



Lublin, 7.09.2023 r.

dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisiel, prof. UMCS  
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin  
[jolanta.jaroszuk-scisel@mail.umcs.pl](mailto:jolanta.jaroszuk-scisel@mail.umcs.pl)

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Chlebek

pt. "Identyfikacja i uwarunkowania genetyczne antagonistycznych oddziaływań endofitycznych szczepów *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 i *Serratia quinivorans* KP32 z fitopatogenami grzybowymi"

Rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek została przygotowana w Zespole Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, w Wydziale Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem Promotora: dr hab. Katarzyny Hupert-Kocurek, prof. UŚ oraz Promotora pomocniczego: dr Magdaleny Pacwa-Płociniczak

## Uzasadnienie wykonania recenzji

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały (podjętej zgodnie z art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce - tekst jednolity Dz. U. z 2022 r. poz. 574, ze zm.) Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska z dnia 30 czerwca 2023 r. w sprawie powołania komisji doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr Darii Chlebek i wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

## Struktura rozprawy doktorskiej – ocena formalna

**Bardzo wysoko oceniam przygotowanie rozprawy doktorskiej pod względem formalnym**

Podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej stanowią wyniki zaprezentowane w **182 stronicowym opracowaniu** oraz w **dwóch doświadczalnych publikacjach naukowych**:

1. „Genome mining and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.) against fungal pathogens” (autorstwa Daria Chlebek, Artur Piński, Joanna Żur, Justyna Michalska, Katarzyna Hupert-Kocurek),



2. „Genetic determinants of antagonistic interactions and the response of new endophytic strain *Serratia quinivorans* KP32 to fungal phytopathogens” (autorstwa Daria Chlebek, Valeriia Grebstsova, Artur Piński, Joanna Żur-Pińska, Katarzyna Hupert-Kocurek ),

które ukazały się w latach 2020 i 2022 w wysoko punktowanym czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, IF=5,924, punktacja MNiE=140.

W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem i miała wiodący udział w przygotowaniu koncepcji, projektowaniu i prowadzeniu doświadczeń, analizie wyników, w tym bioinformatycznej genomu, wykonaniu zdjęć mikroskopowych, opracowaniu manuskryptu.

Udział Doktorantki w ww. publikacjach został udokumentowany oświadczeniem o wkładzie pracy zamieszczonym w ostatnim rozdziale pracy doktorskiej Addenda na stronie 177 i jest zgodny z informacjami zamieszczonymi w publikacjach w podrozdziale Author Contributions.

Badania opisane w rozprawie i publikacjach zostały przeprowadzone w ramach dwóch projektów OPUS20 - „Badania molekularne wpływu grzybowych patogenów roślin na wybrane bakterie endofityczne wykazujące aktywność biologiczną” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz projektu realizowanego w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki "Inkubator Innowacyjności 4.0 – „Zastosowanie szczepów bakterii endofitycznych w ochronie przed grzybowymi patogenami rzepaku w hodowlach wazonowych”.

Rozprawa doktorska została bardzo starannie przygotowana w postaci złożonego z **12 rozdziałów 182 stronicowego opracowania** zakończonego rozdziałami Streszczenie i Summary, odpowiednio w języku polskim i angielskim, oraz spisem wykorzystanych w pracy doktorskiej publikacji zamieszczonym w rozdziale Literatura.

**Publikacje naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej** zostały zamieszczone w rozdziale Addenda, w którym znajdują się także oświadczenia Doktorantki i współautorów publikacji. Wstęp pracy doktorskiej oraz bardzo obszerny, a jednocześnie przejrzyste, napisany przegląd literatury poprzedzony został ważnym i starannie przygotowanym podrozdziałem „Spis skrótów stosowanych w pracy”. W pracy doktorskiej zabrakło jedynie spisu grafiki, która przy tak obszernym opracowaniu jest bardzo przydatna dając możliwość łatwego wielokrotnego powracania do danych zamieszczonych w rozprawie.

**Bibliografia** rozprawy doktorskiej mgr Darii Chlebek zawiera aż 327, niemal wyłącznie angielskojęzyczne, publikacje. W dwóch artykułach naukowych Autorka cytuje, odpowiednio, 95 i 120 publikacji.

### **Ocena podjętej tematyki badawczej**

Do najważniejszych współczesnych wyzwań należy opracowanie i wprowadzenie nowatorskich, zrównoważonych i proekologicznych środków ochrony roślin, które pozwolą ograniczyć negatywny wpływ na ekosystem stosowanych w rolnictwie pestycydów i dostosować nowoczesne metody do nowych uwarunkowań legislacyjnych i warunków klimatycznych.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek jest doskonałym przykładem właściwego podejścia do wyzwań wpisujących się w ideę integrowanej ochrony roślin.

Współczesne rolnictwo wymaga wypracowania skutecznych metod zapewniających wysoki poziom plonowania w rolnictwie konwencjonalnym jak i ekologicznym. Przy tym konieczne jest ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin oraz nadmiernego nawożenia roślin, co jest głównym wymogiem kształtowania zrównoważonego rolnictwa zawartym m.in. w rozporządzeniu Rady Unii Europejskiej z 2007 r. Zielony Ład, którego elementem jest Strategia na Rzecz Bioróżnorodności, wprowadzona 20.05.20 r., zakłada objęcie uprawami ekologicznymi 25% powierzchni gruntów uprawnych oraz zmniejszenie stosowania pestycydów o 50%, co dokonane ma być do 2030 r. Zatem



nowoczesne rolnictwo musi być nie tylko skuteczne i ekonomicznie uzasadnione, ale także oparte na biologicznych metodach podnoszących odporność roślin oraz podwyższających poziom ich plonowania a także poprawiających parametry abiotyczne i biotyczne gleb uprawnych.

Rozprawa doktorska wpisuje się w określone przez Unię Europejską priorytety dążące do przywrócenia i zachowania bioróżnorodności (1) Ekosystemy i bioróżnorodność oraz (2) Zdrowa żywność i zrównoważone rolnictwo.

Rozprawa oparta jest na bardzo słusznym założeniu, które formułuje Autorka w rozdziale trzecim przeglądu literatury, twierdząc, że dzięki ścisłemu bezpośredniemu kontaktowi i oddziaływaniu endofitów z roślinami, ochrona, w której pośredniczą mikroorganizmy endofityczne jest korzystniejsza od tej, którą mogą zapewnić mikroorganizmy glebowe, ryzosferowe czy epifityczne. Endofity kolonizując tkanki wewnętrzne mogą oddziaływać bezpośrednio na infekującego rośliny fitopatogena, a także indukować w nich silnie odporność, przyczyniać się do stymulacji kiełkowania nasion czy wzrostu korzeni i części nadziemnych będąc chronione przed czynnikami, które mogłyby im zagrażać w środowisku.

