

Warszawa, dn. 18 sierpnia 2020 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Spalik
Instytut Biologii Ewolucyjnej,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel. 22 552 66 91, e-mail: spalik@biol.uw.edu.pl

Rada Naukowa Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Recenzja osiągnięć naukowo-badawczych oraz działalności
dydaktycznej i organizacyjnej dr. Michała Kality**
w związku z wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Ocena osiągnięcia naukowego

Dr Michał Kalita wskazał jako swoje osiągnięcie naukowe cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, które opatrzył tytułem „Filogeneza molekularna bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe wybranych gatunków roślin plemienia Genisteae z rodziny Fabaceae”. Artykuły ukazały się w czasopiśmie znajdujących się w stosownym wykazie MNiSW, a zatem spełniają formalny wymóg art. 219 ust. 1 pkt 2b Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 30 sierpnia 2018 r. Wszystkie publikacje są zbiorowe, ale dr Kalita jest w nich wskazany jako autor korespondencyjny, a w czterech jest także na pierwszym miejscu wśród autorów, co świadczy o jego dominującym udziale w ich powstaniu. Potwierdzają to zgodne oświadczenia współautorów, pozwalające jednoznacznie ocenić indywidualny wkład habilitanta w poszczególne publikacje, czego wymaga art. 219 ust. 2 Ustawy.

Pierwsza publikacja dotyczyła molekularnej filogenezy szczepów *Bradyrhizobium* wyizolowanych z brodawek korzeniowych czterech przedstawicieli roślin motylkowatych: *Genista germanica*, *G. tinctoria*, *Cytisus ratisbonensis* i *C. scoparius* występujących w Polsce. Ukazała się w *Systematic and Applied Microbiology*, który to periodyk znajduje się według Scimago w 2. kwartylu w kategorii *Microbiology*, ale w 1. – w kategoriach *Applied Microbiology and Biotechnology* oraz *Ecology, Evolution, Behaviour and Systematics*. Jest to tradycyjne czasopismo specjalistyczne, stosujące kryteria selekcji artykułów nie tylko pod kątem poprawności merytorycznej i technicznej (jak wiele współczesnych czasopism Open Access), ale także potencjalnego znaczenia dla dyscypliny.

Autorzy przeanalizowali zmienność siedmiu loci: 16S rRNA, *atpD*, *glnII*, *recA*, *nodC*, *nodZ* oraz *nifH*. Wykazali, że wszystkie wyizolowane szczepy miesz-

czą się w zakresie zmienności *Bradyrhizobium*, choć poszczególne geny wskazywały na nieco odmienne pokrewieństwo. Np. 16S rRNA oraz połączone dane *atpD*, *glnII* i *recA* sugerowały pokrewieństwo z *B. japonicum*, natomiast *nodZ* – z *B. canariense*. W dyskusji autorzy omawiają problemy z definicją gatunków *Bradyrhizobium*, dyskutują zmienność i rozdzielczość filogenetyczną poszczególnych markerów, również w kontekście ich grup funkcjonalnych. Ta publikacja niewątpliwie przyczynia się do lepszego poznania zmienności genetycznej i filogenetycznej bakteryjnych symbiontów roślin motylkowatych, jednak pod względem metod filogenetycznych pozostawia niedosyt. Sekwencje 16S rDNA zostały przeanalizowane jedynie z wykorzystaniem arbitralnie przyjętego 2-parametrycznego modelu Kimury oraz algorytmu łączenia sąsiadów (NJ), a nie – tak jak pozostałe geny, czyli za pomocą metody największej wiarygodności z wykorzystaniem modelu podstawień wybranego przez jModelTest. Ta druga ścieżka analizy jest zdecydowanie lepsza, ponieważ metoda łączenia sąsiadów – jak każda metoda klasteryzacji – jest podatna na wpadnięcie w optimum lokalne. Poszczególne markery były łączone (konkatenowane) w grupy pod względem funkcjonalnym – natomiast lepszym rozwiązaniem byłoby sprawdzenie ich pod względem spójności sygnału filogenetycznego. Może jest on niesprzeczny i można było połączyć wszystkie znaczniki? Zwiększyłyby to rozdzielczość filogenetyczną analizy. Problematiczne są też analizy genów związanych z symbiozą (*nodC*, *nodZ* i *nifH*), ponieważ zostały one przeprowadzone bez grupy zewnętrznej, a tym samym zakorzenienie jest arbitralne. Te niedostatki utrudniają interpretację wyników. Powyższe wątpliwości nie podważają jednak głównego wniosku tego artykułu, jakim jest stwierdzenie, że cztery występujące w Polsce gatunki motylkowatych z plemienia Genistae są zasiedlane przez blisko spokrewnione szczepy *Bradyrhizobium*.

