

Prof. dr hab. Tadeusz Kowalski  
Wydział Leśny  
Uniwersytet Rolniczy  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
Al. 29-Listopada 46, 31-425 Kraków  
Tel. 012/ 6625035 e-mail: rltkowal@cyf-kr.edu.pl

Kraków, 05.09.2022

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Artura Paci pt. „Wykorzystanie nawozów fosforowych do ochrony jesionu wyniosłego *Fraxinus excelsior* L. przed patogenami z rodzaju *Phytophthora* i *Chalara*”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Oszako

#### Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w formie wydruku oraz identycznej wersji elektronicznej na płycie CD zawiera 164 strony tekstu wraz z rycinami, fotografiami, tabelami, spisem literatury oraz wykazem rycin i tabel. Zamieszczony jest także abstrakt w języku polskim i angielskim. Tekst został przedstawiony w jedenastu numerowanych rozdziałach o mało czytelnej, pomieszanej strukturze. Pomijając wprowadzającą w błąd strukturę przedstawioną w spisie treści, sam tekst ma na ogół logiczne następstwo i ułożony jest według trzech głównych doświadczeń, tak więc tezy pracy należy uznać za kompletne.

#### Ocena merytoryczna

Tytuł rozprawy nie jest całkowicie precyzyjny. Badano bowiem tylko jeden gatunek *Chalara* i jego nazwa gatunkowa powinna zostać wymieniona w tytule. Na podstawie obecnego tytułu można wnioskować, że chodzi o różne gatunki *Chalara*, tak jak w przypadku *Phytophthora*.

Wstęp jest napisany w syntetyczny, dobrze przemyślany sposób. Autor naświetla problem zamierania jesionu w Europie wskazując, że mimo różnych działań nie opracowano skutecznej metody ochrony drzewostanów jesionowych przed dużym nasileniem choroby. Z tej analizy wynika uzasadnienie podjęcia dalszych badań nad tym zjawiskiem chorobowym występującym epidemicznie w większości krajów Europy. Autor naświetla także, jakie doświadczenia podjęte zostały w ramach obecnej pracy. Wskazują one, że podjęte badania mają aspekt naukowo-poznawczy, ale dotyczą jednocześnie ważnego problemu dla gospodarki leśnej.

Przegląd literatury jest stosunkowo obszerny, obejmuje bowiem 30 stron tekstu. Ma to jednak uzasadnienie, gdyż problematyka zamierania jesionu jest od strony symptomologii i etiologii wielowątkowa i poświęcono jej w ostatnich latach kilkaset prac naukowych. Z dużym uznaniem dla Autora należy stwierdzić, że bardzo trafnie dokonał pogrupowania zagadnień w 18 podrozdziałach poświęconych *H. fraxineus*, *Phytophthora* spp., *Armillaria* spp., szkodnikom owadzi, czynnikom abiotycznym oraz uwarunkowaniom siedliskowym jesionu. Jest to przegląd dokonany na stosunkowo wysokim poziomie szczegółowości i wnikliwości, który znakomicie odzwierciedla obecny stan wiedzy oraz różnice obserwowane w różnych krajach Europy. Dobrze zostały uwypuklone istotne elementy z cyklu rozwojowego i dróg infekcji patogenów. Nie było by to możliwe bez szerokiego rozeznania Autora w dotychczasowej literaturze. Można by jedynie wskazać, że Autor nie wymienił jakie gatunki *Phytophthora* zostały stwierdzone w powiązaniu z nekrozami korzeni i podstawy pnia *F. excelsior* i jakie jest wykazane dotychczas znaczenie tych organizmów w odniesieniu do jesionu, przywołuje jedynie wybrane publikacje. Byłaby to istotna informacja w aspekcie

doboru gatunków *Phytophthora* do własnych doświadczeń. Należałoby ponadto objaśnić, że poglądowe ryciny przedstawione na str. 32 w istocie pochodzą z pracy Guesta i Granta (1991).

