

Opole, dnia 13.08.2024

**Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr inż. Wojciecha Pawła Kukuły  
wykonana przez Dr hab. Ewę Moliszewską, prof. UO**

Tytuł dysertacji doktorskiej:

**Charakterystyka grzyba *Valdensia heterodoxa* (Peyr.) sprawcy  
brunatnej plamistości borówki wysokiej**

Promotor: **dr hab. Ewa Mirzwa-Mróz, prof. SGGW**

Promotor pomocniczy: **dr inż. Marcin Wit**

**Podstawa formalna recenzji**

Podstawą formalną niniejszej recenzji jest Ustawa z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) oraz pismo przewodnie z Instytutu Nauk Ogrodniczych SGGW z dnia 22.07.2024 przesłane mi wraz z egzemplarzem dysertacji doktorskiej (wersja papierowa) autorstwa pana mgr inż. Wojciecha P. Kukuły.

**Charakterystyka rozprawy oraz ocena merytoryczna i naukowa**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pana mgr inż. Wojciecha P. Kukuły stanowi jednorodną tematycznie monografię naukową. Praca obejmuje łącznie 141 stron maszynopisu (wydruk dwustronny w twardej oprawie) i składa się z 7 rozdziałów głównych, w tym: *Wstęp, Cel pracy i hipotezy badawcze, Przegląd literatury, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski*, dodatkowo wyodrębniono *Bibliografię* oraz *Aneks*. W pracy zawarto także *Streszczenie* i *Summary* oraz wymagane przez uczelnię oświadczenia autora.

Rozdział *Wstęp* przybliży czytelnikowi problematykę opracowania (str. 1-2). *Cel pracy i hipotezy badawcze* (str. 3) precyzuje cele jakie postawił sobie autor oraz zadania badawcze umożliwiające wykonanie tych celów; wyszczególniono w nim także założone hipotezy badawcze. *Przegląd literatury* (str.4-14) wprowadza czytelnika, w sposób szczegółowy, w problematykę podjętą przez autora dając podstawy dotychczasowej wiedzy w zakresie badanego zagadnienia. *Materiały i metody* (str. 15-34) szczegółowo opisuje zastosowane metody badań oraz opracowania uzyskanych wyników. Rozdział *Wyniki* (str. 35-76) jest obszernym rozdziałem pokazującym uzyskane rezultaty badań wraz z komentarzem oraz stosownymi tabelami, wykresami i fotografiami. *Dyskusja* (str. 77-85) jest rozdziałem pokazującym umiejętność doktoranta przedyskutowania własnych wyników z wynikami dotychczas opublikowanymi w literaturze naukowej; jest to rozdział tematycznie dostosowany do rozdziału *Wyniki*, poparty adekwatnymi odniesieniami do literatury, a także pokazujący dojrzałość naukową doktoranta. Rozdział *Podsumowanie i wnioski* (str. 86-87) przedstawia konkluzje wyciągnięte na podstawie prowadzonych badań oraz wnioski dotyczące dalszych prac, które należałoby wykonać w przyszłości. *Bibliografia* (str. 88-95) obejmuje spis literatury, którą autor posługiwał się w trakcie przygotowania ocenianej pracy, zawiera on wykaz 116 materiałów źródłowych oraz 7 źródeł internetowych. W ostatniej części, *Aneksie*, zawarto dodatkowe wyniki takie jak tabelaryczne dane dotyczące morfologii badanych szczepów, sekwencje wybranych szczepów z zaznaczeniem delecji i podstawienia, wykresów ilustrujących wzrost wybranych kultur na różnych pożywkach.

Praca jest napisana zwięzłym językiem, kolejność rozdziałów jest adekwatna do realizowanych celów i są one rozplanowane w taki sposób, że wynikają kolejno z siebie, bądź też tematyka jest w sposób dość oczywisty umiejscowiona w danym miejscu rozprawy.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pana Wojciech P. Kukuły koncentruje się na badaniach dotyczących jednego z patogenów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum*), a mianowicie – *Valdensia heterodoxa*, sprawcy brunatnej plamistości borówki wysokiej.

