

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej mgr inż. arch.kraj. Magdaleny Odrzywolskiej-Hasiec pt. „Wpływ wysokości nad poziomem morza na wybrane właściwości fizjologiczne liści olszy zielonej (*Alnus viridis* DC.) w Bieszczadach”

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Odrzywolskiej-Hasiec koncentruje się na zjawisku odporności na środowiskowe czynniki stresowe olszy zielonej - gatunku stosunkowo mało przebadanego, a będącego ważnym elementem biocenozy nie tylko w Bieszczadach. Opracowywany temat jak dotychczas nie przyciągnął uwagi wielu naukowców. Wiemy, że odporność na czynniki stresowe jest związana bezpośrednio z ekspresją szeregu dobrze opisanych genów, ale wiemy również, że znamy jedynie mały fragment procesów zachodzących w organizmach roślin. Zainteresowania badaczy reprezentujących nauki fizjologiczno-biochemiczno-genetyczne często koncentrują się na opisie roli poszczególnych genów, białek i procesów w typowych obiektach doświadczalnych często w całości zsekwencjonowanych, zaniebując fakt, że rośliny wykazują nierzadko swoistą specyfikę i ich zdolności do zasiedlania odpowiednich siedlisk są niepowtarzalne i wynikają właśnie z tych oryginalnych właściwości. Wielokrotnie wykazano już, że wiedza uzyskana na roślinach modelowych nie zawsze umożliwia zrozumienie zjawisk obserwowanych w przyrodzie. Ponadto głównie ze względu na powtarzalność wyników większość badań wykonuje się na materiale roślinnym uzyskiwanym w kontrolowanych warunkach komór hodowlanych, przy łatwych do opisanie i stabilnych podstawowych parametrach zewnętrznych. Tymczasem rośliny w naturalnych warunkach poddawane są stresom, które nie przypominają warunków komór hodowlanych. Dlatego też koniecznym jest prowadzenie badań na innych obiektach i w naturalnych warunkach. W pracy doktorskiej mgr Odrzywolskiej-Hasiec oceniono wrażliwość badanego gatunku wegetującego w warunkach panujących w Bieszczadach w ściśle określonym otoczeniu, w warunkach stresu związanego z wysokością n.p.m. i jego pochodnych i roślinach „niejako” kontrolnych pobranych z niżej położonego stanowiska. Chociaż zjawisko reakcji roślin na ten szczególny rodzaj kompleksu czynników było opisywane od kilku dziesięcioleci w setkach publikacji, to wiele wątpliwości dotyczących tego tematu nie zostało do chwili obecnej rozwiązanych i dysponujemy tylko niepełnymi danymi odnośnie funkcjonowania tych mechanizmów w poszczególnych grupach roślin.

Przedstawione wyniki analiz mają przede wszystkim charakter badań podstawowych, ale uzyskane wyniki już na obecnym etapie prac mogą być przydatne dla celów praktycznych.

Oceniana praca obejmująca 128 stron, 5 tabel, 27 rycin zawiera elementy typowe dla rozpraw doktorskich z dziedziny nauk biologicznych. W części wstępnej pracy koncentruje się na zagadnieniach typowo środowiskowo-ekologicznych, a w części eksperymentalnej ma charakter fizjologiczno-biochemiczny. Praca składa się ze spisu treści, obszernego wstępu oraz krótkiego określenia celu pracy, rozdziałów poświęconych zastosowanym materiałom i metodom, uzyskanym wynikom i ich dyskusji, spisu cytowanej literatury, wnioskami wypływającymi z przeprowadzonych badań oraz streszczeń w języku polskim i angielskim.

Pracę wyposażono ponadto w „Wykaz stosowanych skrótów”, ale niektóre skróty są wyjaśnione niezręczne i przykładowo mówienie o „przechwyconej energii” można zastąpić wyrażeniem „energii zaabsorbowanej”, „gęstość powierzchniową liści” zastąpiłbym „masą liści w przeliczeniu na powierzchnię”, „indeks azotowy” „zawartością azotu” a „żywoćność PSII” to po prostu jego „sprawność”.

