Olsztyn, 14 marca 2023r.

Urszula Barbara Wachowska
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
Wydział Rolnictwa i Leśnictwa,
Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej,
10-720 Olsztyn, ul. Prawocheńskiego 17

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Elżbiety Mikołajczak pt. „Mykobiom endosfery pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) i jego charakterystyka w ujęciu sposobu transmisji grzybów endofitycznych i ich wpływu na reakcje odpornościowe pszenicy"

Rozprawę doktorską wykonano w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, w Zakładzie Mikrobiomiki Roślin pod kierunkiem dr hab. Lidii Błaszczyk, prof. IGR PAN

Recenzję rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk po podjęciu przez Radę Naukową IGR PAN w Poznaniu uchwały (nr 12/I/2023 RN IGR PAN) o wyznaczeniu mnie na recenzenta.

W obliczu zmieniających się zasad ochrony roślin, spowodowanych ideą „Europejskiego Zielonego Ładu" ograniczającego zużycie środków ochrony roślin, przed rolnictwem stawiane są nowe wymagania. Dotyczą one między innymi poszukiwań innowacyjnych i skutecznych metod ograniczenia agrofagów, w tym metod biologicznych. Stosowanie metod biologicznych jest przyjazne środowisku, ale wyselekcjonowanie mikroorganizmów spełniających wysokie wymagania odnośnie skuteczności w ograniczeniu patogenów jest złożone i bardzo pracochłonne. Pierwszym etapem w tym procesie jest poznanie społeczności bakterii i grzybów związanych z rośliną uprawną. Zbiorowiska grzybów pełnią nieocenioną rolę w agrocenozach. Biorą udział w procesach biodegradacji środków ochrony roślin, chronią rośliny przed patogenami, wpływają także pozytywnie na roślinę podnosząc jej kompetencje do obrony przed patogenami.

Przedstawiona do oceny praca doktorska opisuje zbiorowiska endofitycznych grzybów zasiedlających 10 odmian pszenicy zwyczajnej. Dysertacja dotyczy także sposobu transmisji tych grzybów, ich wzajemnych interakcji oraz wpływu wybranych szczepów na ekspresję trzech genów pszenicy związanych z mechanizmami obronnymi roślin. Praca obejmuje szerokie spektrum metod badawczych oraz bogaty materiał biologiczny (879 izolatów grzybów, w tym 828 zidentyfikowanych molekularnie). Eksperymenty badawcze są dobrze zaprojektowane i wzajemnie ze sobą powiązane. Obejmują doświadczenia mikropoletkowe, szklarniowe a także laboratoryjne. Zbiorowiska grzybów uzyskano z roślin rosnących w warunkach polowych i w szklarni. Do identyfikacji grzybów zastosowano metodę sekwencjonowania amplikonów, trafnie wybranych kilku regionów DNA (ITS1 i ITS2 klastra genów rDNA, fragmenty kodujące małą i dużą podjednostkę LSU i SSU nrRNA, fragmenty genów kodujących elongacyjny czynnik translacyjny 1-α (*tef1*), β-tubulinę (*tub2*) i aktynę (*act*)). Wpływ wybranych szczepów grzybów na siewki pszenicy określono analizując transkrypty genów *PR9, HSP70* i *SOD* przy pomocy techniki RT-qPCR. Uzyskane dane analizowano dobrze dobranymi narzędziami statystycznymi i bioinformatycznymi.

