

Prof. dr hab. Bogdan Kulig  
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
al. Mickiewicza 21  
31-120 Kraków

Kraków, 28.02.2024 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Karoliny Smytkiewicz-Buzak** pt. „Wpływ czynników Nod i molibdenu na usprawnieniu procesu symbiotycznego wiązania azotu i plonowanie grochu siewnego w zróżnicowanych warunkach wilgotności gleby”  
Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UMCS w Lublinie  
wykonanej w Instytucie Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa  
- Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach  
pod kierunkiem prof. dr hab. dr hab. inż. Janusza Podleśnego

Recenzja wykonana na zlecenie Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach - pismo z dnia 3 stycznia L.dz. 4/2024

### Uzasadnienie podjętego tematu badań

W ostatnich latach powierzchnia uprawy roślin bobowatych grubonasiennych w Polsce systematycznie rośnie. W 2023 roku kształtowała się ona na poziomie 370 tys. ha, w tym grochu 97 tys. ha. Nasiona roślin bobowatych grubonasiennych są cennym źródłem pożywienia dla ludzi i paszy dla zwierząt. Odznaczają się wysoką zawartością białka, skrobi, błonnika pokarmowego oraz witamin i minerałów. Zwiększenie powierzchni uprawy roślin bobowatych grubonasiennych na nasiona wynika ze docenienia ich roli w zmianowaniu, gdyż wzbogacają glebę w materię organiczną, a dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi pozostawiają znaczne ilości azotu w resztkach poźniwnych i słomie (średnio 40 do 100 kg N·ha<sup>-1</sup>), co przyczynia się do lepszego plonowania roślin następczych przy ograniczonych nakładach na nawożenie. Wsparcie finansowe do produkcji roślin bobowatych grubonasiennych uaktywniło ten segment rynku produkcji i sprzedaży materiału siewnego. Wysokie i ciągle rosnące ceny nawozów skłaniają do wykorzystania procesu symbiozy w większym stopniu niż dotychczas, zarówno ze względów ekonomicznych, jak i środowiskowych. Azot z nawozów mineralnych jest wykorzystywany w 50-70%. Nadmierne stosowanie sprzyja wymywaniu azotanów oraz wydzielaniu gazów cieplarnianych (podtlenek azotu), którego wpływ na ocieplenie klimatu jest 293 razy większy niż dwutlenku węgla. Pomimo wielu zalet rośliny te cechuje mała stabilność plonowania, wrażliwość na niedobór wody, utrudniający proces wiązania azotu atmosferycznego jak i początkowe etapy symbiozy. Nawiazaniu symbiozy i prawidłowemu przebiegowi tego procesu sprzyja odpowiedni odczyn gleby, stosowanie szczepionek zawierających efektywne szczepy bakterii, dostępność

mikroelementów, np. molibdenu. Badania mające na celu usprawnienie procesu symbiozy pomiędzy rośliną bobowatą a symbiontami prowadzone są dwutorowo. Z jednej strony prowadzone są badania agrotechniczne z czynnikami mającymi wpływ na proces nodulacji (odczyn, nawożenie makroelementami i mikroelementami, różne sposoby szepienia itp.), a z drugiej badane się substancje przekazujące sygnały ułatwiającymi bakteriom znalezienie włośników i wnikanie do nich bakterii, zwane czynnikami Nod. Są to niskocząsteczkowe związki sygnałowe, które ze względu na podobieństwo do rodzenia oligosacharydowego chityny nazywane są lipochitooligosacharydami (LCOs). Bakteryjne czynniki Nod są najistotniejszym sygnałem w dialogu molekularnym pomiędzy organizmem wyższym a mikro symbiontami. W tym obszarze badawczym jest jeszcze wiele do wyjaśnienia z agronomicznego punktu widzenia np.: jak aplikować, w jakim terminie i dawce, jak jest ich interakcja z makro i mikroelementami i warunkami siedliska. Z tego względu uznaje za w pełni zasadne podjęcie badań dotyczących oceny oddziaływania czynników Nod i molibdenu na plonowanie roślin w zależności od stanu uwilgotnienia gleby.

