

Prof. UPP dr hab. inż. Alicja Niewiadomska
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Rolnictwa Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej
ul. Szydłowska 50
60-637 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej

mgr inż. Kingi Marii Włodarczyk

pt.: „Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu roślinna – endofit do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej”

**wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Agnieszka Wolińska, prof. KUL
oraz promotora pomocniczego dr Agnieszka Kuźniar**

1. Podstawa opracowania recenzji

- Pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie prof. dr hab. inż. Barbary Kołodziej z dnia 17 czerwca 2021 r., wystosowane w związku z uchwałą Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie podjętą dnia 16 czerwca 2021 r.,
- Umowa o dzieło z Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie, reprezentowanym przez Prorektora ds. Kadr prof. dr hab. inż. Andrzeja Marczuka,
- Egzemplarz rozprawy doktorskiej mgr inż. Kingi Marii Włodarczyk pt. „Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu roślinna – endofit do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej”,
- Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami,
- Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

2. Ogólna charakterystyka – zasadność podjęcia tematu

Wraz ze wzrostem liczby ludności na świecie jednym z najważniejszych priorytetów jest zwiększenie wydajności upraw. Wzrost produkcji musi zostać osiągnięty pomimo rosnącej liczby wyzwań współczesnego rolnictwa, w tym ograniczeń w stosowaniu pestycydów, obaw o wpływ zmian klimatycznych na plon pszenicy i spektrum chorób. Interesującym osiągnięciem ostatnich lat jest odkrycie, że różnorodne i przede wszystkim aktywne społeczności drobnoustrojów nie są jedynie „pasażerami” zasiedlającymi rośliny, ale odgrywają ważną rolę w ich wzroście, rozwoju i odporności na stres. Korzystne cechy endofitów mogą stanowić zatem rozwiązanie mające na celu poprawę ilości i jakości

plonów pszenicy w sposób zrównoważony. Celowane wykorzystanie bakterii pobudzających wzrost roślin (PGPB- *Plant Growth Promoting Bacteria*), w tym bakterii endofitycznych lub ich produktów, jako nawozów biologicznych w rolnictwie jest obiecującą technologią zapewniającą skuteczne i przyjazne dla środowiska rozwiązania, które mogą zapewnić bezpieczeństwo żywnościowe.

Autorka wykazała się kompleksowym podejściem do tematu. Wykorzystując standardowe metody izolacji hodowli mikroorganizmów oraz metody molekularne bardzo dokładnie przeanalizowała mikrobiom endofityczny w tkankach liści, korzeni i koleoptyli pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum* L. cv. 'Hondia' oraz dwóch odmian pszenicy orkiszowej *Triticum spelta* L. cv. 'Rokosz' i 'Schwabenkorn', uprawianych w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Określiła właściwości izolatów bakteryjnych do promowania wzrostu rozwoju pszenicy na podstawie zdolności ich do produkcji: kwasu indolilo-3-ocowego, syntezy enzymów hydrolizujących rozkład celulozy, ksylanu i białek, produkcji metabolitów przeciwgrzybiczych, wiązania azotu cząsteczkowego oraz syntezy deaminazy ACC, które mogą stanowić cenną alternatywę dla stosowanych w rolnictwie nawozów mineralnych i środków chemicznych.

3. Struktura i zawartość pracy

Rozprawa doktorska mgr inż. Kingi Marii Włodarczyk liczy 107 ponumerowanych stron formatu A4 jednostronnie zadrukowanych i oprawionych. Zawiera zasadniczy tekst rozprawy z 22 tabelami, 22 rysunkami, składający się z: 7 głównych rozdziałów (Wstęp, Przegląd literatury, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki badań, Dyskusja, Wnioski), co zajmuje 83 strony. Dodatkowo przedstawiona do recenzji dysertacja zawiera spis 184 pozycji biograficznych mieszczący się na 16 stronach oraz streszczenie w języku polskim i angielskim (łącznie 4 strony). Struktura pracy jest poprawna, właściwa dla podjętej problematyki i charakteru rozprawy doktorskiej.

W jednostronicowym Wstępie (s. 5), Doktorantka przedstawiła uzasadnienie podjęcia problemu badawczego. Podkreśliła zasadność podjętych badań poprzez wskazanie na możliwość wykorzystania potencjału bakterii endofitycznych lub ich produktów, w postaci nawozów biologicznych w zrównoważonym rolnictwie, jako alternatywę dla stosowanych dotychczas nawozów mineralnych czy środków ochrony roślin.