Autorka dostrzegła, że konieczne jest **dokładne poznanie i zrozumienie molekularnego podłoża** antagonistycznych oddziaływań endofitów bakteryjnych wobec fitopatogennych grzybów. Słusznie stwierdziła, że poznanie podłoża genetycznego tych interakcji pozwoli znacząco poszerzyć wiedzę uzyskaną dotąd na podstawie oceny aktywności biologicznej i analiz biochemicznych i podnieść skuteczność biologicznej ochrony roślin.

**Znaczenie podjęcia przez Doktorantkę badań z bardzo aktualnej i wymagającej natychmiastowych i skutecznych rozwiązań tematyki biologicznej ochrony roślin z wykorzystaniem bakterii endofitycznych jest ogromne i stwarza nadzieję na istotne poszerzenie wiedzy teoretycznej o mechanizmach działania endofitów i ich genetycznej regulacji oraz na opracowanie nowoczesnej, niezawodnej metodyki i procedury selekcjonowania składników czynnych biopreparatów oraz kontrolowania skuteczności tych biopreparatów, które mogą istotnie ograniczyć stosowanie środków chemicznych.**

**Podjęta tematyka doskonale wpisuje się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych i dyscyplinę nauk biologicznych.**

### **Analiza merytoryczna rozprawy doktorskiej i wyszczególnienie osiągnięć**

Ocenianą rozprawę doktorską **mgr Darii Chlebek** cechuje bardzo szerokie spojrzenie na sprawę kształtowania integrowanej ochrony roślin i zrównoważonego rolnictwa opartego na stosowaniu skutecznych biopreparatów, których składniki mikrobiologiczne odznaczają się zdolnością intensywnej kolonizacji, stymulacji wzrostu oraz właściwościami antagonistycznymi i konkurencyjnymi a także indukującymi odporność roślin, co skutkuje ochroną roślin przed fitopatogenami.

Bardzo rozległa wiedza Doktorantki, przekazana w przeglądzie literatury, pozwoliła na wstępne wyłonienie kandydatów na testowane bakterie endofityczne spośród typu *Proteobacteria*, w tym klasy  $\gamma$ -*Proteobacteria* jako najbardziej zróżnicowanej i dominującej, a w tej klasie wybranie ich spośród kilku rodzajów, biorąc pod uwagę głównie *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, nie pomijając w tym przeglądzie bardzo ważnego przedstawiciela typu Firmicutes - rodzaju *Bacillus*.

Autorka podkreśla znaczenie dla skutecznej biokontroli fitopatogenów przez bakterie endofityczne sześciu kluczowych mechanizmów: (1) konkurencji z patogenami o niszę i składniki odżywcze; oraz oddziaływania na patogeny poprzez metabolity tych bakterii: (2) antybiotyki, (3) enzymy lityczne,



(4) związki lotne; jak również poprzez oddziaływanie na chronioną przed patogenem roślinę poprzez:  
(5) indukowanie odporności systemicznej, (6) stymulowanie wzrostu roślinnego gospodarza.

Autorka, bardzo słusznie, równorzędną rolę przypisuje zdolności endofitów do efektywnej kolonizacji roślinnego gospodarza, bardzo obszernie opisując ten proces zachodzący co najmniej w pięciu etapach: (1) rozpoznania wydzielin korzeniowych i ruchliwości w kierunku rośliny, (2) adhezji do powierzchni korzeni, (3) tworzenia biofilmu, (4) penetracji powierzchni korzenia prowadzącej do (5) kolonizacji wewnętrznych części rośliny. Doktorantka opisuje dokładnie cechy warunkujące kolonizację i kodujące je geny: ruchliwość bakterii napędzaną chemotaksją oraz wskazując na powiązanie struktur odpowiedzialnych za ruch z procesem rozpoznania a także z indukcją odporności typu ISR. Podkreślić należy, że Autorka mocno naświetla, słabo doceniany dotąd w interakcjach roślina-mikroorganizm problem, przemieszczania się bakterii różniąc sposoby poruszania bakterii ruchem pływającym i rozpełzliwym zależnym od rotacji wici oraz ruchem drgającym uwarunkowanym obecnością pilusów typu IV. wymagających transkrypcji kilkudziesięciu różnych genów. Autorka zwraca bardzo mocno uwagę na złożoność interakcji zachodzących podczas kolonizacji. Podkreśla wzajemne interakcje pomiędzy fitopatogenem, rośliną i bakteriami kolonizującymi. Dostrzega, że podczas infekcji patogenem dochodzi do zmian składu wydzielin korzeniowych, co przyczynia się do wytwarzania silnych chemoatraktantów przyciągających bakterie endofityczne. Doktorantka podkreśliła też bardzo ważną rolę szlaku chemosensorycznego i transbłonowych receptorów oraz ich znaczący i bezpośredni wpływ na wici. Bardzo dokładnie opisane zostały etapy adhezji, które zapoczątkowują podziały, tworzenie mikrokolonii i biofilmu, w którym z kolei kluczowe miejsce zajmują egzopolimery, głównie polisacharydowe, kodowane przez wiele specyficznych, konserwatywnych genów skupionych w operonach. Kolejnym podstawowym czynnikiem kolonizacji są enzymy degradujące ścianę komórkową roślin (CWDEs) takie, jak: celulazy, ksylanazy, pektynazy i endoglukanazy. Ponadto zauważone zostało w przeglądzie literatury, że bakterie endofityczne są wyposażone w mechanizmy umożliwiające przezwyciężenie stresu oksydacyjnego, przed którym muszą się bronić w tkankach roślinnego gospodarza, dzięki posiadaniu wielu genów kodujących enzymy dezaktywujące reaktywne formy tlenu (ROS), w tym: katalazy (*katE*, *katG*), dysmutazy ponadtlenkowe (*sod1*, *sod2*), powodujące detoksykację wolnych rodników tlenków azotu, dioksygenazę flawohemoproteinową tlenku azotu (gen *hmp*), czy enzymy zaangażowane w beztlenową redukcję azotanów (geny *norRVW*). Poza tym u bakterii endofitycznych stwierdzono również obecność genów kodujących białka regulatorowe kontroli stresu oksydacyjnego: S-transferazy glutationowe (*gst*), peroksydazy tiolowe (*tpx*), peroksydazy glutationowe (*gpx*), reduktazy glutationowe (*gor*), hydrolazy glutationowe (*gor*) czy reduktazy wodoronadtlenku alkilu. Doktorantka podkreśliła bardzo ważny, a często pomijany fakt, indukcji syntezy wtórnych metabolitów przeciwdrobnoustrojowych i zewnątrzkomórkowych enzymów litycznych hamujących działanie fitopatogenów w szeroko opisywanym mechanizmie Quorum sensing. Autorka nie zapomniała o cząsteczkach sygnałowych, których charakter jest zależny od typu bakterii, a u  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -proteobakterii ich rolę pełnią autoinduktory tzw. laktony N-acetylo-homoseryny (NAHL) syntetyzowane przez dodanie łańcucha acylowego do cząsteczki S-adenozylometioniny (SAM). W przeglądzie literatury wskazano także na kluczową rolę w modulowaniu interakcji bakterii z ich środowiskiem wydzielanych przez bakterie endofityczne białek efektorowych, dla których w komórkach bakterii Gram-ujemnych opisano funkcjonowanie aż sześciu typów systemów translokacji i sekrecji białek (T1SS – T6SS), dzięki którym bakterie endofityczne wydzielają antybiotyki, wtórne metabolity, enzymy, toksyny a także aktywne peptydy.

