

Warszawa, dn. 20 kwietnia 2020 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Spalik
Instytut Biologii Ewolucyjnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
e-mail: spalik@biol.uw.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Winnickiej

pt. „Tolerance of dessication stress in *Sphagnum denticulatum* Brid. (Sphagnaceae) from aquatic and terrestrial habitats”

Rozprawa mgr Katarzyny Winnickiej składa się z trzech angielskojęzycznych publikacji zbiorowych oraz ich omówienia w języku polskim. Pani Katarzyna Winnicka była pierwszą autorką w wszystkich publikacjach, podczas gdy autorką korespondencyjną była dr hab. Iwona Melosik, czyli promotorka doktorantki. Z oświadczeń współautorów oraz z not o ich udziale zamieszczonych w dwóch artykułach wynika, że promotorka była również autorką manuskryptów wszystkich publikacji, co stwarza problem z oceną indywidualnego wkładu doktorantki. Według art. 13 ust. 4 Ustawy o stopniach i tytule naukowym „Rozprawę doktorską może (...) stanowić samodzielna i wyodrębniona¹ część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.” Na podstawie oświadczeń współautorów można jednak wnioskować, że doktorantka wykonała część eksperymentalną, jest także jedyną autorką liczącego 60 stron wprowadzenia, co łącznie pozwala ocenić jej indywidualny wkład w przedstawione dzieło.

Składające się na rozprawę artykuły ukazały się w *Plant Physiology and Biochemistry* (IF = 3,4), *Plant Biosystems* (IF = 1,5) oraz *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* (IF = 2,5). Pierwsze czasopismo jest w pierwszym kwartylu dyscypliny Plant Science w kategoryzacji JCR Clarivate, natomiast dwa pozostałe – w drugim kwartylu. Są to renomowane czasopisma botaniczne, w których artykuły przyjęte do druku są zazwyczaj poddane rygorystycznemu procesowi redakcyjnemu, co ułatwia pracę recenzentowi rozprawy.

Doktorantka zajęła się niezwykle interesującym gatunkiem mchu – torfowcem ząbkowanym (*Sphagnum denticulatum*), charakteryzującym się szerokim spektrum ekologicznym. Oprócz form lądowych, charakterystycznych dla torfowisk wysokich, ma on także ekotypy wodne, występujące w pełnym zanurzeniu w oligotroficznym jeziorach lobeliowych. Bliskie pokrewieństwo form lądowych i wodnych zostało potwierdzone metodami filogenetycznymi. Jest to zatem doskonały obiekt do badania tolerancji mchów na stres wywołany przez suszę, można bowiem założyć, że różnice w odpowiedzi na stres obserwowane u obu form mają podłoże genetyczne. Z drugiej jednak strony należy zauważyć, że ekotyp wodny wywodzi się z ekotypu lądowego, a zatem różnice między nimi w mniejszym stopniu wynikają z doboru pozytywnego, premiujące-

¹ podkreślenie moje [KS]

go warianty genów warunkujące wyższą tolerancję na stres suszy u ekotypu lądowego, a w większym – z braku u ekotypu wodnego doboru oczyszczającego, działającego na te geny. W warunkach stałego zanurzenia w wodzie nie mają one już bowiem znaczenia adaptacyjnego. Trudności z interpretacją wyników, jakie napotkała doktorantka, w dużej części mogą mieć właśnie źródło w ewolucyjnym pochodzeniu ekotypu wodnego. Oba ekotypy reprezentowane były łącznie przez pięć genotypów (klonów), co dodatkowo utrudnia interpretację – jednak w tym wypadku doktorantka ma pełną świadomość tych ograniczeń.

