

dr hab. Grażyna B. Dąbrowska, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Genetyki
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 6114576; e-mail: brownsk@umk.pl



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

RECENZJA

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr Natalii Hordyńskiej**,
pt. „**Genetyczne i fizjologiczne markery odporności pszenicy jarej (*Triticum aestivum*
L.) na suszę w aspekcie interakcji zachodzących w ryzosferze”,
wykonanej w Zakładzie Biologii Stresu, Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka*
Górskiego Polskiej Akademii Nauk,
pod kierunkiem **dr hab. inż. Magdaleny Szechyńskiej-Hebdy**, prof. Instytutu IB PAN.**

Podstawowe dane o kandydatce

Pani Natalia Hordyńska ukończyła studia magisterskie na kierunku biologia w Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi i tytuł magistra uzyskała w 2015 roku.

Kandydatka od 2017 roku jest zatrudniona jako pracownik techniczny w Zakładzie Biologii Stresu, Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, i również w 2017 roku rozpoczęła studia doktoranckie w Studium Doktoranckim Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Instytutu Fizjologii Roślin *im. F. Górskiego* PAN w Krakowie. Pani Natalia Hordyńska jest współautorką dziewięciu publikacji w czasopiśmie: Journal of Plant Interaction, Plants, Environmental Sciences and Pollution Research, Journal of Cleaner Production, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, których łączna liczba cytowań wynosi 162 a Indeks Hirscha 5. Doktorantka czterokrotnie prezentowała wyniki badań na konferencjach krajowych i zagranicznych, była też wykonawczynią w trzech projektach badawczych.

Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Przedstawiona do oceny dysertacja została wykonana w Zakładzie Biologii Stresu, Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk, pod



kierunkiem dr hab. inż. Magdaleny Szechyńskiej-Hebdy, prof. Instytutu Botaniki *im. Władysława Szafera* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Rozprawę doktorską stanowi spójna, obszerna monografia zawarta na 254 stronach, o konwencjonalnym układzie, którą rozpoczyna strona tytułowa, następnie znajdują się *Spis treści* i pierwszy rozdział pracy zatytułowany *Indeks skrótów*. Drugi rozdział stanowi *Przegląd literatury* zajmujący 17 stron (str. 8-24), w którym Doktorantka zawarła informacje dotyczące systematyki i uprawy pszenicy w Polsce i na świecie oraz wymagań środowiskowych tego gatunku. W kolejnej części tego rozdziału omówiła wpływ suszy glebowej na wzrost i rozwój pszenicy jarej oraz opisała sposoby przeciwdziałania negatywnym skutkom suszy w uprawie pszenicy, do których zaliczyła stosowanie w uprawach grzybów i bakterii glebowych stymulujących wzrost roślin. Ostatnie dwa podrozdziały Autorka poświęciła pośrednim i bezpośrednim oddziaływaniom bakterii ryzosferowych (PGPR ang. *plant growth promoting rhizobacteria*) na rośliny. Doktorantka szczegółowo opisała wpływ mikroorganizmów na wzrost i rozwój roślin w warunkach naturalnych i w obecności stresu suszy i zasolenia, a przedstawione treści udokumentowała cytowaniami z literatury przedmiotu. W tym miejscu jednak zabrakło informacji na temat bakteryjnych genów, zwłaszcza tych odpowiedzialnych za wiązanie azotu. Dlatego też proszę Doktorantkę o uzupełnienie tych informacji podczas obrony pracy doktorskiej. W mojej opinii w *Przeglądzie literatury* zabrakło też informacji poświęconych mikroorganizmom ryzosferowym towarzyszącym pszenicy, także w warunkach stresowych oraz podrozdziału prezentującego stan wiedzy na temat ekspresji genów w korzeniach i części nadziemnej roślin rosnących w warunkach suszy, zwłaszcza że dane te są dostępne w literaturze. Podsumowując, zawarte w *Przeglądzie Literatury* informacje są ułożone w logicznej kolejności i jasno wskazują na wagę podjętych badań i ich możliwość zastosowania w praktyce.

