

dr hab. Agata Konarska, prof. UP
Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15
20-950 Lublin

Lublin, 2.02.2021r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Wiśniewskiej

pt. „Analiza porównawcza kwiatowych struktur wydzielniczych u wybranych gatunków Orchidaceae Schltr. i Apocynaceae Juss. wabiących muchówki (Diptera)”

wykonanej w Katedrze Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego
pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Kowalkowskiej, prof. UG

Od wielu lat globalnym problemem środowiskowym jest spadek różnorodności gatunkowej roślin, pośrednio wynikający ze zmniejszania się liczebności owadów zapylających. Ich obecność jest niezbędna, aby zapewnić zmienność genetyczną, sukces rozrodczy, a także powiązane z nim rozprzestrzenianie się roślin owadopylnych. Powszechnie uważa się także, że relacje roślin z zapylaczami mają duży wpływ na ewolucję roślin. Zainteresowanie człowieka zjawiskiem koewolucji oraz mechanizmami zapylania i rolą zwierząt w tym procesie sięga ostatnich kilku dekad. Jednak zjawisko koewolucji zostało opisane po raz pierwszy już ok. 100 lat temu przez Karola Darwina.

Rośliny kwiatowe wykształciły wiele mechanizmów przywabiania zapylaczy związanych z wytwarzaniem atraktantów wizualnych, zapachowych i/lub pokarmowych. Wśród tej grupy roślin niewątpliwym prym wiodą przedstawiciele Orchidaceae. Takie nagrody kwiatowe, jak nektar i ciała tłuszczowe oferowane zapylaczom w zamian za efektywne zapylenie oraz swoisty zapach, atrakcyjny dla różnych grup zapylaczy wytwarzane są przez kwiatowe struktury wydzielnicze, typu nektarniki, elajofory i osmofory. Jednak uważa się, że sygnały zapachowe mają znacznie lepszy zasięg transmisji niż atraktanty wizualne. Tematyka zapylania roślin i dostosowywania się kwiatów do budowy morfologicznej i potrzeb swoich zapylaczy oraz budowa i funkcjonowanie kwiatowych struktur wydzielniczych jest w dalszym ciągu aktualna i nie końca poznana.

Powyższej tematyki dotyczy przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Natalii Wiśniewskiej, która przedstawia mikrostrukturę kwiatowych struktur wydzielniczych oraz

adaptacje kwiatów kilku gatunków sapromiofilnych z rodzin Orchidaceae i Apocynaceae do zapylania przez muchówki.

Recenzowana dysertacja oparta jest na trzech oryginalnych pracach badawczych opublikowanych w języku angielskim w czasopismach z Listy Filadelfijskiej, tj. w „Protoplasma” (dwie prace) i „South African Journal of Botany” (jedna praca). Wszystkie prace mają styl i układ typowy dla publikacji naukowych, zgodny także z wymaganiami konkretnego czasopisma. W strukturze treści każdego z artykułów wyróżniono wstęp podsumowujący wcześniejsze badania, wyraźnie przedstawiony cel pracy, materiał i metody badawcze, szczegółowe omówienie wyników własnych, dyskusję opartą o literaturę przedmiotu oraz piśmiennictwo.

Złożonej do recenzji rozprawie, oprócz trzech artykułów, towarzyszy także krótkie streszczenie w języku polskim i angielskim. Streszczenia są zwarte i napisane poprawnie pod względem formalno-językowym, jednak oczekiwałam w nich wyraźniej postawionej hipotezy badawczej.

Wszystkie publikacje wchodzące w skład dysertacji są wieloautorskie; pierwszą współtworzyło pięciu autorów, drugą – czterech, a trzecią – trzech. W każdej z publikacji Doktorantka jest jednak pierwszym autorem, a z załączonych w rozprawie oświadczeń wynika, że jej udział w powstaniu prac był znaczny i wyniósł 50%, 80% i 85%, odpowiednio. Doktorantka uczestniczyła prawie we wszystkich etapach pracy, tj. pozyskaniu funduszy na realizację projektu, kierowaniu projektem, wykonywaniu części eksperymentalnej oraz opracowaniu i interpretacji wyników, odgrywając wiodącą rolę w powstaniu każdej z publikacji. Jednak z zamieszczonych oświadczeń współautorów wynika także, że Doktorantka nie miała indywidualnego wkładu w przygotowanie materiału i obrazowanie w transmisyjnym mikroskopie elektronowym oraz nie brała udziału w opracowywaniu koncepcji żadnej z publikacji.

