

Kraków, dnia 09.08.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.

„Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu roślin-endofity do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej”

autorstwa mgr Kingi Włodarczyk

Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu

Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II

MATERIAŁY OTRZYMANE W CELU DOKONANIA RECENZJI

W celu wykonania recenzji rozprawy doktorskiej przedstawiono następujące materiały:

1. Pismo w sprawie uchwały Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 16 czerwca 2021 roku w sprawie wyboru recenzenta pracy doktorskiej,
2. Rozprawa doktorska pt. „Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu roślin-endofity do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej” autorstwa mgr Kingi Włodarczyk.

1. Ocena problematyki badawczej

Podjęta tematyka badań w przedstawionej do recenzji pracy mgr Kingi Włodarczyk jest bardzo wartościowa, dotyczy analizy mikrobiomu endofitycznego w różnych fragmentach pszenicy zwyczajnej i orkiszowej oraz określenia właściwości uzyskanych izolatów do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy. Endofity są grupą mikroorganizmów, na którą w ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę. Zamieszkują wnętrza prawdopodobnie każdej rośliny występującej na Ziemi, odgrywając ważną rolę w ich wzroście, rozwoju i odporności na stres. Ułatwiają roślinom adaptację do niekorzystnych warunków środowiska takich jak nadmierne zasolenie, brak wody, zbyt niska lub wysoka temperatura, stres spowodowany pestycydami, metalami ciężkimi czy węglowodorami. Mogą przynosić korzyści roślinom żywicielskim zarówno w sposób bezpośredni, ułatwiając pobieranie składników odżywczych i syntetyzując fitohormony lub pośrednio, kiedy odgrywają rolę czynników kontroli biologicznej. Warto podkreślić, że wśród bakterii endofitycznych od kilku lat szczególnym zainteresowaniem cieszą się tzw. endofity promujące wzrost roślin (PGPE, Plant Growth-Promoting Endophyte). Mikroorganizmy te poprzez szereg różnych mechanizmów stymulują wzrost swojego

gospodarza, umożliwiają zwiększenie biomasy i poprawiają jego żywotność. Stosowanie bakterii endofitycznych pobudzających wzrost roślin jako bionawozów, szczepionek, bioinsektycydów oraz biostymulatorów w ostatnich latach systematycznie wzrasta, pozytywnie wpływając na ilość i jakość plonów, kondycję gleby oraz stabilność środowiska. Rozwiązanie to jest ekologiczną alternatywą dla konwencjonalnej technologii rolniczej. Należy podkreślić, że mimo znaczącego postępu nauki odnotowywanego w tym obszarze, mając na uwadze potencjał biologiczny i rolę endofitów we wzroście i rozwoju roślin, nadal należy prowadzić badania nad tymi mikroorganizmami, tak aby osiągnąć coraz lepsze rezultaty w zakresie produktywności rolnictwa i ochrony środowiska. Aby tego dokonać należy dokładnie poznać mikrobiom endofityczny poszczególnych roślin. Dlatego uważam, że praca mgr Kingi Włodarczyk, pt. „Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu roślina-endofity do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej” celnie wpisuje się w rozwiązywanie nakreślonego problemu.

2. Ocena pod względem formalnym i strukturalnym

Rozprawa doktorska została przygotowana i opracowana przez Panią mgr Kingę Włodarczyk na podstawie badań własnych pod kierunkiem naukowym dr hab. Agnieszki Wolińskiej, prof. KUL- promotora i dr Agnieszki Kuźniar- promotora pomocniczego. Rozprawa jest monografią o typowym układzie dla tego rodzaju prac: liczy 107 stron i składa się z 10 rozdziałów, których tekst uzupełniają 22 tabele i 22 rysunki dobrze ilustrujące omawiane zagadnienie i niezbędne dla właściwej analizy tekstu rozprawy. W bibliografii ujęto łącznie 184 pozycje. W przedstawionym w rozprawie piśmiennictwie przedmiotu, ok. 95% stanowią prace w języku angielskim, a blisko 67% to pozycje opublikowane w okresie ostatnich 5 lat. Rozprawa posiada klasyczny układ, charakterystyczny dla prac doktorskich. Struktura rozdziałów jest prawidłowa i obejmuje wstęp, przegląd literatury, cel badań, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, streszczenie oraz bibliografię. W ramach rozdziałów wydzielone zostały dodatkowo podrozdziały, co czyni pracę bardziej czytelną. Część teoretyczna rozprawy przedstawiona na 28 stronach jest przeglądem aktualnej wiedzy na temat: występowania, podziału i możliwości kolonizacji roślin przez endofity, oddziaływania bakterii endofitycznych na rośliny, możliwości wykorzystania bakterii endofitycznych w rolnictwie. Z przedstawionej treści wstępnej części rozprawy wyłania się motywacja podjętych badań i cel pracy, który Autorka prezentuje w przejrzysty sposób na kolejnej stronie rozprawy. Na kolejnych 10 stronach pracy, Autorka prezentuje materiał badawczy i zastosowaną nowoczesną metodykę badawczą. Po nich na 32 stronach, Autorka omawia uzyskane wyniki

badania, a na kolejnych 10 poddaje je wnikliwej dyskusji, by w końcu rozprawy na 2 stronach zwięźle sformułować wnioski. Rozprawa doktorska zakończona jest streszczeniem całości pracy w języku polskim i angielskim oraz obszernym piśmiennictwem przedmiotu, które zostało prawidłowo dobrane i w pełni wykorzystane w treści rozprawy. Rozprawa jest przygotowana z wielką starannością językową i pod tym względem zasługuje na wyróżnienie.

