Dr hab. inż. Robert Jankowiak, prof. URK
Katedra Ochrony Ekosystemów Leśnych
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków, 19.01.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Macieja Hałuszczaka pt. „Skuteczność wybranych metod ochrony przed osutką wiosenną sosny w nalotach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na terenie Nadleśnictwa Skwierzyna".

Podstawą wykonania recenzji jest pismo prof. dr hab. Piotra Łakomego – Dziekana Wydziału Leśnego i Technologii Drewna z dnia 22 listopada 2021 r. (WL-4000-17/2009). Rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Hałuszczaka została wykonana w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu pod opieką prof. UPP dr hab. inż. Jolanty Behnke-Borowczyk. Praca ma strukturę tradycyjnego opracowania i obejmuje 108 stron w tym 3 tabele 23 ryciny oraz 455 pozycji cytowanej literatury.

Rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Hałuszczaka dotyczy problemu ochrony samosiewu sosnowego przed wiosenną osutką sosny. Sosna zwyczajna jest podstawowym gatunkiem lasotwórczym w naszym kraju a jej udział wynosi prawie 60%. Lasy sosnowe w ostatnich latach są narażone na działanie wielu szkodotwórczych czynników. Silne osłabienie sosen wynika m.in. ze zmian klimatycznych co sprzyja masowemu pojawowi szkodliwych owadów, patogenicznych grzybów oraz pasożytniczych roślin kwiatowych. Rosnący trend temperaturowy oraz zmiany w dynamice struktury opadów mogą spowodować, że niektóre gatunki grzybów zwiększą swoją aktywność patogenną oraz rozszerzą areał swojego występowania i zakres roślin żywicielskich. Takimi patogenami są z pewnością grzyby reprezentujące rodzaj *Lophodermium* i *Cyclaneusma*. Grzyby te są znanymi sprawcami groźnych chorób igieł drzew rodzaju *Pinus*. Pomimo tego, że ukazało się wiele prac dotyczących symptomatologii i etiologii osutek na sośnie zwyczajnej wiele aspektów nie zostało jeszcze wyjaśnionych. Dotyczy to zwłaszcza metod ochrony sosny zwyczajnej przed osutkami sosny, co jest szczególnie ważne dla praktyki leśnej. Wyniki wielu badań z ostatnich lat nad osutką sosny górskiej doprowadziły do odkrycia nowych gatunków grzybów oraz

wykrycia nowych patogenów igieł. Jestem pewien, że wiele nowych informacji mogą dostarczyć także badania nad osutkami na sośnie zwyczajnej, zwłaszcza w obliczu obserwowanych zmian klimatycznych. Pomimo często obserwowanego i udanego naturalnego odnowienia sosny, w Polsce rzadko wykorzystuje się samosiew sosnowy do odtworzenia drzewostanów. Naturalna regeneracja lasu jest istotnym elementem zrównoważonej gospodarki leśnej, zwłaszcza że odnowienie naturalne pozwala na zachowanie lokalnych populacji drzew leśnych, które mogą lepiej przezwyciężać zaburzenia biotyczne i abiotyczne. Poza tym, badania zbiorowisk grzybów zasiedlających igły sosny zwyczajnej wykonane w czasach sprzed ery biologii molekularnej i biotechnologii mogą być nieprecyzyjne i niepełne, co z pewnością wymaga rewizji.

Wobec powyższych argumentów wybór tematyki badań objętych przedstawioną pracą doktorską jest trafny i aktualny. Oceniam je wysoko zarówno z naukowego, a przede wszystkim z aplikacyjnego punktu widzenia.

W swoich badaniach mgr inż. Maciej Hałuszczak zajął się analizą skuteczności czterech metod ochrony nalotów sosny zwyczajnej przed wiosenną osutką sosny oraz szerzej badał zbiorowiska grzybów zasiedlających igły samosiewu sosnowego. Praca doktorska obejmuje zarówno eksperyment terenowy jak i prace laboratoryjne.

Tytuł rozprawy doktorskiej uważam za niezbyt prawidłowy. Doktorant nie badał wiosennej osutki sosny jako choroby a raczej analizował grzyby zasiedlające igły, w tym sprawcę tej choroby grzyba *Lophodermium seditiosum*. Tytuły alternatywne, np. „Mykobiota igieł nalotu sosnowego (*Pinus sylvestris* L.) poddanego wybranym zabiegom ochronnym na terenie Nadleśnictwa Skwierzyna" lub „*Lophodermium seditiosum* i inne grzyby osutkowe zasiedlające igły nalotu sosnowego (*Pinus sylvestris* L.) potraktowanego wybranymi zabiegami ochronnymi" byłyby bardziej adekwatne do zwartości czytanej pracy.

W układzie rozprawy doktorskiej znajdują się: 1. Wstęp; 2. Cel badań i hipotezy badawcze; 3. Przegląd literatury – podzielony na trzy podrozdziały opisujące problematykę związaną z naturalnym odnowieniem sosny, wiosenną osutką sosny oraz sposobami ochrony sosny przed osutką; 4. Materiały i metody z opisem powierzchni badawczych, przeprowadzanego doświadczenia terenowego oraz prac laboratoryjnych związanych z analizą zbiorowisk grzybów zasiedlających igły. Podrozdział 4.2. - Opis powierzchni badawczych mógłby być połączony z podrozdziałem 4.4. - Prace terenowe. Podrozdział 4.2. nie opisuje bowiem powierzchni badawczych ale sposób wykonania doświadczenia, zastosowane metody,

itd. Podrozdział 4.3. - Wybrane warunki meteorologiczne – wilgotność względna i temperatura powietrza przy gruncie lepiej pasuje do rozdziału wyniki; 5. Wyniki – podzielone na podrozdziały omawiające cechy biometryczne nalotu sosnowego w kolejnych okresach po wykonaniu zbiegów ochronnych oraz na podrozdziały omawiające zbiorowiska grzybów i lęgniowców w igłach samosiewu w poszczególnych okresach badawczych; 6. Dyskusja; 7. Wnioski i Literatura.