Borówka wysoka jako roślina ważna gospodarczo występuje wśród upraw owocowych w Polsce od stosunkowo niedługo czasu. Według danych Agencji Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa powierzchnia uprawy borówki wysokiej w Polsce



wyniosła ponad 12 tys. ha w 2023 roku i była większa niż w poprzednim roku. Wraz z popularyzacją uprawy tej rośliny, na plantacjach towarowych i w ogrodach przydomowych, zaczęły pojawiać się także zagrażające jej patogeny. Spowodowało to konieczność podjęcia badań nad ich biologią i zwalczaniem w obrębie upraw borówki wysokiej. *V. heterodoxa* jest jednym z takich patogenów. Został on po raz pierwszy zidentyfikowany w Polsce na borówce wysokiej w 2011 roku, i pomimo upływu sporej liczby lat nie doczekał się w Polsce, aż do chwili obecnej, bardziej szczegółowego opracowania. Zatem przedstawiona do oceny praca uzupełnia istniejącą w Polsce lukę w nauce oraz praktycznej ochronie roślin przed chorobami. Patogen ten znany był na terenie Polski już wcześniej ze stanowisk naturalnych, z roślin takich jak borówka czarna (*Vaccinium myrtillus*) i borówka brusznica (*V. vitis-idea*) oraz szeregu innych gatunków, które podawane były jako potencjalni żywicieli tego patogena zarówno w Polsce jak i na świecie. Wykaz roślin żywicielskich został zamieszczony przez autora w tabeli numer jeden w części dotyczącej przeglądu literatury.

W przeglądzie literatury autor przedstawił informacje historyczne dotyczące patogena, omówił zagadnienia dotyczące nazewnictwa i stanowiska systematycznego, a także przedstawił polskie i angielskie nazewnictwo choroby powodowanej przez *V. heterodoxa*. W dalszej kolejności doktorant omówił dość szczegółowo budowę, biologię oraz epidemiolog patogena, a także jego występowanie biologiczne i geograficzne. Zostały przez niego przedstawione i opisane objawy chorobowe powodowane przez *V. heterodoxa*, a także dane dotyczące jego zwalczania. Ciekawostką jest, że *V. heterodoxa* ma znaczenia w ochronie roślin jako składnik biopreparatu przeznaczonego w Kanadzie do zwalczania inwazyjnego gatunku *Gaultheria shallon* – o czym także wspomniano w ocenianej pracy.

Prowadzone przez doktoranta badania wymagały od niego zastosowania różnorodnych technik badawczych zarówno laboratoryjnych, jak i służących do badań terenowych. Dzięki temu doktorant w swojej pracy badawczej wykazał się szerokim warsztem i umiejętnością stosowania różnorodnych metod badawczych począwszy od klasycznych metod stosowanych w fitopatologii, po metody nowoczesne np. molekularne, oraz obserwacje i badania terenowe. Niektóre z przeprowadzonych przez niego eksperymentów wymagały pomysłowości i własnej inicjatywy w rozwiązaniu problemów metodologicznych jak np. badania dotyczące wyrzutu zarodników konidialnych, czy tworzenia apotecjów w warunkach naturalnych. Dowodzi to dobrego przygotowania autora do pracy badawczej oraz rozwiązywania problemów o

charakterze naukowym. Uzyskane przez doktoranta wyniki badań zostały przez niego przeanalizowane i opracowane z wykorzystaniem dostępnych mu narzędzi analitycznych oraz przedstawione w sposób tabelaryczny oraz graficzny.

Pomimo dość sporej ilości literatury i danych naukowych z zakresu biologii i znaczenia *V. heterodoxa*, pracę należy uznać za wartościową, oryginalną i o wysokiej wartości merytorycznej oraz naukowej. Wiele zawartych w niej informacji przedstawiono po raz pierwszy, jak np. dane dotyczące zróżnicowania morfologicznego i genetycznego patogena w Polsce, co pozwoliło na wyciągnięcie istotnych wniosków. Dowiedziono sporego zróżnicowania w rozmiarach zarodników konidialnych, których wielkości odbiegają od danych literaturowych, przy czym wykazano pewien związek tych rozmiarów z pochodzeniem szczepów z różnych żywicieli. Wskazano warunki wzrostu wegetatywnego grzybni i zarodnikowania. Próbowano uzyskać, bez powodzenia, stadium płciowe, dzięki czemu możliwe było stwierdzenie, że w warunkach Polski najprawdopodobniej ono nie występuje, czego potwierdzeniem jest niskie zróżnicowanie genetyczne badanej grupy szczepów, mimo ich pochodzenia z różnych i odległych regionów Polski.

