



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu
31-120 Kraków, al. A. Mickiewicza 21
Tel. + 48 12 662-40-96
E-mail: kmib@urk.edu.pl

Kraków, dnia 07 sierpnia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: mgr inż. Anna Kozłowska

Tytuł pracy:

„Badania możliwości wykorzystania arbuskularnych grzybów mykoryzowych (gromada Glomeromycota) w ochronie roślin chronionych i wydm Mierzei Kurońskiej oraz arbuskularne grzyby mykoryzowe innych stanowisk”

Praca wykonana w Katedrze Kształtowania Środowiska na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Janusza Błaszczewskiego

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie Pani dr hab. inż. Joanny Podlasińskiej, prof. ZUT z dnia 05.07.2023 roku, w którym poinformowano mnie, że uchwałą z dnia 30.06.2023 r. zostałam powołana na recenzentkę ww. pracy.

Problematyka badawcza

Grzyby to najbardziej zróżnicowane Królestwo organizmów na Ziemi, do którego obecnie zliczonych jest ponad 100.000 gatunków, jednak według różnych danych literaturowych może być ich nawet 5 milionów. Nowe techniki badawcze (analizy molekularne) stosowane w diagnostyce mykologicznej pozwalają na regularne uzupełnianie listy znanych gatunków, jednak ogromne zróżnicowanie tej grupy sprawia wiele trudności z usystematyzowaniem istniejącej wiedzy. Arbuskularne grzyby mykoryzowe zostały

stosunkowo niedawno umieszczone w gromadzie Glomeromycota na co pozwoliły badania molekularne – jednak systematyka grzybów nadal podlega licznym zmianom, a propozycje naukowców niekiedy bywają sprzeczne.

Według różnych szacunków blisko 90% roślin tworzy związki z grzybami, które pozwalają im skutecznie kolonizować niesprzyjające środowiska lądowe jak gleby silnie zakwaszone czy piaszczyste - o niskiej zawartości materii organicznej i wody. To właśnie arbuskularne grzyby mykoryzowe często pomagają roślinom naczyniowym zaaklimatyzować się i rozwijać w niekorzystnych warunkach – toteż coraz powszechniejsza staje się mykoryzacja (głównie drzew) przed ich introdukcją na nowe tereny. Dla wielu roślin symbioza z grzybami jest warunkiem ich przetrwania na trudnych stanowiskach jakimi są piaszczyste tereny w tym wydmy. Polskie wydmy są cennymi przyrodniczo siedliskami licznych roślin chronionych: halotolerancyjnych/halofilnych i kserotolerancyjnych – co zapewne w dużej mierze jest zasługą grzybów żyjących z nimi w symbiozie. Grzyby mykoryzowe nie tylko zwiększają powierzchnię chłonną korzeni i pełnią funkcję „sanitarną” ochraniając rośliny przed patogenami - szczególnie tymi, które atakują system korzeniowy i zmniejszając ich wrażliwość na stresy abiotyczne i biotyczne - ale także, podobnie jak inne grzyby strzępkowe, ograniczają erozję wodną i wietrzną gleb poprzez tworzenie sieci strzępek i produkcję szeregu substancji agregujących.

Skuteczna ochrona polskich wydm będzie możliwa jedynie po dobrym poznaniu tego środowiska, jego bioróżnorodności i zależności troficznych organizmów w nim bytujących, a wykorzystanie AGM naturalnie występujących w ryzosferze roślin wydmych i już zaadaptowanych do takich warunków wydaje się kluczowym elementem ich ochrony.

Polska od dawna posiada technologie pozwalające na produkcję biopreparatów zawierających aktywne szczepy grzybów mykoryzowych i sterowanej mykoryzacji sadzonek, warto zatem te osiągnięcia wykorzystać także w przypadku chronionych roślin wydmych - na co zwraca uwagę w swojej pracy doktorantka typując gatunki grzybów, które mogą być użyteczne w rekonstrukcji wydm Mierzei Kurońskiej.

