

Lublin, 07.09.2023

prof. dr hab. Magdalena Frąc
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

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 wykonana w Zespole Biochemii i Genetyki Mikroorganizmów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem promotora dr hab. Katarzyny Hupert-Kocurek, prof. UŚ oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Pacwy-Płociniczak. Recenzja została wykonana na podstawie umowy na wykonanie recenzji z dnia 10 lipca 2023 roku, zawartej z Uniwersytetem Śląskim w Katowicach, reprezentowanym przez Prodziekana Wydziału Nauk Przyrodniczych prof. dra hab. Piotra Świątka.

1. Struktura rozprawy doktorskiej – ocena formalna

Rozprawa doktorska Pani mgr Darii Chlebek liczy 182 strony, w tym 22 rysunki, 26 fotografii, 18 tabel, 327 pozycji literatury, a także 53 strony, zawierające teksty dwóch publikacji naukowych. Badania opisane w rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone w ramach dwóch projektów finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki projektu OPUS20 pn. „*Badania molekularne wpływu grzybowych patogenów roślin na wybrane bakterie endofityczne wykazujące aktywność biologiczną*” oraz finansowanego przez Ministerstwo Edukacji i Nauki projektu pn. „*Zastosowanie szczepów bakterii endofitycznych w ochronie przed grzybowymi patogenami rzepaku w hodowlach wazonowych*”.

Rozprawa doktorska została bardzo starannie przygotowana w postaci złożonego z 8 rozdziałów opracowania, zawierającego liczne podrozdziały. W kolejnych rozdziałach przedstawione zostały: WSTĘP (1), PRZEGLĄD LITERATURY (2), CEL PRACY (3), HIPOTEZY BADAWCZE (4), MATERIAŁY I METODY (5), WYNIKI (6), DYSKUSJA

WYNIKÓW (7) , WNIOSKI (8). Dodatkowo w rozprawie znalazły się streszczenia w języku polskim i angielskim, literatura oraz agenda, zawierająca dwie publikacje naukowe i oświadczenia doktorantki i współautorów publikacji. **Pierwsze dwa rozdziały**, liczące 38 stron należą do części pracy wprowadzających czytelnika do poruszanej tematyki oraz badań, obejmując charakterystykę zarówno grzybowych patogenów roślin, jak też endofitów bakteryjnych wraz z przedstawieniem mechanizmów, które wykorzystują w biokontroli. Przegląd literatury rzetelnie nakreśla zagadnienia badawcze, którymi zajmuje się Doktorantka, wskazując na Jej gruntowne pogłębienie wiedzy z obszaru istotnego dla zrównoważonego rozwoju, znaczenia chorób roślin powodowanych przez fitopatogeny oraz wykorzystania mikroorganizmów endofitycznych w zwalczaniu grzybów powodujących choroby roślin. Na kolejnych 19 stronach Doktorantka przedstawiła **cel pracy, hipotezy badawcze oraz materiały i metody** wykorzystane w ramach prowadzonych badań. Część metodyczna została przygotowana bardzo skrupulatnie, została podzielona na kilka podrozdziałów, przedstawiających zarówno charakterystykę testowanych szczepów, opisy eksperymentów, a także bardzo szeroki wachlarz metod zastosowanych w badaniach i odrębny podrozdział poświęcony analizie statystycznej. Najbardziej rozbudowaną część rozprawy doktorskiej stanowią rozdziały **Wyniki, Dyskusja wyników i Wnioski**, które zostały przedstawione na 49 stronach, przy czym rozdział wyniki został podzielony na podrozdziały obejmujące omówienie uzyskanych rezultatów badań, biorąc pod uwagę zastosowane metody badań, co pokazuje ich logiczny ciąg, począwszy od charakterystyki szczepów bakteryjnych, poprzez identyfikację mechanizmów warunkujących ich oddziaływania antagonistyczne, a skończywszy na ocenie wpływu testowanych izolatów na wzrost roślin i ich ochronę przed chorobami grzybowymi. W kolejnych rozdziałach umieszczone zostały streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, które w syntetyczny sposób podsumowują zaprezentowaną w pracy problematykę oraz najważniejsze wyniki badań. **Spis literatury** liczy 327 pozycji, przy czym prace z ostatnich 10 lat stanowią około 75%, a z ostatnich 20 lat 95% wszystkich zestawionych pozycji literaturowych, a także należy dodać, że z wyjątkiem jednej publikacji wszystkie publikacje są anglojęzyczne. Wskazuje to na podjęcie przez mgr Darię Chlebek bardzo aktualnej tematyki badawczej. Na podstawie zawartego w dysertacji, obszernego spisu literatury można wnioskować, że Doktorantka przeprowadziła gruntowną analizę podjętej problematyki skupiając się na najnowszych osiągnięciach w tym obszarze. Następnie Autorka zamieściła agendę zawierającą dwie opublikowane prace oraz oświadczenia współautorów. Układ rozprawy jest typowy dla