Przeprowadzone testy z fungicydami dają także podstawy do planowania zabiegów ochronnych, choć jednocześnie pokazują niski potencjał fungicydów obecnych na rynku. Niestety zadawalające wyniki co do ograniczania rozwoju grzybni uzyskano tylko po zastosowaniu mieszaniny piraklostrobiny i boskalidu zastosowanej w stężeniu 100 ppm, co stanowi ilość znacznie przekraczającą dawkę połową substancji aktywnej. Należy tu podkreślić przydatność tej części badań w świetle braku zaleceń co do ochrony borówki wysokiej przed *V. heterodoxa*. Mimo, że obecnie grzyb jest uznawany za patogena o małym znaczeniu (<https://calfert.pl/najwazniejsze-choroby-borowki-wysokiej/> - informacja z marca 2024 r.), należy spodziewać się dalszego jego rozprzestrzeniania, zwłaszcza w regionach położonych blisko lasów i o dostatecznej wilgotności, zatem takie badania powinny być kontynuowane i wzbogacane o dalsze elementy dotyczące rozwoju patogena, jak np. wpływ środków ochrony roślin na kiełkowanie zarodników i nawiązywanie kontaktu pasożytniczego przez grzyba.

W ocenianej pracy doktorskiej pojawiają się cenne spostrzeżenia wynikające z wnikliwych studiów własnych i literaturowych, a to np.: informacja dotycząca braku występowania *V. heterodoxa* na innych roślinach niż gatunki z rodziny *Ericaceae*, co stawia



dotychczasowe doniesienia co najmniej pod znakiem zapytania, a z pewnością wymaga to dokładniejszego zbadania, w tym środowiskowego, molekularnego i infekcyjnego (faktyczna zdolność *V. heterodoxa* do porażania innych gatunków) i ustalenia czy obserwacje są słuszne, czy jest to zbieg okoliczności. Kolejna ważna obserwacja to to, że mechanizm uwalniania zarodników można wykorzystać w laboratorium do uzyskania kultur jednozarodnikowych, a także określenie wysokości lotów konidiów.

Ważnym także jest ustalenie, że *V. heterodoxa* to gatunek mało zróżnicowany genetycznie mimo dużych dystansów dzielących poszczególne badane populacje, a także mimo pochodzenia z różnych żywicieli, co pozostaje w zgodzie z badaniami światowymi.

### **Poprawność redakcyjna rozprawy**

Co do zasady praca spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim, jednak w toku jej przygotowania autor nie uchronił się przed usterkami technicznymi. Podczas czytania zauważyłam liczne błędy pisarskie, tzw. literówki, nieprawidłowe zapisy w postaci pominięcia kursywy (np. str. 20, 8-y wiersz od góry) w nazwach łacińskich lub jej wprowadzenia do np. skrótu „sp.” (str. 81, 6 wiersz od dołu), który co do zasady nie powinien być pisany kursywą. Wiele tytułów tabel, wykresów, czy fotografii zakończono kropką, a co do zasady kropki nie stawia się w tytule (*vide* - tytuły książek, prasowe, itp. oraz zasady pisowni). W pracy pojawił się nawet jeden błąd ortograficzny, mianowicie str. 15 – jest „nie sąsiadujących” a powinno być „niesąsiadujących”.

W opisie metody izolacji DNA grzyba użyto określenia „rozdrobnienia tkanki” co w odniesieniu do grzybni jest nieprawidłowe (str. 20, wiersz 14 od dołu).

Ryciny 3,4,5 obrazujące filogramy/drzewa filogenetyczne przedstawiono używając zbyt drobnego druku, przez co są one niemal nieczytelne, a w każdym razie bardzo trudne w analizie. Rycina 16B zawiera stanowczo zbyt drobny druk.

Wykres 4 (str. 74) został pozbawiony opisów do osi, czyli „Liczba zarodników” – oś pionowa i „Liczba dni” – oś pozioma.

W odniesieniu do rycin 4 i 5 zastosowano pogrubienie, czego zasadniczo nie praktykowano w ocenianej pracy doktorskiej, czyli jest to odstępstwo od przyjętej reguły.

W niektórych tabelach podawano pod nimi wyjaśnienie zaznaczone gwiazdką (\*), jednak nie pojawiała się ona w samej tabeli (np. tabela 14 i dalsze zawierające oznaczenia literowe poziomu istotności wyników).

