

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr **Jakuba Oliwy**
p.t. „**Ontogeza oraz odpowiedź liści sporotrofofilowych i okrywowych *Platycerium*
Bifurcatum (CaV.) C.Chr. na stres świetlny i ozonowy**”

Od kilkudziesięciu lat podstawowym gatunkiem modelowym w biologii eksperymentalnej roślin jest *Arabidopsis thaliana*, niewielki chwast nieposiadający znaczenia gospodarczego, który dzięki małemu genomowi i paru innym cechom umożliwiającym stosunkowo łatwe manipulacje genetyczne zdominował nasze myślenie o roślinach. Jeśli poważnie traktujemy doniosłość bioróżnorodności dla życia biologicznego na Ziemi musimy także dbać o zachowanie bioróżnorodności w badaniach biologicznych. Dlatego z uznaniem odnotowałam wybór gatunku badawczego, którym jest epifityczna paproć *Platycerium bifurcatum*. Również główny problem badawczy podjęty przez pana Jakuba Oliwę, strategie stosowane przez tę roślinę w celu minimalizacji skutków stresu abiotycznego, zwłaszcza stresu będącego następstwem działalności człowieka, uważam za interesujący i ważny. O aktualności badanych zagadnień świadczy fakt, iż ponad 30% ze stu dwudziestu kilku pozycji literatury cytowanych w rozszerzonym streszczeniu pracy zostało opublikowane w ciągu ostatniej dekady.

Oceniana praca jest kompilacją pięciu publikacji. Dwie z nich, trójautorskie, zostały opublikowane w latach 2016 i 2017 w polskich czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Acta Physiologiae Plantarum* i *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. Pozostałe prace pochodzą z 2019 roku; dwie z nich są dwuautorskie, trzecia wieloautorska. Pierwsza z nich już się ukazała w szacownym *International Journal for Photosynthesis Research – Photosynthetica*, druga została przyjęta do druku w nieco młodszym czasopiśmie *Acta Biologica Hungarica*, które od bieżącego roku nosi nazwę *Biologia Futura*, trzecia jest w stadium poprawy po recenzjach w *Photosynthetica*. We wszystkich publikacjach pan Jakub Oliwa jest pierwszym autorem, a z zamieszczonych po każdej publikacji/manuskrypcie oświadczeń wynika, że swój udział w przygotowaniu wszystkich pięciu publikacji ocenia na 75-95%, udział ten można zatem uznać za kluczowy. W rozwinętym, 28-stronicowym streszczeniu pracy Autor przedstawił tło badań, cele rozprawy, opis stosowanych technik, omówienie wyników zawartych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską oraz najważniejsze wnioski.

Ponieważ wyniki stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały już ocenione przez kilku recenzentów wymienionych wyżej czasopism, pozwolę sobie ograniczyć się do omówienia jedynie najważniejszych osiągnięć dysertacji pana Oliwy. Autor postawił sobie za cel ustalenie wpływu stosunku R/FR (światła czerwonego do dalekiej czerwieni) na przebieg ontogenezy