Kolejne rozdziały pracy zatytułowane są: *Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Literaturę, Streszczenie w języku polskim i Streszczenie w języku angielskim*. W dysertacji zawarto 60 tabel i 33 ryciny.



Za cel badawczy Doktorantka postawiła wyjaśnienie w jakim zakresie genetycznie uwarunkowana wrażliwość roślin na stres suszy glebowej jest modyfikowana przez interakcje z mikroorganizmami zasiedlającymi ryzosferę. Natomiast celem aplikacyjnym przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było wytypowanie składu mikroorganizmów, które mogą być wykorzystane do opracowania biopreparatów użytecznych w praktyce rolniczej do ochrony upraw pszenicy w warunkach suszy glebowej. Doktorantka zredagowała także siedem szczegółowych celów badawczych, obejmujących charakterystykę: i. wrażliwości 20 genotypów pszenicy na suszę uwzględniając efektywność fotosyntezy oraz cech morfologicznych organów wegetatywnych i generatywnych; ii. mechanizmów uruchamianych przez rośliny o różnej wrażliwości na stres jako reakcję na suszę glebową występującą w warunkach niskiej i wysokiej temperatury oraz na różnym poziomie intensywności suszy; iii. genotypów pszenicy wrażliwych i tolerancyjnych na stres suszy; iv. składu ilościowego i jakościowego mikroorganizmów w ryzosferze genotypów pszenicy o zróżnicowanej wrażliwości na suszę z uwzględnieniem cech drobnoustrojów korzystnie oddziałujących na rośliny; v. wpływu mikroorganizmów glebowych na kinetykę fotosyntezy, wzrost i rozwój pszenicy w warunkach suszy; vi. wpływu mikroorganizmów pochodzących z ryzosfery pszenicy na strukturę korzeni i bioróżnorodność gleby ze stanowiska; vii. interakcji mikroorganizmów glebowych z pszenicą poprzez analizę transkryptomu korzeni pszenicy i sprawdzenie ekspresji wybranych genów w części nadziemnej roślin w celu poznania mechanizmów odpowiedzialnych za wrażliwość pszenicy na suszę. Cele zredagowane zostały poprawnie, umożliwiając zweryfikowanie hipotezy, zakładającej, że tolerancja i wrażliwość pszenicy jarej na suszę uwarunkowana jest genetycznych, a obecność mikroorganizmów ryzosferowych w sposób pośredni lub bezpośredni wpływa na reakcję pszenicy na suszę glebową. Podsumowując, przedstawione cele są ułożone w logicznej kolejności i jasno wskazują na wagę podjętych badań oraz ich możliwość zastosowania w praktyce.

Wagę przeprowadzonych badań podkreśla też sam dobór materiału badawczego, który stanowiło 20 genotypów pszenicy jarej, niezwykle ważnej gospodarczo rośliny. W rozdziale *Materiały i metody* na 16 stronach (str. 26-41), Autorka zawarła szczegółowe



