

Bydgoszcz, 14.11.2018 r.

Dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. nadzw. UTP
Pracownia Fitopatologii i Mykologii Molekularnej
Katedra Biologii i Ochrony Roślin
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Anny Kacprzak-Siuda pt. „Zbiorowiska mikroorganizmów zasiedlających korzenie i strefę przykorzeniową roślin uprawnych w dwóch systemach nawożenia” wykonanej w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza P. Kurowskiego

Do najważniejszych środowisk naturalnych bytowania i rozwoju mikroorganizmów należy gleba. Występuje w niej ogromna ilość bardzo zróżnicowanych drobnoustrojów, w tym patogenów roślin uprawnych. Ich ilość jest zmienna i zależy przede wszystkim od jakości gleby, jej właściwości fizykochemicznych, struktury i odczynu. Zasobność gleb w składniki odżywcze, jej dobra struktura, warunkująca prawidłowe stosunki powietrzno-wodne, sprzyjają namnożeniu się mikroorganizmów. Należy zaznaczyć, iż intensywny rozwój tych organizmów jest jednym z podstawowych warunków utrzymania się na wysokim poziomie żyzności gleby. Rozmieszczenie mikroorganizmów w glebie nie jest jednakowe, im bliżej korzeni roślin tym jest ich więcej. Na zmianę ich liczebności, oprócz samej gleby, wpływają także czynniki ekologiczne, klimatyczne oraz agrotechniczna działalność człowieka, w tym nawożenie. Zarówno wieloletnie nawożenie mineralne, jak i organiczne, może znacząco zmieniać środowisko glebowe. Jednak niezrównoważone nawożenie mineralne może wpływać niekorzystnie na niektóre elementy żyzności gleby. Stosowanie samych nawozów organicznych również nie zapewnia równowagi. Za najkorzystniejsze uważa się połączenie nawożenia organicznego z mineralnym. Jednak zbiorowiska mikroorganizmów występujących w glebie oraz korzeniach roślin uprawianych w takich warunkach nadal są stosunkowo mało zbadane. Wobec tego Doktorantka dokonała słusznego wyboru podejmując się analizy zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających korzenie i strefę przykorzeniową trzech gatunków roślin uprawianych w różnych systemach nawożenia, zwłaszcza że obserwacje prowadziła na 32-letnim polowym doświadczeniu statycznym.

Przedstawiona do oceny rozprawa pani mgr inż. Karoliny Anny Kacprzak-Siuda liczy łącznie 202 numerowanych stron, w tym zawiera 43 tabele, 46 wykresów i 1 zdjęcie. Struktura rozprawy została opracowana w układzie klasycznym dla prac doktorskich, według ogólnie przyjętego schematu, typowego dla wieloaspektowej pracy empirycznej. Całość materiału opisowego podzielono na 9 głównych rozdziałów merytorycznych: 1. Wstęp, 2. Cel, zakres pracy i hipotezy badawcze, 3. Przegląd literatury, 4. Materiał i metody, 5. Warunki meteorologiczne, 6. Wyniki badań, 7. Dyskusja wyników, 8. Wnioski, 9. Piśmiennictwo oraz dodatkowo wyodrębniono 3 rozdziały nienumerowane: Załączniki, Streszczenie i Summary. Ponadto w ramach rozdziałów 3., 4. i 6. wyodrębniono szereg podrozdziałów oraz mniejszych jednostek redakcyjnych. Taki układ sprawia, iż praca jest czytelna.

Treść pracy odpowiada tematowi określonymu w prawidłowo zredagowanym tytule. W rozbudowanym „Wstępie” Doktorantka w sposób jasny i zrozumiały wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań. W trafny sposób uzasadnia sensowność podjęcia badań. Cel pracy dobrze sformułowany i w toku badań został osiągnięty. Na podstawie dotychczasowego stanu wiedzy sformułowała trzy hipotezy badawcze.

W „Przeglądzie literatury” Autorka słusznie wyodrębniła 7 podrozdziałów, wykorzystując liczne pozycje literatury, dobrane odpowiednio do studiowanego zagadnienia i właściwego tematu badawczego. Przedstawiła wpływ nawożenia na zdrowotność roślin. W dalszej kolejności przybliżyła mikroorganizmy glebowe i strefy przykorzeniowej w agrocenozach, opisała zależności antagonistyczne pomiędzy patogenami a saprotrofami oraz grzyby towarzyszące uprawom roślin rolniczych. Ponadto w trzech podrozdziałach przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący etiologii, patogenezy, epidemiologii oraz charakterystykę wybranych chorób uprawianych roślin. Jednakże w tytułach tych trzech podrozdziałów stosowała różne zapisy dla słowa choroba, tj. „mykozy”, „mikozy” i „choroby”, co wprowadza pewne zamieszanie. Pomimo to rozdział ten opracowano wnikliwie, w oparciu o najnowsze doniesienia literatury krajowej i międzynarodowej.

