

dr hab. Tomasz Leski
Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk
ul. Parkowa 5
62-035 Kórnik

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Rosy-Gruszeckiej
pt. „**Wpływ warunków glebowych na występowanie owocników trufli (*Tuber spp.*)
w makroregionie Niecki Nidziańskiej**”

wykonanej w Zakładzie Ochrony Lasu Instytutu Badawczego Leśnictwa
pod kierunkiem dr hab. Doroty Hilszczańskiej

Trufle, które od wieków fascynowały ludzi nie tylko ze względu na ich walory smakowe, należą niewątpliwie do jednych z najbardziej niezwykłych i tajemniczych przedstawicieli świata grzybów. Należy pamiętać, to właśnie dzięki trufiom w świecie nauki pojawił się termin mykoryza. Albert Frank, twórca tego terminu, otrzymał bowiem zlecenie na badania mające na celu zintensyfikowanie produkcji trufli. Pomimo, że z zadania tego się nie wywiązał, to w trakcie prac prowadzonych w ramach zlecenia opisał szczegółowo specyficzne struktury grzybowo-korzeniowe, którym nadał nazwę mykoryza. Współczesne badania nad trufkami, z oczywistych (komercyjnych) względów koncentrują się w zagłębiach truflowych, czyli krajach południowej Europy: Francji, Włoszech, Hiszpanii. Jednak trufle występują również w innych krajach, w tym również w Polsce. Jednak, chyba ze względu na swój ukryty tryb życia w naszym kraju przez wiele lat traktowane były trochę po macoszemu, a badaczy zajmujących się grzybami podziemnymi, można by policzyć na palcach jednej ręki. Niewątpliwie autorytetem w tej dziedzinie i w pewnym sensie pionierką badań nad trufkami występującymi w Polsce jest Pani Profesor Maria Ławrynowicz, autorka jedynego jak do tej pory monograficznego opracowania w tym zakresie. Tym bardziej należy docenić pojawienie się nowej, silnej grupy badawczej, z Panią dr hab. Dorotą Hilszczańską (promotorem ocenianej rozprawy) na czele. Jej badania jak i badania jej zespołu wniosły wiele nowych, cennych informacji i należy żywić nadzieję, że będą nadal kontynuowane.

Przedstawiona do recenzji praca jest opracowaniem zawierającym niemal wszystkie elementy standardowo pojawiające się w klasycznych rozprawach doktorskich. Rozpoczyna się od krótkiego streszczenia w języku polskim i angielskim, po którym następują wstęp, cel, zakres badań i hipotezy badawcze, opis materiału i metod, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury. Wszystkie wymienione części mieszczą się na 102 stronach maszynopisu. W większości rozdziałów wydzielono liczne, trafne z merytorycznego punktu widzenia podrozdziały. Pracę zamykają i uzupełniają załączniki w formie wykresów i tabel, obejmujące łącznie 25 stron. Zasadnicza część pracy zawiera 13 tabel, 31 rycin oraz 32 fotografie. W pracy daje się zauważyć brak typowego przeglądu literatury, który pojawia się w większości rozpraw doktorskich. Jego miejsce zajmuje obszerny wstęp, zawierający

wszystkie niezbędne dane na temat biologii trufli, historii oraz czynników środowiskowych warunkujących występowanie owocników trufli, a w szczególności gatunków objętych badaniami. Cały wstęp jest stosunkowo długi (obejmuje prawie 1/3 całej rozprawy doktorskiej), stanowi jednak swoiste kompendium wiedzy o trufiach. Czytając ta część rozprawy czuje się, że grzyby będące obiektem badań doktorantki stały się dla niej nie tyle sposobem na osiągnięcie kolejnego stopnia naukowego, ale są również jej pasją. Znaczną część wstępu stanowi podrozdział zatytułowany „*Charakterystyka badanych gatunków trufli*”. Rodzi się pytanie, czy wszystkie informacje zawarte w tym podrozdziale powinny być zamieszczone w tym miejscu rozprawy? Czy nie lepiej było wykorzystać je do wzbogacenia dyskusji?. Liczę, że doktorantka odniesie się do tej kwestii w trakcie obrony swojej pracy.

W kolejnym, jednostronicowym rozdziale autorka definiuje główny cel badań: „*określenie wpływu czynników glebowych, a zwłaszcza odczynu gleby i zawartości wapnia, na występowanie owocników trufli*”. Cel główny uzupełniony został przez cel dodatkowy sformułowany następująco: „*określenie wpływu innych niż glebowe czynników środowiskowych (bio- i abiotycznych), które kształtują biotop trufli i mogą oddziaływać na rozwój owocników*”. Cele te realizowane były przez Autorkę konsekwentnie poprzez wykonane badania terenowe i laboratoryjne obejmujące:

- sezonowe poszukiwania owocników trufli i towarzyszących im grzybów podziemnych,
- analizy chemiczne i granulometryczne gleby,
- pomiary wilgotności i temperatury gleby w sezonie wegetacyjnym,
- badania fitosocjologiczne na stanowiskach trufli,
- charakterystykę warunków meteorologicznych.

Rozdział ten kończy się postawieniem trzech hipotez badawczych:

- najważniejszymi parametrami mającymi wpływ na rozwój owocników trufli są zawartość wapnia w glebie i jej odczyn,
- wilgotność podłoża ma wpływ na wielkość plonu trufli,
- różnorodność roślin na stanowiskach trufli ma korzystny wpływ na ich owocnikowanie.

Analiza tej części rozprawy, jak również wynikające z celów otrzymane wyniki rodzą jedno zasadnicze pytanie: dlaczego tytuł rozprawy odnosi się tylko do głównego celu badań? Na szczęście cel ten został w pełni zrealizowany, a wyniki będące rezultatem celu dodatkowego znacznie wzbogaciły badania i w rezultacie całą pracę.

Na kolejny rozdział zatytułowany „*Materiał i metody*” składa się siedem podrozdziałów, w których Autorka przedstawia w zwięzły sposób charakterystykę powierzchni badawczych, założenia metodyczne lokalizacji poletek obserwacyjnych, sposób poszukiwania i identyfikacji trufli, metodykę analiz chemicznych i granulometrycznych gleby, metodykę zbioru szeroko pojętych danych meteorologicznych, sposób analizy roślinności oraz analizy statystyczne. Pewne wątpliwości budzi sformułowanie tytułu podrozdziału piątego: „*Wpływ temperatury i wilgotności na wielkość plonu trufli*”. Użyte określenie „wpływ” nosi znamiona dyskusji, a tymczasem jest to rozdział dotyczący się metodyki badań.

Być może lepiej byłoby sformułować tytuł tego podrozdziału bardziej ogólnie, np. „Zbiór danych meteorologicznych”.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę w trakcie trzech lat badań zaprezentowane zostały na 28 stronach maszynopisu i stanowią niewątpliwie obok dyskusji najcenniejszą część pracy. Nie ukrywam, że mam pewne problemy z oceną formy prezentacji wyników. Ze względu na szereg badanych czynników mających potencjalny wpływ na owocnikowanie trufli, wyniki zaprezentowane zostały w podrozdziałach. Spowodowało to, że dane odnoszące się do występowania trufli oraz liczby wytwarzanych przez nie owocników pojawiają się w różnych miejscach, w odniesieniu do różnych czynników. Zabrakło mi w tym rozdziale krótkiego zbiorczego podsumowania występowania trufli w szerszym ujęciu, a nie tylko w odniesieniu do konkretnego badanego elementu środowiska. Pozwolę sobie jeszcze wrócić do tego zagadnienia w uwagach i pytaniach zawartych w dalszej części recenzji.

Podobny układ ma również przeprowadzona przez doktorantkę obszerna Dyskusja wyników. Jednak w przeciwieństwie do poprzedniego rozdziału, taki układ Dyskusji pozwolił Autorce na precyzyjne skonfrontowanie uzyskanych przez siebie wyników z danymi literaturowymi. Trzeba przyznać, że z tego zadania Autorka rozprawy wywiązała się niemal doskonale. Dobór cytowanej literatury uważam za jak najbardziej słuszny, a nie było to z pewnością łatwe. Literatura przedmiotu badań jest bowiem niezwykle bogata. Dyskutowany jest nie tylko wpływ różnych czynników środowiskowych na występowanie i plonowanie trufli traktowanych jako rodzaj, ale również tam gdzie było to możliwe także w odniesieniu do konkretnych gatunków, których występowanie wykazała Autorka. Dyskusję zamyka podrozdział dotyczący metod badawczych stosowanych do poznania lokalizacji i wymagań środowiskowych trufli. Pomimo, że nie odnosi się on do głównego nurtu badań Autorki, wnosi wiele ciekawych informacji. Trzeba przypomnieć, że do poszukiwań trufli w terenie wykorzystywany był przede wszystkim pies, choć nie była to jedyna stosowana metoda. Jako wskaźniki występowania trufli stosowano m.in. obserwacje muchy *Suillia affinis*.

Eleganckim zakończeniem rozważań Autorki jest zwięzłe podsumowanie i sformułowanie czterech wniosków, z których trzy pierwsze należy uznać za weryfikacje postawionych wcześniej hipotez badawczych. Wynika z nich, że:

- najważniejszymi czynnikami determinującymi rozwój trufli na badanych stanowiskach są wysoka zawartość wapnia oraz odczyn gleby o wartości powyżej 6,8;
- na owocnikowanie trufli na terenie Niecki Nidziańskiej dodatni wpływ mają obfite opady atmosferyczne oraz brak ujemnych temperatur w miesiącach zimowych;
- różnorodność gatunkowa roślin, w tym również różnorodność drzew i krzewów będących partnerami mykoryzowymi trufli, jak również obecność storczykowatych wskazuje na korzystne warunki sprzyjające rozwojowi badanych grzybów.

Przedstawiona do oceny rozprawa wnosi niewątpliwie wiele cennych i nowych informacji na temat biologii różnych gatunków należących do rodzaju *Tuber*. Pomimo, jak już

wspominałem grzyby te stanowią obiekt badań prowadzonych pod różnym kątem przez wielu autorów, to zdecydowanie brakuje prac tak kompleksowych jak wykonane z dużym nakładem sił przez Panią mgr inż. Aleksandrę Rosę-Gruszecką. W trakcie badań na sześciu stanowiskach Autorka stwierdziła występowanie 5 gatunków trufli: letniej, wielkozarodnikowej, wydrążonej, plamistej i rudej. Trzeba przyznać, że szczególne wrażenie robi liczba owocników odnalezionych w trakcie badań: 2184 owocników trufli i 107 należących do 7 innych rodzajów grzybów podziemnych. Wśród trufli pod względem owocnikowania zdecydowanie dominowały dwa gatunki: trufla letnia i trufla wydrążona. Szczególnie cenne są dane dotyczące rzadko badanych gatunków, nie mających znaczenia komercyjnego. Należy również pamiętać, o czym wielokrotnie wspominałem jest w rozprawie, że trufle to nie tylko grzyby o wyjątkowych walorach smakowych, ale także istotny element zbiorowisk grzybów mykoryzowych. Z własnego doświadczenia wiem, że ektomykoryzy tworzone przez trufle występują niemal we wszystkich badanych przez nasz zespół środowiskach, również w szkółkach leśnych. Niestety nigdy nie udało się nam odnaleźć owocników. Wielokrotnie są to miejsca gdzie kwasowość gleby jest o wiele niższa, niż określona przez Autorkę jako optymalna dla rozwoju owocników trufli. Wynika z tego, że grzybnia trufli może występować niemal wszędzie i trwać w formie np. ektomykoryz przez wiele lat, ale zawiązywanie owocników możliwe jest tylko przy wystąpieniu optymalnych warunków glebowych.

W trakcie czytania pracy nasunęły mi się uwagi o charakterze redakcyjnym, które zaznaczyłem w manuskrypcie pracy. Wymienię tu tylko kilka najważniejszych:

- w niektórych fragmentach pracy brak jest konsekwencji w stosowanej terminologii, np. na stronie 11 Autorka pisze o grzybach epi- i hypogeicznych, nadrewnowych, wodnych itd. Będąc konsekwentnym należałoby raczej pisać o grzybach nadziemnych i podziemnych, nadrewnowych,
- podobnie brak jest konsekwencji przy stosowaniu nazw gatunków trufli na rycinach. Najczęściej podawana jest nazwa łacińska, jednak na rycinach 16-18 nieoczekiwanie pojawiają się nazwy polskie.
- w opisie metodyki identyfikacji trufli na podstawie analiz molekularnych znajduje się następujące stwierdzenie: *Analizowany materiał genetyczny (DNA jądrowe) wydzielano ze 100 mg sterylnie odśloniętego hymenium...* DNA się izoluje a nie wydziela.
- powiększenie podane na fotografiach przedstawiających zarodniki z pewnością podane jest błędnie. Szkoda, że na tych fotografiach, jak i na fotografiach owocników nie naniesiona została skala.
- w tabeli 5 zawierającej wyniki identyfikacji molekularnej brakuje numerów sekwencji referencyjnych jak również wartości e-value, czyli stopnia dopasowania.
- na rycinach 16-18 opis osi Y brzmi: Liczba owocników/100m³. Z pewnością nie chodzi tu o metry sześciennie.
- w opisach rycin 32-43 stanowiących załączniki do pracy brak jest wyjaśnienia co oznaczają umieszczone na wykresach strzałki.

Jest jeszcze jedna ważna kwestia, którą należy podnieść oceniając rozprawę Pani mgr inż. Aleksandry Rosy-Gruszeckiej. Jak sama Autorka wspomina w Dyskusji, „na liczbę i wielkość owocników trufli wpływa wiele czynników środowiska...”. Píše również: „Na każdym stanowisku występuje wiele czynników, które tworzą unikatowy biotop i wpływają na siebie nawzajem”. Tymczasem wnioskowanie o istotności wpływu badanych czynników na występowanie i plonowanie trufli oparte zostało o stosunkowo prostą analizę statystyczną, z wykorzystaniem korelacji rang Spearmana. Był to z pewnością słuszny wybór, jednak pozwalający na określenie współzależności owocnikowania trufli i każdej z badanych cech środowiska oddzielnie. Myślę, że przygotowując pracę do druku (a z pewnością jest tego warta) należy poddać uzyskane wyniki głębszej analizie statystycznej. Do analizy wpływu wszystkich czynników glebowych łącznie, można np. zastosować metodę głównych składowych (PCA). Z kolei wykorzystanie jednej z metod analizy kanonicznej pozwoliłoby włączyć równocześnie do analizy szereg różnych badanych czynników środowiskowych. Warto byłoby również wykonać analizę korelacji między parametrami glebowymi a parametrami fitosocjologicznymi.

Na koniec prosiłbym jeszcze o wyjaśnienie jednej kwestii. We wstępie do rozprawy Autorka wspomina o saprotroficznej fazie rozwoju trufli. Rzeczywiście przez szereg lat funkcjonowało przekonanie, że rozwijające się owocniki trufli nie mają symbiotycznego kontaktu z korzeniami drzew i prowadzą saprobiontyczny tryb życia. Niemniej ostatnie badania prowadzone w tym zakresie zdają się modyfikować ten utarty pogląd. Proszę, więc o krótkie omówienie tego zagadnienia w świetle najnowszych prac.

Przytoczone uwagi i pytania, jak również drobne usterki redakcyjne nie podważają wysokiej wartości pracy doktorantki. Przedstawione uwagi dyktowane są przede wszystkim chęcią uzyskania wysokiej jakości przygotowywanych publikacji. Niewątpliwie można stwierdzić, że w osobie Pani mgr inż. Aleksandry Rosy-Gruszeckiej nauka polska zyskuje młodego, utalentowanego, a przede wszystkim pełnego pasji badacza, przygotowanego do prowadzenia samodzielnych badań.

Podsumowując i biorąc pod uwagę wysoką jakość wykonanych badań stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami) i może być podstawą ubiegania się Pani mgr inż. Aleksandry Rosy-Gruszeckiej o stopień naukowy doktora. Przedkładam, zatem Radzie Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa wniosek o przyjęcie rozprawy i wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Kórnik, 24.02.2016 r.