Prace stanowiące rozprawę doktorską stanowią spójną tematycznie analizę porównawczą struktur wydzielniczych oraz adaptacji kwiatów do zapylania przez muchówki u trzech gatunków sapromiofilnych z rodzaju *Bulbophyllum* (*B. levanae*, *B. nymphopolitanum* i *B. echinolabium*) należących do rodziny Orchidaceae oraz dwóch gatunków z rodziny Apocynaceae (*Echidnopsis cereiformis* i *Stapelia situla*). Mimo że wiele tajników koewolucji i mimikry u roślin zostało już dobrze poznanych, to uważam, że zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej, dotyczące przedstawicieli dwóch odległych filogenetycznie rodzin,

k którzy nie byli dotychczas badani pod tym kątem, są oryginalne i wartościowe.

W artykułach stanowiących rozprawę doktorską szczegółowo scharakteryzowano morfologię kwiatów badanych taksonów oraz określono lokalizację i rodzaje struktur wydzielniczych obecnych w tych organach. Kompleksowo i wyczerpująco przeanalizowano sposoby sekrecji wydzieliny oraz budowę osmoforów, a w przypadku *Bulbophyllum echinolabium* także nektarników. Struktury wydzielnicze obecne na listkach okwiatu i warzce u przedstawicieli Orchidaceae oraz na płatkach korony u Apocynaceae scharakteryzowano na poziomie morfologicznym, anatomicznym i ultrastrukturalnym umiejętnie stosując z reguły właściwie dobrane metody i narzędzia badawcze.

Doktorantka wraz z zespołem wykazała, że wydzielina powstająca w komórkach osmoforów, transportowana była w formie pęcherzyków i ostatecznie gromadziła się w przestrzeniach peryplazmatycznych, tworzących się między plazmolemmą a ścianą komórek epidermy. Następnie wydzielina uwalniana była na zewnątrz osmoforu przez mikrokanaliki polisacharydowe obecne w kutykuli i/lub przez pęknięcia powstające w tym nabłonku na skutek wzrostu ciśnienia wewnątrz protoplastów komórek epidermy. Chcę podkreślić, że jednoczesne występowanie mikrokanalików i przestrzeni peryplazmatycznych w komórkach osmoforów przedstawicieli *Bulbophyllum* opisano po raz pierwszy w niniejszej dysertacji.

Dla każdego z gatunków określono także typ wydzieliny przy zastosowaniu wybranych testów histochemicznych i stwierdzono, że wydzielina miała zróżnicowany charakter, najczęściej jednak białkowy, nawiązujący do zapachu rozkładającej się padliny. Uważam, że w tej części pracy korzystne byłoby zastosowanie większej różnorodności testów histochemicznych (zwłaszcza do wykrywania różnych grup związków fenolowych i lipidów), które pozwoliłyby dokładniej określić charakter wydzieliny.

Dodatkowo dla *Bulbophyllum echinolabium*, tj. gatunku, u którego zlokalizowano zarówno osmofony, jak i nektarniki, określono skład chemiczny produkowanej wydzieliny w oparciu o chromatografię gazową ze spektrometrią mas. Wydzielinę ekstrahowano dwoma sposobami, stosując dichlorometan lub metanol. Właściwie dobrana metodyka analizy składu chemicznego wydzieliny pozwoliła ujawnić w niej różne grupy metabolitów.

