Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Suśniak
pt. „Wpływ zmian w składzie błony zewnętrznej *Agrobacterium tumefaciens* na proces infekcji roślin na modelu pomidora"

Przedstawiona rozprawa została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Iwony Komanieckiej, prof. UMCS, w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Badania były realizowane w ramach projektu OPUS 16 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz projektu dla Młodych Naukowców finansowanego przez Instytut Nauk Biologicznych UMCS. Obok głównego celu pracy dotyczącego wpływu zmian zawartości wybranych lipidów w błonie zewnętrznej *Agrobacterium tumefaciens* na proces infekcji roślin oraz patogenezę wywołanej choroby, Doktorantka podjęła próbę określenia zmian jakościowych w populacjach bakterii endofitycznych zasiedlających rośliny pomidora po inokulacji tym patogenem.

Bakteria *A. tumefaciens* jest polifagiem porażającym kilkaset gatunków roślin, prawie wyłącznie dwuliściennych. Powoduje chorobę o nazwie guzowatość, przy czym na drzewach owocowych, ze względu na występowanie zmian chorobowych głównie na korzeniach i szyjce korzeniowej, nosi nazwę guzowatość korzeni. Infekcja ma najczęściej charakter lokalny, tzn. narośle rozwijają się w miejscu infekcji, ale w przypadku niektórych roślin, np. winorośli, róży czy złocienia udowodniono, że bakterie mogą rozprzestrzeniać się w tkance przewodzącej powodując powstawanie guzów na części nadziemnej. Choroba jest znana na wielu gatunkach roślin ozdobnych, na których do nazwy guzowatość dodano nazwę rośliny-gospodarza, np. guzowatość różanecznika, guzowatość kaktusów (wg opracowania 'Polskie nazwy chorób roślin uprawnych' wyd. PTFit Poznań, 2017). Szkodliwość guzowatości polega głównie na ograniczaniu przewodzenia wody i składników pokarmowych, których straty związane budową narośli mogą sięgać nawet 70%. Wielkość (średnica) guzów może wynosić od kilku milimetrów do nawet kilkunastu centymetrów. Choroba jest szczególnie groźna dla roślin wieloletnich, zwłaszcza w pierwszych latach po posadzeniu, a więc dla upraw szkółkarskich, młodych sadów i innych plantacji. Z tego względu mówi się niekiedy, że jest to choroba niemowlęcego wieku drzewek.

Podjęcie przedstawionych badań uważam za celowe, bowiem poznanie determinantów warunkujących zakażenie roślin przez *A. tumefaciens* jest ważne i interesujące nie tylko w aspekcie poznawczym, a po przeprowadzeniu szerszych badań może mieć również znaczenie aplikacyjne. W obszernym wstępie stanowiącym wprowadzenie do wykonanych badań przedstawiono aktualny stan poznania czynników związanych z patogennością i wirulencją patogena, koncentrując się głównie na najważniejszych genach zlokalizowanych na koniugacyjnym plazmidzie Ti (Tumor inducing), w tym genach *Vir* kodujących wirulencję, genach produkcji opin oraz najważniejszym fragmencie tego plazmidu tzn. T-DNA, na którym znajdują się geny determinujące hipertrofię i hiperplazję zakażonych komórek rośliny, nazywane onkogenami. A czy poznane już geny chromosomalne *A. tumefaciens* także uczestniczą w procesie patogenezy?

Podczas czytania rozprawy nasunęło się pytanie o zasadność używania terminu kalus w kontekście infekcji przez *A. tumefaciens*. Kalus jest określany jako tkanka przyranna, zabliźniająca uszkodzenia tkanki okrywającej i tkanek leżących pod nią. Kalus tworzy się także w przypadku powstawania raka drzew, czyli nekrozy na pniu czy konarach, wokół której w okresie aktywności kambium powstaje wałek kalusa. Warto dodać, że nazwa bakterii *A. tumefaciens* w języku łacińskim pochodzi od jej zdolności wywoływania narośli, guzów czy nabrzmień. Można zauważyć ich pewne podobieństwo do kalusa, ale etiologia jest oczywiście inna.

