

dr hab. Tomasz Wyka  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Wydział Biologii  
Zakład Botaniki Ogólnej  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań

Poznań, 6 IX 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Radosława Jagiełły p.t. „*Ekologiczne konsekwencje występowania szrotówka kasztanowcowiaczka (*Cameraria ohridella*) i czekoladowej plamistości liści na kasztanowcu zwyczajnym (*Aesculus hippocastanum*)*”**

wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Mariana Giertycha

**Strona formalna pracy**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa mgr. R. Jagiełły przygotowana została w Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku. Stanowi ją zestaw czterech artykułów naukowych w języku angielskim, opublikowanych w recenzowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych o międzynarodowym obiegu i ustalonej renomie, acz umiarkowanych wartościach współczynnika wpływu (zakres 0.36 - 1.63). Ta forma pracy doktorskiej zasługuje na uznanie przede wszystkim z punktu widzenia ekonomiki pracy naukowej, której celem jest nie tylko dokonywanie odkryć, ale i ich upowszechnianie. Po drugie, przygotowanie publikacji to ważny element kształcenia doktoranta i egzamin z jego umiejętności zawodowych. Fakt, że wyniki swych badań p. Radosław Jagiełło zdołał publikować praktycznie na bieżąco dobrze o tych umiejętnościach świadczy. Prace mają od 4 do 7 autorów, przy czym p. Jagiełło jest zawsze pierwszym autorem a tylko w jednej nie jest autorem korespondencyjnym. Wnioskuje z tego, a także na podstawie oświadczeń autorskich, że w powstaniu tych prac odgrywał rolę wiodącą, dobrze opanował umiejętność pracy w zespole i posiada kompetencje do pełnienia roli lidera w projektach badawczych.

Szkoda natomiast, że oświadczenia zarówno doktoranta jak i współautorów dotyczące wkładu pracy każdej z osób są bardzo ogólnikowe (np. „zbiór części materiału” „przygotowanie wstępnej wersji artykułu oraz opracowanie ostatecznej jego wersji”, „udział w przygotowaniu manuskryptu”, „opracowanie interpretacji wyników”- wszystkich?). Takie zdawkowe formuły, choć może i zgodne z utartym zwyczajem, nie ułatwiają wyodrębnienia treści, stanowiących rozprawę doktorską. Problem ten wystąpił zwłaszcza w pracy 2, która była jednocześnie składnikiem osiągnięcia habilitacyjnego dr. U. Walczak. Ponieważ zarówno doktorant jak i pani dr hab. U. Walczak oświadczyli, że przygotowali wstępną i ostateczną wersję artykułu 2, proszę doktoranta o stosowne wyjaśnienie w czasie obrony. Przyjąłem na potrzeby recenzji, że p. mgr Jagiełło napisał lwią część tekstu każdej z prac 1,3 i 4 i mniej więcej połowę pracy 2. Ponadto, z załączonych oświadczeń można by wnosić, że doświadczenie uprawowe opisane w pracy 1 wykonało się praktycznie samo. Szczęśliwie miałem okazję przez kilka lat naocznie obserwować pracę p. Jagiełły i nie mam wątpliwości co do jego zasadniczej roli w przeprowadzeniu tego doświadczenia, podobnie jak doświadczeń opisanych w artykułach 3 i 4. Powyższe uwagi nie mają zniechęcać do włączania prac zespołowych do rozpraw doktorskich a jedynie skłonić do szczegółowego opisywania wkładu doktoranta, tak, by ułatwić recenzentowi uznanie rozprawy za samodzielną i wyodrębnioną część pracy zbiorowej, zgodnie z wymogami ustawy.

Pod względem ilości przedstawionego materiału, zakresu przeprowadzonych badań i ogólnej objętości praca w pełni odpowiada oczekiwaniom stawianym wobec rozpraw doktorskich. Wszystkie prace tworzą logiczną, spójną całość, która dodatkowo opatrzona jest przedmową oraz przejrzyste napisanym wstępem-streszczeniem, zawierającym opis koncepcji badań, syntezę wyników i ich podsumowanie.