dwóch typów liści *P. bifurcatum*: sporotrofofilowych i okrywowych oraz dokonanie charakterystyki odpowiedzi aparatu fotosyntetycznego tych liści na stres abiotyczny wywołany silnym światłem i podwyższonym stężeniem ozonu. W streszczeniu cele te zostały doprecyzowane w postaci dziewięciu celów szczegółowych, które można nazwać także zadaniami badawczymi. W ramach dwóch pierwszych zadań badawczych Autor dokonał oceny zmian morfologicznych i fizjologicznych liści sporotrofofilowych i okrywowych podczas fotomorfogenezy odbywającej się przy niskim i wysokim stosunku R/FR. Stwierdził, że skład spektralny światła w hodowli decyduje o szybkości morfogenezy i starzenia się liści badanej paproci: duża zawartość zakresu czerwonego, tj. wysoki stosunek R/FR, wpływa hamująco na rozwój liści sporotrofofilowych i obniża wydajność fotosystemu II w tych liściach. Jednocześnie wysoki stosunek R/FR opóźnia proces starzenia liści okrywowych. Wyniki te są o tyle istotne, że wysoki stosunek R/FR jest charakterystyczny dla światła bezpośrednio padającego na roślinę zaś niski – dla warunków panujących w cieniu, zatem pozwalają one przewidzieć wpływ jaki mają na rozwój i fotosyntezę *P. bifurcatum* zmiany oświetlenia występujące w sposób naturalny oraz zmiany wymuszone np. wycięciem drzew w lasach tropikalnych. Pozostałe siedem zadań badawczych poświęconych było zaburzeniom spowodowanym przez stres silnego światła i podwyższone stężenie ozonu oraz mechanizmom, które pozwalają roślinie przeciwdziałać tym stresom. W tym obszarze Autor uzyskał szereg oryginalnych i ważnych wyników. Wykazał zasadnicze różnice we wrażliwości dwóch typów liści *P. bifurcatum* na stres świetlny: skutki tego stresu są widoczne w różnych stadiach fazy świetlnej fotosyntezy a PSII liści sporotrofofilowych funkcjonuje gorzej na silnym świetle niż PSII liści okrywowych. Natomiast sporotrofofile znacznie efektywniej niż liście okrywowe wykorzystują mechanizmy fotoprotekcyjne polegające na akumulacji antocyjanów i związków flawonowych. Co także ważne, rośliny rosnące przy wysokim stosunku R/FR syntetyzują więcej związków fotoochronnych, co zapewnia im skuteczną ochronę przed fotoinhibicją. Interesujące wyniki przyniosła również analiza roślin poddanych stresowi ozonowemu. Sporotrofofile mają dużą odporność na stres ozonowy. Głównymi skutkami działania ozonu są w nich przejściowe obniżenie poziomu fotosyntezy netto i długotrwały spadek transpiracji skorelowany z trwałym przymknięciem szparek. W *P. bifurcatum* zidentyfikował Autor hormon brassinosteroidowy, homocastasteron, któremu przypisał udział w stymulacji procesu fotosyntezy podczas stresu ozonowego. Hormon ten został wykryty w paprociach należących do kilku rodzin ale praca pana Oliwy jest pierwszym doniesieniem dokumentującym obecność homocastasteronu w epifitycznej paproci tropikalnej, co więcej wskazującym na jego zaangażowanie w obronie przed stresem ozonowym.

Do realizacji programu eksperymentalnego Autor wykorzystał głównie techniki fluorymetryczne i refleksjometrię. We wszystkich pięciu pracach podstawowymi metodami były pomiary kinetyki fluorescencji chlorofilu a *in vivo*, pomiary widm emisji fluorescencji liści oraz spektrometryczne pomiary światła odbitego od powierzchni liści umożliwiające ocenę ilości barwników antocyjanowych, karotenoidów i flawonoidów. Ważną cechą tych metod jest ich nieinwazyjność umożliwiająca porównanie stanu tych samych liści poddanych

działaniu czynników stresowych przez okres kilku tygodni. Lektura dysertacji pokazuje, że pan Jakub Oliwa jest ekspertem w dziedzinie fluorymetrii i refleksjometrii roślin, zarówno pod względem technicznym jak interpretacyjnym. Powyższe techniki zostały uzupełnione o mikroskopię transmisyjną i fluorescencyjną (prace nr 1 i 2 w APP i ABC), a także o pomiary wymiany gazowej liści pozwalające na ocenę fotosyntezy netto, poziomu transpiracji i przewodnictwa szparkowego, pomiary zawartości chlorofilu w ekstraktach, chromatografię cieczową przeprowadzoną w celu oznaczenia zawartości karotenoidów oraz oznaczenie zawartości brassinosteroidów (praca nr 5 wysłana do Photosynthetica). Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że oznaczenie karotenoidów zostało wykonane przez współautorkę pracy nr 5 natomiast oznaczenie brassinosteroidów przy udziale współautora, co wynika z załączonych oświadczeń.

Problemy do dyskusji / uwagi krytyczne

Lektura pracy nasunęła mi kilka pytań:

1) jak wynika z porównania pól powierzchni pod krzywymi rozkładu spektralnego na Fig.1 w publikacji nr 1 i Fig.2 w publikacji nr 4, w wariancie o niskim natężeniu dalekiej czerwieni (L-R/FR) podniesiono o ok. $\frac{1}{4}$ natężenie światła niebieskiego aby rośliny otrzymywały stałą ilość energii. Czy takie zwiększenie natężenia światła krótkofalowego kosztem dalekiej czerwieni jest zasadne, innymi słowy co ta „kompensacja energetyczna” ma w istocie skompensować? W fotosyntezie ten zakres dalekiej czerwieni ma niewielki udział, a w fotomorfogenezie działa w zupełnie inny sposób niż światło niebieskie. Czy nie należałoby sprawdzić jak przebiega wzrost rośliny i parametry fluorescencyjne bez tej kompensacji?