Oddzielną część wstępu Autorka poświęciła przeglądowi literatury na temat architektury błony zewnętrznej patogena, a zwłaszcza lipidów. Należy podkreślić, że badania nad ich znaczeniem w patogenności *A. tumefaciens* podjęto stosunkowo niedawno i to w nielicznych ośrodkach. Wykazano na przykład, że szczepy zmutowane w zakresie wytwarzania fosfatydylocholiny traciły zdolność do transformacji komórek, czyli właściwie zdolność infekcji roślin. Stwierdzono także osłabienie innych cech związanych ze wzrostem takich mutantów. Natomiast w zakresie wytwarzania lipidu ornitynowego mutanty wykazywały właściwości stymulacji infekcji roślin przez patogena.

Bardzo interesujący jest ostatni rozdział Wstępu, w którym opisano zastosowanie metod spektroskopowych w obrazowaniu tkanek roślinnych, w tym obrazowania spektrometrii mass (MALDI MSI, MALDI MS), obrazowania spektroskopowego w podczerwieni oraz spektrometrii Ramana. Metody te okazały się przydatne w określaniu występowania i dystrybucji metabolitów wytwarzanych w tkankach po inokulacji roślin różnymi szczepami *A. tumefaciens*, to znaczy szczepem dzikim i jego mutantami oraz komplementantami.

Poza stroną opisową mgr Katarzyna Suśniak wprowadziła do tego rozdziału poglądowy materiał ilustracyjny w postaci fotografii, schematów, tabel, wykresów i rysunków. Oddzielną część rozdziału stanowi wstępna charakterystyka mutantów i komplementatów szczepu C58 *A. tumefaciens* użytych w badaniach własnych.

Praca zawiera wszystkie formalnie wymagane dla rozprawy doktorskiej części, tzn. wstęp obejmujący przegląd literatury mającej głównie związek z przedmiotem badań, jasno sformułowany cel, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz streszczenie w językach polskim i angielskim. Praca obejmuje 114 stron, w tym 8 tabel i 31 rysunków. W różnych miejscach pracy Doktorantka powołuje się na ponad 110 pozycji literatury zestawionych na końcu pracy. Ponadto, w aneksie, Autorka przedstawiła swój życiorys naukowy obejmujący wykazy: projektów naukowych, w których była wykonawcą lub kierownikiem, odbytych staży zagranicznych, publikacji naukowych (łącznie 9, w tym w dwóch jest pierwszym autorem), współautorstwo 13 monografii recenzowanych, udziału w 8 konferencjach międzynarodowych i 9 krajowych. Była także współautorem jednego patentu.

Niektóre informacje i uwagi szczegółowe

Pierwszy etap badań dotyczył analizy elektroforetycznej mutantów i komplementantów szczepu C58. W badaniach wykorzystano 3 mutanty (mutacje w syntezie lipidu A oraz fosfatydyloetanolaminy) oraz 8 komplementantów. Hodowano je na pożywce 79CA, odpowiednio z dodatkiem gentamycyny lub/oraz kanamycyny. Do analizy plazmidowego DNA zastosowano zmodyfikowaną metodę Eckhardta. Mutantami i komplementantami inokulowano siewki pomidora i po 6 tygodniach od inokulacji analizowano strukturę powstałych narośli. Dla porównania do badań włączono szczep dziki C58. W zależności od szczepu stwierdzono różnice w wielkości narośli i ich strukturze. Narośli powstałych od inokulacji mutantami w syntezie lipidu A było mniej i ogólnie były one mniejsze w porównaniu do narośli od inokulacji szczepem dzikim. Podobnie efekty inokulacji zaobserwowano w przypadku mutanta AtuC58ΔpssΔ (defektywnego w syntezie fosfatydyloetanolaminy). A jakie było stężenie inokulum (tzn. liczba jtk/ml)? Proszę również o podanie jak przygotowywano inokulum. Ponadto, czy w trakcie realizacji tej części badań zaobserwowano wytwarzanie kalusa na roślinach zranionych, ale nie inokulowanych?

W kolejnym etapie badań narośli zastosowano technikę spektrometrii mas MALDI MS. Analiza widma mas maceratu narośli od inokulacji szczepem dzikim C58 wykazała, że dominowały trzy sygnały, które wskazywały na występowanie α-tomatyny – toksyny o właściwościach przeciwbakteryjnych. Wynik ten jest bardzo interesujący, a wartościowe

byłoby także poznanie, kiedy i w jakiej ilości związek ten tworzy się w procesie patogenezy. Warto wspomnieć, że po nawiązaniu pasożytniczego stosunku patogena z rośliną może on zamrzeć, a guzy będę się dalej rozwijały wskutek trwałej transformacji porażonych komórek. Czy w związku z tym toksyna ta może mieć wpływ zarówno na *A. tumefaciens*, jak i ekspresję wprowadzonych do genomu rośliny onkogenów? Wspomnę tu nasze badania fenotypowe, które wykazały, że rozwój guzów na korzeniach drzewek owocowych jest największy podczas aktywności kambium i ustaje pod koniec okresu wegetacji.

