

Prof. dr hab. Natasza Borodynko-Filas
Instytut Ochrony Roślin-PIB
Klinika Chorób Roślin i Bank Patogenów
Ul. W. Węgorza 20
60-318 Poznań

Poznań, 20.11.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Karola Kotlarza pt.: „Struktura mikroorganizmów strefy korzeniowej oraz zdrowotność wybranych roślin uprawnych w zależności od nawożenia azotem”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana i napisana na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, w Katedrze Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Kurowskiego. Jest to opracowanie liczące 142 strony, w tym 19 tabel i 2 rysunki.

Rozprawa została podzielona na następujące rozdziały: Wstęp, Cel, zakres pracy i hipotezy badawcze, Przegląd literatury, Materiał i metody badań, Przebieg pogody, Wyniki badań, Dyskusja wyników oraz Wnioski i Piśmiennictwo. Dodatkowo wyodrębniono trzy nienumerowane rozdziały: Załączniki oraz Streszczenia w języku polskim i angielskim (Summary). W większości rozdziałów wydzielono liczne i trafne pod względem merytorycznym, podrozdziały, a przedstawiony układ pracy nie odbiega od ogólnie przyjętego dla tego typu prac doktorskich.

Plonowanie roślin jest uzależnione od gleby (jej żyzności) i zawartych w niej składników pokarmowych. Mówiąc o żyzności gleby myślimy o zawartych w niej składnikach mineralnych, takich jak: azot, fosfor czy potas, o materii organicznej, a także, a może przede wszystkim – o mikroorganizmach glebowych, które są odpowiedzialne za obieg materii organicznej, napowietrzenie i poprawę struktury gleby. Gleba, mikroorganizmy i rośliny są od siebie zależne, a brak któregoś z ogniw wpływa negatywnie na pozostałe. Organizmy które znajdujemy w podłożu, to bakterie, grzyby, glony czy pierwotniaki, ale także nicienie, owady, dżdżownice czy gryzonie. Najwięcej mikroorganizmów, których dotyczy niniejsza praca, występuje w warstwie ornej oraz wokół korzeni roślin, czyli w ryzosferze. W ostatnich latach coraz częściej mówi się o zaburzeniach równowagi biologicznej z powodu niewłaściwie stosowanej chemizacji. Stosowanie na szeroką skalę monokultur, nawozów sztucznych

i środków ochrony roślin może prowadzić do wyjąłwienia gleby, co oznacza również brak organizmów odpowiadających za krążenie materii organicznej i pierwiastków w glebie. Dlatego, za niezwykle ważne uważam podjęcie badań nad wpływem nawożenia azotem, w różnej formie, na występowanie mikroorganizmów zarówno w glebie, jak i korzeniach czy liściach wybranych roślin.

Po wstępie przedstawiającym po pierwsze znaczenie mikroorganizmów w glebie oraz czynników wpływających na ich liczebność oraz, po drugie charakterystykę wybranych roślin uprawnych, a także nawozów azotowych, Autor przedstawia cel badań oraz hipotezy badawcze. Celem badań było m.in. porównanie wpływu stosowanych nawozów na liczebność oraz skład gatunkowy grzybów patogenicznych i saprofitycznych zasiedlających strefę korzeniową wybranych roślin uprawnych. Przedstawione hipotezy stanowią, że: (1) nawożenie roślin uprawnych roztworem saletrzano-mocznikowym wpływa na wzrost różnorodności i liczebności mikroorganizmów w porównaniu z nawożeniem saletrą i mocznikiem w formie stałej; (2) nawożenie roztworem saletrzano-mocznikowym wpływa korzystniej na zdrowotność testowanych roślin w porównaniu z nawożonymi saletrą i mocznikiem w formie stałej; (3) brak nawożenia azotem wpływa niekorzystnie na liczebność mikroorganizmów w strefie korzeniowej badanych roślin w porównaniu z roślinami nawożonymi azotem; (4) brak nawożenia azotem zmniejsza nasilenie chorób testowanych roślin w porównaniu z roślinami nawożonymi azotem.

Kolejnym stosunkowo obszernym rozdziałem liczącym 17 stron jest Przegląd literatury, który słusznie został podzielony na 6 kolejnych podrozdziałów. W kolejnych rozdziałach Autor, na podstawie dostępnej literatury, scharakteryzował glebę i ryzosferę jako środowisko życia mikroorganizmów, a następnie mikroorganizmy glebowe i strefy przykorzennej oraz wpływ nawożenia mineralnego na mikroorganizmy, ze szczególnym uwzględnieniem nawożenia azotem. Moim zdaniem wydzielenie punktu dotyczącego nawożenia azotem (3.3.1), podobnie jak w dalszej części - p. 3.6.1. nie było konieczne. W kolejnych podrozdziałach mgr inż. Karol Kotlarz scharakteryzował: najważniejsze patogeny roślin, którymi zajął się w swojej pracy, wpływ nawożenia azotem na zdrowotność roślin uprawnych oraz opisał formy nawozów azotowych stosowanych w rolnictwie. Doktorant w rozdziale 'Przegląd literatury', jak i w Dyskusji powołuje się na 285 pozycji literaturowych i to zarówno starszych, jak i tych najnowszych oraz odwołuje się do 5 stron internetowych. Duża część publikacji (ponad połowa) jest anglojęzyczna, można więc uznać, że zebrano całe najważniejsze krajowe i światowe piśmiennictwo związane z tematyką badań.