Pierwsza z publikacji składających się na doktorat dotyczy zmian na poziomie ultrastrukturalnym u obu ekotypów w odpowiedzi na stres suszy oraz następujące po nim nawodnienie. Doktorantka badała zmiany w komórkach merystematycznych z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz zmiany fluorescencji chlorofilu, przede wszystkim parametru F_v/F_m , który określa maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II. Zauważyła, że u roślin poddanych wysuszeniu wartość tego parametru znacząco spadała, osiągając wartości znamionujące zaprzestanie aktywności fotosystemu II, a tym samym i reakcji fotosyntezy. Choć wzrosła ona po nawodnieniu roślin, nie powróciła do wartości wyjściowych nawet po 30 dniach. Nie zauważono różnic w parametrach fluorescencji między ekotypami lądowym i wodnym. Takie różnice natomiast stwierdzono na poziomie ultrastruktury – zmiany u ekotypu wodnego były głębsze, świadczące o trwalszym uszkodzeniu komórek oraz o mniejszej zdolności tego ekotypu do regeneracji po wysuszeniu niż ekotypu lądowego. Co interesujące, stwierdzono zróżnicowanie nie tylko między ekotypami, ale także między klonami (genotypami) – np. zmiany parametrów komórek merystemu apikalnego u lądowego klonu nr 4 były kierunkowo bardziej podobne do tych u klonów nr 1 i 2 ekotypu wodnego niż klonów nr 3 i 5 ekotypu lądowego (ryc. 7 w omawianej pracy). Jak zauważają autorzy w dyskusji, takie zróżnicowanie oraz jego mechanizmy są istotne w dynamice torfowisk wysokich – sukcesji dolinek i kępek. Choć ten wątek nie był bezpośrednio badany przez doktorantkę, to przewija się przez wszystkie trzy publikacje i jest bardzo ważnym ekologicznym kontekstem jej badań.

Zmiany aktywności fotosyntetycznej u badanych roślin są głównym tematem drugiego artykułu. W tej pracy przedstawiono wartości kilku parametrów fluorescencji chlorofilu oraz szacowano zawartość barwników fotosyntetycznych: chlorofilów *a* i *b* oraz karotenoidów. Zaobserwowano znaczące różnice między ekotypami i genotypami w zakresie niektórych parametrów, które sugerują większą cienioznośność ekotypu wodnego, a także wyższą fotoinhibicję w warunkach wysuszenia u ekotypu lądowego, co może świadczyć o lepszych mechanizmach fotoprotekcji – ogółem jednak reakcje obu ekotypów na wysuszenie i nawodnienie były podobne. Autorzy podkreślają jednak pewne zróżnicowanie tej odpowiedzi między genotypami – wniosek zgodny z konkluzją pierwszej pracy.

Ostatnim aspektem badań doktorantki były zmiany poziomu ekspresji genów u obu ekotypów poddanych stresowi suszy. W celu identyfikacji genów ulegających silniejszej ekspresji w warunkach suszy doktorantka porównała profile AFLP uzyskane z wykorzystaniem cDNA dla prób poddanych wysuszeniu oraz prób kontrolnych. Następnie, sekwencjonując różnicujące prążki i identyfikując je na podstawie baz genów, wybrała zestaw 21 genów, których ekspresję zbadała ilościowo za pomocą metody RT-qPCR. Zsekwencjonowała także 19 ge-

nów dla obu ekotypów, aby sprawdzić, stosując test oparty na stosunku podstawień niesynonimicznych do synonimicznych, czy podlegają one doborowi. Wartości tego stosunku zbliżone do jedności świadczą o ewolucji neutralnej, wyższe od jedności – o doborze pozytywnym, natomiast niższe – o doborze oczyszczającym. Wyniki tej części rozprawy, choć niewątpliwie interesujące, są jednak bardzo trudne do interpretacji. Żaden ze zbadanych 21 genów nie zmienił istotnie ekspresji u ekotypu lądowego pod wpływem stresu suszy. Natomiast u ekotypu wodnego dziewięć genów zmieniło poziom ekspresji w sposób znaczny i statystycznie istotny – nie tworzą one jednak funkcjonalnej grupy. Niekonkluzywna jest także analiza sekwencji pod kątem działania doboru naturalnego – choć niektóre zastosowane modele wskazywały na dobór pozytywny w wypadku niektórych genów, różne zastosowane metody nie dawały spójnego wskazania, a ogólna liczba stwierdzonych podstawień nie była zbyt wysoka: łącznie zaobserwowano 48 substytucji niesynonimicznych i 51 synonimicznych, co sugeruje raczej ewolucję neutralną.