Druga publikacja z cyklu dotyczyła przydatności filogenetycznej genu *ftsA* dla rozwiązania zależności filogenetycznych *Bradyrhizobium*. Miała ona formę krótkiego doniesienia i ukazała się w *Journal of Applied Genetics* – periodyku wydawanym przez Springer, ale z polską redakcją, plasującym się w 3. kwartylu rankingu Scimago w kategorii „Genetics”. Autorzy uzyskali osiem nowych sekwencji tego genu – co nie jest dużą liczbą – i dokonali ich analizy filogenetycznej z wykorzystaniem 61 sekwencji pozyskanych z GenBanku. Uzyskane drzewo filogenetyczne porównali z drzewami uzyskanymi na podstawie markerów *glnII* oraz *recA*, konkludując, że są one zbieżne. Ta konkluzja nie była jednak wsparta żadnymi formalnymi analizami – ani analizą spójności sygnału filogenetycznego (np. testem ILD), ani porównaniem topologii drzew (np. za pomocą *compat.py* Kauffa i Lutzoniego). Interesującym aspektem tej pracy była analiza sekwencji pod kątem znalezienia podstawień diagnostycznych gatunkowo – autorzy znaleźli substytucje, które mogą posłużyć do identyfikacji *B. japonicum*.

Artykuł, który ukazał się w *Annals of Microbiology* (3. kwartył kategorii „Applied Microbiology and Biotechnology”) dotyczył różnorodności genetycznej ryzobiów zasiedlających brodawki korzeniowe szczodrzyka czerniejącego (*Lembotropis nigricans*). Autorzy wyizolowali 33 szczepy bakterii brodawkowych i scharakteryzowali je pod względem fenotypu, uwzględniając zestaw cech mor-

fologicznych, fizjologicznych i metabolicznych. Uzyskali także sekwencje pięciu markerów (geny 16S rRNA, *atpD*, *dnaK*, *gyrB* i *rpoB*) oraz przeprowadzili analizę fingerprintingu z wykorzystaniem metod BOX-PCR oraz AFLP. Obie te metody generują na żelu wzorzec prążków, odpowiadających odcinkom DNA o określonej długości. Obecność lub brak prążka jest w analizie numerycznej kodowana jako cecha binarna (dwustanowa).

Pod względem fenotypowym, na dendrogramie uzyskanym metodą UPGMA, symbionty szczodrzyka tworzyły jedną gałąź, której grupą siostrzaną były szczepy referencyjne dla pięciu gatunków *Bradyrhizobium*. Wykazywały one jednak pewne zróżnicowanie, np. pod względem zdolności do przyswajania dwucukrów lub wykorzystywania L-lizyny jako źródła azotu albo oporności na poszczególne antybiotyki, co jest bardzo ciekawym spostrzeżeniem.

Niestety, z przedstawionych analiz BOX-PCR i AFLP niewiele wynika. Autorzy nie uwzględnili w analizach grupy zewnętrznej, a zatem zakorzenienie drzew wynika jedynie z algorytmu UPGMA, co może być zawodne. Autorzy nie porównali nawet uzyskanych dendrogramów, aby stwierdzić, czy relacje pokrewieństwa są podobne (w części tak, ale w części – nie) oraz czy odzwierciedlają podobieństwo fenotypowe (raczej nie). Zaskakuje, że w analizie BOX-PCR nierozróżnialne okazały się szczepy o sąsiednich numerach: na ryc. 2a identyczne parami są szczepy 11 i 12, 20 i 21, 22 i 23 oraz 29 i 30. Sugeruje to, że są to szczepy wyizolowane z tego samego materiału roślinnego, czyli w zasadzie duplikaty, co możliwe, ponieważ próbkowano 10 roślin, a wyizolowano 33 szczepy. Informacji o tym, które szczepy pochodziły z tej samej rośliny, nie ma jednak w tekście ani w materiałach uzupełniających.

