

Dziedkanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 18.06.2015v.
L.dz. nr 25/2015
Pie

UNIwersytet M. Curie-Skłodowskiej
ZAKŁAD GENETYKI i MIKROBIOLOGII
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
Prof. dr hab. Anna Skorupska

Tel: (081) 537 59 72
Fax: (81) 537 59 59
anna.skorupska@poczta.umcs.lublin.pl

Lublin 15.06.2015

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marty Potrykus

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Potrykus pt. *Charakterystyka molekularnego mechanizmu warunkującego patogeniczność bakterii z rodzaju Dickeya na roślinach* i w angielskiej wersji „*Characteristics of the molecular mechanism involved in the pathogenicity of bacteria from genus Dickeya on plants*” została wykonana w Katedrze Biotechnologii, Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem i opieką naukową promotora prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej oraz kopromotora dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat z Uniwersytetu w Lyonie, Francja. Fundusze na badania mgr M. Potrykus pochodziły z różnych źródeł; z grantu NCN (kierownik prof. E. Łojkowska), oraz z dwóch projektów współfinansowanych przez UE z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki. Na pracę doktorską składa się 3 współautorskie prace doświadczalne opublikowane w czasopiśmie indeksowanych w bazie JCR, t.j., *Molecular Plant Microbe Interactions* (2014) IF=4.455 oraz dwie prace w *Annals of Applied Biology* (2013- 2014) IF=1.955. W dwóch pracach mgr M. Potrykus jest pierwszym autorem. Do pracy doktorskiej załączono oświadczenia współautorów publikacji, z których wynika, że Doktorantka wykonywała większość doświadczeń, opracowała wyniki badań oraz przygotowywała manuskrypty do publikacji. Ta część pracy, która była wykonywana przez Doktorantkę świadczy o jej dominującym udziale w powstaniu i opublikowaniu przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

W trakcie przygotowywania pracy doktorskiej mgr M. Potrykus uczestniczyła w różnych projektach, których efektem jest współautorstwo w publikacjach nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Są to dwie prace indeksowane w JCR, i wykonane w dużym międzynarodowym zespole. W publikacji w *Intern. J. System. Evol. Microbiol.* (2014) opisano nowy gatunek *Dickeya solani*, jako pektynolityczną i patogeniczną bakterię wyizolowaną z ziemniaka. Następna praca opublikowana w *Ann. Appl. Biol.* (2015) dotyczy identyfikacji i analizy zróżnicowania *Pectobacterium* sp. i *Dickeya* sp., jako czynników

sprawczych chorób ziemniaka. Udział w badaniach prowadzonych w zespole międzynarodowym dobrze rokuje na przyszłą aktywność naukową Doktorantki. Opisane publikacje nie wchodzi w skład rozprawy, jednak ściśle wiążą się z głównym problemem i stanowią ważny element składowy już znacznego dorobku naukowego mgr. M. Potrykus. Część pracy doktorskiej była wykonywana w laboratorium kopromotora dr Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat na Uniwersytecie w Lyonie, gdzie Doktorantka łącznie przebywała 8 miesięcy, w latach 2011-2015 w ramach programów finansowanych z funduszy europejskich przeznaczonych na kształcenie doktorantów i młodej kadry akademickiej oraz z funduszu pochodzącego z grantu NCN. Obok publikacji, mgr Potrykus przedstawiła 10 współautorskich komunikatów, z których 8 było prezentowanych na konferencjach zagranicznych.

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawę doktorską mgr Marty Potrykus stanowią zebrane 3 publikacje poprzedzone Streszczeniem oraz krótkim Wstępem, w którym Doktorantka omówiła kolejne etapy prowadzonych badań, opublikowane w trzech pracach doświadczalnych. Jako główny cel pracy Doktorantka przedstawiła problem bezpośrednio odpowiadający tytułowi rozprawy, czyli badanie aktywności kilku białek regulatorowych odpowiedzialnych za patogeniczność szczepów *Dickeya solani*. Inne zamierzenia badawcze, to opracowanie szybkiego testu pozwalającego na monitorowanie bakterii patogenicznych dla ziemniaka głównie *Dickeya* spp. oraz identyfikację patogena, który był czynnikiem sprawczym epidemii czarnej nóżki w Finlandii.

W ostatnich latach w Europie i w Polsce pojawił się szczególnie wirulentny patogen ziemniaka powodujący duże straty ekonomiczne w plantacjach hodowlanych, który został opisany taksonomicznie z udziałem polskiego zespołu prof. dr hab. E. Łojkowskiej, jako nowy, odrębny gatunek *Dickeya solani*. Badania te mają szczególne znaczenie ze względu na wysoką wirulencję tego gatunku i innych gatunków *Dickeya*, które w niektórych krajach europejskich są gatunkami kwarantannowymi.

Doktorantka wybrała do badań cztery szczepy *D. solani* różniące się wirulencją w celu zbadania aktywności białek wcześniej opisanych w pokrewnym gatunku *D. dadantii*, jako negatywne regulatory (represory) istotne w regulacji poziomu wirulencji. Obiektem badań były także białka odpowiedzialne za syntezę i odbieranie sygnałów w quorum sensing (QS). Różnice w poziomie wirulencji zostały potwierdzone przez analizę aktywności pektynolitycznej, proteolitycznej, celulolitycznej, produkcję sideroforów oraz ruchliwość

bakterii. Wyróżniono szczep najbardziej wirulentny i szczep, który nie wywoływał wyraźnych objawów zakażenia. Szczepem zewnętrznym w tych analizach był *D. dadantii* różniący się istotnie niemal wszystkimi badanymi własnościami. Mimo znacznych różnic fenotypowych, wybrane szczepy wykazywały wzajemną pełną zgodność wzorów genomowych uzyskanych metodą REP-PCR oraz PFGE, odmienną od *D. dadantii*, potwierdzając tym samym odrębność tego gatunku w stosunku do blisko spokrewnionego gatunku. Ponieważ jest dostępny draft sekwencji genomu *D. solani* analizowano także sekwencje 5 genów wybranych do dalszych badań i stwierdzono ich bardzo wysoką zachowawczość.

Trudno recenzować prace opublikowane w dobrych czasopismach, ale uważam, że można komentować przedstawione badania, co może być przydatne w dalszej aktywności naukowej Doktorantki. Nie zawsze też wszystkie wyniki mieszczą się w publikacji.

Komentarz: Podano wiele danych dotyczących poziomu podobieństwa badanych genów w stosunku do innych gatunków Dickeya, ale nie przedstawiono dendrogramu, który w prosty sposób pokazuje wzajemne podobieństwo szczepów oraz odległości filogenetyczne, przy określonych współczynnikach poparcia.

Czy do badania polimorfizmu szczepów Dickeya solani próbowano użyć bardziej dyskryminacyjnej metody jak np. często stosowanej metody AFLP?

Dalszym etapem badań była mutageneza genów *pecT*, *pecS*, *kdgR*, *expR*, *expI* metodą transdukcji z użyciem faga specyficznego dla *D. dadantii*. Wykorzystano w tym doświadczeniu zarówno podobną wrażliwość obu gatunków na faga, mutanty w tych genach skonstruowane w szczepie *D. dadantii* oraz pełną zgodność sekwencji tych genów w obu gatunkach. Uzyskano mutanty we wszystkich analizowanych genach i zbadano jak mutacja wpływa na aktywności istotne dla wirulencji szczepu *D. solani*.

Jeśli chodzi o samą metodykę; jaka była częstość transdukcji? Czy wszystkie klony Cm^r równocześnie były mutantami w odpowiednim genie? Jak duży genom ma bakteriofag użyty w transdukcji?

Najciekawszym wynikiem uzyskanym w badaniach fenotypu mutantów była zgodność między wzrostem poziomu wirulencji i zwiększoną wydajnością produkcji enzymów pektynolitycznych, szybkością wzrostu oraz produkcją sideroforów. Przypuszczalnie wysoki podstawowy i indukowany poziom syntezy badanych enzymów ma znaczenie w skutecznej inicjacji infekcji. Szczególnie wyraźny efekt wzrostu wirulencji uzyskano w przypadku mutacji w genie *pecT*, którego produkt jest określany, jako główny regulator w *D. dadantii*. Odmienny obraz uzyskano w przypadku braku białek ExpI i ExpR, tzn. mutacje w tych

genach powodowały obniżenie wirulencji. Jest to logiczne, ponieważ brak czynników sygnałnych wpływa negatywnie na funkcjonowanie QS. Ciekawe jest również wewnątrzgatunkowe znaczne zróżnicowanie poziomu wirulencji szczepów *D. solani*, co zależy przypuszczalnie od całej różnorodności warunków środowiskowych, w tym temperatury.

Komentarz: W całej pracy białka *PecT*, *PecS*, *KdgR* są nazywane „regulatorami”, „negatywnymi regulatorami” lub czynnikami wirulencji. Nie są to precyzyjne określenia. Czy te białka, jeśli działają, jako represory mają domeny świadczące o zdolności do wiązania z DNA, czy to określenie dotyczy tylko fenotypowego obrazu aktywności? Jaka jest struktura drugorzędowa tych białek? Być może jest to znane z innych publikacji, ale wg. Recenzenta jest pewien niedosyt, jeśli chodzi o informacje o samych białkach, szczególnie, gdy znana jest ich sekwencja aminokwasowa.