opisy szeregu poprawnie dobranych metod zastosowanych w badaniach. Wykorzystane w badaniach metody obejmowały m.in.: eksperymenty prowadzone w tunelu wegetacyjnym, w którym uprawiano pszenicę w warunkach suszy czy w obecności analizowanych konsorcjów mikroorganizmów, które umożliwiły ocenę cech biometrycznych i komponentów plonu takich jak: długość pędu głównego i korzeni, całkowita liczba liści i pędów, długość i liczba pięterek kłosa, liczba i biomasa ziarniaków, sucha biomasa części nadziemnej i korzeni, pole powierzchni, średnica, objętość i liczba wierzchołków korzeni oraz określenie stopnia tolerancji genotypów pszenicy na stres suszy i pomiary fluorescencji chlorofilu. Odnosnie aplikacji mikroorganizmów nasuwa mi się pytanie: czym był podyktowany sposób aplikacji mikroorganizmów? Wartość uzyskanych wyników w selekcji genotypów tolerancyjnych i wrażliwych na suszę podnosi fakt ich przeprowadzenia w czterech sezonach wegetacyjnych (lata 2017-2020). Z kolei ocena wpływu mikroorganizmów na wzrost i rozwój pszenicy prowadzony był w dwóch latach: w roku 2018 testowano trzy konsorcja, każde z nich zawierające dwa szczepy bakteryjne pochodzące z SymbioBanku Instytutu Ogrodnictwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Skierniewicach, a w roku 2020 do testów użyto cztery konsorcja, które zawierały w składzie dwa lub trzy szczepy bakteryjne, w tym promieniowce pochodzące z ryzosfery badanych genotypów pszenicy (Goplana, Telimena, Sharki). Odnosnie konsorcjów zastosowanych w badaniach mam pytanie do Doktorantki, czy zawarte w tychże konsorcjach mikroorganizmy były testowane pod względem wzajemnego antagonizmu? Autorka w pracy nie wspomina o takich analizach, dlatego proszę o krótki komentarz dotyczący potencjalnych interakcji mikroorganizm-mikroorganizm. W omawianym rozdziale Doktorantka zawarła opisy metod, które zastosowała w celu izolacji bakterii i grzybów z ryzosfery pszenicy jarej i charakterystyki mikroorganizmów pod kątem zdolności do rozpuszczania chityny koloidalnej, solubilizacji związków fosforu i żelaza(II), wytwarzania auksyn oraz antagonizmu przeciwko roślinnym grzybom patogennym (*Phytophthora cactorum*, *Fusarium oxysporum* (2 szczepy), *Verticilium dahliae*) oraz metod identyfikacji molekularnej bakterii i grzybów, analizy transkryptomu korzeni pszenicy techniką RNAseq (wykonane dla 2 genotypów Sharki, Telimena, rosnących w warunkach



suszy inokulowanych konsorcjami K2, K3 i K2+K3 - 6 wariantów) i ekspresji genów w liściach techniką RT-qPCR (wykonane dla 13 genów), brakuje jednak w opisie informacji, które genotypy analizowano. Zastanawiam się, dlaczego analizując aktywności metaboliczne bakterii nie były one testowane pod kątem wytwarzania kwasu indoliloctowego IAA, chociaż takie analizy zaplanowano dla grzybów? Podobnie w sytuacji, w której analizowane były interakcje bakteria-grzyb patogenny, nie sprawdzono interakcji pomiędzy grzybami wyizolowanymi z ryzosfery pszenicy a grzybami patogennymi. Proszę o wyjaśnienie.

Doktorantka do analizy wyników wykorzystwała programy komputerowe m. in. WinRhizo, BlastN, MYCOCALC, Blast-PRIMER również te stosowane do analiz statystycznych oraz danych z sekwencjonowania transkryptomów.

Wyróżniającą się część dysertacji stanowi rozdział *Wyniki* zawarty na 130 stronach (str. 42-172), w którym uzyskane dane zaprezentowano w formie 56 tabel i 30 rysunków. W pierwszej części Autorka przedstawiła dane dotyczące tolerancji 20 genotypów pszenicy na suszę glebową i efektywności fotosyntezy u tych genotypów w warunkach optymalnego nawodnienia oraz suszy podczas różnych temperatur (2017 rok). Wyniki te uzupełniają dane dotyczące współczynników korelacji dla wskaźnika wrażliwości na suszę (DSI DW, DSI GY) z parametrami fluorescencji chlorofilu *a* obliczone dla 20 genotypów i oddzielnie dla 6 genotypów pszenicy wytypowanych jako model do dalszych badań. Doktorantka wykazała różnice w funkcjonowaniu fotosyntezy u genotypów wrażliwych a także znacznie tolerujących stres suszy. Ustaliła, że rośliny wrażliwe na suszę charakteryzuje niższa maksymalna wydajność PSII a obniżenie biomasy i plonu były spowodowane: niższą absorpcją energii, niższym przepływ przechwytywanej energii wzbudzenia przez fotosystem II, niższym aktywnym transportem elektronów przez PSII i zwiększonym rozpraszaniem nadmiaru energii w postaci ciepła. Ponadto analizując cechy biometryczne roślin (odrębnie części wegetatywnych i generatywnych) wykazała, że genotypy wrażliwe na suszę charakteryzuje obniżenie zarówno suchej biomasy w nadziemnych wegetatywnych częściach roślin (pędach i liściach) jak i plonu. Doktorantka udowodniła, że susza występująca w czasie niskich temperatur podczas wzrostu roślin stanowi



