

Lublin, 07.06.2021

prof. dr hab. Magdalena Frąć
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 Renaty Tyśkiewicz

pt. „*Właściwości ryzosferowych szczepów *Trichoderma spp.* istotne w stymulacji i ochronie pszenicy przed fitopatogenami *Fusarium spp.”**

Rozprawa doktorska mgr Renaty Tyśkiewicz została wykonana w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod opieką promotora dr hab. Jolanty Jaroszuk-Ścisiel, prof. UMCS oraz promotora pomocniczego dr Ewy Ozimek. Recenzja została wykonana na zlecenie Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych – prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkolazkiej.

1. Formalna ocena rozprawy – struktura dysertacji

Rozprawa doktorska Pani mgr Renaty Tyśkiewicz została napisana według struktury właściwej dla doktorskich prac eksperymentalnych. Na podkreślenie zasługuje bardzo staranne przygotowanie pracy pod względem edytorskim. Rozprawa liczy 322 strony, a w tekst wkomponowano 50 tabel, aż 79 rycin oraz 414 pozycji literaturowych i 12 pozycji netografii. Tym samym dysertacja jest wyjątkowo obszerna, obejmując szczegółowe wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie oraz kompleksowe podejście do rozwiązania problemu badawczego z wykorzystaniem szerokiego wachlarza metod analitycznych. Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej jest precyzyjny i odpowiada jej treści.

Rozprawa złożona jest z jedenastu rozdziałów z licznymi podrozdziałami, które zostały ujęte w zawierającym detale spisie treści, rozpoczynającym dysertację. Następnie Autorka zamieściła wykaz skrótów (w języku polskim i angielskim) stosowanych w pracy, oraz streszczenia i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, które są spójne i zawierają krótki opis podjętego tematu badawczego, cel badań oraz syntetyczne podsumowanie uzyskanych rezultatów. Dalszej części pracy nadano strukturę obejmującą: Wstęp, Hipotezę i

cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski, Bibliografię, Netografię, Spis Tabel, Spis Rycin oraz Aneks – życiorys naukowy. **Wstęp liczący 54 strony**, podzielony jest na 8 podrozdziałów, a niektóre z nich zawierają kolejne szczegółowe podpunkty. Ten rozdział wprowadza czytelnika do tematyki rozprawy doktorskiej, nakreślając problem badawczy oraz umożliwiając zorientowanie się zarówno w nowych osiągnięciach w obrębie omawianych zagadnień, jak i podstawach podejmowanego problemu. Na pochwałę zasługuje przedstawienie rozbudowanej części dotyczącej charakterystyki grzybów, które są przedmiotem badań ujętych w rozprawie oraz mechanizmów ich oddziaływania, ale także wzbogacenie tego rozdziału o przegląd komercyjnych rozwiązań, zawierających grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Kolejny rozdział to **Hipoteza i cel pracy**, w którym Doktorantka prawidłowo sformułowała weryfikowane hipotezy badawcze, dotyczące potencjału biokontrolnego i biostymulującego grzybów z rodzaju *Trichoderma*, a także przedstawiła cel główny oraz cele szczegółowe podjętych badań. Część metodyczna – **Materiały i metody** obejmuje 34 strony i również stanowi rozbudowaną część rozprawy podzieloną na 13 podrozdziałów, zawierających charakterystykę materiału biologicznego wykorzystanego w badaniach oraz szczegółowe omówienie użytych metod i technik analitycznych oraz zastosowanych procedur badawczych i sposobów oznaczeń. W końcowej części rozdziału zamieszczono opis zastosowanych analiz statystycznych, co jest ważne dla wsparcia uzyskanych wyników i wyciągnięcia prawidłowych wniosków. Najbardziej obszerną część rozprawy doktorskiej stanowi rozdział **Wyniki**, który został przedstawiony na 147 stronach i składa się z 8 głównych podrozdziałów, w większości podzielonych na szczegółowe podpunkty. Wyniki przedstawione z tej części pracy zostały przedstawione w kolejności korespondującej w większości z rozdziałami lub podrozdziałami części metodycznej, co ułatwia śledzenie i analizę przedstawionych rezultatów. Dyskusja została przedstawiona na **20 stronach** i odnosi się do głównych tendencji oraz najważniejszych wyników uzyskanych w trakcie prowadzonych badań, a Doktorantka umiejętnie i w sposób wyważony interpretuje uzyskane wyniki odnosząc je również do osiągnięć i rezultatów uzyskanych przez innych Autorów. **Podsumowanie i wnioski** przedstawiono na 5 stronach dysertacji, i co zasługuje na podkreślenie, odniesiono się do hipotezy badawczej, sformułowano wniosek końcowy, a także podsumowano i poparto uzyskane rezultaty badań w dwudziestu wnioskach szczegółowych. **Bibliografia** liczy 414 pozycji literaturowych, w tym głównie publikacji anglojęzycznych, przy czym literaturę, na której opierała się Doktorantka, stanowią w około 70% publikacje z ostatnich 10 lat, pozostałe to w większości artykuły naukowe z ostatnich 20