doktorskich prac eksperymentalnych, a tytuł dysertacji jest trafny i odpowiada treści pracy. **Pod względem formalnym bardzo wysoko oceniam przygotowanie rozprawy doktorskiej.**

2. Ocena podjętej tematyki badawczej rozprawy

Jednym z ważniejszych wyzwań współczesnej produkcji żywności, w dobie zmian klimatycznych i związanej z nimi migracji fitopatogenów, jest ochrona roślin przed patogenami grzybowymi, które wywołując choroby ważnych globalnie upraw, powodują obniżenie plonów i ogromne straty ekonomiczne. Do kluczowych patogenów należą grzyby, które często bytują w glebie, a w wyniku kontaktu z podatnym gospodarzem prowadzą do infekcji roślin, powodując obniżenie jakości upraw, a w konsekwencji żywności i pasz. W związku z tym dbałość o gleby, ich jakość, zdrowotność i żyzność, należy do ważnych składowych wpływających na bioróżnorodność mikroorganizmów glebowych oraz kontrolę fitopatogenów. Wciąż poszukiwane są nowe rozwiązania i strategie poprawiające kontrolę fitopatogenów, które często obejmują wykorzystanie aktywnych mikroorganizmów, pochodzących z różnych naturalnych środowisk, w także bakterii endofitycznych. Z literatury wiadomo, że w świecie roślin nie występują gatunki, które byłyby pozbawione specyficznej mikrobioty endofitycznej. Należy też podkreślić, że rośliny zdolne do tworzenia asocjacji z mikroorganizmami endofitycznymi charakteryzują się lepszymi parametrami wzrostu, a także większą odpornością na szereg stresów środowiskowych. Choć wciąż powszechną praktyką zwalczania patogenów wielu roślin uprawnych jest stosowanie chemicznych środków ochrony, to coraz częściej świadomość konsumentów, szereg zagrożeń środowiskowych czy wprowadzane regulacje prawne sprawiają, że metody biologiczne oparte o interakcje gleba-roślina-mikroorganizmy, w tym bakterie endofityczne, są coraz częściej poszukiwane i doceniane w obszarze biokontroli agroekosystemów. **Recenzowana rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek obejmuje badania dotyczące identyfikacji mechanizmów warunkujących wysoką aktywność biologiczną bakterii endofitycznych, a także poznania molekularnych podstaw antagonistycznych oddziaływań między bakteriami endofitycznymi i fitopatogenami grzybowymi, co stanowi problematykę badawczą istotną dla opracowania rozwiązań dla opartego na biologizacji, nowoczesnego, zrównoważonego i ekologicznego rolnictwa.**

Znanych jest wiele mechanizmów antagonistycznych oddziaływań bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów. Jednakże skuteczna kontrola patogenów roślinnych jest

bezpośrednio związana ze zdolnością endofitów do kolonizacji roślin, której efektywność warunkuje silną asocjację mikroorganizmów endofitycznych z gospodarzem roślinnym.