W wydzielinie ekstrahowanej przy użyciu metanolu wykazano m.in. obecność cukrów, tj. głównych składników nektaru, co potwierdza występowanie nektarników w kwiatach tego gatunku. Wykrycie nektarników w zapylanych przez muchówki kwiatach

B. echinolabium jest znaczącym osiągnięciem mgr Wiśniewskiej i zespołu, gdyż z dotychczasowych danych literaturowych wynika, że kwiaty sapromiofilne, uważane za tzw. kwiaty zwodnicze (ang. deceptive flowers), często nie oferują zapylaczom żadnego pokarmu.

Z kolei badania profilu zapachowego wydzieliny *B. echinolabium* uzyskanej przy zastosowaniu dichlorometanu wykazały występowanie w niej licznych związków chemicznych, wśród których zidentyfikowano 10 będących atraktantami zapachowymi muchówek. Niektóre z tych związków opisano wcześniej w zapachu zwłok wołu, uryny czy odchodów, co potwierdza występowanie mimetyzmu zapachowego u badanego gatunku *Bulbophyllum*. Szkoda jednak, że analiza składu wydzieliny nie została przeprowadzona dla żadnego z przedstawicieli drugiej badanej rodziny (Apocynaceae). Doktorantka posiłkowała się w tej kwestii jedynie danymi uzyskanymi wcześniej przez różnych autorów dla innych rodzajów i gatunków należących do Apocynaceae. Uważam, że przeprowadzenie takiej analizy dla *Echidnopsis cereiformis* i/lub *Stapelia situla* znacznie podniosłoby wartość publikacji i niniejszej dysertacji, tym bardziej, że jak wiadomo, profil zapachowy wydzieliny może być zróżnicowany nawet u gatunków w obrębie tego samego rodzaju.

Ponadto przeprowadzone przez Doktorantkę i zespół badania wykazały różnice w morfometrii listków okwiatu i płatków korony oraz w budowie mikromorfologicznej kwiatów i struktur wydzielniczych badanych gatunków. Powszechnie uważa się, że wymienione cechy mikrostrukturalne mogą mieć wartość taksonomiczną.

Wyniki badań zawarte w publikacjach tworzących rozprawę doktorską, w znacznej mierze uzyskane przy zastosowaniu różnych technik mikroskopowych, zostały poparte bogatą dokumentacją fotograficzną, która jest mocną stroną przedstawionej rozprawy doktorskiej. Z własnego doświadczenia wiem, że przygotowanie i opracowanie tak dużej liczby plasz fotograficznych (23 plansze z ok. 160 zdjęciami) było niezmiernie czasochłonne i na pewno okupione dużym wysiłkiem. Uzyskane wyniki świadczą o dobrym opanowaniu i odpowiednim wykorzystaniu przez Doktorantkę zasad i metod naukowego poznania.

W dyskusjach wszystkich prac tworzących recenzowaną dysertację najważniejsze wyniki zostały skonfrontowane i przedyskutowane z trafnie dobraną aktualną i wcześniejszą literaturą przedmiotu.

Po wnikliwej analizie treści publikacji mogę stwierdzić, że mgr Wiśniewska wykazała się dobrą znajomością ogólnej wiedzy teoretycznej dotyczącej podjętej tematyki. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę poszerzają wiedzę o gatunkach zapylanych przez

muchówki i pozwalają lepiej poznać i zrozumieć relacje owad – zapylacz. Przeprowadzone analizy pozwoliły więc zrealizować określone w pracach cele i wykazały, że mimo odległej pozycji filogenetycznej rodzin Orchidaceae i Apocynaceae struktura osmoforów oraz mimikra i adaptacje kwiatów do zapylania przez muchówki wykazują znaczne podobieństwa, co przypuszczalnie jest konsekwencją długotrwałej presji owadów zapylających i niewątpliwie ma znaczenie ewolucyjne.

W trakcie lektury wychwytiłam także pewne nieścisłości lub błędy w streszczeniu i tekstach publikacji, które dla porządku przytaczam poniżej.