## Ocena merytoryczna

Tematyka pracy obejmuje ekologiczne i praktyczne aspekty żerowania gąsienic szrotówka kasztanowcowiaczka (*Cameraria ohridella*) na liściach kasztanowca w związku z ich jednoczesnym porażaniem przez grzyb *Phyllosticta paviae* – sprawcę czekoladowej plamistości liści. Z uwagi na aktualność i znaczenie gospodarcze tego problemu wybór tematu był decyzją trafną. Mimo, że badania nad szrotówkiem są w różnych ośrodkach prowadzone od lat, to jednak w znajomości jego biologii i ekologii pozostało sporo luk, które doktorant dostrzegł i w części wypełnił. Ponadto, o ile interakcje między roślinożercami a roślinami stanowią tradycyjne i ugruntowane pole badań ekologicznych, ewolucyjnych i fizjologicznych, to interakcje trójstronne, obejmujące także komponent grzyba chorobotwórczego są uwzględniane w badaniach znacznie rzadziej. Znane mi przykłady takich oddziaływań są niezwykle ciekawe i wskazują na koewolucję ich uczestników. Wprawdzie badania p. Radosława Jagiełły nie poszły zbyt daleko w tym kierunku, jednak udało mu się połączyć stronę aplikacyjną zagadnienia z ujęciem ekologicznym i elementami etologii owada, co przyniosło wartościowe efekty poznawcze. Do głównych osiągnięć zawartych w rozprawie doktorskiej p. Jagiełły zaliczam:

- Stwierdzenie długoterminowej skuteczności zwalczania szrotówka kasztanowcowiaczka przez injekcję drzew imidaklopridem
- Wykazanie małej skuteczności syntezy związków fenolowych i tanin jako mechanizmu obronnego drzewa przeciw minującym larwom szrotówka
- Wykazanie elastyczności pokarmowej szrotówka w reakcji na różną jakość pokarmu
- Odkrycie, że samice szrotówka, składając jaja, kierują się wielkością zdrowej powierzchni listków a składając je na licznych listkach, przejawiają strategię rozpraszania ryzyka.

Szczególnie wysoko oceniam rygorystyczne, eksperymentalne podejście do badania nisz ekologicznych i zachowań szrotówka. Bardzo mocną stroną ocenianej rozprawy są wprowadzenia do poszczególnych prac. Są bogate w treść, uporządkowane, zawierają liczne odnośniki do bieżącej literatury i czyta się je z satysfakcją. Hipotezy i wyniki są odpowiednio powiązane z teorią ekologiczną. Zwraca uwagę rutynowe stosowanie zaawansowanych metod statystycznych do analizy wyników. Poniżej zamieszczam uwagi, które nasunęły mi się podczas lektury poszczególnych prac.

W Pracy 1 (*Dendrobiology* 78:146-156; 2017) Autorzy poszukują odpowiedzi na pytanie o konsekwencje jednoczesnej obecności grzyba i szrotówka na liściach kasztanowca. Pod uwagę brany jest ich wpływ na ubytek powierzchni asymilacyjnej liści, przyrost pni i akumulację związków obronnych. Założono ambitne i pracochłonne doświadczenie z wykorzystaniem 120 drzewek kasztanowca poddawanych regularnym chemicznym zabiegom zwalczania grzyba, owada lub obu tych organizmów jednocześnie. Jestem pełen uznania dla wysiłku badawczego i zaangażowania doktoranta. Mam jednak kilka uwag do metod, wyników oraz ich interpretacji:

- 1) Wykorzystano układ dwuczynnikowy, w którym przy użyciu pestycydów próbowano wykluczyć grzyba lub owada, bądź oba te organizmy. Jak wynika z tekstu pracy, zabieg ten był częściowo nieskuteczny w przypadku fungicydu. Ten problem ogromnie komplikuje interpretację wyników, zwłaszcza, że nie wiemy w jakim nasileniu grzyb pojawiał się na liściach traktowanych fungicydem. Wydaje się że błędem było niedokonanie oceny stopnia porażenia liści przez każdy z badanych organizmów, a przynajmniej obu łącznie. Dane umożliwiające wyliczenie procentowego porażenia powierzchni liści były przecież zebrane.
- 2) Autorzy z jakiejś przyczyny unikają podania nieprzetworzonych danych dotyczących stopnia defoliacji, np. w postaci uśrednionych krzywych Richardsa z pokazaniem zmienności, skupiając się w zamian na prezentowaniu parametrów mierzących dynamikę defoliacji. Przypuszczam też, że wykorzystanie pośrednich punktów (np. punktu 50% defoliacji) byłoby

bardziej miarodajne, niż skupianie się na terminie całkowitego opadu liści, gdyż obok efektów porażenia przez grzyb i owada, mamy wówczas do czynienia z akumulacją uszkodzeń z innych przyczyn i fizjologicznym opadem liści.