Doktorantka przedstawiła następnie analizę narośli stosując metodę spektrometrii mas MALDI MSI. Uzyskała mapy rozkładu przestrzennego metabolitów w naroślach w zależności od użytego do inokulacji szczepu. I tak mutanty w genie *fabFII* oraz ich komplementanty tylko nieznacznie zmieniły rozkład α-tomatyny w naroślach w porównaniu do narośli od szczepu dzikiego. W podsumowaniu Autorka stwierdziła, że inokulacja mutantami skutkuje słabszą reakcją odpornościową pomidora niż inokulacji pozostałymi szczepami. Poproszę jeszcze o komentarz na ten temat.

W naroślach stwierdzono także występowanie innych metabolitów, m.in.: solamarginę, feotynę, solasoninę, dehydrotomatynę oraz likopersoid. Niektóre z tych związków znane są z działania przeciwbakteryjnego czy nawet przeciwzapalnego. A czy są jakieś informacje, że któryś z wymiennych związków jest aktywny wobec bakterii fitopatogennych, w tym wobec sprawcy guzowatości?

Narośla poddano również analizie techniką spektroskopii FT-IR uzyskując mapy dystrybucji wybranych pasm pochodzących od białek, lipidów i fosfolipidów. Na podstawie obrazów mikroskopowych i map dystrybucji Amidu I oraz Amidu II stwierdzono wyższe nagromadzenie ich pasm w naroślach od zakażeń mutantami w porównaniu do zakażeń szczepem dzikim. Nie wykazano różnic w dystrybucji lipidów i fosfolipidów między naroślami od mutanta w genie *fabII* (C58-15), a naroślami od szczepu dzikiego. Natomiast w naroślach od mutanta w genie *Atu1595* stwierdzono, że pasma lipidowe występowały w znacznie wyższej intensywności, a pasma fosfolipidowe w mniejszej intensywności niż w naroślach od szczepu dzikiego. Mutant w genie *pssA* powodował zwiększenie nagromadzenia lipidów w naroślach w porównaniu do narośli od szczepu dzikiego.

Ostatnia analiza w tej części badań była poświęcona obrazowaniu tkanek łodygi i narośli techniką spektroskopii Ramana. Uzyskane mapy wskazują, że pasma Amidu I w naroślu od szczepu dzikiego były skoncentrowane w konkretnych punktach, natomiast w tkankach od inokulacji mutantami były one bardziej rozproszone. Podobna była dystrybucja lipidów w roślinach zakażonych szczepem dzikim i mutantem *fabFII*, natomiast w tkankach zakażonych

mutantami w genie *Atu1595* oraz *pssA* lipidy były rozproszone. Ciekawą sytuację zaobserwowano także w przypadku polisacharydów. W naroślach od szczepu dzikiego charakterystyczne pasma były skoncentrowane w konkretnych miejscach, a w naroślach od inokulacji szczepami AtuC58-15 i AtuC58ΔpssΔ prawie w ogóle nie występowały. Z kolei w naroślach od inokulacji szczepem AtuC58-1595 były one rozproszone w całym obszarze obrazowania. Ostatnie badane metabolity to flawonoidy, które – jak stwierdzono – nie występowały w naroślach zarówno od szczepu dzikiego, jak i mutanta AtuC58ΔpssΔ, a w naroślach od inokulacji pozostałymi mutantami były równomiernie rozmieszczone. A czy udało się zaobserwować jakąś prawidłowość między wykrytymi metabolitami (po inokulacji poszczególnymi mutantami), a strukturą (wielkością) narośli, do oceny której pomocna byłaby skala bonitacyjna?

