

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz
Katedra Mikrobiologii, Instytut Biologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Lwowska 1, 87-100 Toruń
Tel. +48 (56) 611-25-40
E-mail: hrynk@umk.pl

Toruń 11.09.2023

Podstawa formalna opinii

Opinia została sporządzona dla Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia zgodnie z decyzją podjętą na posiedzeniu w dniu 30 czerwca 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Darii Chlebek

p.t. „Identyfikacja i uwarunkowania genetyczne antagonistycznych oddziaływań endofitycznych szczepów *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 i *Serratia quinivorans* KP32 z fitopatogenami grzybowymi”

w postępowaniu dotyczącym nadania stopnia naukowego doktora
w dyscyplinie biologia

Recenzja została przygotowana zgodnie z wymaganiami zawartymi w Ustawie z dnia 18 lipca 2018 r. (art. 187) Dz.U. 2022 poz. 574 oraz w oparciu o stanowisko recenzenta w sprawie dopuszczenia mgr Darii Chlebek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

1. Opis ogólny

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek została napisana pod kierunkiem promotora - dr hab. Katarzyny Hupert-Kocurek, prof. UŚ oraz promotora pomocniczego - dr Magdaleny Pacwa-Płociniczak, z Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Część badań naukowych zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej D. Chlebek została wykonana w ramach projektu zatytułowanego: „*Badania molekularne wpływu grzybowych patogenów roślin na wybrane bakterie endofityczne wykazujące aktywność biologiczną*” (OPUS20, UMO-2020/39/B/NZ9/00491) oraz projektu „*Zastosowanie szczepów bakterii endofitycznych w ochronie przed grzybowymi patogenami rzepaku w hodowlach wazonowych*” realizowanego w ramach programu MEiN "Inkubator Innowacyjności 4.0"(UŚ/5/II 4.0/2021).

Struktura pracy ma formę monografii i jest zgodna z ogólnymi zasadami i wymogami stawianymi rozprawom doktorskim. Składa się z ośmiu rozdziałów głównych: wstęp, przegląd literatury, cele pracy, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusja wyników i wnioski. W pracy zamieszczono również abstrakt w języku polskim i angielskim oraz spis literatury. Powyższe składowe elementy pracy doktorskiej zostały zaprezentowane na 128 stronach. Na końcu pracy dołączono dwie publikacje, w których została opublikowana część wyników zaprezentowanych i opisanych w monografii pracy doktorskiej, wraz z oświadczeniami współautorów. W obu publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem. Opublikowane prace, do których odnosi się Doktorantka w pracy doktorskiej stanowią duży wkład w jej dorobku. Ze względu jednak na fakt, że praca została przedstawiona w formie monografii, recenzent w opisie przedstawionym poniżej nie będzie odnosił się do zawartych w niej wyników i treści, a jedynie do części pracy przedstawionej w formie monografii.

Przedłożona do recenzji praca doktorska dotyczy interakcji, które mogą zachodzić pomiędzy bakteriami endofitycznymi i grzybowymi patogenami roślin oraz mechanizmów je warunkujących. Cel główny oraz cele szczegółowe pracy doktorskiej (w formie 7 punktów) zostały określone (str.39). Postawione hipotezy badawcze są poprawne i odnoszą się do przeprowadzonych i opisanych w pracy eksperymentów. Wnioski z pracy doktorskiej (str. 109) prawidłowo weryfikują postawione hipotezy. Na dużą uwagę zasługuje dobór literatury naukowej, którą Doktorantka wykorzystała do napisania rozprawy. Lista pozycji literaturowych liczy aż 327 prac, w większości opublikowanych w ostatnich 5 latach, w uznanych czasopiśmie naukowych i ściśle odnoszących się do opisywanych problemów badawczych.

