

Lublin, 07.09.2023

prof. dr hab. Magdalena Frąć
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Suśniak

pt. „Wpływ zmian w składzie błony zewnętrznej *Agrobacterium tumefaciens* na proces infekcji roślin na modelu pomidora”

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Suśniak została wykonana w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, pod kierunkiem promotora dr hab. Iwony Komanieckiej, prof. UMCS. Recenzja została wykonana na podstawie umowy z Uniwersytetem Marii Curie-Skłodowskiej podpisanej przez prof. dr hab. Annę Jarosz-Wilkołazką – Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych UMCS.

1. Formalna ocena rozprawy – struktura dysertacji

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Suśniak liczy 119 stron, w tym 31 rycin, 8 tabel oraz 110 pozycji literaturowych. Struktura dysertacji jest typowa dla doktorskich prac eksperymentalnych, a tytuł rozprawy odpowiada treści pracy i został poprawnie sformułowany. Rozprawa doktorska obejmuje siedem głównych rozdziałów: Wstęp (I), Cel pracy (II), Materiały i metody (III), Wyniki (IV), Dyskusja (V), Wnioski (VI) i Bibliografia (VII). Wymienione powyżej rozdziały zawierają również szereg podrozdziałów. Pierwsze trzy rozdziały zostały przedstawione na 51 stronach i stanowią elementy pracy wprowadzające czytelnika do poruszanej problematyki podjętej w dysertacji oraz prezentują metodologię przeprowadzonych badań, ułatwiając śledzenie i analizę wyników badań, które dotyczą zmian składu błony zewnętrznej *A. tumefaciens*, z uwzględnieniem wielu technik badawczych, co przyczynia się do pogłębienia wiedzy z zakresu roli błony zewnętrznej tych bakterii w procesie infekcji roślin. W części dotyczącej celu pracy ujęto również krótkie uzasadnienie badań z podkreśleniem istotnych luk w wiedzy dotyczącej zmian struktury cząsteczek lipidu A, występujących w błonie zewnętrznej agrobakterii, a także znaczenia tych zmian dla procesu

infekcji rośliny oraz ich migracji wewnątrz organizmu gospodarza. Te części dysertacji zostały opatrzone 14 rycinami, które bardzo dobrze obrazują zagadnienia teoretyczne, wokół których skoncentrowana jest praca, co ułatwia czytelnikowi percepcję i jasno wprowadza w tematykę podjętych badań naukowych. W tej części rozprawy zabrakło mi sformułowania hipotez badawczych, które Doktoranta weryfikowała w ramach prowadzonych badań, a także nie znalazłam informacji na temat przeprowadzonych analiz statystycznych, które stanowią podstawę wnioskowania w badaniach naukowych. Dlatego w tym miejscu chciałabym prosić Doktorantkę o odniesienie się do tych uwag podczas obrony rozprawy doktorskiej. Kolejną część rozprawy doktorskiej stanowią rozdziały **Wyniki, Dyskuja i Wnioski**, przedstawione na 51 stronach dysertacji. Rozdział dotyczący omówienia wyników składa się z 5 podrozdziałów, które korespondują z zastosowanymi przez Doktorantkę metodami badawczymi. Dyskusja uzyskanych wyników na tle aktualnego stanu wiedzy została przedstawiona tylko na 4,5 stronach, ale stanowi ona dobre podsumowanie uzyskanych rezultatów i ich konfrontację w odniesieniu do danych literaturowych. Jednakże w rozdziale tym zabrakło mi dyskusji w zakresie odniesienia do perspektyw na przyszłość, a także potencjalnych możliwości praktycznych zastosowań uzyskanych rezultatów badań. W związku z tym bardzo proszę Doktorantkę o przedstawienie tych zagadnień podczas obrony rozprawy doktorskiej. W rozdziale **Wnioski** Doktorantka sformułowała 9 trafnych i znajdujących potwierdzenie w uzyskanych wynikach badań wniosków. **Bibliografia** liczy 110 pozycji literatury, przy czym referencje, na których opierała się Doktorantka, stanowią w około 85% publikacje z ostatnich 20 lat, a około 53% stanowią artykuły naukowe z ostatnich 10 lat. Oznacza to, że podjęta tematyka rozprawy doktorskiej wpisuje się w najnowsze i aktualne trendy badawcze. Przedstawiona bibliografia, potwierdza również, że Doktorantka przeprowadziła gruntowny przegląd literatury, obejmujący kluczowe aspekty badań poruszanych w dysertacji. Następnie Autorka zamieściła spis rycin, spis tabel oraz aneks, w którym został przedstawiony życiorys naukowy i osiągnięcia naukowe Doktorantki. Należy też dodać, że na samym początku rozprawy został umieszczony wykaz skrótów, a także streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, które są spójne i zawierają cel podjętych badań, syntetyczne podsumowanie uzyskanych rezultatów oraz słowa kluczowe związane z tematyką podjętych badań. **Pozytywnie oceniam przygotowanie rozprawy doktorskiej pod względem formalnym.**