W bardzo skromnym **wstępie** (dwie strony) Autor wprowadza w podejmowane zagadnienie badawcze i uzasadnia potrzebę badań nad osutką sosny w naturalnych odnowieniach sosnowych. Po przeczytaniu tego rozdziału mam pewien niedosyt. Jest on po prostu zbyt krótki a większość poruszonych w nim wątków powinna być bardziej rozwinięta. Dla przykładu Doktorant pisze, że *L. pinastri* jest sprawcą wiosennej osutki sosny ale w świetle aktualnych badań nie jest to przecież prawdą. Doktorant pisze dalej, że głównym sposobem ochrony sadzonek przed wiosenną osutka sosny są opryski chemiczne. Nie mogę zgodzić się z takim stwierdzeniem ponieważ podstawowym sposobem ochrony drzew przed tą chorobą są jednak zabiegi profilaktyczne, pozachemiczne. Kolejny przykład, Autor pisze, że chore na wiosenną osutkę sosny rośliny stają się podatne na inne patogeny. Tutaj Doktorant mógłby podać o jakie patogeny chodzi.

Autor już w pierwszym akapicie rozdziału podaje pełną nazwę rodzajową i gatunkową sosny zwyczajnej – *Pinus sylvestris*. Później nie ma już potrzeby podawania pełnej nazwy rodzajowej. Nazwa powinna być skrócona do *P. sylvestris*.

W pracy stosowane są dwie formy nazwy choroby: osutka wiosenna sosny i wiosenna osutka sosny. Nazwa choroby powinna być ujednolicona w całej pracy. Moim zdaniem prawidłowa nazwa to wiosenna osutka sosny (według podręcznika fitopatologia leśna autorstwa prof. Karola Mańki).

Rozdział 2. Cel badań i hipotezy badawcze. Generalnie od strony sformułowania celów oraz hipotez badawczych oceniana rozprawa zasługuje na ocenę pozytywną, jednak uważam, że hipotezy można sformułować bardziej precyzyjnie. Moje propozycje przedstawiam poniżej (do rozważenia i wykorzystania przy przygotowywaniu publikacji do druku):

Hipoteza 1. Ponieważ Doktorant nie badał nasilenia występowania wiosennej osutki na nalotach a jedynie stwierdzał obecność sprawcy tej choroby w igłach hipoteza ta mogłaby brzmieć: Zastosowanie różnych metod ochronnych wpływa na obecność *L. seditiosum* w igłach

nalotu sosnowego a metoda hylotechniczna będzie zmniejszała obecność tego patogenu w igłach równie skutecznie co chemiczna metoda ochrony.

Hipoteza 2. Co oznacza zdanie „*Lophodermium seditiosum nie będzie dominował w zbiorowiskach grzybów osutkowych porażających igły sosny zwyczajnej*". To znaczy, że jakieś inne patogeny zamiast niego mają dominować w chorych igłach? Przecież jak igły chorują na wiosenną osutkę sosny to wiadomo, że w zbiorowisku musi dominować *L. seditiosum*. Proponuje: Mykobiota igieł samosiewu sosnowego zależy od: a) rodzaju wykonanego zabiegu ochronnego; b) rodzaju badanych igieł (igły martwe i igły bezobjawowe); c) siedliska (BMśw, Bśw).

Hipoteza 3. Proponuję: Zabiegi ochronne przeprowadzone w nalotach sosnowych spowodują zwiększenie przeżywalności oraz polepszą cechy biometryczne drzewek poddanych zabiegom.

Rozdział 3. Przegląd literatury. Został przygotowany w sposób syntetyczny i uporządkowany, w oparciu o bogatą literaturę polską jak i zagraniczną. Pokazuje on szeroką teoretyczną wiedzę doktoranta, zarówno z zakresu hodowli lasu jak i fitopatologii leśnej. Jedynie w rozdziale dotyczącym wiosennej osutki sosny powinny znaleźć się bardziej precyzyjne informacje dotyczące występowania rodzaju *Lophodermium* na *P. sylvestris* i innych gatunkach rodzaju *Pinus* w Polsce.

Uwagi szczegółowe dotyczące rozdziału:

Strona 18: cytowana pozycja literatury - Santiago i in. 2001 nie znajduje się w spisie literatury.

Strona 20: zdanie „*Hanso i Drenkham (2007) chorobę tą uważa się za czynnik doboru naturalnego*". Powinno być: Hanso i Drenkhan (2007) chorobę tę uważają za czynnik doboru naturalnego".

Strona 22: zdanie „*Ponadto autorzy….sugerują, że występowanie osutek porażających sosnę wynika z ….".* Osutki nie porażają sosny ale czynią to sprawcy choroby czyli w tym przypadku *L. seditiosum* lub *C. minus*.

Fragment tekstu rozpoczynający się od zadnia „*Do 1978 roku uważano, że wszystkie grzyby rodzaju Lophodermium występujące na sośnie należą do gatunku Lophodermium pinastri…"* jest niejasny. Proponuję go zamienić na: Przez wiele lat różne formy morfologiczne *L. pinastri* występujące na sośnie zwyczajnej były traktowane jako jeden gatunek. Dopiero Minter i inni (1978), obok *L. pinastri sensu stricto* wyodrębnili na igłach sosny zwyczajnej jeden nieznany wcześniej gatunek - *L. seditiosum,* oraz dwa znane już gatunki *L. conigenum* i

L. pini-excelse. Trzy lata później z igieł sosny zwyczajnej z Oregonu opisano kolejny gatunek - *L. staleyi* (Minter 1981; Minter, D.W. 1981. *Lophodermium* on pines. Mycological Papers. 147: 1–54.). Wśród nich za najbardziej groźnego dla sosny zwyczajnej uznano *L. seditiosum* (Diwani i Millar 1990).