**Zaznaczyć należy, że zarówno przegląd literatury jak i całą rozprawę doktorską cechuje imponująca wręcz dbałość o szczegóły i dostrzeganie wszystkich elementów skomplikowanej**



**interakcji roślin z mikroorganizmami endofitycznymi. Bardzo cenne, porządkujące rozległą wiedzę na temat tej interakcji i jej znaczenia dla nowoczesnych metod biologicznej ochrony są syntetyczne, uporządkowane, przypisane konkretnej funkcji zestawienia (tabelaryczne) ogromnej liczby genów zaangażowanych w poszczególne aspekty wzrostu, fizjologii i oddziaływania szczepów.**

**Rozprawa doktorska wniosła nowe pojęcia i niezwykle usystematyzowała wiedzę, a wręcz podała opracowany protokół postępowania w badaniach nad endofitami w kierunku selekcji spośród nich składników biopreparatów stosowanymi w rolnictwie.**

**Wielką zaletą rozprawy doktorskiej mgr Darii Chlebek jest to, że została ona oparta na innowacyjnych założeniach i solidnych podstawach:**

(1) Pierwszym z nich jest dobór modeli badawczych – mikroorganizmów i roślin: bakterii endofitycznych *Pseudomonas fluorescens* i *Serratia quinivorans* wyizolowanej z korzeni, odpowiednio, rzepaku *Brassica napus* i pietruszki *Petroselinum crispum* oraz szczepu referencyjnego *Enterobacter asburiae* wyizolowanego z kosmaczka wysokiego *Hieracium piloselloides* a także fitopatogenicznych grzybów stanowiących poważne zagrożenie dla roślin uprawnych: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium avenaceum*, *Colletotrichum dematium*, *Sclerotinia sclerotiorum* o różnej przynależności taksonomicznej a jednocześnie o ogromnym znaczeniu dla rolnictwa. Należy też podkreślić, że szczepy bakterii endofitycznych wcześniej zostały wybrane jako obiecujące we wspomaganiu procesu fitoremediacji gleb skażonych ksenobiotykami, w tym pestycydami oraz związkami organicznymi takimi jak: fenole i katechole. Bardzo trafny jest także wybór roślin do izolacji endofitów a jednocześnie do badań nad biologiczną ochroną przed fitopatogenami. Wybór do badań nad efektywnością ochrony *in vivo* rzepaku *Brassica napus*, rośliny należącej do Brasicaceae, dał możliwość mikroskopowego porównania kolonizacji z wzorcową rośliną należącą do tej rodziny *Arabidopsis thaliana*.

(2) Drugim, bardzo ważnym punktem decydującym o sukcesie badań, był odpowiedni dobór testów służących do potwierdzenia cech kandydatów na aktywne biologiczne składniki biopreparatów ochronnych obejmujących określenie aktywności antagonistycznej antygrzybowej oraz zdolności kolonizacji i wspomagania wzrostu roślin.

**W rozprawie postawiono pięć hipotez badawczych, które poddano weryfikacji, dzięki bardzo dobremu wytyczeniu celu głównego i cząstkowych.**

**Hipoteza zakładała, że badane szczepy bakterii endofitycznych: (1) hamują wzrost fitopatogenicznych grzybów, (2) wykazują różne mechanizmy aktywności biologicznej wobec fitopatogenów grzybowych, (3) efektywnie kolonizują tkanki roślinne, (4) przyczyniają się do ochrony rzepaku przed fitopatogenami. Niezwykle ważne i nowatorskie w ocenianej pracy doktorskiej jest założenie (5) istnienia wpływu grzybów fitopatogenicznych na ekspresję genów warunkujących aktywność biologiczną badanych szczepów bakterii.**

**Nadrzędnym celem** pracy doktorskiej była identyfikacja mechanizmów warunkujących wysoką aktywność biologiczną wybranych bakterii endofitycznych. Ogromną zaletą pracy doktorskiej jest podjęcie próby poznania i zrozumienia podstaw antagonistycznych oddziaływań między bakteriami endofitycznymi i zróżnicowanymi taksonomicznie grzybami fitopatogenicznymi na poziomie molekularnym.

Realizację celu nadrzędnego przeprowadzono przeprowadzając doświadczenia składające się na bardzo szczegółowe cele badawcze pozwalające określić: (1) aktywności biologiczne testowanych szczepów bakterii endofitycznych wobec zróżnicowanych taksonomicznie grzybów fitopatogenicznych (2) geny kluczowe dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślin w genomach badanych szczepów bakterii, (3) mechanizmy warunkujące oddziaływania antagonistyczne za pomocą testów



biochemicznych *in vitro*, (4) wpływ fitopatogenów na ekspresję genów potencjalnie zaangażowanych w proces biokontroli u badanych szczepów bakterii, (5) charakterystykę biochemiczną cech szczepów bakterii niezbędnych w procesie kolonizacji roślin i nawiązania interakcji endofitycznej z gospodarzem, zdolności badanych szczepów bakterii do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin, (7) wpływ szczepów endofitycznych na wzrost i ochronę rzepaku przed infekcją grzybem fitopatogenicznym.