- 3) Potencjalnie ważny, ale zaskakujący wynik pojawia się w ryc. 4 i 5. Wynika z nich, że pod nieobecność szrotówka uszkodzenia grzybowe postępują najszybciej. Wskazuje on na istotne negatywne oddziaływanie owada na grzyb, choć wydaje się, że ta nieoczekiwana obserwacja wymaga dalszej weryfikacji zanim zostanie zaakceptowana.
- 4) Ze względu na wspomnianą niepewność co do efektywności fungicydu, uważam że większą wagę należy przyłożyć do porównania liści drzew kontrolnych i liści drzew traktowanych insektycydem, a tu jasny jest efekt hamowania wzrostu pnia, co nie jest nowym wynikiem, jak i zwiększenie akumulacji frakcji skondensowanych tanin wskutek żerowania szrotówka. Dyskusja wskazuje jednak na brak jednoznacznych argumentów za skutecznością tanin jako mechanizmu obronnego w badanym układzie. Szczególnie ciekawa jest uwaga o ich przypuszczalnej nieskuteczności w alkalicznym środowisku przewodu pokarmowego gąsienic.
- 5) Wygląda na to, że objętości poszczególnych fragmentów pni modelowano jako objętości walca. Jeśli tak, to we wzorze na str. 149 brakuje liczby Pi. Czy jest to błąd literowy we wzorze czy rachunkowy w wynikach? Jeśli ten drugi to proszę o wskazanie, jakie błędy spowodował, i ewentualne sporządzenie erraty.
- 6) W Dyskusji zawarta jest teza, że zróżnicowanie we wzroście pnia może być spowodowane różnym poziomem inwestycji w związki obronne w liściach na zasadzie alternatywnej alokacji asymilatów. Tezę tę traktować można raczej jako spekulację, gdyż po pierwsze nie podjęto próby skorelowania przyrostu pnia z pulą związków obronnych w liściach (ani nawet ich stężeniem). Po drugie, należałoby sprawdzić, czy łączny koszt energetyczny syntezy takich związków w roślinie jest w ogóle podobnego rzędu wielkości, jak ubytek masy pnia. Jest to jednak na pewno trop warty podjęcia.
- 7) Istotną częścią pracy jest opis metody pomiaru powierzchni rzutu listowia przy użyciu fotografii, zawarty w suplemencie. Samo opracowanie tej metody jest godnym uznania osiągnięciem p. Jagiełły. Na podkreślenie zasługuje skrupulatne uwzględnienie wymogów kalibracji aparatu do wysokości. Metoda ta została wykorzystana do pomiarów „uszkodzeń” liści, choć z opisu nie wynika, jak radzono sobie z faktem wzajemnego zasłaniania się liści i ewentualnej zmiany ułożenia blaszek w ciągu sezonu. Czy pomiar uszkodzeń poprzez skanowanie lub fotografowanie in situ i analizę wylosowanych liści nie byłby dokładniejszy? O ile metoda ta może rzeczywiście posłużyć do jednorazowych pomiarów powierzchni rzutu listowia, to jej przydatność do pomiaru powierzchni listowia, i to fenologicznych, a więc powtarzalnych, proponowana przez Autora, budzi wątpliwości.

W moim przekonaniu, w artykule nie udało się, niestety, dokonać, solidnej weryfikacji głównej hipotezy o interakcji grzyba i owada. Pozwala on natomiast na ocenę reakcji młodych drzewek na porażenie przez szrotówka (choć nie przez grzyba). Zawarte tam wyniki stały się natomiast punktem wyjścia do kolejnych badań, przedstawionych w pracach 3 i 4.

Praca 2 (*International Journal of Pest Management* 65: 33-43; 2019) przedstawia pozytywną ocenę długoterminowej skuteczności iniekcji pestycydowych w ochronie przed szrotówką. Wykorzystana została m.in. retrospektywna analiza przyrostu pni i pomiar stopnia porażenia liści przez szrotówką dziewięć lat po zabiegu. Pomysł i stronę naukową pracy oceniam wysoko. Zastosowany prosty układ doświadczalny wydaje się wystarczający, toteż nie jest jasne, dlaczego w dyskusji umieszczono zastrzeżenie, że nie ma bezpośredniego dowodu na wpływ zabiegu iniekcji na wzrost drzew, podczas gdy takim dowodem są przecież dane z Fig. 2 i 4. Dyskusja zawiera ciekawe informacje o trwałości imidaklopridu w drzewach, zgodne z wynikami obecnej pracy.