Zweryfikowanie postawionych hipotez badawczych oraz osiągnięcie założonego celu wymagało zgromadzenia i przygotowania odpowiedniego materiału badawczego oraz wielu szczegółowych i wysoce specjalistycznych badań, których wykonanie Doktorantka podała w rozdziale „Materiał i metody”. Oceniana rozprawa doktorska obejmuje obserwacje polowe i prace laboratoryjne. Z uwagi na szeroko zakrojone badania i związaną z tym konieczność zastosowania wielorakich metod, Autorka wyodrębniła w tym rozdziale 6 podrozdziałów i 5 mniejszych jednostek. Dzięki takiemu podejściu lokalizacja, czynniki doświadczenia, materiał badawczy oraz sposób wykonania badań zostały odpowiednio przedstawione.

Materiał badawczy stanowiły rośliny kukurydzy, pszenicy jarej i buraka cukrowego, uprawiane w statycznym doświadczeniu założonym w Bałcynach w 1986 roku, oraz gleba strefy przykorzeniowej tych roślin. Lata trwania doświadczenia wraz z rotacją roślin, schematem doświadczenia i wielkością nawożenia pod poszczególne rośliny uprawne przedstawiono w trzech tabelach.

W pracy użyto prawidłowych metod badawczych, właściwie dobranych i zastosowanych, nie budzących zastrzeżeń merytorycznych. Autorka opisała sposoby przeprowadzania eksperymentów, uwzględniając wszystkie niezbędne metodyki przez ich opisanie bądź podanie źródła literaturowego. W swych badaniach stosowała metody klasyczne, jak również nowoczesne. Przedstawiła sposób izolacji grzybów i wybranych rodzajów bakterii zasiedlających glebę i strefę przykorzeniową oraz sposób ich identyfikacji. Pewnego doprecyzowania wymaga termin wykonania obserwacji zdrowotności liści. W opisie podano, iż ocenę zdrowotności liści kukurydzy wykonano w fazie BBCH 59-65 a pszenicy w fazie BBCH 71-77, natomiast dane z wynikami dotyczą ocen wykonanych w fazach BBCH 59-60 i BBCH 63-65 dla kukurydzy oraz faz BBCH 71-73 i BBCH 75-77 dla pszenicy. Bardzo wartościowe jest zastosowanie technik molekularnych, pozwalających na potwierdzenie przynależności gatunkowej wybranych izolatów grzybów, jak i występującego pomiędzy nimi zróżnicowania genetycznego. Autorka przeprowadziła analizę sekwencji regionów ITS uzyskanego genomowego DNA, z wykorzystaniem starterów ITS1 i ITS4, choć w dalszej części metodyki zamiast ITS4 podaje ITS2. Przedstawiła także charakterystykę wykonanej reakcji MSP-PCR mikrosatelitami z zastosowaniem startera GTG-5. Nie było jednak potrzeby dwukrotnego podawania jego pełnej sekwencji. W analizach tych uwzględniła 78 izolatów *Fusarium* spp. uzyskanych z badanych środowisk, jak również pozyskanych z ziarna pszenicy, które nie było uwzględnione w badaniach.

Podjęcie powyższych badań świadczy o rzetelnym rozpoznaniu i dobrym opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnych technik badawczych, jak i tych już sprawdzonych. Wskazuje wyraźnie, że posiada duże umiejętności praktyczne i szerokie rozeznanie w literaturze światowej, dotyczącej metod badawczych. Dla odpowiedniej interpretacji uzyskanych wyników i wnioskowania konieczne było przeprowadzenie szeregu analiz statystycznych, co wymagało od niej wiedzy i umiejętności. Moim zdaniem w rozdziale 4.5.1. zbędna jest krótka informacja dotycząca analiz statystycznych, zwłaszcza że w pracy wyodrębniono rozdział 6.6., w którym uwzględniono również badania dotyczące izolacji bakterii z gleby.

