

Poznań 10 listopada 2021 roku

Prof. UPP dr hab. Dorota Narożna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań
dorota.narozna@up.poznan.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Banasiewicz

pt. „Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych”

Recenzję przygotowałam w odpowiedzi na pismo Pani prof. dr. hab. Agnieszki Gniazdowskiej –Piekarskiej, Dyrektora Instytutu Biologii, SGGW. Stwierdzam, że otrzymany zestaw dokumentów jest kompletny i umożliwia ocenę, czy rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Wybór tematyki badawczej

Symbioza roślin bobowatych z bakteriami zdolnymi do wiązania azotu atmosferycznego jest powszechnie znana, mimo to temat biologicznego wiązania azotu i mikrobiologia gleby stanowią ciągle aktualne tematy wymagające badań, w których pozostaje wiele niewyjaśnionych problemów dotyczących między innymi różnorodności i ewolucji mikrosymbiontów roślin bobowatych. Wśród tych mikrosymbiontów rodzaj *Bradyrhizobium* stanowi dominującą i prawdopodobnie najbardziej zróżnicowaną grupę bakterii brodawkowych na świecie a izolacja geograficzna oraz klimat są czynnikami wpływającymi na ich ewolucję. Badania na poziomie molekularnym, które zostały przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Joanny Banasiewicz są interesujące i istotne w kontekście bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych z punktu widzenia badań podstawowych, ale także wpisują się w nurt dogłębnego wyjaśnienia przyczyn różnorodności tej grupy bakterii, ich filogenezy i filogeografii. Obszar obejmujący przedstawione wyniki badań nie jest przypadkowy ponieważ stanowi centrum różnicowania się rodziny Fabaceae a co za tym idzie również bakterii wchodzących z nimi w zależności symbiotyczne.

Biorąc pod uwagę znaczenie badań uważam, że tematyka podjęta przez Doktorantkę jest ważna, interesująca, w pełni uzasadniona i wpisuje się w, dyscyplinę nauk biologicznych

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Joanny Banasiewicz wykonana została w Katedrze Biochemii i Mikrobiologii Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego pod kierunkiem prof. SGGW dr hab. Tomasza Stępkowskiego.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu (konkurs OPUS 8), projekt nr 2014/15/B/NZ8/00259, pt. „Znaczenie izolacji geograficznej Ameryki Południowej w ewolucji bakterii brodawkowych z rodzaju *Bradyrhizobium* na obszarze Krainy Neotropikalnej” (2015-2020), oraz ze środków na działalność statutową dla młodych naukowców SGGW, projekt nr 505-10-012400-M00399-99, pt. „Zastosowanie metod klasycznych i metagenomicznych w badaniach populacji bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* izolowanych na terytorium południowo-wschodniej Brazylii” (2015-2016).

Rozprawę stanowią trzy spójne, oryginalne artykuły opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym:

Stępkowski, T.; **Banasiewicz, J.**; Granada, C.E.; Andrews, M.; Passaglia, L.M.P. Phylogeny and Phylogeography of Rhizobial Symbionts Nodulating Legumes of the Tribe Genisteae. *Genes* (2018), 9(3), 163, doi: 10.3390/genes9030163. IF: 4.096 (2020); MNiSW: 25 (2018), 100 (2021)

Banasiewicz, J.; Granada, C.E.; Lisboa, B.B.; Grzesiuk, M.; Matuszkiewicz, W.; Bałka, M.; Schlindwein, G.; Vargas, L.K.; Passaglia, L.M.P.; Stępkowski, T. Diversity and phylogenetic affinities of *Bradyrhizobium* isolates from Pampa and Atlantic Forest Biomes. *Syst Appl Microbiol.* 2021a, 44(3), 126203, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126203.

