

Lublin 7.07.2023

dr hab. Justyna Bohacz, prof. uczelni
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Agrobiotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 7
20-069 Lublin

RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Włodarczyk
pt. „Genetyczna i fizjologiczna charakterystyka endofitów
szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*) i ich potencjalne
zastosowanie w ochronie gatunku”
wykonanej
w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii
Instytutu Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
pod kierunkiem
Promotora, Pana dr hab. Jerzego Wielbo prof. UMCS
oraz Promotora pomocniczego, Pani dr Moniki Marek -Kozaczuk**

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej sporządzona została w odpowiedzi na decyzję Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, dotyczącą powołania mnie do roli recenzenta, podjętą jako Uchwała nr 10/d/23 w dniu 19.04.2023 i w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych UMCS w Lublinie, Pani prof. dr hab. Anny Jarosz-Wilkołazkiej z dnia 27.04.2023 roku.



1. Znaczenie i aktualność podjętej problematyki badawczej

Wszystkie, aktualne działania na rzecz ochrony środowiska oraz zagrożonych wyginięciem gatunków organizmów żywych, w niekorzystnych warunkach zmieniającego się klimatu są szczególnie ważne i zasługują niewątpliwie na uznanie. Szczególnie ważne znaczenie w tym zakresie mają te działania, które opierają się na zasobach środowisk naturalnych, co z powodzeniem zostało wykorzystane w przedłożonej do recenzji rozprawie doktorskiej.

Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego będące przedmiotem doświadczeń opisywanych w przedstawionej rozprawie doktorskiej jest powszechnie znanym zjawiskiem w środowiskach naturalnych oraz w uprawach rolniczych, gdzie diazotrofy odgrywają ważną rolę w produkcji żywności i pasz. Mutualistyczny układ pomiędzy roślinami bobowatymi (*Fabaceae*) a bakteriami zwanymi rizobiami z rodziny *Rhizobiaceae*, polega na wzajemnej współpracy opartej na obustronnych korzyściach. W odpowiedzi na zaistnienie symbiozy na korzeniach roślin pojawiają się brodawki, w których to zasiedlające je mikrosymbionty są odpowiedzialne za wiązanie azotu atmosferycznego. W największym skrócie taki mutualistyczny układ polega na tym, że rośliny dostarczają bakteriom produkty asymilacji jako źródła C i energii, a bakteroidy-formy inwolucyjne bakterii w brodawkach roślin, dostarczają gospodarzowi roślinnemu dodatkowej puli łatwo przyswajalnych związków azotu. Dzięki aktywności bakterii brodawkowych rośliny bobowate mogą rosnąć na glebach ubogich w azot, a po obumarciu przyczyniają się do zwiększenia puli azotu glebowego. Sprawia to, że stosowanie chemicznych środków nawożenia w uprawie roślin bobowatych na potrzeby produkcji rolnej staje się zbędne i tym samym przyczynia się do ograniczenia negatywnego ich wpływu na środowisko naturalne. Najbardziej rozpoznane układy symbiotyczne w obrębie roślin bobowatych dotyczą tych roślin, które mają znaczenie w produkcji rolniczej. Wśród roślin bobowatych, które są zdolne do tworzenia brodawek korzeniowych i wiązania azotu cząsteczkowego, występują także gatunki rzadkie, naturalnie występujące w środowisku. Do takich roślin należy szczodrzeniec zmienny *Chamaecytisus albus*, będący przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Włodarczyk. Gatunek ten naturalnie występuje w południowo-wschodniej części Polski na terenach objętych unijnym Programem Natura 2000 Zachodniowołyńska Dolina Bugu, który ma na celu ochronę siedlisk przyrodniczych i gatunków uznawanych za cenne, a także w krajach południowo-wschodniej i środkowej Europy. Z uwagi na drastycznie malejącą wielkość

populacji gatunek ten został wpisany do Polskiej Czerwonej Listy Paprotników i Roślin Kwiatowych jako roślina krytycznie zagrożona wyginięciem.

Podjęte przez Doktorantkę badania celująco wpisują się w działania na rzecz ochrony środowiska i gatunków zagrożonych poprzez wykorzystanie naturalnych zasobów środowiskowych, naturalnych właściwości organizmów żywych i wzajemnych oddziaływań pomiędzy drobnoustrojami a roślinami. Przedłożona do recenzji dysertacja doktorska po raz pierwszy przedstawia wyniki badań dotyczących charakterystyki populacji bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe *Chamaecytisus albus* tj. ich zróżnicowania genetycznego i fizjologicznego oraz znaczenia w ochronie gatunku.

Stąd zaprezentowane w niniejszej dysertacji doktorskiej badania uważam za słuszne, nowatorskie i wręcz konieczne. Podjęty przez Panią mgr Karolinę Włodarczyk, w ramach rozprawy doktorskiej, problem badawczy wpisuje się w aktualne trendy nauki światowej, które ukierunkowane są na poszukiwanie, opracowanie i zaproponowanie bezpiecznych sposobów ochrony gatunków zagrożonych z jednoczesnym wykorzystywaniem zasobów naturalnych, co wskazuje na użyteczny charakter badań.

2. Ocena pod względem struktury i formalnej strony pracy

Badania eksperymentalne opisane w niniejszej rozprawie zostały częściowo przeprowadzone w ramach projektu pt. „Wykorzystanie rizobiów w biologicznej ochronie szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*)” (nr 11/2020/D/IN), którego kierownikiem był dr hab. Jerzy Wielbo, prof. UMCS, finansowanego ze środków Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Lublinie.