1. W streszczeniu Doktorantka pisze, że badania gatunków *Bulbophyllum* wykazały, że struktury wydzielnicze są zlokalizowane w obrębie warzki oraz bocznych sepali (płatków zewnętrznego okółka okwiatu). W zdaniu tym mamy pewną nieścisłość, tj. albo błędne użycie słowa „sepale” dla określenia płatków lub odwrotnie - niewłaściwe użycie określenia „płatki” dla bocznych sepali. Ponadto w przedstawionych artykułach wielokrotnie używane są terminy działki kielicha (ang. sepals) i płatki korony (ang. petals) dla opisanie elementów okwiatu u przedstawicieli Orchidaceae. Warto przypomnieć, że u roślin jednoliściennych, do których należą też Orchidaceae, dla opisanie elementów okwiatu przyjęty jest termin listki okwiatu (ang. tepals), a nie działki kielicha i płatki korony. Zauważyłam jednak, że w literaturze światowej dopuszcza się stosowanie również wymienionych określeń.
2. We wszystkich publikacjach jako termin zbioru materiału badawczego (kwiatów) podawany jest bardzo ogólnie czas antezi, bez sprecyzowania dokładnego etapu tego procesu. Jak wiadomo anteza może mieć różną długość, a w przypadku Orchidaceae proces ten może trwać stosunkowo długo. Dlatego też uważam, że uzupełnienie metodyki o konkretny etap antezi, w którym pobierano kwiaty jest ważne, zwłaszcza w badaniach powiązanych z procesem zapylania, tj. dotyczących aktywności struktur wydzielniczych czyli emisji związków zapachowych i prezentacji nektaru, czy też receptywności znamion. Jak wiadomo procesy te muszą być zsynchronizowane z aktywnością owadów zapylających.
3. W metodyce dwóch pierwszych prac dotyczących przedstawicieli Orchidaceae brakuje informacji, które części kwiatu i w ilu powtórzeniach były analizowane w LM, które

- w SEM i TEM, co utrudnia analizę wyników.
4. W pracy 1 Fot. 2a opisana jest jako mikromorfologia warzki, podczas gdy fotografia ta przedstawia szczegóły budowy anatomicznej tej części kwiatu. Ponadto na Fot. 2f przedstawiony jest fragment przekroju poprzecznego przez osmofor, którego komórki nie wykazują typowych cech tkanki sekrecyjnej.
 5. W pracy 2 zawarta jest informacja o świeceniu kutykuli w obecności Auraminy O, gdzie Autorka powołuje się na obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego (Fot. 4c-e), które według mnie nie są wybrane najtrafniej, gdyż świecenie kutykuli jest niewidoczne, natomiast wyraźnie świecą komórki epidermy.
 6. W pracy 2 w Tabeli 1 podano informację o braku mikrokanalików w kutykuli struktur wydzielniczych zlokalizowanych na warzce u *Bulbophyllum echinolabium*. Tymczasem na Fot. 5a i b zaznaczone są mikrokanaliki w kutykuli nektarnika obecnego w nasadowej części warzki tego gatunku. Jeżeli tabela 1 dotyczyła tylko cech osmoforów, to taka informacja powinna znaleźć się w nagłówku tabeli.

Zamieszczone przeze mnie krytyczne uwagi i komentarze mają albo charakter polemiczny, albo zostały przedstawione w celu uzupełnienia i udoskonalenia uzyskanych i ewentualnie przyszłych wyników kolejnych prac badawczych. Nie mają one większego wpływu na moją końcową ocenę recenzowanej rozprawy.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Natalii Wiśniewskiej stanowi spójne tematycznie opracowanie i przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, co jest ustawowym wymogiem stawianym tego typu opracowaniom naukowym. Wykazuje przy tym znaczny, indywidualny wkład Doktorantki w kolejne etapy przygotowywania publikacji. Otrzymane wyniki badań posiadają wartość naukową i świadczą o wystarczającym opanowaniu wiedzy teoretycznej i umiejętności praktycznych oraz odpowiednim przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego projektowania i realizowania kolejnych projektów badawczych.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym przedkładam wniosek Radzie Dyscypliny Nauki

biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Natalii Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Agata Konarska, profesor UP