

Prof. dr hab. Adam Stebel
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej i Zielarstwa
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Ostrogórska 30
41-200 Sosnowiec
e-mail: astebel@sum.edu.pl; adamstebel@gmail.com

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

pt. „Tolerance of desiccation stress in *Sphagnum denticulatum* Brid. (Sphagnaceae, Bryophyta) from aquatic and terrestrial habitats [Tolerancja stresu suszy u mchu torfowca *Sphagnum denticulatum* Brid. (Sphagnaceae, Bryophyta) pochodzącego z siedlisk wodnych i lądowych”]

**wykonanej przez magister Katarzynę Winnicką
w Zakładzie Genetyki Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. A.
Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Iwony Melosik**

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Winnickiej ma charakter eksperymentalny. Celem pracy była ocena biologicznych efektów dehydratacji i rehydratacji u pięciu genotypów wodnych i lądowych ekotypów torfowca ząbkowanego *Sphagnum denticulatum*. Autorka sformułowała trzy pytania badawcze, na które starała się znaleźć odpowiedzi analizując otrzymane wyniki oraz informacje dostępne w literaturze. Badania zostały przeprowadzone na kilku poziomach organizacji organizmu torfowca – morfologicznym, ultrastruktury komórek, fizjologicznym i molekularnym, z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod (badano wybrane cechy morfologiczne, zmiany w ultrastrukturze komórek, fluorescencji chlorofilu, zawartości barwników fotosyntetycznych, ekspresję wybranych genów oraz wpływ selekcji pozytywnej na miejsca nukleotydowe).

Układ formalny pracy

Praca składa się z dwóch zasadniczych części. Pierwsza, wprowadzająca, obejmuje omówienie i dyskusję wyników zawartych w publikacjach składających się na rozprawę doktorską. Druga zawiera zestaw publikacji, w których zamieszczone są najważniejsze wyniki otrzymane podczas realizacji tematu badań. Obejmuje on trzy prace, wszystkie opublikowane w czasopismach z Listy Filadelfijskiej.

Ocena publikacji składających się na rozprawę doktorską

1. Winnicka K., Melosik I. Wojciechowicz M. K. 2018. Ultrastructure variations in *Sphagnum denticulatum* ecotypes in response to desiccation stress matter to conservation. – *Plant Physiology and Biochemistry* 132: 363 – 374.

Mgr Katarzyna Winnicka odpowiedzialna była za przeprowadzenie eksperymentu, analizę i interpretację wyników oraz współuczestniczyła w planowaniu koncepcji i przygotowaniu tekstu, a jej udział w powstaniu artykułu wynosił 60%. Autorzy wykazali, że genotypy lądowe miały lepszą zdolność do regeneracji po wysuszeniu niż genotypy wodne, co sugeruje ich lepszą adaptację do zmiennych i nieprzewidywalnych warunków siedlisk naziemnych. Koncepcja eksperymentu, dobór materiału i adekwatnych metod nie budzą zastrzeżeń. Praca zawiera obszerną dyskusję, a wyniki ilustrowane są licznymi wykresami i diagramami oraz trafnie dobranymi, oryginalnymi fotografiami wykonanymi za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

2. Winnicka K., Melosik I., Joniak T., Luciński R. 2019. The effect of extreme dehydration on photosynthetic activity of *Sphagnum denticulatum* cultivated genotypes from different habitats. – *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. DOI: 10.1080/11263504.2019.1635220

Autorka również była odpowiedzialna za przeprowadzenie eksperymentu, analizę i interpretację wyników oraz współuczestniczyła w planowaniu koncepcji i przygotowaniu tekstu, a jej udział w powstaniu artykułu wynosił 75%.

W pracy badano wpływ ekstremalnego odwodnienia na aktywność fotosyntetyczną genotypów *Sphagnum denticulatum* pochodzących z siedlisk lądowych i wodnych. Wykorzystano dwa różne źródła informacji (fluorescencję chlorofilu i zawartość barwników asymilacyjnych) do oceny wrażliwości na wysuszenie ściśle określonych genotypów *Sphagnum denticulatum*. Wykazano, że osobniki mogą częściowo powrócić do funkcjonowania po wysuszeniu, a także obserwowano specyficzne dla badanych ekotypów reakcje. Podobnie jak w poprzedniej publikacji, koncepcja eksperymentu, dobór materiału i adekwatnych metod są poprawne a otrzymane wyniki szczegółowo omówione i przedyskutowane.

3. Winnicka K., Melosik I. 2019. Genetic and expression differences between putative ecotypes of *Sphagnum denticulatum* Brid. (Sphagnaceae: Bryophyta) subjected to drought stress and rehydration. – *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 37: 39–52.