Temat badawczy stanowi istotny wkład doktorantki w poszerzenie wiedzy z zakresu mykologii środowiskowej i poznanie wielogatunkowych społeczności arbuskularnych grzybów mykoryzowych roślin obszarów chronionych, a podjęta w rozprawie tematyka jest aktualna, oryginalna, i wpisuje się w światowe trendy.

Przeprowadzone przez doktorantkę kilkuletnie badania dostarczyły wielu ciekawych wyników i z pewnością stanowiły dla autorki niemałe wyzwanie szczególnie, że

wykorzystywała w analizach nie tylko metody tradycyjne, ale także techniki molekularne co dobrze świadczy o jej warsztacie badawczym i przygotowaniu do pracy laboratoryjnej. Doceniam także ogromny wysiłek doktorantki włożony w zestawienie, opracowanie i analizę wyników.

Mając na uwadze różnorodność i szeroki zakres wykonanych badań oraz dogłębną analizę wyników pozytywnie oceniam opracowanie, które – w mojej ocenie, wobec braku dyscypliny ochrona środowiska - mieści się w dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

Ocena pracy pod względem formalnym i strukturalnym

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w formie zwartego opracowania w sposób typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych i obejmuje 72 strony maszynopisu - w tym 64 strony zasadniczego tekstu (z uwzględnieniem stron tytułowych i spisu treści).

Opracowanie podzielono aż na siedemnaście rozdziałów z licznymi podrozdziałami systematyzującymi informacje literaturowe, cel pracy, dane na temat zastosowanych materiałów i metod badawczych – w tym obliczeń statystycznych, opis wyników uzyskanych z badań własnych autorki, dyskusję, rozdział poświęcony ocenie możliwości wykorzystania AGM w ochronie roślin wydm Mierzei Kurońskiej i wnioski. W pracy zawarto również spis wykorzystanej bibliografii oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Chociaż treść pracy została przedstawiona logicznie i we właściwej kolejności to jednak mam pewne zastrzeżenia dotyczące jej podziału na rozdziały i podrozdziały:

- podrozdziały 5.3 i 5.3.1 – powinny w mojej ocenie stanowić całość jako „Pobór prób do badań”, tym bardziej, że podrozdział „Badania polowe” zawiera informacje dotyczące liczby zebranych prób, ich masy i roślin, spod których próbki pochodziły, a nie eksperymentu polowego (bo takiego nie założono);

- rozdziały 6, 7, 8 dotyczą części metodycznej i jako takie powinny stanowić kolejne podrozdziały rozdziału 5. „Materiał i metody”;

- z kolei rozdziały 10, 11, 12 i 13 powinny stanowić część rozdziału 9. „Wyniki” ponieważ tego właśnie dotyczą.

Pod względem formalnym opracowanie nie wzbudza zastrzeżeń, jest napisane w sposób poprawny językowo – błędy edytorskie są nieliczne. Praca przygotowana jest spójnie, a zgromadzone pozycje literatury zostały zacytowane poprawnie.

Wykorzystana w przygotowaniu opracowania starannie dobrana bibliografia obejmuje 116 pozycji z czego 14 to netografia (strony internetowe). Zgromadzona literatura to głównie najnowsze publikacje w języku angielskim oraz pozycje starsze, które niezbędne były dla prawidłowego przedstawienia analizowanego zagadnienia, zarówno od strony teoretycznej jak i praktycznej.

Sposób zestawienia rezultatów badań i wykonana analiza świadczą o tym, że doktorantka potrafi dojrzałe i trafnie weryfikować informacje naukowe.

W pracy znajdujemy 15 tabel (w tym jedną zasadniczo jako suplement), głównie zawierających wyniki badań własnych oraz 7 rycin związanych przede wszystkim z częścią metodyczną. Treść pracy uzupełnia również dokumentacja fotograficzna (5 zdjęć). Jednak większość danych uzyskanych w trakcie realizacji doktoratu przedstawiono w formie opisowej, co wynika ze specyfiki prowadzonych badań.

Ocena pracy pod względem metodycznym

W ramach części eksperymentalnej recenzowanej pracy doktorantka wykonała szereg analiz próbek pobranych z ryzosfery pięciu roślin wydmowych (*Ammophila arenaria*, *Viola littoralis*, *Hieracium umbellatum*, *Linaria loeselli*, *Lathyrus japonicus* ssp. *maritimus*) dwóch stanowisk Mierzei Kurońskiej zmierzających do oceny częstotliwości występowania i obfitości zarodnikowania arbuskularnych grzybów mykoryzowych.

Ilość pobranych próbek i wykonanych badań podstawowych (132 próbki gleby ryzosferowej i kultury pułapkowe założone z tych gleb) pozwala sądzić, że uzyskane wyniki są wiarygodne i reprezentatywne dla badanego środowiska.

Autorka nie tylko wyizolowała zarodniki AGM i zidentyfikowała je w oparciu o cechy morfologiczne, ale, co istotniejsze, przeprowadziła także analizy molekularne (PCR), a po uzyskaniu sekwencji izolatów grzybów porównywała je ze znanymi sekwencjami znajdującymi się w GenBanku, co pozwoliło nie tylko na oznaczenie ich przynależności systematycznej ale także ujawnienie w nim pozycji rodzajów/gatunków wcześniej niezidentyfikowanych. Doktorantka umiejętnie wykorzystwała informacje zawarte na stronach GenBanku, MycoBanku i innych baz danych dotyczących diagnostyki mykologicznej, co często stanowi wyzwanie nie tylko dla młodych badaczy.

Metodyka została poprawnie opisana i uzupełniona odsyłaczami do stosownych tekstów źródłowych. Doświadczenia były zaplanowane logicznie, a szeroko zakrojone badania wymagały od doktorantki znajomości różnych technik badawczych, dokładności oraz

dużego nakładu pracy w laboratorium, bowiem tego typu analizy są bardzo czasochłonne i wymagają ogromnego zaangażowania badacza.

W oparciu o zgromadzone dane autorka wykonała liczne obliczenia zmierzające do określenia bioróżnorodności AGM roślin chronionych Mierzei Kurońskiej w oparciu o kilka wskaźników: ogólnej różnorodności H'Shannona, bogactwa gatunkowego Simpsona, dominacji Simpsona oraz Bergera-Parkera i równomierności Simpsona.

Do części metodycznej mam tylko prośbę o uzasadnienie wyboru babki lancetowatej (*Plantago lanceolata*) jako rośliny pułapkowej w badaniach wazonowych.

Ocena merytoryczna pracy

Autorka pracy postawiła sobie właściwie trzy cele dotyczące nie tylko określenia częstotliwości występowania i różnorodności AGM związanych z roślinami wydmowymi Mierzei Kurońskiej na podstawie analiz ilościowych i morfologii zarodników wyekstrahowanych z prób gleby ryzosferowej oraz kultur wazonowych i molekularnej filogenezy ich DNA; określenia morfologii i filogenezy potencjalnie nowych gatunków AGM oraz gatunków, których opisy morfologiczne oraz filogenetyczne są wątpliwe lub nieznanne (zbiory z Mierzei Kurońskiej oraz kolekcja AGM macierzystej jednostki), ale, co moim zdaniem najistotniejsze, oceny możliwości wykorzystania AGM w ochronie roślin chronionych i zagrożonych wydm Mierzei Kurońskiej.

Teoretyczne podstawy związane z celami badawczymi autorka przedstawiła w kilkunastu wstępie, w którym omówiła zagadnienia dotyczące występowania, roli, systematyki i problemów związanych z identyfikacją AGM. W tym rozdziale doktorantka uwzględniła również podstawowe informacje na temat Mierzei Kurońskiej zwracając uwagę na niedobór danych związanych z grzybami występującymi w symbiozie z roślinami wydmowymi tego obszaru, które można w praktyce wykorzystać do mykoryzacji roślin endemicznych wydm.