W odniesieniu do tabeli 27, w wyjaśnieniu pod nią, podano określenia „powyżej przekątnej” i „poniżej przekątnej” – warto by było umieścić/narysować tą przekątną w tabeli.

Na str. 59 omawiano warunki zarodnikowania w zależności od zastosowanego wariantu indukcji tegoż. W metodyce podano „wariant 3” natomiast w części wynikowej na ww. stronie podano „wariant III”. Powstała w ten sposób niezgodność oznaczenia.

### Uwagi polemiczne i pytania do autora

Po przestudiowaniu przedłożonej mi do oceny monografii nasunęły mi się następujące spostrzeżenia, uwagi i komentarze, a także pytania do doktoranta:

- Wariant 3 dotyczący badania/indukcji zarodnikowania grzyba został podany jako modyfikacja własna danych z literatury, ale nie podano na czym dokładnie polegała ta modyfikacja.
- Czy doktorant spotkał informacje/badania dotyczące występowania i tworzenia specyficznych toksyn odgrywających rolę w opanowaniu tkanki roślinnej przez *V. heterodoxa* w związku z występowaniem czerwonej obwódki wokół plamy chorobowej na zasadzie podobnej do *Cercospora beticola*? Analogia nasuwa się niemal automatycznie, szczególnie, że obwódki te pojawiają się pod wpływem światła.
- Czy zróżnicowanie w wymiarach zarodników *V. heterodoxa*, zdaniem autora, mogłoby być podstawą do wyodrębnienia np. niższych od gatunku jednostek np. odmian/form/form specjalnych, zwłaszcza, że w pracy wykazano powiązanie tego parametru z pochodzeniem z różnych roślin żywicielskich? Czy może jest to zróżnicowanie środowiskowe, powiązane tylko chwilowo z żywicielem i w razie jego zmiany może nastąpić także zmiana rozmiaru zarodników? Podobne analogie występują w przypadku *Claviceps purpurea* sensu lato i jego sklerocjów, choć w tym przypadku zróżnicowanie genetyczne dało podstawy do bardziej wyraźnego podziału.
- Niedosyt pozostaje po zapoznaniu się z rezultatami badań dotyczących zarodnikowania testowanych izolatów w warunkach *in vitro*, widać, że autor



obserwował ilościowo zarodnikowanie w czasie i dla poszczególnych kultur, zatem pojawia się brak wyników w postaci np. wykresu zależności liczby wytwarzanych konidiów od czasu.

- W powyżej wspomniany badaniu, w metodyce, podano, że obserwacje zarodnikowania na pożywce prowadzono 7, 14, 21 i 28 dni od założenia doświadczenia, natomiast w części wynikowej pojawia się informacja, że „zarodniki pojawiały się już po 8 dniach”, zatem powstaje nieścisłość metodologiczno-wynikowa.
- W części wynikowej omówiono dokładnie warunki wzrostu poszczególnych badanych kultur *V. heterodoxa* na różnych pożywkach i w różnych warunkach, zawarto je w kilku tabelach, ale brakło sumarycznego podsumowania/uśrednienia/pogrupowania tych wyników np. w formie wykresów, co znacząco ułatwiłoby ich przyswojenie. Niestety wykresy zawarte w *Aneksie* nie dają ww. sumarycznego spojrzenia na tę grupę wyników. Innym ewentualnym miejscem na takie podsumowanie mógłby być rozdział Dyskusja.
- Dlaczego w badaniu przyrostów grzybni w różnych warunkach nie zastosowano jednakowego zestawu temperatur, dlaczego jest to temperatura 19°C dla ciemności oraz fotoperiodu i 20°C dla badań realizowanych ze światłem dziennym?
- Na stronie 61 (wers 12 od dołu) pojawia się zapis: „po zastosowaniu wszystkich ze stężeń”, jest to błąd – stężeń się nie stosuje, ani one nie działają; stosuje się substancje w stężeniach; powinno być np.: „po zastosowaniu badanych fungicydów we wszystkich ustalonych/wytypowanych do badań stężeniach”.
- W wielu miejscach pracy pojawiają się zdania np. „Szczegóły zawarto w tabeli 24.” (str. 61), jest to niepotrzebne, znacznie lepszym byłoby zastosowanie odsyłacza na końcu poprzedniego zdania, czyli zapisu: „..... (Tab. 24).
- W odniesieniu do zarodnikowania grzybni na porażonych liściach (str. 75) zastosowano nie do końca adekwatny tytuł rozdziału, a mianowicie tytuł informuje o badaniu uwalniania zarodników na różne wysokości, a nie wspomina o ogólnym badaniu zarodnikowania na liściach.
- Brakuje mi w podsumowaniu ogólnego opisu choroby, tj. wskazania, że patogen zimuje na opadłych liściach, wymaga pewnych warunków do wytworzenia sklerocjów