Fragment rozpoczynający się od zdania „*W kolejnych latach wyróżniono 5 gatunków grzybów zasiedlających igły starszych drzew: Lophodermium pinastri, L. seditiosum jako gatunki najbardziej rozpowszechnione w kraju, oraz L. conigenum , L. pini-excelsae, L. staleyi, jako gatunki mniej znane w Polsce*". Niestety Doktorant nie powołuje się tutaj na żadne artykuły. Naprawdę chciałbym się dowiedzieć gdzie i przez kogo zostały stwierdzone na igłach sosny zwyczajnej w Polsce, takie gatunki jak *L. conigenum, L. pini-excelsae* i *L. staleyi*. Brakuje w tym miejscu precyzyjnych danych jakie gatunki rodzaju *Lophodermium* zostały do tej pory stwierdzone na igłach *P. sylvestris* w Polsce. Korzystne by było podanie także jakie gatunki *Lophodermium* zostały zidentyfikowane na *P. mugo* w Polsce. W ostatnim czasie pojawiło wiele publikacji z tego zakresu. Warto aby Doktorant włączył do przeglądu ostatnio wydaną publikację dotyczącą grzybów infekujących *P. mugo* w Tatrach (Bartnik C, Kowalski T, Bilański P, Zwijacz-Kozica T. 2021. Fungi associated with disease symptoms on *Pinus mugo* needles in the Polish Tatra Mountains. Plant and Fungal Systematics 66(1): 53-65).

Strona 23: Moim zdaniem używanie słowa patogen w odniesieniu do całego rodzaju *Lophodermium* jest nieuprawnione, tym bardziej, że wiele gatunków z tego rodzaju może występować jako saprotrofy lub endofity.

Strona 26 Doktorant w tej części wymienia grzyba *Sydowia polyspora* jako patogena słabości igieł. Moim zdaniem lepiej nazwać go jako patogena słabości na igłach. Poza tym, gatunek ten na tej samej stronie jest omawiany pod nazwą *Sclerophoma pythiophila* co może sugerować, że są to dwa oddzielne gatunki. *Sydowia polyspora* jest nie tylko patogenem słabości bo Talgø et al. (2010) udokumentowali tego grzyba jako sprawcę "current season needle necrosis (CSNN)" na igłach *Abies procera, A. nordmanniana* i *A. grandis* w Danii.

Rozdział 4 Materiały i metody zawiera opis powierzchni badawczych oraz przeprowadzonych eksperymentów co pozwala zorientować się w jakich warunkach i w jaki sposób były prowadzone doświadczenia. Moim zdaniem w podrozdziale 4.1. przydałaby się mapka z naniesionymi powierzchniami doświadczalnymi, a także rycina jednego bloku doświadczenia. W podrozdziale 4.3. Doktorant umieszcza dwa wykresy jednak nie wiadomo jakie dane są prezentowane na wykresach. Czy są to dane dla wszystkich wykonanych pomiarów czy są to wartości dobowe temperatur i wilgotności, średnie dobowe dla wszystkich

powierzchni doświadczalnych. Ponieważ to warunki pogodowe sterują rozmiarem występowania wiosennej osutki sosny lepszym rozwiązaniem byłoby przedstawienie wartości średnich miesięcznych wartości temperatur i wilgotności względnej w badanym okresie z zaznaczeniem jeszcze pór roku (wiosna, lato, jesień, zima). Dodatkowo można podać także udział (%) dni wilgotnych i bardzo wilgotnych oraz bardzo suchych i suchych w poszczególnych miesiącach.

Moje zastrzeżenie do metodyki dotyczy braku monitoringu występowania objawów chorobowych wiosennej osutki sosny na samosiewie w badanym okresie oraz nasilenia występowania tej choroby w zależności od zastosowanej metody. Moim zdaniem Doktorant stosując metodę NGS nie do końca badał występowanie choroby tj. wiosennej osutki sosny a stwierdzał jedynie obecność w igłach sprawcy choroby. To nie jest tożsame. Praca nie dostarcza żadnych informacji o skali nasilenia występowania objawów chorobowych związanych z wiosenną osutką sosny na samosiewie sosnowym w poszczególnych latach. Jest to o tyle ważne, że *L. seditiosum* podobnie jak *Cyclaneusma minus* może występować w fazie utajonej, co zresztą Doktorant sam wykazał w swoich badaniach. Czy w badanym okresie Doktorant w ogóle stwierdzał tę chorobę na igłach nalotu, zwłaszcza w początkowym okresie trwania eksperymentu, gdy było sucho?

Do analizy zbiorowisk grzybów zasiedlających igły (podrozdział 4.5.) z każdej sadzonki pobierano jesienią igły zielone oraz martwe. Należało by doprecyzować co oznacza okres jesienią. Czy to był wrzesień/październik czy listopad/grudzień? Czy jesienią na tegorocznych igłach nie było żadnych objawów przebarwień lub plamek infekcyjnych? Właśnie takie objawy występują w pierwszych stadiach choroby. Czy Doktorant analizował igły z takimi objawami (czyli igły chore)? Można przypuszczać, że wówczas frekwencja występowania *L. seditiosum* w zbiorowiskach grzybów zasiedlających takie igły byłaby najwyższa. Doktorant pobierał jesienią igły martwe co jest trochę dziwne gdyż w okresie tym powinny występować na samosiewie głównie igły chore. Wydaje się, że igły martwe powinny być zbierane wiosną kiedy zaczynają opadać lub wykruszać się (na jednorocznych sadzonkach).