lat, natomiast poniżej 10% (39 pozycji) całego spisu bibliografii stanowią prace sprzed roku 2000. Oznacza to, że podjęta tematyka badawcza jest aktualna i bardzo dynamicznie się rozwija, a także potwierdza, że Doktorantka przeprowadziła gruntowny przegląd literatury, obejmujący kluczowe aspekty badań poruszanych w dysertacji. Kolejne rozdziały to **Netografia**, obejmująca spis 12 pozycji stron internetowych oraz **Spis Tabel** i **Spis Rycin**, z odniesieniem do stron dysertacji, na których zostały umieszczone, obejmujący odpowiednio 50 tabel i 79 rycin. Na końcu został umieszczony **Aneks – życiorys naukowy** Doktorantki, z którego wynika, że tematyka badań zbliżonych do zagadnień, które obejmuje dysertacja, była szeroko publikowana przez Doktorantkę (6 publikacji w czasopismach naukowych z listy ministerialnej, 4 rozdziały w monografiach, 33 komunikaty konferencyjne, w tym 2 wyróżnione), a także finansowana w ramach grantów naukowych UMCS dla młodych pracowników i doktorantów. Doktorantka jest również współtwórcą 1 zgłoszenia patentowego, dotyczącego preparatu o właściwościach przeciwgrzybowych do ochrony roślin oraz legitymuje się innymi działaniami naukowymi. Oznacza to, że Doktorantka jest osobą bardzo aktywną i zaangażowaną w podejmowane przez Nią zadania, co zasługuje na uznanie. Praca została napisana w sposób czytelny i zrozumiały, bardzo ładną polszczyzną. **Wysoko oceniam przygotowanie rozprawy doktorskiej pod względem formalnym.**

2. Ocena wyboru tematyki badawczej rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Renaty Tyśkiewicz obejmuje badania dotyczące właściwości ryzosferycznych szczepów z rodzaju *Trichoderma* istotnych w stymulacji wzrostu i ochronie pszenicy przed grzybami fitopatogenicznymi z rodzaju *Fusarium*.

Badania dotyczyły obszaru tematycznego obejmującego oddziaływanie, mechanizmy i regulacje w interakcjach szczepów *Trichoderma* spp., należących do 6 gatunków i fitopatogenicznych szczepów *Fusarium* spp., będących przedstawicielami 3 różnych gatunków oraz pszenicy. Głównym celem przeprowadzonych badań było określenie potencjału ryzosferycznych szczepów *Trichoderma* spp. do biologicznej ochrony roślin przed fitopatogenami z rodzaju *Fusarium* oraz do stymulacji wzrostu pszenicy w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Szczegółowe cele badawcze odnosiły się do określenia zdolności szczepów z rodzaju *Trichoderma* do bezpośredniego zwalczania oraz do pośredniego wpływu na patogeny roślinne z rodzaju *Fusarium*, poprzez szczegółową charakterystykę mikrobiologiczną i biochemiczną testowanych szczepów oraz określenie potencjału

biostymulującego, poprzez analizy metabolitów badanych grzybów i pomiary parametrów wzrostu roślin.