i potem w kolejnym roku zarodników, że stadium płciowe do chwili obecnej nie zostało w Polsce stwierdzone, że objawy chorobowe intensywniej rozwijają się na niższej położonych liściach, aniżeli na tych umiejscowionych na wierzchołku rośliny. Brak także prostego zalecenia dotyczącego usuwania i palenia opadłych liści (bo mogą być źródłem zakażenia, a także dobra pożywką dla patogena) oraz innych praktycznych dla plantatorów informacji, choćby o lokalizacji jagodników. Te wszystkie informacje w sposób bezpośredni lub pośredni w pracy występują, ale trzeba ją całą przestudiować, aby dojść do takich wniosków.

- Czy autorowi znane są możliwości biologicznego zwalczania *V. heterodoxa*? Jak doktorant zapatruje się na taką możliwość? Czy własne obserwacje i doświadczenie badawcze podpowiadają autorowi ewentualny kierunek poszukiwania biopreparatu skutecznego w ochronie przed *V. heterodoxa*? Czy zdaniem doktoranta *Coniothyrium minitans*, jako antagonist *Sclerotinia sclerotiorum*, a więc także przedstawiciela *Sclerotiniaceae*, mógłby być użyteczny w ochronie przed *V. heterodoxa*?
- Wniosek nr 2 dotyczący warunków występowania *V. heterodoxa* został podjęty na podstawie obserwacji, jednak żadne dane metodyczne nie zostały dla nich opisane, zatem wnioskuje, że bardziej wysunięto go na podstawie ogólnego odczucia, obserwacji i doświadczenia autora, niż metodycznych badań.
- Wniosek nr 6 wydaje się być zbyt optymistyczny w świetle uzyskanych rezultatów, gdyż po pierwsze, nie uzyskano całkowitego zahamowania rozwoju grzybni, a po drugie nie badano wpływu fungicydów na faktyczne porażenie liści borówki, zatem raczej należałoby zasugerować kierunek dalszych badań w celu ustalenia najlepszych wariantów ochrony borówki przed porażeniem, bądź przed rozwojem infekcji, a także wpływu fungicydów na zarodnikowanie, kiełkowanie zarodników, nawiązywanie kontaktu pasożytniczego i dalszy rozwój grzybni i opanowywanie tkanek liścia.

Podsumowując należy zauważyć, że doktorant wykonał istotną pracę badawczą przeprowadzając różnego rodzaju eksperymenty, wymagające od niego szeregu umiejętności, począwszy od umiejętności organizacyjnych, planowania badań, działania w terenie, po



wysublimowane techniki laboratoryjne, aż po zebranie wyników oraz ich analizowanie i przedstawienie. Cele badawcze zostały osiągnięte, a hipotezy - potwierdzone.

Wobec powyższego należy uznać, że doktorant opanował szeroki wachlarz umiejętności badawczych oraz analitycznych i rokuje jako przyszły pracownik nauki, a uwagi zawarte w niniejszej recenzji pozwolą jemu na przygotowanie wartościowego materiału publikacyjnego oraz na ukierunkowanie dalszych badań.

### Wnioski końcowe

Praca doktorska mgr inż. Wojciecha P. Kukuły stanowi wartościowy materiał zarówno z punktu widzenia naukowego jak i praktyki ogrodniczej/sadowniczej. Zatem, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha P. Kukuły spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim, gdyż prezentuje oryginalną wiedzę oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi umiejętności realizowania przez doktoranta badań naukowych, a także stanowi jednorodną tematycznie rozprawę w postaci monografii naukowej. W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka grzyba *Valdensia heterodoxa* (Peyr.) sprawcy brunatnej plamistości borówki wysokiej” spełnia warunki określone w Ustawie z dn. 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669) i wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Wojciecha P. Kukuły do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr hab. Ewa Moliszewska, prof. UO