Z obowiązku recenzenta chciałam zaznaczyć, że w rozdziale Piśmiennictwo nie zawsze została dochowana właściwa kolejność cytowań. W przypadku prac wykonywanych przez jednego autora, a także w zespole, najpierw podaje się prace autorskie, następnie z innym autorem, a potem kolejno z dwoma, trzema itd. Należy również zwracać uwagę na rok wydania. Te nieścisłości występują np. w pozycjach: 108 – 115, czy 125 – 130. W tym miejscu warto też zwrócić uwagę na fakt, że czasopismo Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin, od roku 214 nosi nazwę – Progress in Plant Protection, np. pozycja 150.

Na stronie 12 znajduje się, moim zdaniem, dość niefortunne zdanie: „Na roślinach grzyby powodują szereg objawów, wśród których znajdują się: rdze, zgnilizny, mączniaki...”. Proszę o ustosunkowanie się.

Doświadczenie polowe założone zostało we współpracy z Instytutem Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Jak wynika z tabel z wynikami, dla różnych roślin w różnych latach. Do badań wytypowano po jednej odmianie pszenicy ozimej, rzepaku oraz kukurydzy. Jak podkreśla sam Doktorant, wybrana odmiana pszenicy należy do odpornych na mączniaka, choroby podstawy źdźbła oraz fuzariozę kłosów. Pozostaje więc do wyjaśnienia, być może w dalszych badaniach, jaki wpływ miałyby forma zastosowanego azotu w przypadku wyboru innej odmiany, podatnej na choroby. To samo dotyczy pozostałych analizowanych upraw rolniczych. Doświadczenia zostały założone, w wariantach: (1) kontrola bez nawożenia azotem, (2) nawożenie saletrą amonową i mocznikiem oraz (3) nawożenie roztworem saletrzano-mocznikowym. Z poszczególnych kombinacji, dla każdego gatunku rośliny pobrano próbki w celu określenia występowania patogenów na korzeniach, podstawie źdźbła, liściach, kłosach czy kolbach. Przeprowadzono również doświadczenia laboratoryjne, w trakcie których izolowano bakterie i grzyby. Metody badawcze zostały dobrane w sposób niebudzący wątpliwości i pozwalający na uzyskanie wyników, które dadzą odpowiedź na postawione w pracy cele czy pytania. Dodatkowo, całość uzyskanych wyników została opracowana statystycznie. Ostatnie doświadczenie opisane w metodyce dotyczy określenia występowania toksynotwórczych grzybów z rodzaju *Fusarium* z zastosowaniem reakcji qPCR. W tym miejscu trzeba wskazać, że nie zostało wyjaśnione w jakim celu podjęto tego typu badania, które odbiegają od poprzedniej fitopatologicznej części. Ponadto, Doktorant w przeglądzie literatury nie zawarł żadnych informacji na temat wytwarzania mykotoksyn przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (poza jednym zdaniem na stronie 21), chociaż bibliografia na ten temat jest bardzo bogata. Wiadomo, że jest to patogen będący obiektem zainteresowań wielu naukowców i prac badawczych prowadzonych w licznych ośrodkach krajowych i zagranicznych, na co wskazują chociażby doniesienia prof. Łukasza Stępnia z Instytutu

Genetyki Roślin PAN. Badania nad występowaniem mykotoksyn są obecnie bardzo szeroko prowadzone także ze względu na rosnącą świadomość społeczeństwa dotyczącą bezpieczeństwa żywności.

Z drugiej strony – o badaniach nad występowaniem toksynotwórczych grzybów z rodzaju *Fusarium* i ich znaczeniu nie ma żadnej wzmianki w celu badań, a tym bardziej w hipotezach badawczych. Równocześnie jeszcze raz chcę podkreślić, że zastosowane metody wskazują na szeroki, dobrze „rozbudowany” warsztat badawczy doktoranta, a przeprowadzone doświadczenia molekularne znacząco go poszerzają. Doktorant jest dobrze przygotowany do pracy naukowej. Ostatni etap badań molekularnych bardzo ogólnikowo przedstawia klonowanie produktów PCR do wektora (moim zdaniem trochę niefortunnie nazwane „wbudowywaniem amplikonów”), chociaż wcześniej poszczególne techniki badawcze przedstawiano bardzo szczegółowo. W przypadku tej nowoczesnej techniki można było znacznie szerzej opisać jej zastosowanie.