Tematyka badawcza rozprawy doktorskiej wpisuje się w aktualne trendy, ujęte w programach strategicznych UE, w tym jest spójna z założeniami Europejskiego Zielonego Ładu i Strategii na rzecz Bioróżnorodności do 2030, które to dokumenty podkreślają znaczenie i konieczność rozwoju agroekologii, biologizacji rolnictwa i zakładają zwiększenie powierzchni roślin uprawianych w systemach ekologicznej produkcji. Sprawia to, że badania podjęte przez Doktorantkę wychodzą naprzeciw realnym potrzebom społeczeństwa, zwłaszcza rolnictwa, mając bardzo duże znaczenie aplikacyjne. Niemniej ważne jest znaczenie prowadzonych badań podstawowych, ponieważ mechanizmy i interakcje zachodzące pomiędzy awitulentnymi, oportunistycznymi symbiontami, grzybami fitopatogenicznymi i roślinami wciąż nie są do końca rozpoznane i wymagają badań. Dlatego też recenzowana rozprawa doktorska przedstawia wyjątkowo aktualną i bardzo ciekawą tematykę badawczą, zarówno z punktu widzenia użytecznego, jak i poznawczego. Wybór pszenicy jako rośliny testowej w prowadzonych badaniach jest wysoce uzasadniony, zarówno ze względu na to, że znajduje się ona wśród zbóż, których produkcja i konsumpcja na świecie jest największa, a także z uwagi na fakt, że roślina ta jest narażona na liczne choroby grzybowe, w tym fuzariozę kłosów, fuzaryjne więdnienie, zgorzel siewek, a także zgniliznę korony i korzeni. Patogeniczne dla roślin grzyby z rodzaju *Fusarium*, będące również obiektem badań przedstawionych w dysertacji, przyczyniają się do poważnego obniżenia jakości światowych plonów pszenicy, a także zmniejszenia ich ilości, co bezpośrednio wiąże się ze stratami gospodarczymi. Dlatego też występowanie chorób roślin powinno być monitorowane i odpowiednio kontrolowane, przy czym należy pamiętać, że intensywny rozwój chemicznych fungicydów i wzrastająca chemizacja rolnictwa stanowią coraz większe zagrożenie dla środowiska przyrodniczego, będąc jednym z ważniejszych problemów wymagających poszukiwania zrównoważonych rozwiązań, zapewniających jakość i bezpieczeństwo żywności, ale także środowiska. Jedną z najbardziej obiecujących strategii ograniczających chemizację rolnictwa jest stosowanie czynników kontroli biologicznej (BCA – Biological Control Agents), opartej o wykorzystanie żywych mikroorganizmów lub ich metabolitów oraz produktów pochodzenia naturalnego do kontrolowania szkodników w uprawach. Do tych metod należy również wprowadzenie do uprawy roślin technologii mikrobiologicznych, obejmujących wykorzystanie mikroorganizmów o właściwościach biostymulujących i ochronnych. Szczepy z rodzaju

Trichoderma należą do mikroorganizmów pożytecznych o właściwościach antagonistycznych wobec szeregu patogenów roślinnych, a także mogą indukować odporność roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, prowadząc do szybszego wzrostu roślin i ich lepszego plonowania. Dlatego też, przedstawione w rozprawie doktorskiej prace badawcze nad interakcjami pomiędzy roślinami i mikroorganizmami oraz określeniem potencjału zebranych szczepów z rodzaju *Trichoderma* do ochrony przed fitopatogenami z rodzaju *Fusarium* oraz biostymulacji roślin pszenicy, zwłaszcza z wykorzystaniem rodzimych szczepów, stanowią temat bardzo aktualny, wymagający badań, w którym pozostaje wiele niewyjaśnionych i nierozwiązanych problemów, zwłaszcza w kontekście biokontrolnego i biostymulacyjnego oddziaływania szczepów *Trichoderma* spp. w różnych warunkach interakcji *Trichoderma*-patogen-roślina. Praca poszerza wiedzę na temat zdolności szczepów *Trichoderma* spp. do bezpośredniego zwalczania fitopatogenów z rodzaju *Fusarium*, poprzez m.in. badania zjawiska mechanizmu mykopasożytnictwa nekrotroficznego, mykostazy, konkurencji pokarmowej czy aktywności enzymów degradujących ściany komórkowe grzybów, oraz do pośredniego wpływu na patogeny, poprzez badania mechanizmów indukowanej odporności roślin. Podkreślić też należy, że rozprawa również dotyczy aspektu obejmującego stymulację wzrostu pszenicy oraz ochronę roślin przed infekcją patogenem w warunkach fitotronowych, co związane jest z biologizacją rolnictwa i poszukiwaniem czynników kontroli biologicznej, które mogłyby zastąpić fungicydy chemiczne, zwłaszcza, że na polskim rynku nie ma preparatu opartego o grzyby z rodzaju *Trichoderma*, dedykowanego dla roślin zbożowych. Ten aspekt badań niewątpliwie wpisuje się również w misję „Troska o gleby to troska o życie” w ramach Programu Europa, bowiem zmniejszenie zużycia chemicznych środków ochrony roślin jest niezbędne również ze względu na konieczność ochrony gleb.