Banasiewicz, J.; Lisboa, B.B.; da Costa, P.B.; Schlindwein, G.; Venter, S.N.; Steenkamp, E.T.; Vargas, L.K.; Passaglia, L.M.P.; Stępkowski, T. Culture-independent assessment of the diazotrophic *Bradyrhizobium* communities in the Pampa and Atlantic Forest Biomes localities in southern Brazil. *Syst Appl Microbiol.* 2021b, 126228, doi: 10.1016/j.syapm.2021.126228. IF: 4.022 (2020); MNiSW: 100 (2021)

Pierwszy z artykułów został opublikowany w 2018 roku natomiast dwa pozostałe w 2021 roku. Łączny współczynnik wpływu (IF) czasopism, w których ukazały się artykuły wynosi 11.235, a liczba punktów MEiN jest równa 225. Są to prace współautorskie, w których Doktorantka pełniła wiodącą rolę w ich przygotowaniu (w dwóch pracach doktorantka jest pierwszym, a w jednej drugim autorem). Fakt ten oraz dołączone oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują, że Doktorantka pełniła wiodącą rolę w przygotowaniu tych publikacji.

W skład rozprawy poza wymienionymi pracami wchodzi Streszczenie w języku polskim i angielskim, krótkie Wprowadzenie, Cel pracy, Wyniki i dyskusja w odniesieniu do

poszczególnych publikacji, Podsumowanie w języku polskim i angielskim oraz Wykaz pozostałych prac opublikowanych w trakcie studiów doktoranckich, istotnych dla dorobku naukowego, lecz niewchodzących bezpośrednio w skład rozprawy Doktorskiej.

Ocena merytoryczna pracy

Głównym celem prezentowanej pracy doktorskiej było określenie zależności biogeograficznych w ewolucji bakterii należących do rodzaju *Bradyrhizobium*, badania zostały oparte o metody mikrobiologii klasycznej oraz narzędzia metagenomiczne. Doktorantka porusza istotne zagadnienia dotyczące ewolucji bakterii zdolnych do symbiozy z Fabaceae. Do swoich badań wykorzystwała szczepy *Bradyrhizobium* pozyskane z jednego z najbogatszych pod względem występowania roślin z rodziny Fabaceae rejonów świata – południowej Brazylii, stanowiącej część krainy neotropikalnej.

Praca została podzielona na rozdziały Wprowadzenie, Cel pracy, Wyniki i dyskusja w odniesieniu do poszczególnych publikacji, Podsumowanie i Literatura.

We rozdziale **Wprowadzenie**, który poprzedza publikacje składające się na rozprawę doktorską Doktorantka przedstawiła zwięzłe opracowanie obecnie obowiązującej klasyfikacji ryzobiów, scharakteryzowała rodzaj i występowanie *Bradyrhizobium*, wyszczególniła geny symbiotyczne i wybrane geny związane z metabolizmem podstawowym komórki. Te dwie kategorie genów zostały wykorzystane w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę, ponieważ podlegają różnym procesom ewolucyjnym: geny symbiotyczne podatne są na transfer horyzontalny, co ma znaczenie przystosowawcze, natomiast ewolucja genów niesymbiotycznych ma charakter organizmalny.

W rozdziale **Cel pracy** sformułowano problemy i hipotezy badawcze oraz podjęty cel badań, zostały one jasno określone wyznaczając kierunek prac badawczych. **W tym miejscu należy podkreślić, że zrealizowanie celu pracy było możliwe wyłącznie dzięki opanowaniu przez Doktorantkę bardzo szerokiego wachlarza technik badawczych poczynwszy od prac z materiałem biologicznym poprzez prace z zakresu biologii molekularnej i bioinformatyki.** W kolejnym rozdziale **Wyniki i dyskusja w odniesieniu do poszczególnych publikacji** Doktorantka odniosła się do poszczególnych artykułów wchodzących w skład rozprawy.

Pierwszy z artykułów powstał w oparciu o dane literaturowe i bioinformatyczną analizę sekwencji nukleotydowych genów metabolizmu podstawowego *recA* i *glnII*, symbiontów ryzobiowych infekujących rośliny należące do plemienia Genisteeae

zdeponowanych w ogólnodostępnych bazach danych. Autorka wykazała bardzo wysoki poziom zróżnicowania mikrosymbiontów zakażających *Genisteae* spp., który wynika ze złożonej historii ewolucyjnej badanej grupy bobowatych, wynikającej z ich rozprzestrzeniania i różnicowania w różnych regionach m.in. południowej Afryce, basenie Morza Śródziemnego i obu Amerykach. Analizy filogenetyczne wykazały, że rodzaj *Bradyrhizobium*, jest dominującą grupą mikrosymbiontów *Genisteae*, geny metabolizmu podstawowego *recA* i *glnII* grupowały się w supergrupie *B. japonicum* jak i supergrupie *B. elkanii*. Geny symbiotyczne *nifD* i *nodA* grupowały się w obrębie kilku różnych kładów, z których każdy zawierał szczepy pochodzące z odległych filogenetycznie roślin.