skuteczniejszy czynnik selekcyjny wrażliwości na suszę, niż susza w momencie działania wysokiej temperatury. W pracy wielokrotnie stosowane są określenia: „susza podczas wczesnej wiosny i susza podczas późnej wiosny”. Proszę o wyjaśnienie tych pojęć i podanie informacji w jakich fazach rozwojowych znajdowały się rośliny według skali BBCH, wykorzystywanej do identyfikacji fitofenologicznych faz roślin uprawnych? Jak Pani sądzi, czy faza wzrostu rośliny miała znaczenie dla ich reakcji na działanie analizowanych czynników środowiskowych (suszę i niską/wysoką temperaturę)?

Kolejna część *Wyników* poświęcona jest identyfikacji i charakterystyce mikroorganizmów pochodzących z ryzosfery genotypów pszenicy. W pracy Kandydatka wykazała, że genotypy pszenicy jarej wrażliwe i tolerancyjne na stres suszy różnią się liczbą mikroorganizmów w ryzosferowych. Ponadto drobnoustroje pochodzące z ryzosfery różnych genotypów wykazują też różną oporność na NaCl. Zastanawiam się, dlaczego jako czynnik selekcyjny w poszukiwaniu drobnoustrojów odpornych na suszę zastosowano chlorek sodu generujący stres solny? Czy możliwe było zastosowanie innego czynnika selekcyjnego? Proszę o krótkie wyjaśnienie uwzględniające porównanie reakcji roślin na stres solny i suszę. Według mnie w *Wynikach* zabrakło danych dotyczących oceny wrażliwości pojedynczych szczepów bakteryjnych na czynnik selekcyjny (NaCl). Autorka w dalszych badaniach analizowała pięć szczepów bakteryjnych wyselekcjonowanych z ryzosfery genotypów wrażliwych i pięć szczepów pochodzących z ryzosfery genotypów tolerancyjnych na suszę. Nie informuje jednak co było podstawą wytypowania tych bakterii do dalszych badań? Proszę o wyjaśnienie. Autorka w *Wynikach* umieściła dane dotyczące charakterystyki oceny aktywności metabolicznej przed wynikami molekularnej identyfikacji gatunkowej. Sugerowałabym w przyszłości odwrócenie kolejności prezentowanych danych co w moim przekonaniu nadaje logiczną kolejność prezentowanych danych. W przypadku danych dotyczących grzybów pochodzących z ryzosfery pszenicy, Kandydatka wykonała testy dla poszczególnych izolatów grzybów na podłożu mikrobiologicznym z NaCl. Według mnie w pracy doktorskiej zabrakło danych dotyczących aktywności metabolicznej grzybów, mimo że w *Materiałach* i *Metodach* znajdują się opisy takich analiz. Odnośnie molekularnej identyfikacji drobnoustrojów mam



pytanie: jakich innych baz danych zawierających sekwencje wykorzystywane do identyfikacji mikroorganizmów oprócz tych zawartych w GenBank NCBI, które Pani wykorzystywała, można użyć w celu oznaczenia bakterii i grzybów do gatunku?