Analizy filogenetyczne z wykorzystaniem 16S rDNA zostały prawidłowo przeprowadzone (tym razem z wykorzystaniem metody największej wiarygodności), a ich wyniki sugerują, że wyizolowane szczepy reprezentują *Bradyrhizobium japonicum* – choć należy zauważyć, że gatunek ten, reprezentowany w macierzy przez dwie sekwencje, nie był monofiletyczny, a wewnętrzne wsparcia gałęzi (*bootstrap*) były niskie. Na takie pokrewieństwo wskazują jednak analizy połączonych genów *atpD*, *dnaK*, *gyrB* i *rpoB*. Monofiletyzm symbiontów *L. nigricans* był wsparty wartością *bootstrap* 100%, a siostrzana relacja z *B. japonicum* – wartością 93%.

Autorzy konkludują, że *L. nigricans*, który nie był wcześniej badany pod kątem ryzobiów, jest zasiedlany przez *B. japonicum* – należy jednak zauważyć, że pobrano próby z jednej zaledwie populacji tego gatunku. Niemniej jednak, to ograniczenie może być także zaletą tej pracy, pokazuje bowiem zróżnicowanie fenotypowe i genotypowe ryzobiów właśnie w bardzo małej skali przestrzennej, w obrębie jednej, niewielkiej populacji szczodrzyka.

Według opisanego powyżej schematu skonstruowana jest także kolejna publikacja w *Systematic and Applied Microbiology*, poświęcona 18 nowym szczepom ryzobiów wyizolowanych z brodawek janowca ciernistego (*Genista germanica*) – gatunku, który badano już w pierwszej pracy cyklu. Autorzy zsekwencjonowali badane już uprzednio markery (16S rRNA, *dnaK*, *ftsA*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *nodC*, *nodZ*) oraz przeprowadzili analizę BOX-PCR. Tym razem wykryli przedstawicieli dwóch rodzajów: *Bradyrhizobium* oraz *Rhizobium*, a w tym

ostatnim – przedstawicieli dwóch kładów. Zróżnicowanie na te trzy grupy wykazały zarówno analizy fenetyczne danych z BOX-PCR, jak i analizy filogenetyczne poszczególnych genów oraz połączonych genów *dnaK*, *glnIII*, *gyrB*, *recA* i *rpoB*. Nie uzasadniono, dlaczego połączono w jedną macierz tylko geny metabolizmu podstawowego, a nie – wszystkie markery. W analizach filogenetycznych nie uwzględniono grupy zewnętrznej. W tym wypadku jednak nie było to konieczne, jeśli wcześniejsze badania wykazały, że rodzaje *Bradyrhizobium* i *Rhizobium* są monofiletyczne – można wtedy drzewo zakorzenić na łączącej je gałęzi, jak to zrobiono w wypadku drzewa rDNA (ryc. 2 w omawianej pracy) oraz połączonych sekwencji genów metabolizmu podstawowego (ryc. 3). Jednak drzewo *nodC* zakorzeniono wewnątrz *Rhizobium* (ryc. 4), a drzewo *nodZ* – wewnątrz *Bradyrhizobium* (ryc. 5), czyniąc te rodzaje parafiletycznymi i zniekształcając zależności filogenetyczne między nimi. Zatem interesujący wniosek autorów o transferze horyzontalnym genów nodulacji z *Bradyrhizobium* do *Rhizobium* może być nieuprawniony i wynikać jedynie ze złego zakorzenienia drzewa. Może, ale nie musi – w tym celu należałoby zrobić szerszą analizę filogenetyczną z lepszą reprezentacją *Rhizobium* i właściwie dobraną grupą zewnętrzną.

W artykule zamykającym cykl, opublikowanym w *Systematic and Applied Microbiology*, autorzy zajęli się ryzobiami kolejnego gatunku – szczodrzeńca ruskiego (*Chamaecytisus ruthenicus*), osiągającego w Polsce zachodnią granicę swojego zasięgu geograficznego. Wyizolowali 16 szczepów bakteryjnych, których zmienność zbadali metodą ERIC-PCR oraz sekwencjonując geny 16S rRNA, *atpD*, *gyrB*, *nodC*, *nodZ*, *nifD* i *nifH*. Sekwencje analizowali za pomocą metody największej wiarygodności. Drzewo uzyskane metodą UPGMA z danych ERIC-PCR (opisanych na ryc. 1 jako BOX-PCR) pokazało zróżnicowanie na dwa kłady, zidentyfikowane w analizach filogenetycznych jako reprezentujące rodzaje *Bradyrhizobium* oraz *Phyllobacterium*. Obecność bakterii z tych rodzajów wcześniej już stwierdzono w brodawkach korzeniowych szczodrzeńca ruskiego z południowego Uralu. Autorzy argumentowali, że na podstawie poziomu zmienności genów metabolizmu podstawowego można uznać dwa wykryte warianty *Bradyrhizobium* za nowe gatunki, jednak formalnie ich nie opisali. Jest to niewykluczone, niemniej jednak słabo uzasadnione, ponieważ przy definiowaniu gatunków należy porównać zmienność wewnątrz- i międzygatunkową, a w tej pracy dokonano tego w umiarkowanym zakresie. To samo zastrzeżenie dotyczy nowego wariantu *Phyllobacterium* opisanego w tej pracy. W wypadku tej bakterii, autorzy nie uzyskali produktu PCR genów odpowiedzialnych za nodulację, nie stwierdzili też, aby ten szczep stymulował wytwarzanie brodawek u szczodrzeńca ruskiego, co sugeruje, że jest on niesymbiotycznym endofitem. Także w tej pracy autorzy nie ustrzegli się błędów analitycznych – w analizie największej wiarygodności połączonych macierzy *nodC*, *nodZ*, *nifD* i *nifH* nie uwzględnili grupy zewnętrznej, a zatem drzewo na ryc. 4 jest zakorzenione arbitralnie.

Podsumowując ocenę cyklu publikacji wskazanych jako osiągnięcie, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2b Ustawy, należy zauważyć ich opisowy raczej niż problemowy charakter oraz pewien schematyzm – kolejne prace dotyczą ryzobii kolejnych gatunków motylkowatych, analizowanych za pomocą

zbliżonego zestawu metod. Niepokoją błędy metodyczne w analizach filogenetycznych, zwłaszcza że tytuł cyklu odwołuje się do filogenezy molekularnej. (Notabene, choć błędy te mogą irytować czytelników bardziej biegłych w filogenetyce, to nie wpływają na zasadnicze wnioski publikacji.) Z drugiej jednak strony trzeba podkreślić, że stan poznania różnorodności filogenetycznej bakterii, w tym ryzobiów, jest wysoce niezadowolający – jesteśmy wciąż na etapie tzw. taksonomii alfa, czyli poznawania i opisywania tej różnorodności, a dopiero następnym etapem będzie podejście problemowe. Dlatego takie systematyczne i rutynowe (w dobrym znaczeniu tego słowa) badania mają dużą wartość poznawczą, zwłaszcza w kontekście uporządkowania systemu klasyfikacji bakterii, w tym definicji gatunku bakteryjnego. Z oczywistych względów (brak rozmnażania płciowego oraz łatwy transfer horyzontalny genów) klasyczna Mayrowska definicja gatunku nie znajduje zastosowania w systematyce bakterii, dlatego proponowane są alternatywne, np. bazujące na odległości genetycznej między taksonami – i ten wątek regularnie pojawia się w pracach habilitanta. Dlatego, mimo wyrażonych powyżej zastrzeżeń, uważam, że przedstawiony przez habilitanta cykl publikacji stanowi znaczny wkład w rozwój dyscypliny nauk biologicznych, a tym samym spełnia wymóg art. 219 ust. 1 pkt 2.

Ocena aktywności naukowej

Oprócz publikacji składających się na cykl wskazany jako osiągnięcie naukowe, dr Michał Kalita jest współautorem 20 artykułów naukowych, w tym 14, które ukazały się po doktoracie. Wśród tych ostatnich, 13 opublikowanych zostało w czasopismach indeksowanych w Web of Science. Z wyłączeniem PLOS ONE, są to czasopisma o punktacji poniżej 30 na liście MNiSW (najczęściej 15-20 pkt.). Udział procentowy habilitanta w ich powstaniu najczęściej wynosił 10% i zwykle obejmował analizy bioinformatyczne, w tym filogenetyczne, ale także opracowanie części tekstu. Poza nielicznymi wyjątkami, publikacje te dotyczyły bardzo zbliżonej tematyki do osiągnięcia naukowego habilitanta – charakterystyki ryzobiów roślin motylkowatych z wykorzystaniem markerów molekularnych. Liczba cytowań prac habilitanta z wyłączeniem autocytowań wynosi 109 wg Web of Science i 119 wg Scopus, co nie jest wartością wysoką, ale satysfakcjonującą, biorąc pod uwagę etap rozwoju naukowego oraz tematykę badawczą.

