

Dr hab. Izabela Kałucka
Katedra Algologii i Mykologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Hanny Jolanty Szmidli

pt. „Wpływ rośliny-gospodarza i warunków glebowych na zbiorowiska ektomykoryz w plantacjach trufli letniej (*Tuber aestivum* Vittad.)”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Doroty Hilszczańskiej
w Instytucie Badawczym Leśnictwa w Sękocinie Starym

Rozprawa doktorska Pani mgr Hanny J. Szmidli dotyczy biotycznych i abiotycznych uwarunkowań półnatralnej hodowli trufli letniej *Tuber aestivum* Vittad. Autorka przeprowadziła 3-letnie badania w trzech eksperymentalnych plantacjach tego gatunku położonych na terenie Polski, w nadleśnictwach Chełm, Olkusz i Pińczów. Analizie poddany został skład i struktura zbiorowisk grzybów ektomykoryzowych (EM) oraz innych grzybów ryzosferowych występujących w obrębie systemów korzeniowych dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i leszczyny pospolitej (*Corylus avellana* L.) inokulowanych zarodnikami *T. aestivum*. Autorka podjęła próbę określenia wpływu gatunku rośliny-gospodarza oraz wybranych warunków glebowych na trwałość sztucznie indukowanych mykoryz trufli. Zdolność utrzymywania się tej symbiozy na korzeniach w warunkach konkurencji ze strony grzybów autochtonicznych jest bowiem kluczowym warunkiem powodzenia uprawy – uzyskiwania plonów w postaci owocników *T. aestivum*. Autorka wykazała istnienie szeregu istotnych różnic jakościowych i ilościowych między zbiorowiskami grzybów EM dębu i leszczyny, w tym również w udziale mykoryz trufli letniej. Wykazała także pozytywną korelację między udziałem tych mykoryz a niektórymi parametrami glebowymi. Otrzymane przez Autorkę wyniki znacząco wzbogacają wiedzę o wymaganiach ekologicznych *T. aestivum* w warunkach uprawy w Polsce oraz o wrażliwości tego gatunku na różne czynniki środowiskowe. Z tego względu mają duże znaczenie praktyczne i mogą się przysłużyć rozwojowi plantacji truflowych w naszym kraju i ich efektywności.

OCENA POPRAWNOŚCI STRUKTURY PRACY

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji została przygotowana w języku polskim i ma typową strukturę właściwą dla tego typu opracowań. Zasadnicza część pracy zawiera 9

rozdziałów: *Wstęp* liczący 24 strony, *Cel, zakres pracy i hipotezy badawcze*, *Material i metody* (16 stron), *Wyniki* (27 stron), *Dyskusję* (17 stron), *Wnioski, Literaturę* (292 pozycje), wykaz używanych w pracy skrótów oraz *Załączniki* (załączniki numerowane, 1-7). Poprzedza je *Streszczenie* (ze słowami kluczowymi, po polsku i po angielsku) i *Spis treści*. Praca jest ilustrowana 34 rycinami (20 w tekście, 14 w załącznikach) oraz zawiera 17 tabel (15 w tekście, 2 w załącznikach). Ze względu na ich dużą liczbę brakuje w pracy oddzielnego Wykazu rycin i tabel. Niezbyt wygodny jest nieciągły system ich numeracji przyjęty przez Autorkę, uzależniony od numeru podrozdziału. Powoduje to na przykład, że w podrozdziale 4.1 jest Tabela 4.3, a w podrozdziale 4.3 – Tabela 4.11. Podobnie z rycinami. Ryciny i tabele w Załącznikach mają numerację oddzielną, rozpoczynającą się od numeru Załącznika. To powoduje, że istnieją w pracy różne ryciny i tabele o tych samych numerach, np. Rycina 1.2 we Wprowadzeniu i w Załączniku 1, Tabela 5.1 w Dyskusji i w Załączniku 5. Numeracja stron w końcowej części pracy jest nieuporządkowana – jest ciągła do strony 121 (wykaz Załączników). Załącznik 1, 2 i 3 mają strony nienumerowane, po czym Załącznik 4 i 5 mają strony numerowane od 129 do 143. Załączniki 6 i 7 ponownie mają strony nienumerowane.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Wstęp pracy stanowi cenne i niezwykle wyczerpujące opracowanie, w którym Autorka omówiła zagadnienia konieczne do zrozumienia postawionych przez siebie hipotez i celów rozprawy. Umiejętnie przedstawiła współczesne poglądy na biologię i ekologię trufli letniej z jednej strony na tle badań nad zbiorowiskami grzybów EM, z drugiej – w aspekcie jej wartości kulinarnej i ekonomicznej. Autorka opisała następnie funkcjonowanie plantacji *T. aestivum*, od historii uprawy tego gatunku w Europie i w Polsce, po szczegółowy opis czynników wpływających na jego plonowanie. Przedstawiła również bardzo obszerny przegląd wiedzy na temat interakcji grzybów EM z roślinami-gospodarzami oraz środowiskiem glebowym, zgrabnie nawiązując w tym zakresie do badań nad rodzajem *Tuber* na siedliskach naturalnych i w uprawie. Drobiazgowo podejście do znanych z literatury wyników badań innych autorów umożliwiło jasne sprecyzowanie istniejących pytań a także klarowne oddzielenie wkładu do wiedzy samej Autorki rozprawy.