Prawidłowe zaplanowanie i staranne wykonanie pracochłonnych badań, umożliwiło uzyskanie wielu interesujących, a zarazem cennych danych. Niewątpliwie wyniki badań są najcenniejszym elementem dysertacji. Opis wyników Autorka przedstawiła w 2 podrozdziałach i 10 mniejszych jednostkach redakcyjnych. Dane wynikowe uzyskane z przeprowadzonych

obserwacji i analiz zamieściła w 39 tabelach, 46 wykresach oraz zilustrowała na 1 zdjęciu, doskonale oddających różnicowanie badanych izolatów, stanowiących cenne uzupełnienie i udokumentowanie wykonanych obserwacji. Taki układ umożliwił dokładne i zrozumiałe przedstawienie bardzo dużej ilości danych wynikowych.

Doktorantka stwierdziła, że stosowanie nawożenia mineralnego i obornikiem wpłynęło korzystnie na zdrowotność korzeni kukurydzy i pszenicy, jednak rośliny te były w silniejszym stopniu porażane przez patogeny aparatu asymilacyjnego oraz patogeny powodujące choroby podsuszkowe. Z gleby spod uprawy kukurydzy i buraka po zastosowaniu nawożenia mineralnego i organicznego uzyskano większą ogólną liczbę kolonii bakterii, oraz większą liczbę kolonii bakterii rodzaju *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*, nie miało natomiast wpływu na liczebność bakterii *Azotobacter*. Wysokie dawki nawożenia azotem wpływały niekorzystnie na liczebność kolonii bakterii uzyskanych z gleby spod uprawy pszenicy, a brak nawożenia mineralnego spowodował wzrost ich liczebności, natomiast w przypadku buraka – spadek liczebności *Azotobacter*, *Pseudomonas* i *Streptomyces*.

Autorka analizując zbiorowiska grzybów zasiedlających różne środowiska wyodrębniła wśród nich grzyby o silnym potencjale patogenicznym, o słabym potencjale patogenicznym, o uzdolnieniach antagonistycznych oraz inne saprotrofy. Z gleby nawożonej nawozami mineralnymi i obornikiem uzyskała więcej izolatów grzybów. System ten sprzyjał także występowaniu grzybów o uzdolnieniach patogenicznych wobec analizowanych roślin. Większą liczbę grzybów wyodrębniono z ryzosfery kukurydzy i buraka oraz ryzoplany kukurydzy i pszenicy nawożonych tylko nawozami mineralnymi. Z korzeni kukurydzy i pszenicy więcej uzyskano grzybów z kombinacji z nawożeniem mineralnym i obornikiem.

Z gleby spod wszystkich trzech upraw oraz ich systemu korzeniowego Doktorantka często izolowała grzyby rodzaju *Fusarium*. Na podstawie analiz ITS zdiagnozowała 10 gatunków *Fusarium*, a najliczniej reprezentowaną grupę stanowiły izolaty *F. oxysporum*. Każda z 4 wyodrębnionych grup polimorficznych charakteryzowała się umiarkowanym polimorfizmem genetycznym. Na podstawie analiz molekularnych stwierdziła, iż na każdej z analizowanych części rośliny przeważa inny gatunek lub grupa genetyczna *Fusarium* spp.

Analizy mykologiczne i bakterologiczne są tym cenniejsze, że zostały poparte obliczeniami statystycznymi, co dowodzi o dobrym warsztacie badawczym Doktorantki. Umożliwiło to jej wyciągnąć prawidłowe wnioski z badań, w tym określić wpływ różnych systemów nawożenia na skład zbiorowisk grzybów i bakterii.

Pewne trudności w interpretacji wyników badań spowodowało podawanie przez Autorkę różnych określeń dla tych samych kombinacji. W opisie wyników raz podaje np. N₁P₁K₁, raz 40/80/30, a innym razem podaje numer kombinacji („kombinacja numer dwa”),

bądź też symbol lub numer kombinacji i jej opis. Nie było potrzeby za każdym razem tłumaczyć w tekście co oznacza np. kombinacja druga, wystarczyło to zrobić na początku.

W „Dyskusja wyników”, liczącej 11 stron, Autorka wyniki własne umiejętnie konfrontuje z rezultatami badań innych autorów, zawartych w przytoczonych pozycjach piśmiennictwa. Z rozdziału tego wynika, iż posiada ona szerokie rozeznanie w literaturze naukowej, a jednocześnie umiejętność krytycznego podejścia do uzyskanych rezultatów własnych badań.

Osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych oryginalnych badań podsumowane zostały osiemnastoma wnioskami, które wypływają bezpośrednio z dyskusji i są trafnie osadzone w wynikach badań. Wnioski te są poprawnie sformułowane, warto jednak zastanowić się nad ograniczeniem ich liczby, między innymi poprzez połączenie niektórych z nich, lub wykorzystanie w „Dyskusji wyników”, jako podsumowanie z przeprowadzonych badań.

Cytowana przez Doktorantkę literatura stanowi 285 pozycji, w tym 93 anglojęzycznych i 4 niemieckojęzycznych, związanych tematycznie z rozprawą. Dobór literatury jest właściwy, zawierający dobrze wyselekcjonowane pozycje, odzwierciedlające aktualny stan wiedzy dotyczący problematyki podjętej w pracy.

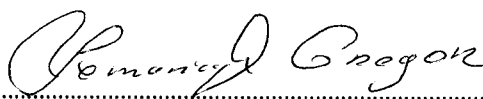
Oceniając pracę stwierdzam, że jest spójna, dobrze zredagowana, napisana przejrzysto, niebudząca zastrzeżeń pod względem stylistycznym i językowym. Pomimo niewątpliwych walorów jakie praca ta posiada, jej lektura skłania do kilku uwag i sugestii:

- W „Spisie treści” rozdział 6.1. zatytułowany jest jako „Prace polowe”, natomiast w tekście na str. 44 jest podane „Badania polowe”. Ponadto w „Spisie treści” znajduje się informacja, iż rozdział „Streszczenie” znajduje się na stronie 200 natomiast „Summary” na stronie 202, a w rzeczywistości znajdują się one odpowiednio na stronach 199 i 201.
- Przy podawaniu łacińskich nazw rodzajów/gatunków stosujemy kursywę, a przy ponownym podawaniu nazwy gatunkowej grzybów lub bakterii stosujemy ich skrócone nazwy. Zasady pisowni Doktorantce znane, choć nie zawsze stosowane,
- Zbędne jest ciągle podawanie synonimów obok aktualnych nazw gatunkowych grzybów,
- Niekiedy stosowanie w pracy indeksu górnego jest niezrozumiałe, np. „Po ochłodzeniu płynu dodawano w sterylnych warunkach 10 g⁻¹ badanej gleby ...”,
- Na początku omawiania wyników badań należy wyraźnie zaznaczyć, iż podawane wartości wyrażone są w postaci indeksu chorobowego,
- Nie można zamiennie stosować pojęć „obiekt” i „poletko”,
- Zamiast określenia „grzyby silnie patogeniczne” lepiej użyć stwierdzenia „grzyby bardzo wirulentne/zjadliwe”,
- Gdy pada stwierdzenie „gatunki rodzaju ...” to nie podajemy nazw gatunków grzybów a tylko ich rodzaj (str. 23, w. 10),

- Należy unikać stwierdzenia, iż porażenie roślin powodują choroby, gdyż dokonują tego patogeny (str. 24, w. 1; str. 28, w. 3; str. 29, w. 18 i 21; str. 81, w. 22). Niefortunnym jest również stwierdzenie „Długotrwała susza powoduje porażenie kukurydzy przez liczne fitofagi” (str. 77, w. 8),
- W „Wynikach badań”, nie ma potrzeby ciągłego podawania opisowych nazw faz rozwojowych, w których wykonywano obserwacje i faz wg skali BBCH. Moim zdaniem wystarczy podać fazę wg skali BBCH, jako precyzyjniejszej,
- W tabelach i wykresach zalecane jest podawanie wartości NIR z większą dokładnością niż wartości analizowanych danych wynikowych, tj. z dokładnością większą o jedną cyfrę znaczącą,

Powyżej wymienione drobne błędy, często edytorskie, nie umniejszają wartości ocenianej pracy. Wskazanie kilku, niekiedy dyskusyjnych uwag lub sugestii, mogących być uwzględnionych przy redagowaniu pracy do opublikowania, nie kwestionuje niewątpliwych wartości jakie wnosi rozprawa do nauki. Należy wyraźnie stwierdzić, że rozprawa doktorska ma charakter pełnego opracowania, zawiera wiele cennych i nowych dla nauki wyników, mających dużą wartość poznawczą, a także praktyczną.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Kacprzak-Siuda spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595) oraz Rozporządzenia Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dnia 15 stycznia 2004 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2004 r., nr 15, poz. 128 z późn. zmianami). **Wobec czego, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie pani mgr inż. Karoliny Anny Kacprzak-Siuda do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Uważam, iż treść pracy kwalifikuje Kandydatkę do ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych w zakresie dyscypliny naukowej agronomii.**



dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. UTP