Rozdział 2. (s. 6-32) zawierający przegląd literatury odnosi się do podstaw literaturowych rozważanych aspektów w pracy. Układ treści w rozdziale uważam za bardzo logiczny, a poszczególne tematy ułożone są w prawidłowej kolejności. Za bardzo przydatne w studiowaniu

tego rozdziału uważam podział na podrozdziały, co w znacznej mierze ułatwiło interpretację. W rozdziale Autorka porusza kolejno takie kwestie, jak: występowanie endofitów, ich podział i typy oraz możliwości i preferencje kolonizacji roślin przez nie.

Kolejnym ważnym aspektem poruszonym w przeglądzie jest omówienie oddziaływań bakterii endofitycznych na rośliny, które mogą poprzez szereg różnych mechanizmów wpływać pośrednio lub bezpośrednio na roślinę. Doktorantka wskazuje m.in. na zdolność pozyskiwania przez bakterie endofityczne ze środowiska azotu, fosforu i żelaza, produkcję fitohormonów (auksyn, giberlin, kwasu abscysynowego i jasmonowego), syntezę deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC) oraz związków hamujących wzrost patogenów i witamin. Na podkreślenie w tej części przeglądu literaturowego zasługuje fakt wnikliwego przestudiowania przez Panią mgr Kingę, Marię Włodarczyk literatury krajowej i zagranicznej. Autorka ze swobodą posługuje się pojęciami dotyczącymi indukcji odporności ogólnoustrojowej powodowanej m.in. przez endofity oraz łagodzenia przez te bakterie wielu rodzajów stresów abiotycznych takich jak susza, nadmierne zasolenie, zbyt niska temperatura czy obecność w glebie metali ciężkich, co świadczy o dużej dojrzałości Doktorantki.

Za najbardziej wartościową część przeglądu literatury uważam opisanie możliwości wykorzystania bakterii endofitycznych w rolnictwie. Autorka wskazuje, że ze względu na swoje właściwości metaboliczne, stosowane mogą być w postaci biopreparatów, czyli substancji zawierających żywe organizmy lub odpowiednio przygotowane produkty ich metabolizmu. Mogą stanowić składnik szczepionek, biopestycydów, biostymulantów oraz środków biokontroli. Podkreśla również możliwość ich aplikacji w postaci zapraw do nasion lub bezpośrednio do gleby. Doktorantka zdaje sobie sprawę z faktu, iż szczególnie ta ostatnia metoda nie jest skuteczna we wszystkich warunkach, m.in. ze względu na dużą konkurencyjność mikrobioty autochtonicznej pedonu, dlatego wskazuje, iż najlepszy ze sposobów aplikacji, w celu zwiększenia lub utrzymania obecnego tempa produkcji żywności, przy jednoczesnym zapewnieniu stabilności środowiska jest zastosowanie bakterii endofitycznych w formie bionawozów.

Reasumując Autorka dokonała krytycznego i szerokiego przeglądu literatury w tym zakresie, równocześnie wskazując na zasadność podjętego tematu badawczego.

Rozdział 3. (s. 33) dotyczy sformułowania celów pracy. Cele pracy dotyczą podejmowanych badań i są sprecyzowane prawidłowo. W związku z kompleksowością podjętej tematyki badawczej Autorka postawiła dwa cele badawcze – pierwszy z nich dotyczy analizy mikrobiomu endofitycznego w różnych fragmentach pszenicy zwyczajnej i orkiszowej,

podczas gdy drugi określa właściwości uzyskanych izolatów do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy,

Cele ułożone są chronologicznie w stosunku do wykonywanych prac badawczych. Badania zostały podzielone na etapy, odpowiadające celom niniejszej pracy. Jako recenzent, muszę jednak wskazać na pewne niedociągnięcia w tym rozdziale, zabrakło bowiem sformułowanych problemów badawczych i hipotez, do których powinny odnosić się cele pracy.

Rozdział 4. (s. 34 – 43) przedstawia materiały i metody.

Materiał badawczy stanowiły trzy odmiany pszenicy ozimej: *Triticum aestivum* L. cv. 'Hondia', *Triticum spelta* L. cv. 'Rokosz' i 'Schwabenkorn' zarówno w doświadczeniu *in vivo* jak również w doświadczeniu *in vitro*. Z doświadczenia *in vivo* pozyskano siewki, które oddzielono od gleby i materii organicznej za pomocą technik ultradźwiękowych, a następnie rozdzielono je na liście, korzenie i koleoptyl, z których to fragmentów izolowano czyste szczepy bakterii endofitycznych. Z kolei w doświadczeniu *in vitro* wykładano w warunkach aseptycznych wysterylizowane zarodki, które hodowano do momentu osiągnięcia stadium wzrostu BBCH 13 i analogicznie jak w przypadku materiału pozyskanego w warunkach *in vivo* podzielono rośliny na odpowiednie fragmenty i dokonano izolacji bakterii endofitycznych.

Doktorantka w sumie otrzymała 60 szczepów endofitycznych wyizolowanych z tkanek wewnętrznych liści, korzeni i koleoptyli *Triticum aestivum* L. cv. 'Hondia', *Triticum spelta* L. cv. 'Rokosz' i 'Schwabenkorn' w warunkach *in vivo* i 24 szczepy wyizolowane z liści, korzeni i koleoptyli w warunkach *in vitro*.

Wywiązując się z obowiązku recenzenta chciałabym podkreślić, że Doktorantka mało precyzyjnie opisała w tej części przedstawionej do recenzji dysertacji, jaka była ilość pobieranych siewek każdej odmiany pszenicy do analiz w warunkach *in vivo* oraz sposobu ich transportu do laboratorium. Podobna uwaga dotyczy liczby wyłożonych zarodków, a tym samym liczby próbek do dalszych analiz, dla doświadczenia prowadzonego w warunkach *in vitro*. Niedociągnięcia w przedstawionej metodyce dotyczą także sposobu sterylizacji materiału roślinnego wykorzystanego do badań. Proszę o wyjaśnienie, czy procedury sterylizacji materiału badawczego zarówno siewek jak i zarodków, zostały opracowane przez Doktorantkę, czy Doktorantka sugerowała się opracowaną metodą opisaną, w którejś z publikacji naukowej? Jeżeli przedstawione metody nie są opracowaniem własnym, sugeruję aby w przygotowywanej ewentualnej publikacji to uwzględnić. Niedociągnięcia w rozdziale materiały i metody, dotyczą także maceracji fragmentów roślin. Moje pytanie brzmi: W jakim roztworze były macerowane fragmenty roślin i czy wykonano posiew bezpośrednio z otrzymanego maceratu, czy dokonano

jego jakiś rozcieńczeń? Jeżeli tak to ile wynosiło to rozcieńczenie oraz w ilu powtórzeniach wykonano posiew?

W dalszej części rozdziału czwartego, w podrozdziale 4.3, 4.4 Autorka opisuje bardzo dokładnie metody molekularne izolacji materiału genetycznego DNA z materiału roślinnego i otrzymanych szczepów, ich amplifikacji, sekwencjonowania i identyfikacji.

W ostatnim podrozdziale metodyki (4.5) została opisana procedura dotycząca oceny właściwości promujących wzrost roślin przez wyizolowane szczepy. Analizowano ich zdolność do produkcji kwasu indolilo-3-octowego, syntezy deaminazy ACC, wiązania azotu cząsteczkowego, syntezy enzymów hydrolizujących rozkład celulozy, ksylanu i białek oraz produkcji metabolitów przeciwgrzybiczych. Przedstawiona metodyka dotycząca oceny wybranych właściwości endofitów w promowaniu i rozwoju pszenicy jest przystępnie i jasno przedstawiona. Występując w roli Recenzenta zalecałbym, podobnie jak w przypadku metod sterylizacji materiału badawczego, o podanie publikacji naukowej, z której ta metodyka została zapożyczona. Ponadto brakuje także wskazania, w ilu powtórzeniach zostały dokonane pomiary wybranej aktywności metabolicznej dla jednego izolatu, tym bardziej, iż w rozdziale „Wyniki”, m.in. na stronie 71. podane jest stwierdzenie: „średni promień strefy (mm) dla aktywności celulolitycznej, ksylanolitycznej i proteolitycznej. Stąd moje pytanie: Z ilu powtórzeń był wyliczony średni promień strefy halo?

Zmuszona jestem nadmienić, iż brakuje w metodyce opisu zastosowanych metod statystycznych wykorzystanych w opracowaniu wyników. Doktorantka na stronie 71. w rozdziale 5 „Wyniki” pisze:

*„średni promień strefy był większy po 72h hodowli płytkowych w porównaniu ze strefami powstałymi po 48 h wzrostu bakterii, jednak wartości te **nie były statystycznie istotne...**”*

dalej Doktorantka pisze:

*„wszystkie analizowane szczepy wykazały aktywność proteolityczną, która **była istotnie statystycznie wyższa po 72 h hodowli niż po 48 h** ($p=0,0111...$ ”.* Proszę wskazać jakie metody statystyczne zostały wykorzystane w opracowaniu otrzymanych wyników.

Reasumując uważam, że Doktorantka zastosowała odpowiedni dobór metod i sposób badań do przedstawionych w dysertacji celów, jednak niedociągnięcia, które wskazałam powinny być uzupełnione, w szczególności, w przypadku przygotowywanej publikacji.

Rozdział 5. (s. 44-97) przedstawia omówienie wyników. Obszerność materiału doświadczalnego zaowocowała dużą ilością wyników, które opracowano statystycznie (choć jak wspomniałam wyżej, nie podano w metodyce narzędzi analiz statystycznych) i

przedstawiono w sposób jasny i syntetyczny łącznie na 53 stronach. Opisy tabel nie budzą zastrzeżeń. Jednak ilustracje opisane jako Rys. 13-16 oraz Rys. 19-20 są dla mnie wykresami, a nie rysunkami, proszę to rozważyć w ewentualnym przygotowaniu publikacji. Rozdział ten podzielony jest na podrozdziały, które korelują z zadaniami badań przedstawionymi w metodyce. Doktorantka kolejno opisała wyniki analizy metagenomicznej, gdzie wykazała, że w przypadku roślin uprawianych w warunkach *in vivo*, najbardziej różnorodnymi tkankami pod względem występowania rodzajów bakterii endofitycznych były korzenie pszenicy zwyczajnej 'Hondia' i koleoptyle pszenicy orkiszowej 'Rokosz' i 'Schwabekorn'. Podkreśliła, iż dominującymi rodzajami bakterii obecnymi we fragmentach badanych roślin były: *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Pedobacter* oraz unclassified_002. Z kolei w tkankach pszenicy pochodzących z kultur *in vitro* to korzenie cechowały się wyższą obfitością występowania rodzajów bakterii, w porównaniu z tkankami liści, a mikrobiom dominujący stanowiły *Pantoea* sp., *Perbacillus* sp., *Bacillus* sp., unclassified_001 i unclassified_041. W dalszej części rozdziału, Pani mgr Kinga, Maria Włodarczyk, bardzo logicznie przedstawiła wyniki dotyczące identyfikacji molekularnej uzyskanych w sumie 84 szczepów (60 *in vivo* + 24 *in vitro*) pochodzących zarówno z tkanek roślin uprawianych w warunkach polowych, jak i tych hodowanych *in vitro*, gdzie wykorzystując sekwencjonowanie genu 16S rRNA, za pomocą algorytmu BLAST i wykorzystując bazę danych GenBank, określiła ich przynależność gatunkową. **Należy podkreślić w tym miejscu, że nowe sekwencje nukleotydowe uzyskane w ramach badań prowadzonych przez Doktorantkę, zostały wprowadzone do bazy danych GenBanku, jako nowe rekordy** (numery pod jakimi zostały opisane nowe rekordy, przedstawione zostały szczegółowo w dysertacji na stronie 50). W kolejnych podrozdziałach (5.3 i 5.4), w wynikach Autorka bardzo jasno i logicznie przedstawiła właściwości izolatów pochodzących z roślin hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*, do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy. Jediną sugestią jaką bym dla tej części dysertacji zaproponowała, to podzielenie tabeli nr 15 na trzy części, odpowiednio dla właściwości metabolicznych izolatów pochodzących z każdej badanej odmiany pszenicy oddzielnie, co ułatwiłoby czytanie tak ciekawej lektury.


Rozdział 6. (s. 76-85) to dyskusja. Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych wyników, odnosząc się do rezultatów badań innych badaczy, wykorzystując literaturę o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Pani mgr Kinga Maria Włodarczyk przedstawiła ten rozdział logicznie, w postaci 2 podrozdziałów korespondujących z przedstawionymi wynikami pracy, w których sposób interpretacji wyników wskazuje na wysoki poziom jej dojrzałości naukowej.

bezpieczeństwo żywnościowe. Autorka w pełni zrealizowała postawione w pracy cele i wskazała oryginalne rozwiązania.

Zgodnie z ustawą z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003r. Nr 65 poz. 595 z późn.zm.) w zw. z art. 179 ust.3 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. i przepisach wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1669), rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uważam, że przedstawiona rozprawa jest świadectwem opanowania przez Doktorantkę warsztatu naukowego w stopniu wystarczającym, odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim ww. Ustawy i tym samym kwalifikuje Ją do uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w Dyscyplinie Rolnictwo i Ogrodnictwo. W związku z powyższym, jako wyznaczona uchwałą Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa recenzentka, wnoszę do Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kingi Marii Włodarczyk pt. **„Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu rośliny – endofit do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej”** i dopuszczenie do publicznej obrony.

Korzystając z przysługującego recenzentowi uprawnienia i biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną i aplikacyjną rozprawy wnoszę do Wysokiej Rady o WYRÓŻNIENIE przedstawionej do oceny pracy.

Poznań, dnia 29 lipca 2021 r.


Prof. UPP dr hab. inż. Alicja Niewiadomska