2. Ocena wyboru tematyki badawczej rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Katarzyny Suśniak obejmuje badania zmian składu i architektury błony zewnętrznej bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, które należą do mikroorganizmów wywołujących powstawanie guzowatych narośli w miejscu zranienia rośliny, w celu określenia roli tych struktur w procesie infekcji i zasiedlania rośliny przez te mikroorganizmy.

Agrobacterium tumefaciens wnika do wnętrza rośliny przez uszkodzone tkanki, wprowadzając do komórek gospodarza fragment własnego DNA i w efekcie wbudowując go do DNA rośliny, prowadzi do jej transformacji genetycznej. W wyniku zmiany ekspresji genów w komórce roślinnej następuje niekontrolowany rozrost kalusa, co prowadzi do powstania guzowatej narośli. Ponadto, zainfekowane komórki roślinne zaczynają wytwarzać pochodne aminokwasów i ketokwasów, które są metabolizowane wyłącznie przez *A. tumefaciens*, a nie są wykorzystywane przez inne mikroorganizmy, co sprawia, że agrobakterie tworzą dla siebie mikronisze, w których następuje hamowanie rozwoju innych mikrobów, dając przewagę fitopatogenom do adaptacji w środowisku. Niekontrolowana proliferacja komórek i rozrost guza zbudowanego z tkanki kalusa powoduje zmniejszenie efektywności przewodzenia wody i składników pokarmowych, co prowadzi do zaburzeń wzrostu rośliny i obniżenia jej plonowania. Biorąc pod uwagę najnowocześniejsze badania bioróżnorodności mikrobiomu, uprawa pomidora na glebach zainfekowanych fitopatogenem *A. tumefaciens* wiąże się ze zmianami struktury mikrobioty endofitycznej i ryzosferowej. Jednakże niewiele jest danych potwierdzających te założenia, dlatego też badania ukierunkowane na rozpoznanie struktury mikrobiomu w wyniku infekcji tym fitopatogenem są zasadne.

W związku z tym, że zdolność do przetrwania w glebie oraz infekcji roślin przez patogeny jest ściśle związana z elastycznością, składem i organizacją przestrzenną błon tych mikroorganizmów, badania ukierunkowane na tę tematykę są uzasadnione. W przypadku bakterii Gram-ujemnych, do których należy *A. tumefaciens*, istotne znaczenie w procesie infekcji ma błona zewnętrzna i wchodzące w jej skład fosfolipidy, od których w znacznym stopniu zależy zjadliwość tych bakterii. Pomimo dostępnych badań literaturowych z zakresu funkcji poszczególnych genów regionu *acpXL-msbB*, odpowiedzialnego za biosyntezę i transfer kwasu tłuszczowego o bardzo długim łańcuchu do lipidu A, dotychczas nie zbadano jak inaktywacja genów kodujących tę syntezę wpłynie na zdolności infekcyjne *A. tumefaciens*. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę badań skoncentrowanych na wyjaśnieniu tych zależności uważam za zasadne.

Z powyższych powodów tematyka badawcza, obejmująca badania zmian składu i struktury błony zewnętrznej *A. tumefaciens*, jako czynników wpływających na proces infekcji rośliny oraz analiza zmian w mikrobiomie pomidora po zakażeniu tym bakteryjnym fitopatogenem, podejmuje bardzo ważne zagadnienia dostarczające nowej wiedzy i wychodzące naprzeciw problemom ochrony roślin. Dlatego recenzowana rozprawa doktorska przedstawia aktualną i ciekawą tematykę badawczą, z punktu widzenia badań podstawowych, dając nadzieje na przyszłą kontynuację w ramach bardziej praktycznych zastosowań użytkowych.

Tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinę nauki biologiczne, a podjęte badania są celowe i w pełni uzasadnione w kontekście oceny zagrożeń powodowanych przez fitopatogeny. Pozytywnie oceniam wybór podjętej tematyki badawczej.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Pierwszym rozdziałem rozprawy jest **Wstęp**, w którym Doktorantka przedstawiła ogólną charakterystykę *Agrobacterium tumefaciens*, z uwzględnieniem systematyki, znaczenia tej bakterii jako fitopatogenu, a także odniosła się do literatury traktującej o wpływie infekcji *A. tumefaciens* na mikrobiom rośliny, poruszając niezwykle istotne zagadnienia interakcji roślin i mikroorganizmów. Dodatkowo w tej części pracy przedstawiona została budowa błony zewnętrznej *A. tumefaciens*, ze szczególnym uwzględnieniem lipidów błonowych i ich funkcji w procesie infekcji rośliny, a także omówiono organizację konserwatywnego regionu w genomie tych bakterii, który odgrywa istotną rolę w procesie biosyntezy i transferze kwasów tłuszczowych. Ostatnia część wstępu porusza zagadnienia dotyczące metod spektroskopowych wykorzystywanych w obrazowaniu tkanek roślinnych. Rozdział ten napisany jest poprawnie pod względem merytorycznym i poparty stosowną bibliografią, co świadczy o znajomości przez Doktorantkę tematyki badawczej, jednakże zawiera drobne błędy językowe i stylistyczne. W mojej ocenie czwarty rozdział wstępu, omawiający wstępną charakterystykę otrzymanych mutantów i komplementantów, powinien zostać umieszczony w części metodycznej rozprawy. Ponadto, biorąc pod uwagę zaproponowaną strukturę pracy, zabrakło mi w tej części omówienia metod sekwencjonowania następnej generacji. W tym miejscu chciałabym prosić Doktorantkę o uzupełnienie tych informacji podczas obrony rozprawy doktorskiej, ponieważ w tekście dysertacji Doktorantka pominęła to zagadnienie.

Kolejną część rozprawy doktorskiej stanowi przedstawienie celu pracy, w którym Doktorantka krótko nakreśliła uzasadnienie podjętych badań, przedstawiła cel główny oraz cel uzupełniający przeprowadzonych badań. Jednakże zabrakło mi ujęcia w tym miejscu jasno sformułowanej hipotezy badawczej dotyczącej podjętych badań, co zasygnalizowałam już w części dotyczącej formalnej analizy rozprawy doktorskiej.

Kolejny rozdział rozprawy **Materiały i metody** omawia zastosowane w badaniach szczepy bakteryjne, podłoża hodowlane, odczynniki, a także prezentuje zastosowane w badaniach metody. Praca pod względem metodycznym została wykonana prawidłowo. Zastosowana metodyka badań świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę szerokiego warsztatu badawczego, pomimo tego, że nie wszystkie prace badawcze zostały samodzielnie przeprowadzone przez Doktorantkę. Doktorantka w czytelny i jasny sposób przygotowała opisy metodyczne, dotyczące zastosowanych metod laboratoryjnych, doświadczenia szklarniowego na siewkach pomidora oraz podstawowej charakterystyki wykorzystanej metodologii, w tym spektrometrii mas, analizy plazmidowego DNA, spektroskopii, izolacji DNA, analizy kwasów tłuszczowych. Należy podkreślić, że eksperymenty wykonane zostały prawidłowo, a metody badawcze zostały dobrane właściwie, umożliwiając zrealizowanie podjętego celu rozprawy doktorskiej. Doktorantka opanowała szereg metod wykorzystywanych w obszarze dyscypliny nauki biologiczne. Jednakże, nasuwają mi się następujące uwagi i pytania do części metodycznej: a) w części metodycznej z wyjątkiem odniesienia do metody Eckhardta, praktycznie brakuje odniesienia do literatury, stąd pytania: czy były to metody autorskie Doktorantki czy literaturowe, czy zastosowane startery (str. 50) zostały zaprojektowane samodzielnie czy są starterami pochodzącymi z literatury – proszę o wyjaśnienie oraz/lub uzupełnienie odpowiednich referencji podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej oraz przyszłej publikacji wyników badań; b) w rozdziale 2.1.3. zapisano, że usługę sekwencjonowania i wstępnej analizy danych zlecono firmie Novogene – rozumiem, że były to badania służące określeniu składu mikrobiomu pomidora, a więc związane z realizacją celu uzupełniającego rozprawy doktorskiej, stąd konieczne jest rozbudowanie opisu tej części badań – bardzo proszę o wyjaśnienie jaka metoda sekwencjonowania została zastosowana i na jakiej platformie, jakie były poszczególne etapy w zastosowanej metodzie, w jaki sposób przygotowano amplikony, jak je oczyszczano; czy przygotowano biblioteki do sekwencjonowania i w jaki sposób je przygotowano – bardzo proszę odnieść się do tych zagadnień podczas obrony rozprawy doktorskiej; c) w

pracy przedstawiono tylko pobieżną charakterystykę narzędzi bioinformatycznych, która zupełnie nie uwzględnia zagadnień związanych z bioinformatyczną analizą wyników sekwencjonowania – bardzo proszę o uzupełnienie informacji o wykorzystanych narzędziach bioinformatycznych i ścieżkach analitycznych sekwencjonowania amplikonów podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej oraz proszę o uwzględnienie tych informacji podczas przyszłego publikowania uzyskanych rezultatów.