„Wstęp” stanowi obszerną część rozprawy i donosi o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie. Autorka charakteryzuje badany gatunek i jego występowanie oraz załącza materiał ilustracyjny (na Ryc.1 brak skali). W pierwszych podrozdziałach scharakteryzowała szczegółowo występowanie tego gatunku na terenie Alp szwajcarskich i fragmenty te, aczkolwiek dla przyrodnika ciekawe, to nie mają w istocie wiele wspólnego z celami pracy. „Wstęp” opisuje też pokrótce reakcje roślin na oddziaływanie czynników środowiskowych jak temperatura i promieniowanie w zakresie UV. W kolejnych podrozdziałach, w dość wyczerpujący sposób, zestawiała metody oceny stanu fizjologicznego dotyczące reakcji roślin, a w szczególności drzew, na różnego rodzaju czynniki stresowe. Tekst jest podzielony na krótkie podrozdziały skupiające uwagę na poszczególnych parametrach pomiarowych zastosowanych w pracy. Takie poszatkowanie tekstu nie jest potrzebne, bo koncentruje uwagę na niektórych metodach i parametrach pomiarowych, które nie stanowią istoty problemu przy rozważaniach o stresie. Dużo uwagi poświęciła zjawisku fluorescencji zielono-czerwonej, a jest to nowatorski kierunek pracy stosunkowo mało eksploatowany w literaturze przedmiotu. Podobnie szczegółowo analizowała zagadnienie refleksji promieniowania, co jest często zaniedbywane w literaturze przedmiotu. Natomiast mało uwagi Doktorantka poświęciła systemom zabezpieczającym przed stresem na poziomie komórkowym i mechanizmom obronnym, które kontrolują przebieg metabolizmu w warunkach stresów środowiskowych. Pewnych nieścisłości dopatrzyłem się na stronie 16., i na podstawie tekstu można sądzić, że rośliny górskie są szczególnie narażone na stres

promieniowania, co bezsprzecznie jest prawdziwe, ale w moim odczuciu można odwrócić sposób postrzegania i założyć, że właśnie dzięki odpowiednim mechanizmom ochronnym w jakie zostały wyposażone, rośliny te mogą zasiedlać te trudne środowiska eksponowane na stres silnego promieniowania. Prace eksperymentalne zaplanowano na wybranych okazach roślin i w określonych punktach czasowych ważnych dla przebiegu reakcji rośliny na stres.

„Wstęp” pracy pomimo wypunktowanych zalet budzi jednak pewne zastrzeżenia. W mojej opinii zbyt skrótowo potraktowano rolę poszczególnych procesów fizjologicznych odpowiedzialnych za kształtowanie odporności, bez zrozumienia których szczegółowe analizy procesów biochemiczno/fizjologicznych nie dają się łatwo interpretować. Zgodzę się, że w publikacjach, szczególnie tzw. wysokoimpaktowych czasopismach, pomija się takie informacje, ale w pracach cenzusowych poświęca się znacznie więcej miejsca informacjom stojącym u podstaw badanych procesów. Ponadto mam wrażenie, że opis metody dyskryminacji ^{13}C wynikającej z aktywności RubisCO i PEPC aczkolwiek poprawny, to przy przedstawionym ograniczonym zestawie faktów może być dla czytelnika mało zrozumiały.