Osobną kwestią jest rekomendacja dla praktyki ochroniarskiej. Pamiętam dyskusje sprzed ok. 20 lat na temat skutecznych sposobów ochrony kasztanowców i dotkliwy brak solidnych danych, które pozwalałyby na wybór właściwej metody. Przedstawione wyniki, potwierdzające wysoką skuteczność zabiegu endoterapii w 9 lat po jego dokonaniu (np. 3-4-krotne zmniejszenie wielkości min) wypełniają tę lukę. Jednak kategoryczna rekomendacja stosowania imidaklopridu do ochrony drzew ozdobnych budzi mój opór i mimo zamieszczenia łagodzącego ten ton dopisku na końcu pracy, uważam, że jest niezbyt rozważna, w świetle znanych ubocznych skutków działania tego insektycydu. Wyjęte z kontekstu wyniki badań naukowych mogą posłużyć producentom do zwiększenia sprzedaży pestycydu. Łatwo można sobie wyobrazić reklamę „Środek polecany przez Polską Akademię Nauk”. Proszę doktoranta o odniesienie się do tej kwestii w czasie obrony.

Praca 3 (*European Journal of Entomology* 116:42-51, 2019) kontynuuje wątek podjęty w dyskusji Pracy 1, dotyczący znaczenia warunków świetlnych dla kolonizacji liści przez szrotówkę. Zacienienie liści skutkuje bowiem zmianą budowy i składu chemicznego, a więc walorów odżywczych liści w stosunku do liści w pełni eksponowanych na słońce. Za najważniejszy wynik uważam wykazanie plastyczności pokarmowej larw szrotówki, przejawiającej się efektywniejszą konwersją biomasy i tworzeniem rozleglejszych min w cienkich, lecz wzbogaconych nieco w azot liściach zacienionych. Plastyczność ta stabilizuje ostateczną masę poczwarki. Przekonuje mnie również sceptyczne potraktowanie narzucającej się hipotezy o hamującym wpływie związków fenolowych na efektywność konwersji biomasy przez gąsienice w liściach silnie nasłonecznionych. Poniżej zamieszczam uwagi krytyczne i kwestie dyskusyjne:

- 1) Nie jest jasne, dlaczego nie zastosowano wariantu pełnego (100%) nasłonecznienia, ograniczając się do 50% i 78%.
- 2) Wzór [1] na obliczenie LWC zawiera błąd. Zamiast 1 powinno być 100.
- 3) W równaniu [3] LMA jest wyrażone w  $\text{mg mm}^{-2}$  a w na str. 47 w  $\text{mg cm}^{-2}$ .
- 4) Na ile dokładna jest zastosowana metoda pomiaru ULM (*utilized leaf mass*) wykorzystująca LMA skoro konsumowane są głównie komórki palisadowe a LMA jest wyznaczana dla całej blaszki?
- 5) Skoro wykonano preparaty mikroskopowe zdrowych liści, to szkoda, że nie wykonano także badań anatomicznych żerów gąsienic szrotówki w liściach w odmiennych warunkach świetlnych, przestając na ogólnych informacjach z literatury.
- 6) Zdziwiła mnie interpretacja przekroju liścia na str. 45/46. Autorzy orzekli, że niektóre z komórek palisadowych w liściach z grupy LL nie kontaktowały się z miękiszem gąbczastym a jedynie z przestworami powietrznymi (niejako zwisając luźno z górnej epidermy). Nie wynika to z zamieszczonej mikrofotografii. Należy pamiętać że struktura liści jest trójwymiarowa, zatem nie da się jej w pełni uchwycić na dwuwymiarowym obrazie cienkiego przekroju. W znanych mi liściach licznych gatunków roślin komórki palisadowe kontaktują się z miękiszem gąbczastym lub pochwami wiązkowymi albo bezpośrednio, albo przez krótsze tzw. komórki zbierające. Gdyby tak nie było, dokąd trafiałyby asymilaty? Jestem pewien, że obejrzenie materiału np. w mikroskopie skaningowym potwierdziłoby tę regułę także u kasztanowca. Z kolei obserwacja przylegania komórek palisadowych do siebie nawzajem może być dość złudna, gdyż takiej oceny w praktyce dokonać można jedynie na przekrojach paradermalnych. Z reguły komórki palisadowe kontaktują się z przestworami powietrznymi na przeważającej części swej powierzchni. Tak musi być, by do chloroplastów łatwo dopływał  $\text{CO}_2$ .

Praca 4 (*Arthropod-Plant Interactions*, 2019) podejmuje problem wpływu porażenia liści grzybem czekoladowej plamistości na wybór miejsca składania jaj przez samice szrotówki. Testowana jest hipoteza, że listki porażone przez grzyba wybierane są z mniejszą częstotliwością niż listki nieporażone i hipoteza ta, zdaniem Autorów, nie uzyskuje potwierdzenia. O ile same układy doświadczalne zaprojektowano właściwie, to nie jestem zupełnie przekonany, że do analizy wyników wybrano modele

statystyczne, które najskuteczniej odpowiadają na postawione we wstępie pytanie. W badaniach nad wyborem miejsca składania jaj najważniejszym bowiem parametrem jest prawdopodobieństwo wyboru danego typu podłoża, a do jego oceny stosowany jest na ogół test  $\chi^2$ . Nie jest dla mnie jasne, dlaczego zrezygnowano z prezentacji wyników w tej najbardziej komunikatywnej formie. W zamian skupiono się na dodatkowej, także zresztą istotnej kwestii, jaką jest atrakcyjność zdrowej powierzchni listka i wykazano, że wielkość tej powierzchni to istotny czynnik, którym kieruje się samica. Czy jednak nie ma korelacji między porażeniem a ubytkiem zielonej powierzchni? Warto ponadto zauważyć, że nawet w zastosowanym kompleksowym modelu efekt porażenia grzybowego w doświadczeniu laboratoryjnym był istotny ( $P=0,03$ ). Wydaje się, że dane zasługują na reanalizę, która skupiłaby się na porażeniu z pominięciem zmiennych towarzyszących. Ponadto nasuwa się pytanie, czy analizowanie poszczególnych listków jako niezależnych powtórzeń jest właściwe, skoro samica może przecież przed złożeniem jaj oceniać jakość całego liścia (a nawet całej rośliny zwłaszcza, że obok są drzewka zupełnie nie porażone)?

Z kolei obserwacja, że jaja jednej samicy są umieszczane na licznych listkach jest cenna dla poznania biologii gatunku i słusznie interpretowana jest przez Autora jako dowód na strategię rozpraszania ryzyka.

Pewną usterką tej pracy jest zaś niezachowanie stałej kolejności w opisach poszczególnych eksperymentów w działach Metody i Wyniki.

### Strona edytorska rozprawy

Prace są napisane rzeczowo i zwięźle. Dostrzegam pewne niedoskonałości językowe, zwłaszcza kalki z języka polskiego, które miejscami utrudniają lekturę, obecne szczególnie licznie w pracy nr 1. Na przykład, jednym z powtarzających się mankamentów jest używanie słowa „variant” zamiast „treatment” lub „experimental group”. Prace są opublikowane, więc za późno na korektę, ale w razie zainteresowania wskażę liczne inne takie miejsca. Doceniam jednocześnie starania o poprawność językową poprzez zlecenia formalnych lub nieformalnych korekt językowych. Prace są opracowane starannie, ryciny dobrej jakości a umieszczanie głównych wyników analiz statystycznych w obrębie ryciny jest dobrym obyczajem, który bardzo ułatwia czytanie.

### Podsumowanie

Propozycję zrecenzowania rozprawy p. mgr. Radosława Jagiełły przyjąłem chętnie, gdyż przez kilka lat, odwiedzając Instytut Dendrologii z podziwem obserwowałem jego zaangażowanie w pracę nad kolejnymi doświadczeniami i słuchałem dyskusji ze współpracownikami. Nie mam wątpliwości, że jest on samodzielnym, dociekliwym i pracowitym badaczem. W swej rozprawie udowodnił, że potrafi formułować istotne problemy naukowe i je rozwiązywać oraz umieszczać w szerszym kontekście. Opanował literaturę przedmiotu i potrafi z niej wydobywać istotne informacje. Stosunkowo liczne uwagi krytyczne zawarte w recenzji nie przeciwważą tej opinii, zwłaszcza że kolejne prace są coraz lepszej jakości. Mam nadzieję, że choć część zarzutów zostanie odparta w czasie obrony. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Radosława Jagiełły „Ekologiczne konsekwencje występowania szrotówka kasztanowcowiaczka (*Cameraria ohridella*) i czekoladowej plamistości liści na kasztanowcu zwyczajnym (*Aesculus hippocastanum*)” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr. Jagiełły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Tomasz Wyka