Część wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej zostało opublikowane w 1 artykule naukowym, w którym to artykule Doktorantka jest pierwszym autorem co wskazuje, na znaczący Jej wkład w powstanie tej pracy.

W świetle art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce dopuszczalne jest, aby rozprawa doktorska, jako praca pisemna, składała się po części z opublikowanych jak i nieopublikowanych wyników badań, czyli miała tzw. formę hybrydową.

Recenzowane opracowanie, ma układ klasycznej rozprawy doktorskiej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Składa się z 12 głównych, ponumerowanych, właściwie zestawionych rozdziałów, co obejmuje 1) Streszczenie, 2) Streszczenie w języku angielskim (Summary), 3) Wstęp, 4) Cel pracy 5) Materiały i metody,

6) Wyniki, 7) Dyskusja, 8) Podsumowanie i wnioski, 8) Bibliografia, 10) Spis rycin, 11) Spis tabel, 12) Aneks - życiorys naukowy. Tytuł pracy jest dobrze sformułowany i odpowiada treści recenzowanej dysertacji. Na początku rozprawy doktorskiej znajduje się także Spis treści oraz Wykaz skrótów zastosowanych w pracy. Trzy rozdziały tj. Wstęp, Materiały i metody oraz Wyniki podzielone są na podrozdziały, a niektóre z podrozdziałów we Wstępie i Materiałach i metodach na bardziej szczegółowe podrozdziały, co czyni te części pracy przejrzystymi i ułatwia analizowanie dużej liczby omawianych zagadnień oraz całościową ocenę problematyki pracy. Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Włodarczyk składa się ze 141 numerowanych stron wydruku komputerowego, w tym 17 tabel, 31 rysunków oraz spisu 169 pozycji literatury i 5 pozycji witryn internetowych. Część rycin, przedstawia fotografie oraz schematy. Wykorzystana do opracowania i rozwiązania podjętego problemu badawczego literatura przedmiotu w 95% jest piśmiennictwem anglojęzycznym, a 68% pozycji literatury jest z ostatnich 10 lat. Fakt ten świadczy o dużym zaangażowaniu Doktorantki w odniesieniu do problematyki dotyczącej aktualnych potrzeb ochrony środowiska. Dodatkowym ułatwieniem, w zrozumieniu toku postępowania jest opatrzenie poszczególnych podrozdziałów w rozdziale „Wyniki” uzasadnieniem celowości analizowanych w nich doświadczeń. Rozprawa doktorska wyróżnia się bardzo rozbudowaną częścią badań własnych obejmujących materiał badawczy, metody analityczne, opis wyników, co zajmuje 50 % pracy. Uzyskane, wybrane wyniki, opracowane są pod względem statystycznym i skonfrontowane zostały z literaturą przedmiotu, przez co opracowanie jest wiarygodne naukowo. W ogólnej ocenie praca napisana jest, zrozumiałym i poprawnym pod względem stylistycznym językiem. Dysertacja przedstawiona jest bardzo starannie i estetycznie.

3. Merytoryczna ocena rozprawy

Założenia pracy oraz koncepcja ich realizacji dowodzą bardzo dobrej znajomości i przygotowania warsztatowego do realizowanej problematyki. Świadczy o tym również dobór oraz zakres omawianych zagadnień, przedstawionych w rozdziale „Wstęp”. Rozdział ten został podzielony na trzy główne podrozdziały, z czego w jednym wyróżniono podpodrozdziały. W pierwszym podrozdziale, na początku Doktorantka omówiła znaczenie azotu w funkcjonowaniu organizmów żywych i wskazała formy azotu, jakie mogą występować w środowisku. Następnie wyczerpująco scharakteryzowała poszczególne procesy związane z obiegiem azotu w przyrodzie tj. proces amonifikacji, nityfikacji, denityfikacji, proteolizy oraz biologiczne wiązanie azotu. To ostatnie zagadnienie zostało opisane także w kontekście