W rozdziale drugim **Cel, zakres pracy i hipotezy badawcze** Autorka przedstawiła jasno sformułowane cele pracy i cztery hipotezy badawcze oraz określiła zakres przeprowadzonych analiz. Jako cel zasadniczy Autorka podała poznanie zbiorowisk grzybów EM na badanych plantacjach, a jako „cele dodatkowe” – poznanie wpływu gatunku rośliny-gospodarza oraz warunków glebowych na trwałość mikoryz trufli letniej. Tymczasem tytuł rozprawy sugeruje, że wynik realizacji tychże „celów dodatkowych” jest jej głównym tematem – brakuje konsekwencji między tytułem a głównym celem pracy. Sprecyzowanie hipotez badawczych dobrze świadczy o zrozumieniu przez Autorkę zasad naukowego podejścia do prowadzonych badań. Wątpliwości budzi jednak użyte przez Autorkę w hipotezie czwartej sformułowanie, że

„obniżona wilgotność i temperatura podłoża [...] ma niekorzystny wpływ na strukturę zbiorowiska grzybów ektomykoryzowych”. Autorka nie wyjaśniła, co konkretnie rozumie przez *niekorzystny wpływ*.

Materiał i metody zostały opisane przez Autorkę w 4 podrozdziałach, z których pierwszy zawiera opis powierzchni badawczych, drugi odnosi się do jakościowych i ilościowych badań zbiorowisk grzybów EM, trzeci do analizy metagenomicznej grzybów związanych z korzeniami badanych drzew i czwarty do zastosowanych w pracy metod statystycznych. Niezbyt uzasadnione wydaje się włączenie opisu metod badań glebowych do podrozdziału o metodach badania zbiorowisk grzybów EM – powinny one być opisane oddzielnie, tym bardziej, że analizy glebowe zostały również wydzielone w opisie zakresu badań.

Materiał i metody badań zostały opisane w większości w sposób przejrzysty, zrozumiały i spójny. Pewne zamieszanie powoduje brak zdefiniowania niektórych pojęć, które pojawiają się dalej również w Wynikach i Dyskusji. Pierwszym przykładem, gdzie niedoprecyzowanie i nie zawsze konsekwentne stosowanie terminów sprawia, że powstaje miejscami wrażenie żargonowości, są określenia korzeni – *korzenie wyższego rzędu* (określone na podstawie rzędowości? Średnicy?), *korzenie drobne*, *frakcje korzeni drobnych* (można się tylko domyślać, że chodzi o korzenie autotroficzne, mykoryzowe żywe i mykoryzowe martwe), *korzenie mykoryzowe*, *mykoryzy*, *wierzchołki mykoryzowe*. Drugim przykładem nieprecyzyjnego języka jest użycie słowa *losowy* w odniesieniu do metod badania korzeni ektomykoryzowych („Z każdej próby wybierano losowo korzenie...”, „korzenie losowo układano na papierze milimetrowym...”), gdzie chodziło raczej o korzenie przypadkowe, wybrane arbitralnie, a nie z zastosowaniem liczb losowych. Przykładem zastosowania niewłaściwej czy nieprecyzyjnej terminologii są też *grupy ekologiczne*. Grupy ekologiczne grzybów tradycyjnie wyróżnia się ze względu na substrat – mowa o grzybach naziemnych, naściólkowych, nadrewnowych, koprofilnych, karbofilnych, glebowych, itp. W Załączniku 5, będącym wykazem OTU grzybów zasiedlających korzenie badanych drzew, w kolumnie *Grupa ekologiczna* Autorka niepoprawnie wskazuje w większości grupy troficzne – grzyby EM, arbuskularne, erikoidalne, saprotroficzne, patogeniczne, endofity i inne (w tym dermatofity, grzyby zlichenizowane, entomopatogeniczne). W podobnie niepoprawny sposób Autorka rozumie względną obfitość *grup ekologicznych* grzybów w opisie metod statystycznych (str. 52). Dopiero w Dyskusji na stronie 88 Autorka słusznie nazwała grzyby mykoryzowe, saprotroficzne, patogeniczne i endofityczne grupami troficznymi, a nie ekologicznymi. Warto jeszcze zwrócić uwagę, że należało tu zamiast o grzybach patogenicznych mówić o grzybach pasożytniczych – nie są to bowiem pojęcia tożsame.