Doktorant podaje, że jesienią z każdego wariantu pobierano igły z 15 sosen. Z każdej sadzonki pobierano igły, które później były segregowane na igły zielone oraz martwe. Doktorant powinien tutaj doprecyzować: ile igieł było pobranych z każdego drzewka, ile igieł zielonych i martwych pobrano do badań, jaki rocznik igieł był pobierany (tegoroczne, zeszłoroczne, dwuletnie – w przypadku zbierania materiału w roku i dwa lata po wykonaniu zabiegów). Czy martwe igły miały objawy chorobowe charakterystyczne dla wiosennej osutki

sosny (tzn. objawy zniekształcenia igieł, obecność miseczek sprawcy, itd.). Bardzo przydatne byłoby zamieszczenie w pracy zdjęć takich igieł oraz zdjęć chorującego samosiewu? Dodatkowo w pracy brakuje informacji dotyczącej liczby produktów PCR, które zsekwencjonowano.

Chociaż sekwencje obszaru ITS, są powszechnie używane do identyfikacji gatunków grzybów, nie ma konsensusu co do progu procentowej identyczności na poziomie gatunkowym. Jednak przyjęty przez doktoranta % próg podobieństwa uzyskanej sekwencji z sekwencją referencyjną tj. 98-100% jest chyba zbyt wysoki choć jest on stosowany w tego typu pracach. Dla regionu ITS, Vu i in. (2019) udokumentowali, że optymalny próg podobieństwa dla rozróżnienia taksonów na poziomie gatunkowym wynosi powyżej 99,6%. Dodatkowo badania te wykazały, że 17% gatunków nie da się odróżnić na podstawie markera genetycznego ITS. Dla wielu grup grzybów, zwłaszcza tych patogenicznych niezbędna jest wielogenowa analiza sekwencji (np. rodzaje *Alternaria, Aspergillus, Calonectria, Cladosporium, Diaporthe, Fusarium, Ophiostoma, Leptographium, Graphilbum, Colletotrichum, Epicoccum, Penicillium, Ilyonectria, Trichoderma*). Dlatego użycie wyłącznie markera ITS trzeba traktować z dużą ostrożnością tym bardziej, że 30 % zdeponowanych sekwencji ma złe nazwy (Hofstetter et al. 2019). W wielu grupach taksonomicznych analiza sekwencji ITS służy jedynie do wstępnej identyfikacji molekularnej, często pozwala określić wyłącznie dany kompleks gatunkowy (Lücking i in. 2020; Crous i in. 2021).

Strona 37: Zdanie: „*Zidentyfikowane zbiorowiska grzybów i grzybów niedoskonałych zasiedlających*…”. To sformułowanie jest dla mnie niezrozumiałe. Czy Doktorant wydziela w pracy także grzyby niedoskonałe?

Najbardziej wartościową częścią pracy stanowi **rozdział 5- Wyniki.** Doktorant logicznie podzielił je na trzy części, przy czym dwa pierwsze podrozdziały dotyczą cech biometrycznych oraz przeżywalności sadzonek a ostatni odnosi się do zbiorowiska grzybów i lęgniowców zasiedlających igły. Dla wszystkich analiz Doktorant przyjął podobny schemat: w roku wykonania zabiegu, rok po wykonaniu zabiegów oraz dwa lata po wykonaniu zabiegów. Szkoda, że Autor rozprawy obok cech biometrycznych sadzonek, nie przedstawił także wyników zagęszczenia samosiewu. Przecież jest to bardzo ważny parametr, który istotnie wpływa na przeżywalność oraz cechy biometryczne sadzonek. Przypuszczam, że na poszczególnych powierzchniach, a także w obrębie każdej powierzchni to zagęszczenie mogło być różne. Naturalne odnowienie charakteryzuje się właśnie tym, że są miejsca silnie

przegęszczone albo takie pozbawione odnowienia. Czy miejsca „słabo” albo „silnie odnawiające się” zostały wyłączone z badań?

Autor rozprawy wyższe jednostki taksonomiczne (rząd, klasa, gromada) zapisuje bez kursywy. Pragnę nadmienić, że ostatnio International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF) zaleca aby jednostki systematyczne wyższego rzędu w królestwie Fungi (rodziny, rzędy, klasy, itd..) zapisywać także kursywą (https://www.fungaltaxonomy.org/.).

Doktorant w pracy używa pojęcia grzyby hodowalne i niehodowalne. Pojęcia te nie są wcześniej nigdzie wyjaśnione. Co one oznaczają? Nie wiadomo jak Doktorant klasyfikował poszczególne OTU do tych dwóch grup i w ogóle po co Doktorant wprowadza ten podział skoro nie wykonywał klasycznych izolacji grzybów z igieł ?

W pracy podano frekwencje taksonów do trzeciego miejsca po przecinku. Czy to nie jest przesada. Poza tym nigdzie nie ma zdefiniowanej frekwencji. Co oznacza pojęcie frekwencja (%) taksonu.

Opis dla rycin 4-11 jest niewłaściwy. Nie można zatytułować rycin: wpływ metod ochrony na wysokość, średnicę szyi korzeniowej, przeżywalność nalotów sosny zwyczajnej w roku…. wykonania zabiegu. Taki może być tytuł podrozdziału/rozdziału pracy co zresztą sam Autor zrobił w pracy (rozdział 5.2. *Wpływ metod ochrony odnowienia naturalnego sosny zwyczajnej na parametry nalotu sosnowego*). Dla przykładu rycina nr 4 mogłaby być zatytułowana następująco: Średnia wysokość nalotu sosnowego w zależności od wykonanej metody ochrony. Na wykresie można było dodać: w roku wykonania zbiegów.