Zamierzony cel badań doktorantka osiągnęła przeprowadzając liczne analizy materiałów pobranych z dwóch stanowisk wyznaczonych na wydmach Mierzei Kurońskiej. W ramach przeprowadzonych w przemyślany sposób badań nie tylko określiła liczebność, przynależność systematyczną i częstotliwość występowania arbuskularnych grzybów mykoryzowych związanych z roślinnością wydmową, ale określiła także pozycję filogenetyczną nowych rodzajów i gatunków oraz – co uważam za szczególnie istotne - zasugerowała, które z nich mogą zostać wykorzystane do mykoryzacji roślin chronionych stanowisk wydmowych

Mierzei Kurońskiej. Ważna w rozdziale Wyniki jest także szczegółowa charakterystyka nowych rodzajów i gatunków AGM wyizolowanych, oznaczonych i opisanych w trakcie prowadzenia badań.

Rezultaty badań zostały poddane dyskusji w rozdziale czternastym, w którym autorka omówiła uzyskane wyniki na tle literatury. W ramach tego rozdziału dokonana została szczegółowa analiza tekstów źródłowych związanych z tematyką przeprowadzonych badań – wyjątkowo cenny wydaje się tutaj podrozdział dotyczący możliwości wykorzystania arbuskularnych grzybów mykoryzowych w ochronie roślin chronionych i wydm. Autorka atwierdziła, że AGM naturalnie występujące w ryzosferze roślin Mierzei Kurońskiej najlepiej nadają się do mykoryzacji roślin wydmowych tego obszaru gdyż są już do niego zaadaptowane - co również znalazło poparcie w cytowanych tekstach źródłowych.

W końcowym rozdziale autorka zamieściła sześć wniosków, które stanowią bezpośrednie odbicie otrzymanych wyników badań, są rzeczowe i odnoszą się do celu pracy.

Na zacytowanie zasługuje wniosek ostatni, w którym autorka podsumowując swoje badania podaje, że do rekonstrukcji wydm badanego terenu należy wykorzystać inokulum zawierające jeden lub kilka gatunków spośród dominujących: *Acaulospora mellea*, *Archaeospora trappei*, *Cetraspora gilmorei*, *C. pellucida*, *Glomus tetrastratosum*, *Rhizoglomus irregulare* i *Scutellospora dipurpurescens*, po przetestowaniu efektywności funkcjonalnej utworzonych kombinacji.

Mając na uwadze informacje zawarte w poszczególnych rozdziałach i podrozdziałach praca może stanowić istotną pozycję w literaturze dotyczącej nie tylko mykoryzy arbuskularnej, ale także diagnostyki mykologicznej ze względu na zawarte w niej szczegółowe opisy nowej rodziny *Pervetustaceae* oraz nowych rodzajów i gatunków AGM.

Tytuł przedstawionej do recenzji rozprawy zasadniczo odpowiada zakresowi badań wykonanych w trakcie jej realizacji, chociaż mój pewien niedosyt budzi brak wyników dotyczących wzrostu roślin po inokulacji wybranymi AGM, ponieważ tylko wymieniono gatunki grzybów, które można do niej potencjalnie wykorzystać, a takich analiz właśnie spodziewałam się w ocenianej pracy.

W tym miejscu mam również uwagi i pytanie dotyczące nowej rodziny i nowych rodzajów oraz gatunków: m.in. na stronie 61 podaje Pani: „...Ponadto na podstawie żywej kolekcji AGM hodowanych w Katedrze Kształtowania Środowiska opisano nową rodzinę, *Pervetustaceae*...” – opis tej rodziny można znaleźć już w publikacji z 2017 roku „A new family, *Pervetustaceae* with a new genus, *Pervetustus* , and *P. simplex* sp. nov.

(Paraglomerales), and a new genus, *Innospora* with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina” w czasopiśmie *Nova Hedwigia*.