Przeprowadzone i opisane przez Doktorantkę eksperymenty badawcze stanowią chronologicznie i precyzyjnie zaplanowany cykl badań, oparty o szeroki wachlarz analiz laboratoryjnych, które umożliwiły w istotnym stopniu poszerzyć wiedzę w tak ważnym obszarze naukowym. W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano m.in. (i) sekwencjonowanie i analizę funkcjonalną genomów badanych szczepów bakterii, którą przeprowadzono z użyciem wielu narzędzi bioinformatycznych i baz danych; (ii) szeroką

gamę analiz chemicznych umożliwiającą potwierdzenie syntezy określonych związków mogących potencjalnie stymulować wzrost roślin przez badane bakterie, np. syntezy sideroforów, kwasu salicylowego, deaminazy ACC, solubilizacji fosforanów, itd. (iii) analizę wybranych genów potencjalnie zaangażowanych w aktywność przeciwgrzybową oraz genów kodujących enzymy antyoksydacyjne; (iv) zdolność bakterii do tworzenia biofilmu, który jest ważnym etapem kolonizacji roślin przez bakterie; (v) znakowanie badanych szczepów białkiem zielonej fluorescencji i wykorzystanie ich w ocenie potencjału do kolonizacji roślin z wykorzystaniem analiz mikroskopowych, itd. Olbrzymia i bardzo zróżnicowana liczba technik świadczy nie tylko o doskonałych umiejętnościach laboratoryjnych Doktorantki ale również jej dojrzałości naukowej.

2. Znaczenie i aktualność zagadnień zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin w rolnictwie, które mają zapewnić wysoką jakość i ilość plonów, budzi w ostatnich latach coraz więcej kontrowersji. Ich długotrwałe stosowanie może prowadzić do zaburzenia równowagi mikrobiologicznej w środowisku oraz negatywnie wpływać na zdrowie ludzi. Poszukiwanie alternatywnych rozwiązań jest kluczowe w planowaniu nowych technologii upraw. Dużą nadzieją są mikroorganizmy endofityczne, które w naturalnym środowisku zasiedlają tkanki wszystkich roślin uprawnych, przyczyniając w wielu przypadkach się do zwiększonej tolerancji gospodarza roślinnego na niekorzystne czynniki abiotyczne i biotyczne. Badania nad bakteriami endofitycznymi i ich potencjałem do hamowania rozwoju patogenów grzybowych roślin uprawnych prowadzone są od wielu lat, jednak wciąż nie znaleziono kluczowej odpowiedzi, która wyjaśniałaby mechanizmy leżące u podstaw tych zależności. Rozprawa doktorska Pani mgr D. Chlebek stanowi znaczący wkład i w istotnym stopniu pogłębia wiedzę w tym zakresie, ponieważ oprócz stosowanych powszechnie w badaniach naukowych testów biochemicznych i *in vitro* służących do oceny aktywności biologicznej bakterii endofitycznych wobec grzybowych patogenów, prezentuje podłoże genetyczne złożonych interakcji zachodzących pomiędzy tymi organizmami. Są to niezwykle cenne wyniki badań, które w przyszłości mogą w znaczącym stopniu wpłynąć na technologie stosowane w rolnictwie z wykorzystaniem endofitów bakteryjnych.

3. Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej przedstawione w publikacjach naukowych i ich znaczenie

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych w pracy doktorskiej Pani mgr D. Chlebek zaliczam:

1. Zastosowanie szerokiego wachlarza technik laboratoryjnych, opartych nie tylko na badaniach biochemicznych, *in vitro* i mikroskopowych, ale również technikach umożliwiających zrozumienie molekularnego podłoża antagonistycznych oddziaływań endofitów bakteryjnych wobec fitopatogennych grzybów;
2. Identyfikację genów warunkujących mechanizmy biokontroli badanych bakterii, w tym: konkurencję o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe, produkcję antybiotyków, produkcję enzymów degradujących ściany komórkowe patogenów oraz produkcję lotnych związków.
3. Wykazanie udziału różnych mechanizmów biorących udział w hamowaniu wzrostu badanych fitopatogenów przez bakterie endofityczne: szczep *Pseudomonas*

fluorescens BRZ63 - zmiany w poziomie transkrypcji genów zaangażowanych w produkcję piowerdyny i wiskozyiny; szczep *Serratia quinivorans* KP32 - istotne zmiany w transkrypcji genów kodujących chitynazy oraz zaangażowanych w biosyntezę cyjanowodoru, enterobaktyny oraz acetoiny.