Badania podjęte przez Doktorantkę są celowe i w pełni uzasadnione w kontekście funkcji endofitycznych szczepów bakteryjnych, ich roli w ochronie roślin i mechanizmów kolonizacji roślinnego gospodarza. Prowadzenie badań nad aktywnością biologiczną szczepów bakterii endofitycznych, mechanizmów warunkujących ich oddziaływania antagonistyczne czy identyfikację genów kluczowych w biokontroli, stanowi ważny element zmierzający do wypracowania innowacyjnych, opartych na metodach biologicznych, rozwiązań dla zrównoważonego rolnictwa. Znaczenie podjęcia przez Doktorantkę badań z tej bardzo aktualnej i wymagającej natychmiastowych i skutecznych rozwiązań tematyki jest ogromne, gdyż podejmuje bardzo ważne zagadnienia wychodzące naprzeciw problemom ochrony roślin, dając nadzieję nie tylko na poszerzenie wiedzy teoretycznej, ale również dostarczając podstaw do opracowania metodologii opartej na mikroorganizmach endofitycznych i ich oddziaływaniach z rośliną, a także na biochemicznych podstawach procesu kolonizacji roślin, w celu przyszłych zastosowań praktycznych. Dlatego recenzowana rozprawa doktorska przedstawia aktualną i ciekawą tematykę badawczą, zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i użytecznego. Należy dodać, że tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinę nauki biologiczne.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Zarządzanie produkcją rolniczą, w tym poprzez wprowadzanie podejścia opartego o biologiczną ochronę roślin z wykorzystaniem bakterii endofitycznych, należy do ważnych elementów ochrony agroekosystemów, wpisując się w założenia Europejskiego Zielonego Ładu, którego elementem jest Strategia na rzecz Bioróżnorodności do 2030 roku, zakładająca m.in. ochronę różnorodności biologicznej oraz zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin. Zatem nowoczesne podejście do agroekosystemów, ich zarządzania, ochrony i monitorowania musi być nie tylko skuteczne i ekonomicznie uzasadnione, ale również oparte na metodach biologicznych. Dlatego też rozpoznanie mechanizmów występujących w asocjacjach roślin i mikroorganizmów endofitycznych, z uwzględnieniem aspektów kolonizacji roślinnego gospodarza i zjawiska *quorum sensing* wciąż wymaga szeregu badań.

Ocenianą rozprawę doktorską mgr Darii Chlebek cechuje bardzo szerokie spojrzenie na zagadnienia aktywności biologicznej bakterii endofitycznych, z uwzględnieniem mechanizmów ich działania oraz interakcji między tymi bakteriami a zróżnicowanymi taksonomicznie fitopatogenami grzybowymi.

Rozprawa doktorska nadała nową jakość badaniom nad bakteriami endofitycznymi, obejmując nie tylko ich aktywność biologiczną, ale także kompleksowe podejście, obejmujące szeroki wachlarz analiz na poziomie molekularnym wraz z identyfikacją w genomach testowanych szczepów bakteryjnych genów ważnych dla promowania wzrostu roślin, biokontroli czy istotnych z punktu widzenia kolonizacji roślin, a także zidentyfikowanie mechanizmów warunkujących oddziaływania antagonistyczne z wykorzystaniem testów biochemicznych. Odmową zaletą rozprawy doktorskiej mgr Darii Chlebek jest połączenie biochemicznej charakterystyki izolatów z badaniami wpływu fitopatogenów na ekspresję genów zaangażowanych w proces biokontroli u badanych szczepów bakteryjnych, a także określenie zdolności bakterii endofitycznych do kolonizacji wewnętrznych tkanek roślin.

W rozprawie uwzględniono bardzo ciekawy oraz ważny cel główny, dotyczący rozpoznania mechanizmów warunkujących wysoką aktywność biologiczną bakterii endofitycznych. W oparciu o ten cel sformułowano szczegółowe cele, które ukierunkowały badania według bardzo dobrego planu działania i pozwoliły na określenie zakresu rozprawy, który pozwolił na przeprowadzenie kolejnych etapów prac, obejmujących logiczny ciąg eksperymentów z wykorzystaniem szerokiego warsztatu badawczego, uwzględniającego metody mikrobiologiczne, biochemiczne, biologii molekularnej, biofizyczne, mikroskopowe i statystyczne. Takie zaplanowanie badań oraz opanowanie skomplikowanego i interdyscyplinarnego warsztatu badawczego sprawia, że **oceniana rozprawa doktorska jest przykładem niezwykle umiejętnego i nowoczesnego wykorzystania różnorodnych metod niezbędnych do realizacji założeń i celów**. Zarówno część metodyczna pracy, jak też rodzaje obejmujące wyniki i dyskusję potwierdzają bardzo szeroki zakres badań wykonanych przez Doktorantkę, obejmujący obszerną część badań antagonistycznych oddziaływań bakterii endofitycznych wobec fitopatogenów grzybowych, w tym testy podwójnej hodowli, zdolność wydzielania do podłoża metabolitów hamujących wzrost fitopatogenów, zdolność do produkcji metabolitów lotnych, a także badania efektywności płynu pochodzącego z hamowania wzrostu fitopatogenów. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła sekwencjonowanie i analizę funkcjonalną genomów bakterii endofitycznych oraz analizę filogenetyczną obu

