

Prof. dr hab. Katarzyna Turnau  
Instytut Nauk o Środowisku  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Soni Szymańskiej

pt. „Bakterie endofityczne i ryzosferowe halofitów *Salicornia europaea* i *Aster tripolium*”

Przedstawiona do recenzji rozprawa została przygotowana w języku polskim. Badania wykonano w ramach grantu NCN OPUS4 -2012/07/B/NZ9/01801. Praca obejmuje 224 strony i 10 rozdziałów, 18 tabel (w tym 8 w materiałach dodatkowych) i 39 rycin (2 w materiałach dodatkowych). Część badań została opublikowana w czasopismach z listy filadelfijskiej (Ecoscience IF 0,97, 2 prace w Microbiological Research IF 2,72), co istotnie podnosi wartość pracy i utwierdza w przekonaniu poprawności przeprowadzonych badań. Rozprawa została przygotowana logicznie i z godną pochwałą precyzją. Metodykę badań przedstawiono w sposób jasny i umożliwiający powtórzenie badań.

Wstęp pracy stanowi bardzo cenne opracowanie, które powinno zostać opublikowane przynajmniej w formie dostępnej dla studentów polskich uczelni. Zbyt mało na opisany temat wiadomo zarówno wśród studentów jak i pracowników, zwłaszcza na uniwersytetach rolniczych. Stosunkowo lepiej, choć i tu jest wiele braków, rozpoznawane są mikroorganizmy ryzosfery. Istnieje potrzeba pojawienia się podręcznika dla studentów dotyczącego mikrobiologii roślin i gleb. To zadanie powinno być podjęte w przyszłości przez opiekuna pracy doktorskiej, ponieważ pod jej kierunkiem pojawiło się kilka prac, które warto zebrać i udostępnić w Polsce dla szerszej grupy. Na niewielu uczelniach w Polsce to zagadnienie jest poruszane, a w zamian króluje mikrobiologia medyczna i studenci rzadko wiedzą np. o kolumnie Winogradskiego. Wobec konieczności ograniczenia chemizacji rolnictwa,

zmniejszenia ilości stosowanych nawozów i środków ochrony roślin czeka nas istotne wyzwanie w postaci zrewidowania zarówno metod upraw jak i kształcenia młodych ludzi, także na poziomie szkolnictwa podstawowego i średniego. W podręcznikach fizjologii roślin również te zagadnienia są potraktowane „po macoszemu”. Doktorantka zestawiała we wstępie informacje dotyczące zasolenia gleb, sposobu reakcji roślin i mikroorganizmów z naciskiem na bakterie, opisała znaczenie mikroorganizmów w udostępnianiu nutrientów roślinom i zestawiała najważniejsze techniki laboratoryjne stosowane przy ocenie bioróżnorodności bakterii ryzosferowych i endofitycznych, zestawiając także przykładową literaturę. Wstęp napisano interesująco, jedynym zagadnieniem którego mi ewentualnie brakuje jest znaczenie grzybów w rozprzestrzenianiu się bakterii – tu jednak niewiele jest literatury opublikowanej. Warto w przyszłości zwrócić uwagę na ten aspekt.

Drugi rozdział dotyczy celów badań, które są jasno sformułowane. W skrócie wymieniono tu zbadanie bioróżnorodności taksonomicznej i funkcjonalnej *Salicornia europaea* i *Aster tripolium* na dwóch stanowiskach o różnym stężeniu soli, izolację szczepów bakteryjnych oraz zbadanie ich potencjału aplikacyjnego w odniesieniu do dwóch gatunków *Brassica*. Kolejny rozdział dotyczy hipotez badawczych, który w zasadzie przy tak dobrze sformułowanych celach mógł zostać pominięty. Umieszczenie go wskazuje jednak na to, że doktorantka dobrze rozumie naukowe podejście do zagadnienia. Ciekawe byłoby stwierdzenie na ile te hipotezy ewoluowały w trakcie wykonywania pracy i czy w obecnej formie postawione były na początku czy po zakończeniu badań. Przypuszczam, że wstępne hipotezy istniały na etapie składania wniosku o dofinansowanie.

Rozdział „Materiały i metody” stanowi bardzo przydatną część rozprawy i z powodzeniem można użyć tę część badań jako protokół metod stosowanych w pracach badawczych dotyczących mikrobiologii gleb i roślin.

Wyniki badań przedstawione zostały jasno, rzeczowo, momentami zbyt skrótowo, co utrudniało pełne zrozumienie zagadnienia, ale ponieważ dane zostały opublikowane równoległe w czasopiśmie, nie stwarzało to problemu. W przyszłości warto pomyśleć o wykorzystaniu publikacji jako składowej doktoratu, co powinno zmniejszyć nakład pracy doktoranta. Znakomicie opracowana jest Dyskusja, którą podzielono na części odpowiadające poszczególnym etapom badawczym. Doktorantka wykazała znajomość literatury. Cytacje obejmują 419 pozycji, co jest wyjątkowe jak na prace doktorskie. Na pochwałę zasługują znakomicie przygotowane ilustracje jak również materiały dodatkowe. Należy tu podkreślić, że w pracy wykorzystano wyjątkowo szeroki zakres metod badawczych