Ciekawe wyniki uzyskała Doktorantka, w eksperymentach z wykorzystaniem konsorcjów bakterii i grzybów. Wykazała, różnice w składzie mikroorganizmów ryzosferowych genotypów wrażliwych i tolerancyjnych na suszę na poziomie ilościowym jak i jakościowym. Stwierdziła, wyższą liczebność grzybów w ryzosferze pszenicy jarej w warunkach suszy glebowej w porównaniu do warunków optymalnego nawodnienia. Z kolei liczebność szczepów bakteryjnych w ryzosferze genotypów tolerancyjnych na suszę była większa niż wrażliwych genotypów tej rośliny. W przypadku bakterii ryzosferowych wykazała, że ich aktywność metaboliczna wskazuje na zdolność do stymulowania wzrostu pszenicy poprzez zwiększanie dostępności składników odżywczych. Autorka udowodniła, że oddziaływanie zidentyfikowanych bakterii ryzosferowe należących do rodzajów *Bacillus* sp. i *Streptomyces* sp. w porównaniu do grzybów, które były najliczniej reprezentowane przez rodzaje: *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp. i *Clonostachys* sp. było bardziej specyficznie względem poszczególnych genotypów. W przypadku grzybów oddziaływanie na analizowane genotypy pszenicy określiła jako uniwersalne. Proszę o wyjaśnienie tego stwierdzenia. Czy zastosowanie badanych w pracy mikroorganizmów w uprawach innych gatunków roślin byłoby równie skutecznym sposobem ochrony przed suszą? Co więcej ustaliła, że zarówno bakterie glebowe pochodzące ze środowisk ekstremalnych (z gleb zasolonych, z terenów pustynnych (SymbioBank) i te wyizolowane z ryzosfery pszenicy oddziaływały korzystnie na kinetykę fotosyntezy, stymulowały wzrost i rozwój pszenicy w stresie suszy, a aplikacja mikroorganizmów korzystnie oddziaływała na tolerancyjny genotyp Sharki w warunkach optymalnego nawodnienia i suszy, a na wrażliwy genotyp Telimena jedynie podczas suszy. Dodatkowo Doktorantka wykazała pozytywny wpływ mikroorganizmów wyizolowanych z ryzosfery pszenicy (konsorcjum K2 zawierające 3 szczepy bakteryjne *Streptomyces* sp. z ryzosfery genotypu Telimena wrażliwego na suszę i konsorcjum K3 zawierającego *Bacillus megaterium* i *Streptomyces* sp. z ryzosfery genotypu tolerancyjnego Sharki) na strukturę



korzeni i bioróżnorodność gleby, w której uprawiano pszenicę jara, zwłaszcza genotypy o dużej wrażliwości na suszę. Obecność mikroorganizmów zawartych w konsorciach K1, K2, K3, K4, zwłaszcza K2 i K3 powodowała podwyższenie liczby struktur mikoryzowych w systemie korzeniowym i intensywność mikoryzowej kolonizacji systemu korzeniowego genotypów Telimena i Sharki.