4. Podsumowanie

Podsumowując, praca doktorska mgr D. Chlebek prezentuje szereg ważnych osiągnięć naukowych przedstawiających nową i cenną wiedzę z zakresu interakcji zachodzących pomiędzy endofitami bakteryjnymi a grzybowymi patogenami roślin uprawnych, która może przyczynić się do wprowadzenia nowatorskich rozwiązań stosowanych w zrównoważonym rolnictwie. Doświadczenia, które przeprowadzono przy zastosowaniu zróżnicowanych technik badawczych, przedstawiają szeroki i dobrze zaprezentowany zestaw wyników badań, które zostały bardzo dokładnie przeanalizowane i omówione na podstawie najnowszej literatury naukowej. Rozprawa doktorska została poprawnie zaprezentowana pod względem redakcyjnym.

5. Uwagi

1. Na stronie 13-14 pracy doktorskiej pojawia się zdanie: „Wiele roślin uprawnych zdolnych jest do nawiązania asocjacji z endofitycznymi bakteriami, ...”. Pojawia się zatem pytanie, czy znane są rośliny uprawne, które nie są zasiedlane przez endofity bakteryjne? Bardzo proszę aby Doktorantka ustosunkowała się do tego zagadnienia podczas obrony pracy doktorskiej.
2. W pracy doktorskiej badano dwa szczepy bakterii endofitycznych: *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 - wyizolowany z wysterylizowanych powierzchniowo korzeni rzepaku (*Brassica napus* L.) i *Serratia quinivorans* KP32 - wyizolowany z wysterylizowanych powierzchniowo korzeni pietruszki (*Petroselinum crispum* L.). Jak wspomina Doktorantka w pracy (str. 40), szczepy te zostały wyizolowane w 2017 roku i były badane wcześniej pod kątem degradacji zanieczyszczeń organicznych oraz fitodegradacji (Chlebek, 2018). Nie wyjaśnia jednak dlaczego właśnie te dwa szczepy zostały wybrane w doświadczeniach nad interakcjami antagonistycznymi z grzybowymi patogenami. Czy dobór oparty był jedynie na przeglądzie literatury (wstęp do pracy doktorskiej), czy istniały inne przesłanki, które skłoniły Doktorantkę do tak szczegółowych analiz nad tymi szczepami pod kątem interakcji z patogenami grzybowymi?
3. Wszystkie hodowle mikroorganizmów prowadzono w stosunkowo wysokiej temperaturze 30°C. Czy jest to temperatura optymalna do wzrostu wszystkich badanych mikroorganizmów oraz czy mogła mieć wpływ na przeprowadzone analizy?
4. W zaprojektowanym doświadczeniu donicowym, w którym badano dwa bakteryjne szczepy endofityczne w ochronie rzepaku przed *R. solani* nie wykonano wariantów kontrolnych dla roślin, które nie poddano żadnej inokulacji oraz inokulowanych wyłącznie bakteriami. Bardzo proszę aby Doktorantka ustosunkowała się do tego problemu podczas obrony rozprawy doktorskiej.

1. Wnioski

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek przedstawia szeroko zakrojone i doskonale zaprezentowane wyniki badań, co wpływa na jej ogólny bardzo wysoki poziom merytoryczny. Liczba moich uwag jest niewielka i nie wpływa na ogólną **bardzo dobrą** ocenę pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 18 lipca 2018 r. (art. 187) Dz.U. 2022 poz. 574. W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w dyscyplinie biologia o dopuszczenie mgr Darii Chlebek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie biologia.

Jednocześnie, zwracam się do Członków Rady o **wyróżnienie pracy doktorskiej** za szeroki zakres analiz wykorzystanych podczas prowadzonych doświadczeń oraz istotny wpływ uzyskanych wyników na rozwój wiedzy naukowej w tematyce badawczej.

Prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz

