



Dr hab. Krzysztof Waleron

Gdańsk, 27.02.2015

krzysztof.waleron@gumed.edu.pl

tel (058) 3491972

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Emaldeelen Alimaher Mohamed Ismail
z tytułowanej

Novel plasmids of *Erwinia amylovora* – the causal agent of fire blight

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Puławskiej.

Wykładniczy wzrost liczby danych o sekwencjach genomów mikroorganizmów obserwowany na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat stworzył możliwość prowadzenia bardziej zaawansowanych badań dotyczących migracji różnych gatunków bakterii jak również poznania ich potencjału adaptacyjnego umożliwiającego zasiedlanie nowych gospodarzy, czy nowych siedlisk. Pozwala też na na lepsze zrozumienie mechanizmów regulujących wymianę informacji genetycznej, wpływających na zmienność genetyczną i kierujących ewolucją. Badania te są niezwykle istotne w aspekcie zwiększającej się wymiany międzynarodowej żywności czy materiałów roślinnych oraz obserwowanych zmian klimatycznych.

Najnowsze badania z zakresu genomiki, pozwoliły również na uświadomienie badaczom, iż genom bakterijny może być bardzo plastyczną strukturą, ulegającą intensywnym rearanżacjom. Znaczący wkład w generowanie zmienności mają ruchome elementy genetyczne, posiadające między innymi, zdolność przenoszenia informacji genetycznej pomiędzy komórkami nawet odległych filogenetycznie gatunków bakterii. Do tej grupy czynników należą także plazmidy. Zwykle występują jako pozachromosomalne elementy genetyczne ulegające niezależnej od chromosomu bakteryjnego replikacji. Ze względu na liczbę kopii w komórce dzielimy je na niskokopijne i wielokopijne. Zwykle zawartość specyficznych determinant genetycznych na plazmidzie określa jego funkcję. Wyróżniamy plazmidy typu R (niosące kasety genów oporności), typu F (konigacyjne), plazmidy bakteriocynowe, degradacyjne czy plazmidy wirulencji. Komórka bakteryjna może posiadać jednocześnie kilka typów plazmidów. Jednak nie wszystkie rodzaje plazmidów

moga współistnieć w komórce, o tym decyduje ich przynależność do grupy niezgodności Inc (incompatibility), stanowiącej istotny element charakterystyki plazmidów.

Projekt badawczy realizowany przez mgr mgr Emaldeleen Ismail koncentruje się na jednym z najstarszych znanych patogenów roślinnych, opisanym ponad sto trzydzieści lat temu w USA, aczkolwiek efekty bakteryjnych infekcji jabłoni i grusz obserwowano i opisano już w roku 1794 w rejonie Nowego Yorku. Bakterie *Erwinia amylovora* to specyficzny gatunek w rodzinie pałeczek *Enterobacteriaceae*. Jest to patogen ponad 130 gatunków roślin zaliczanych do 40 rodzajów reprezentujących głównie rodzinę *Rosaceae*. Należy do jednego z najbardziej homogennych gatunków wśród patogenów roślinnych zarówno pod względem cech biochemicznych jak również charakterystyki genetycznej. Początkowo patogen obserwowany był jedynie na obszarze Ameryki Północnej a jego dystrybutorem na inne kontynenty najprawdopodobniej był człowiek. Obecnie występowanie tych bakterii notuje się w ponad 40 krajach od Ameryki Północnej poprzez Europę, Azję jak dotąd jedynie Ameryka Południowa, Południowa Afryka i Australia wydają się być wolne od *Erwinia amylovora*.

Celem przedstawionej do recenzji pracy była analiza kolekcji szczepów *Erwinia amylovora* pochodzących z różnych rejonów geograficznych pod kątem obecności w nich nowych nieznanych dotąd plazmidów. Określenie ich sekwencji oraz adnotacja genów w nowo charakteryzowanych plazmidach. A w kolejnym etapie zbadanie wpływu nowo wyizolowanych plazmidów na właściwości patogeniczne szczepów posiadających te plazmidy.

Obecność plazmidów w komórkach *Erwinia amylovora* obserwowano od lat 80 ubiegłego stulecia. Pierwsze badania dotyczyły plazmidu pEA29, który jak się nieco później okazało, jest powszechnie występujący niemal we wszystkich znanych izolatach bakterii tego gatunku. W oparciu o powyższą obserwację opracowano pierwsze molekularne testy do detekcji *Erwinia amylovora*. Intensywne badania genetyczne na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat wykazały obecność niemal 30 różnych plazmidów, o wielkości od 1,7 kbp do 78 kbp w szczepach *E. amylovora*.