Doktorantka sprawdziła również jakie zmiany zachodzą na poziomie transkryptomu korzeni pszenicy po aplikacji mikroorganizmów. Analiza RNA-seq dotyczyła 6 wariantów we wszystkich zastosowano konsorcja K2, K3, K2+K3, zawierające drobnoustroje pochodzące z ryzosfery pszenicy. Chciałabym dowiedzieć się czy analiza ta była wykonana dla genotypów Sharki i Telimena uprawianych w warunkach bez zastosowania mikroorganizmów (kontrola). Proszę też o informacje czy podczas uprawy w wermikulicie rośliny były nawożone? Nurtuje mnie jeszcze jedna kwestia, jako że w opisie nie znalazłam informacji, czy podczas przygotowania RNA do analizy RNAseq przeprowadzona była deplecja rRNA? Autorka wykazała, że zarówno genotyp, jaki i obecność mikroorganizmów miały wpływ na zmiany transkryptomu korzeni pszenicy jarej. Aplikacja *Bacillus megaterium* i *Streptomyces* sp. zawartych w konsorcjum K3 miała wpływ na zmiany ekspresji genów, zwłaszcza tych odpowiedzialnych za transport przez błonę komórkową, składników mineralnych, metabolitów i cukrów, genów odpowiedzialnych za aklimatyzację i ochronę przed stresem oksydacyjnym oraz genów odpowiedzialnych za formowanie ściany komórkowej i reakcje odpornościowe. Analizy transkryptomu umożliwiły wykazanie, że konsorcjum K2, zawierające trzy izolaty *Streptomyces* sp. w największym stopniu wpływało na zmiany ekspresji genów zaangażowanych w ochronę przed suszą u obu genotypów pszenicy. Co ciekawe, obecność zastosowanych mikroorganizmów w odmienny sposób oddziaływała na genotypy wrażliwe i tolerancyjne na suszę, w przypadku genotypu Sharki zanotowano spadek a w przypadku genotypu Telimena wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za gospodarkę azotową. Odwrotną natomiast sytuację zanotowano dla genów odpowiedzialnych za reakcję na kwas abscysynowy i reaktywne formy tlenu, którym ilość wzrastała u genotypu Sharki a spadała u genotypu Telimena. Autorka wykazała także, specyficzną reakcję genotypu



tolerancyjnego Sharki na obecność mikroorganizmów, co przejawiało się wzrostem ekspresji genów odpowiedzialnych za reakcje na stresy abiotyczne, suszę, niską temperaturę i stresy biotyczne oraz genów odpowiedzialnych za modyfikacje ściany komórkowej. Zanotowała natomiast spadek ekspresji genów odpowiedzialnych za: interakcje z patogenem, uszkodzenia mechaniczne, detoksyfikację, mikoryzę, reakcje za pośrednictwem fitohormonów oraz czynników transkrypcyjnych regulujących te procesy. Co więcej Doktorantka wykazała, że podczas suszy u 5 analizowanych genotypów SM2115, Struna (genotypy wrażliwe) i Goplana, Telimena, Scirocco (genotypy tolerancyjne), rosnących w różnych temperaturach, geny markerowe odpowiedzialne za reakcje fotosyntetyczne i antyoksydacyjne ekspresjonowane są na różnym poziomie. Ponadto wskazała, że u genotypów wrażliwych na suszę w niskiej temperaturze dochodzi do wzrostu ilości mRNA genów: *D2*, *DH14*, *SOD*, *SOD1*, *DHAR* a w wysokiej temperaturze do spadku transkryptów genów: *CBP3*, *DHAR*, *SOD1*, *SOD*, *CAT*, *tAPX*.

Rozdział szóstym dysertacji zatytułowany *Dyskusja*, obejmuje pięćdziesiąt trzy strony (str. 173-225). Autorka szczegółowo przeprowadziła dyskusję poszczególnych wyników i pokazała uzyskane dane na tle aktualnych doniesień w zakresie badań nad poznaniem mechanizmów interakcji roślina-mikroorganizm oraz potencjalnym wykorzystaniem drobnoustrojów do ochrony upraw przed niekorzystnym działaniem czynników środowiskowych zwłaszcza suszą i zmianami temperatury. Szczególnie szeroko w dyskusji omówiła wyniki badań, w których oceniła parametry fotosyntezy, zagadnienia tak ważnego dla funkcjonowania roślin, a wciąż wymagającego poznania. Autorka szeroko przedyskutowała także wyniki własnych badań z danymi literaturowymi dotyczącymi pozytywnego wpływu bakterii PGPR na wzrost, rozwój i plonowanie w warunkach suszy, uwzględniając, w oddzielnych podrozdziałach ich oddziaływanie na część nadziemną, korzenie roślin, bioróżnorodność gleby oraz kolonizację korzeni pszenicy arbuskularnymi grzybami mikoryzowymi. Czy, na podstawie literatury, wiadomo, że stosowane w badaniach rodzaje lub gatunki bakterii mogą być endofitami pszenicy? Ostatnią część opisywanego rozdziału stanowi wnikliwie przeprowadzona dyskusja danych uzyskanych z sekwencjonowania transkryptomów korzeni pszenicy i analizy ekspresji wybranych genów