Oceniana praca spełnia wymogi formalne. Tytuł pracy odpowiada treściom w niej zawartym, a opisywane w pracy zagadnienia dotyczą aktualnych trendów w ochronie roślin, poszukiwania nowych metod biologicznej ochrony. Ogółem dysertacja liczy 197 stron, podzielonych na 11 rozdziałów (w tym 19 tabel i 50 rysunków). Do pracy dołączono materiały uzupełniające liczące 70 stron (zwierające 6 tabel i 16 rysunków). Struktura przedstawionej mi do oceny pracy nieco odbiega od układu klasycznego z powodu nadmiernie rozbudowanego (29 stron) rozdziału „Wstęp", który w mojej ocenie powinien być podzielony na rozdziały „Wstęp" i „Przegląd literatury". Osiem rozdziałów dysertacji ma charakter merytoryczny (Wstęp, Hipotezy, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski) a trzy charakter pomocniczy (Streszczenie, Abstract, Bibliografia). Dodatkowy podział rozdziału „Wstęp" na osiem podrozdziałów, rozdziału „Materiał i Metody" na dziewięć podrozdziałów, rozdziału „Wyniki" na pięć podrozdziałów, a rozdziału „Dyskusja" na 9 rozdziałów sprawia, że praca jest przejrzysta i czytelna. Na uwagę zasługuje też bardzo dobre upoglądowienie rozdziałów „Metody" i „Wyniki", które znacznie ułatwia zrozumienie i interpretację uzyskanych wyników badań.

W pracy rozdział „Wstęp" w zasadzie jest bardzo bogatym przeglądem literatury obejmującym aktualne zagadnienia dotyczące znaczenia uprawy pszenicy zwyczajnej, definicji i roli mikrobiomu oraz endofitów roślin w agrocenozach, szczególnie endofitów

zasiedlających pszenicę, a także molekularnych mechanizmów interakcji między roślinami i mikroorganizmami. Szczególnie wysoko oceniam podrozdział dotyczący molekularnych mechanizmów interakcji roślin z mikroorganizmami, napisany w oparciu o dobrze dobraną literaturę. Obejmuje on akademicki opis odporności wrodzonej i nabytej, oraz charakterystykę złożonych systemów obronnych roślin, na które składają się m.in. białka PR i fitohormony roślinne. Z kolei podrozdział opisujący rolę i znaczenie grzybów endofitycznych jest przeglądem badań prowadzonych w latach 2010-2020 dotyczących konkretnych przykładów łagodzenia przez endofity stresów abiotycznych (suszy, temperatury, zasolenia, zanieczyszczenia metalami ciężkimi) i biotycznych (patogenów, owadów).

Hipoteza badawcza zawarta w pracy została prawidłowo sformułowana na podstawie doświadczeń wstępnych wykonanych przez Panią K. Mikołajczak. Cele badań wyznaczają cztery podstawowe obszary badań prezentowane w pracy: (1) poznanie struktury gatunkowej zbiorowisk grzybów zasiedlających liście, kłosy, źdźbła i korzenie 10 odmian pszenicy zwyczajnej uprawianej w warunkach polowych i szklarniowych, (2) określenie sposobów transmisji grzybów endofitycznych, (3) poznanie interakcji między wybranymi szczepami grzybów endofitycznych oraz (4) analiza ekspresji genów pszenicy zwyczajnej po naniesieniu na rośliny wybranych szczepów grzybów endofitycznych.

Materiały i metody, opisane na 32 stronach, przedstawione są w sposób wyczerpujący i klarowny. Materiał roślinny scharakteryzowano opisując 10 odmian pszenicy zwyczajnej z podkreśleniem ich podatności/odporności na infekcje przez wybrane patogeny. Schemat czterech doświadczeń przedstawiono w postaci rysunku, co znacznie ułatwia zrozumienie powiązań między eksperymentami. Doświadczenie poletkowe i szklarniowe założono zgodnie z wymaganiami doświadczalnictwa rolniczego. Metody molekularne wykorzystano do analiz jakościowych (identyfikacja szczepów grzybów) i ilościowych (analiza ekspresji genów). Sposób izolacji DNA z komórek grzybów oraz reakcje amplifikacji (PCR), a także technikę sekwencjonowania fragmentów DNA opisano szczegółowo w 6 podrozdziałach zawierających 6 tabel. Izolacje RNA z fragmentów liści i aksenicznych korzeni siewek pszenicy, reakcję odwrotnej transkrypcji i Real-time qPCR wykonano przy pomocy komercyjnych zestawów, co zostało szczegółowo opisane w 6 podrozdziałach i 5 tabelach. Zebrane dane analizowano przy pomocy dobrze dobranych specjalistycznych programów, dodatkowo policzono wskaźniki bioróżnorodności zbiorowisk grzybów. Ogólnie należy podkreślić, że metody zastosowane w pracy są nowoczesne i adekwatne do w/w rodzajów analiz i powszechnie stosowane w badaniach fitopatologicznych i mykologicznych.