Na podkreślenie zasługuje bardzo dobra dyskusja wyników we wszystkich publikacjach oraz ich krytyczne podsumowanie we wprowadzeniu, którego autorką była już sama doktorantka. Ma ona pełną świadomość ograniczeń przeprowadzonych badań, a wnioski wysuwa z dużą ostrożnością. Czytając poszczególne publikacje, zapisywałem swoje wątpliwości dotyczące m.in. liczby użytych klonów (genotypów), ewolucyjnego pochodzenia ekotypu wodnego i związanych z tym ograniczeń, sposobu identyfikacji genów o zmiennej ekspresji oraz analizy doboru – po czym znajdowałem swoje zastrzeżenia omówione albo w dyskusji w artykułach, albo w ich podsumowaniu. Zwłaszcza zagadnienie ewolucyjnego pochodzenia ekotypu wodnego – dość pobieżnie potraktowane w publikacjach – jest szeroko i wnikliwie przedyskutowane w polskojęzycznej części rozprawy.

Jeden aspekt przeprowadzonych badań wymaga dodatkowego wyjaśnienia. Opis warunków eksperymentu w publikacjach oraz w polskim wprowadzeniu sugeruje, że był on przeprowadzony jedynie raz, a kolejne publikacje dotyczą jego różnych aspektów, nie zaś wyników kolejnych doświadczeń, w których warunki byłyby modyfikowane, np. w oparciu o wyniki poprzedniego etapu. Brakuje mi informacji, na jakiej podstawie ustalono czas przesuszania roślin na 3 lub 4 doby? Czy nie jest to czas zbyt długi, zwłaszcza u ekotypu wodnego, co zresztą sugerują wyniki eksperymentu? Świadczą one o poważnych uszkodzeniach w ultrastrukturze i w funkcjonowaniu komórek, ponieważ nawet po 30 dniach od ponownego nawodnienia nie doszło do powrotu badanych parametrów do wartości sprzed eksperymentu nie tylko u ekotypu wodnego, ale nawet u ekotypu lądowego. Innymi słowy, stres był zbyt silny, a w pracy zbadano nie tyle fizjologiczną odpowiedź roślin na stres, co skutki uszkodzeń komórek przez ten stres powstałe wskutek niezdolności roślin do właściwej nań odpowiedzi. W publikacjach podano, że największa utrata wody zaszła w ciągu pierwszych 10–14 godzin. Może w tym czasie należało wykonać badania, zwłaszcza w zakresie zmian ekspresji genów, zamiast po 72 lub 96 godzinach?

Polskojęzyczne wprowadzenie napisane jest ogólnie dobrym językiem, choć nieco razi nadmiar naukowego żargonu i nazbyt częste podawanie oczywistych angielskich odpowiedników polskich terminów. Podział tekstu, zwłaszcza „Wstępu” i „Dyskusji”, na merytorycznie zatytułowane podrozdziały ułatwiłby jego czytanie i przyswojenie. Pod względem merytorycznym wprowadzenie to

jest jednak bardzo dobre i zdecydowanie wykracza poza streszczenie załączonych artykułów, rozwijając poruszane w nich zagadnienia i krytycznie podsumowując całość badań. Bardzo dobrze świadczy o kompetencjach doktorantki i potwierdza jej znaczący udział w powstaniu publikacji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami), uwzględniając przy tym indywidualny wkład doktorantki w powstanie publikacji zbiorowych zgodnie z par. 6 ust. 5 rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Wniosuję zatem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Winnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk biologicznych, dyscyplinie *biologia*. Wniosuję także o stosowne wyróżnienie tej rozprawy.



Krzysztof Spalik