Wyniki badań zostały przedstawione jasno, rzeczowo i stosunkowo szczegółowo. Liczne, odpowiednio dobrane ryciny i tabele uzupełniają analizowane dane i dobrze ilustrują wyniki badań. Wiele parametrów i zależności opisujących strukturę badanych zbiorowisk grzybów Autorka zweryfikowała odpowiednimi analizami statystycznymi. Niezbyt fortunate jest natomiast zatytułowanie podrozdziałów poświęconych wynikom słowem *Analiza* – zamiast

sformułowania „Jakościowa i ilościowa analiza zbiorowisk grzybów...” lepsze byłoby „Struktura jakościowa i ilościowa zbiorowisk grzybów...”, podobnie zamiast „Analiza wpływu rośliny-gospodarza na zbiorowiska grzybów...” – „Wpływ rośliny-gospodarza na zbiorowiska grzybów...”, zamiast „Analiza wpływu warunków glebowych na stan mykoryz...” – Wpływ warunków glebowych na liczebność mykoryz...” (liczebność, a nie stan czy obecność), itd. Zastosowany przez Autorkę podział wyników badań między poszczególne podrozdziały nie jest najszcześniejszy, powoduje wrażenie nieuporządkowania. Byłoby może lepiej, gdyby struktura Wyników była podobna do struktury Dyskusji, a kwestie wpływu rośliny-gospodarza i warunków glebowych na zbiorowiska EM, *T. aestivum* i zbiorowiska związane z korzeniami dębu i leszczyny zostały wyłączone z podrozdziałów dotyczących struktury zbiorowisk grzybów.

W części pracy poświęconej wynikom badań znalazły się pewne nieścisłości związane z brakiem konsekwencji w stosowaniu terminów *gatunek – takson*. Autorka przyjmuje na przykład, że całkowite bogactwo gatunkowe wyraża się liczbą *gatunków* grzybów EM (str. 57), po czym pisze o liczbie *taksonów*, wliczając w to *taksomy* niezidentyfikowane (NN). Co Autorka rozumie przez zdanie „Średnie bogactwo gatunkowe na powierzchniach [...] wynosiło odpowiednio 2,99 i 3,33 GEM *zidentyfikowanych do poziomu taksonu* w próbie”?

Do analizy składu gatunkowego zbiorowisk grzybów EM na korzeniach drzew w badanych plantacjach Autorka zastosowała metody identyfikacji molekularnej na podstawie regionu ITS, wykorzystując jako materiał podzielone na morfotypy wierzchołki mykoryzowe. Są to metody dobrze sprawdzone i zalecane w tzw. barkodingu grzybów. Jako wartość graniczną zróżnicowania wewnątrzgatunkowego sekwencji regionu ITS przyjmuje się obecnie najczęściej 1,5%; w przypadku niektórych rodzajów, np. *Cortinarius*, już różnica 5 par zasad może oznaczać różne gatunki. Dlatego może trochę dziwić określenie przez Autorkę przynależności morfotypu do gatunku *Laccaria amethystina* przy podobieństwie sekwencji na poziomie 96%, do rodzaju *Hymenogaster* przy podobieństwie na poziomie 92% i do rodzaju *Hypholoma* przy podobieństwie 95%. Szczególnie w ostatnim przypadku identyfikacja jest wątpliwa ze względu na to, że rodzaj *Hypholoma* i całą rodzinę *Strophariaceae* uważa się za należące do grzybów saprotroficznych.

Obok badań zbiorowisk grzybów EM na podstawie wyróżnionych morfotypów Autorka przeprowadziła również bardzo interesujące badania metagenomiczne zbiorowisk wszystkich grzybów związanych z korzeniami dębu i leszczyny w najstarszej z trzech badanych plantacji trufli, w oparciu o metodę sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Są to prawdopodobnie pierwsze, pionierskie badania tego typu przeprowadzone w plantacjach trufli letniej. W ich wyniku Autorka wykazała obecność 134 operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU), z których 71 (53%) udało się zidentyfikować na poziomie gatunku, w tym ponad połowę stanowiły grzyby EM. W przeciwieństwie do zbiorowisk grzybów EM wyróżnionych na podstawie badań mykoryz, struktura zbiorowisk grzybów związanych z korzeniami dębu i leszczyny wyróżnionych na podstawie analiz metagenomicznych okazała się być znacznie

mniej zróżnicowana. Byłoby ciekawe porównać wyniki analizy NMDS struktury zbiorowisk grzybów EM z plantacji w Chełmie badanych na podstawie morfotypów mykoryz z wynikami analizy NMDS struktury tych samych zbiorowisk EM ale badanych metodą NGS.