**Weryfikacja hipotez i całkowita realizacja celów dokonana przez Doktorantkę możliwa była dzięki świetnemu, systematycznemu zaplanowaniu doświadczeń i dostosowaniu planów do możliwości aparaturowych i metodycznych.**

**Opracowane** w oparciu o postawioną hipotezę **bardzo szczegółowe cele cząstkowe** ukierunkowały badania według świetnego planu działania, który pozwolił na dokładne poznanie cech, mechanizmów i interakcji w układzie roślina—bakteria endofityczna—grzyb fitopatogeniczny. Aplikacja bakterii endofitycznej wyizolowanej z korzeni rzepaku do gleby w postaci mutantu rifampicylinowego pozwoliła określić nie tylko wpływ na parametry wzrostu rzepaku: masę korzeni i części nadziemnych i ich długość ale także stopień kolonizacji wyznaczony na podstawie liczebności mutantu w glebie oraz tkankach rzepaku. Przeprowadzono niezwykle ważny test przemieszczania się szczepu pomiędzy glebą a rośliną, co oznaczano w 2-tygodniowych odstępach w trakcie 35-dniowego okresu wegetacji.

**Rozprawa doktorska jest przykładem niezwykle umiejętnego i nowoczesnego wykorzystania różnorodnych metod koniecznych do realizacji założeń i celów, co wymagało połączenia zróżnicowanych dziedzin mikrobiologii, genetyki, biochemii, fizjologii roślin, ekologii i nauk rolniczych.**

**Zwraca uwagę systematyczność publikowania prac zawierających wyniki dla poszczególnych szczepów i przekazujących szeroką wiedzę teoretyczną, a w szczególności metodyczną oraz porównującą uzyskane wyniki z osiągnięciami innych zespołów badawczych.**

**Zakres badań wykonanych przez Doktorantkę, jest bardzo szeroki i obejmuje przeprowadzenie badań:**

- oddziaływania antagonistycznych bakterii endofitycznych *in vitro* wobec fitopatogenów grzybowych, przy zastosowaniu dla wskazania mechanizmów tych oddziaływań aż czterech odrębnych testów: podwójnej hodowli na stałym podłożu PDA oraz oddziaływania na fitopatogena metabolitów wydzielanych do podłoża przez bakterie endofityczne, lotnych związków oraz supernatantów,

- sekwencjonowanie i analizę funkcjonalną genomów badanych szczepów - genomowe DNA szczepów *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 izolowano z użyciem zestawu GeneMatrix Bacterial and Yeast Genomic Purification Kit a funkcjonalną adnotację genów prowadzono z użyciem wielu narzędzi bioinformatycznych i baz danych, w tym programu eggNOG 5.0 z ograniczeniem ortologicznym jeden do jednego. Drzewo filogenetyczne szczepu *P. fluorescens* skonstruowano na podstawie podobieństwa sekwencji białkowych szczepu BRZ63 i sekwencji białkowych dobrze opisanych w literaturze szczepów należących do rodzaju *Pseudomonas* oraz szczepu *E. coli* K-12, a drzewo filogenetyczne szczepu *S. quinivorans* skonstruowano na podstawie podobieństwa sekwencji białkowych szczepu KP32 i sekwencji białkowych dobrze opisanych w literaturze szczepów należących do rodzaju *Serratia* oraz szczepu *Klebsiella pneumoniae* ATCC jako grupę zewnętrzną.

W rozprawie doktorskiej scharakteryzowano genomy szczepów bakterii endofitycznych i przedstawiono w nich klasyfikację funkcjonalną klastrów grup ortologicznych (COGs) oraz zidentyfikowano geny kluczowych dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślin. Cechy warunkujące efektywną kolonizację roślin określono u *P. fluorescens* BRZ63, *S. quinivorans* KP32 oraz szczepu referencyjnego *E. asburiae* 4FJK.



Przeprowadzono także analizy właściwości potencjalnie warunkujących aktywność biologiczną szczepów bakterii endofitycznych oceniając ich zdolności do produkcji: sideroforów, enzymów litycznych, acetoiny i 2,3-butanodiolu, cyjanowodoru, kwasu indolilo-3-octowego, kwasu salicylowego, deaminazy ACC oraz zdolność do rozpuszczania fosforanów.

Bardzo ciekawym zadaniem było określenie wpływu patogenów grzybowych na ekspresję wybranych genów u badanych szczepów bakterii, które objęło przygotowanie filtratów grzybowych a następnie hodowli bakteryjnych z filtratami grzybowymi.

Dokonano izolacji całkowitego RNA i syntezę cDNA: całkowite RNA z hodowli bakteryjnych traktowanych filtratami po hodowli grzybów, jak i kontrolnych, izolowano przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit a syntezę cDNA prowadzono w trzech powtórzeniach, stosując 1 µg całkowitego RNA, losowe startery (ang. Random Hexamer Primers) i zestaw RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit.

Analiza ekspresji wybranych genów objęła projektowanie i walidację starterów, które zebrano w osobnych tabelach dla szczepu *P. fluorescens* BRZ63 (Tabela 2. Opisująca 2 startery dla genów referencyjnych, aż 13 starterów dla genów potencjalnie zaangażowanych w biokontrolę i 2 startery dla genów kodujących enzymy antyoksydacyjne) i szczepu *S. quinivorans* KP32 (Tabela 3. Opisująca 2 startery dla genów referencyjnych, 7 starterów dla genów potencjalnie zaangażowanych w biokontrolę i 2 startery dla genów kodujących enzymy antyoksydacyjne). Ekspresję wybranych genów determinujących aktywność przeciwgrzybową oraz genów enzymów antyoksydacyjnych oceniano w reakcji qPCR z użyciem LightCycler® 480 SYBR Green I Master.

