

Prof. dr hab. Danuta Sosnowska
Instytut Ochrony Roślin – PIB
ul. Władysława Węgorka 20
60-318 Poznań

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana dr inż. Roberta Cysewskiego
pt. **„Zróżnicowanie taksonomiczne grzybów entomopatogenicznych Parku Narodowego
„Bory Tucholskie” oraz jego otuliny”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem naukowym dr hab. Łukasza Stępnia z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu.

Uwagi ogólne

Przedstawiona do recenzji praca doktorska swoim obszarem tematycznym obejmuje zagadnienia taksonomii, biologii i występowania grzybów entomopatogenicznych w warunkach naturalnych na terytorium Parku Narodowego „Bory Tucholskie” oraz jego otuliny. Autor pracy na podstawie obszernej literatury zagranicznej przedstawił nowe podejście do taksonomii grzybów patogenicznych dla owadów. Na podstawie nowej nomenklatury przeanalizował zróżnicowanie składu gatunkowego grzybów entomopatogenicznych na terenie Parku Narodowego oraz jego otuliny. Autor przeanalizował zależności występujące w przyrodzie mające wpływ na pojawienie się poszczególnych gatunków grzybów na gospodarzu. Ponadto wykazał przyczyny pionowego zróżnicowania liczby występujących gatunków grzybów na owadach.

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów obliguje państwa członkowskie, w tym Polskę, do wprowadzenia od stycznia 2014 r. integrowanej ochrony roślin polegającej na rozważnym stosowaniu wszystkich dostępnych metod ochrony, gdzie priorytetem jest stosowanie metod niechemicznych. W związku z drastycznym ograniczeniem stosowania chemicznych środków ochrony roślin większą uwagę zwraca się na stosowanie metody biologicznej opartej na stosowaniu czynników biologicznych w ochronie roślin, takich jak, między innymi: bakterie, wirusy i grzyby patogeniczne. Biorąc zatem powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że Doktorant podjął badania w ważnym dziale metody biologicznej związanej z poszukiwaniem nowych czynników zwalczania jakimi są grzyby owadobójcze. Uzyskane wyniki są istotne dla nauki, gdyż pozwalają uporządkować wiedzę z zakresu taksonomii tych grzybów i odnieść się do zróżnicowania tej grupy w środowisku naturalnym. Rozwój metod molekularnych pozwolił uszeregować gatunki grzybów patogenicznych pod kątem taksonomicznym, a także zweryfikować nazewnictwo. Opisane przez Autora gatunki grzybów mają ogromne znaczenie dydaktyczne oraz mogą mieć znaczenie aplikacyjne i praktyczne, gdyż wskazują na

różnorodność gatunków na terenach chronionych i dostępność nowych gatunków i szczepów, które w przyszłości mogą być wykorzystane w produkcji biopreparatów opartych na tych grzybach do zwalczania szkodników roślin uprawnych.

Praca doktorska wzbogaca wiedzę na temat nowych gatunków grzybów owadobójczych w Polsce, ich potencjałe infekcyjnym oraz zróżnicowaniu genetycznym. Największe zastosowanie w praktyce ochrony roślin czynniki biologiczne mają w uprawach szklarniowych. W latach 2005-2010 udział środków biologicznych w ogólnym rynku pestycydów w świecie wzrósł z 2,5% do 4,2%. Jednak udział biopreparatów opartych na grzybach owadobójczych spada. W Polsce obecnie nie zarejestrowano ani jednego biopreparatu opartego na grzybie owadobójczym. Dlatego trzeba szukać innych rozwiązań. Przyszłością metod biologicznych będzie metoda konserwacyjna, która polega na modyfikacji krajobrazu rolniczego dla stworzenia odpowiednich warunków dla rozwoju mikroorganizmów pożytecznych w środowisku. Jest to strategia o największym potencjale dla integrowanej ochrony roślin w uprawach polowych. Pozwoli ona trwale zachować bioróżnorodność w środowisku.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pokazała jak ekosystemy leśne i ich otuliny wpływają na różnorodność gatunkową grzybów entomopatogenicznych. Takie środowisko jest rezerwuarem grzybów i dlatego praca ta jest ogromnym wkładem dla nauki, który pomaga w rozpoznaniu tego środowiska.

Ważne jest zwrócenie uwagi na metabolity grzybów i ich funkcje biologiczne i ekologiczne. Może to być jeden z nowych kierunków w ochronie roślin polegający na wykorzystaniu do zwalczania szkodników metabolitów wtórnych produkowanych przez grzyby.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Struktura rozprawy doktorskiej dr Roberta Cysewskiego nie budzi większych zastrzeżeń. Praca liczy 126 stron. Treść rozprawy została podzielona na następujące rozdziały: wstęp, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie, summary, literatura, suplementy i mapy. W pracy zamieszczono 2 tabele, 11 rysunków i 10 fotografii.

Ocena merytoryczna rozprawy

Prawie 40-stronicowy wstęp jest przeglądem literatury. Autor w punkcie pierwszym wyjaśnia pojęcie grzybów entomopatogenicznych, zarys historyczny powstania problemu chorób owadów i wykorzystania grzybów do zwalczania szkodników. Zwraca uwagę na problemy związane z zastosowaniem grzybów w praktyce oraz krótko opisuje proces chorobowy w gospodarzu. Dalej w punkcie 1.1. przechodzi do opisu klasyfikacji taksonomicznej grzybów. Uważam, że od tego punktu powinien znaleźć się punkt zatytułowany „Przegląd literatury”. Prawdopodobnie było to niedopatrzenie Autora. Traktując kolejne punkty rozprawy jako przegląd literatury trzeba podkreślić, że zasługuje on na uwagę.

Autor cytuje 227 pozycji literatury, w tym tylko 9 w j. polskim. Świadczy to o tym, że w Polsce bardzo mało naukowców zajmuje się tematyką taksonomii grzybów owadobójczych i tym bardziej trzeba podkreślić, że Autor miał trudne zadanie do wykonania. Tak obszerna literatura świadczy o tym, że Autor zna literaturę i potrafi się nią posługiwać.

Autor na podstawie aktualnej literatury przedstawił dotychczasowy stan wiedzy z bardzo szerokiego zakresu, który jest często zupełnie nowy i bardzo trudny. Szczególnie dotyczy to klasyfikacji taksonomicznej grzybów entomopatogenicznych. Jest to wiedza stosunkowo nowa, która rozwinęła się dzięki wykorzystaniu technik biologii molekularnej. Autor przedstawił podział taksonomiczny grzybów z uwzględnieniem grzybów owadobójczych. Ta nowa nomenklatura grzybów została przez Autora wykorzystana do opisania poszczególnych gromad i typów oraz gatunków grzybów owadobójczych, ich infekcyjności w stosunku do owadów. Zostało to porównane do badań wcześniejszych i zweryfikowane, co pozwala czytelnikowi zweryfikować również swoją wiedzę.

Autor w tym rozdziale przedstawia kilka rysunków, niektóre są na podstawie literatury, co jest zaznaczone w podpisie, ale np. Rys. 1 i Rys. 4 nie ma podpisu informującego, czy jest to rysunek Autora, czy na podstawie literatury. Numeracja rysunków nie jest kontynuowana, dlatego że na str. 22 jest nr 4, na str. 27 jest również nr 4. Kolejne rysunki nie mają również odnośnika, czy są one dziełem Autora, czy na podstawie literatury. Takie odnośniki powinny się znaleźć w podpisie tych rysunków.

Wiele uwagi w przeglądzie literatury Autor poświęcił opisaniu biologii grzybów entomopatogenicznych, opisując zagadnienia związane z rozmnażaniem grzybów, typach jednostek infekcyjnych, sam proces infekcji i co jest bardzo ciekawe Autor odniósł się do metabolitów grzybów i zasad ich działania.

Osobne zagadnienie opisane w przeglądzie literatury dotyczy aspektów ekologii grzybów entomopatogenicznych. Autor dokładnie opisał preferowane typy gospodarzy, co jest ważne szczególnie w aspekcie badań Autora w Parku Narodowym.

Ostateczną sekwencją kończącą przegląd literatury jest opis zastosowania grzybów entomopatogenicznych w praktyce w ochronie roślin.

Uważam, że Autor w tak ujętym przeglądzie literatury wystarczająco, a nawet bardzo obszernie i ciekawie przedstawił zakres wiedzy i informacji do przeanalizowania uzyskanych wyników swoich badań i dalszej ich interpretacji. Dzięki takiemu przeglądowi literatury, czytający pracę ma pogląd jak wyglądają badania z tego zakresu w świecie i jak na tym tle wyglądają badania prowadzone w Polsce.

W punkcie 2 „Hipotezy badawcze i cele badań” Autor przejrzyste sformułował cele podjętych badań, które polegają na analizie zróżnicowania składu gatunkowego grzybów entomopatogenicznych terenu Parku Narodowego „Bory Tucholskie” oraz jego otuliny ze szczególnym uwzględnieniem procesu epizooecji. W celach szczegółowych Autor używa skrótu EPF nie informując, co on oznacza. Najpierw powinien być napisany w całości, a w nawiasie skrót.

„Materiały i metody”.

Rozdział ten jest obszerny i opisuje stanowisko badawcze z dokładnymi mapami obszaru Parku Narodowego „Bory Tucholskie”. W opisie rysunków 7, 8, 9, 10, 11 oraz fig. 1 brak odnośników do pochodzenia tych zdjęć, czy są one zrobione przez Autora, czy na podstawie literatury. Autor bardzo dokładnie opisał siedliska występujące na terenie Parku Narodowego, na których prowadził obserwacje.

Autor opisał metodykę badań terenowych oraz badań laboratoryjnych. Dokładnie podał skład barwników, które używał do określania gatunków oraz skład pożywek stosowanych w hodowli grzybów.

Zastosowane metody badań są prawidłowe.

Rozdział 4. Wyniki

W rozdziale tym zawarto dokumentację przeprowadzonych obserwacji na 16 stronach. Uzyskane dane zawarto w obszernej Tabeli 2 oraz udokumentowano na 10 zdjęciach. Źródło pochodzenia tych zdjęć powinno być podpisane. Wyniki dostarczyły cennego pod względem poznawczym materiału i poszerzają wiedzę na temat zróżnicowania gatunkowego grzybów owadobójczych w naturalnym środowisku.

Szczególne wrażenie robi wykaz ponad 90 gatunków grzybów umieszczony w Tabeli 2. Świadczy on o ogromnym zaangażowaniu Autora, o Jego ogromnej wiedzy, przede wszystkim taksonomicznej. Tego typu badania są bardzo pracochłonne i czasochłonne, wymagają precyzji i umiejętności ich interpretacji.

Istotne elementy rozprawy

Do istotnych elementów rozprawy zaliczam:

- 1) zidentyfikowanie i opisanie 91 gatunków grzybów owadobójczych na terenie Parku Narodowego „Bory Tucholskie” oraz jego otuliny,
- 2) stwierdzenie wpływu rodzaju siedliska na występowanie grzybów owadobójczych. W ściółce leśnej obserwowano ubogi skład gatunkowy grzybów (3 gatunki), podczas gdy w zbiorowiskach roślinności łąkowej był on liczniejszy (7 gatunków), natomiast z przydroży i parkingów izolowano 4 gatunki grzybów. Tereny piaszczyste z ubogą roślinnością trawiastą były najuboższe pod względem frekwencji i różnorodności grzybów. Dominowały tam strzępczaki. Obecność miedz, zadarnionych przydroży, łąk i mokradeł wpływała wzbogacająco na różnorodność grzybów.
- 3) oznaczenie 6 gatunków grzybów z taksonu *Lecanicillium* i 25 gatunków owadomorków na różnych owadach oraz powiązanie składu gatunkowego z nową nomenklaturą taksonomiczną,
- 4) stwierdzenie, że liczba grzybów owadobójczych w drzewostanach leśnych Parku Narodowego „Bory Tucholskie” była dwukrotnie wyższa niż w otulinie parku,