w liściach roślin uprawianych w obecności mikroorganizmów i zmian temperatury w warunkach suszy. Jak Pani sądzi, czym były podyktowane różnice w ekspresji genów w korzeniach roślin wrażliwych i tolerancyjnych na niedobór wody. Czy zastosowany w eksperymentach stres (wilgotność podłoża na poziomie 35% połowej pojemności wodnej) był stresem dla genotypów wrażliwych jak również genotypów tolerancyjnych? Podsumowując, treści zawarte w dyskusji zostały poprawnie dobrane i opisane w sposób tworzący logiczną całość.

Rozdziale zatytułowanym *Wnioski* Doktorantka zawarła czytelne i jasno sformułowane podsumowanie wyników i wnioski zredagowane w dziesięciu punktach odnoszących się do kolejno omawianych w pracy badań. W mojej opinii ten ważny rozdział pracy w dużej części stanowi podsumowanie wyników, dlatego trafniej byłoby, aby został nazwany *Podsumowanie wyników i wnioski*. Odnośnie, punktu dziesiątego tego rozdziału, proszę Autorkę o informację, czy każde z analizowanych konsorcjów jest zalecane do ochrony upraw pszenicy przed suszą, czy może zaobserwowała Pani różnice w ochronie przed suszą pomiędzy konsorcjami zawierającymi mikroorganizmy ze środowisk ekstremalnych a tymi, w których zawarto izolaty drobnoustrojów pochodzące z ryzosfery pszenicy. Informacje te będą cennym uzupełnieniem tego rozdziału.

Do napisania dysertacji Doktorantka wykorzystowała 410 pozycji, poprawnie dobranych i zacytowanych w tekście, z których dużą część (42%) stanowią publikacje z lat 2020-2024. Świadczy to o szczegółowym zapoznaniu się Autorki z literaturą, również tą najnowszą.

Autorka na ostatnich stronach dysertacji zawarła *Streszczenia* pracy napisane w języku polskim i angielskim, które moim zdaniem powinny znajdować się na początku pracy, stanowiłyby wówczas skrótowe wprowadzenie czytelnika w opisywane w dysertacji zagadnienia.

Uwagi szczegółowe

Autorka podczas pisania rozprawy doktorskiej nie uniknęła drobnych błędów:



str. 6 – w wykazie skrótów brak konsekwencji w zapisie. Należałoby rozwinięcie stosowanych w pracy skrótów podać zarówno w języku polskim jak i w języku angielskim, zwłaszcza, że większość skrótów pochodzi od wyrazów angielskich; w *Wykazie stosowanych skrótów* jedynie w niektórych przypadkach podano wyjaśnienia w dwóch językach;

str. 6, wers 11 – literówka (zamiast „z” powinno być „y”);

str. 6 wers 29; str. 29 wersy 11, 12 i 13 – po skrócie wyrazu brak kropki;

str. 7, wers 18 – powtórzenie;

str. 8 – w wersach 8 i 9 należało podać pełne nazwy łacińskie gatunku, ponieważ pierwszy raz pojawiają się w tekście;

str. 29, wers 33 – zamiast „stężenie bakterii” należało użyć sformułowania „gęstość optyczna bakterii” ponieważ zawartość bakterii wyrażono w jednostkach tworzących kolonie na mililitr;

str. 32, wers 31 – brak °C

str. 33, wers 11- błędny zapis nazwy łacińskiej *Phytothora*, należałoby poprawić na *Phytophthora*;