Badano aż 18 właściwości (zestawionych w tabeli 17) warunkujących efektywną kolonizację roślin przez 3 testowane szczepy bakterii, w tym ocenę zdolności ruchu, autoagregacji, tworzenia biofilmu metodą z fioletem krystalicznym, produkcji egzopolisacharydów oraz substancji sygnałowej laktonu homoseryny AHL z użyciem wieloetapowej metody kolorymetrycznej. Przeprowadzono ocenę wpływu patogenów na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Bardzo ważna, m.in. dla określenia konkurencji o związki węgla była ocena zdolności do wykorzystywania związków organicznych jako źródło węgla i energii. Zdolność testowanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 do wzrostu w obecności wybranych związków organicznych jako jedyne źródła węgla i energii określano przy użyciu 96-dołkowych mikropłytek zawierających dołki z 18 substratami: glukozą, arabinozą, ramnozą, mannozą, trehalozą, mannitolem oraz kwasami: bursztynowym, 4-hydroksyfenylooctowym, fumarowym, benzoesowym, jabłaczanowym, cytrynowym, p-kumarowym w stężeniach 1 mM.

Oceniono też zdolność badanych szczepów do kolonizacji roślin podejmując się niezwykle ważnego zadania znakowania badanych szczepów białkiem zielonej fluorescencji EGFP (ang. *Enhanced Green Fluorescent Protein*), które obejmowało przygotowanie komórek elektrokompetentnych oraz elektrotransformację tych komórek i selekcję wyznakowanych transformantów. Kompetentne komórki bakterii transformowano wektorem pMP4566 z wklonowanym genem *egfp* o konstytutywnej ekspresji a obserwacji komórek elektotransformantów niosących plazmid pMP4566 dokonano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon ECLIPSE-Ni-U, w ciemnym polu, przy fali wzbudzenia wynoszącej 480 nm (światło niebieskie) oraz fali emisji wynoszącej 510 nm (światło zielone). Zdolność testowanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 wyznakowanych białkiem EGFP do kolonizacji roślin badano przez inokulację nasion modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* Col-0 oraz *Brassica napus* L. Kolonizację wewnętrznych tkanek roślin *A. thaliana* Col-0 oraz *B. napus* L. przez badane szczepy bakterii potwierdzano, w 7-dniowych siewkach roślin zainokulowanych *Rhizoctonia solani* dokonując izolacji poprzez posiew maceratu wysterylizowanych powierzchniowo siewek na stałe



podłoże LB. Obecność świecących w promieniach lampy UV kolonii na płytkach z tetracykliną świadczyła o zdolności bakterii do kolonizacji rośliny i endofitycznego stylu życia. Zdolność wyznakowanych szczepów *P. fluorescens* BRZ63 i *S. quinivorans* KP32 do kolonizacji roślin obserwowano *in planta* z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego w inokulowanych danym szczepem 7-dniowych siewkach roślin *A. thaliana* Col-0 i *B. napus* L. Wpływu bakterii endofitycznych na wzrost i ochronę rzepaku zbadano przygotowując mutanty rifampicynowe każdego z badanych szczepów bakterii wyznakowanych wcześniej białkiem EGFP. Bakterie wprowadzano w zawiesinie  $10^8$  j.t.k. ml<sup>-1</sup> do gleby z wysianymi nasionami rzepaku i inokulowanej krążkami agaru z grzybnią fitopatogenicznego *R. solani* a rośliny zbierano w 14., 28. oraz 35. dniu hodowli. Izolację bakterii prowadzono z 1 g masy roślinnej oraz 10 g gleby i szacowano ich liczebność na podłoże LB z rifampicyną.

W publikacjach i jak i przeglądzie literatury zawartym w rozprawie doktorskiej wymieniono oraz wzięto pod uwagę w badaniach bardzo szeroki zakres mechanizmów i związków takich, jak: antybiotyki, siderofory, enzymy hydrolityczne, cyjanowodór, wytwarzanych przez bakterie endofityczne ograniczające wzrost grzybów fitopatogenicznych i rozwój chorób wywoływanych przez fitopatogeny.

**Opis ten wskazuje na bardzo dobre opanowanie przez Doktorantkę podstaw teoretycznych bezpośrednich mechanizmów działania biopestycydów.**

**O umiejętnościach nie tylko planowania i przeprowadzania badań ale także wnikliwej analizy i syntezy ogromnej liczby uzyskanych wyników świadczy dobitnie umiejętność sformułowania zaledwie ośmiu klarownych, potwierdzonych dokładnie uzyskanymi wynikami wniosków, które wskazują, że w recenzowanej rozprawie dokonano dokładnej weryfikacji postawionej hipotezy i spełniono wszystkie cele:**

- Stwierdzono, że testowane wybrane do badań bakterie endofityczne *P. fluorescens* BRZ63 oraz *S. quinivorans* KP32 wykazują aktywność antagonistyczną wobec patogenów grzybowych należących do różnych grup taksonomicznych, ale jest ona zróżnicowana i zależna od typu testu użytego do badań,
- Wykazano, że w genomach szczepów bakterii endofitycznych obecne są geny pozwalające tym szczepom oddziaływać poprzez różne mechanizmy na fitopatogeny, kolonizować rośliny i stymulować ich wzrostu,
- Niezwykle ważnym osiągnięciem jest wykazanie różnic w poziomie ekspresji genów bakterii endofitycznych zaangażowanych w mechanizmy biokontroli w odpowiedzi na oddziaływanie badanych fitopatogenów, czyli dwukierunkowego oddziaływania obu partnerów w relacji bakteria endofityczna—patogen,
- Badając oddziaływanie filtratu hodowli fitopatogena w hodowlach bakterii stwierdzono, że w tej interakcji bakteria endofityczna—patogen podstawową rolę mogą odgrywać różne procesy i metabolity zależnie od bakterii endofitycznej:
  - a) nierybosomalne peptydy, w tym piowerdyna i wiskozylna oraz oddziaływania poprzez stres oksydacyjny w hodowli szczepu *P. fluorescens* BRZ63, gdyż filtrat grzybowy indukował w nich ekspresję genów zaangażowanych w produkcję tych peptydów oraz genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny,
  - b) chitynazy, cyjanowodór, enterobaktyna i acetoina, gdyż filtrat fitopatogena doprowadził do wzrostu ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę tych metabolitów w hodowli szczepu *S. quinivorans* KP32,





- Wykazano, że testowane bakterie endofityczne posługują się różnymi mechanizmami w biokontroli fitopatogenów i stymulacji wzrostu roślin, na co wskazuje ich zdolność wydzielania enzymów litycznych, produkcji sideroforów, lotnych związków i rozpuszczania fosforanów,
  - Testowane szczepy bakterii endofitycznych mogą skutecznie kolonizować rośliny, gdyż cechuje je zdolność do aktywnego ruchu, autoagregacji, produkcji egzopolisacharydów i tworzenia biofilmu,
  - W badaniach wegetacyjnych i mikroskopowych z użyciem transformantów i mutantów rifampicilinowych wykazano, że oba szczepy bakterii endofitycznych są efektywnymi kolonizatorami roślin z rodziny Brassicaceae: *A. thaliana* i *B. napus*.
- Bardzo ważnym osiągnięciem rozprawy doktorskiej jest uzyskanie istotnego efektu ochronnego testowanej rośliny – rzepaku przed jej patogenem z gatunku *Rhizoctonia solani* przez wyizolowane z korzeni endofityczne szczepy bakteryjne.**

Badania ochronne *in vivo* pozwoliły wykazać, że trend oddziaływania wybranym szczepem endofitycznym na parametry wzrostu zarówno części podziemnych jak i nadziemnych jest bardzo zbliżony, chociaż istotność statystyczna dla tych dwóch części roślin i dwóch parametrów nieco się różni.