Stosowana nomenklatura naukowa jest w zasadzie poprawna, aczkolwiek w kilku miejscach Doktorantka nie ustrzegła się przed stosowaniem mało precyzyjnych określeń. Przykładowo mówienie o „zakłóceniach środowiskowych” przy opisie ery lodowcowej (str. 9) czy określanie „towarzyskości” gatunku (str.16) przy omawianiu zespołów biocenotycznych, nie jest poprawne. Również stosowanie terminu „tracona energia” (str.19) odnośnie tej porcji promieniowania, która nie jest wykorzystana w procesie fotosyntezy może nasuwać niepoprawne skojarzenia. W rzeczywistości to nadmiar niepotrzebnej energii jest wypromieniowywany. Mam wątpliwości co do stosowania w „Celu pracy” terminu „barwniki ochronne”, który wydaje się niefortunny, gdyż te same barwniki odgrywają też rolę w absorpcji promieniowania w procesie fotosyntezy przy niskich intensywnościach światła.

Podsumowując tę część pracy można stwierdzić, że we „Wstępie” Autorka wykazała się znajomością szerokiego fragmentu literatury, a omawiany rozdział został przedstawiony logicznie i poza wypunktowanymi przeoczeniami w przejrzysty sposób uzasadnia celowość podjętych badań. Doktorantka wykazała się też umiejętnością zarówno dostrzeżenia aktualnych, a niezbadanych obszarów jak i określenia problemu badawczego.

W rozdziale „Cel pracy” znajdujemy szereg faktycznie zrealizowanych zadań. Jako fizjolog roślin formułowałbym te zadania bardziej pod kątem procesów fizjologicznych, a nie konkretnych mierzonych parametrów.

W rozdziale „Materiał i Metody” znajdujemy szczegółowy opis materiału badań. Z zaciekawieniem czyta się ten fragment pracy. Precyzyjnie opisano poszczególne stanowiska

pomiarowe, a jako materiał do badań Autorka wybrała konkretne grupy roślin i w kompetentny sposób dobrała i pogrupowała materiał do badań ograniczając do minimum możliwe błędy. Można zadać dodatkowe pytanie jak wybierano konkretne liście do badań? Pytanie to jest o tyle istotne, że liście wykazują zasadnicze zróżnicowanie zależnie od ekspozycji na światło, a struktura analizowanych krzewów jest różna w zależności od wysokości n.p.m. Czy nie właściwiej byłoby charakteryzować materiał zawsze zacieniony, lub zawsze eksponowany na światło? Doprecyzowania wymaga termin „początek” i „koniec” okresu wegetacji oraz określenie „różne części krzewu”(str. 39).

Opis poszczególnych technik jest szczegółowy, umożliwiając ich powtórzenie i często wchodzi w detale laboratoryjne jak to zazwyczaj bywa opisywane w pracach cenzusowych. Autorka dokonała kompetentnego opisu metod i udokumentowała potrzebę stosowania pewnych modyfikacji, ułatwiając tym samym pracę ewentualnym kontynuatorom doświadczeń. Metodyka pracy jest właściwie dobrana. Szczegóły techniczne opisane w pracy wskazują na fakt, że Autorka świetnie zdaje sobie sprawę z wielu zagrożeń, próbuje je wyeliminować i unikać uzyskiwanie artefaktów. Próba statystyczna na jakiej wykonano badania upoważnia do wyciągnięcia jednoznacznych wniosków. Przeprowadzone analizy statystyczne wyników nie budzą zastrzeżeń.

W części eksperymentalnej opisanej w rozdziale „Wyniki” Doktorantka może pochwalić się obszerną ilością zanotowanych porównań dokonanych metodami statystycznymi i w rezultacie proste pomiary i obserwacje mogą być użyteczne przy analizie również innego materiału roślinnego. Przeprowadzenie analiz w dwóch terminach sezonu wegetacyjnego pozwoliło ocenić dynamikę procesu. Małe zastrzeżenia budzi przedstawianie współczynnika kolistości liści, który ma zastosowanie do bardzo ograniczonej grupy roślin.

Intencją Autorki było przebadanie liści przy pomocy dostępnych urządzeń, co jest oczywiste. Uzyskane wyniki skłaniają do zadania pytania czy zastosowane metody były optymalne dla wykazania różnic i zrozumienia na czym polegają adaptacje do danych warunków. Przy okazji wykazano, że to nie sama wysokość n.p.m. jest kluczowa dla natężenia stresu, ale czynniki pochodne wysokości. W przedstawionych wynikach wielokrotnie wykazano, że przy porównaniu dwóch grup z dwóch wyższych i dwóch wybranych z niższych wysokości obserwujemy brak zgodności z oczekiwaniami. Wiele parametrów wykazuje się brakiem zgodności z wysokością, ale w zgodzie z innymi parametrami. Tym samym te poszczególne parametry są bardziej wiarygodne i dają się wytłumaczyć na bazie znanych procesów opisanych w fizjologii fotosyntezy. W moim przekonaniu zebranie tych faktów jest istotnym osiągnięciem rozprawy. Obserwacje te mogą

wprowadzić istotne nowe elementy do naszej wiedzy na temat adaptacji roślin do zmiennych warunków środowiskowych. Przedstawione badania umożliwiają dogłębną interpretację dzięki równoległym pomiarom na podobnym materiale, co stanowi o wartości eksperymentów.

Wyniki są przedstawione w sposób skondensowany. Na uwagę zasługuje też fakt, że praca jest napisana zwięzłym, treściwym i poprawnym językiem, co ułatwia lekturę. Wszystkie pomysłowo przeprowadzone serie pomiarowe zaowocowały dużą ilością wyników, umożliwiły wyciągnięcie wielu wniosków, dokonanie pewnych uogólnień i zaproponowanie znaczenia zmian wybranych parametrów fizjologicznych, które mogą być stosowane do charakterystyki materiału roślinnego. Zebrany materiał eksperymentalny pozwala na szeroką dyskusję. W rozdziale „Dyskusja” Autorka przeanalizowała uzyskane wyniki na tle wielu innych prac z podobnego zakresu. Kolejność przedstawienia poszczególnych doświadczeń nie jest identyczna jak ta przyjęta w „Wynikach” i jestem przekonany, że podzielenie rozdziału „Dyskusja” na kilka podrozdziałów ułatwiłoby lekturę.

W tej części pracy Autorka wykazała się ostrożnym i krytycznym podejściem do przedstawionych rezultatów. Badań wykonanych na innym materiale, analizujących omawiany problem jest stosunkowo dużo. „Dyskusja” dostarcza czytelnikowi dużej porcji informacji i jest rzeczowa. Z dużym prawdopodobieństwem można sądzić, że wykonane prace będą inspiracją do dalszych prac i badań. „Dyskusję” otwiera charakterystyka miejsc poboru materiału, co dla niniejszej pracy jest kluczowym tematem. Z wielu względów pochodzenie materiału z form wklęsłych lub wypukłych terenu ma fundamentalne znaczenie dla długości okresu wegetacji, nawodnienia i nasłonecznienia. Autorka zauważa ponadto, że w badanym terenie brak jest lokalnych stacji meteorologicznych, co utrudnia charakterystykę materiału. Osobiście mam wrażenie, że bardziej szczegółowe dane niewiele wniosłyby do interpretacji danych ponieważ lokalne epizody pogodowe, bez znajomości „historii rozwoju” konkretnego badanego liścia nie jest łatwo zinterpretować. Ogólnym zarysem warunków klimatycznych dysponujemy, a lokalne szczegóły i tak w rzeczywistości nie jesteśmy w stanie powiązać z konkretnymi pomiarami.