Wyjątek stanowi kład II, który obejmuje szczepy wyspecjalizowane w zakażaniu *Genisteae*, ale również *Loteae*, co może być przykładem koewolucji tych plemion wraz z bradyryzobiami z kladu II. Wykazano dominację dwóch głównych supergrup w obrębie rodzaju *Bradyrhizobium* – *B. elkanii* i *B. japonicum*, która wynika z ich dużego potencjału symbiotycznego i pozwala na infekowanie szerokiego spektrum roślin z rodziny *Fabaceae* oraz ich zdolności adaptacyjnych do zróżnicowanych warunków edaficznych i klimatycznych, co wpływa na rozszerzenie ich zasięgu geograficznego.

Na szczególną uwagę zasługuje użycie przez Doktorantkę bardzo bogatego zestawu algorytmów w różnych programach do analizy bioinformatycznej, które pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników.

W drugim artykule Doktorantka analizowała różnorodność i pochodzenie symbiotycznych bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* pozyskanych z gleb z obszaru południowej Brazylii, szczepy pozyskano za pomocą pułapek roślinnych (*Macroptilium atropurpureum*, *Aeschynomene falcata*, *Chamaecrista nictitans*, *Crotalaria tweediana*, *Indigofera hirsuta*, *Lupinus linearis*, *Sesbania punicea*, *Chamaecytisus ruthenicus*) tworzących brodawki korzeniowe przez bakterie zasiedlające analizowane próbki gleby. W puli oczyszczonych szczepów bakteryjnych prawie 85% izolatów wykazało przynależność do supergrupy *B. elkanii*, a pozostałe, z dwoma wyjątkami, do supergrupy *B. japonicum*.

Większość sekwencji symbiotycznego genu *nifD*, należała do amerykańskich subkladów III.3D, III.4, nowo utworzonego kladu XX, kladu VII a także pantropikalnego subkladu III.3C. Zidentyfikowano także szczepy należące do australijskiego kladu I oraz europejskiego kladu II. Taka przynależność może wskazywać na przypadkową introdukcję tych szczepów razem z ich roślinnymi gospodarzami, odpowiednio z *Acacia mearnsii* oraz *Ulex europaeus*. Wśród symbiotycznych społeczności *Bradyrhizobium* w południowej Brazylii autorka wykazała

przewagę szczepów pochodzących z Ameryki jednak większość izolatów w obrębie kładów, do których przynależą, grupowała się zwykle oddzielnie w stosunku do tych pochodzących z Ameryki Środkowej, Karaibów, Meksyku, czy Stanów Zjednoczonych. Taki podział może wskazywać na znaczenie barier geograficznych w procesie różnicowania się symbiotycznych regionów DNA. Natomiast wykrycie obcych dla tego obszaru linii filogenetycznych świadczy o rozprzestrzenieniu się tam pan tropikalnych taksonów Fabaceae oraz jest związane z introdukcją egzotycznych dla Brazylii gatunków roślin bobowatych.

W trzeciej pracy Doktorantka dokonała charakterystyki diazotroficznych społeczności bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* wykorzystując do tego celu technologię sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Takie podejście pozwala pominąć czasochłonny etap pozyskiwania czystych szczepów bakteryjnych z brodawek korzeniowych, a także daje możliwość wglądu w mikrobion gleby, pozwala identyfikować rzadkie grupy diazotrofów których nie da się pozyskać z brodawek korzeniowych. Do NGS doktorantka zaproponowała wykorzystanie specyficznych starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji jednego z genów symbiotycznych - *nifD*, takie podejście pozwoliło na analizę składu populacji bradyryzobiów zasiedlających gleby południowej Brazylii.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że wykorzystanie przez Doktorantkę technologii NGS do charakterystyki ryzobiów jest jedną z nielicznych prób opisanych w literaturze, w których do scharakteryzowania społeczności ryzobiów zasiedlających gleby zastosowano podejście niezależne od otrzymywania czystych kultur bakteryjnych.