Przedłożona do oceny praca zawiera 100 stron tekstu wzbogaconego o 16 rycin, 4 tabele, aneks z płytą CD, na której zamieszczone zostały sekwencje charakteryzowanych plazmidów i ich adnotacja oraz 8 stronicowy wykaz pozycji literaturowych wykorzystywanych w trakcie badań i pisania pracy. Tu mam kilka uwag. Mapy genetyczne zamieszczone na figurach 3 i 4 są nieco małe co utrudnia czytelnikowi ich interpretację, podobnie mapa plazmidu pEA68 przedstawiona na figurze 8. W przypadku figury 7 na str 42 brakuje opisu wzorca DNA. Konstrukcja tabeli 1 zawierającej wykaz szczepów

wykorzystanych do badań wymaga udoskonalenia, brak w niej uporządkowania według jednej z wybranych kategorii. W przypadku szczepów wyizolowanych w Polsce niezwykle ciekawe byłoby podanie pochodzenia roślin, jeśli były one importowane, co byłoby wartościowe w kontekście przeprowadzonych analiz biogeograficznych.

Rozprawa skonstruowana została w układzie zawierającym wstęp wprowadzający w problematykę związaną z badaniami, opis materiałów i zastosowanej metodyki badań rozdział omawiający wyniki oraz osobno wydzieloną dyskusję i wnioski końcowe. Praca napisana w języku angielskim w sposób przystępny, łączy się w logiczną całość, chociaż w mojej opinii ostatni akapit rozdziału wyniki IV.3.3 opisującego plazmid pEA30 powinien się znaleźć w dyskusji.

Aby zrealizować postawiony sobie cel badawczy doktorant wykorzystał zgromadzoną na potrzeby projektu kolekcję 491 szczepów *Erwinia amylovora* z czego 162 było wyizolowanych w Polsce a pozostałe pochodziły z 11 krajów europejskich głównie Belgii i Holandii i Bułgarii oraz szczepów z USA, Algierii i Egiptu. Badania zrealizowano z wykorzystaniem szerokiej międzynarodowej współpracy umożliwiającej pozyskanie materiału do badań, jak również wartościową interpretację wyników i ich publikację.

W toku realizacji projektu doktorant wyizolował DNA plazmidowy ze 162 szczepów *Erwinia amylovora* pochodzących z Polski oraz ze 160 szczepów z innych rejonów geograficznych. Na podstawie analiz z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych wyselekcjonował pięć szczepów, które oprócz plazmidu pEA29 posiadały jeszcze jeden dodatkowy plazmid.

Trzy szczepy posiadały plazmid o identycznych profilach restrykcyjnych a pozostałe plazmidy były unikalne. W celu stwierdzenia czy wykryte plazmidy zależą do grupy wcześniej opisanych w literaturze czy są nowe doktorant wykonał klonowanie ich fragmentów oraz wstępną analizę sekwencji. Wykonane badania doprowadziły autora do interesującej obserwacji, że sekwencjonowane fragmenty mogą stanowić elementy nieopisanych dotychczas plazmidów.

W kolejnym kroku doktorant wykonał sekwencjonowanie wyselekcjonowanych plazmidów z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji – NGS. Uzyskane dane zostały poskładane w kompletne sekwencje plazmidów z wykorzystaniem oprogramowania CLC Genomic Workbench a następnie poddane analizom bioinformatycznym i porównawczym. W wyniku tych analiz doktorant stwierdził że szczep *E. amylovora* 692 zawiera nowy plazmid nazwany pEA68 o wielkości 68 761 pz. W plazmidzie wyróżniono 78 otwartych ramek odczytu (ang. ORF). Szczep 651a zawiera nowy plazmid pEA27 wielkości 29 462pz, który posiada 38 otwartych ramek odczytu a Szczep

635a zawiera nowy plazmid pEA30 o wielkości 29 585pz, w którym opisano 35 otwartych ramek odczytu. Następnie wykonana została, oparta na technikach PCR, analiza zgromadzonej kolekcji szczepów pod kątem występowania nowo scharakteryzowanych plazmidów. Na podstawie zebranych danych autor pracy stwierdził że plazmid pEA68 występuje w trzech spośród badanych szczepów jednym z Polski i dwóch z Belgii, plazmid pEA27 wykryto jedynie w trzech polskich szczepach a plazmid pEA30 jest unikalny dla szczepu 635a wyizolowanego w Polsce.

W dalszych krokach doktorant wykazał że badane plazmidy są bardzo stabilne i nie są eliminowane z komórki. Wykonał także badania wpływu nowych plazmidów na syntezę amylovoranu (egzopolisacharydu kluczowego dla patogeniczności *E. amylovora*) oraz wpływu na wirulencję szczepów. W tym celu wykorzystując techniki inżynierii genetycznej uzyskał szczepy z usuniętym plazmidem. Dzięki temu możliwe było porównanie szczepów dzikich i szczepów z usuniętym plazmidem pod kątem wirulencji i poziomu syntezy amylovoranu.

Wszystkie trzy nowo opisane plazmidy zostały znalezione w szczepach *E. amylovora* wyizolowanych z chorych roślin pochodzących z importu co wskazuje na możliwość zawleczenia ich z zagranicy. Jest to niepokojąca obserwacja wskazująca na wysokie ryzyko fitosanitarne w świetle bardzo intensywnej w obecnych czasach wymianie materiału roślinnego i produktów rolnych.

Nie znajduję w pracy żadnych poważnych uchybień. Uwagę moją zwróciło, w dyskusji wyników na str 71, stwierdzenie mówiące o niewielkiej roli bakteriofagów w wymianie materiału genetycznego organizmów prokariotycznych, nie mogę się z nim zgodzić, w świetle wielu najnowszych badań metagenomicznych. Bakteriofagi stanowią istotny czynnik wpływający na zmienność genetyczną prokariota. A sam gatunek *Erwinia amylovora* ma grupę infekujących bakteriofagów, również o szerokim zakresie gospodarzy choć rzeczywiście ich wpływ na zmienność tego gatunku wydaje się być ograniczony. Prosiłbym tu autora o komentarz jakie mogą być tego przyczyny.

Szkoda też, że dyskusja dotycząca porównania różnych rodzajów systemów sekrecji typu IV występujących na plazmidach pEA27 i pEA30 str 73 i 74 nie została wzbogacona o schematy graficzne z wykonanych analiz i porównań. Mam też pytanie do autora czy w świetle znacząco innej zawartości par GC w tych plazmidach w stosunku do % par GC w genomie gospodarza wykonywał może analizę użycia kodonów w badanych plazmidach pozwoliłoby to na wysnucie hipotezy z jakiego tła genetycznego mogą się one wywodzić.

Szkoda też, że autor nie przeanalizował wnikliwiej zasobów GenBanku gdyż można było wyszukać, że numer akcesji NC020920 wspomniany przez autora na stronie 49 łączy się ze szczepem CFBP2585 posiadającym również plazmid typu pEA30 wyizolowanym w Irlandii z *Sorbus* sp., zaś sekwencja genomu tego szczepu oraz plazmidu została opublikowana w pracy Mann et al. 2012 numer akcesji HF560646. Porównanie tych dwóch plazmidów byłoby ciekawym wątkiem w dyskusji wyników.

Ponadto prosiłbym doktoranta o komentarz w trakcie publicznej obrony czy podejmowane były próby sprawdzenia czy szczepy niosące nowo opisane plazmidy mają lepszy potencjał adaptacyjny, lepiej reagują na stres środowiskowy czy też wykazują patogeniczność w szerszym spektrum warunków środowiskowych.

Podsumowując praca zawiera nowe oryginalne wyniki naukowe. Autor w pełni zrealizował postawiony w pracy cel przedstawiając charakterystykę genetyczną trzech nowych plazmidów koniugacyjnych, dodatkowo na podstawie analiz porównawczych sekwencji opisał nową rodzinę plazmidów pEA68, do której zaliczył jeszcze plazmid pEA72 pochodzący z USA i pEA78 pochodzący z Meksyku. Praca świadczy o znaczącej wiedzy doktoranta z zakresu dyscypliny, umiejętności spójnej prezentacji informacji uzasadniających celowość podjęcia badań, umiejętności interpretacji i dyskusji wyników w świetle aktualnych danych literaturowych. Wyniki opisanych badań zostały opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie naukowym.

Z przekonaniem mogę stwierdzić, że uważam przedstawioną do oceny pracę za wartościową i spełniającą wymogi stawiane pracom doktorskim.

W oparciu o powyższą analizę wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa o dopuszczenie pana magistra Emaldeleen Alimaher Mohamed Ismail do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