Rozdział **Wyniki** zawiera opisane w sposób syntetyczny rezultaty badań uzyskane w ramach prowadzonych eksperymentów dotyczących zmian struktury kalusa i zdolności do zakażenia mutantów roślin pomidora, analizy tkanki kalusa metodami spektroskopowymi, spektrometrii mas, obrazowania tkanki metodą spektroskopii Ramana oraz charakterystyki struktury mikrobiomu pomidora po zakażeniu *A. tumefaciens* metodami klasycznej mikrobiologii oraz z wykorzystaniem sekwencjonowania amplikonów i analizy metataksonomicznej. Nie znalazłam w rozprawie wykresów przedstawiających zmiany struktury mikrobiomu w podziale na rośliny pomidora infekowane i nie infekowane *A. tumefaciens*, stąd moje pytanie czy rycina 29 dotyczy roślin infekowanych czy nie infekowanych tym fitopatogenem. W związku z tym, że na rycinie 31 B znajduje się podsumowanie wariantów sekwencji amplikonu zidentyfikowanych w roślinach niezainfekowanych oraz zainfekowanych, bardzo proszę o omówienie podczas obrony rozprawy doktorskiej zmian metataksonomicznych pomiędzy tymi roślinami.

W mojej ocenie na szczególną uwagę zasługują wyniki dotyczące zwiększenia syntezy α -tomatyny – glikoalkaloidu przeciwbakteryjnego, w tkankach pomidora infekowanych *A. tumefaciens*, co wskazuje na uruchomienie mechanizmów obronnych gospodarza. Niemniej ważne są wyniki dotyczące zmian dystrybucji przestrzennej tomatyny i innych metabolitów wtórnych w tkance tumorowej i w łodydze mutantów w porównaniu do szczepu dzikiego, a także rezultaty związane ze zmianami profilu mikrobiomu rośliny zainfekowanej *A. tumefaciens*. Dyskusja wyników, stanowiąca kolejną część rozprawy, obejmuje omówienie uzyskanych rezultatów na tle aktualnego stanu wiedzy. Merytoryczną część rozprawy kończy dziewięć wniosków, podsumowujących uzyskane rezultaty. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie, dotyczące interakcji roślina-mikrobiom – czy na podstawie uzyskanych danych dotyczących zmian struktury endofitów oraz kolonizacji rośliny przez konkretne grupy bakterii w przypadku roślin infekowanych *A. tumefaciens* można sformułować podstawy dla przyszłych strategii ochrony roślin, opartych na analizie mikrobiomu roślinnego?

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pokazuje umiejętność Doktorantki do analizy i przedstawienia wyników oraz ich prawidłowego omówienia i skonfrontowania z danymi literaturowymi, co znalazło odzwierciedlenie w ocenianej dysertacji. Doktorantka prawidłowo scharakteryzowała efekty badań, a wyniki pomimo kilku uwag, zostały opisane w jasny sposób. Biorąc pod uwagę uzyskane przez Panią K. Suśniak wyniki badań, bardzo proszę omówić/podsumować najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej, a także ocenić przyszłe perspektywy praktycznego ich zastosowania w ochronie roślin czy innych obszarach, istotnych dla badań podstawowych lub aplikacyjnych.

Pozytywnie oceniam rozprawę doktorską pod względem merytorycznym.

4. Wniosek końcowy

Doktorantka zaprezentowała dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, opanowała warsztat badawczy istotny dla badaczy reprezentujących dyscyplinę nauki biologiczne, a także wykazała się zdolnością do opracowania i interpretacji uzyskanych wyników. Uwagi i pytania zawarte w recenzji mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Dysertacja doktorska Pani mgr Katarzyny Suśniak jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w obrębie dyscypliny nauki biologiczne.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Suśniak spełnia warunki wymagane Ustawą o stopniach i tytule naukowym (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. zm.)), i stanowi podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Katarzyny Suśniak do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.


prof. dr hab. Magdalena Frąć