Ten spektakularny sukces o wielkim znaczeniu aplikacyjnym i osiągnięcie naukowe obejmujące uzyskanie biologicznej ochrony rośliny przed fitopatogenem oraz rozpracowanie genetycznego podłoża tego oddziaływania poprzedzony został uzyskaniem niezwykle ważnych wyników na każdym etapie badań poczynając od doświadczeń biologicznych efektu biotycznego, który został pięknie i bardzo dokładnie udokumentowany tablicami zdjęć makroskopowych zamieszczonymi w Rysunkach 2 i 3 oraz w Fig. 2 publikacji z 2022 roku, w której zamieszczone zostały także na wykresie dane liczbowe wzrostu strzępek fitopatogenów przy bezpośrednim oddziaływaniu szczepu *S. quinivorans* oraz jego metabolitów i związków lotnych. Szkoda, że takie porównawcze zestawienie liczbowych danych dla zahamowania wzrostu fitopatogenów przez oba testowane szczepy bakterii endofitycznych nie zostały przedstawione w opracowaniu za Rysunkami 2 i 3.

Bardzo dużo ważnych informacji charakteryzujących genomy i porównujących poszczególne cechy genomów szczepów *P. fluorescens* i *S. quinivorans* zamieszczonych zostało w Tabeli 5 wskazując na różnice w liczbie genów (RNA) i liczbie sekwencji kodujących (CDSs) oraz liczbie genów przypisanych do klastrów grup ortologicznych (COGs) obejmujących 20 kategorii. Niezwykle informatywna jest Tabela 6., gdzie zebrano dane o tych 20 funkcjonalnych klastrach grup ortologicznych oraz Tabela 7., w której sklasyfikowano szlaki przy użyciu narzędzia KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) genów związanych oddziaływaniami molekularnymi, środowiskowymi oraz metabolizmem i takimi procesami wewnątrzkomórkowymi jak *Quorum sensing*, tworzenie biofilmu, chemotaksja i składanie wici przyporządkowując je do 4 kategorii pierwszorzędowych.

Drzewa filogenetyczne przedstawione Rysunkach 4 i 5 bardzo dobrze ilustrują przynależność gatunkową testowanych izolatów.

Imponującą liczbę danych zawierają Tabele 8 i 9 przedstawiające, odpowiednio, geny determinujące istotne cechy związane z biokontrolą i promowaniem wzrostu roślin oraz klastry genów metabolitów wtórnych zidentyfikowane w genomie *P. fluorescens* BRZ63. W genomie tego szczepu zidentyfikowano ponadto 134 geny kodujące enzymy aktywne w syntezie bądź degradacji węglowodanów, obecne w bazie danych CAZy (ang. *Carbohydrate Active Enzymes*) (Tabela 11), w których klasach hydrolaz glikozydowych (GH, ang. *Glycoside Hydrolase*) i esteraz węglowodanowych (CE, ang. *Carbohydrate Esterases*) zostały zidentyfikowane geny aż siedmiu enzymów o potencjale degradacji polimerów zawartych w ścianach komórkowych grzybów i roślin:  $\beta$ -1,3-glukanu, celulozy, hemicelulozy, pektyny, peptydoglikanów, polisacharydów i chitoooligosacharydów (Tabela 12). Analogiczne dane dla szczepu



*S. quinivorans* zebrano w Tabelach 13, 14 i 15. Na szczególną uwagę w genomie *S. quinivorans* zasługują 162 geny kodujące białka o potencjalnej aktywności w syntezie bądź degradacji węglowodanów oraz CAZymes o potencjale degradacji takich polimerów ściany komórkowej, jak hemicelulozy, pektyny i peptydoglikany.

Ogromną liczbę bardzo ważnych danych charakteryzujących testowane szczepy bakterii endofitycznych dostarczono dodatkowo w badaniach biochemicznych (Tabela 16.) – dane o aż 12 cechach, czyli zdolnościach trzech testowanych szczepów bakterii (w tym referencyjnego szczepu *Enterobacter asburiae*) do produkcji aż 12 różnych niezwykle istotnych dla interakcji z rośliną metabolitów. Dane te wskazują na przewagę szczepu *P. fluorescens* w poziomie syntezy IAA, SA i zdolności do rozpuszczania fosforanów.

Ogromną wartość mają wyniki poziomu ekspresji genów określanych metoda RT-qPCR wskazujące nie tylko na poziom ekspresji genów u danego szczepu, ale co niezwykle ważne, na ogromny wpływ filtratów uzyskanych z hodowli każdego z czterech testowanych fitopatogenów na ekspresję niektórych genów u *P. fluorescens* (Rysunki 6-9): syntetaz nierybosomalnych peptydów (*nrpS*), piowerdyny (*pvdL*), wiskozyny (*vsmA*) a u *S. quinivorans* (Rysunki 10-13): acetoiny (*budA*), syntazy cyjanowodoru (*hcnC*), chitynazy (*chiA*), dehydrogenazy mannitolu (*mtlR*) i dwufunkcyjnej liazy izochoryzmatu (*entB*), przy czym wykazano duże różnice pomiędzy oddziaływaniem fitopatogenów - najsłabsze oddziaływanie filtratów *F. avenaceum* i najsilniejsze, na największą liczbę genów, oddziaływanie grzybów z rodzajów *Colletotrichum* i *Sclerotinia*.