Wyniki badań, analizowane na 50 stronach, podzielono na cztery rozdziały opisujące (1) struktury zbiorowisk endofitycznych grzybów w zależności od warunków uprawy i odmian pszenicy, (2) analizę oddziaływań 12 szczepów endofitycznych grzybów w bi-kulturach, (3) ocenę struktury zbiorowisk endofitycznych grzybów w dwóch generacjach pszenicy oraz (4) analizę ekspresji genów pszenicy po 7 dniach od naniesienia na rośliny 4 szczepów grzybów.

Rozdział pierwszy wyróżnia się ciekawą formą prezentacji wyników w postaci sieci powiązań wspólnych dla gatunków/rodzajów grzybów endofitycznych w zależności od badanej niszy ekologicznej. Szczególnie interesujące są wyniki wskazujące, że z roślin uprawianych w sposób tradycyjny uzyskano najliczniejsze i najbardziej zróżnicowane społeczności grzybów, szczególnie zasiedlających korzenie. Jednocześnie aż 25 gatunków było unikatowych, nie wystąpiły one ani w uprawie ekologicznej ani w szklarni. Eksperyment ten wykazał, że najprawdopodobniej środowisko korzeni pszenicy jest najbardziej obiecującym dla poszukiwania potencjalnych antagonistycznych grzybów ograniczających rozwój patogenów roślin.

Uwagę zwraca także opis społeczności grzybów zasiedlających pszenicę rosnącą w warunkach szklarniowy. Co prawda w zbiorowisku tym zidentyfikowano tylko 28 rodzajów lub gatunków endofitów, ale aż 16 tych taksonów było unikatowych dla tego środowiska, w tym trzy gatunki rodzaju *Trichoderma* (*T. viride, T. koningii, T. hamatum*).

W mojej opinii bardzo interesujące są wyniki dotyczące zasiedlenia poszczególnych organów pszenicy przez patogeny. Korzenie były rezerwuarem sześciu gatunków rodzaju *Fusarium* (*F. oxysporum, F. proliferatum, F. avenaceum, F. poae, F. redolens* i *F. solani*), potencjalnych patogenów roślin uprawnych, wytwarzających liczne mykotosyny. Co ciekawe gatunki *F. proliferatum, F. oxysporum* i *F. solani* wyizolowano także ze źdźbeł, a gatunki *F. proliferatum* i *F. oxysporum* z liści. Z kolei na ziarnie pojawił się patogen nieodnotowywany w innych analizowanych organach – *F. temperatum*. Informacje te są niezwykle cenne, ponieważ wskazują na możliwe rezerwuary tych groźnych patogenów roślin w agrocenozach.

Opis społeczności endofitycznych grzybów zasiedlających 10 odmian pszenicy jest niezwykle zawiły. W mojej opinii należy go skrócić. Wymienianie na 4 stronach gatunków i rodzajów grzybów bez podania ich liczby znacznie utrudnia zrozumienie i interpretację wyników.