5) stwierdzenie i opisanie niedawno odkrytego gatunku *Harposporium janus* na larwach kózkowatych (Cerambycidae),

6) stwierdzenie i opisanie składu gatunkowego grzybów hydrofilnych terenów mokradłowych i wodno-lądowych,

7) stwierdzenie wśród uzyskanych szczepów grzybów mitosporowych większości form konidialnych (anamorf) workowców,

8) stwierdzenie rzadkości występowania epizoocji na terenie Parku Narodowego i jego otulinie.

Jednak mam do tego rozdziału kilka uwag.

- Na str. 66 Autor napisał, że „niektóre szczepy grzybów gatunków strzępczaków wykorzystane zostały w badaniach chemicznych, których celem było stwierdzenie ich zdolności do biodegradacji toksycznych związków organicznych. Nie wiadomo, czy takie badania przeprowadził Autor rozprawy, czy jest to stwierdzenie oparte na danych z literatury. Powinny być one dokładniej opisane w tym rozdziale.

- W Suplemencie 5 – Mapy podano numery poletek przypisane do danego siedliska i izolowanych grzybów. Szkoda, że Autor w wynikach nie pokusił się o dokładniejsze opisanie Tabeli 2 i powiązanie izolowanych gatunków grzybów owadobójczych z danym siedliskiem. Brak dogłębnej analizy wyników z przedstawionymi mapami.

- Celem pracy było między innymi uwzględnienie procesu epizoocji oraz charakterystyka tego procesu na wybranych przykładach. Autor nie opisał takich przypadków. Wprawdzie na str. 70 pisze, że epizoocje miały charakter skupiskowy i tylko w jednym na pięć przypadków występowały na powierzchni większej niż 40 m². Należałoby napisać więcej o tym przypadku, jak również powiązać go z warunkami pogody panującymi w latach obserwacji na danym terenie.

Przedstawione wyniki, na pewno dostarczyły cennego pod względem poznawczym materiału i wniosły wiele nowego do nauki. Przede wszystkim poszerzyły wiedzę na temat różnorodności gatunkowej grzybów owadobójczych w środowisku, jak również pokazały ich potencjał infekcyjny. Izolowanie i opisanie ponad 90 gatunków grzybów owadobójczych świadczy o ogromnym wkładzie pracy Doktoranta, o Jego ogromnej wiedzy, przede wszystkim znajomości nowej taksonomii. Do tej pory nikt w Polsce nie rozpoznał tak dokładnie terenu Parku Narodowego „Bory Tucholskie” pod kątem różnorodności gatunkowej grzybów owadobójczych. Jest to temat bardzo trudny i pracochłonny. Jedynie prof. dr hab. Stanisław Bałazy izolował i opisał te zależności na terenie Puszczy Białowieskiej.

Bardzo wysoko oceniam rozdział 5 „Dyskusja”, przedstawiony na 8 stronach. Doktorant wykazał w niej bardzo dobrą znajomość tematyki badań i bardzo dobrze ją

przedyskutował z literaturą światową i krajową. Widać, że zna tematykę zagadnienia, zna problemy związane z grzybami owadobójczymi. Na słowa uznania zasługują badania i obserwacje w różnych siedliskach roślin Paku Narodowego i jego otuliny, a następnie określenie różnorodności taksonomicznej tych grzybów. W badaniach polskich jest mało informacji na ten temat. Autor wzbogacił tę wiedzę o swoje badania. Są one na tyle ważne, że obecnie ponownie wraca się do metod biologicznych w ochronie roślin i poszukiwania szczepów grzybów owadobójczych charakteryzujących się wysoką wirulencją w stosunku do szkodników upraw. W opracowaniu strategii integrowanego zwalczania szkodników będzie wykorzystywana konserwacyjna metoda biologiczna polegająca na modyfikowaniu krajobrazu rolniczego dla stworzenia odpowiednich warunków dla rozwoju mikroorganizmów pożytecznych w środowisku. Wyniki uzyskane przez Doktoranta wskazują na znaczenie siedliska w rozwoju grzybów owadobójczych i mogą być pomocne w opracowaniu tych strategii.

Mam nadzieję, że uzyskane wyniki zostaną opublikowane w różnych czasopismach o zasięgu krajowym i zagranicznym.

Autor zamieścił w rozprawie rozdział 6 „Podsumowanie i wnioski” na dwóch stronach. Czytając ten rozdział można powiedzieć, że cel został osiągnięty. Wnioski końcowe zostały sformułowane poprawnie pod względem merytorycznym i znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach.

Opracowanie zamyka rozdział 9 „Literatura”, który zawiera 227 pozycji głównie w języku angielskim. Szeroki wykaz piśmiennictwa świadczy o tym, że Autor orientuje się w zakresie problematyki badawczej będącej obiektem Jego zainteresowań i potrafi je dobrze wykorzystać do interpretacji własnych wyników. Spis cytowanej literatury nie jest podany w porządku alfabetycznym. Jest to utrudnieniem dla czytających jeżeli trzeba znaleźć autora publikacji po nazwisku. Wtedy brak spisu alfabetycznego to utrudnia. Jednak czytając rozprawę takich problemów nie ma, gdyż numeracja jest podana w kolejności cytowania w tekście.

Pracę uzupełniają Suplementy. Nie do końca jestem przekonana o zasadności podania Suplementu nr 2 pokazującego listę metabolitów produkowanych tylko przez grzyba *Beauveria bassiana*. Tym bardziej, że w tekście dużo na ten temat się nie pisze, jak również w Suplemencie 3 podającym listę produkowanych destruksyn.

W Suplemencie 4 Autor podaje gatunki grzybów entomopatogenicznych najczęściej występujące w Polsce. Jednak to nie są gatunki tylko rodzaje. W tekście rozprawy mało jest na ten temat.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Sposób przedstawienia całej pracy, w szczególności przegląd piśmiennictwa, dyskusja z danymi w literaturze i cała oprawa rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa jest napisana poprawnym językiem polskim, prawie w ogóle nie ma błędów literowych, tabele i rysunki są czytelne i przekazują odpowiednią informację. Brak jednak odnośników pod zdjęciami, kto

jest ich autorem. W spisie literatury nazwy łacińskie gatunków grzybów powinny być napisane kursywą, tak jak w tekście.

Wniosek końcowy

Pracę doktorską dr inż. Roberta Cysewskiego przedstawioną do recenzji oceniam jako dobre opracowanie naukowe wnoszące wiele nowych informacji w dziedzinie biologii i ochrony roślin, a przede wszystkim w taksonomii. Doktorant wykazał się bardzo dobrym przygotowaniem merytorycznym i naukowym. Posiada umiejętności interpretacji wyników. Uzyskane dane pozwalają poznać zróżnicowanie genetyczne i bioróżnorodność grzybów owadobójczych w Parku Narodowym „Bory Tucholskie”. Dane te mogą być również pomocne w ochronie roślin przed ważnymi szkodnikami, gdyż przedstawiają bogactwo gatunkowe i potencjał infekcyjny grzybów owadobójczych, które mogą być wykorzystane do produkcji biopreparatów. Sformułowane przez Doktoranta cele rozprawy zostały zrealizowane. Wykorzystał umiejętnie dostępną literaturę, a praca jest napisana starannie i dostępnie.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Pana dr inż. Roberta Cysewskiego rozprawa doktorska pt. „Zróżnicowanie taksonomiczne grzybów entomopatogenicznych Parku Narodowego „Bory Tucholskie” oraz jego otuliny” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie „O stopniach naukowych i tytule oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” obowiązującą aktualnie w Polsce.

Wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Danuta Sosnowska

Prof. dr hab. Danuta Sosnowska

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
w Poznaniu

Poznań, 21.06. 20017 r.