biochemicznych uwarunkowań wiązania azotu atmosferycznego przez mikroorganizmy, ze szczególnym uwzględnieniem struktury i mechanizmu działania kompleksu nitrogenazy. Rozdział ten został wzbogacony schematem obiegu azotu w przyrodzie a także schematem obrazującym strukturę i działanie enzymu odpowiedzialnego za wiązanie azotu atmosferycznego wraz z równaniami chemicznymi opisującymi przemiany związków azotu. W następnym podrozdziale Doktorantka dokładnie opisała etapy rozwoju interakcji symbiotycznych, wyjaśniając na wstępie, na czym polega symbioza pomiędzy roślinami bobowatymi a bakteriami glebowymi zwanymi rizobiami, a następnie scharakteryzowała proces infekcji bakteryjnej korzeni roślin bobowatych i ich odpowiedź na zainicjowanie takiej symbiozy. Dla zobrazowania poszczególnych etapów rozwoju interakcji symbiotycznych w tym tworzenia brodawek korzeniowych zdeterminowanych i niezderminowanych Autorka przedstawiła schemat obrazujący rozwój i budowę brodawek korzeniowych. Opisała także główne czynniki inicjujące nawiązanie symbiozy między roślinami bobowatymi a rizobiami a także najważniejsze symbiotyczne sygnały molekularne, co obejmowało charakterystykę i funkcję flawonoidów oraz charakterystykę czynników Nod i proces ich biosyntezy. W rozdziale tym Doktorantka zawarła także ryciny przedstawiające strukturę cząstek różnych grup flawonoidów, budowę cząsteczek czynników Nod oraz schemat biosyntezy czynników Nod. Kolejne opisane przez Doktorantkę zagadnienie dotyczyło charakterystyki bakterii brodawkowych (rizobia) w tym w szczególności rodzaju *Bradyrhizobium*, będącego głównym mikrosymbiontem roślin bobowatych z plemienia *Genisteeae*, opisała także plemię *Genisteeae* oraz znaczenie roślin bobowatych w środowisku naturalnym oraz ekosystemach rolniczych. Z uwagi na to, że przedmiotem badań był szczodrzeniec zmienny (*Chamaecytisus albus* (Hacq.) Rothm.) gatunek należący do rodziny bobowatych a zagrożony wyginięciem i z tego tytułu wpisany do Polskiej Czerwonej Listy Paprotników i Roślin Kwiatowych z oznaczeniem „CR” Doktorantka poświęciła jeden podrozdział charakterystyce tej rośliny. W podrozdziale 3.3. dotyczącym bakteryjnych endofitów roślin i ich wpływu na gospodarza Doktorantka opisała znaczenie mikroorganizmów zaliczanych do PGPR/PGPE (ang. *plant growth-promoting rhizobacteria* / ang. *plant growth promoting endophytes*) i zaprezentowała mechanizmy działania tych drobnoustrojów, co dodatkowo zobrazowała na schemacie. W szczególności podkreśliła rolę endofitów w wiązaniu azotu, uwalnianiu fosforu z jego niedostępnych połączeń oraz żelaza poprzez produkcję sideroforów, w produkcji fitohormonów i cyjanowodoru mających istotne znaczenie w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin oraz w ochronie przed fitopatogenami.

Doktorantka przytoczyła także prace wskazujące, że zarówno rizobia jak i bakterie endofityczne PGPR/PGPE będąc składnikiem biopreparatów wywierają korzystny wpływ na uprawiane rośliny.

Oceniając ten rozdział, pomimo drobnych błędów stylistycznych i językowych należy podkreślić szeroki zasób wiedzy Autorki w odniesieniu do zagadnień związanych z tematyką pracy oraz również dużą umiejętność opisywania skomplikowanych zagadnień, takich jak, np. etapy rozwoju interakcji symbiotycznych ze szczególnym uwzględnieniem symbiotycznych sygnałów molekularnych. Moim zdaniem, bardzo dobra znajomość opisywanej tematyki powinna zaowocować opracowaniem przez Autorkę artykułu przeglądowego dotyczącego dotychczasowego stanu wiedzy i perspektyw w zakresie możliwości zastosowania bakterii stanowiących naturalnie występujący mikrosymbiont w brodawkach roślin bobowatych, ze szczególnym uwzględnieniem tych szczepów bakterii, które mogą zostać wykorzystane jako składnik biopreparatów do odnawiania i ochrony zagrożonych gatunków tych roślin.

Autorka za główny **cel pracy** przyjęła pozyskanie z brodawek korzeniowych szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*) efektywnych szczepów bakterii rizobium o najwyższym potencjale do promocji wzrostu szczodrzeńca zmiennego. Ten ogólny cel Doktorantka realizowała poprzez przeprowadzenie, logicznie ze sobą powiązanych etapów badań, które obejmowały ¹⁾ Pozyskanie szczepów bakteryjnych zasiedlających brodawki szczodrzeńca zmiennego do analiz genetycznych; ²⁾ ocenę zebranej kolekcji izolatów bakterii pod kątem ich zróżnicowania genetycznego i fenotypowego oraz określenie interakcji pomiędzy rośliną a bakteriami ³⁾ wytypowanie najwydajniejszego pod względem zawiązywania symbiozy szczepu bakteryjnego i zaproponowanie go, jako składnika biopreparatu stymulującego wzrost i rozwój rośliny będącej przedmiotem badań.

Dążąc do osiągnięcia postawionych celów Doktorantka wykorzystwała szereg nowoczesnych narzędzi badawczych oraz dobrze dobranych metod przedstawionych w rozdziale „**Materiały i metody**”. Rozdział ten Doktorantka podzieliła na trzy podrozdziały, „Materiały”, „Metody” i „Analiza statystyczna” co było słuszne ze względu na obszerność materiału badawczego i zastosowanych metod.

Materiał do badań stanowiły szczepy bakterii wyizolowane z brodawek korzeniowych szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*) rosnącego na glebie w doniczkach w Ogrodzie Botanicznym UMCS i stanowisku naturalnym w Gródku k. Hrubieszowa i dwa szczepy otrzymane z Katedry Genetyki i Mikrobiologii UMCS, które posłużyły, jako kontrole. Materiałem roślinnym będącym przedmiotem dysertacji był szczodrzeniec zmienny