Analizy metagenomiczne prezentowane przez doktorantkę dostarczyły informacji o 876 specyficznych sekwencjach genu *nifD* z 20 próbek gleby. Dodatkowo dla porównania 29 sekwencji tego genu pozyskano z izolatów bakteryjnych otrzymanych metodą pułapek roślinnych. Wszystkie sekwencje klasyfikowały się w obrębie 22 głównych grup rodzaju *Bradyrhizobium* oraz utworzyły 21 linii reprezentowanych przez pojedyncze sekwencje. W tym miejscu należy podkreślić, że w ten sposób odkryto 18 nowych grup filogenetycznych utworzonych przez diazotroficzne bradyryzobia, potwierdzono przewagę sekwencji należących do amerykańskiego subkladu III.3D, oraz stwierdzono obecność sekwencji, które nie były dotąd wykrywane w czystych kulturach (klad XXXVIII),

W kolejnym rozdziale dysertacji **Podsumowanie** autorka podsumowała wyniki swoich prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Rozdział **Literatura** zawiera pozycje trafnie dobrane i cytowane w przygotowanej rozprawie doktorskiej, ponadto każda opublikowana

praca wchodząca w skład dysertacji zawiera bardzo bogatą literaturę, która świadczy o tym, że Doktorantka posiada bardzo dobrą znajomości tematyki badawczej.

Przedstawione w dysertacji opublikowane prace w znaczący sposób poszerzają aktualny stan wiedzy dotyczący społeczności bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* w oparciu o badania populacyjne obejmujące obszar Brazylii południowej, który jest bogaty w rośliny bobowate a jednocześnie narażony na degradację tego środowiska. Ponadto zastosowane podejście metagenomiczne w którym opracowano i zastosowano startery obejmujące geny *nifD* może mieć znaczenie praktyczne do monitorowania zmian w populacjach *Bradyrhizobiów* zasiedlających różne obszary, szczególnie te narażone na procesy degradacji.

Poszczególne elementy rozprawy zostały ocenione merytorycznie przez kompetentnych recenzentów współpracujących z wydawnictwami, w których ukazały się prace wchodzące w skład doktoratu i udostępnione do szerokiej weryfikacji środowiska naukowego, jednak podczas czytania i analizy przygotowanej dysertacji nasunęły mi się pewne sugestie i uwagi, mają one głównie charakter dyskusyjny i nie mają one wpływu na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej:

- pierwsza uwaga dotyczy sposobu pisania publikacji, w teksie przygotowanej dysertacji niektóre fragmenty napisano poprawnie w formie bezosobowej, a inne w formie osobowej np. Odkryliśmy 18 zupełnie nowych spośród wyodrębnionych 38 grup filogenetycznych utworzonych przez diazotroficzne bradyryzobia....., czy Otrzymaliśmy ponadto 29 sekwencji tego genu z izolatów *Bradyrhizobium*....., to tylko przykłady w pracy jest ich znacznie więcej.

- zastosowanie metodologii metagenomicznej do próbek gleby jest utrudnione przez ekstremalne wyzwania techniczne, takie jak ekstrakcja obiektywnej i reprezentatywnej próbki materiału genetycznego z organizmów o bardzo różnych błonach komórkowych i dostępnym DNA, w pracy "Culture-independent assessment of the diazotrophic *Bradyrhizobium* communities in the Pampa and Atlantic Forest Biomes localities in southern Brazil" mikrobiomy gleby charakteryzowano na podstawie DNA pozyskanego bezpośrednio z gleby za pomocą zestawu MO BIO PowerSoil_ DNA Isolation Kit (Qiagen), czy izolowane w ten sposób DNA zawiera pełną pulę DNA mikroorganizmów (bakterii) zasiedlających badane

próbki gleby? Czy użyta metoda izolacji była porównywana z innymi metodami pozyskiwania DNA z gleby?

- do analizy mikrobiomu gleby wykorzystano startery specyficzne do genów *nodD*, dlaczego wybrano te symbiotyczne sekwencje do zaprojektowanie starterów, a nie użyto do tego celu sekwencji innych genów symbiotycznych?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Joanny Banasiewicz pt. „Badania populacyjne bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej oraz podejść metagenomicznych” spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz 1669).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie o dopuszczenie mgr Joanny Banasiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoka wartość naukową wykonywanych badań i fakt, że prace wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Banasiewicz

Prof. UPP dr hab. Dorota Narożna