#### Ocena struktury pracy

Praca obejmuje 108 stron maszynopisu i została podzielona na 7 rozdziałów ułożonych w logicznej kolejności, typowej dla prac o charakterze eksperymentalnym. Praca zawiera sprecyzowany cel i hipotezę badawczą. Doktorantka wyodrębniła 2 cele główne i 5 szczegółowych. Celem badań było ocenienie możliwości zwiększenia plonowania grochu siewnego poprzez usprawnienie procesu symbiotycznego wiązania azotu w wyniku stosowania innowacyjnych preparatów zawierającego czynniki Nod oraz preparatu zawierającego molibden. Cele szczegółowe obejmowały dynamikę wzrostu roślin i równomierność wschodów roślin poprzez stosowanie w/w preparatów oraz poprawę wielkości cech morfologicznych i fizjologicznych poprzez zabezpieczenie potrzeb wodnych na różnych poziomach wilgotności. W hipotezie roboczej założono, że nie ma ograniczeń w procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego. Stężenie związków sygnałowych zmienia się w niekorzystnych warunkach, a niedobór wody w glebie, dodatkowo nasila ten efekt. Założono, że zastosowanie preparatu zawierającego LCOs w postaci zaprawy nasiennej zwiększy efektywność symbiozy,

Podział treści pracy na poszczególne rozdziały przedstawia się następująco (tabela):  
 Udział poszczególnych rozdziałów w stosunku do objętości pracy

lp.	nazwa rozdziału	stron	udział (%)
1.	Strony pozatkowe i spis treści	5	4.6
2.	Wstęp i cel badań	4	3.7
3.	Przegląd literatury	24	22.2
4.	Metodyka badań	11	10.2
5.	Wyniki badań	30	27.8
6.	Dyskusja	10	9.3
7.	Wnioski	2	1.9
8.	Literatura	20	18.5
	Streszczenie	2	1.9
	Razem	108	100.0

a zastosowanie molibdenu usprawni działanie nitrogenazy, przyczyniając się do lepszego zaopatrzenia roślin w azot, co wpłynie na efektywność fotosyntezy i cechy plonotwórcze oraz jakość plonu nasion.

Analiza powyższego zestawienia (tabela) oraz ocena merytoryczna treści w poszczególnych rozdziałach wskazuje, że największy nakład pracy związany jest z omówieniem wyników oraz przeglądem literatury i dyskusją, a następnie z metodyką badań. Treści zawarte w pracy są zgodne z jej tematem. Należy podkreślić poprawny rozkład treści między rozdziałami i duży nakład pracy, jaki Doktorantka włożyła w pozyskanie wyników, o czym świadczy liczba badanych cech, co dokładnie zostanie przedstawione w szczegółowej charakterystyce rozdziału 4. Ponadto należy podkreślić staranność edytorstwa rozprawy.

#### Ocena szczegółowa głównych rozdziałów

We „Wstępie” Autorka zwróciła uwagę na znaczenie gospodarcze i przyrodnicze roślin bobowatych grubonasiennych oraz możliwości zastąpienia w żywieniu zwierząt śrutą sojowej GMO białkiem rodzimych gatunków bobowatych grubonasiennych. Omówiła zalety i wady roślin bobowatych, poruszając problem wiązania azotu atmosferycznego. W końcowej części rozdziału zawarła cel pracy i hipotezę badawczą, które poprawnie korespondują z tematem i wnioskami.

Przegląd literatury jest obszerny i zajmuje około 22% objętości pracy. Autorka wykorzystała w nim około 70% z 250 pozycji literatury, z czego 61% stanowiły pozycje w języku angielskim. W rozdziale dotyczącym literatury skoncentrowano się na znaczeniu gospodarczym grochu siewnego, jego wartości odżywczej i paszowej, a także wpływie makro- i mikroelementów na plonowanie grochu. Doktorantka wskazała, że groch jest gatunkiem o dużych walorach konsumpcyjnych i paszowych i wysokim potencjale plonowania. Obecnie w KR jest wpisane 29 odmian grochu, w tym 20 to odmiany ogólnoużytkowe, a 9 pastewnych. Azot jest składnikiem w największym stopniu wpływającym na plonowanie roślin. Wchodzi w skład białek, kwasów nukleinowych, nukleotydów, witamin, hormonów roślinnych, a także wtórnych metabolitów. Azot w glebie występuje głównie w postaci organicznej (95%), a w mniejszej części w postaci mineralnej (ok. 5%), głównie w postaci jonów azotanowych i amonowej. Niezbilansowane nawożenie azotowe prowadzi do wymywania azotanów i zwiększenia efektu cieplarnianego, poprzez nadmierne ulatnianie się podtlenku azotu. Niedobór tego pierwiastka wpływa upośledzenie wzrostu i drastyczne ograniczanie plonu roślin. Doktorantka omówiła również znaczenie mikroelementów, ze szczególnym uwzględnieniem molibdenu. Autorka opisała proces symbiotycznego wiązania azotu, w którym przedstawiła środowiskowe i agrotechniczne uwarunkowania przebiegu tego procesu, jak również rolę specyficznych oddziaływań, tj. wymiany odpowiednich ilości sygnałów prowadzących do wzajemnego rozpoznania się partnerów procesu symbiozy. Sygnały te przekazywane są za pomocą czynników. Czynniki te m.in. inicjują zmiany rozwojowe w roślinie, wpływające na dystrybucję fitohormonów oraz prowadzą do deformacji i skręcenia włóśników korzeniowych (tzw. laska pasterza) i są niezbędne do rozwoju nici infekcyjnej, która umożliwia penetrację tkanek korzeni przez bakterie i ich dotarcie do miejsca powstania brodawki korzeniowej. Literatura jest poprawnie cytowana, aktualna i wyczerpująca dla przedstawienia tła badań.

W rozdziale 3. „Metodyka badań” w 14 podrozdziałach doktorantka przedstawiła warunki prowadzenia badań, układ doświadczenia oraz zakres badań i termin ich przeprowadzenia, jak również urządzenia i cały zestaw narzędzi badawczych i statystycznych. W podrozdziale „Warunki badań” Doktorantka opisuje sposób przygotowania substratu glebowego użytego do napełniania wazonów i przedstawiała zasobność gleby użytej do substratu, ponadto okres badań oraz liczbę, objętość i masę wazonów, a także sposób siewu, terminu stosowania zabiegów będących przedmiotem doświadczenia. Doświadczenie przeprowadzono w latach 2020 i 2021

w hali wegetacyjnej Instytutu Uprawy Nawożenia Gleboznawstwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, jako doświadczenie dwuczynnikowe w układzie całkowicie losowym, w 3 powtórzeniach. Czynnikiem I – cztery poziomy technologiczne (kontrola, stosowanie LCOs, stosowanie molibdenu oraz połączenie kombinacji LCOs z molibdenem). Obiektami II czynnika była dostępność wody (wilgotność gleby na poziomie 30% połowej pojemności wodnej i 60% połowej pojemności wodnej). Zakres badań obejmował wykonanie następujących pomiarów i obserwacji: ocenę wschodów roślin, pomiary biometryczne w 4 terminach, w tym określenie dynamiki przyrostu biomasy, liczby i masa brodawek korzeniowych, wymiany gazowej, współczynnika wykorzystania wody, pomiaru fluorescencji chlorofilu a, wskaźnika zieloności liścia, pomiaru powierzchni liściowej oraz zdrowotności liści pomiaru systemu korzeniowego za pomocą systemu skanującego in-situ. Ponadto określono wielkość plonu, jego strukturę, a także analizowano skład chemiczny nasion, określając zawartość suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu i włókna surowego, bezazotowych wyciągów oraz popiołu i składników mineralnych: azotu, potasu, magnezu, siarki, żelaza, manganu i molibdenu. Analizę statystyczną zgodnie z układem doświadczenia wykonano w programie Statistica, a istotność różnic pomiędzy średnimi obiektowymi wykazano za pomocą testu porównań wielokrotnych Tukey'a, przy poziomie istotności  $p=0,05$ .

Rozdział „Wyniki badań” jest najszerszym obejmującym 30 stron tj. 27,8% objętości pracy. Wyniki zestawiono w 11 tabelach oraz 12 wykresach o czytelnym, prawidłowym układzie, ich analiza wskazuje na wysoką wiarygodność pozyskanych danych. Doktorantka scharakteryzowała wyniki dotyczące cech morfologicznych, fizjologicznych (wymienionych w opisie rozdziału „metodyka badań”), jak również plon oraz skład chemiczny nasion (zawartość składników organicznych i zawartość składników mineralnych). Doktorantka udowodniła, że preparaty zawierające LCOs lub molibden oraz ich mieszanka korzystnie wpłynęły na cechy morfologiczne i fizjologiczne roślin grochu. Najlepsze efekty uzyskano stosując preparat zawierający mieszankę czynnika Nod i molibdenu niezależnie od poziomu uwilgotnienia gleby. Doktorantka wykazała, że w warunkach stresu suszy w fazie kwitnienia preparat LCOs oraz preparat zawierający molibden istotnie zwiększyły liczbę brodawek korzeniowych w porównaniu do obiektów, na których badane preparaty stosowano osobno – nawet do 27,3%. Ponadto na tym obiekcie obserwowano najmniejszą redukcję plonu w warunkach niedoboru wody. Łączne stosowanie czynników Nod i molibdenu spowodowało zwiększenie indeksu zieloności liści, niezależnie od poziomu wilgotności gleby. Po zastosowaniu mieszanki LCOs i Mo wskaźniki fluorescencji chlorofilu a - Fv/Fm oraz PI oraz wskaźniki biologicznej redukcji azotu przyjęły istotnie większe wartości w odniesieniu do kontroli. Rozdział ten zawiera wiele cennych wyników, które można eksplorować odpowiednio poprzez obróbkę statystyczną, dającą lepszy obraz współzależności pomiędzy cechami morfologicznymi a fizjologicznymi i innymi. W tym miejscu zachęcam do lepszego wykorzystania narzędzi statystycznych w przygotowywanych publikacjach naukowych, np.: wykorzystanie korelacji prostej, regresji prostoliniowej, ewentualnie kontrastów ortogonalnych dla kontrastu - obiekty LCOs: obiekty pozostałe.

Dyskusja wyników - obszerna (10 stron maszynopisu ok. 9% objętości pracy) i merytoryczna, z wykorzystaniem licznych pozycji piśmiennictwa naukowego (30% z 250 pozycji). W poszczególnych częściach dyskusji Autorka poruszała następujące zagadnienia: zapotrzebowania wodnych grochu w kontekście dyskusji cech związanych z wymianą gazową a w szczególności wskaźnik wykorzystania wody (WUE oraz wskaźników opisujących wzrost roślin (GR) i intensywność procesu wiązania azotu atmosferycznego. W dalszej części autorka dyskutowała wyniki wielkości powierzchni liściowej, wskaźników fluorescencji chlorofilu, a w końcowej części wyniki charakteryzujące cechy morfologiczne, plon nasion i ich skład chemiczny. . Doktorantka szeroko dyskutowała te wyniki odnosząc się do prac

innych Autorów wykonujących podobne badania na bobiku, grochu, soi, łubinie, wspanie i słoneczniku.

W rozdziale 6. Autorka przedstawiła 9 wniosków podsumowujących osiągnięcia. Dotyczyły one korzystnego oddziaływania zastosowanych preparatów na dynamikę wzrostu, na wysokość roślin, fizjologiczną szybkość wzrostu roślin, na liczbę i masę brodawek korzeniowych, wpływ suszy na wskaźniki fizjologiczne. Zwykle lepszymi okazywał się obiekt na którym łącznie stosowano LCOs i Mo, na drugim miejscu LCOs, następnie molibden i na końcu kontrola. Wnioski korespondują z celami szczegółowymi i z postawioną hipotezą badawczą. Z praktycznego punktu widzenia najcenniejszym wydaje się wniosek 7, z którego wynika że niezależnie od poziomu uwilgotnienia najlepsze plonu uzyskano stosując łącznie oba preparaty (LCOs i molibden). Wniosek 9 wytycza drogę dalszych badań i jest to cenna wskazówka dla badaczy zajmujących się tymi zagadnieniami.

Z walorów przedstawionej rozprawy doktorskiej na szczególne podkreślenie zasługują:

- 1) innowacyjna tematyka badawcza o znaczeniu naukowo-poznawczym i użytkowym oraz wskazanie kierunku przyszłych badań wynikających z analizy uzyskanych wyników
- 2) duży nakład pracy włożony w celu pozyskania przedstawionych wyników oraz bardzo obszerny przegląd piśmiennictwa naukowego,
- 3) zastosowanie nowych technik badawczych i pozyskanie wartościowych wyników – wskaźniki fluorescencji chlorofilu a, wskaźnik powierzchni liści, wskaźnik względnej zawartości chlorofilu, obserwacje i badania systemu korzeniowego in-situ, badanie wymiany gazowej/ (dokumentacja fotograficzna - 9 fotografii).
- 4) brak wyraźnych uchybień i staranność edycyjna.

Mankamentem pracy jest brak weryfikacji polowej, ale prowadzenie takich badań byłoby nadmierne obciążenie Doktorantki pracą badawczą.

Uwagi szczegółowe (pytania):

- 1) W kontekście wysiewu grochu w wazonach na głębokość 1,5 cm - w jaki sposób kiełkuje groch i jak głęboko się go sieje w warunkach polowych?
- 2) Pomiar powierzchni liści (czy mierzono powierzchnię wąsów czepnych?).

Podsumowanie i wniosek końcowy

Autorka zebrała obfity materiał dowodowy i wiele cennych wyników, które właściwie opracowała i zinterpretowała wykorzystując metody statystyczne (analizę wariancji, test Tukeya i Shapiro-Wilka). Uzyskane wyniki badań są wiarygodne, a ich ilość daje możliwość przygotowania kilku publikacji naukowych. Rezultaty są szeroko konfrontowane z doniesieniami innych autorów. Praca wnosi nowe elementy do teorii i praktyki uprawy grochu siewnego i produkcji materiału siewnego, a tym samym do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo.

Stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania zawarte w **art. 104 § 1 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. z 2023 r. poz. 775) w zw. z art. 178 ust. 1 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.)** i wnioskuję do Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Smytkiewicz-Buzak do publicznej obrony, zgodnie z obowiązującymi przepisami.