i jego nasiona a także rośliny żarnowiec miotlasty (*Cytisus scoparius*), janowiec ciernisty (*Gernista germanica*), wyka jara (*Vicia sativa*), soja (*Glycine max*) oraz łubin żółty (*Lupinus luteus*). O wykorzystaniu tych ostatnich w badaniach skriningowych w poszukiwaniu alternatywnego gospodarza roślinnego dla wyselekcjonowanego szczepu KW98 brodawkującego korzenie *Chamaecytisus albus*, Doktorantka wspomina tylko w rozdziale Dyskusja (str.107), ale nie wymienia ich w rozdziale Materiał i metodyka. Liczne podłoża hodowlane i roztwory odczynników posłużyły, jako materiał do izolacji szczepów bakteryjnych z brodawek korzeniowych i ich hodowli oraz do sprawdzenia ich właściwości fizjologicznych tj. zdolności do tworzenia brodawek korzeniowych, wytwarzania kwasu indolilo-3-octowego (IAA) i indolu, zdolności do rozkładu trifosforanów (TCP), produkcji sideroforów i cyjanowodoru (HCN), a także zdolności do syntezy zewnątrzkomórkowych enzymów celulolitycznych. Materiały do analiz genetycznych stanowiły startery nukleotydowe, do reakcji PCR, wzorce mas cząsteczkowych DNA i zestawy odczynników niezbędnych do kompletnego przeprowadzenia reakcji PCR i sekwencjonowania nukleotydów. Doktorantka szczegółowo opisała metody i procedury badawcze stosowane w doświadczeniach laboratoryjnych, dotyczących charakterystyki zróżnicowania genetycznego i fenotypowego izolatów bakterii a także w doświadczeniach roślinnych *in vitro* i w doświadczeniach wazonowych. Szeroki wachlarz dobrze opisanych analiz genetycznych, obejmował izolację genomowego DNA, oznaczanie stężenia i czystości DNA, analizę zróżnicowania genomowego DNA metodą BOX-PCR, amplifikację fragmentów genów metabolizmu podstawowego (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*) i genów symbiotycznych (*nodA*, *nodC*, *nodZ*), rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji i ich oczyszczanie, PCR sekwencyjny i analizę wyników sekwencjonowania. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że oprócz ogromu przeprowadzonych analiz Doktorantka pokusiła się o zoptymalizowanie warunków amplifikacji genu *recA*, *atpD* z użyciem techniki PCR, poprzez zastosowanie m.in. dwóch różnych par starterów. W trakcie opisu tego rozdziału nie uniknęła, jednakże drobnych uchybień, a niektóre z nich przytoczę na końcu recenzji. Nie wpływają one jednak w żaden sposób na ważność problematyki badawczej a przydać się mogą w przygotowywaniu pracy do druku. Omawiane rozdziały tej części pracy wskazują na określony tryb postępowania, co stanowi dobre wprowadzenie do śledzenia dalszej części pracy. Zwraca przy tym uwagę fakt, że doświadczenia, podporządkowane realizowanym zadaniom badawczym, prowadzono z użyciem bardzo szerokiego wachlarza metod mikrobiologicznych, biochemicznych w tym enzymatycznych, z zastosowaniem zarówno klasycznych jak i wysoko zaawansowanych

technik badawczych takich jak analizy genetyczne. W tym miejscu należy podkreślić, że Doktorantka wykonała wszystkie analizy samodzielnie, co świadczy o dużych umiejętnościach organizacyjnych, analitycznych oraz posługiwania się specjalistyczną aparaturą badawczą.

Przechodząc do najważniejszej części pracy, jaką jest rozdział „Wyniki” należy stwierdzić, że ich omówienie prowadzone jest konsekwentnie, zgodnie z wyznaczonymi wcześniej celami, a w związku z tym jest spójne, co ułatwia zrozumienie treści zawartych w rozdziale. W pierwszej części, omówienie wyników dotyczyło rezultatów zróżnicowania genetycznego, zebranej kolekcji 92 izolatów bakterii, pochodzących z brodawek korzeniowych *Chamaecytisus albus* z użyciem techniki BOX-PCR. Na podstawie uzyskanych wyników tej analizy Autorka, skonstruowała dendrogram określający wzajemne podobieństwo genetyczne badanych szczepów i wskazała na istnienie 65 unikatowych genotypów w badanej kolekcji bakterii. Pozwoliło to na stwierdzenie, że mikroorganizmy zasiedlające brodawki *Chamaecytisus albus* charakteryzują się wysoką bioróżnorodnością. Z uwagi na to, że analiza BOX –PCR nie pozwoliła na określenie statusu taksonomicznego badanych izolatów bakterii, w kolejnej części tego rozdziału Autorka przedstawiła wyniki analizy podobieństwa sekwencji fragmentów genów metabolizmu podstawowego tj. genów *gyrB*, *recA*, *rpoB* i *atpD*.. Otrzymane sekwencje nukleotydowe fragmentów badanych genów szczepów bakteryjnych, Doktorantka porównała z sekwencjami szczepów referencyjnych, umieszczonych w bazie GenBank, co pozwoliło na opracowanie 4 oddzielnych filogramów oraz określenie stopnia podobieństwa sekwencji fragmentów czterech badanych genów, co przedstawiła w formie czterech oddzielnych tabel. Sekwencje nukleotydowe genu *gyrB* zdeponowała w bazie danych GenBank pod odpowiednimi numerami akcesyjnymi. Analiza porównawcza fragmentów sekwencji genów *gyrB*, *recA*, *rpoB* i *atpD* z sekwencjami szczepów referencyjnych z bazy GenBank pozwoliła na pogrupowanie badanych szczepów i zaklasyfikowanie ich do rodzajów *Bradyrhizobium*, *Tardiphaga*, *Bosea*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium* (tylko na podstawie analizy sekwencji genu *recA* i *rpoB*) i *Pararhizobium* (tylko na podstawie analizy sekwencji genu *atpD*, *gyrB* i *recA*). Ponadto w oparciu o przeprowadzone analizy, Doktorantka udowodniła zróżnicowanie genetyczne badanych szczepów bakterii endofitycznych szczodrzeńca zmiennego i wykazała, że część badanych szczepów wykazuje relatywnie dużą odrębność genetyczną. Wyjątek stanowiły wyniki analizy porównawczej fragmentu sekwencji genu *atpD*, które wykazały relatywnie wysokie podobieństwo do

szczepów referencyjnych z bazy GenBank. Do dokładniejszego ustalenia przynależności gatunkowej badanych izolatów, Pani mgr Karolina Włodarczyk zastosowała wielolokusową analizę porównawczą połączonych fragmentów sekwencji nukleotydowych czterech wspomnianych wyżej genów tj. analizę MLSA (ang. *multilocus sequence analysis*). Uzyskane wyniki badań przedstawionych w formie filogramu i tabeli z danymi określającymi wzajemne podobieństwo połączonych sekwencji badanych genów, pozwoliły Doktorantce na potwierdzenie przynależności badanych szczepów bakterii do ww. rodzajów. Ponadto Doktorantka na podstawie tej analizy wykazała, że w obrębie badanej populacji bakterii znajdują się takie grupy, których podobieństwo sekwencji do szczepów referencyjnych było niskie, co może sugerować, że badane szczepy bakterii należą do nowych dotąd niescharakteryzowanych gatunków. Kolejny etap pracy dotyczył analizy pokrewieństwa filogenetycznego wybranych izolatów bakterii z wykorzystaniem fragmentów sekwencji trzech genów związanych z procesem symbiozy tj. genów *nodZ*, *nodC* i *nodA* oraz połączonych fragmentów tych genów (analiza MLSA) w celu wykazania podobieństwa tych wytypowanych szczepów bakterii do rodzaju *Bradyrhizobium* należących do symbiowaru genistearum. Uzyskane wyniki badań Doktorantka przedstawiła w formie 4 filogramów i 4 tabel wykazujących odpowiednio, pokrewieństwo między taksonami oraz procent podobieństwa sekwencji fragmentów badanych genów *nod*. Na ich podstawie wykazała, że wytypowane szczepy bakterii należą do wskazanego we wcześniej analizie rodzaju *Bradyrhizobium* a niski stopień podobieństwa badanych sekwencji genów do sekwencji referencyjnych oraz ich pogrupowanie w obrębie jednej gałęzi, wyraźnie oddzielonej od gałęzi grupującej szczepy referencyjne, może świadczyć o zidentyfikowaniu nowego symbiowaru w obrębie tego rodzaju. W kolejnym etapie badań, dotyczącym biochemicznej charakterystyki wszystkich izolatów bakterii pochodzących z brodawek korzenia szczodrzenia zmiennego, Doktorantka wykazała, że zdolność syntezy i uwalniania kwasu indolilo-3-octowego (IAA) zaobserwowano u ponad połowy (59%) badanych szczepów, z czego większość wykazywała wysoką zdolność produkcji IAA. Niewielki procent badanych szczepów (17%) był zdolny do produkcji indolu. Zdolność do uwalniania przyswajalnych form fosforu z trudno rozpuszczalnych soli fosforanowych $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ stwierdzono u 26% badanych szczepów, wśród których pojedyncze szczepy wykazywały największe uzdolnienia do uwalniania PO_4^{3-} . Zdolność do produkcji sideroforów wykazywało 63% badanych szczepów bakterii a do syntezy enzymów celulolitycznych 70% badanych szczepów bakterii. Zdolność do produkcji cyjanowodoru posiadało jedynie 2% badanej populacji i była to

właściwość na poziomie umiarkowanym. Charakterystykę wszystkich cech fizjologicznych mających znaczenie w stymulacji wzrostu i rozwoju roślin Doktorantka przedstawiła w zbiorczej tabeli. W kolejnej części tego rozdziału, Autorka przedstawiła wyniki badań dotyczące właściwości symbiotycznych endofitów *Chamaecytisus albus*, w których wykazała, że tylko 28 szczepów, spośród badanych 92, posiada zdolność do brodawkowania korzeni szczodrzeńca zmiennego, wśród których jedne wykazywały większą efektywność nawiązywania symbiozy mierzonej liczbą brodawek korzeniowych a inne mniejszą. Ponadto Doktorantka wskazała, że wśród tych 28 szczepów bakterii, jest szczep oznaczony KW98, który powodował utworzenie największej liczby brodawek, co oznacza, że charakteryzował się zdolnością do wiązania azotu atmosferycznego i na tej podstawie został wybrany, jako najbardziej efektywny mikrosymbiont *Chamaecytisus albus* do doświadczeń wazonowych. Na podstawie tych doświadczeń Doktorantka wykazała, że inokulacja roślin tym szczepem bakterii, spowodowała istotnie różny, od tych w próbach kontrolnych, wzrost roślin szczodrzeńca zmiennego, mierzonych na podstawie wielkości blaszki liści, przyrostu świeżej masy i długości roślin.

Doktorantka w rozdziale „**Podsumowanie i wnioski**” w sposób wyważony, z dużą ostrożnością przedstawiła 5 trafnych wniosków, które sformułowała na podstawie przeprowadzonych badań i jednocześnie wskazała na wykorzystanie wytypowanego i przebadanego szczepu bakterii KW98, wykazującego znaczącą zdolność do brodawkowania korzeni szczodrzeńca zmiennego (*Chamaecytisus albus*), jako składnik biopreparatu wspomagającego wzrost tej rośliny a szczepów bakterii niezdolnych do brodawkowania a wykazujących cechy bakterii PGPR, jako składniki biopreparatów bakteryjnych wspomagających wzrost roślin.

Dyskusja wyników jest prowadzona z podobną kolejnością i konsekwencją jak ich omówienie. Autorka wykorzystwała przy tym bardzo wiele publikacji, związanych z problematyką pracy, z którymi skonfrontowała wyniki badań własnych. W wielu poruszanych kwestiach Doktorantka podjęła się także interpretacji wyników i przedstawiała przekonujące sugestie, co wzbogaca i podnosi wartość merytoryczną rozprawy. Na końcu pracy znajduje się spis bardzo starannie przedstawionej literatury.

W efekcie szeroko zakrojonych zadaniowo, wieloaspektowych i kompleksowych badań Autorka otrzymała wiele ważnych i interesujących informacji, z których część odnotowała po raz pierwszy.

Reasumując, do oryginalnych o dużej wartości poznawczej, a także zawierającej przesłanki praktyczne rezultatów badań Pani mgr Karoliny Włodarczyk w szczególności zaliczam:

1. Podjęte po raz pierwszy badania dotyczące poznania populacji bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe niezbadanej dotychczas pod tym względem rośliny, jakim jest szczodrzeniec zmienny (*Chamaecytisus albus*) i wskazania potencjalnego udziału wytypowanych szczepów w ochronie tego zagrożonego wyginieciem gatunku.
2. Wykazanie, na podstawie techniki BOX-PCR, że 71% badanej populacji bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe *Chamaecytisus albus*, posiada unikatowy genotyp.
3. Ustalenie przynależności rodzajowej i gatunkowej nieznannej do tej pory populacji bakterii brodawkowych szczodrzenia zmiennego, na podstawie analizy podobieństwa sekwencji fragmentów genów kodujących białka metabolizmu podstawowego tj. genów *gyrB*, *recA*, *rpoB* i *atpD* oraz połączonych fragmentów sekwencji tych genów za pomocą analizy MLSA.
4. Optymalizację warunków amplifikacji fragmentów wybranych genów metabolizmu podstawowego *recA* i *atpD*, poprzez zastosowanie dwóch różnych par starterów w reakcji PCR.
5. Zastosowanie analizy pokrewieństwa filogenetycznego badanych szczepów bakterii z wykorzystaniem fragmentów sekwencji genów związanych z procesem symbiozy *nodZ*, *nodC* i *nodA*, mającej na celu doprecyzowanie i potwierdzenie przynależności zidentyfikowanych, z wykorzystaniem analizy porównawczej fragmentów sekwencji genów metabolizmu podstawowego szczepów, do rodzaju *Bradyrhizobium* należących do symbiowaru genistearum.
6. Wykazanie, że wśród badanych szczepów tylko 30% jest zdolnych do indukcji tworzenia brodawek korzeniowych *Chamaecytisus albus*.
7. Udowodnienie, że spośród przebadanej puli 92 szczepów bakterii, jeden szczep oznaczony KW98 należący do rodzaju *Bradyrhizobium* wykazujący silne uzdolnienia do tworzenia brodawek, istotnie poprawia wzrost i rozwój szczodrzenia zmiennego w doświadczeniach modelowych, w warunkach zbliżonych do naturalnych i zaproponowanie tego szczepu jako składnika biopreparatu wspomagającego wzrost tej rośliny a tym samym odbudowy populacji tej rośliny.

8. Wykazanie, że szczepy niezdolne do tworzenia brodawek korzeniowych szczodrzeńca zmiennego wykazują liczne cechy bakterii PGPR/PGPE poprzez silne uzdolnienia do wytwarzania i uwalniania produktów metabolizmu komórkowego mających znaczenie w promowaniu wzrostu roślin i zaproponowanie ich jako dodatkowych składników biopreparatów wspomagających wzrost roślin.

Jak w każdej pracy, zwłaszcza wielowątkowej trafić się mogą pewne nieścisłości i niedociągnięcia. Zwracam uwagę tylko na te, które moim zdaniem wymagają uzupełnienia lub korekty, ponieważ dotyczą merytorycznej bądź edytorskiej strony pracy. Jednakże nie umniejszają wartości i ważności rozwiązanego problemu badawczego i nie rzutują na merytoryczną ocenę pracy a wynikają z dużego zainteresowania podjętymi przez Doktorantkę badaniami i dotyczą:

1. W przedłożonym do recenzji wydruku komputerowym rozprawy doktorskiej Doktorantka nie zaznaczyła, w jakim czasopiśmie zostały opublikowane wyniki badań, pomimo, że podała punkty MEiN przypisane do czasopisma (70 pkt.) i IF=2,349. Proponuję w przyszłości zwracać szczególną uwagę na cytowanie pełnej bibliografii artykułów naukowych, co przedkłada się na ich rozpoznawalność i cytowania. Nie zaznaczono także, która część wyników przedstawionych w przedłożonej dysertacji została już opublikowana.

Przegląd piśmiennictwa

2. str. 13-14.: W pierwszym podrozdziale Wstępu, zatytułowanym „Obieg azotu w przyrodzie” Doktorantka w pierwszej kolejności scharakteryzowała przemiany mineralnych form azotu tj. amonifikację, nityfikację, denityfikację a potem proces proteolizy. Moim zdaniem powinna zacząć od charakterystyki procesu proteolizy w trakcie, którego rozkładane są białka do związków prostszych, które to kolejno ulegają mikrobiologicznym procesom hydrolizy, podczas których uwalniane są nieorganiczne związki azotu i te w dalszej kolejności ulegają mikrobiologicznym przemianom, które Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała.
3. str. 13: Pozostając przy tym zagadnieniu Doktoranta posługuje się sformułowaniem azotyny (III). Według obecnie obowiązującej nomenklatury (IUPC *ang. International Union of Pure and Applied Chemistry*) azotyny zapisuje się jako azotany (III) a azotany jako azotany (V). Ponadto moim zdaniem bardziej poprawnym w opisywaniu

przemian nieorganicznych związków azotu w odniesieniu do procesu nityfikacji jest następujące sformułowanie „amoniak jest utleniany do azotanów (III)” zamiast „amoniak w warunkach tlenowych jest przekształcany do azotanów (III)” a w stosunku do procesu denityfikacji proponuję sformułowanie „proces redukcji azotanów” zamiast „proces przekształcania azotanów”.

4. str. 28: Autorka napisała, cytuję, „plemię *Genisteae* jest jednym z największych plemion pośród rodziny roślin bobowatych - obejmuje 25 rodzajów z 618 gatunkami roślin”. Na poprzedniej stronie (str.27) Autorka informuje, że rodzina bobowatych tworzy trzy podrodziny w których wyróżnione są rodzaje, i gatunki a w przypadku bobowatych właściwych także plemiona. Jednakże w konfrontacji z tym pierwszym cytowanym zdaniem nie wynika, że plemię *Genisteae* jest największym plemieniem pośród rodziny bobowatych, gdyż zawiera 25 rodzajów a podrodzina *Caesalpinioideae*-Brezyłkowe (170 rodzajów), *Mimosoideae* - Mimosowe (80 rodzajów), *Papilionoideae* - Bobowate właściwe (28 plemion, około 480 rodzajów i 14000 gatunków). Uprzejmie proszę doprecyzować tę informację, na jakiej podstawie Pani podała, że plemię *Genisteae* jest najliczniejsze, gdyż z przedstawionych danych /wyliczeń tak nie wychodzi, że jest to najliczniejsza grupa.

Materiał i metody

5. str. 38, str. 53: W nomenklaturze gleboznawczej poprawnym sformułowaniem nie jest „ziemia” tylko „gleba”.
9. Str. 38: Według moich wyliczeń wychodzi, że Doktorantka w badaniach wykorzystwała 91 szczepów a Autorka podaje zawsze 92. Rozumiem, że jest to niedopatrzenie.
10. Str.48: W podrozdziale 5.2.1 opisano izolację szczepów bakteryjnych z brodawek korzeniowych szczodrzeńca zmiennego pochodzącego z Ogrodu Botanicznego UMCS. Doktorantka nie doprecyzowała jednak w jaki sposób wyizolowała szczepy bakteryjne ze stanowiska naturalnego w Gródku k. Hrubieszowa (woj. lubelskie). Ponadto brakuje informacji o ilości roślin wykorzystanych do izolacji, jak i tego, czy rośliny z naturalnych stanowisk były to także osobniki 2-3 letnie, jak te pochodzące z Ogrodu Botanicznego. Ile roślin pobrano z Ogrodu Botanicznego i z Gródka w celu izolacji mikrosymbiontów.
11. str. 49. Ile brodawek Doktorantka wykorzystwała w celu izolacji bakterii i czy były to brodawki z jednego korzenia i jednej rośliny czy kilku korzeni różnych roślin. Jeżeli z kilku to z ilu?



12. str.49: Jakiej metody Doktorantka użyła do otrzymania czystych kultur bakteryjnych. Czy była to metoda posiewu redukcyjnego, czy może inne metoda?
13. Str. 52: W jakiej ilości wykładano wyjałowione nasiona szczodrzeńca zmiennego na płytki Petriego z podłożem bezazotowym Fåhræus'a?
14. Str.52: W jaki sposób zakażano młode rośliny szczodrzeńca zmiennego zawieszoną badanych szczepów bakterii w doświadczeniu *in vitro* i doświadczeniu wazonowym?
15. Str. 94-100: Czy szczep KW98 oprócz wysokich zdolności do brodawkowania korzeni szczodrzeńca zmiennego wykazuje także cechy bakterii PGPR/PGPE tj. produkuje i uwalniania związki stymulujące wzrost roślin?. Zabrakło takiej informacji w opisie wyników i Doktorantka nie odniosła się do tych informacji w dalszej części pracy.
16. Czy przy zastosowaniu dwóch par starterów atp D1f i atpDr lub TsatpDF i TSatpDR w celu amplifikacji fragmentu genu *atpD* zastosowano takie same warunki reakcji PCR? Taką informację umieszczono, bowiem w odniesieniu do dwóch par starterów w celu amplifikacji fragmentu genu *recA*.

Wyniki

17. Str 62: Zabrakło omówienia wyników dotyczących izolacji szczepów bakteryjnych z brodawek korzeniowych *Chamaecytisus albus*, stąd w tym miejscu kieruję pytanie: Czy wszystkie wyizolowane szczepy zostały wykorzystane w analizach genetycznych, czy tylko wybrane 92 szczepy?. Jeżeli wybrane, to jakimi kryteriami kierowano się w selekcji uzyskanych izolatów do dalszych badań.
18. Str.65 i 85: Dlaczego jedynie sekwencje nukleotydowe genu *gyrB* i *nodZ* zdeponowano w bazie danych GenBank po odpowiednimi numerami akcesyjnymi?
19. Str.61: W odniesieniu do analizy statystycznej należy podać czemu miała służyć, co miała udowodnić.
20. str.81: Jakie pary starterów użyła Pani w tej analizie porównawczej sekwencji nukleotydowych (MLSA) połączonych fragmentów genów *gyrB-recA-rpoB-atpD*?
21. Str.85: Dlaczego Autorka, do analizy pokrewieństwa filogenetycznego oznaczanej na podstawie sekwencji fragmentów genów *nodZ*, *nod C* i *nod A* wybrała szczepy, które we wcześniejszych badaniach genetycznych wykazywały podobieństwo do rodzaju *Bradyrhizobium*?
22. Str. 94: Na jakiej podstawie Doktorantka wykazała, że badane szczepy wykazują wysoką, umiarkowaną lub niską zdolność do syntezy kwasu indolilo-3 octowego

(IAA) i uwalniania cyjanowodoru . Czy przyjęła jakieś kryterium?

Dyskusja

23. Str. 107 Autorka napisała, że w testach roślinnych, w doświadczeniu skринingowym mającym na celu wskazanie alternatywnego gospodarza dla wyselekcjonowanego szczepu KW98, wykorzystwała nasiona roślin pokrewnych dla szczodrzenia zmiennego takich jak żarnowiec miotlasty (*Cytisus scoparius*), janowiec ciernisty (*Gernista germanica*), wyka jara (*Vicia sativa*), soja (*Glycine max*) oraz łubin żółty (*Lupinus luteus*). Jednakże w rozdziale Materiał i metodyka, Doktorantka nie doprecyzowała tych informacji i nie umieściła opisu tych badań.
24. Str.105: Proszę doprecyzować, która wartość procentowa, uzyskana w analizie MLSA, wskazująca podobieństwo badanych sekwencji do sekwencji referencyjnych jest wartością „progową” oznaczającą, że badane szczepy bakterii mogą należeć do nowych dotąd nie poznanych gatunków. W Dyskusji na str. 105 napisała Pani, że jest to wartość poniżej 97% a na str. 85, że jest to wartość poniżej 90%.

Do wyżej przedstawionych pytań i komentarzy uprzejmie proszę się odnieść podczas obrony pracy doktorskiej.

4. Życiorys naukowy

Jakkolwiek dorobek publikacyjny Doktorantki, nie jest przedmiotem niniejszej oceny, to zasługuje na podkreślenie, ponieważ wskazuje na dynamiczny rozwój oraz dużą samodzielność naukową. Pani mgr Karolina Włodarczyk posiada w swoim dorobku naukowym 5 artykułów opublikowanych w czasopismach ujętych w bazie JCR, gdzie w jednym jest pierwszym autorem oraz 7 rozdziałów w monografii, w których w połowie jest pierwszym autorem. Jest współautorką 6 komunikatów o zasięgu międzynarodowym (pierwszy autor w dwóch komunikatach) i 20 o zasięgu krajowym, wśród których, w 14 jest pierwszym autorem. W latach 2017-2022 otrzymywała liczne stypendia w tym stypendium Rektora UMCS dla Najlepszych Doktorantów, Stypendium na dofinansowanie zadań projakościowych, Stypendium z Własnego Funduszu Stypendialnego UMCS. Ponadto Doktorantka uczestniczyła w licznych kursach i szkoleniach wskazujących na dodatkowe zainteresowania naukowe wykraczające poza zakres podjętej w rozprawie doktorskiej problematyki. Doktorantka wykazywała się aktywnością organizacyjną i popularyzatorską. Aktywnie przez kilka ostatnich lat uczestniczyła w działaniach na rzecz popularyzacji nauki poprzez organizacje i prowadzenie warsztatów w ramach Nocy Biologów, Lubelskiego

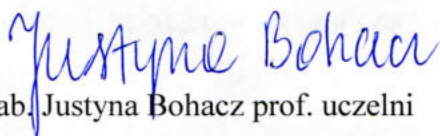
Festiwalu Nauki, SKN Bakcyl. Organizowała/współorganizowała „Forum Młodych Naukowców 2019” i warsztaty bioinformatyczne we współpracy z firmą ideas4biology.com.

5. Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Włodarczyk stanowi wartościowe i oryginalne pod względem naukowym opracowanie, które prezentuje nie tylko ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie rozwiązywanego problemu i w znacznym stopniu ją poszerza, ale przede wszystkim prezentuje nowe do tej pory niebadane, a istotne w ochronie szczydliwego zmiennego (*Chamaecytisus albus*), gatunku zagrożonego wyginięciem, wyniki badań, mających przesłanki badań aplikacyjnych. O wysokiej wartości ocenianej pracy, obok oryginalnej i aktualnej tematyki, decyduje przyjęta koncepcja jej realizacji, wysoki poziom metodyczny i szeroki zakres prowadzonych badań, co świadczy o dużej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Stwierdzam, zatem, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i stosownie do odpowiednich przepisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Włodarczyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i do publicznej obrony.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorskie i konieczne badania na rzecz ochrony gatunków roślin zagrożonych wyginięciem, a także ze względu na dobrze dobrany, kompleksowy zakres przeprowadzonych badań, z zastosowaniem nowoczesnych metod analitycznych, w celu rozwiązania problemu badawczego oraz ze względu na perspektywy wykorzystania uzyskanych wyników w praktyce, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Włodarczyk stosowną nagrodą.


dr hab. Justyna Bohacz prof. uczelni