Podsumowując, należy stwierdzić, że układ poszczególnych części rozprawy jest klasyczny i prawidłowy, ich merytoryczna zawartość odpowiada wymogom stawianym tego typu pracom, pod względem formalnym praca została wykonana poprawnie.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska została zaplanowana i przygotowana w sposób bardzo staranny i logiczny, wykonana rzetelnie na obszernym materiale przy zastosowaniu nowoczesnej metodyki, odpowiadającej światowym wytycznym w tym zakresie, co wynika zapewne z dobrego opanowania warsztatu badawczego przez Autorkę. Warstwa metodologiczna rozprawy, w aspekcie preparatyki laboratoryjnej wskazuje, że Autorka biegle porusza się w obszarze najnowszych technik molekularnych. Mając na uwadze szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich pracochłonność, warto docenić duży nakład pracy włożony przez Autorkę w realizację rozprawy doktorskiej. Podjęta w pracy tematyka badawcza bardzo dobrze wpisuje się w aktualną problematykę, poruszaną obecnie w pracach naukowych i bez wątpienia dopełnia brakujące elementy poznawcze, a uzyskane wyniki mają duże znaczenie aplikacyjne. Głównym celem naukowym rozprawy była analiza mikrobiomu endofitycznego w różnych fragmentach pszenicy zwyczajnej i orkiszowej oraz określenie właściwości uzyskanych izolatów do promowania wzrostu i rozwoju pszenicy. W oparciu o cel główny, badania w ramach niniejszej rozprawy przeprowadzono w dwóch etapach tj. przeprowadzono izolację i identyfikację szczepów bakterii endofitycznych zdolnych do promowania wzrostu pszenicy, a następnie określono zdolności izolatów endofitycznych do produkcji kwasu indolilo-3-octowego (IAA), syntezy enzymów hydrolizujących rozkład celulozy, ksylanu i białek, produkcji metabolitów przeciwgrzybiczych czy wiązania azotu cząsteczkowego i syntezy deaminazy ACC. W wyniku przeprowadzonych badań Autorka uzyskała wiele oryginalnych i nowych dla nauki wyników, które wnikliwie zinterpretowała, posługując się swoją obszerną wiedzą z dziedziny mikrobiologii i nauk pokrewnych. Rozdział „Wyniki badań” jest obszerny, zawiera dużą ilość kompletnych i rzetelnych danych, które zaprezentowane zostały w sposób poprawny, syntetyczny i przejrzysty. Zamieszczone w pracy liczne rysunki i tabele zostały

wykonane starannie i stanowią właściwą dokumentację. Szczególnie wysoko należy również ocenić rozdział „Dyskusja”, który jest napisany bardzo dobrze, w sposób pozwalający na łatwe zorientowanie się w uzyskanych wynikach. Autorka umiejętnie prezentuje je na tle rezultatów dotychczasowych badań przeprowadzonych przez innych autorów, co niewątpliwie podnosi wartość rozprawy doktorskiej. Dyskusja obejmuje 10 stron i przedstawiona jest w dwóch podrozdziałach, według postawionych celów badawczych. Sposób przeprowadzenia dyskusji świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości Autorki. W wyniku przeprowadzonych badań i na bazie uzyskanych wyników, Autorka sformułowała wnioski, które potwierdzają, że:

- a) wewnętrzne tkanki badanych odmian pszenic, uprawianych zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* zasiedlone są przez bakterie endofityczne;
- b) w warunkach *in vivo* najbardziej różnorodnym fragmentem rośliny w przypadku pszenicy zwyczajnej pod względem najwyższej zasobności w bakterie endofityczne były tkanki korzenia, natomiast spośród tkanek obu odmian pszenicy orkiszowej najwyższą obfitością w różnorodne rodzaje bakterii endofitycznych cechował się koleoptyl;
- c) w tkankach badanych odmian pszenic, uprawianych w warunkach *in vitro* tkanki korzeni cechowały się wyższą różnorodnością pod względem występowania rodzajów bakterii endofitycznych w porównaniu z tkankami liści;
- d) w tkankach badanych pszenic, pochodzących z hodowli *in vivo*, dominującymi rodzajami bakterii endofitycznych były: *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas*, *Pedobacter* i unclassified_002, natomiast uprawianych *in vitro*: *Pantoea*, *Peribacillus*, *Bacillus*, oraz unclassified_001, unclassified_041;
- e) uzyskane izolaty bakterii endofitycznych, pochodzące z roślin hodowlanych w warunkach *in vivo* i *in vitro*, posiadały cechy promujące wzrost i rozwój pszenic.

