Prof. dr hab. Zbigniew Sierota
Instytut Badawczy Leśnictwa
Zakład Ochrony Lasu

Sękocin Stary, 09 sierpnia 2017 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marleny Baranowskiej-Wasilewskiej pt.:

”Wpływ warunków stresowych na podatność wybranych gatunków drzew leśnych w stosunku do *Heterobasidion annosum* sensu stricto”

wykonanej na Wydziale Leśnym Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Łakomego

(zlecenie WL-4000-4/13 z dnia 12 lipca 2017 r. Dziekana Wydziału Leśnego Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, prof. dr. hab. Piotra Łakomego)

Wstęp

Problematyka relacji miedzy suszą, czy szerzej zmianami klimatycznymi i tzw. globalnym ociepleniem, a stanem zdrowotnym drzewostanów jest przedmiotem zainteresowania większości badaczy na świecie. Wiele już wiadomo na ten temat, a jednak pozostaje wiele tajemnic Natury wymagających rozpoznania i zrozumienia. Bo dopiero zrozumienie, połączone z doświadczeniem, pozwoli na mądre gospodarowanie - w naszym przypadku w drzewostanach gospodarczych. One bowiem w pierwszej kolejności ulegają różnego rodzaju zaburzeniom, będąc efektem stresu i źródłem kolejnych stresów. Tematyka ta jest mi dość bliska, stąd z dużym zainteresowaniem zapoznałem się z prezentowaną rozprawą, przyjętymi hipotezami i uzyskanymi wynikami. W modelu doświadczenia Doktorantka przyjęła kilka różnych czynników stresowych, kilka najważniejszych gospodarczo roślin drzewiastych oraz różne izolaty patogena *Heterobasidion annosum*, sprawcy huby korzeni w naszych lasach. Już ten bogaty zestaw zmiennych wskazuje na trudny cel badawczy, jaki został podjęty w rozprawie oraz skomplikowany interpretacyjnie model choroby. Naukową analizę tych złożonych uwarunkowań, zachodzących w zainfekowanej i zestresowanej roślinie, Doktorantka postawiła ambitnie przed sobą jako cel recenzowanej rozprawy.

Omówienie pracy

Uwagi ogólne

Rozprawa ma klasyczny układ dysertacji naukowej. We „Wstępie”, stanowiącym około 3% jej treści, Doktorantka omawia pozycję taksonomiczną patogenów rodzaju *Heterobasidion*, nie podając tu jednak polskiej nazwy sprawców, ich rozmieszczenie, rośliny-

gospodarzy, jak i szkodliwość. Słusznie zauważa, że są przyczyną jednej z najważniejszych gospodarczo chorób infekcyjnych w Europie, a w Polsce przede wszystkim w drzewostanach na gruntach porolnych. Wymieniona liczba tysięcy publikacji odnoszących się do problematyki grzybów *Heterobasidion* wskazuje na ciągły niedostatek wiedzy na ten temat, także w kontekście zmian klimatycznych i możliwości adaptacyjnych patogena. Nie dziwi zatem cel badawczy postawiony przez Doktorantkę w prezentowanej rozprawie, a było nim rozpoznanie reakcji roślin-gospodarzy sześciu gatunków drzew rosnących w warunkach kontrolowanego stresu na infekcję powodowaną przez 10 sztucznie wprowadzonych izolatów *H. annosum* sensu stricto. Jako porównanie przyjęto podobną ocenę w uprawach gospodarczych. Autorka postawiła przed sobą cztery hipotezy – moim zdaniem dość niejednoznaczne - zakładając: 1. zróżnicowane obniżenie odporności roślin zależnie od rodzaju stresu, 2. zbliżony charakter reakcji roślin na infekcje, 3. wzrost podatności zainfekowanych roślin uważanych za odporne względem patogena, oraz 4. możliwość rekonstrukcji przebiegu infekcji pasożytniczej z wykorzystaniem stabilnych izotopów węgla, jako wskaźnika żywotności drzewa (dotyczy sosny zwyczajnej).

Zagadnienia te są nadzwyczaj interesująco zasygnalizowane, a ich rozstrzygnięcie będzie niezmiernie ważne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.