Cele pracy zostały dość jasno określone. Należały do nich: i) ocena wpływu preparatów zawierających fosforyn na zdrowotność jesionu wyniosłego, ii) zbadanie występowania synergii infekcji pędów jesionu wyniosłego przez *H. fraxineus* oraz korzeni przez patogeny z rodzaju *Phytophthora*, iii) określenie roli patogenów z rodzaju *Phytophthora* w uszkodzaniu korzeni drobnych jesionu wyniosłego oraz iv) dokonanie oceny wpływu fosforynu potasu oraz fosforynu amonu na wzrost *H. fraxineus* in vitro. Nie są to cele łatwe do osiągnięcia, zwłaszcza jeżeli zważyć specyfikę trofizmu, infekcji i patogeniczności *Phytophthora* spp. Adekwatnie do założonych celów pracy, Autor przedstawił cztery hipotezy badawcze. Dla realizacji celów pracy Autor zaplanował i przeprowadził trzy główne doświadczenia: szklarniowe, laboratoryjne i terenowe. Metodyka jest opisana w większości wystarczająco jasno i szczegółowo, jedynie miejscami rodzą się dodatkowe pytania, dotyczące toku postępowania.

Doświadczenie pierwsze, szklarniowe, przeprowadzone zostało z wykorzystaniem 240 dwuletnich jesionów. Pozytywnie należy ocenić fakt, że Autor samodzielnie zebrał odpowiedni materiał oraz wyhodował kultury patogenów, które wykorzystał w doświadczeniach. Jest to ważne, że kultury zostały świeżo pozyskane, gdyż w miarę przechowywania in vitro, większość patogenów zmienia swe uzdolnienia metaboliczne oraz stopień patogeniczności, co mogłoby zakłócać wartość otrzymanych wyników. Potwierdzono prawidłowość ich identyfikacji poprzez badania molekularne, zostały więc zachowane obecnie oczekiwane standardy. Doświadczenie to obejmowało dwanaście wariantów różniących się zastosowanym dolistnie preparatem fosforynowym (Actifos, Phos60) oraz użytymi do inokulacji patogenami (indywidualnie *H. fraxineus*, *Phytophthora* spp. oraz ich połączenie). Zapewniono również warianty kontrolne. Ewaluacja stanu zdrowotnego jesionów, według przyjętej skali, nastąpiła po 3 miesiącach. Pomierzono wówczas także liczne cechy biometryczne każdego testowanego jesionu. Uzyskane wyniki, poddane analizom statystycznym, przedstawione przejrzyście w licznych tabelach i na rycinach są interesujące naukowo, dostarczając wiele konkretnych danych doświadczalnych. Autor potwierdził między innymi wysoką patogeniczność *H. fraxineus* niezależnie od zastosowanych preparatów, jak i efekt oddziaływania *Phytophthora* w różnych wariantach na kształtowanie się cech korzeni i strzałek jesionów.

Na kanwie doświadczenia szklarniowego rodzi się kilka spostrzeżeń. W przeprowadzonym doświadczeniu jesiony zostały zainokulowane w ranę na strzałce tylko grzybem *H. fraxineus*, natomiast *Phytophthora* spp. zostały wprowadzone tylko do gleby, przez co miały one dużo mniejsze szanse wywołania objawów w ciągu 3 miesięcy niż *H. fraxineus*, na co wskazuje także Autor. Przy ocenie stanu zdrowotnego jesionów po 3 miesiącach uwzględniano tylko udział zamartwych pędów, stąd stan jesionów w wariantach z *Phytophthora* spp. wypadł bardzo korzystnie. Natomiast na fotografiach jesionów (Ryc. 12) w wariantach z *Phytophthora* widać dość wyraźnie znaczny udział sadzonek z symptomami chorobowymi na liściach, nie można wykluczyć, że to właśnie efekt oddziaływania *Phytophthora* spp. Poza tym, należy dostrzec problem w tym, że w trakcie ewaluacji, wśród analizowanych cech nie uwzględniono udziału martwych korzeni u poszczególnych sadzonek. Dane takie stanowiłyby zapewne bardzo istotny element do interpretacji wyników, gdyż jak określić rolę *Phytophthora* wprowadzonych do gleby bez oceny stanu zdrowotnego korzeni. Poza tym, niezadawalające jest przedstawienie od strony metodycznej i wynikowej problemu reizolacji testowanych gatunków z rodzaju *Phytophthora* z tkanek jesionu. Wykonano ich stosunkowo mało oraz nie podano z ilu sadzonek pobrano korzenie drobne. Wynik reizolacji w odniesieniu do *Phytophthora* (str. 75) ograniczony jest do stwierdzenia, że przeprowadzone czynności potwierdziły występowanie mieszanki patogenicznych lęgniowców z rodzaju *Phytophthora* w tkankach inokulowanych