Druga część rozprawy została poświęcona jakościowym zmianom w mikrobiomie pomidora po punktowej inokulacji łodygi bakteriami dzikiego szczepu C58. Przez 6 tygodni, w odstępach tygodniowych, Autorka pobierała do analizy fragment łodygi z miejscem inokulacji, fragment liścia powyżej miejsca inokulacji oraz fragment korzenia. Tu prosiłbym o podanie więcej informacji na temat samej procedury badań i powtórzeń ich poszczególnych elementów. Bardzo interesujący jest fakt, że inokulacje roślin wykonano tylko w jednym miejscu na łodydze, a próbki do badań pobierano także z liścia i korzeni, których nie inokulowano. Czy w takim razie można przypuszczać, że przyjęto tu możliwość systemicznego rozprzestrzeniania *A. tumefaciens* w roślinie od miejsca inokulacji? A może patogena potraktowano jako induktora sygnałów związanych z odpornością pomidora, w tym przypadku na stres pochodzenia biotycznego? Powstaje także pytanie jakie było stężenie inokulum oraz czy na pobranym materiale występowały narośla, zwłaszcza w końcowym okresie pobierania próbek? I jeszcze jedno: czy próbki były w jakiś sposób standaryzowane, np. ważone? Na stronie 48 w rozdziale Materiały i Metody Autorka podaje, że ‘po okresie inkubacji maceratu zliczono i opisano wyrosłe kolonie, z których pobrano po jednej kolonii reprezentatywnej z każdego typu morfologicznego i przesiano dla otrzymania czystej kultury’. Mam pytanie: czy te obliczenia przekładają się na informację podaną na stronie 68 w rozdziale Wyniki. Z tytułu paragrafu 4.4 (str. 68) należy rozumieć, że wykonano całościową analizę po inokulacji roślin szczepem C58, tzn. łącznie z wszystkich trzech organów. Mam również uwagę odnośnie sposobu selekcji kolonii bakterii do ich opisu (identyfikacji) na podstawie cech morfologicznych. Czy sposób ten wiarygodnie odzwierciedla składniki mikrobiomu bakteryjnego? Do izolacji bakterii zastosowano dwie pożywki: PCA i 79CA. Autorka podała, że na pierwszej z nich wyosobniono i wybrano 55 izolatów, a na drugiej 39.

Nie podano jednak konkretnie z jakich, wymienionych wcześniej miejsc, tzn. fragmentów organów (liścia, korzenia, łodygi), pochodziły te izolaty. Można jedynie domniemywać, że wiązało się to z zastosowaną pożywką, czyli z organów części nadziemnej i podziemnej, dla których przeznaczone są odpowiednio wymienione pożywki. Identyfikację bakterii oparto na barwieniu Grama, analizie profili komórkowych kwasów tłuszczowych oraz metodzie MALDI Biotyper. I tu nasuwa się pytanie odnośnie wyników przedstawionych na rycinie 26. Czy tytuły wykresów A i B, cytuję: 'Liczba izolatów otrzymanych po wysiewie bakterii na daną pożywkę (odpowiednio PCA, 79CA)' oznaczają to samo, co na osi rzędnych (y), na której podano 'Liczba opisanych izolatów' i dotyczą liczby kolonii wyrosłych na odpowiedniej pożywce, czy też liczby reprezentatywnych izolatów? Na tej rycinie przedstawiono łączną liczbę izolatów bakterii wyosobnionych (czy wybranych?) w poszczególnych terminach (tygodniach) po inokulacji stosując objaśnienia 'roślina zakażana' i 'roślina niezakażana'. Interesujące byłoby pokazanie bakterii pochodzących z poszczególnych organów, zarówno ich składu ilościowego, jak i jakościowego.

W tabelach 6 i 7 Doktorantka przedstawiła wszystkie wyniki dotyczące identyfikacji izolatów bakterii oddzielnie pochodzących z poszczególnych pożywek (odpowiednio 55 i 39 izolatów), co jest bardzo pomocne w analizie możliwego składu jakościowego populacji bakterii zasiedlających rośliny pomidora. Ze względu na to, że często lub najczęściej, udało się zidentyfikować zebrane izolaty do gatunku mam pytanie czy o którymś z nich wiadomo, że wykazuje aktywność przeciwbakteryjną w ogóle, a może wykazuje aktywność przeciwko sprawcy guzowatości? Pytanie to ma również związek z analizą otrzymanych wyników przedstawionych na stronach 88-96. Pewnych informacji dostarczają drzewa filogenetyczne szczepów wyizolowanych z pomidora i hodowanych na pożywkach PCA lub 79CA, skonstruowane na podstawie analizy całkowitych komórkowych kwasów tłuszczowych (Ryc. 27 i 28). A czy wiadomo jakie było pochodzenie izolatów *Rhizobium radiobacter*. I jeszcze jedno: czy samo zranienie tkanki okrywającej pomidora może mieć wpływ na skład mikrobiomu bakteryjnego? Poza tym proszę o krótkie omówienie występowania możliwych interakcji między bakteriami zasiedlającymi ten sam biotop oraz o możliwy wpływ fazy rozwoju roślin i warunków środowiskowych na bakterie. Skąd wzięły się różne bakterie w tkankach po inokulacji *A. tumefaciens*? Tu warto zwrócić uwagę, że doświadczenie – jak się domyślam – nie było przeprowadzone w warunkach sterylnych, a rośliny były narażone na zasiedlenie przez bakterie obecne w środowisku.

Ostatnim zagadnieniem tej części badań była analiza zmian w mikrobiomie pomidora na podstawie analizy DNA wyizolowanego z inokulowanych szczepem C58 organów roślin, tzn.

z pominięciem izolacji bakterii na pożywkę. Analizie poddano próbki roślin zbierane przez 4 tygodnie od inokulacji, a kombinację kontrolną stanowiła roślina nieinokulowana, z której pobierano próbkę do badań w tym samym czasie, co rośliny inokulowane po jednym tygodniu od inokulacji (Str. 50). Stanowiły one kontrolę porównawczą dla wszystkich tygodni. Warto zauważyć, że w opisie dot. izolacji całkowitego DNA z tkanek roślin zakażonych C58 (str. 50) podano, że materiał roślinny pozyskano analogicznie, jak w podrozdziale 2.8. Tymczasem w podrozdziale tym, dotyczącym obrazowania techniką spektroskopii Ramana, brak jest takiego opisu. Wyniki przedstawiono na rycinie 29. Autorka przeanalizowała występowanie poszczególnych typów taksonomicznych bakterii metodą analizy metataksonomicznej genu 16S rRNA wskazując ich względną ilość w procentach. Analizując dane przedstawione na tej rycinie można zauważyć, że skład taksonomiczny mikrobiomu bakteryjnego w kombinacji kontrolnej (rośliny nieinokulowane) zmieniał się w okresie 4 tygodni. Jest to bardzo ciekawy i godny zauważenia, ale i rozważenia wynik. Natomiast na rycinie 30 przedstawiono skład rodzajów taksonomicznych bakterii w poszczególnych organach pomidora analizowany w okresie 4 tygodni. W opisie na stronie 95 dokonano porównania występowania różnych taksonów w organach nieinokulowanych i inokulowanych, tzn. w liściu, korzeniu i łodydze. W tym półstronicowym opisie Autorka użyła ciekawych określeń, cytuję: ‘Obecność patogenu całkowicie zaburzyła równowagę rodzajową w tkankach pomidora wypierając naturalnie występujące w nich mikroorganizmy’, a także ‘Jednocześnie infekcja spowodowała wtórny napływ środowiskowych mikroorganizmów pierwotnie nie obserwowanych w roślinach’. Poproszę o komentarz do tych stwierdzeń.

Ostatnia część omawianej analizy mikrobiomu obejmuje podsumowanie występujących ASV (co oznacza Amplicon sequencing variants, czyli warianty sekwencjonowania amplikonu) w niezainokulowanych i zainokulowanych liściu, łodydze i korzeniu (Ryc. 31). Byłoby wskazane dokładniejsze omówienie tej analizy. Jak należy rozumieć zdanie: ‘Zestawienie danych uzyskanych z 4 kolejnych tygodni po zakażeniu pokazało, że migracja bakterii jest procesem bardzo dynamicznym’? Czy są jakieś dowody, że bakterie migrowały, zwłaszcza *A. tumefaciens* z miejsca inokulacji na łodydze? Na rycinie 30 wykazano obecność *Agrobacterium* w tkankach liścia w drugim i trzecim tygodniu, ale już nie w czwartym, podobnie jak w łodydze. Nasuwa się pytanie czy były to bakterie szczepu C58?

W rozdziale ‘Dyskusja’ podjęto próbę interpretacji otrzymanych wyników w oparciu o wybrane dane literaturowe. Autorka zwróciła szczególną uwagę na rolę lipopolisacharydów jako czynników wirulencji bakterii fitopatogennych. Nie ma jednak jednoznacznych dowodów, że jest ona podobna lub nawet taka sama u wszystkich bakterii powodujących

choroby roślin. Przypomnijmy, że dotychczas poznano co najmniej 150 gatunków takich bakterii, a wśród których wyróżnia się nekrogeny, macerogeny i onkogeny. Cytowane badania dotyczące *A. tumefaciens,* prowadzone przez innych autorów w aspekcie znaczenia lipidów w błonie zewnętrznej w patogenezie wskazują, że mutanty bez zdolności syntezy niektórych z nich wykazują również odmienną wirulencję w porównaniu do szczepów dzikich, w tym wirulencję osłabioną a nawet jej brak. Dyskusyjny pozostaje problem efektu infekcji, który Autorka określa, cytuję: 'mutant jest zdolny do wniknięcia do skaleczonej tkanki rośliny-gospodarza, natomiast nie jest w stanie w pełni przeprowadzić transformacji komórek, a wytworzony kalus jest szczątkowy'. Oczywiście powstaje pytanie, czy ten szczątkowy kalus pochodzi od infekcji czy tylko od zranienia.

Ciekawy fragment dyskusji dotyczy obrazowania dystrybucji metabolitów i wydaje się, że metoda jest bardzo przydatna w analizie zmian w tkankach spowodowanych stresem. W powiązaniu z innymi metodami analitycznymi można uzyskać pełniejszą informację o dużym znaczeniu naukowym. W przypadku recenzowanej pracy chodzi o odpowiedź rośliny na stres biotyczny, w tym jego potencjalne skutki.

Odnośnie drugiej części doktoratu, dotyczącej zmian w mikrobiomie różnych organów pomidora pod wpływem punktowej inokulacji łodygi szczepem C58 *A. tumefaciens* pragnę zwrócić uwagę, że badanie oparte na izolacji samego DNA z rośliny może być obciążone pewnym błędem. DNA pochodzi wtedy z żywych i martwych komórek bakterii. Autorka podała, że do identyfikacji bakterii zastosowano metodę MALDI Biotyper. Na stronie 51 czytamy, cytuję: 'Preparaty wyizolowanego DNA poddano sekwencjonowaniu w celu poszukiwania sekwencji specyficznych dla bakteryjnego genu 16S rRNA'. Poproszę o komentarz dotyczący zastosowanej metody.

Podjęta dyskusja, w moim odczuciu niezbyt szeroka, wskazuje jak trudny problem badawczy został podjęty oraz w jakim kierunku badania powinny być kontynuowane. W tym kontekście na podkreślenie zasługuje rozważenie aplikacyjnego znaczenia przyszłych badań, np. opracowania preparatu ingerującego w składniki błony zewnętrznej patogena w celu zapobieżenia infekcji. Niewątpliwie Doktorantka zna metody mikrobiologii klasycznej i biologii molekularnej, a przedstawione wyniki badań wskazują na celowość potwierdzenia wykazanych zmian, zarówno w reakcji roślin na porażenie przez *A. tumefaciens,* jak i zmian w mikrobiomie badanych organów pomidora. Analizując składniki mikrobiomu oraz ich wzajemnych relacji z *A. tumefaciens* jest także możliwe wyselekcjonowanie bakterii, które mogłyby znaleźć zastosowanie w biologicznej ochronie roślin przed guzowatością.

Przykładem może tu być szczep K84 *A. radiobacter* na bazie którego opracowano w różnych krajach, w tym w Polsce, skuteczne biopreparaty.

Recenzowaną pracę zamyka 9 wniosków. Mam jednak uwagę odnośnie wniosków 4 i 5, które faktycznie są podsumowaniem wyników. Natomiast wnioski 6, 7 i 8 są chyba zbyt daleko idące.

Podsumowując stwierdzam, że w przedstawionej pracy doktorskiej podjęto ważne badania zarówno dla nauki jak i praktyki, bowiem guzowatość powodowana przez *A. tumefaciens* jest chorobą powodującą straty o znaczeniu ekonomicznym, zwłaszcza w produkcji szkółkarskiej drzew owocowych i krzewów róży. Doktorantka zrealizowała założony cel badań, a zgromadzona wiedza stanowi podstawę dalszego ich rozwinięcia, zwłaszcza na roślinach.

Wniosek końcowy

Uważam, że praca doktorska mgr Katarzyny Suśniak spełnia formalne wymagania określone w artykule 13 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), a także inne zwyczajowo przyjęte kryteria oceny rozpraw doktorskich. Zarówno przedstawiona praca, jak i dorobek naukowy uzasadniają nadanie mgr K. Suśniak stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Suśniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

P. Sobiczewski

Prof. dr hab. Piotr Sobiczewski

Skierniewice 17 sierpnia 2023 r.