jak BIOLOG, analizy PLFA, analizy metagenomowe uzupełnione izolacją bakterii z ryzosfery i endofitów oraz uprawą roślin z inokulacją wyselekcjonowanymi szczepami bakterii. Uzyskane szczepy powinny być przedmiotem zgłoszenia patentowego, choć stale jeszcze nie doceniamy w pełni tego narzędzia. Nie wiem dlaczego w przypadku ryciny 29 nie zamieszczono oznaczeń istotności różnic. Czy różnic statystycznych nie było czy też jest to niedociągnięcie wydruku. Według tekstu szczep *Pseudomonas stutzeri* wpłynął istotnie na złagodzenie skutków stresu solnego (strona 119) i na rycinie 30 takie oznaczenia już są. Z literatury wiem, że również w nasionach występują bakteryjne endofity, które mogą mieć istotne znaczenie w uprawie. Z drugiej strony uprawa przez 5 lat w warunkach silnego nawożenia i stosowania środków ochrony roślin powoduje zanik tych endofitów. Warto aby w przyszłości podjęto izolację bakterii z nasion roślin spontanicznie występujących w siedliskach naturalnych i przeprowadzono odpowiednie próby aby wspomóc uprawy roślin takich jak *Brassica* spp. Naturalnie praca doktorska nie przewidywała tego typu badań więc ewentualnie może to być tylko pomysł na przyszłe badania.

Praca w znacznym stopniu zwiększa naszą wiedzę na temat endofitów roślin terenów zasolonych. Ważne są dane dotyczące różnorodności bakterii w zależności od stanowiska. Stwierdzono dominację G+ u obu gatunków roślin na stanowisku I oraz równowagę obu form na stanowisku C (w tym wypadku tylko u solirodu). Stwierdzono także różnice pomiędzy endofitami w odniesieniu do poszczególnych gatunków roślin. Warto zwrócić uwagę na fakt, że wybrane do badań gatunki roślin w zasadniczy sposób różnią się także pod względem zasiedlania ich przez grzyby arbuskularne. Gatunkiem mykoryzowym jest *A. tripolium*. To także może mieć wpływ na endofity bakteryjne, bo coraz częściej dowiadujemy się, że niektóre bakterie są także endofityczne względem grzybów arbuskularnych. Może to właśnie jest przyczyną dla której stwierdzono w przedstawionej pracy, że *A. tripolium* ma wyższą zdolność nawiązywania bezpośredniej interakcji z PGPR. Na kilku stanowiskach w Europie obserwowałam obecność mykoryzy u *Aster tripolium*. Ciekawa jestem czy doktorantka sprawdzała obecność tych grzybów na badanych siedliskach. Nurtuje mnie także pytanie w jaki sposób następuje kolonizacja roślin przez endofity bakteryjne. Trudno tu wymagać, przy tak rozbudowanym zagadnieniu, badań mikroskopowych. Przypuszczam jednak, że kolejnym krokiem może być uzyskanie fluorescencyjnie znakowanych szczepów i przebadanie kolonizacji roślin. Badania Jamesa F. White'a wykazały, że obecność bakterii stymuluje tworzenie włośników u roślin. Można zatem stosując badania *in vitro* przebadać efektywność ich tworzenia w obecności poszczególnych szczepów bakterii. Jak twierdzi J.F. White

bakterie wnikają do włóśników tworząc tzw. formy L, pozbawione ścian komórkowych, barwiąc się podobnie do G- mimo, że w glebie wykazują przynależność do G+. Przepuszczam, że w przypadku badań molekularnych uzyskujemy jednak bardziej wiarygodne wyniki i o pomyłce nie ma tu mowy. Ponieważ doktorantka wspomina o reaktywnych formach tlenu (ROS) przypuszczam, że ciekawe byłoby zbadanie ROS w oparciu o metodę barwienia DAB, która pozwala w stosunkowo łatwy sposób ocenić interakcje rośliny z bakteriami wewnątrz włóśników. Być może wpływ zasolenia zmienia istotnie obraz takich interakcji. Podane przykłady mają na celu pokazanie jak wiele zagadnień otwierają przeprowadzone badania, zagadnienia których bez przeprowadzenia przedstawionych przez doktorantkę wyników nie można rozwiązywać. Mamy tu do czynienia z rozprawą doktorską, która daje nowy obraz i perspektywy dalszych badań. Zdecydowanie namawiam aby talent Pani Prof. Hryniewicz do zdobywania młodych i zdolnych współpracowników został dostrzeżony i nagrodzony stworzeniem grupy badawczej.

Biorąc pod uwagę ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę, Jej znakomitą orientację w literaturze dotyczącej tematyki badawczej i wagę uzyskanych wyników stwierdzam, że cel pracy został przez Autorkę osiągnięty. Przedłożona do oceny rozprawa jest oryginalnym osiągnięciem Doktorantki, nie tylko spełnia wymagania stawiane tego typu pracom lecz w pełni zasługuje na nagrodzenie tej pracy, o co stawiam wniosek do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu w Toruniu. Wnoszę o dopuszczenie mgr Soni Szymańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, dn. 15. 05. 2017

  
Prof. dr hab. Katarzyna Turnau