Rozważania na temat powiązań między masą blaszki liściowej i jej pochodzeniem było już opisane w literaturze i w dużej mierze wynikają z różnej anatomii liścia i rozwoju poszczególnych miękiszów liściowych. Takie prace byłyby dobrym uzupełnieniem przedstawionych analiz. Stwierdzona (str. 75) „drugorzędna” rola parametru wysokości wyrażona w m.n.p.m jest dość oczywista. Autorka zauważa makroskopowe różnice (str.76) i słusznie wiąże je z zawartością barwników chlorofilowych w przeliczeniu na powierzchnię i

ich wzajemnych proporcji. Z zawartością poszczególnych barwników wiąże się aktywność poszczególnych fotosystemów i obecność anten fotosyntetycznych. Jestem przekonany, że jest to klucz do zrozumienia wielu stwierdzonych zależności. W tym zakresie dyskusja mogłaby być bardziej dogłębna i sięgająca do naszej wiedzy na temat struktury i rozwoju aparatu fotosyntetycznego. Bardzo ciekawy jest fragment dyskusji dotyczący dostępności światła w zakresie R/FR i powiązania z zawartością barwników chlorofilowych. Natomiast interpretacja analizy zawartości Flav w zależności od poziomu zaopatrzenia w mikro i makroelementy mogłaby napotkać na wiele kontrargumentów. Z bardzo dużym prawdopodobieństwem można sądzić, że jest to efekt wysokości i jakości docierającego promieniowania, a zasobność gleby jest jedynie efektem równoległym. Sprawdzenie tych tez w prostym doświadczeniu na takim samym podłożu na różnych wysokościach byłoby dość proste.

Interpretacja uzyskanych wartości dyskryminacji izotopu ^{13}C jest poprawna i zgodna z ogólnie przyjętymi tendencjami w literaturze. Nie mogę jednak zgodzić się z tezą, że to „zapas CO_2 wykorzystywany w procesie fotosyntezy” jest regulowany przez szparki. Znacznie bardziej prawdopodobne jest, że kluczowa jest bezpośrednia dostępność CO_2 . Należałoby dodać, że wartość tych wyników jest konsekwencją stojącego u podstaw tej metody kumulatywnego charakteru parametru w trakcie rozwoju liści. Analizę dyskryminacji ^{15}N ze względu na rzadko obserwowaną zdolność olszy zielonej do wiązania azotu atmosferycznego można zapewne próbować eksploatować w dalszych badaniach. Pomimo trudności i komplikacji procesu wybrany obiekt doświadczalny jest bardzo obiecujący i należałoby zwrócić w ewentualnych publikacjach więcej uwagi na ten ważny szczegół.

Przy porównywaniu krzywych fluorescencji uzyskanych w lipcu i we wrześniu zwróciłbym uwagę na fakt zróżnicowanej fazy rozwojowej liścia nakładającą się na inne aktualne warunki klimatyczne. Jest to niezwykle trudne w interpretacji, ale może pomóc zrozumieć obserwowane fakty. Przy okazji dyskusji tych wyników w bardzo klarowny sposób pokazano, że wysokość położenia stanowiska jest nie tym najistotniejszym parametrem dla ukształtowania ogólnego poziomu stresu, jednak termin „akumulacja stresu” (str. 80) będzie trudny do obronienia przy uwzględnieniu zróżnicowania długości sezonu wegetacyjnego i pokroju analizowanych okazów.

Analiza poszczególnych parametrów fluorescencyjnych dobitnie wskazała, które dane są użyteczne, a które obarczone poważnym błędem. Analiza ta pozwala też rozróżniać, które parametry nadają się do oceny aktualnej kondycji liści, a które charakteryzują trwałe zmiany znajdujące odzwierciedlenie w strukturze liścia i aparatu fotosyntetycznego. Doktorantka