Autorka była odpowiedzialna za zaplanowanie i przeprowadzenie eksperymentu, analizę i interpretację wyników oraz współuczestniczyła w planowaniu koncepcji i

przygotowaniu tekstu, a jej udział w powstaniu artykułu wynosił 85%. W pracy badano ekspresję genów dwóch ekotypów (wodnych i lądowych) *Sphagnum denticulatum*, stosując metody cDNA-AFLP oraz RT-qPCR. Wykazano, że większość znaczących różnic we wzorach transkrypcji była widoczna u roślin wodnych. Ekspresja była znacznie mniej wyraźna w roślinach lądowych, co wskazuje, że są one lepiej przygotowane do wytrzymania stresu związanego z suszą. W pracy po raz pierwszy badano genetyczne podstawy przypuszczalnej ewolucji adaptacyjnej u torfowców.

W mojej ocenie przedstawione prace stanowią ważny krok w poznaniu mechanizmów odpowiedzi roślin na stres wywołany suszą. Badania dotyczą torfowców – organizmów niezwykle ważnych w obiegu wody w wielu rejonach Ziemi, a także głównych komponentów torfowisk, które są jednymi z największych rezerwuarów węgla na świecie. Wobec zachodzących zmian klimatycznych, postępującego efektu cieplarnianego, temat pracy jest bardzo aktualny, a otrzymane wyniki mogą mieć zastosowanie aplikacyjne.

Prace napisane są bardzo starannie, w czasopiśmie z wysokim współczynnikiem oddziaływania (impact factor), zostały zauważone i są cytowane w literaturze o zasięgu światowym. We wszystkich pracach, na wszystkich etapach ich powstawania, udział Autorki był znaczący. Moja ocena tej części rozprawy doktorskiej jest jednoznacznie pozytywna.

Ocena części wprowadzającej

Część wprowadzająca pracy ma układ typowy dla tradycyjnych rozpraw doktorskich. Po streszczeniu (w języku polskim i angielskim) Autorka zamieściła obszerny wstęp. Omawia w nim krótko rolę torfowisk w przyrodzie, zwracając uwagę na ich rolę w kształtowaniu klimatu oraz magazynowaniu organicznego węgla i azotu. Porusza problem ich zagrożeń oraz płynących z tego konsekwencji a także ochrony wskazując, że poznanie reakcji torfowców na stres suszy oraz mechanizmów adaptacji tych roślin do środowiska może mieć duże znaczenie w planowaniu skutecznych zabiegów ochronnych torfowisk. Dalszą część wstępu zajmuje omówienie systematyki i ekologii rodzaju *Sphagnum*. Obszerny fragment dotyczy strategii zabezpieczenia się przed stresem suszy roślin, ze szczególnym uwzględnieniem mszaków. Omówiono adaptacje na różnych poziomach – morfologicznym, anatomicznym, ultrastruktury komórek, fizjologicznym i molekularnym. Wstęp kończy charakterystyka obiektu badań – torfowca ząbkowanego *Sphagnum denticulatum*. Ponieważ jest on gatunkiem poliploidalnym, omówiono tu także zagadnienia dotyczące hybrydyzacji i poliploidalności u roślin. Autorka zadała tu także trzy pytania, na które szukała odpowiedzi podczas swoich badań.

W kolejnej części omówione zostały metody. Scharakteryzowano dokładnie materiał badawczy (gametofity 3 genotypów lądowych i 2 ekotypów wodnych), warunki hodowli roślin, dobór cech morfologicznych i ultrastruktur komórkowych uwzględnionych w porównaniach. Następnie Autorka omówiła metody (ChIFP, cDNA-ALFP i RT-qPCR) którymi się posługiwała w celu uzyskania odpowiedzi na postawione pytania badawcze. Wskazała również, dlaczego wybrała takie metody i jakie informacje można uzyskać przy ich zastosowaniu. Ta część napisana jest poprawnie, dobór metod nowatorski i odpowiedni do osiągnięcia zakładanych celów.

Po omówieniu metod mgr Katarzyna Winnicka przedstawiła uzyskane wyniki. Zostały one ułożone zgodnie z poziomami prowadzonych analiz. Najpierw przedstawiono rezultaty badań nad morfologią badanych roślin, następnie ultrastrukturą ich komórek, zróżnicowaniu wartości fizjologicznych oraz różnicom w ekspresji wybranych genów.

Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane z dostępną literaturą. Dyskusja jest prowadzona w sposób wyważony. Autorka w wielu kwestiach ostrożnie podchodzi do uzyskanych danych, jest krytyczna i dostrzega niektóre ograniczenia w swoich badaniach. W dyskusji stawia szereg hipotez, np. *„Rośliny ze stanowisk wodnych wykazują adaptację lokalną oraz obniżony stopień plastyczności, natomiast rośliny lądowe są bardziej plastyczne i mogą łatwiej dostosować się do warunków stresowych, dlatego lepiej zniosły wysuszenie”*, które w większości są dobrze uzasadnione otrzymanymi wynikami. Postuluje też kolejne badania, mające dać odpowiedź na powstałe nowe pytania. Sposób przeprowadzenia dyskusji, jej wieloaspektowość, krytyczne podejście do niektórych otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości Autorki, dużej wiedzy oraz dobrym przygotowaniu do prowadzenia badań.

Całość zamyka wykaz literatury, obejmujący aż 232 prace.

Część wprowadzająca napisana jest poprawnie, ułożona logicznie, powoli wprowadzając i przeprowadzając czytelnika przez skomplikowane zagadnienia poruszane w pracy, zarówno w części metodycznej, jak również w części dotyczącej wyników i ich interpretacji. Liczba cytowanych prac jest znaczna, praktycznie wyczerpuje ich listę w literaturze światowej, co świadczy dużym zaangażowaniem Autorki w zgłębianiu tematu badań i jej dużej wiedzy w tym zakresie. Tekst pracy jest komunikatywny, maksymalnie wysycony treścią, z dużą liczbą trafnie dobranych cytowań publikacji naukowych. Szczególnie dotyczy to wstępu, który, moim zdaniem, może być opublikowany jako artykuł przeglądowy. Również moja ocena tej części rozprawy doktorskiej jest jednoznacznie pozytywna.

Najważniejsze osiągnięcia

Tematyka związana z tolerancją stresu suszy u mszaków nie jest jeszcze dobrze rozpoznana, stąd też każde wyniki badań są cenne. Do najważniejszych osiągnięć Autorki można zaliczyć:

- pierwsze, wieloaspektowe badania torfowca, organizmu wrażliwego na wysuszenie, które dostarczyło nowych danych do poznania biologii tej grupy roślin,
- pierwsze zastosowanie metody RT-qPCR do opisu zmian ekspresji genów u mchu torfowca w warunkach dehydratacji,
- ocenę użyteczności zastosowanych metod w badaniach tolerancji na wysuszenie u torfowców
- wykazanie, że torfowiec ząbkowany *Sphagnum denticulatum* jest w stanie przetrwać głęboki stres suszy, w związku z czym może być wykorzystywany przy rewitalizacji terenów bagiennych.

Reasumując stwierdzam, że praca ma charakter nowatorski zarówno jeżeli chodzi o zastosowanie po raz pierwszy określonych metod w badaniach biologii torfowców jak również sposobu interpretacji danych.

Uwagi i pytania

Praca napisana jest starannie i nie zauważyłem w niej błędów merytorycznych. Otrzymane wyniki są prawidłowo zinterpretowane i przedyskutowane. Postawione hipotezy są uzasadnione. Moja uwaga dotyczy jedynie formalnej strony części wprowadzającej. Ilość poruszanych wątków, liczne wyniki, obszerna dyskusja byłyby lepiej odebrane przez czytelnika, gdyby zostały uporządkowane wewnątrz głównych rozdziałów. Ujęcia poszczególnych zagadnień w hierarchiczny układ podrozdziałów (np. w systemie cyfrowym: 1., 1.1, 1.2. itd.) dałoby bardziej przejrzysty obraz, a ponadto w tekście można byłoby odwoływać się do konkretnych omawianych tematów umieszczonych w różnych częściach pracy.

Czytając pracę, nasunęło mi się kilka pytań:

1. Szereg gatunków mszaków to gatunki zasiedlające środowisko lądowe i wodne. Jak długo trwa adaptacja do poszczególnych środowisk?
2. Czy zmiana parametrów fizycznych i chemicznych wody może zmienić reakcję torfowców na stres suszy?
3. Czy niektóre z zaproponowanych metod można będzie wykorzystać do badania innych roślin zasiedlających siedliska ziemno-wodne?

Podsumowanie

Po przeczytaniu przedłożonej do recenzji pracy stwierdzam, że ma ona dużą wartość naukową a Autorka jest dobrze przygotowana do prowadzenia prac badawczych. Praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (tekst jednolity, Dz. U. z 2014 r. poz. 1852) oraz warunki proceduralne opisane w art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669), w związku z czym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani magister Katarzyny Winnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wskazane w recenzji osiągnięcia Autorki oraz wysoką ocenę poszczególnych części rozprawy zwracam się uprzejmie z kolejnym wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Winnickiej.

Sosnowiec, dnia 16 kwietnia 2020 r.



prof. dr hab. Adam Stebel