Habilitant jest współautorem 31 wystąpień konferencyjnych, w tym 23 po uzyskaniu stopnia doktora. Jedenaście z nich to wystąpienia (postery) na konferencjach zagranicznych. Dr Kalita jedynie raz prezentował swoje badania ustnie – i miało to miejsce przed doktoratem, na lokalnej konferencji w Lublinie. Nie ma zatem w swoim dorobku wykładów na zaproszenie ani wykładów plenarnych. Nie brał też udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji. Przez kilka lat był sekretarzem redakcji *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sectio C – Biologia*, czasopisma wydawanego przez macierzystą uczelnię. Wykazał siedem recenzji dla czasopism naukowych, w tym trzy – dla polskiego periodyku. Nie był zapraszany do zespołów eksperckich lub konkursowych. Rozpoznawalność dr. Michała Kality w środowisku naukowych jest zatem dość niska.

Dobrze przedstawia się aktywność habilitanta w zdobywaniu grantów – był on laureatem konkursu Iuventus Plus, grantu NCN Miniatura (trzeba jednak zaznaczyć, że konkurs ten jest mniej wymagający niż np. OPUS albo SONATA) oraz uzyskał finansowanie wspólnego projektu w ramach współpracy Polska-RPA. W ramach tego ostatniego grantu odbył tygodniową wizytę badawczą na Uniwersytecie w Pretorii. Przed uzyskaniem odbył także miesięczny staż w Zakładzie Biologii Molekularnej Roślin Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Tym samym spełnił ustawowy warunek legitymowania się aktywnością naukową w więcej niż jednym uniwersytecie lub instytucji badawczej, a współpraca z prof. Teresą Coutinho z Uniwersytetu w Pretorii (RPA) zaowocowała jedną z publikacji włączonych do cyklu stanowiącego osiągnięcie badawcze habilitanta.

Podsumowując aktywność naukową habilitanta, należy stwierdzić, że pod względem publikacyjnym jest ona dobra, ale nie przełożyło się to na rozpoznawalność dr. Kality w środowisku naukowym, o czym świadczy brak wykładów na zaproszenie, brak uczestnictwa w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji, panelach eksperckich i konkursowych oraz umiarkowana liczba zaproszeń do recenzowania manuskryptów. Habilitant wykazuje się aktywnością w pozyskiwaniu środków na swoje badania, spełnia też ustawowy wymóg aktywności badawczej w więcej niż jednej instytucji. Tym samym, mimo wyrażonych zastrzeżeń, pozytywnie oceniam tę składową aktywność naukowej habilitanta.

Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej habilitanta

Habilitant jest nauczycielem akademickim zatrudnionym na stanowisku badawczo-dydaktycznym i od początku swojej pracy zawodowej prowadził różnorodne ćwiczenia laboratoryjne, m.in. z genetyki i mikrobiologii. Jest współkoordynatorem kursów bioinformatycznych na różnych kierunkach studiów II stopnia. Był opiekunem 20 prac licencjackich oraz 17 magisterskich; jest także promotorem pomocniczym jednej doktorantki. Angażował się w aktywność organów kolegialnych wydziału i instytutu w macierzystej jednostce. Jest koordynatorem programu Erasmus+ na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS, prowadzi także angielskojęzyczne zajęcia dla studentów przyjeżdżających w ramach tej wymiany. Działalność dydaktyczną i organizacyjną habilitanta można zatem ocenić jako satysfakcjonującą.

Konkluzja

Podsumowując, stwierdzam, że osiągnięcie naukowe oraz pozostała aktywność naukowa, dydaktyczna, organizacyjna oraz popularyzująca naukę dr. Michała Kality spełniają wymogi stawiane w Ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 30 sierpnia 2018 r. W związku z tym pozytywnie opiniuję wniosek o nadanie dr. Michałowi Kalicie stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych.


prof. dr hab. Krzysztof Spalik