosyntezę egzopolisacharydów w szczepach gatunku *Rhizobium leguminosarum* opracowano metodę, opartą na reakcji PCR, służącą do identyfikacji blisko spokrewnionych gatunków *R. leguminosarum*, *R. gallicum* i *R. etli*. Zastosowanie odpowiedniej kombinacji starterów w reakcji PCR pozwala również na różnicowanie szczepów

w obrębie gatunku *R. leguminosarum* należących do różnych symbiowarów. Stosując tę metodę można zidentyfikować szczepy gatunku *R. leguminosarum* w populacji izolatów z gleby, czy brodawek korzeniowych.

W 2010 roku byłem jednym z wykonawców ekspertyzy na zlecenie firmy Weber Shandwick z siedzibą oddziału w Warszawie. W ramach tej ekspertyzy przeprowadzono badania mikrobiologiczne polskich banknotów i monet. Wyniki tych analiz były podstawą publikacji:

Kalita, M., Palusińska-Szysz, M., Turska-Szewczuk, A., Wdowiak-Wróbel, S., Urbanik-Sypniewska, T. Isolation of cultivable microorganisms from polish notes and coins (2013) *Polish Journal of Microbiology*, 62, 281-286.

Bakterie wyizolowane z polskich banknotów i monet zostały poddane analizom fenotypowym poprzez zbadanie cech fizjologicznych i biochemicznych. Ponadto przeprowadzono analizę porównawczą sekwencji genu 16S rRNA. Wśród wyizolowanych szczepów dominowały bakterie rodzaju *Enterococcus* i *Staphylococcus*. W kilku przypadkach wykazano obecność bakterii gatunków: *Escherichia coli* i *Pseudomonas stutzeri*. Poza bakteriami, w badanym materiale zidentyfikowano grzyby rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* oraz drożdżaka z rodzaju *Candida*. Identyfikację grzybów przeprowadzono w oparciu o cechy morfologiczne i właściwości biochemiczne.

W 2010 roku opublikowana została praca:

Kalita, M., Małek, W. *Genista tinctoria* microsymbionts from Poland are new members of *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum* (2010) *Systematic and Applied Microbiology*, 33, 252-25,

w której zaprezentowano część wyników badań przeprowadzonych jeszcze w trakcie wykonywania doświadczeń do mojej pracy doktorskiej. Analiza porównawcza sekwencji genu 16S rRNA izolatów z brodawek korzeniowych janowca barwierskiego (*Genista tinctoria*) rosnącego w Polsce, Anglii i na Ukrainie wykazała ich przynależność do rodzaju *Bradyrhizobium*. Bliskie pokrewieństwo badanych szczepów z przedstawicielami gatunku *Bradyrhizobium japonicum* zostało wykazane poprzez analizę filogenetyczną genów metabolizmu podstawowego *atpD* i *recA*. Oznaczenie

stopnia podobieństwa badanych izolatów janowca barwierskiego do referencyjnych szczepów rodzaju *Bradyrhizobium* metodą hybrydyzacji DNA-DNA jednoznacznie potwierdziła przynależność badanych mikrosymbiontów pochodzących z Polski do gatunku *B. japonicum* (poziom podobieństwa DNA-DNA powyżej 70%). Pozycja gatunkowa szczepów pochodzących z Anglii i Ukrainy była niejednoznaczna, choć najwyższy stopień podobieństwa DNA-DNA wykazywały one, podobnie jak polskie izolaty, do szczepów gatunku *B. japonicum*.

Omówione powyżej publikacje, powstałe we współpracy z naukowcami z Katedry Genetyki i Mikrobiologii, były podstawą kilku wniosków o nagrodę zespołową J.M. Rektora UMCS. Do przyznanych nagród należą:

- 2010 – Nagroda zespołowa I stopnia J. M. Rektora UMCS za osiągnięcia naukowe
- 2011 – Nagroda zespołowa I stopnia J. M. Rektora UMCS za osiągnięcia naukowe
- 2016 – Nagroda zespołowa III stopnia J. M. Rektora UMCS za osiągnięcia naukowe
- 2019 – Nagroda zespołowa III stopnia J.M. Rektora UMCS za pozyskanie zewnętrznych środków finansowych.



(podpis wnioskodawcy)