str.: 39, 173, 175, 182, 186, 194, 199, 204, 206 - należałoby usunąć kropki na końcu tytułów podrozdziałów;

str. 37 - Autorka opisując uprawy roślin, które stanowiły materiał do analizy RNAseq odwołuje się do rozdziału 3.2.2, a takie informacje znajdują się w rozdziale 4.2.2.;

str. 152 - w miejsce sformułowania „profil ekspresji genu” należy stosować określenie „ekspresja genu”

str. 167, rys.33 - niewłaściwe sformułowania: „proces metabolizmu komórkowego”, „proces metabolizmu związków azotowych”, „proces metabolizmu makrocząsteczek”; powinno być: metabolizm komórkowy, metabolizm związków azotowych, metabolizm makrocząsteczek.

Uważam, że przedstawione przez Panią mgr Natalię Hordyńską badania zostały wykonane w oparciu o najnowsze techniki badawcze RNAseq, RT-qPCR, połączone z



badaniami mikrobiologicznymi, fizjologicznymi dały szeroki obraz reakcji roślin na działanie czynników środowiskowych, również tych powodujących stres. Pomimo pewnych niejasności, które pojawiły się w rozprawie, to jednak z uwagi na ogrom wykonanych badań, wyniki te wnoszą nowe i cenne informacje, które wpisują się w strategię Zielonego Ładu. Godna podkreślenia jest szczegółowa analiza uzyskanych wyników, zwłaszcza danych transkryptomicznych, także prawidłowa i kompleksowa analiza statystyczna oraz szczegółowa i dogłębna dyskusja wyników. Wysoki poziom naukowy badań oraz ich aktualny charakter, dają szerokie możliwości publikacji w uznanych czasopismach międzynarodowych. Uważam, że wyniki badań opisane w dysertacji wnoszą nowe interesując i ważne informacje na temat mechanizmów interakcji roślin z mikroorganizmami.

Bardzo wysoko oceniam wartość uzyskanych wyników. Za najważniejsze osiągnięcia uważam wykazanie, że: i. mechanizmy fotosyntetyczne determinujące wrażliwość pszenicy na suszę są zależne od genotypu i w mniejszym stopniu od temperatury; ii. liczebność i skład mikroorganizmów są zróżnicowane w ryzosferze genotypów o różnej wrażliwości na suszę; iii. wybrane mikroorganizmy pochodzące z ryzosfery pszenicy jarej wpływają na: efektywność fotosyntezy, wzrost i rozwój części nadziemnej i korzeni pszenicy oraz ich kolonizację arbuskularnymi grzybami a także bioróżnorodność gleby; iv. wyselekcjonowane szczepy bakteryjne powodują zmiany na poziomie transkryptomu korzeni i ekspresji wybranych genów w liściach pszenicy; v. opracowane i zweryfikowane konsorcja mikroorganizmów mogą stanowić składniki biopreparatów wspomagających uprawy pszenicy w tym w ochronie przed negatywnymi skutkami suszy.

Praca doktorska mgr Natalii Hordyńskiej spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim (określone w art. 187 ust. 1 i 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) a rozmiarem przedstawionych wyników i merytoryczną wagą większości z nich, plasują ją w szeregu najlepszych prac.



Wysoko oceniam umiejętność poradzenia sobie z całością detalicznych wyników, których ogrom był trudny do interpretacji i zredagowania w konkretne podsumowanie i wnioski. Dlatego też, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Instytutu Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Biorąc pod uwagę dorobek naukowy Doktorantki a przede wszystkim wartość naukową recenzowanej pracy, zwłaszcza wyników analiz transkryptomicznych oraz danych dotyczących interakcji mikroorganizmy-pszenica jara, cennych pod względem możliwości ich wykorzystania w praktyce, wnioskuję również o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.

Kierownik
Katedry Genetyki

dr hab. Grażyna Dąbrowska, prof. UMK

Toruń, 17 września 2024 r.

dr hab. Grażyna B. Dąbrowska, prof. UMK