Rozdział „Przegląd literatury" stanowi około 9% treści rozprawy i zawiera wszystkie podstawowe informacje dotyczące przesłanek podjęcia tematu, jak i dotychczas uzyskanej wiedzy światowej na ten temat. Został on słusznie podzielony na grupy zagadnień odnoszących się do zakresu rozprawy – Stres, Redukcja systemów korzeniowych, Defoliacja, Susza, Nadmiar i niedobór składników pokarmowych oraz jako podrozdział uzupełniający - Stabilne izotopy. Przedstawiony przegląd literatury obejmuje najważniejsze informacje z tego zakresu – zarówno te inicjujące z lat 70. i 80., jak i współczesne. Doktorantka przestudiowała 155 pozycji literaturowych, wśród nich 142 w języku angielskim, 28 w języku polskim i 13 w innych językach. Zaprezentowane tło badań w pełni oddaje obraz stanu aktualnej wiedzy na temat stresu oraz przebiegu chorób infekcyjnych w roślinach i drzewostanach. Mam jednak wrażenie, że kolejność tych podrozdziałów, podobnie jak i omówienie wyników, mogłoby być zaprezentowane w odmiennej sekwencji, a zapoczątkowane Suszą, jako głównym źródłem stresu, wpływającym na redukcję systemu korzeniowego i zanik mikoryz oraz na kompensacyjne zjawisko defoliacji. Nawożenie jest odmiennym źródłem stresu, jakkolwiek wiąże się również w sposób oczywisty z aktywnością systemów korzeniowych i aparatu asymilacyjnego. Ta złożoność i synergizm reakcji zachodzących w roślinie powoduje, że trudno jest analizować całą kombinację możliwych interakcji źródeł stresu. Zrozumiałe jest

zatem oddzielne badanie poszczególnych czynników, co jednak komplikuje późniejszą interpretację uzyskanych wyników. Jednak dalsza analiza tekstu w części wynikowej rozprawy tłumaczy przyczyny braku wyników w wariancie Susza.

Rozdział 4. „Materiały i metodyka badań" został logicznie podzielony na następujące po sobie etapy realizacji badań i obejmuje: 4.1 Przygotowanie doświadczenia wraz ze wskazaniem badanych czynników stresowych, 4.2 Sposób wprowadzania sadzonek w warunki stresu – gdzie podano sposoby uzyskania danego czynnika, 4.3 Przygotowanie materiału infekcyjnego w postaci kultur 10 izolatów patogena, 4.4 Założenie doświadczenia oraz wskazanie jego wariantów, przy czym chyba zbędnie wyodrębniono podrozdział kontrolny 4.5 (infekcja bez stresu), 4.6 Doświadczenie porównawcze w uprawach gospodarczych Nadl. Smolarz, 4.7 Prace laboratoryjne związane z oceną wielkości przebarwienia po inokulacji, 4.8. Analizy statystyczne oraz 4.9. Pilotażowe badanie procesu infekcyjnego z zastosowaniem izotopów węgla. Refleksje dotyczące zagadnień metodycznych przedstawię w Uwagach szczegółowych recenzji.

Rozdział 5. „Wyniki" stanowi około 63% treści rozprawy - co nie dziwi, biorąc pod uwagę rozmach podjętych badań, ich wielowątkowość, a także skrupulatność w zaprezentowaniu uzyskanych rezultatów. Jako miarę tempa przerastania drewna przez grzybnię wprowadzonego izolatu patogena przyjęto wielkość strefy przebarwienia drewna nad- i pod miejscem inokulacji. Można domniemywać, że wielkość ta była uznana jako pośredni wskaźnik stopnia podatności drewna na rozkład, rozumiany w kontekście odporności danego osobnika na infekcję *H. annosum*. W kolejno następujących po sobie podrozdziałach Doktorantka przedstawiła i udokumentowała: jako podrozdział 5.1 przebieg nadzwyczaj rozbudowanych doświadczeń infekcyjnych (61 stron), oraz nieco skromniej - 5.2 doświadczenia porównawcze w uprawach (3 str.). W podrozdziale 5.3 porównała rozwój grzybni w drewnie, podsumowując powyżej zaprezentowane wyniki oraz w podrozdziale 5.4 omówiła wyniki dotyczące określenia początku procesu infekcyjnego metodą izotopową z wykorzystaniem analiz dendrochronologicznych.