szczepów: *Pseudomonas fluorescens* BRZ63 i *Serratia quinivorans* KP32, a także badania ekspresji wybranych genów u bakterii endofitycznych pod wpływem testowanych fitopatogenów. **Najbardziej obszerną i rozbudowaną część badań stanowiły jednak badania właściwości potencjalnie warunkujących aktywność biologiczną badanych szczepów oraz badania związane z efektywną kolonizacją roślin przez bakterie endofityczne**, z uwzględnieniem metod klasycznej mikrobiologii, jak również nowoczesnych metod opartych o techniki biologii molekularnej. Zakres wykonanych przez Doktorantkę badań aktywności biologicznej szczepów obejmował: ocenę zdolności produkcji sideroforów, enzymów litycznych, acetoiny, 2,3-butanodiolu, cyjanowodoru, kwasu indolilo-3-octowego, kwasu salicylowego, deaminazy ACC i solubilizacji fosforanów. **Na podkreślenie zasługuje kompleksowe przeprowadzenie badań dotyczących kolonizacji roślin przez bakterie, poprzez określenie zarówno właściwości warunkujących efektywną kolonizację roślin, jak też ocenę zdolności badanych szczepów do kolonizacji roślin.** Pierwszy aspekt badań obejmował ocenę zdolności do ruchu, autoagregacji, tworzenia biofilmu, produkcji egzopolisacharydów czy określenie zdolności do wykorzystania związków organicznych jako źródła węgla i energii. Druga część badań koncentrowała się na testowaniu szczepów znakowanych białkiem zielonej fluorescencji (GFP) w eksperymencie z inokulowanymi nasionami *Arabidopsis thaliana* oraz *Brassica napus* oraz w doświadczeniu doniczkowym z rzepakiem, w którym glebę kontaminowano fitopatogenem *R. solani* oraz inokulowano szczepami bakterii endofitycznych. Zastosowana metodyka badań świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę szerokiego warsztatu badawczego. Doktorantka w jasny i czytelny sposób przygotowała opisy metodyczne, dotyczące zastosowanych metod laboratoryjnych oraz założenia doświadczeń. **Należy podkreślić, że metody badawcze zostały dobrane właściwie, a eksperymenty zostały wykonane w sposób poprawny, umożliwiając zrealizowanie podjętego celu rozprawy doktorskiej.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pokazuje umiejętność Doktorantki do analizy i przedstawienia wyników oraz ich prawidłowego omówienia i skonfrontowania z danymi literaturowymi, co znalazło odzwierciedlenie w tej części dysertacji. Doktorantka opisała wyniki w sposób przejrzysty i uporządkowany, a efekty badań zostały prawidłowo scharakteryzowane. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę w ramach pierwszego etapu prac badawczych wykazały skuteczność testowanych bakterii endofitycznych w hamowaniu wzrostu patogenów oraz działanie na morfologię grzybni. Jak wskazała Doktorantka, charakterystyka genomów i analiza filogenetyczna potwierdziły

identyfikację testowanych szczepów bakterii, ujawniając jednocześnie obecność od 2385 (*P. fluorescens* BRZ62) do 3342 (*S. quinivorans* KP32) genów związanych ze szlakami metabolicznymi w bazie KEGG.