jesionów. Jak należy rozumieć w tym ujęciu pojęcie „mieszanki”? Brak danych w powyższych kwestiach nie pozwala na bardziej dogłębne odniesienie się do roli *Phytophthora* u testowanych jesionów. Być może Autor pominął w tym miejscu pewne informacje, gdyż w dyskusji (str. 109) można się dowiedzieć, że była potwierdzana obecność *Phytophthora* także przy pomocy pułapek.

Doświadczenie drugie, laboratoryjne, miało na celu określenie wpływu różnych stężeń fosforynu potasu (Kalex) oraz fosforynu amonu (Actifos) na wzrost kolonii grzyba *H. fraxineus*. Doświadczenie przeprowadzono na pożywce PDA in vitro z zapewnieniem kontroli i analizy statystycznej. Wyniki wskazują, że jeden z preparatów (Kalex) w stężeniu zarówno 0.6% jak i 1.2 % działał ograniczająco na wzrost *H. fraxineus*, a różnice w porównaniu z kontrolą były istotne. Natomiast Actifos wpływał stymulująco na wzrost tego patogena. Jest to ważne osiągnięcie Autora w aspekcie stosowania tych preparatów w drzewostanach jesionowych.

Doświadczenie trzecie, terenowe, obejmowało badania prowadzone w Nadl. Chojnów w ponad 20-letnim drzewostanie jesionowym. Zasadniczym celem doświadczenia była ocena wpływu preparatu Actifos zawierającego fosforyn amonu na stan zdrowotny jesionu. W 2011 roku zinwentaryzowano i znumerowano 231 egzemplarzy *F. excelsior*. W maju 2012 i 2013 roku dokonano oceny ich witalności, a w lipcu 2012 i 2013 roku oceny defoliacji koron według przyjętej skali. W oparciu o te dwa kryteria obliczono syntetyczny wskaźnik uszkodzenia drzew. Przeprowadzono także badania fluorescencji chlorofilu liści jesionów dla oceny sytuacji stresowej drzew, wyliczając różne wskaźniki. W lipcu 2012 roku przeprowadzono dwukrotny oprysk nasad pni 38 jesionów preparatem Actifos, przy zapewnieniu takiej samej liczby drzew do celów porównawczych. Oceny dokonano dwa lata po tym zabiegu. Wyniki badań oraz obliczone wskaźniki są szczegółowo przedstawione w tabelach i na rycinach. Wynika z nich między innymi, że po dwu latach w grupie drzew traktowanych Actifosem obumarło o 15 % mniej drzew w porównaniu z kontrolą, natomiast zwiększył się stopień defoliacji u 65 % drzew podczas gdy w grupie kontrolnej u 25 % drzew. Do ważnych wyników należy także stwierdzenie, że po zastosowaniu Actifos zmniejszyła się wydajność fotosyntezy, co jest zgodne z wynikami innych badaczy odnośnie działania tego preparatu. Autor zamierzał dalej obserwować drzewa traktowane i kontrolne, jednak doszło do intensywnego wydzielania się drzew. Przeprowadzone dużym nakładem pracy doświadczenie dostarczyło, podobnie jak doświadczenia poprzednie, licznych konkretnych danych, którego wyniki będzie można zapewne wykorzystać do opracowania dalszych wariantów stosowania preparatów odpornościowych, których dużą zaletą jest to, iż w odróżnieniu od fungicydów można je stosować w warunkach naturalnych. Trzeba podkreślić, że badania te mają duży akcent pionierstwa, gdyż omawiane preparaty są wykorzystywane głównie do ochrony przed patogenami glebowymi. Tutaj mamy próbę ich zastosowania względem groźnego patogena atakującego w głównej mierze nadziemne części drzew. W odniesieniu do tego doświadczenia nasuwa się jedna uwaga. Generalnie stosuje się dwie drogi wprowadzania preparatów odpornościowych: dolistnie oraz do pni, ale w formie iniekcji. Według wielu badaczy, skuteczność poprzez oprysk pni uzyskuje się dopiero po dodaniu surfaktantu organo-krzemianowego (np. Pentra-bark/ USA). W pracy trudno znaleźć komentarz do tych obserwacji. Pewne wyniki Autora wskazują, że Actifos w sposób zastosowany przez Autora mógł jednak oddziaływać na traktowane drzewa.

Dodatkowym celem badań w omawianym drzewostanie było określenie występowania w strefie ryzosferowej organizmów z rodzaju *Phytophthora*. Po ich wyizolowaniu przeprowadzono metodyczne analizy morfologiczne i molekularne, które doprowadziły do identyfikacji trzech taksonów: *P. plurivora*, *P. megasperma* oraz *P. hungarica*. Jest to znaczące

osiągnięcie naukowe Autora. Szkoda, że nie kontynuowano tego cennego osiągnięcia dla stwierdzenia, czy gatunki te atakują korzenie *F. excelsior*, stając się jednym z ogniw w procesie chorobowym przyspieszającym zamieranie jesionów. W odniesieniu do tych osiągnięć wskazane jest uszczegółowienie informacji metodycznych, które pozwalałyby potwierdzić, że gatunki te faktycznie występowały w ryzosferze, a nie w glebie poza ryzosferą, obecne dane na taką ocenę nie pozwalają.

Dyskusja jest stosunkowo obszerna, pewne kwestie są powtarzane, co może wynikać z braku pogrupowania podobnych problemów. Generalnie jednak Autor w ciekawy i krytyczny sposób omawia i interpretuje otrzymane wyniki. Dyskusja potwierdza bardzo szerokie rozeznanie Autora w literaturze. W dyskusji nad wynikami doświadczenia szklarniowego szczególnie cenne jest zwrócenie uwagi na powtarzalność uzyskanych niektórych wyników dotyczących *Phytophthora* pomiędzy własnym doświadczeniem oraz wynikami innych badaczy, pomimo że trudno określić istotę tych zjawisk. Rozważania, że *Phytophthora* spp. mogą wpływać na indukowanie reakcji obronnych jesionu na patogeny infekujące nadziemne części są ciekawe, jednak musiało by mieć ono charakter systemiczny i dla potwierdzenia konieczne byłyby dalsze badania biochemiczne tkanek roślinnych. Można by podjąć próbę szerszego podbudowania tej istotnej hipotezy w oparciu o literaturę. Trzeba się zgodzić z Autorem, że mechanizm, który prowadzi do tego, iż w wariantach z *Phytophthora* jest więcej korzeni drobnych i większa jest ich długość jest niejasny i na obecnym etapie można tylko opierać się o przypuszczenia, zwłaszcza że nie badano stanu zdrowotnego korzeni. Natomiast rodzi się pytanie, czy można mówić o synergii działania testowanych czynników chorobotwórczych, jeżeli (str. 113) w wariacie zastosowania inokulacji tylko *H. fraxineus* 95 % jesionów obumarło, a w wariacie zastosowania *H. fraxineus* i *Phytophthora* spp. obumarło 90% jesionów. Być może o synergii można by mówić, gdyby jesiony pod wpływem obu grup patogenów szybciej zamierały, ale w tym celu trzeba byłoby dokonywać ocen wcześniejszych, np. po jednym i dwóch miesiącach. Problem synergii wymagałby więc uszczegółowienia. Na działanie ochronne preparatów fosforynowych Autor wskazuje przywołując także inne doświadczenia, w których zastosowano je prewencyjnie względem inokulacji *H. fraxineus*, co dało efekt zasadniczo różny w porównaniu z obecnym doświadczeniem szklarniowym. Cenne są przemyślenia co do kierunku dalszych badań dla wyjaśnienia uwypuklonych zagadnień oraz wpływu zastosowanych preparatów fosforynowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz Autor sformułował 12 wniosków, ustosunkował się także do założonych hipotez badawczych. W większości wnioski mają swe uzasadnienie. Natomiast do dwóch z nich konieczne są pewne uwagi: wniosek nr 3 - czy rzeczywiście wykazana została synergia pomiędzy użytymi do inokulacji organizmami oraz wniosek nr 8 - czy można stwierdzić, że preparaty fosforynowe chroniły drobne korzenie przed infekcjami *Phytophthora*, skoro nie badano ich stanu zdrowotnego ani stopnia zasiedlenia, a losowe reizolacje jednak potwierdziły ich obecność.

Bibliografia obejmuje 258 pozycji literatury polskiej i obcojęzycznej, głównie angielskiej. Jest to literatura wielostronna i odpowiadająca podjętej tematyce badawczej. Bardzo dobre rozeznanie Autora w literaturze znajduje odzwierciedlenie w całej rozprawie.

#### Uwagi ogólne

Praca napisana jest starannie, nieliczne usterki redakcyjne oraz drobne uwagi merytoryczne zostały zaznaczone na wydruku komputerowym. Dla przykładu:

- przy pracach wieloautorskich stosowane są trzy różne formy cytowania,

- w języku polskim raczej używana jest powszechnie nazwa fosetyl glinu niż fosetyl aluminium
- jeden z taksonów pisany jest w trzech różnych formach: *Phytophthora hungarica*, *Phytophthora sp. hungarica*, *Phytophthora taxon hungarica*, wskazane jest ujednoczenie
- prawidłowa nazwa antybiotyku to pimarycyna (pimaricin) (str. 51 oraz str. 85)
- na str. 79 winno być raczej fosforyn potasu niż 'fosforan potasu'
- na str. 122 błędnie jest podana łacińska nazwa opieńki północnej
- bibliografia winna być podana w ujednolicony sposób

#### Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Artura Paci oparta jest na własnych materiałach badawczych, jest oryginalnym rozwiązaniem postawionych problemów naukowych w oparciu o doświadczenia terenowe i laboratoryjne. Autor podjął się stosunkowo trudnych doświadczeń dla wyjaśnienia wybranych zagadnień dotyczących zamierania jesionu, z których część należy określić jako pionierskie. Organizmy z rodzaju *Phytophthora* z wielu względów są niezwykle trudnymi do badań, Autor uwzględnił je jednak w swych badaniach, nie ograniczył się tylko do głównego sprawcy zamierania jesionów, grzyba *H. fraxineus*. W rozprawie jasno określono cele, które zostały zrealizowane, odniesiono się również do postawionych hipotez badawczych. Uzyskano liczne interesujące wyniki, choć po części nie dają one jednoznacznej odpowiedzi, a wręcz pobudzają do dalszych badań, które, jak wynika z dyskusji, Autor już podjął wraz z innymi badaczami, uzyskując kolejne cenne wyniki. Trzeba dostrzec wyróżniające zaangażowanie Autora w przeprowadzenie doświadczeń, przedstawienie uzyskanych wyników i ich interpretację, co dowodzi dużej umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wzbudza podziw bardzo szerokie rozeznanie w literaturze nie tylko dotyczącej zamierania jesionu, ale także wielu zagadnień fizjologicznych i hodowlanych, co wykorzystane zostało w przeglądzie literatury oraz wielowątkowej dyskusji.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa mgr inż. Artura Paci spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim oraz przedkładam wniosek do Rady Naukowej IBL o jej dopuszczenie do publicznej obrony.



Tadeusz Kowalski