Nie rozumiem dlaczego Doktorant używa innej (większej) wielkości czcionki na wykresach w porównaniu do reszty tekstu. Wygląda to bardzo nieestetycznie. I jeszcze jedna uwaga „techniczna”. Otóż zaznaczenie poszczególnych gatunków grzybów różnymi kolorami na słupkach wykresów powoduje, że trudno się zorientować jaka jest frekwencja poszczególnych gatunków. Osobiście proponowałbym tabele. Naprawdę trudno rozpoznać gdzie na słupkach, np. na ryc. 14 jest zaznaczona frekwencja gatunków zaznaczonych w odcieniach żółtego koloru np. *Cladosporium* sp., *Helotiales, Gymnopus androsaceus, Sydowia polyspora* itd. Poza tym, na wszystkich rycinach „sp.” powinno być pisane bez kursywy.

Niestety dużym mankamentem pracy jest pisownia poszczególnych taksonów. Nie wiem dlaczego Doktorant dla niektórych gatunków używa w tekście skrótu nazwy rodzajowej a dla innych cały czas używa pełnej nazwy, pomimo tego, że wcześniej wielokrotnie był on już wymieniany. Znakomitym przykładem są strony 54-57, gdzie *L. seditiosum* w różnych

miejscach występuje w wersji *L. seditiosum* i *Lophodermium seditiosum*. Z kolei *L. pinastri* cały czas jest pisany jako *Lophodermium pinastri*. W całej pracy w tej kwestii panuje spory bałagan. Niektóre gatunki występują cały czas z całą nazwą rodzajową, inne zaś są pisane ze skrótem nazwy rodzajowej albo różnie. Powinno to być ujednolicone.

Odnoszę wrażenie, że opis ryciny 12 odnosi się do ryciny 13 i vice versa. Poza tym, niektóre podpisy pod rycinami powinny zostać przeformułowane. Np. w przypadku ryciny 12 powinno być: Frekwencja (%) grzybów należących do poszczególnych gromad. Poza tym w opisie ryciny jest nazwa grzybopływki a na samym wykresie Oomycota. W przypadku ryciny 15 Doktorant nie podaje frekwencji taksonów grzybów zasiedlających igły, w tym tych, które powodują infekcje aparatu asymilacyjnego (drzew?- co to znaczy drzew) ale podaje wyłącznie gatunki o potencjalnych zdolnościach patogennych w stosunku do igieł lub liści (?). Ta uwaga dotyczy także rycin 19 oraz 23. Poza tym dane podane w tekście dotyczące ryciny 12 nie zgadzają się z danymi na wykresie. Cytuje: „*Wśród zbiorowiska grzybów hodowalnych i Oomycota frekwencja taksonów należących do Ascomycota wynosiła 78,759-95,498%, Basidiomycota 4,502-20,096%, Mucoromycota 0-1,056% oraz Oomycota 0-0,089 (ryc. 12*)”. Otóż z wykresu 12 *Ascomycota* osiągają najwyższą frekwencję przy wartości około 85% (MI), a najniższą przy 28% (KzI). Z kolei, *Basidiomycota* najwyższą frekwencję ma dla kombinacji MI – około 52% a najniższą dla KzI – 20%.

Strona 49: Zdanie „*W zbiorowiskach prób w roku wykonania zabiegu (termin I) najwyższą frekwencją wyróżniały się*:…” ? Chyba powinno być w zbiorowiskach grzybów zasiedlających igły lub w zbiorowiskach grzybów w igłach. Poza tym, nie można pisać, że dany takson wyróżniał się najwyższą frekwencją jeżeli w jakieś kombinacji np. igłach żywych nie został w ogóle stwierdzony. Należało napisać, że frekwencja poszczególnych grzybów stwierdzonych w igłach była różna, najwyższa w kombinacji x a najniższa w kombinacji y.

Strona 52-53: Nie wiem czy rycina 16 jest poprawna bo przecież na osi Y mamy liczbę taksonów (w szt.) a w opisie ryciny frekwencję (%). Chyba jest tam błąd i oś Y powinna być opisana jako frekwencja %.

Doktorant pisze na stronie 53: „*Najwięcej taksonów otrzymano w próbie igieł zielonych z roślin, gdzie zastosowano metodę mieszaną (B=RZII, 318), następnie igieł zielonych, gdzie wykonano zabieg mechaniczny (RZII, 333), igieł martwych*…”. Kombinacja RZII powinna być wymieniona jako pierwsza bo przecież 333 to więcej niż 318.

Rozdział **Dyskusja** został poprowadzony na 12 stronach, na których mgr inż. Maciej Hałuszczak omawia swoje wyniki w oparciu o dostępne dane literaturowe. Dyskusję poprowadzono poprawnie choć brak w niej jest syntetycznego i uporządkowanego omówienia różnic w mykobiocie igieł pomiędzy badanymi rodzajami igieł. Wpływ warunków pogodowych na występowanie osutki w trakcie trwania eksperymentu także wymagałoby nieco bardziej szczegółowego omówienia.

Strona 69: Akapit 2 cytuje: „Warunki pogodowe w ostatnim etapie trwania doświadczenia stawały się optymalne dla rozwoju patogena". Co to znaczy? Trzeba to rozwinąć. Czy to oznacza, że dopiero w ostatnim roku trwania doświadczenia igły były masowo infekowane przez *L. seditiosum* a wcześniej na nalocie w ogóle nie stwierdzano objawów wiosennej osutki sosny?

Cytuje zdanie „*Kilkunastoletnie rośliny tego gatunku drzewa są porażane przez L. seditiosum tylko na pojedynczych igłach" (Stocka 2010b)"*. Nie rozumiem tego zdania. Przecież pojedyncze igły (tzw. pierwoigły) są wytwarzane tylko na siewkach sosny.