W związku z powyższym proszę wyjaśnić, co nowego Pani badania, wykonane w ramach realizacji doktoratu, wniosły do charakterystyki tej rodziny i opisu m.in. rodzaju *Pervetustus* i innych rodzajów/gatunków, ponieważ część informacji można znaleźć w opublikowanych w ostatnich latach pracach.

Z obowiązku recenzentki przedstawiam również inne uwagi dotyczące pracy (głównie drobne błędy edycyjne), mając jednocześnie nadzieję, że posłużą lepszemu przygotowaniu publikacji do druku:

- 1) Autorka niestety nie ustrzegła się błędów w nazewnictwie - chociażby na stronach 10 (mikoryzacja) i 63 (mikoryzowe) - zgodnie z decyzją Rady Języka Polskiego, powinniśmy używać terminu mykoryza w miejsce powszechnie dotychczas stosowanego mikoryza. Rada Języka Polskiego przy Prezydium Polskiej Akademii Nauk w dnia 27 czerwca 2011 roku, na XXXV posiedzeniu plenarnym, na którym zostały przedstawione i omówione kwestie dotyczące ustalenia fonetyczno-graficznej formy nazwy nauki o grzybach, opowiedziała się za przyjęciem, jako jedynie poprawnej formy zapisywanej przez „y”, czyli: mykologia i słów pochodnych jak: mykologiczny, mykolog, mykoryza. Informację o decyzji można znaleźć na stronie Polskiego Towarzystwa Mykologicznego;
- 2) Strona 8 – użyto skrótu AMF podczas gdy w pozostałej części pracy używano AGM;
- 3) Strona 13 – jest: „...zebrano 132 prób korzeni...” – powinno być „...zebrano 132 próby korzeni...”;
- 4) Strona 26 - jest: „...wydają się być niepełne lub są nieopisanych taksonami...” - powinno być: „...wydają się być niepełne lub są nieopisane taksonami...”;
- 5) Strona 26 - cytuję: „Katedra Kształtowania Środowiska utrzymuje kolekcję żywych kultur AGM, których opisy wydają się być niepełne lub są nieopisanych taksonami; grzyby te pochodziły z ponad trzydziestu krajów świata. Wykorzystując metody opisane wyżej izolowano i przeprowadzano identyfikacje morfologiczną oraz molekularną tych grzybów.” – (pomijając błędy gramatyczne) chciałam zwrócić uwagę na fakt, że skoro grzyby znajdują się w kolekcji to raczej nie wymagały już izolacji;
- 6) Strona 30 – „... stwierdzono występowanie 17 morfotypów wspólnych...” - powinno być: „...stwierdzono występowanie 17 gatunków wspólnych...” – to, że izolaty wykazują podobieństwo morfotypowe nie znaczy, że grzyby należą do tego samego

gatunku – o czym zresztą autorka pisze w innej części pracy po dokonaniu identyfikacji molekularnej wyizolowanych szczepów;

- 7) Strony 26, 61, 64 (i inne) – chociaż forma „znajdywać” niepoprawną nie jest, to jest przestarzała i obecnie praktycznie nieużywana, dlatego skłaniam się ku użyciu słowa „znajdować”;
- 8) Strona 63 – jest „... najlepiej zaadoptowane do...” - powinno być: „...najlepiej zaadaptowane do...”;

Wniosek końcowy

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa naukowa pt. „Badania możliwości wykorzystania arbuskularnych grzybów mykoryzowych (gromada Glomeromycota) w ochronie roślin chronionych i wydm Mierzei Kurońskiej oraz arbuskularne grzyby mykoryzowe innych stanowisk” przygotowana przez mgr inż. Annę Kozłowską stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje, że autorka posiada niezbędną wiedzę teoretyczną, zdolna jest do planowania eksperymentów, opanowała techniki laboratoryjne oraz umiejętność prowadzenia pracy badawczej w dziedzinie nauk inżynierijno-technicznych, dyscyplinie inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka spełniając tym samym wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

W związku z powyższym wnioskuję do członków Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr inż. Anny Kozłowskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Dr hab. inż. Maria J. Chmiel, prof. URK