Do bardzo cennych i nowatorskich wyników badań zaliczam rezultaty identyfikacji genów kluczowych dla biokontroli, promocji wzrostu roślin i kolonizacji roślin w genomach badanych szczepów bakterii, wskazujące na obecność szeregu genów zaangażowanych w te procesy, co wskazuje na potencjalne możliwości ich wykorzystania w praktyce rolniczej i ogrodniczej. Doktorantka wykazała, że testowane, wprowadzone na nasiona bakterie są zdolne do kolonizowania tkanek roślinnych i ich zasiedlania, co wykazała z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej. Wykazano, że zastosowane szczepy bakteryjne były efektywne w tworzeniu biofilmu, jak również charakteryzowały się zdolnością do autoagregacji, co podkreśla ich potencjał do kolonizacji roślin i w konsekwencji daje możliwość potencjalnego wykorzystania w ochronie roślin. **Dyskusja wyników stanowi bardzo wartościową i pouczającą część dysertacji, w której Doktorantka odniosła się do aktualnej literatury, interpretując uzyskane rezultaty badań na tle aktualnego stanu wiedzy, co daje pełny obraz istotności podjętego w rozprawie doktorskiej problemu badawczego. W końcowej części dysertacji Doktorantka sformułowała 8 trafnych wniosków.** Niezwykle ważny jest w mojej ocenie ostatni – ósmy wniosek, w którym Doktorantka podkreśla, że oba testowane szczepy bakterii są efektywnymi kolonizatorami *A. thaliana* i *B. napus*, przyczyniając się jednocześnie do promowania wzrostu oraz ochrony rzepaku przed *R. solani*, co potwierdza, że bakterie endofityczne wykazują nie tylko aktywność w badaniach laboratoryjnych *in silico*, ale także są aktywne w glebie i kolonizacji tkanek roślinnych. W tym kontekście, należy podkreślić, że chociaż prace badawcze koncentrowały się głównie wokół badań podstawowych, to bardzo ważnym osiągnięciem rozprawy doktorskiej jest również aspekt praktyczny obejmujący nie tylko charakterystykę cech bakterii niezbędnych do skutecznej kolonizacji, ale także badania przeprowadzone w warunkach doświadczenia doniczkowego, dające perspektywę rozwoju nowych rozwiązań biotechnologicznych do zastosowania w biologicznej ochronie roślin.

Rozprawa doktorska mgr Darii Chlebek wyróżnia się dużą starannością przygotowania i przejrzystością opisu poszczególnych eksperymentów, metod i wyników, nadając opracowaniu przejrzystość i spójność.

Podczas analizy rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pytania, które mają charakter dyskusyjny, wynikający z przeprowadzonych wielokierunkowych badań oraz

ich kompleksowości, a także potwierdzają moje zainteresowanie i bardzo wysoką ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej:

1. Jak Doktorantka ocenia perspektywy rozwoju praktycznego wykorzystania endofitycznych szczepów bakteryjnych, biorąc pod uwagę wyniki Pani badań oraz dane literaturowe? Proszę Doktorantkę o informację czy znane są Pani biopreparaty lub konsorcja mikroorganizmów endofitycznych z sukcesem wykorzystywane w biologicznej ochronie roślin?
2. Jakie są zagrożenia oraz korzyści wynikające ze stosowania bakterii endofitycznych w biologicznej ochronie roślin?
3. Biorąc pod uwagę przeprowadzone testy doniczkowe przez Doktorantkę, nasuwa się pytanie, które z badanych parametrów i właściwości wskazałaby Pani jako najważniejsze w ocenie efektywności zastosowanych bakterii?
4. Czym kierowano się przy wyborze wielkości inokulum szczepów bakteryjnych podczas zabiegów w eksperymencie doniczkowym? Czy w świetle uzyskanych wyników Doktorantka zalecałaby wprowadzenie inokulum w innej gęstości i w inny sposób?

4. Wniosek końcowy

Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, opanowała szeroki warsztat badawczy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, a także wykazała się zdolnością do opracowania i interpretacji uzyskanych wyników. Uwagi i pytania zawarte w recenzji mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na mój bardzo pozytywny odbiór rozprawy doktorskiej. **Dysertacja doktorska Pani mgr Darii Chlebek jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w obrębie dyscypliny nauki biologiczne.**

Podsumowując, **z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Darii Chlebek spełnia wymagania art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. zm.), i stanowi podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Darii Chlebek do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, jej nowatorstwo i kompleksowe zastosowanie zaawansowanych, odpowiednio dobranych i bardzo dobrze opanowanych metod badawczych oraz perspektywy przyszłego, utylitarne

wykorzystania uzyskanych wyników, **wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Darii Chlebek** stosowną nagrodą.

Magdalena Frąc
prof. dr hab. Magdalena Frąc