Akapit 3: Doktorant wspomina o zmniejszaniu zagęszczenia siewek na badanych poletkach w kolejnych latach eksperymentu ale w pracy (wynikach) nie ma żadnych informacji na ten temat.

Strona 71: cytuję zdanie „*Pozostawionych powinno zostać*" Dziwny twór językowy. Nie lepiej napisać: Tarasiuk i inni (2015) uznali, że należy pozostawić, w zależności…

Cytuję zdanie "*...co wpływa na przebieg procesu oczyszczania się drzew*…". Chyba należałoby dodać, że wpływa „niekorzystnie"

Strona 75: Prawidłowa nazwa dla grzyba *Ceratocystis pilifera* to *Ophiostoma pilifera*. Rodzaj *Ceratocystis* rezyduje w rzędzie *Microascales*, zaś *Ophiostoma* w rzędzie *Ophiostomatales*. Te dwa rzędy w swojej historii, ze względu na duże podobieństwo morfologiczne, zarówno stadiów płciowych jak i bezpłciowych miały bardzo turbulentną historię i poszczególne gatunki były przenoszone z jednego rodzaju do drugiego. Domyślam się, że Doktorant temu taksonowi nadał nazwę według Index fungorum. Jednak jest ona błędna. Prawidłowe nazwy grzybów, zwłaszcza tych gatunków najliczniejszych uzyskanych w badaniach powinny być także zweryfikowane na podstawie najnowszych prac taksonomicznych. Nazwa *Ophiostoma piliferum* powszechnie funkcjonuje w literaturze naukowej od wielu lat. Tak czy inaczej obecność tego gatunku, uznawanego za typowego „tree- or wood infecting fungi" jest dla mnie olbrzymią niespodzianką. Nie znam żadnej pracy, w której stwierdza się obecność

przedstawicieli *Ophiostomatales* w igłach, zwłaszcza jako endofitów. W literaturze jest tylko kilka prac o występowaniu tych grzybów endofitycznie (np. Hoff i in. 2004; Sanz-Ros i in. 2015). Gatunek ten jest pospolicie stwierdzany jako sprawca sinizny drewna sosny w Polsce, np. Jankowiak R., Szewczyk G., Bilański P., Jazłowiecka D., Harabin B., Linnakoski R. 2021. Blue-stain fungi isolated from freshly felled Scots pine logs in Poland, including *Leptographium sosnaicola* sp. nov. Forest Pathology 51 (2): e12672; Jankowiak, R., Bilański, P., Chyrzyński, P., Strzałka, B., 2018. Identification of sapstain fungi from Scots pine pallets and assessment of their staining ability. European Journal of Plant Pathology 150: 307–322.). Dobrze by było aby Doktorant zacytował te publikacje. Poza tym brakuje mi także innych publikacji z tego zakresu, np. Seifert, K. A. (1993). Sapstain of commercial lumber by species of Ophiostoma and Ceratocystis. In M. J. Wingfield, K. A., Seifert, and J. F. Webber, (Eds.), Ceratocystis and ophiostoma: taxonomy, ecology, and pathogenicity (pp. 141–151). APS Press.; Uzunović, A., & Byrne, T. (2013). Wood market issues relating to bluestain caused by ophiostomatoid fungi in Canada. In K. A. Seifert, Z. W. De Beer, & M. J. Wingfield (eds.), Ophiostomatoid fungi: Expanding frontiers (pp. 201–212). CBS Biodiversity Series 12. CBSKNAW Fungal Biodiversity Centre; Uzunović, A., Yang, D.-Q., Gagné, P., Breuil, C., Bernier, L., Byrne, A., Gignac, M., & Kim, S. H. (1999b). Fungi that cause sapstain in Canadian softwoods. Canadian Journal of Microbiology, 45, 914–922.

Strona 77: Cytuje zdanie "*Najbardziej patogenicznymi gatunkami Lophodermium są L. pinastri i L. seditiosum*…". Nie można stawiać tych dwóch gatunków w jednym szeregu w zakresie patogeniczności. Przecież sam Autor w przeglądzie literatury uznaje *L. pinastri* jako saprotrofa lub co najwyżej słabego patogena porażającego starsze roczniki igieł, igły zainfekowane już przez inne patogeny (np. *L. seditiosum*), generalnie igły zamierające lub już martwe.

Strona 78 cytuje zdanie „*Na szczególną uwagę zasługuje rodzaj Aspergillus, którego udział w zbiorowiskach grzybów igieł był niewielki*..". Jak jego udział był niewielki to po co o nim w ogóle wspominać w pracy. To samo dotyczy rodzaju *Trichoderma*. Są to pospolite kosmopolityczne grzyby, które kolonizują różne tkanki roślinne. Na tej samej stronie omawiane są grzyby związane z owadami. Takson zidentyfikowany jako *Beauveria* sp. jest wspomniany w pracy na stronie 63 (wyniki). Z kolei w dyskusji omawiany jest już gatunek *B. bassiana*, który nie należał chyba do najczęściej stwierdzanych taksonów. W pracy *Beauveria* sp. został stwierdzony w zielonych igłach w kombinacji KzZIII co sugeruje, że takson ten występował w igłach endofitycznie. Dlatego raczej stawiam na tę ewentualność niż na to, że obecność tego grzyba wynika z wcześniejszego żerowania owadów na igłach. W pracy sam Doktorant cytuje zresztą prace, w których *B. bassiana* jest stwierdzany jako endofit (Reay i in. 2010; Brownbridge i in. 2012). Takie szczepy można wykorzystać w biologicznej ochronie roślin przed owadami oraz patogenicznymi grzybami. Dalej Doktorant opisuje gatunki grzybów związane z owadami (*Ophiostoma* spp.) i nagle w tym samym akapicie pojawia się „wrzutka"

o *Pestalotiopsis beessey*, że wytwarza furanozy. Najdziwniejsze jest to, że Doktorant nie wspomina wcześniej o tym gatunku w wynikach. Poza tym pisze, że w glebie grzyb ten występuje jako saprotrof przytaczając pracę Żukowskiej i Bajan (1996), która dotyczy zwalczania prusaków przez *B. bassiana*! Grzyby rodzaju *Pestalotiopsis* są typowymi endofitami lub patogenami wielu gatunków roślin, w tym rodzaju *Pinus*.