Rozdziały 6. „Dyskusja" oraz 7. „Wnioski" łącznie stanowią około 12% treści rozprawy i są oczekiwanym omówieniem wyników badań własnych na tle danych literaturowych oraz ich rekapitulacją. Doktorantka wykazała, że warunki stresowe - zależnie od źródła stresu, gatunku drzewa a także rodzaju izolatu patogena - w warunkach opisywanych doświadczeń w zróżnicowanym stopniu wpłynęły na rozwój grzybni *H. annosum* w drewnie, świadcząc o równie zróżnicowanym zasiedlaniu tkanek, a pośrednio o stopniu podatności lub odporności danych egzemplarzy danych gatunków drzew. Najbardziej

spektakularny efekt uzyskano w przypadku stresu wynikającego z nadmiaru azotu w podłożu dla wszystkich gatunków drzew. Z kolei redukcja systemu korzeniowego zwiększyła wielkość strefy przebarwienia u modrzewi, a także dębów. Wpływ warunków sztucznej suszy okazał się niemożliwy do interpretacji z uwagi na zamarcie drzew oraz grzybni, co – jak podaje Doktorantka – było efektem błędu metodycznego, stad w ocenach łącznych ten stres został pominięty. Wpływ defoliacji został oceniony jako nieistotny, jakkolwiek stwierdzono pewne różnice w wielkości strefy przebarwienia pomiędzy wariantami – u dębów była ona największa.

Doktorantka podaje, że potwierdziła hipotezę dotyczącą obniżenia odporności drzew na infekcję pasożytniczą, zróżnicowaną zależnie od źródła stresu i stwierdza, że „*długość przebarwienia spowodowanego rozwojem patogena...była większa u roślin rosnących w warunkach stresu, niż w zakażonych drzewach wariantu kontrolnego*”. Tezę tę dokumentuje licznymi przykładami własnych badan, jak i wzmacnia danymi literaturowymi. Również potwierdzona została hipoteza, że w warunkach stresu gatunki uważane za bardziej odporne na infekcje zatracają tę zdolność – wykazano, że największe przebarwienia w warunkach stresu powstały w drewnie dębu, a w warunkach bezstresowych – u brzóz. Uzyskano interesujące wyniki dotyczące rozwoju przebarwień w drewnie świerka – cechowały je największe różnice między wariantami doświadczenia a kontrolą względną, przy czym, jak podaje Doktorantka: „ *tempo rozwoju grzybni w drewnie drzewek bez stresu było szybsze, niż u drzew rosnących w uprawie gospodarczej, a także w doświadczeniu w warunkach stresu*”. Na uwagę zasługują wyniki badań w aspekcie zróżnicowania aktywności poszczególnych izolatów w tworzeniu strefy przebarwienia. Ogólnie, jako najbardziej „agresywne” uznano izolaty: 98316 pobrany pierwotnie z porażonego drzewa oraz 280115 izolowany z pniaka, co może mieć znaczenie interpretacyjne. Doktorantka szczegółowo omawia aktywność izolatów w tworzeniu strefy przebarwienia zależnie od źródła stresu oraz gatunku drzewa. Uzyskane wyniki uwiarygadnia informacja o uzyskaniu z przebarwionego drewna grzybni tych samych izolatów, które zastosowano przy inokulacji strzałek.

Interesująco i logiczne zaprezentowano przejście z badań infekcyjnych do analizy izotopowej drewna (str. 112-113), omawiając kompleksowość oddziaływania wielu źródeł stresu na roślinę, co wyraża się różnym udziałem węgla w słoju rocznym, jako wypadkową wymiany gazowej w okresie poprzedzającym badany przyrost roczny. Ocena stosunku ^{13}C do ^{12}C pozwala bowiem na wyjaśnienie relacji zachodzących pomiędzy asymilacją, gromadzeniem substancji zapasowych czy transpiracją. Doktorantka podaje jednak, że uzyskane wyniki nie pozwoliły na potwierdzenie użyteczności tego wskaźnika jako miernika

redukcji systemu korzeniowego, przy czym rozumiem, że ma na myśli redukcję wynikającą z obecności patogena w korzeniach drzew zamarłych w uprawie. Skutkowało to odrzuceniem hipotezy zakładającej możliwość rekonstrukcji przebiegu infekcji *H. annosum*.

Uwagi szczegółowe

Jak w każdej pracy wielowątkowej, tak i w prezentowanej rozprawie zauważyć można pewne uchybienia, niejasności lub wątpliwości. Przedstawione poniżej uwagi szczegółowe wyrażam z obowiązku recenzenta, a także w przekonaniu, że przy przygotowywaniu rozprawy do druku zostaną poszerzone, uzupełnione lub inaczej sformułowane. Zwracam przy tym uwagę, aby zwrócić większe baczenie na szczegóły metodyczne, gdyż te zaprezentowane w rozprawie nie zawsze są wystarczająco precyzyjne. Jako przykłady podaję:

- str. 21 – Ile było donic w każdym wariancie, bo ze str. 25 (pod zdjęciem) wynika, że każdym izolatem infekowano tylko po 5 drzewek każdego gatunku – czyli po 1 donicy, czy po 1 drzewku z 5 donic??

- „sadzonki podlewano według potrzeb" – jak określano potrzeby podlewania?;

- str. 22 –system korzeniowy zredukowano o 1/3 długości – każdy korzeń osobno, sekatorem, prostując je przy tym, czy ucięto 1/3 całej bryły korzeniowej;

- czy odcięte korzenie były umykoryzowane, a jakie pozostające?

- jak potem ponownie ułożono korzenie w donicy i czy w tym samym substracie?;

- czy redukcja aparatu asymilacyjnego, czyli igieł/liści o 2/3 ich liczby była równomierna na pędach, czy pozostawiano tylko 1/3 od wierzchołka, jak na ryc. 2? Nie podano jak przygotowano wariant kontrolny;

- szkoda, że nie zastosowano wariantu z 2-3 stresami równocześnie - być może z braku materiału - ale wówczas: jakie były przesłanki badania aż 10 izolatów patogena – chyba ze to element innych badań nad zróżnicowaniem geograficznym izolatów?;

- str. 25 dopiero tu pojawia się polska nazwa *H. annosum* - korzeniowiec sosnowy

– sugerowałbym podanie kodów wariantów już na tej stronie, co ułatwiłoby dalsze odczytywanie rycin;

- str. 28 – jak duże były pobrane fragmenty drewna zwane żargonowo „kawałkami"

- czy inokula pobierano bliżej otworu inokulacyjnego, czy ze środkowej strefy przebarwienia?

- czy 2 min. wytrząsanie strefy przebarwienia w podchlorynie nie wpłynęło niszcząco na grzybnię patogena (por. udatność reizolacji na str. 112), zwłaszcza że oceniano jej obecność tylko w 2 na 5 sadzonek? Czy wszędzie uzyskano owocowanie konidialne

patogena? jak potwierdzono tożsamość danego izolatu – tylko na podstawie obecności grzybni lub konidioforów z konidiami z pobranego 5 mm fragmentu?

- czy pomiar długości przebarwienia wykonano dla wszystkich prób tego samego dnia? Czy wartość pomiaru uwzględniała średnicę otworu inokulacyjnego?

- str. 29 – do analizy izotopowej wybrano 3 zdrowe i 3 zamarłe sosny. Nie podano, co było przyczyną zamarcia tych drzew – jeśli korzeniowiec, to brak informacji potwierdzającej oraz symbolu izolatu. Czy w Nadl. Skwierzyna był to izolat oznaczony jako 15/1?.

- str. 32 – ryc. 7, 9 i 10 podają uśrednione wyniki dotyczące długości przebarwienia w drewnie różnych lub wszystkich gatunków drzew – iglastych i liściastych. Jeżeli już decydować się na takie uśrednianie, to powinno ono być podane być raczej w Podsumowaniu wyników, a nie na ich początku; ryc. 8 lepiej to ilustruje;

- str. 33 – Tab. 4 i inne - brak danych dla kontroli bezwzględnej „0" (por. str. 25), co wyjaśniłoby ewentualne przebarwienia traumatyczne;

- str. 38-39 – skoro wyłączono Suszę z przyczyn technicznych, to może w ogóle ten wariant nie powinien być włączony do rozprawy – redukcja korzeni i defoliacja omówione łącznie mogłyby być pośrednią informacją o efekcie suszy, zwłaszcza że ten wariant (brak podlewania w szklarni) i tak byłby trudny do oceny. Co byłoby jego miarą - więdnięcie liści? zamieranie mykoryz?. Może wariant Susza byłby do wykorzystania i omówienia na podstawie badań polowych?;

- str. 41 – podrozdział 5.1.2 liczy 28 stron tekstu i zawiera nienumerowane, kolejne podrozdziały dotyczące badanych źródeł stresu, w tym także Suszy (str. 67-69), co w kontekście wcześniejszych stwierdzeń (str. 39 – wyłączenie stresu suszy, czy str. 104) powoduje pewien zamęt myślowy;

- chyba zbyt bezpośrednio Doktorantka łączy „*różnice w podatności drzew na rozwój grzybni*" z różną długością przebarwień powstałych w wyniku sztucznej infekcji. Grzybnia korzeniowca sosnowego rozwija się u kilkuletnich drzew głównie w strefie przykambialnej oraz w zewnętrznych komórkach bielu, przemieszczając się zwykle od strony systemu korzeniowego. Strzępki wydzielają w tej fazie infekcji agresywne enzymy i nie jestem przekonany, że w okresie 3 miesięcy drzewko jest w stanie indukować reakcje obronne wynikające z genetycznie zakodowanych procesów odpornościowych – przebarwienie jest chyba w tej fazie wypadkową działania enzymów i denaturacji tkanek. Chyba że Doktorantka wykonywała ocenę anatomiczną pobranych fragmentów i stwierdziła np. rozpad cewek;

- str. 70 – jakie były przesłanki zastosowanej kolejności opisu poszczególnych gatunków drzew?;

- str. 96 – podrozdział 5.3. - w zamyśle syntetyczny - jest jednak opisany zbyt skrótowo, a układ danych uśrednionych na ryc. 39 nie ułatwia porównania, zwłaszcza że w legendzie nie dojaśniono, że kolumny wyrażają stosunek długości przebarwień drzewek infekowanych do kontrolnych i są to wartości względne;

- str. 98 – podrozdział 5.4: analiza przyrostów rocznych (ryc. 40 i 42) wskazuje, że w Nadl. Międzychód drzewa które zamarły, przez cały okres 15 lat cechowały wyższe wartości przyrostu rocznego, niż drzewa zdrowe, natomiast w Nadl. Skwierzyna sytuacja była odwrotna i to przez cały ten okres. Odczuwam brak interpretacji tego zjawiska w kontekście i opadów, i wartości dyskryminacji C/C;

- str. 115 – Wnioski; mają zbyt ogólnikowy charakter pozbawiony elementu wynikowego – oczekiwałbym, że np. wniosek 1 wskaże który rodzaj stresu spowodował obniżenie odporności i u której rośliny najbardziej? Z kolei wnioski 5 i 6 wyrażone są w trybie warunkowym i odnoszą się do drzewostanów. Wniosek 8 jest sformułowany skrótowo i w sposób niejasny.

Czytanie tej wielowątkowej, ale bardzo interesującej pracy, utrudniają nieco zbyt długie akapity oraz układ tekstu w stosunku do objaśniających go tabel i rycin – niejednokrotnie dzielą je 2 strony z pustymi miejscami, co wynika chyba z przyjętego dużego formatu rycin (z uwagi na dużą liczbę danych?) oraz długich tabel z grupami homogenicznymi (które mogłyby być zawarte w załączniku).

Powyższe dość szczegółowe uwagi recenzenta mają przede wszystkim charakter redaktorski i w niczym nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej zaprezentowanych badań. Pewne skróty myślowe wynikają zapewne z komasacji informacji, a ich uszczegółowienie zwiększyłoby znacznie objętość tej 130-stronicowej rozprawy. Intencją recenzenta było wskazanie pewnych niedomówień, które łatwo będą usunięte przy przygotowaniu treści rozprawy do druku.

Podsumowanie

Doktorantka postawiła przed sobą bardzo ambitne cele, nie podejmowane dotychczas w znanej mi współcześnie literaturze. Wykonała skomplikowany, ale czytelny zestaw analiz, których wyniki pozwalają na wskazanie dla badanych roślin najważniejszych czynników stresowych. Postawione hipotezy Doktorantka zweryfikowała, omówiła na tle dostępnej literatury oraz postawiła 8 wniosków. Założony zakres badan w pełni zrealizowała, wykazując dobrą znajomość zagadnień zarówno z zakresu teorii stresu, jak i patogenezy

Heterobasidion annosum. Zaprezentowała dobrą umiejętność warsztatu naukowego, postawiła ciekawe hipotezy i logicznie je zweryfikowała. Uzyskane wyniki starannie przedyskutowała, a swoje badania zakończyła postawieniem ważnych tez. Jednoznacznie określa to Doktorantkę jako dojrzałego pracownika naukowego.

Przedstawiając powyższą opinię stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. **Marleny Baranowskiej-Wasilewskiej** pt.: *"Wpływ warunków stresowych na podatność wybranych gatunków drzew leśnych w stosunku do* Heterobasidion annosum sensu stricto*"* w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w obowiązującej Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję równocześnie o wyróżnienie zaprezentowanej rozprawy.

Prof. dr hab. Zbigniew Sierota