Do analizy oddziaływań między szczepami endofitycznych grzybów w bi-kulturach wybrano głównie gatunki saprotroficzne, w tym gatunki o znanych właściwościach antagonistycznych wobec patogenów roślin oraz patogeniczny gatunek *F. proliferatum.* W tym obszarze badań szczególnie ciekawe jest określenie inhibicyjnego wpływu saprotrofów na patogen. Wyróżniający się efekt redukcyjny wzrostu kolonii patogenu spwodowany przez gatunek *Nigrospora gorlenkoana* (38,71%), a także gatunki rodzaju *Trichoderma* (*T. viride, T. koningii, T. hamatum,* w zakresie 31,72-34,95%) być może skłoni do kontynuacji badań z tymi szczepami w warunkach szklarniowych.

Badania struktury społeczności grzybów wyizolowanych z endosfery pszenicy zwyczajnej w generacjach G1 i G2 wykazały, że tylko 9 rodzajów/gatunków było wspólnych dla obu pokoleń roślin. Ale patogeniczny gatunek *F. proliferatum* ulegał transmisji z pokolenia na pokolenie we wszystkich badanych odmianach, a jego obecność odnotowano w korzeniach, źdźbłach, liściach i ziarniakach. Obserwacja ta znacząca przyczynia się do lepszego poznania sposobów transmisji tego patogenu. W pracy wykazano także, że gatunki *F. proliferatum, Penicillium olsonii, P. expansum* oraz *T. hamatum* z powodzeniem ponownie zasiedlają rośliny po naniesieniu ich na liście. Badania te są szczególnie cenne z uwagi na przeprowadzenie analizy porównawczej sekwencji nukleotydowych odpowiednich markerów filogenetycznych dla re-izolowanych grzybów z sekwencjami szczepów nanoszonych na rośliny.

Szczególnie interesujące wyniki zawarte są w rozdziale 5, gdzie na 11 stronach opisano zmiany ekspresji genów kodujących peroksydazę (*PR9*), dysmutazę ponadtlenkową (*SOD*) i białko szoku cieplnego (*HSP70*) pod wpływem inokulacji roślin *F. proliferatum, Penicillim olsonii, P. expansum* oraz *T. hamatum.* Zmiany te były na ogół statystycznie nieistotne i wyraźnie uzależnione od testowanej odmiany. Ale dla odmiany Arkadia stwierdzono istotną nadekspresję genu *PR9* pod wpływem *P. expansum,* a dla odmian Kandela i Legenda istotny wzrost ekspresji genu *HSP70* pod wpływem *T. hamatum*. Przedstawione badania sugerują, że niezwykle subtelne interakcje między antagonistycznym szczepem a rośliną są silnie związane z odmianą pszenicy.

Dyskusja jest poprawnie przeprowadzona w sposób wieloaspektowy, uwzględniający cztery obszary badań zawarte w celach, metodach i wynikach. Rozdział ten, obejmujący 28 stron, podzielono na 9 podrozdziałów. W mojej opinii najciekawsze są podrozdziały opisujące znaczenie gatunków grzybów endofitycznych i ich wpływ na reakcje odpornościowe

pszenicy. Zagadnienia te opisane są klarownie i bardzo szczegółowo na podstawie dobrze dobranej, aktualnej literatury.

Pani mgr inż. K. Mikołajczak sformułowała 29 wniosków, które w pełni odpowiadają celom postawionym w dysertacji. Pracę kończy syntetyczne streszczenie w języku polskim i angielskim. Spis literatury liczy ponad 600 pozycji (611), większość opublikowanych po 2013 roku, nieliczne publikacje (46) ukazały się w poprzednim stuleciu.

W mojej opinii praca została wykonana na bardzo wysokim poziomie, ale pojawia się w manuskrypcie kilka zagadnień wymagających uzupełnienia lub uaktualnienia. Dotyczy to na przykład podanej przez Doktorantkę definicji ochrony biologicznej. Określenia/wyjaśnienia podane w manuskrypcie pochodzą z XX wieku. Jaka jest współczesna definicja biologicznej ochrony roślin? Jakie biopreparaty są obecnie zarejestrowane w Polsce do użytkowania przez ogrodników i rolników? Czy zdaniem Doktoranki endofity mogą być wykorzystane do ochrony roślin przed patogenami, czy raczej do wspomagania rozwoju roślin?