Strona 79: Dla *Candida guilliermondii* i *Rhizopus stolonifer* powinny być podane nazwiska autorów. Nazwy tych grzybów pojawiają się pierwszy raz w pracy.

Jeżeli chodzi o grzyby rodzaju *Sporothrix* to są one także często związane z różnymi gatunkami owadów (*Scolytidae, Nitidulidae*) i roztoczy. Dodatkowo często się je stwierdza w ranach na pniach drzew liściastych. Dlatego Doktorant powinien zacytować publikację: De Beer ZW, Duong TA, Wingfield MJ (2016) The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. Studies in Mycology 83: 165–191. Poza tym, może warto wspomnieć, że wiele gatunków *Sporothrix* spp. zostało ostatnio zidentyfikowanych i opisanych z Polski, w powiązaniu z owadami i ranami na pniach drzew (Ostafińska A., Jankowiak R., Bilański P., Solheim H., Wingfield M.J. 2021. Six new species of Sporothrix from hardwood trees in Poland. MycoKeys 82: 1-32.; Jankowiak R., Bilański P, Ostafińska A., Linnakoski R. 2019. Ophiostomatales associated with wounds on hardwood trees in Poland. Plant Pathology 68: (7): 1407-1424.; Jankowiak R., Strzałka B., Bilański P., Kacprzyk M., Wieczorek P., Linnakoski R. 2019. Ophiostomatoid fungi associated with hardwood-infesting bark and ambrosia beetles in Poland: taxonomic diversity and vector specificity. Fungal Ecology 39, 152-167.; Jankowiak R., Strzałka B., Bilański P., Kacprzyk M., Lukášová K., Linnakoski R., Matwiejczuk S., Misztela M., Rossa R. 2017. Diversity of Ophiostomatales species associated with conifer infesting beetles in the Western Carpathians. European Journal of Forest Research 136: 939–956.). Myślę, że w tej pracy są to ważniejsze informacje niż te, że niektóre gatunki *Sporothrix* spp. wywołują grzybice u człowieka.

Dyskusję kończą wnioski podsumowujące otrzymane wyniki. Mam jednak dwie uwagi. Pierwsza dotyczy wniosku nr 2 „*Wraz z upływem czasu i po zastosowaniu zabiegów ochronnych, udział grzybów Lophodermium pinastri zmniejszył się, natomiast wzrastała frekwencja L. seditiosum*”. Po pierwsze są to wyniki a nie wniosek. Poza tym, jeżeli to stwierdzenie jest prawdziwe to należy wyciągnąć następujący wniosek: Zastosowane zabiegi ochronne sprzyjają rozwojowi wiosennej osutki sosny i są nieskuteczne przeciwko tej chorobie! Bo przecież frekwencja *L. seditisum* (sprawcy wiosennej osutki sosny) rosła po wykonaniu zabiegów. Domyślam się, że ta zależność wynikła prawdopodobnie ze sprzyjających dla rozwoju wiosennej osutki sosny warunków pogodowych w ostatnim roku trwania doświadczenia oraz ze słabnącego wpływu wykonanych zabiegów ochronnych na nalocie. Nie rozumiem dlaczego Doktorant nie podsumował w postaci wniosku (może nawet dwóch) badań

dotyczących mykobioty igieł samosiewu sosnowego. Przecież duża część jego pracy dotyczy właśnie mykobioty igieł. Dlaczego nie pojawił się żaden wniosek z tego zakresu.

Praca doktorska zawiera także **spis literatury.** Niestety jest on słabo opracowany, zawiera liczne błędy i jest wysoce niechlujny. Przede wszystkim nazwy czasopism powinny być ujednolicone gdyż Doktorant nazwy czasopism podaje jako skróty lub jako pełne nazwy. Nawet te same czasopisma są podawane w skrócie lub jako pełna nazwa. Nie wiem dlaczego dla niektórych czasopism podano doi a dla innych nie. Nie ma tutaj żadnej logiki. Poza tym, w wielu przypadkach brakuje nazwy czasopisma, numeru zeszytu, numerów stron czasopisma. Często pojawiają się błędy w pisowni nazw czasopism i tytułów artykułów. Są niepotrzebne kropki lub przecinki. Poniżej przytaczam wyłącznie te najbardziej jaskrawe przypadki:

Dwie publikacje Kowalski (1989) oraz Mańka (2005) nie są cytowane w tekście.

Balint i in. (2014) - brak numeru zeszytu i stron

Bauhus i in. (2013) - brak nazwy czasopisma, numeru zeszytu i stron

Benson i in. (2018) – kuriozum- skopiowane ze stron https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ wraz z PMID i PMCID

Bielawska (2012) - brak numeru zeszytu

Fernandez-Fernandez i in. (2019) - brak, numeru artykułu (tj. 627)

Grzywacz i Aleksandrowicz (1993) - brak numeru zeszytu i stron

Hausner i in. (1993) - brak stron

Hou i Piepenbring (2009) - brak stron

Martin-Gomez i in. (2017) - brak nazwy czasopisma, numeru zeszytu i stron

Mazurek i Nowik (2018) - to jest chyba rozdział w monografii pod redakcją Piotra Łakomego

Salas-Lizana i Oono (2018b) - brak stron

Tanney i Seifert (2017) - brak nazwy czasopisma i stron

Wojewoda (2003) – Szafer Instytut Botaniki im. Szafera w Krakowie ?

Zalewski i Łukomski - brak tytułu artykułu i stron

Uwagi szczegółowe (drobne błędy zauważone w pracy):

1. W nazwie tytułu rozprawy w wersji angielskiej jest błąd: powinno być Skwierzyna Forest District a nie Districts
2. Spis treści: tytuł podrozdziału 4.1 brzmi charakterystyka powierzchni badawczej, zaś podrozdziału 4.2. - opis powierzchni badawczych. Podrozdział 4.1 powinien być

zatytułowany: charakterystyka powierzchni badawczych bo było ich przecież osiem. W tytule rozdziału 5.3 powinny być użyte polskie nazwy: grzyby zamiast Fungi i lęgniowce zamiast Oomycota.

3. Strona 22: jest wzrastał. Powinno być wzrastało.
4. Strona 24: jest Opracowaniu. Powinno być opracowaniu,
5. Strona 48: brak nawiasu przed 95,48%
6. Strona 49: jest zabegu. Powinno być zabiegu,
7. Strona 54: przed *Lophodermium seditiosum* powinien być ,
8. Strona 54: jest *Wynnea Americana*. Powinno być *Wynnea americana*
9. Strona 55: Mircosphaeropsis powinno być kursywą,
10. Strona 61: po Oomycta brak spacji,
11. Strona 62: jest *sali cis*. Powinno być *salicis*,
12. Strona 76: jest Vanyolos i in. 2019, Vanyolos i in. 2020. Powinno być Vanyolos i in. 2019, 2020.

Podsumowanie

Podjęte przez Autora rozprawy doktorskiej badania obejmują zagadnienia związane z hodowlą lasu oraz fitopatologią leśną i mają wymiar aplikacyjny. Na pewno przeprowadzenie badań było praco- i czasochłonne, zwłaszcza część bioinformatyczna dotycząca mykobioty igieł. Dzięki zastosowaniu sekwencjonowania NGS Doktorant zaproponował nowe podejście do badań nad epidemiologią chorób drzew leśnych. Otóż zamiast w sposób klasyczny obserwować występowanie i natężenie objawów chorobowych i etiologicznych związanych z wiosenną osutką sosny wykrywał on DNA sprawcy choroby bezpośrednio w igłach. Jest to ogromna zaleta tej pracy bo w sposób precyzyjny i wiarygodny uzyskał on informacje o zasiedleniu igieł przez *Lophodermium seditiosum*. Dodatkowo, Doktorant uzyskał interesujące i ważne dane o innych potencjalnych patogenach igieł sosny, grzybach towarzyszących chorobie oraz endofitach. To nowe podejście sprawiło jednak, że Doktorant nie prowadził bezpośredniego (klasycznego) monitoringu nasilenia choroby na samosiewie sosnowym i nie uzyskał informacji o występowaniu tej choroby w badanym okresie. Otóż na podstawie stwierdzenia ilości DNA grzyba *L. seditosum* (lub *Cyclaneusma minus*) w igłach nie uzyskano pełnej informacji czy samosiew chorował czy też nie na wiosenną osutkę sosny ponieważ sprawca może występować w igłach sosny w formie utajonej co sam Autor opisuje w swojej pracy. Moim zdaniem badania bardziej dotyczyły występowania *L. seditiosum* i innych grzybów zasiedlających igły samosiewu poddanego różnym formom zabiegów ochronnych. Wyniki tych badań są bardzo ciekawe i wnoszą wiele nowych aspektów z zakresu ekologii grzybów osutkowych. Niewątpliwie bardzo ważną cechą prowadzonych przez Doktoranta badań są aspekty praktyczne. Doktorant w swoje pracy dowiódł, że zastosowanie bronowania może znacznie polepszyć warunki wzrostu samosiewu sosnowego. Wnioski wypływające z

badań są ważne dla praktyki leśnej i mają wyraźny charakter aplikacyjny. Niestety Autorowi nie udało się ustrzec od licznych błędów, które mocno rzutują na całość pracy. W oczy rzuca się także brak dokumentacji fotograficznej a także liczne błędy w spisie literatury.

Omawianą pracę uważam za wartościową, także przydatną w aspektach utylitarnych. Przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają przedstawionej pozytywnej oceny a dużą część przedstawionych uwag można łatwo usunąć przy przygotowywaniu pracy do druku.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Hałuszczaka stanowi oryginalne rozwiązanie ważnego problemu badawczego. Praca wnosi nowe dane do nauki w zakresie wiosennej osutki sosny, która może znacząco wpływać na procesy naturalnego odnawiania się sosny, co jest szczególnie ważne w obliczu zmian klimatycznych. Jej dużą wartością jest precyzyjna charakterystyka mykobioty igieł samosiewu sosnowego oraz jej aplikacyjny charakter. Przedstawione badania na pewno znacząco uzupełniają wiedzę w tym zakresie. Duża liczba cytowanych prac oraz starannie opracowany przegląd literatury utwierdzają mnie w przekonaniu, że Doktorant posiada szeroką wiedzę z zakresu leśnictwa. Duża wiedza Doktoranta dotyczy także molekularnych technik identyfikacji zbiorowisk grzybów co świadczy o Jego dojrzałości naukowej.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji praca Pana mgr inż. Macieja Hałuszczaka pt. „Skuteczność wybranych metod ochrony przed osutką wiosenną sosny w nalotach sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) na terenie Nadleśnictwa Skwierzyna" spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789). Zwracam się więc do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Leśne Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr inż. Macieja Hałuszczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Robert Jankowiak

Dr hab. inż. Robert Jankowiak, prof. URK