Ponadto wykazano, że filtry cztery testowanych fitopatogenów wpływały na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne katalazę (*katB*) i dysmutazę ponadtlenkową (*sodB*) u *P. fluorescens* i *S. quinivorans* (odpowiednio Rysunek 14 i 15), przy czym *R. solani* i *S. sclerotiorum* wpływały na ekspresję obu genów a *F. avenaceum* tylko na ekspresję *SodB*.

W badaniach biologicznych i biochemicznych bardzo wyraźnie zobrazowano silną zdolność do ruchu, autoagregacji i tworzenia biofilmu, przy czym szczep *P. fluorescens* i *S. quinivorans* miały znaczną przewagę nad szczepem referencyjnym.

Biochemiczna charakterystyka szczepów pod kątem kolonizacji dostarczyła danych o cechach określanych w aż 18 testach (Tabela 17.). Zaobserwowano też wpływ filtratów fitopatogenów na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, SOD i CAT (Tabela 18), u szczepu *P. fluorescens* traktowanego fitopatogenami podwyższona (w porównaniu do kontroli) była aktywność obu enzymów a u szczepu *S. quinivorans* jedynie aktywność CAT.

Pięknym i bardzo obrazowym ukoronowaniem uzyskanych wcześniej wyników są zdjęcia dokumentujące obserwację, przeprowadzoną w mikroskopie fluorescencyjnym, kolonizacji *B. napus* i *A. thaliana* przez wyznakowane białkiem EGFP szczepy *P. fluorescens* i *S. quinivorans* przy czym stwierdzono, że endofity kolonizowały głównie powierzchnię i wewnątrz korzeni ale szczep *S. quinivorans* także wnikał do części nadziemnej przez szparki (Rysunki 18 i 19 oraz Fig. 3. publikacji z 2020 roku).

Testy wegetacyjne, w których masa części nadziemnych i korzeni w roślinach ko-inokulowanych *R. solani* wzrastała ponad 3-krotnie w porównaniu z kontrolą inokulowaną tylko fitopatogenem, przekonująco potwierdziły bardzo silne ochronne właściwości szczepów bakterii endofitycznych, a co szczególnie ważne, w trakcie całego 35-dniowego okresu wegetacji wykazano obecność obu bakterii w glebie i tkankach rzepaku (Rysunek 22), czyli udowodniono kolonizację i przeżywanie testowanych bakterii endofitycznych zarówno w glebie jak i w roślinie oraz możliwość ich przemieszczania się pomiędzy tymi dwoma środowiskami.



**Podczas analizy rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag oraz pytań:**

1. W pracy doktorskiej zacytowanych zostało wiele definicji i podziałów endofitów roślinnych, ale dla całościowego ujęcia tematyki Autorka powinna odnieść się do bardzo obszernej analizy endofitów zamieszczonej w publikacji z 2011 autorstwa Partida-Martinez i Heil, którzy w klasyfikacji endofitów ujęli zarówno bakterie, jak i grzyby, w tym wśród grzybowych endofitów wyodrębniając endofity typu I. - clavicipitaceus (wytwarzające alkaloidy) i typu II. nie-clavicipitaceus (obejmujące Basidiomycota a głównie Ascomycota), a także tak ważne mikroorganizmy, jak diazotrofy czy grzyby mykoryzowe.
2. W rozdziale Materiały i metody nazwy gatunkowe testowanych szczepów bakterii endofitycznych oraz fitopatogenów grzybowych powinny być podane wraz z przybliżeniem przynależności taksonomicznej, aby podkreślić przynależność testowanych bakterii do jednego typu *Proteobakterie* i wskazać na różnice w przynależności do odrębnych rzędów i rodzin *Pseudomonas fluorescens* - *Proteobakterie*, *Gamma Proteobakterie*; *Serratia quinivorans* - *Proteobakterie*, *Enterobacteriales*, *Yersiniaceae*; *Enterobacter asburiae* - *Proteobakterie*, *Gamma Proteobakterie*, *Enterobacteriales*, *Enterobacteriaceae*  
Podobnie w przypadku czterech grzybów fitopatogenicznych, aby wskazać na zróżnicowanie ich przynależności do dwóch typów oraz czterech odrębnych rodzin: *Rhizoctonia solani* W70 (RS) – *Ceratobasidiaceae*, *Cantharellales*, *Agaricomycotina*, *Basidiomycota*; *Fusarium avenaceum* (FA) – *Nectriaceae*, *Hypocreales* *Pezizomycotina*, *Ascomycota*; *Colletotrichum dematium* K (CD) – *Glomerellaceae*, *Glomerellales*, *Pezizomycotina*, *Ascomycota*; *Sclerotinia sclerotiorum* – *Sclerotiniaceae*, *Helotiales*, *Pezizomycotina*, *Ascomycota*.
3. Jak oddziaływały szczepy endofitycznych bakterii *P. fluorescens* i *S. quinivorans* na roślinę w nieobecności patogena? Czy stymulowały wzrost roślin, na co wskazywać mogły określone w pracy cechy takie, jak zdolność wytwarzania fitohormonu IAA i aktywność deaminazy ACC.
4. Czy zbadano, w nieopisanych w rozprawie doświadczeniach, oddziaływanie testowanych szczepów bakterii endofitycznych na inne rośliny i ich ochronę przez fitopatogenami?
5. Czy testowane szczepy byłyby skuteczne w ochronie roślin przed pozostałymi testowanymi *in vitro* szczepami grzybów fitopatogenicznych? Czyli czy mogą mieć szerokie zastosowanie w ochronie różnych gospodarzy roślinnych przed różnymi fitopatogenami?
6. Oddziaływanie bakterii endofitycznych i ich metabolitów na fitopatogeniczne grzyby badano na podłożu PDA, na którym ujawnia się głównie mechanizm antybiozy. Czy znany jest efekt tego oddziaływania na innym podłożu?

**Drobne uwagi edycyjne i językowe**

Rozprawa doktorska **mgr Darii Chlebek** wyróżnia się wielką starannością przygotowania i przejrzystością przedstawienia wiedzy stanowiącej podstawę do podjętych badań, opisu zadań, metodyki i wyników zarówno w całym opracowaniu jak i obu publikacji składających się na cykl będący podstawą rozprawy.

Praca doktorska napisana została bardzo ładną polszczyzną, niemal bez błędów literowych czy edycyjnych, z zastosowaniem prawidłowej terminologii naukowej i bez stosowania (poza jednym) zapożyczeń z języka angielskiego.