zauważyła też istotne różnice we wrażliwości poszczególnych fragmentów liści wynikające z ich odmiennych funkcji fizjologicznych. Przy analizie niebiesko-zielonej fluorescencji, która wykracza poza zwykle stosowane badania, nawiązanie do struktur biochemicznych mogłoby być bardziej szczegółowe. Wyobrażenie Doktorantki o „pośredniczeniu RFT” przy asocjowaniu związków fenolowych ze strukturami ścian komórkowych (str. 82) należałoby poddać weryfikacji. Przyglądając się przeprowadzonej analizie poszczególnych parametrów oczekiwanie prostej interpretacji (np. str. 84) dotyczącej zawartości flawonoidów, karotenoidów w zależności od wysokości n.p.m. wydaje się absolutnie niemożliwe. Przy znajomości złożoności procesów aklimacji jest to nieprawdopodobne. Natomiast zastosowanie spektroskopii FT-Ramanowskiej potwierdziło wiele poprzednich analiz i ukazało możliwość szybkiej detekcji różnic w analizowanym materiale.

Niezależnie od wielu zalet ocenianej pracy „Dyskusja” ujawniła pewne słabości całego zamysłu badawczego. Dyskusja wyników w sposób bardzo ogólny podejmuje próbę oceny mechanizmów adaptacyjnych. W kategoriach szczegółowych nie jest to możliwe i wymagałoby znajomości wielu procesów i roli wielu białek, której jeszcze nie posiadamy. Wiele przeprowadzonych eksperymentów ukazały jak trudnym zagadnieniem jest powiązanie obserwacji fizjologicznych z wiedzą ekologa. Doktorantka wykazała jak niezwykle istotnym pytaniem jest dobór odpowiedniego czasu poboru materiału. W swoich doświadczeniach Doktorantka wykazała też jak nasza wiedza fizjologiczna jest ograniczona. Fakt wykonania prac na mało znanym materiale roślinnym dodatkowo utrudniał dyskusję. Uzyskane wyniki pomimo zastosowania wyrafinowanych technik nie doprowadziły do jednoznacznych wniosków wyjaśniających przyczyny wrażliwości/odporności badanych drzew i tu można mieć wrażenie pewnego niedosytu.

Wszystkie nadzieje na postęp w wykryciu zmian adaptacyjnych polegających na „modyfikacjach biochemicznych metabolizmu” w doświadczeniu terenowym nie wydają się realistyczne. Natomiast sprecyzowane wnioski pokazują ogólny wkład Doktorantki w postęp w badaniach nad wybranym gatunkiem jak również mogą mieć zastosowanie w analizie wpływu wysokości n.p.m. na innym materiale roślinnym. Wnioski nr 5 i 11 można zapisać bardziej konkretnie.

Wszelkie moje krytyczne uwagi nie ujmują wartości merytorycznej pracy i stanowią jedynie rady, które powinny być rozważone przy dalszym opracowywaniu tekstu. Opisane powyżej spostrzeżenia dotyczące ocenianej pracy skłaniają mnie do sformułowania następujących pytań pod adresem Doktorantki:

1. Znaczna część dyskusji toczy się wokół problemów zmiany wybranych parametrów fizjologicznych w zależności od wysokości stanowiska n.p.m.. Wyniki badań wskazują, że niektóre z badanych parametrów korelują z wysokością. Czy na podstawie przedstawionych wyników doświadczeń można spekulować na temat różnic lub podobieństwa reakcji rośliny na inne czynniki stresowe?

2. Czy w kontekście przedstawionych wyników i danych literaturowych można spekulować na temat podobieństwa reakcji na stres wysokości z modelową rośliną *A. thaliana*?

Podsumowanie:

Oceniana praca zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich i spełnia wszelkie wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Autorka wykazała się wiedzą, skrupulatnością i przygotowaniem do prowadzenia prac badawczych. Ponadto wykonała dużą ilość badań, które stanowią znaczący wkład w postęp badań dotyczących oceny wrażliwości roślin na stres wysokości w warunkach naturalnych. Badania bez wątpienia będą w przyszłości eksploatowane także przez badaczy zajmujących się innymi roślinami. W związku z tym z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr inż. arch. Magdaleny Odrzywolskiej-Hasiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/-/ Zbigniew Miszalski