Właściwe zaplanowanie i staranne przeprowadzenie czasochłonnych doświadczeń zaowocowało uzyskaniem ważnych i bardzo licznych wyników, które mają szansę znaleźć zastosowanie w praktyce rolniczej. Wyniki badań, podobnie jak przegląd literatury zostały podzielone na dwa rozdziały oraz podrozdziały, oraz bardzo szczegółowo opracowane i zapisane w kilkunastu tabelach. Biorąc pod uwagę fakt, że były to zarówno badania polowe, jak i oznaczenia laboratoryjne, należy podkreślić, że były one szerokie oraz bardzo czasochłonne. I tak np. z gleby spod uprawy pszenicy wyizolowano 334 izolaty grzybów, w tym: 130 w roku 2015, 48 w 2017 i 156 w 2018. Spod upraw rzepaku ozimego Doktorant wyizolował i oznaczył 186 izolatów, w tych samych latach co wyżej i odpowiednio w liczbie: 129, 36 i 21. Najwięcej izolatów zostało pozyskanych z gleby spod kukurydzy, bo aż 632, przy czym są to wyniki z 4 lat badań (2015-2018), a liczba izolatów wynosi odpowiednio: 143, 164, 84 i 241. Daje to ponad 1100 izolacji i oznaczeń, zwykle do gatunku, izolatów grzybów pochodzących z gleby. Znacznie więcej izolatów uzyskano z ryzosfery: 554 dla pszenicy ozimej, 989 dla rzepaku ozimego, i aż 3487 dla kukurydzy. Ze wszystkich upraw, zarówno z gleby, jak i z ryzosfery wyizolowano również bakterie: z rodzaju *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* oraz promieniowce i bakterie PSB – zdolne do rozpuszczania fosforanów.

Za bardzo duże osiągnięcia naukowe i aplikacyjne uważam:

- (1) wykazanie wpływu zastosowanej formy nawożenia na występowanie chorób powodowanych przez grzyby na korzeniach, źdźbłach, kłosach, liściach czy kolbach

- (2) wykazanie korzystnego oddziaływania roztworu saletrzano-mocznikowego na zdrowotność korzeni kukurydzy
- (3) oznaczenie grzybów wyizolowanych z gleby, ryzosfery oraz ryzoplany
- (4) oznaczenie bakterii wyizolowanych z gleby i ryzosfery.

Wysoko oceniam rozdział „Dyskusja wyników” obejmujący 17 stron tekstu. Zwięzła dyskusja wyników w odniesieniu do dobrze dobranej literatury naukowej, przeprowadzona jest we właściwy sposób. Doktorant konfrontując wyniki badań własnych z opracowaniami innych autorów zajmujących się zblizoną tematyką wykazał dużą wartość swojej pracy. Jednocześnie sposób poprowadzenia dyskusji świadczy o umiejętności analitycznego interpretowania uzyskanych wyników, co jest niezbędne w pracy pracownika naukowego.

Najważniejsze osiągnięcia z przeprowadzonych badań Autor podsumował formułując 15 wniosków.

Wśród wniosków, moim zdaniem, brakuje wniosku podsumowującego całość badań, a mianowicie wskazania, która z badanych form nawozów jest przyczyną częstszych infekcji roślin, bądź znacznej poprawy kondycji roślin. Która z zastosowanych form korzystniej wpływa na rozwój roślin, bądź jest przyczyną silniejszych porażeń? Czy dotychczas rzadziej stosowany roztwór saletrzano-mocznikowy powinien być zalecany w uprawach testowanych w trakcie badań lub czy ma szansę na większe zastosowanie w przyszłości? Ponieważ nie wiem, czy takiego wniosku nie dało się sformułować, czy może doktorantowi zabrakło odwagi, żeby go przedstawić, proszę o ustosunkowanie się do tego problemu.

Niefortunne wydaje się być wyrażenie: nawożenie jest operacją agrotechniczną – zdecydowanie lepiej brzmi zabieg agrotechniczny.

Ostatnia moja uwaga nie ma zupełnie znaczenia jeśli bierzemy pod uwagę jej merytoryczną wartość, a dotyczy opracowania graficznego rozprawy. Praca nie ma żadnych zdjęć, a myślę, że kilka fotografii przedstawiających wybrane, główne choroby opisywanych roślin by ją wzbogaciło od strony graficznej. Aczkolwiek jest to wyłącznie moja opinia, pozostająca bez wpływu na ocenę całości dysertacji.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca została zaplanowana, wykonana i opisana w sposób właściwy dla tego typu rozpraw, a uwagi zawarte w recenzji mają charakter redakcyjny, mogą zostać wykorzystane w trakcie przygotowywania materiałów do publikacji i nie mają wpływu na pozytywną ocenę merytoryczną pracy. Jednocześnie uważam, że oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Ma ona z jednej strony duże znaczenie poznawcze, a z drugiej – wnosi wiele nowego do praktyki rolniczej.

Złw

Reasumując potwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Karola Kotlarza pt. „Struktura mikroorganizmów strefy korzeniowej oraz zdrowotność wybranych roślin uprawnych w zależności od nawożenia azotem” pod względem formalnym, metodycznym i merytorycznym spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 z późn. zm). W oparciu o powyższą opinię wnioskuję do Rady Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr. inż. Karola Kotlarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Natana Zaidyulis-Filas