Moim zdaniem warto także zmienić sposób podawania nazw gatunkowych grzybów stosując kilka reguł: (1) w każdym rozdziale należy podawać całą nazwę gatunkową grzybów, gdy wymieniamy ją po raz pierwszy, (2) należy pisać „gatunki rodzaju…" lub „gatunki należące do rodzaju" a nie „grzyby z rodzaju…", (3) przy podawaniu nazwy rodzajowej stosujemy zapis np. „*Trichoderma* spp. …" gdy mamy na myśli kilka gatunków lub „*Trichoderma* sp. …" gdy mamy na myśli jeden szczep należący do tego rodzaju, (4) skróty nazw gatunkowych zawsze piszemy kursywą, np."*A. lecanii*" a nie „A. *lucanii*„ (str. 82.)

W rozdziale 1.3. (str. 4, linia 5) podane wyrażenie „…mikroorganizmy, takie jak wirusy, bakterie…." wprowadza czytelnika w błąd, ponieważ wirusy nie są organizmami żywymi. Podobnie przyczyną brunatnej plamistości liści jest grzyb *Pyrenophora tritici-repenti* (stadium konidialne *Drechslera tritici-repentis*) a nie jak błędnie podano „*P. striformis tritici*„ (str. 4, linia 16). Lepiej jest także napisać „Wśród chorób wirusowych..", zamiast „Wśród chorób odwirusowych…" (str. 4, linia 17). Warto także zadbać o to, aby wszystkie fragmenty tekstu rozdziału „Wstęp" były poparte cytowaniem (np. str. 4, linia 5-12, str.5, linia 8-12).

W rozdziale 5.1.3. (str. 76, 77) opisano wskaźniki bioróżnorodności dla „mykobiomu zasiedlającego tkanki poszczególnych roślin", a nie jak błędnie opisano „bioróżnorodność

odmian”. Czy rzeczywiście stwierdzenia „…dodatkiem 50 µl ampicyliny…o stężeniu 100mg/ml na płytkach…” (str. 45, linia 5) jest poprawne?

Przy podawaniu wartości liczbowych w przedziałach podajemy najpierw mniejszą wartość a potem większą wartość, np. „2,70 - 4,40”, a nie odwrotnie „4,40-2,70” (str. 84, 85).

Wniosek 27 należy przeredagować (str. 152), ponieważ w mojej opinii zaliczenie rodzajów *Neonectria, Verticillium, Colletotrichum* i *Arthrinium* do „…gatunków grzybów powszechnie znanych jako patogeny..” jest błędne.

Reasumując należy podkreślić, że zgromadzony materiał badawczy i zastosowane w pracy metody badawcze nie budzą żadnych zastrzeżeń. Dysertacja napisana jest w oparciu o bardzo liczne, prawidłowo zestawione wyniki. Treść pracy jest logiczna i uporządkowana, analiza wyników przeprowadzono w sposób merytoryczny i niezwykle wnikliwy na tle dobrze napisanej dyskusji. Wyniki badań przedstawione w doktoracie Pani mgr inż. Katarzyny Elżbiety Mikołajczak mogą mieć potencjalny wpływ na rozwój biologicznych metod ochrony roślin w Polsce. Pracę oceniam pozytywnie.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Elżbiety Mikołajczak z całą pewnością spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022r. poz. 574 ze zm.).

Wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Elżbiety Mikołajczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na zastosowane w pracy zaawansowane molekularne techniki badawcze, niezwykle bogaty materiał biologiczny oraz nowatorskie wyniki mające charakter poznawczy i aplikacyjny, pracę należy uznać za wyróżniającą się. Biorąc także pod uwagę bardzo duże zaangażowanie Doktoranki w opracowanie i obszerne opisanie dużego zbioru danych wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną Nagrodą w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Prof. dr hab. Urszula Wachowska