Druga praca wchodząca w skład rozprawy opublikowana w *Annals of Applied Biology* (2014) dotyczy detekcji patogenów ziemniaka *Dickeya* sp. i *Pectobacterium* sp. powodujących dwie różne choroby ziemniaka, czyli czarną nóżkę i mokrą zgniliznę. Głównym zamierzeniem tych badań było opracowanie metody wykrywania i identyfikacji pektynolitycznych patogenów ziemniaka takich jak *Dickeya* sp., *Pectobacterium atrosepticum* i *P. caratovororum* subsp. *caratovororum* pozwalającą na szybką diagnostykę zakażeń. Zakażenia te są przyczyną znacznych strat ekonomicznych dla hodowców. Co więcej, *P. caratovororum* ma bardzo szerokie spektrum gospodarza i zmienność zależną od warunków środowiskowych; specyficzność pozostałych gatunków jest ograniczona do ziemniaka, lecz ostatnio obserwuje się szybkie rozprzestrzenianie się tych gatunków w całej Europie. Opracowano opartą na multiplex PCR metodę specyficznej identyfikacji ww. patogenów w jednej reakcji, w której użycie 3 par specyficznych starterów pozwala na rozróżnienie poszczególnych gatunków bakterii. Optymalizację metody wykonano z użyciem szerokiego spektrum szczepów patogenicznych i saprofitycznych. Następnie na ponad 100 próbach bulw lub pędów ziemniaka zakażonych, lub bez widocznego zakażenia określono poziom specyficzności i wrażliwości opracowanej metody. Ustalono poziom detekcji DNA dla poszczególnych gatunków w obecności i braku kompetencyjnego DNA (*Pseudomonas fluorescens*). Aktualnie metoda ta jest już stosowana w monitorowaniu zakażeń pektynolitycznymi bakteriami w polskich firmach hodowlanych ziemniaka.

Komentarz: Czy opisana metoda jest opatentowana, lub zgłoszona do opatentowania? Czy próbowano modyfikacji metody, która odróżniałaby *P. atrosepticum* od *P. wasabe*? Byłoby to o tyle ważne, że te gatunki różnią się znacznie wirulencją t.j. *P. wasabe* nie jest tak wirulentna jak *P. atrosepticum*.

Kolejna praca opublikowana również w *Annals of Applied Biology* (2013) jest wykonana wspólnie z zespołem fińskim, a mgr M. Potrykus jest drugim z pięciu autorów i współwykonawcą wszystkich eksperymentów. Zasadniczo ta praca wyprzedza dwie pozostałe nie tylko rokiem publikacji, ale też zawartością, ponieważ jest pierwszym doniesieniem dotyczącym patogena, który w latach 2008-2010 w Finlandii spowodował epidemię choroby czarnej nóżki ziemniaka, co kojarzono ze znacznie cieplejszymi latami w całej Europie. Ten patogen okazał się odrębny od innych gatunków *Dickeya* i nadano mu nazwę *D. solani*, teraz już formalnie przyjętą dla tego gatunku. Przedstawiona praca zawiera analizę występowania czynnika sprawczego czarnej nóżki od 2004 r. do epidemii w latach 2008-2010 zaobserwowaną w firmach zajmujących się materiałem siewnym ziemniaka. Szczególnie niepokojący był szybki wzrost (ok. 70% symptomatycznych przypadków) występowania bakterii przypisywanej do nowego kładu *Dickeya* sp. Molekularna analiza ok. 50 izolatów z przypadków czarnej nóżki obejmowała analizę PFGE i REP-PCR oraz sekwencję genu *dnaX*, na podstawie, której stwierdzono, że należą one do wtedy jeszcze niezatwierdzonego gatunku *D. solani*. Znaczenie praktyczne tych badań polega głównie na ostrzeżeniu o zagrożeniu dla hodowców. Znaczenie naukowe zawierało się w znacznym przyspieszeniu badań nad tym gatunkiem, co doprowadziło do formalnego zatwierdzenia nowego gatunku *Dickeya solani* przez odpowiednie gremium.

Komentarz: Czy podobne badania monitorujące częstość występowania głównych patogenów ziemniaka przeprowadza się w Polsce i jakimi metodami?

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Marty Potrykus przedstawiona w postaci trzech oryginalnych prac badawczych opublikowanych w czasopismach naukowych indeksowanych w JCR, w których Doktorantka pełni dominującą rolę, **w pełni uzasadnia nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia** i odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim określonym w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami. Wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Marty Potrykus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