Biorąc pod uwagę oryginalność badań, kompleksowość podejścia do problemu badawczego oraz zakres wykonanych pomiarów i ich pracochłonność wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Bogdan Kulig

Prof. dr hab. Bogdan Kulig  
Katedra Agroekologii i Produkcji Roślinnej  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
al. Mickiewicza 21  
31-120 Kraków

Kraków, 28.02.2024 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Karoliny Smytkiewicz-Buzak** pt. „Wpływ czynników Nod i molibdenu na usprawnieniu procesu symbiotycznego wiązania azotu i plonowanie grochu siewnego w zróżnicowanych warunkach wilgotności gleby”  
Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UMCS w Lublinie  
wykonanej w Instytucie Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa  
- Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach  
pod kierunkiem prof. dr hab. dr hab. inż. Janusza Podleśnego

Recenzja wykonana na zlecenie Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach - pismo z dnia 3 stycznia L.dz. 4/2024

### Uzasadnienie podjętego tematu badań

W ostatnich latach powierzchnia uprawy roślin bobowatych grubonasiennych w Polsce systematycznie rośnie. W 2023 roku kształtowała się ona na poziomie 370 tys. ha, w tym grochu 97 tys. ha. Nasiona roślin bobowatych grubonasiennych są cennym źródłem pożywienia dla ludzi i paszy dla zwierząt. Odznaczają się wysoką zawartością białka, skrobi, błonnika pokarmowego oraz witamin i minerałów. Zwiększenie powierzchni uprawy roślin bobowatych grubonasiennych na nasiona wynika ze docenienia ich roli w zmianowaniu, gdyż wzbogacają glebę w materię organiczną, a dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi pozostawiają znaczne ilości azotu w resztkach poźniwnych i słomie (średnio 40 do 100 kg N·ha<sup>-1</sup>), co przyczynia się do lepszego plonowania roślin następczych przy ograniczonych nakładach na nawożenie. Wsparcie finansowe do produkcji roślin bobowatych grubonasiennych uaktywniło ten segment rynku produkcji i sprzedaży materiału siewnego. Wysokie i ciągle rosnące ceny nawozów skłaniają do wykorzystania procesu symbiozy w większym stopniu niż dotychczas, zarówno ze względów ekonomicznych, jak i środowiskowych. Azot z nawozów mineralnych jest wykorzystywany w 50-70%. Nadmierne stosowanie sprzyja wymywaniu azotanów oraz wydzielaniu gazów cieplarnianych (podtlenek azotu), którego wpływ na ocieplenie klimatu jest 293 razy większy niż dwutlenku węgla. Pomimo wielu zalet rośliny te cechuje mała stabilność plonowania, wrażliwość na niedobór wody, utrudniający proces wiązania azotu atmosferycznego jak i początkowe etapy symbiozy. Nawiazaniu symbiozy i prawidłowemu przebiegowi tego procesu sprzyja odpowiedni odczyn gleby, stosowanie szczepionek zawierających efektywne szczepy bakterii, dostępność

mikroelementów, np. molibdenu. Badania mające na celu usprawnienie procesu symbiozy pomiędzy rośliną bobowatą a symbiontami prowadzone są dwutorowo. Z jednej strony prowadzone są badania agrotechniczne z czynnikami mającymi wpływ na proces nodulacji (odczyn, nawożenie makroelementami i mikroelementami, różne sposoby szczepienia itp.), a z drugiej badane się substancje przekazujące sygnały ułatwiającymi bakteriom znalezienie włośników i wnikanie do nich bakterii, zwane czynnikami Nod. Są to niskocząsteczkowe związki sygnałowe, które ze względu na podobieństwo do rodzenia oligosacharydowego chityny nazywane są lipochitoooligosacharydami (LCOs). Bakteryjne czynniki Nod są najistotniejszym sygnałem w dialogu molekularnym pomiędzy organizmem wyższym a mikro symbiontami. W tym obszarze badawczym jest jeszcze wiele do wyjaśnienia z agronomicznego punktu widzenia np.: jak aplikować, w jakim terminie i dawce, jak jest ich interakcja z makro i mikroelementami i warunkami siedliska. Z tego względu uznaje za w pełni zasadne podjęcie badań dotyczących oceny oddziaływania czynników Nod i molibdenu na plonowanie roślin w zależności od stanu uwilgotnienia gleby.

#### Ocena struktury pracy

Praca obejmuje 108 stron maszynopisu i została podzielona na 7 rozdziałów ułożonych w logicznej kolejności, typowej dla prac o charakterze eksperymentalnym. Praca zawiera sprecyzowany cel i hipotezę badawczą. Doktorantka wyodrębniła 2 cele główne i 5 szczegółowych. Celem badań było ocenienie możliwości zwiększenia plonowania grochu siewnego poprzez usprawnienie procesu symbiotycznego wiązania azotu w wyniku stosowania innowacyjnych preparatów zawierającego czynniki Nod oraz preparatu zawierającego molibden. Cele szczegółowe obejmowały dynamikę wzrostu roślin i równomierność wschodów roślin poprzez stosowanie w/w preparatów oraz poprawę wielkości cech morfologicznych i fizjologicznych poprzez zabezpieczenie potrzeb wodnych na różnych poziomach wilgotności. W hipotezie roboczej założono, że nie ma ograniczeń w procesie biologicznej redukcji azotu atmosferycznego. Stężenie związków sygnałowych zmienia się w niekorzystnych warunkach, a niedobór wody w glebie, dodatkowo nasila ten efekt. Założono, że zastosowanie preparatu zawierającego LCOs w postaci zaprawy nasiennej zwiększy efektywność symbiozy,

Podział treści pracy na poszczególne rozdziały przedstawia się następująco (tabela):  
 Udział poszczególnych rozdziałów w stosunku do objętości pracy

lp.	nazwa rozdziału	stron	udział (%)
1.	Strony pozatkowe i spis treści	5	4.6
2.	Wstęp i cel badań	4	3.7
3.	Przegląd literatury	24	22.2
4.	Metodyka badań	11	10.2
5.	Wyniki badań	30	27.8
6.	Dyskusja	10	9.3
7.	Wnioski	2	1.9
8.	Literatura	20	18.5
	Streszczenie	2	1.9
	Razem	108	100.0

a zastosowanie molibdenu usprawni działanie nitrogenazy, przyczyniając się do lepszego zaopatrzenia roślin w azot, co wpłynie na efektywność fotosyntezy i cechy plonotwórcze oraz jakość plonu nasion.

Analiza powyższego zestawienia (tabela) oraz ocena merytoryczna treści w poszczególnych rozdziałach wskazuje, że największy nakład pracy związany jest z omówieniem wyników oraz przeglądem literatury i dyskusją, a następnie z metodyką badań. Treści zawarte w pracy są zgodne z jej tematem. Należy podkreślić poprawny rozkład treści między rozdziałami i duży nakład pracy, jaki Doktorantka włożyła w pozyskanie wyników, o czym świadczy liczba badanych cech, co dokładnie zostanie przedstawione w szczegółowej charakterystyce rozdziału 4. Ponadto należy podkreślić staranność edytorstwa rozprawy.

#### Ocena szczegółowa głównych rozdziałów

We „Wstępie” Autorka zwróciła uwagę na znaczenie gospodarcze i przyrodnicze roślin bobowatych grubonasiennych oraz możliwości zastąpienia w żywieniu zwierząt śrutą sojowej GMO białkiem rodzimych gatunków bobowatych grubonasiennych. Omówiła zalety i wady roślin bobowatych, poruszając problem wiązania azotu atmosferycznego. W końcowej części rozdziału zawarła cel pracy i hipotezę badawczą, które poprawnie korespondują z tematem i wnioskami.

Przegląd literatury jest obszerny i zajmuje około 22% objętości pracy. Autorka wykorzystała w nim około 70% z 250 pozycji literatury, z czego 61% stanowiły pozycje w języku angielskim. W rozdziale dotyczącym literatury skoncentrowano się na znaczeniu gospodarczym grochu siewnego, jego wartości odżywczej i paszowej, a także wpływie makro- i mikroelementów na plonowanie grochu. Doktorantka wskazała, że groch jest gatunkiem o dużych walorach konsumpcyjnych i paszowych i wysokim potencjale plonowania. Obecnie w KR jest wpisane 29 odmian grochu, w tym 20 to odmiany ogólnoużytkowe, a 9 pastewnych. Azot jest składnikiem w największym stopniu wpływającym na plonowanie roślin. Wchodzi w skład białek, kwasów nukleinowych, nukleotydów, witamin, hormonów roślinnych, a także wtórnych metabolitów. Azot w glebie występuje głównie w postaci organicznej (95%), a w mniejszej części w postaci mineralnej (ok. 5%), głównie w postaci jonów azotanowych i amonowej. Niezbilansowane nawożenie azotowe prowadzi do wymywania azotanów i zwiększenia efektu cieplarnianego, poprzez nadmierne ulatnianie się podtlenku azotu. Niedobór tego pierwiastka wpływa upośledzenie wzrostu i drastyczne ograniczanie plonu roślin. Doktorantka omówiła również znaczenie mikroelementów, ze szczególnym uwzględnieniem molibdenu. Autorka opisała proces symbiotycznego wiązania azotu, w którym przedstawiła środowiskowe i agrotechniczne uwarunkowania przebiegu tego procesu, jak również rolę specyficznych oddziaływań, tj. wymiany odpowiednich ilości sygnałów prowadzących do wzajemnego rozpoznania się partnerów procesu symbiozy. Sygnały te przekazywane są za pomocą czynników. Czynniki te m.in. inicjują zmiany rozwojowe w roślinie, wpływające na dystrybucję fitohormonów oraz prowadzą do deformacji i skręcenia włóśników korzeniowych (tzw. laska pasterza) i są niezbędne do rozwoju nici infekcyjnej, która umożliwia penetrację tkanek korzeni przez bakterie i ich dotarcie do miejsca powstania brodawki korzeniowej. Literatura jest poprawnie cytowana, aktualna i wyczerpująca dla przedstawienia tła badań.

W rozdziale 3. „Metodyka badań” w 14 podrozdziałach doktorantka przedstawiła warunki prowadzenia badań, układ doświadczenia oraz zakres badań i termin ich przeprowadzenia, jak również urządzenia i cały zestaw narzędzi badawczych i statystycznych. W podrozdziale „Warunki badań” Doktorantka opisuje sposób przygotowania substratu glebowego użytego do napełniania wazonów i przedstawiała zasobność gleby użytej do substratu, ponadto okres badań oraz liczbę, objętość i masę wazonów, a także sposób siewu, terminu stosowania zabiegów będących przedmiotem doświadczenia. Doświadczenie przeprowadzono w latach 2020 i 2021



w hali wegetacyjnej Instytutu Uprawy Nawożenia Gleboznawstwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, jako doświadczenie dwuczynnikowe w układzie całkowicie losowym, w 3 powtórzeniach. Czynnikiem badawczym były: I – cztery poziomy technologiczne (kontrola, stosowanie LCOs, stosowanie molibdenu oraz połączenie kombinacji LCOs z molibdenem). Obiektami II czynnika była dostępność wody (wilgotność gleby na poziomie 30% połowej pojemności wodnej i 60% połowej pojemności wodnej). Zakres badań obejmował wykonanie następujących pomiarów i obserwacji: ocenę wschodów roślin, pomiary biometryczne w 4 terminach, w tym określenie dynamiki przyrostu biomasy, liczby i masa brodawek korzeniowych, wymiany gazowej, współczynnika wykorzystania wody, pomiaru fluorescencji chlorofilu a, wskaźnika zieloności liścia, pomiaru powierzchni liściowej oraz zdrowotności liści pomiaru systemu korzeniowego za pomocą systemu skanującego in-situ. Ponadto określono wielkość plonu, jego strukturę, a także analizowano skład chemiczny nasion, określając zawartość suchej masy, białka ogólnego, tłuszczu i włókna surowego, bezazotowych wyciągowych oraz popiołu i składników mineralnych: azotu, potasu, magnezu, siarki, żelaza, manganu i molibdenu. Analizę statystyczną zgodnie z układem doświadczenia wykonano w programie Statistica, a istotność różnic pomiędzy średnimi obiektowymi wykazano za pomocą testu porównań wielokrotnych Tukey'a, przy poziomie istotności  $p=0,05$ .

Rozdział „Wyniki badań” jest najszerszy obejmujący 30 stron tj. 27,8% objętości pracy. Wyniki zestawiono w 11 tabelach oraz 12 wykresach o czytelnym, prawidłowym układzie, ich analiza wskazuje na wysoką wiarygodność pozyskanych danych. Doktorantka scharakteryzowała wyniki dotyczące cech morfologicznych, fizjologicznych (wymienionych w opisie rozdziału „metodyka badań”), jak również plon oraz skład chemiczny nasion (zawartość składników organicznych i zawartość składników mineralnych). Doktorantka udowodniła, że preparaty zawierające LCOs lub molibden oraz ich mieszanka korzystnie wpłynęły na cechy morfologiczne i fizjologiczne roślin grochu. Najlepsze efekty uzyskano stosując preparat zawierający mieszankę czynnika Nod i molibdenu niezależnie od poziomu uwilgotnienia gleby. Doktorantka wykazała, że w warunkach stresu suszy w fazie kwitnienia preparat LCOs oraz preparat zawierający molibden istotnie zwiększyły liczbę brodawek korzeniowych w porównaniu do obiektów, na których badane preparaty stosowano osobno – nawet do 27,3%. Ponadto na tym obiekcie obserwowano najmniejszą redukcję plonu w warunkach niedoboru wody. Łączne stosowanie czynników Nod i molibdenu spowodowało zwiększenie indeksu zieloności liści, niezależnie od poziomu wilgotności gleby. Po zastosowaniu mieszanki LCOs i Mo wskaźniki fluorescencji chlorofilu a -  $F_v/F_m$  oraz PI oraz wskaźniki biologicznej redukcji azotu przyjęły istotnie większe wartości w odniesieniu do kontroli. Rozdział ten zawiera wiele cennych wyników, które można eksplorować odpowiednio poprzez obróbkę statystyczną, dającą lepszy obraz współzależności pomiędzy cechami morfologicznymi a fizjologicznymi i innymi. W tym miejscu zachęcam do lepszego wykorzystania narzędzi statystycznych w przygotowywanych publikacjach naukowych, np.: wykorzystanie korelacji prostej, regresji prostoliniowej, ewentualnie kontrastów ortogonalnych dla kontrastu - obiekty LCOs: obiekty pozostałe.

Dyskusja wyników - obszerna (10 stron maszynopisu ok. 9% objętości pracy) i merytoryczna, z wykorzystaniem licznych pozycji piśmiennictwa naukowego (30% z 250 pozycji). W poszczególnych częściach dyskusji Autorka poruszała następujące zagadnienia: zapotrzebowania wodnych grochu w kontekście dyskusji cech związanych z wymianą gazową a w szczególności wskaźnik wykorzystania wody (WUE oraz wskaźników opisujących wzrost roślin (GR) i intensywność procesu wiązania azotu atmosferycznego. W dalszej części autorka dyskutowała wyniki wielkości powierzchni liściowej, wskaźników fluorescencji chlorofilu, a w końcowej części wyniki charakteryzujące cechy morfologiczne, plon nasion i ich skład chemiczny. . Doktorantka szeroko dyskutowała te wyniki odnosząc się do prac

innych Autorów wykonujących podobne badania na bobiku, grochu, soi, łubinie, wspaniele i słoneczniku.

W rozdziale 6. Autorka przedstawiła 9 wniosków podsumowujących osiągnięcia. Dotyczyły one korzystnego oddziaływania zastosowanych preparatów na dynamikę wzrostu, na wysokość roślin, fizjologiczną szybkość wzrostu roślin, na liczbę i masę brodawek korzeniowych, wpływ suszy na wskaźniki fizjologiczne. Zwykle lepszymi okazywał się obiekt na którym łącznie stosowano LCOs i Mo, na drugim miejscu LCOs, następnie molibden i na końcu kontrola. Wnioski korespondują z celami szczegółowymi i z postawioną hipotezą badawczą. Z praktycznego punktu widzenia najcenniejszym wydaje się wniosek 7, z którego wynika że niezależnie od poziomu uwilgotnienia najlepsze plonu uzyskano stosując łącznie oba preparaty (LCOs i molibden). Wniosek 9 wytycza drogę dalszych badań i jest to cenna wskazówka dla badaczy zajmujących się tymi zagadnieniami.

Z walorów przedstawionej rozprawy doktorskiej na szczególne podkreślenie zasługują:

- 1) innowacyjna tematyka badawcza o znaczeniu naukowo-poznawczym i użytkowym oraz wskazanie kierunku przyszłych badań wynikających z analizy uzyskanych wyników
- 2) duży nakład pracy włożony w celu pozyskania przedstawionych wyników oraz bardzo obszerny przegląd piśmiennictwa naukowego,
- 3) zastosowanie nowych technik badawczych i pozyskanie wartościowych wyników – wskaźniki fluorescencji chlorofilu a, wskaźnik powierzchni liści, wskaźnik względnej zawartości chlorofilu, obserwacje i badania systemu korzeniowego in-situ, badanie wymiany gazowej/ (dokumentacja fotograficzna - 9 fotografii).
- 4) brak wyraźnych uchybień i staranność edycyjna.

Mankamentem pracy jest brak weryfikacji polowej, ale prowadzenie takich badań byłoby nadmierne obciążenie Doktorantki pracą badawczą.

Uwagi szczegółowe (pytania):

- 1) W kontekście wysiewu grochu w wazonach na głębokość 1,5 cm - w jaki sposób kiełkuje groch i jak głęboko się go sieje w warunkach polowych?
- 2) Pomiar powierzchni liści (czy mierzono powierzchnię wąsów czepnych?).

Podsumowanie i wniosek końcowy

Autorka zebrała obfity materiał dowodowy i wiele cennych wyników, które właściwie opracowała i zinterpretowała wykorzystując metody statystyczne (analizę wariancji, test Tukeya i Shapiro-Wilka). Uzyskane wyniki badań są wiarygodne, a ich ilość daje możliwość przygotowania kilku publikacji naukowych. Rezultaty są szeroko konfrontowane z doniesieniami innych autorów. Praca wnosi nowe elementy do teorii i praktyki uprawy grochu siewnego i produkcji materiału siewnego, a tym samym do dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo.

Stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania zawarte w **art. 104 § 1 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. z 2023 r. poz. 775) w zw. z art. 178 ust. 1 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.)** i wnioskuję do Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Smytkiewicz-Buzak do publicznej obrony, zgodnie z obowiązującymi przepisami.

Biorąc pod uwagę oryginalność badań, kompleksowość podejścia do problemu badawczego oraz zakres wykonanych pomiarów i ich pracochłonność wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Bogdan Kulig