Rozdział **Dyskusja** został podzielony na cztery spójne podrozdziały odnoszące się do wyników odpowiadających kolejnym celom i etapom badań. Dotyczą one kolejno (1) składu i struktury zbiorowisk grzybów EM w badanych plantacjach trufli letniej na podstawie badań morfotypów mykoryz oraz (2) zbiorowisk grzybów zasiedlających korzenie dębu szypułkowego i leszczyny pospolitej wyróżnione na podstawie badań metagenomicznych, a następnie (3) wpływu gatunku rośliny-gospodarza na opisane zbiorowiska oraz (4) wpływu warunków glebowych na zbiorowiska grzybów EM. Taki układ lepiej porządkuje omawiane treści niż układ zastosowany w rozdziale Wyniki. W Dyskusji, która jest zdecydowanie mniej obszerna niż Wstęp, Doktorantka umiejętnie skonfrontowała uzyskane wyniki z ustaleniami innych autorów przedstawionymi w literaturze naukowej. Odwołując się do efektów własnych badań i obserwacji odpowiednio je skomentowała i zinterpretowała, nadając im uniwersalny charakter i włączając do istniejącej wiedzy. Autorka ponownie dała dowód doskonałej orientacji w literaturze przedmiotu, zwłaszcza dotyczącej wymagań ekologicznych i siedliskowych trufli oraz warunków jej uprawy. W Dyskusji Doktorantka nie ustrzegła się jednak kilku niezręcznych sformułowań (jak „identyfikacja grzybów przy użyciu *standardów taksonomicznych*” str. 81) i drobnych błędów (jak użycie słowa *kosmopolityczny* zamiast *ubikwistyczny*, str. 84).

Rozdział **Wnioski** jest w bardzo syntetycznym i chyba nieco zbyt skrótowym podsumowaniem najważniejszych wyników uzyskanych przez Autorkę podczas realizacji pracy doktorskiej. Zostały one sformułowane w postaci pięciu punktów, z których pierwsze cztery odnoszą się bezpośrednio do postawionych na początku pracy hipotez badawczych. Szkoda, że żaden z wniosków nie dotyczy przemyśleń Autorki, choćby praktycznych wskazań dla dalszego rozwijania uprawy trufli w Polsce wynikających z wykonanych badań lub prognoz dla ich przyszłości.

W **Literaturze** wykorzystanej w pracy widnieją łącznie 292 publikacje, przy czym w rozdziale Dyskusja zacytowano 94 z nich. Pojedyncze publikacje są w języku polskim, znakomita większość – po angielsku. Recenzent nie ma zastrzeżeń związanych z doborem cytowanych prac.

OCENA STRONY EDYTORSKIEJ ROZPRAWY

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem polskim, w jasny, klarowny sposób i z dużym wyczuciem naukowego stylu. Nielicznie występują błędy typu literówki, powtórzenia czy niezręczne skróty myślowe, które recenzent zaznaczył w maszynopisie rozprawy.

PODSUMOWANIE RECENZJI

Rozprawa doktorska mgr inż. Hanny Jolanty Szmidli pt. „Wpływ rośliny-gospodarza i warunków glebowych na zbiorowiska ektomykoryz w plantacjach trufli letniej (*Tuber aestivum* Vittad.)” stanowi oryginalne rozwiązanie podjętych problemów naukowych, a uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy o wymaganiach ekologicznych *T. aestivum* w warunkach uprawy w Polsce oraz o wrażliwości tego gatunku na biotyczne i abiotyczne czynniki środowiskowe poza obszarem śródziemnomorskim. Wyniki te są tym cenniejsze, że stanowią kontynuację i rozwinięcie badań prowadzonych wcześniej w tych samych obiektach przez innych badaczy. Z tego względu mają duże znaczenie praktyczne i mogą się przyczynić do rozwoju i wzrostu efektywności plantacji truflowych w naszym kraju. Szeroki zakres zastosowanych metod badawczych i technik statystycznych wykorzystanych do analizy zebranych materiałów i danych świadczą o dojrzałości naukowej Autorki, a przedłożona rozprawa doktorska potwierdza umiejętność prowadzenia przez nią pracy naukowej. Przedstawione przeze mnie uwagi mają w dużej mierze charakter polemiczny i nie umniejszają wartości naukowej rozprawy.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa o dopuszczenie mgr inż. Hanny J. Szmidli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Żabala Katusiewicz

Łódź, 28.10.2020 r.