Na tle zaprezentowanej powyżej opinii można stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Kingi Włodarczyk reprezentuje bardzo wysoką wartość naukową, poznawczą i aplikacyjną.

Z obowiązku recenzenta powyższej rozprawy doktorskiej, muszę jednak w tym miejscu przedstawić pewne drobne uwagi dotyczące pracy:

- w opisie metodyki badań Autorka wskazuje, że materiał badawczy stanowiły siewki trzech odmian pszenicy ozimej, jednak w pracy nie podaje liczby siewek z jakiej izolowano bakterie endofityczne oraz czy ich liczba różniła się pomiędzy poszczególnymi odmianami pszenicy;

- w opisie punktu „c) uzyskanie czystych szczepów bakteryjnych” (str. 35), czytelnik chętnie dowiedziałby się w ilu powtórzeniach materiał badawczy wysiewano na płytkach z agarem odżywczym (BTL Sp. z o.o.),
- w rozdziale „Materiały i metody” należało podać jaki komputerowy program wykorzystano w analizie statystycznej danych oraz jakie przeprowadzono analizy statystyczne i przy użyciu jakich testów;
- czytelnik chętnie dowiedziałby się, które z opisanych punktów metodyki badań oparte są na literaturze przedmiotu.

W trakcie lektury rozprawy znalazłem niewielką liczbę błędów edytorskich (tak zwanych literówek) lub drobnych niejasności, które przytoczę:

- na rysunku 8 powinny być oznaczone bakterie *Pseudomonas* i *Serratia* w wyraźnie różniących się kolorach;
- należy ujednoczyć opis gatunków pszenicy na rysunku 11 oraz w jego tytule. Autorka na rysunku podaje nazwy trzech gatunków pszenic jako *T. aestivum* L. cv., *T. spelta* L. cv., *T. spelta* L. cv., podczas gdy w jego tytule jako *T. aestivum* L. cv. „Hondia”, *T. spelta* L. cv. „Rokosz” i *T. spelta* L. cv. Schwabenkorn”;
- pod tabelą 16 i 20 należałoby wyjaśnić co oznaczają zamieszczone w tabeli kolory;
- proponuję (10^3-10^4 j.t.k. · g⁻¹ś.m. łodyg) zastąpić (10^3-10^4 jtk · g⁻¹ś.m. łodyg) (str.8);
- proponuję zastąpić „ml” przez „cm³” (str.41);
- proszę zastąpić „przemieszczanie się” przez „przemieszczanie się ich” (str. 10);
- „”takich jak:” (str. 14, 17);
- powinno być „dominujących kolonii” zamiast „dminujących kolonii” (str. 35);
- powinno być „subdominujący” zamiast „subdminujący” (str. 44);
- nazwy bakterii z rodzajów *Burkholderia* i *Propionibacterium* powinny być pisane kursywą (str. 77);
- powinno być „Autorzy” zamiast „Auorzy” (str. 83);
- proponuję skorygować edycję pisowni 148 pozycji piśmiennictwa (str. 104):

Jako recenzent, pragnę w tym miejscu podkreślić, że powyższe uwagi edycyjne dotyczą drugoplanowych szczegółów, które w żadnym razie nie obniżają bardzo wysokiej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej. Oceniam ją bardzo pozytywnie. Wartość poznawcza rozprawy jest duża, a staranność realizacji podjętych zamierzeń w warstwie badawczej wysoka.

4. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe dane dotyczące oceny formalnej i merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Kingi Włodarczyk, pt. „Wykorzystanie potencjału biotechnologicznego układu roślina-endofity do stymulacji wzrostu pszenicy ozimej” stwierdzam, że powyższa rozprawa doktorska jest pozycją bardzo wartościową, doskonale wykonaną i stanowiącą znaczący, oryginalny wkład do nauki. Rozprawa doktorska potwierdza solidny warsztat naukowy Autorki. Na tle przedstawionego do oceny materiału można stwierdzić, że Autorka opanowała metody prowadzenia badań naukowych oraz techniki analityczne. Posiadła umiejętność interpretacji i dyskusji wyników. Jest przygotowana do samodzielnego prowadzenia pracy naukowo-badawczej.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska wykonana przez mgr Kingę Włodarczyk w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim przez ustawę z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kingi Włodarczyk do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Równocześnie ze względu na wysoki poziom naukowy, stawiam wniosek o wyróżnienie powyższej rozprawy.



dr hab. inż. Krzysztof Frączek, prof. UR
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków