



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Imię i nazwisko kandydata: Monika Malicka

Tytuł rozprawy doktorskiej: Bioróżnorodność grzybów mikoryzy arbuskularnej i ich wpływ na wzrost roślin w środowisku zanieczyszczonym toksycznymi związkami organicznymi

Promotor: Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

Recenzent: prof. dr hab. Katarzyna Turnau, Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biologii

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska autorstwa mgr Moniki Malickiej stanowi oryginalne opracowanie uzyskanych przez Autorkę wyników dotyczących bioróżnorodności arbuskularnych grzybów mykoryzowych (AGM). Wykonana praca obejmowała zbiór materiałów z dwóch stanowisk, zanieczyszczonego fenolem i PAH oraz terenu kontrolnego, analizę podłoża, ocenę kolonizacji mykoryzowej metodami opartymi o powszechnie używane techniki mikroskopowe oraz badania molekularne (qPCR), oszacowanie liczebności zarodników AGM, ocenę obfitości grzybnii zewnętrzkorzeniowej w podłożu, ilości białek spokrewnionych z glomalina, profili fosfolipidowych i neutralnych kwasów tłuszczowych, oceny bioróżnorodności AGM na podstawie DDGE, identyfikację dominujących AGM na podstawie sekwencji fragmentu genu SSU rDNA, przygotowanie starterów fragmentu D2 genu LSU rDNA, analizę bioróżnorodności w oparciu o MOTUs oraz w oparciu o pokrewieństwo filogenetyczne, utworzenie kolekcji kultur AGM oraz przeprowadzenie eksperymentu, którego celem było określenie wpływu fenolu oraz PAH na poziom stresu oksydacyjnego u AGM i u roślin, stopnia kolonizacji mykoryzowej oraz wytwarzania zarodników AGM. Jest to zdecydowanie najpełniejsze opracowanie tego zagadnienia niemające w literaturze tematu równie szczegółowo przeprowadzonych badań z omawianego zakresu. Nie spotkałam się z tak wszechstronną pracą doktorską przedstawianą do recenzji ani w Polsce ani z kilku krajów z których przygotowywałam recenzję. Obecnie jest to już rzadko spotykana forma pokazania wyników, ponieważ na ogół preferowane jest przedstawienie artykułów już opublikowanych w czasopiśmie naukowych z krótkim podsumowaniem. Opublikowanie tych prac będzie niewątpliwie wyzwaniem, ponieważ materiał trzeba będzie odpowiednio podzielić lub przedstawić jako serię prac. Cieszy fakt zapoznania się z szeroką gamą metod, które rzadko są opanowywane przez poszczególnych doktorantów w takiej ilości. To stanowi przyczynę dla której niniejsze opracowanie jest tak wszechstronne. Trudno byłoby tu jeszcze jakąś kolejną metodę dodać. Pełny zakres możliwości został również zastosowany w ramach analizy statystycznej, której również nie można nic zarzucić.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artkułów (25-200 słów):

Praca doktorska mgr Malickiej obejmuje 9 rozdziałów. Pierwszy zawiera wstęp przedstawiający rozwój i funkcjonowanie AGM oraz ich znaczenie w funkcjonowaniu i ochronie roślin zarówno w terenie niezanieczyszczonym jak i pod wpływem czynników abiotycznych. Wyraźnie widoczny jest tu wpływ odbytych staży zagranicznych. Na szczególną uwagę zasługuje okres szkolenia pod okiem Prof. Paoli Bonfante. Trudno sobie wyobrazić lepszy ośrodek i mentora. Całość wprowadzenia pokazuje jak głęboko Autorka pracy weszła w zagadnienie morfologii mykoryzy. Zagadnienia we wstępie i w dyskusji powołują się na około 300 publikacji, które zostały zacytowane właściwie i precyzyjnie zestawione w literaturze.

Instytut Nauk

o Środowisku

Centrum Doskonałości

Unii Europejskiej

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. 12 664 51 21

12 664 51 22

faks 12 664 69 12

sekretariat.inos@uj.edu.pl

www.eko.uj.edu.pl

Metodyka jest na tyle dokładnie przedstawiona, że z powodzeniem może być użyta jako protokoły, z których inni mogą się uczyć, a nawet próbować powtórzyć przedstawione prace. Podobnie precyzyjnie są podane wyniki. Do najważniejszych, które zaskakują, zaliczam wykazanie: i. różnic w składzie taksonów z terenu zanieczyszczonego i kontrolnego, w korzeniach oraz w mykoryzosferze; ii. różnic w glebie około korzeniowej w strukturze zespołów mikroorganizmów; iii. negatywny wpływ mieszanego inokulum na wzrost i biomasa roślin w porównaniu do szczepionek jednogatunkowych; iv. wykazanie najefektywniejszego gatunku/szczepu AGM (*F. caledonium*) pod względem wspomagania wzrostu roślin w glebach skażonych. Prawidłowo została przedstawiona dyskusja, choć ta część z pewnością będzie budziła rozliczne dyskusji w przyszłości, bo wciąż niewiele jeszcze wiemy. Wiąże się to z faktem uwzględnienia wielu metod ale także w efekcie, z koniecznością zatrzymania się przed uzyskaniem dogłębnych badań tłumaczących poszczególne wyniki.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pokazuje umiejętność Autorki wprowadzenia w tematykę badawczą. Jasno sformułowane są hipotezy badawcze, znakomicie dobrane są metody badawcze i narzędzia statystyczne do analizy danych. Profesjonalny jest sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu. Jasne i poprawne jest także formułowanie wniosków.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedstawioną pracę czyta się bez trudności co świadczy o poprawności stylu. Zarówno wstęp jak i wyniki są obficie ilustrowane, co ułatwia zrozumienie przedstawionego zagadnienia. Wstęp jednak uważam za zbyt obszerny i w części dotyczącej rozwoju mykoryzy mógł być mniej rozbudowany, ponieważ niewiele wnosi to do samego zagadnienia wpływu fenolu i PAH na mykoryzę. Tak dokładny opis byłby przydatny gdyby Autorka opisywała zmiany w budowie i w żywotności grzybni, zarodników i arbuskul. Takie badania także miałyby sens ponieważ tego typu cechy znacznie lepiej obrazują stan funkcjonowania mykoryz, zwłaszcza gdyby zastosowano barwniki fluorescencyjne jak LIVE/DEAD kit lub kwaśna i alkaliczna fosfataza. Tu jednak zastąpione zostały tego typu obserwacje przez badania poziomu stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AGM, chociaż akurat w tym przypadku brakuje mi opisu metod w powołanym rozdziale 3.2.8.5. Z kolei, o ile schematy załączone w pracy są bardzo dobre, to uważam że ryciny 10 i 11, przedstawiające teren badań, mogły być lepszej rozdzielczości/jakości.

4. Uwagi krytyczne

Jak w każdej pracy są także pewne niedociągnięcia, które jednak w obecnie recenzowanej pracy nie mają większego znaczenia merytorycznego. Poniżej zestawiono kilka ważniejszych uwag:

1. Autorka konsekwentnie stosuje termin mikoryza (pisane przez i) – nie jest to obecnie uznawane za poprawne. Warto trzymać się uzgodnionych terminów przez mykologów.
2. Str. 14 i dalej „transport węgla z rośliny do grzyba” – warto używać słowa grzybnia zamiast grzyba ponieważ dla większości grzyb to owocnik, a tu niekoniecznie mamy z nim do czynienia.
3. Str. 15. Strzępka koenocytarna – nie znam takiego terminu, przypuszczam, że chodzi o „cenocyt” – specyficzny rodzaj komórczaka, czyli wielojądrowej komórki. Charakteryzuje się tym, że podziałom jądra komórkowego nie towarzyszą podziały komórki i nie powstają wewnętrzne ściany komórkowe
4. Str. 15 „spory AGM różnią się przede wszystkim wielkością i kolorem” – zdecydowanie nie zgadzam się z tym stwierdzeniem. Gdyby tak było to każdy z nas mógłby te grzyby oznaczać, a tak naprawdę jest tylko kilku specjalistów na świecie, którzy w oparciu o cechy morfologiczne potrafią te grzyby rozpoznawać.
5. Str. 16 i 20 „...w procesie anastomozy” niepoprawny termin – są to anastomozy (połączenia pomiędzy strzępkami i nie jest to proces. Można napisać „w procesie tworzenia anastomoz”).
6. Str. 20 „ogniska infekcyjne” – termin przeniesiony żywcem z medycyny; w przypadku mykoryz chodzi raczej o kolonizację, a infekcji używamy w odniesieniu do pasożytów.

7. Podział C-S-R (Grime i Pierce) – ten podział był bardzo mocno krytykowany od momentu pojawienia się; w przypadku mykoryzy raczej bym go nie stosowała ponieważ tak naprawdę wciąż zbyt mało na jej temat wiemy.
8. Str. 38 – glomalina – nowe badania mówią o tym, że jest ona jednak wytwarzana przez bakterie, modyfikujące substancje wydzielana przez grzyby. Warto byłoby przyrzeć się temu zagadnieniu dokładniej w odniesieniu do obecności PAH i fenoli.
9. Str. 49 – w schemacie Trouvelota nie chodzi o liczne i bardzo liczne arbuskule. Jak uczono mnie w Dijon chodzi o to czy arbuskule są w miejscu, gdzie występują albo obok siebie po dwie albo pojedyncze ale nie w większych grupach lub tylko pojedynczo.
10. Str. 124 – występowanie Arum i Paris w terenie kontrolnym i tylko Arum w zanieczyszczonym – może być szereg czynników wpływających na taką sytuację – zwykle jednak chodzi o to jakie są przestrzenie międzykomórkowe w korzeniu; logicznie rzecz biorąc powinno być na odwrót - niestety natura logiką się nie przejmuje. Warto byłoby zastanowić się jakie zmiany powoduje obecność zanieczyszczeń w budowie ścian komórkowych; być może, że są tu jakieś dodatkowe substancje pozwalające np. na obecność bakterii związanych z grzybnią; może też mniejsza liczebność spor i niższa kolonizacja korzenia związana jest ze zmianą różnorodności bakterii związanych ze sporami czy grzybnią itd. Może to dodatkowo być potwierdzone wynikiem Autorki, dotyczącym większej liczebności bakterii G+ w strefie około-korzeniowej (str. 135)

Mam jeszcze dodatkowe pytanie: dlaczego do eksperymentu wybrano *Lolium perenne*, gatunek, który jest raczej mało zależny lub wcale od mykoryzy. W naszych badaniach hałdowych nie stwierdziliśmy u niego występowania mykoryzy.

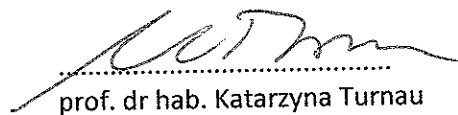
5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Przedstawioną do recenzji pracę uważam za bardzo cenne, oryginalne opracowanie wykonane na podstawie obszernego materiału badawczego. Nie mam wątpliwości, że Autorka dysponuje obecnie wszechstronnymi możliwościami badawczymi i będzie mogła w przyszłości potwierdzić swoje przygotowanie licznymi pracami naukowymi. Cieszy pojawienie się kolejnej osoby specjalizującej się w tym zagadnieniu, które ma istotne znaczenie i może się okazać kluczowe również w przypadku zanieczyszczeń organicznych. Mam nadzieję, że po ukończeniu przewodu doktorskiego Autorka będzie miała możliwość opublikowania prac w języku angielskim i przystąpi do dalszych badań. Ze względu na przygotowanie mikrobiologiczne najbardziej odpowiednie byłyby dalsze prace dotyczące interakcji AGM z bakteriami i innymi grzybami – jest to zagadnienie potencjalnie ważne dla całego procesu ochrony środowiska. Tak wszechstronnie przygotowany naukowiec będzie niewątpliwie poszukiwanym współpracownikiem w ramach projektów badawczych. Gorąco zachęcam do kontynuacji rozpoczętych badań.

Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Moniki Malickiej spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na wyjątkowo obszerne potraktowanie zagadnienia i poprawnie przedyskutowane wyniki oraz doskonałe opanowanie metodyki badawczej. Praca ma szansę na praktyczne zastosowanie wyników a zgromadzenie kultur wyizolowanych szczepów, ma szczególne znaczenie ze względu na obecnie zaniechane lub nieco zaniedbane w ostatnim czasie kolekcje AGM, zwłaszcza z terenów zanieczyszczonych co często wiąże się z niskim finansowaniem badań podstawowych.

25.08.2020, Kraków
data sporządzenia recenzji


prof. dr hab. Katarzyna Turnau
Instytut Nauk o Środowisku
Uniwersytetu Jagiellońskiego