Biorąc pod uwagę znaczenie badań z teoretycznego i aplikacyjnego punktu widzenia, a także aktualne trendy zmierzające do wspierania agroekologii, rozwijania mikrobiologicznych technologii produkcji oraz luki związane z mechanizmami i interakcjami pomiędzy mikroorganizmami i roślinami uważam, że tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę, wpisująca się w dyscyplinę nauk biologicznych, jest celowa, w pełni uzasadniona, ważna i wyjątkowo aktualna.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Pierwszym rozdziałem rozprawy jest **Wstęp**, w którym Doktorantka nakreśliła znaczenie podjętej tematyki badań, odnosząc się do znaczenia chorób roślin w utrzymaniu odpowiedniej jakości i ilości żywności, a także fitopatogenów i mikroorganizmów mających potencjał biokontrolny i podkreśliła wyjątkowe znaczenie grzybów mających silny wpływ na zahamowanie rozwoju wielu chorób roślin, a także podjęła dyskusję na temat konieczności poszukiwania i testowania nowych rozwiązań biokontroli i biostymulacji jakości i wzrostu roślin, opartych o mikroorganizmy. Doktorantka w kolejnym podrozdziale omówiła interakcje zachodzące pomiędzy roślinami i mikroorganizmami w środowisku glebowym, podkreślając znaczenie roślin jako metaorganizmu, posiadającego odrębny mikrobiom i związki symbiotyczne z innymi mikroorganizmami towarzyszącymi. Doktorantka następnie przedstawiła charakterystykę grzybów z rodzaju *Trichoderma*, obejmującą przede wszystkim ich przynależność taksonomiczną oraz charakterystyczne cechy budowy morfologicznej, a w kolejnych podrozdziałach scharakteryzowała grzyby z rodzaju *Fusarium*, w tym mechanizmy oddziaływania tych patogenów na rośliny oraz najważniejsze choroby pszenicy powodowane przez te organizmy. Kolejny podrozdział został poświęcony wyjaśnieniu pojęcia i znaczenia biologicznej ochrony roślin przed fitopatogenami, w tym dotyczył rozpoznania mikroorganizmów będących czynnikami kontroli biologicznej oraz omówienia potencjału biokontrolnego grzybów z rodzaju *Trichoderma*. W kolejnych dwóch rozdziałach omówiono mechanizmy ochrone i biostymulujące, które posiadają grzyby z rodzaju *Trichoderma*, z podkreśleniem mechanizmów pośredniego oddziaływania na fitopatogeny, związanego z indukcją odporności roślin oraz bezpośredniego, obejmującego mykopasożytnictwo, syntezę antybiotyków i innych związków fungistatycznych oraz enzymów degradujących grzybowe ściany komórkowe, a także przytoczono wyniki badań dotyczące konkurencji o składniki pokarmowe i niszę w środowisku. W ostatnim podrozdziale Doktorantka omówiła aktualny stan środków kontroli biologicznej, zawierających grzyby *Trichoderma* spp., które zostały dopuszczone do stosowania przez Komisję Europejską do stosowania w krajach członkowskich UE, a także odniosła się do innych biopreparatów o charakterze nawozów oraz środków wspomagających wzrost roślin dopuszczonych do obrotu w Polsce.

Ta część rozprawy doktorskiej jest zajmująca i wprowadza w zagadnienia przedstawione w dysertacji, a aktualne i dobrze dobrane schematy i rysunki, pokazują umiejętność Autorki do dobrego wprowadzenia w tematykę badawczą. Dobrze omówiona problematyka podjętych badań została napisana w sposób szczegółowy i

bardzo dobrze podsumowuje znaczenie podjętych badań w wielu płaszczyznach oraz podkreśla ich znaczenie praktyczne i poznawcze.

Drugi rozdział dotyczy hipotezy i celu podjętych badań, które choć rozbudowane, są jasno sformułowane. W skrócie wymieniono tu cel główny obejmujący określenie potencjału ryzosferycznych szczepów *Trichoderma* spp. do biologicznej ochrony roślin (zwłaszcza zbożowych) przed fitopatogenami *Fusarium* spp. oraz stymulacji wzrostu pszenicy. Wymieniono też cele szczegółowe, dotyczące w szczególności poszczególnych etapów prac eksperymentalnych, w tym m.in. określenia zdolności szczepów *Trichoderma* spp. do biokontroli fitopatogenów i biostymulacji roślin. **Podjęty cel badań, łączący dobrze dwa aspekty poznawczy i aplikacyjny, został sformułowany poprawnie, wyznaczając wyraźnie kierunek badań. Doktorantka w rozdziale tym precyzyjnie przedstawiła również hipotezę badawczą, o której wspomniałam w części recenzji dotyczącej tematyki podjętych badań, która w kolejnych rozdziałach rozprawy jest weryfikowana poprzez powiązane ze sobą w logiczny sposób etapy prowadzonych badań.**

Kolejny rozdział rozprawy **Materiały i metody** obejmuje opis szczepów wykorzystanych w badaniach oraz warunki ich przechowywania, a także przygotowane w czytelny sposób opisy metodyczne, w tym dotyczące określenia zdolności mykopasożytniczych szczepów grzybów *Trichoderma* spp. wobec fitopatogenów *Fusarium* spp., określenia zdolności szczepów *Trichoderma* spp. do hamowania kiełkowania makrokonidiów *F. culmorum*, określenia parametrów wzrostu grzybów w hodowlach płynnych czy przygotowania konidiów do badań. **W rozdziale szczegółowo omówiono metody i procedury badań mikrobiologicznych i biochemicznych. Doktorantka jasno i precyzyjnie opisała zastosowane metody i techniki badawcze, które posłużyły do realizacji poszczególnych etapów badań, tj. określenia aktywności chitynolitycznej i glukanolitycznej, charakterystyki profili metabolicznych i zdolności konkurencyjnych szczepów z rodzaju *Trichoderma* i *Fusarium* oraz tempa wzrostu na podłożach stałych z glukozą i sacharozą. Opisy dotyczące zdolności szczepów z rodzaju *Trichoderma* do indukowania odporności pszenicy oraz stymulacji wzrostu rośliny zbożowej są przygotowane bardzo dokładnie i mogłyby być z powodzeniem wykorzystane w pracach badawczych z tego zakresu. Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki zakres dobranych testów i oznaczeń, zapewniający przeprowadzenie kompleksowych badań, w tym m.in. enzymów markerowych szlaków odporności, obejmujących określenie aktywności amoniakolizy fenyloalaninowej i tyrozynowej, katalazy, peroksydazy gwajakolowej i askorbinianowej,**

a także określenie zdolności szczepów z rodzaju *Trichoderma* do kolonizacji korzeni i stymulacji wzrostu pszenicy, poprzez oznaczenie stężenia kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz określenie zdolności szczepów do syntezy metabolitów potencjalnie stymulujących wzrost roślin (IAA, GA, ACC-deaminazy, związków kompleksujących Fe^{+3}). Ponadto, w rozdziale opisano badania dotyczące oddziaływania stymulującego i ochronnego szczepów z rodzaju *Trichoderma* przed infekcją fitopatogenem z rodzaju *Fusarium*, prowadzone w hodowlach fitotronowych. Należy podkreślić, że doświadczenia zostały zaprojektowane logicznie i wykonane prawidłowo, a metody badawcze zostały dobrane znakomicie, w celu weryfikacji hipotezy badawczej i realizacji założonych celów rozprawy doktorskiej. Metodyka jest na tyle dobrze przedstawiona, że może stanowić protokoły umożliwiające powtórzenie eksperymentów. Doktorantka przeanalizowała bardzo obszerny materiał doświadczalny, który wymagał dużego nakładu pracy i zaangażowania, a następnie właściwej interpretacji i dyskusji wyników.

Rozdział **Wyniki** zawiera opisane w sposób syntetyczny wyniki badań uzyskane w ramach prowadzonych eksperymentów. W tej części pracy Doktorantka omówiła uzyskane wyniki, przedstawiając najpierw wyniki makroskopowej oceny zdolności szczepów *Trichoderma* spp. do mykopasożytnictwa, które obejmowały określenie efektu biotycznego pomiędzy testowanymi szczepami wobec patogenów z rodzaju *Fusarium* na różnych podłożach mikrobiologicznych. Potwierdzenie zdolności do mykopasożytnictwa znalazło odzwierciedlenie w wynikach analiz mikroskopowych, w których Doktorantka wykazała, że strzępki wszystkich badanych szczepów *Trichoderma* spp. posługiwały się mechanizmem mykopasożytnictwa o charakterze nekrotroficznym w stosunku do strzępek patogenicznych szczepów z rodzaju *Fusarium*, a także charakteryzowały się wyraźną chemotaksją w kierunku żywicieli i adhezją do strzępek patogenów. Doktorantka poparła wyniki obserwacji makro- i mikroskopowych analizami aktywności enzymów hydrolitycznych, degradujących główne komponenty grzybowej ściany komórkowej wykazując, że testowane szczepy charakteryzowały się silną aktywnością chitynolityczną i glukanolityczną. Doktorantka wykazała zdolność niektórych testowanych szczepów z rodzaju *Trichoderma* do efektywnej kolonizacji korzeni pszenicy, poprzez obserwacje chemotropizmu strzępek TkZ3A0 w kierunku komórek granicznych korzenia, tworzenie zwartej grzybni na powierzchni warstwy korowej, a następnie obserwacje wnikania strzępek do przestrzeni międzykomórkowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pokazuje umiejętność Doktorantki do profesjonalnego przedstawienia wyników oraz ich prawidłowego omówienia, co znalazło odzwierciedlenie w tej części dysertacji. Jest to część pracy, w której Doktorantka prawidłowo scharakteryzowała efekty badań. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat charakterystyki szczepów z rodzaju *Trichoderma* oraz podkreślają ich wysoki potencjał do działania biokontrolnego i biostymulującego. Bardzo obszerny materiał badawczy zaowocował dużą ilością wyników, które Doktorantka opisała w uporządkowany i przejrzysty sposób.

Dyskusja stanowiąca kolejny rozdział opracowania, charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym i jest bardzo dobrze napisaną częścią rozprawy doktorskiej. W tej części rozprawy Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych rezultatów odnosząc się do wyników dostępnych w publikacjach naukowych innych badaczy, co świadczy o bardzo dobrym rozpoznaniu podjętej problematyki badawczej. Merytoryczną część rozprawy kończą wnioski. Zaletą tego rozdziału jest logiczne podsumowanie całości prac, a przede wszystkim odniesienie się do weryfikowanej hipotezy badawczej oraz założonego celu naukowego, a także sformułowanie wniosku końcowego, w którym Doktorantka podkreśla, że niezależnie od tego z ryzosfery jakiej rośliny zostały wyizolowane szczepy *Trichoderma* spp., są one zdolne do silnego ograniczania *in vitro* wzrostu fitopatogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*, wyizolowanych z rośliny zbożowej, a także efektywnie kolonizują korzenie pszenicy, strefę ryzosferową i ryzoplano, indukując odporność rośliny i ograniczając rozwój fuzariozy. Wniosek końcowy jest poparty jasno i poprawnie sformułowanymi wnioskami szczegółowymi.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się pewne sugestie i uwagi, które w tym miejscu chciałabym przytoczyć, podkreślając jednocześnie, że mają one głównie charakter dyskusyjny i nie mają one wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej:

- Hipoteza badawcza oraz cele pracy zostały jasno sformułowane, jednakże dwa pierwsze cele szczegółowe również powinny zawierać sformułowanie „Określenie” zamiast „Ocena”. Ciekawe byłoby stwierdzenie odnoszące się do tego jak i czy w ogóle postawiona hipoteza badawcza ewoluowała podczas prowadzenia badań. Proszę Doktorantkę do odniesienia się do tego czy hipoteza w takim kształcie została postawiona na początku czy po zakończeniu badań.

- Rozdział 3.5. Proszę o doprecyzowanie w jakiej objętości pożywki prowadzono hodowlę w celu przygotowania konidiów szczepów grzybów do badania właściwości biochemicznych w hodowlach płynnych.
- Rozdział 3.12.2. Proszę o doprecyzowanie w jaki sposób określono liczebność grzybów z rodzaju *Trichoderma* i z rodzaju *Fusarium*. Posiew prowadzono na podłożu Martina, które nie jest podłożem selekcyjnym. Czy w związku z tym uzyskane kolonie były identyfikowane? Czy na podłożu rosły tylko grzyby z wymienionych rodzajów, czy zaobserwowano również wzrost innych grzybów?
- Rozdział 4.1.1. W wyniku przeprowadzonych badań dla większości szczepów z rodzaju *Trichoderma* zaobserwowano dodatnie wartości efektu biotycznego w oddziaływaniu z fitopatogenicznym szczepem *F. culmorum* Fc37 i *F. oxysporum* Fc38. Jedynie dla nielicznych szczepów z rodzaju *Trichoderma* zaobserwowano neutralny efekt biotyczny. Czym mogłaby Pani wyjaśnić uzyskany neutralny efekt biotyczny, czy może szczepy, dla których zaobserwowano tę tendencję wyróżniały się spośród testowanych innymi zdolnościami uzyskanymi w ramach prowadzonych doświadczeń?
- Rozdziały 4.1.1.-4.1.3. Przeprowadzone badania wykazały, że szczep *T. koningiopsis* TkSk356 należał do szczepów, które najsilniej redukowały kolonie fitopatogenicznego szczepu Fc38 na stałym podłożu PDA oraz na podłożu Martina bez dodatku rózu bengalskiego, natomiast na standardowym podłożu Martina zaobserwowano neutralny efekt biotyczny. Proszę o próbę wyjaśnienia uzyskanych wyników. Czy Pani zdaniem mogą one przełożyć się w jakimś stopniu na zastosowania praktyczne/aplikacyjne testowanego szczepu *T. koningiopsis*?
- Rozdział 4.4. Czy na podstawie analizy profili metabolicznych wyselekcjonowanych szczepów *Trichoderma* spp. i fitopatogenów *Fusarium* spp. mogłaby Pani wskazać, które z badanych związków mogłyby zostać zaproponowane jako składniki suplementacyjne, wspomagające wzrost grzybów z rodzaju *Trichoderma*, pozostając bez wpływu lub hamując wzrost fitopatogenicznych grzybów z rodzaju *Fusarium*?
- Proszę o informację czy umieszczone w życiorysie naukowym aktywności naukowej, np. publikacje, granty, komunikaty konferencyjne, zgłoszenie patentowe były bezpośrednio związane z badaniami zawartymi w rozprawie doktorskiej czy stanowiły Pani dodatkową działalność naukową?
- W treść pracy wkradły się drobne błędy edytorskie, głównie „literówki”, które zostały zaznaczone w tekście. Dyskusyjne wydaje się nazewnictwo niektórych niefortunnych

sformułowań np. zamiast „gen odpowiedzialny”, „Gromada: Ascomycota”, „grzybów *Trichoderma*”, „grzybów *Fusarium*” bardziej odpowiednie są określenia: „gen kodujący”, „Typ: Ascomycota”, „grzybów z rodzaju *Trichoderma*”, „grzybów z rodzaju *Fusarium*”.

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dotyczącego działania biokontrolnego wobec patogenów z rodzaju *Fusarium* oraz stymulującego wzrost pszenicy, szczepów ryzosferowych *Trichoderma* spp., ze szczególnym uwzględnieniem oddziaływań, mechanizmów i regulacji w interakcjach, w tym m.in. ich zdolności mykopasożytniczych, konkurencyjnych i indukujących odporność roślin. Jakość rozprawy naukowej oraz załączony w formie aneksu życiorys naukowy Doktorantki stawiają Panią mgr Renatę Tyśkiewicz w gronie ambitnych młodych badaczy, zaangażowanych w życie naukowe.

Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, opanowała warsztat badawczy z zakresu mikrobiologii i biochemii, a także wykazała się zdolnością do opracowania i interpretacji uzyskanych wyników. Dysertacja doktorska Pani mgr Renaty Tyśkiewicz jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w obrębie dyscypliny nauk biologicznych.

Bez żadnych wątpliwości stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Renaty Tyśkiewicz spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony. **Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy i jej wyjątkowo staranne przygotowanie edytorskie, aktualność podjętej problematyki badawczej, zastosowanie kompleksowego podejścia, obejmującego bardzo szeroki zakres badań oraz potencjał publikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej odpowiednią nagrodą.**



prof. dr hab. Magdalena Frąc

Lublin, 07.06.2021