Zauważyłam jedynie pojedynczy błąd literowy w tabeli 8, niejednorodność w rozwijaniu skrótów od nazw angielskojęzycznych – powinny być pisane wszędzie jak nazwy własne, tak jak rozwinięcie



skrót białka EGFP na stronie 56, brak kropek po liczebnikach porządkowych (str. 59) oraz pomyłkę w podpisie Rysunku 18. dotyczącą mikroskopu - stereoskopowy zamiast fluorescencyjnego.

Należałoby używać słowa rozpuszczanie fosforanów, a nie ich solubilizacja, użytego m.in. w rozdziale 5.7.8, Tabeli 8, 13, 16 i we wnioskach.

Mam też tylko jedną uwagę do użycia w rozprawie doktorskiej błędnej terminologii naukowej – mianowicie cytując publikację Hong i in. (2016) Autorka napisała o mikroflorze endofitycznej, zamiast o mikrobiocie czy mikroorganizmach. Z uwagi na przynależność taksonomiczną bakterii, grzybów czy Protista do innych królestw niż rośliny, termin mikroflora nie powinien być używany w stosunku do mikroorganizmów, gdyż odnosi się do bardzo starej, nieaktualnej taksonomii.

Sugerowałabym posługiwanie się w całej pracy doktorskiej nie tylko symbolem szczepu, ale też jego nazwą gatunkową, tak jak to zrobiła Doktorantka np. w podpisach Rysunku 16 czy Tabeli 17, co znacząco ułatwia zapoznavanie się z prezentowanymi wynikami i ich dyskusją.

Podkreślam, że powyższe uwagi i pytania mają charakter dyskusyjny wynikający z bardzo dużej złożoności i wielokierunkowości badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej. Nie umniejszają one wartości tej pracy a potwierdzają tylko moją bardzo wysoką ocenę.

**Analiza tej niezwykle interesującej rozprawy doktorskiej skłania mnie do zadania kilku pytań Doktorantce, którą na podstawie oceny jego rozprawy postrzegam jako eksperta od problematyki mikroorganizmów endofitycznych roślin i ich znaczenia w biologicznej ochronie roślin:**

1. Czy Doktorantka może porównać skuteczność testowanych szczepów z dostępnym na rynku komercyjnym biopreparatem?
2. Jakie są perspektywy tworzenia mieszanych preparatów łączących różne bakterie endofityczne z endofitami o innej przynależności taksonomicznej, np. grzybami mykoryzowymi?
3. Czy skuteczność ochronnego działania bakterii endofitycznych może znacząco podnieść łączenie ich w jednym preparacie z elicytorami abiotycznymi typu analogów kwasu salicylowego, takich jak BTH (benzotiadiazol) czy polimerów ścianowych jak chitozan czy glukany?
4. Czy biopreparat zawierający bakterie endofityczne mógłby być stosowany wraz z ograniczonymi dawkami chemicznych środków ochrony roślin, a jeśli tak, to w jaki sposób, w jakich proporcjach?
5. W jakim stopniu organ rośliny, z której wyizolowano bakterię endofityczną determinuje miejsce wprowadzania preparatu ochronnego oraz skuteczność w ochronie poszczególnych organów roślin, jak również w kolejnych okresach wegetacji?
6. Jak dobrać typ formulacji, okres oraz częstotliwość wprowadzania preparatu zawierającego bakterie endofityczne, aby uzyskać maksymalną skuteczność przy najlepszym rachunku ekonomicznym oraz uniwersalność preparatu, czyli możliwość jego stosowania w ochronie różnych roślin, przed różnymi fitopatogenami oraz w różnych typach rolnictwa – zarówno konwencjonalnego jak i ekologicznego a także w różnych typach upraw – polowych i szklarniowych?

**Podsumowanie**

Rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek wytycza nowe drogi postępowania i dostarcza doskonale opracowaną kompleksową procedurę, jaką należy stosować przy testowaniu mikrobiologicznych składników biopreparatów nawożeniowych, stymulujących wzrost oraz chroniących rośliny przed fitopatogenami odległymi należącymi do królestwa Grzybów.

Recenzowana praca doktorska jest godnym naśladowania wzorem holistycznego podchodzenia do badań poprzez łączenie zaawansowanych badań molekularnych z pełnym zakresem badań biologicznych:



roślinnych, mikrobiologicznych, mikroskopowych i biochemicznych oraz poprzez łączenie tradycyjnych i nowoczesnych metod w celu zapewnienia najwyższej jakości i skuteczności tworzonych preparatów do zastosowania w zrównoważonym rolnictwie i integrowanej ochronie roślin.

Praca doktorska mgr Darii Chlebek została bardzo dobrze napisana, cechuje ją innowacyjność poruszanych problemów oraz wykorzystanych narzędzi badawczych, zgodność z założeniami i dokładna realizacja postawionych celów.

**Rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek wnosi istotny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.**

Oceniana rozprawa doktorska bardzo znacząco przyczynia się do poszerzenia wiedzy o z zakresu zrównoważonego rolnictwa i bioróżnorodności, interakcji mikroorganizm-roślina, biologicznej ochrony roślin i biostymulacji, mikroorganizmów endofitycznych oraz mechanizmów zaangażowanych w ich oddziaływanie z chronioną rośliną i zwalczanym fitopatogenem, a przede wszystkim wyjaśnia skomplikowane podłoże molekularne tych mechanizmów i oddziaływań.

Recenzowana praca doktorska dostarcza też doskonały, kompletny zestaw metod i technik badawczych umożliwiających pozyskiwanie i selekcję endofitów roślin jako składników biopreparatów.

Wysoka jakość rozprawy doktorskiej i publikacji stanowiących jej podstawę wskazują, że mgr Daria Chlebek jest ambitnym młodym naukowcem z doskonale opanowanym warszatem badawczym i rozumiejącym złożoność zadań badawczych prowadzących do rozwiązywania naukowych problemów w dyscyplinie nauk biologicznych.

### **Wniosek końcowy**

Z całym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Darii Chlebek **spełnia wymagania art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018**

**Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce** (Dz.U. 2023 r. poz. 742 ze zm)


**i stanowi podstawę do nadania stopnia doktora**

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Darii Chlebek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie **wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej** mgr Darii Chlebek **stosowną nagrodą** ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, jej nowatorstwo i kompleksowe zastosowanie zaawansowanych, odpowiednio dobranych i bardzo dobrze opanowanych technik badawczych oraz aplikacyjność uzyskanych wyników.

Lublin, 7.09.2023 r.



*dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ścisel, prof. UMCS*