2) W kilku miejscach dysertacji niską wartość R/FR utożsamiono z „shadow simulating conditions” a liście rosnące w tych warunkach nazwano „growing in the shade”. Czy obniżony udział czerwieni istotnie wystarcza do uzyskania przez sporotrofofile *P. bifurcatum* fenotypu charakterystycznego dla wzrostu w cieniu? Raczej nie: w publikacji nr 1 nie stwierdzono żadnych zmian anatomicznych w budowie liści rosnących w L-R/FR w stosunku do H-R/FR. Czy takie zmiany wystąpiłyby gdyby oprócz niskiej wartości R/FR światło miało także niskie natężenie, tak jak jest w cieniu? Proszę Doktoranta o komentarz ponieważ ta sprawa nie jest dostatecznie przedyskutowana w publikacji nr 1. Wprawdzie zmianom wewnętrznej struktury liści rosnących w świetle o niskiej intensywności poświęcono cały akapit na str. 4. ale po pierwsze chodziło właśnie o liście rosnące w słabym świetle (a nie w niskim R/FR), a po drugie dyskusja dotyczy liści różnych roślin, np. drzew (Oguchi *et al.* 2005). Proszę o ograniczenie dyskusji do liści paproci.

3) Publikacja 1, str. 6 i 7: Dlaczego nie zmierzono wyjściowych parametrów fluorescencji chlorofilu w czasie t_0 i na jakiej podstawie wybrano 1 miesiąc wzrostu w określonych warunkach za punkt startowy rejestracji tych parametrów? Czy można wykluczyć sytuację, że

w H-R/FR parametr (np. Tr_0/RC lub Et_0/RC) rósł szybciej przez pierwszy miesiąc i szybciej osiągnął wysycenie niż w L-R/FR zatem w okresie od 1 do 3 miesięcy nie obserwowano już statystycznie istotnych zmian?

4) Proszę o rozwinięcie komentarza zamieszczonego na str. 154 publikacji nr 3 (w „Analysis of OJIP curves”) dotyczącego podatności epifitów CAM na fotoinhibicję w silnym świetle.

Jak można wytłumaczyć mniejszą podatność na stres silnego światła liści okrywowych *P. bifurcatum* skoro prowadzą one metabolizm CAM, który wg Adamsa i Osmonda (1988) powinien raczej predysponować je do większej wrażliwości na fotoinhibicję w świetle silnym? Czy reakcje *P. bifurcatum* na stres świetlny są typowe dla paproci epifitycznych? Pytanie to dotyczy także drugiego akapitu Dyskusji w pracy nr 4 gdzie porównano parametry fluorescencji chlorofilu tej paproci i „other tropical epiphytic ferns”.

Przy okazji proszę o wyjaśnienie co oznacza określenie „fast but less sudden response” w odniesieniu do aparatu fotosyntetycznego liści okrywowych *P. bifurcatum* rosnących przez tydzień w warunkach stresu świetlnego.

5) Publikacja nr 5 i str. 23 rozwiniętego streszczenia: Na jakiej podstawie Autor uważa, że spadek P_n (fotosyntezy netto) w 1 tygodniu fumigacji ozonem był wynikiem czasowego obniżenia wydajności karboksylacji a nie zamknięcia szparek i obniżenia ich przewodności?

Pozostałe uwagi

Publ. nr 1, str. 3: Natężenie światła podano w $cd\ sr\ m^{-2}$ czyli w luksach, co utrudnia porównanie z warunkami świetlnymi stosowanymi w następnych pracach. Ponadto jednostki fotometryczne m.in. zastosowano do światła dalekiej czerwieni, 700-780 nm, czyli w zakresie granicznym dla fotometrii. Jakie było natężenie stosowanego światła w jednostkach kwantowych?

Publ. nr 4: Źródłem światła stresującego były lampy sodowe. Jaki jest stosunek B/R w świetle użytej lampy (w publikacji nie podano jej typu) w porównaniu do światła słonecznego? Czy nie należało użyć innego źródła światła stresującego?

Fig. 5 i 6: Legendy do wykresów A i B są mylące i wymagają niepotrzebnego zastanowienia. Proponuję objąć klamrą kwadraty i przed nią umieścić oznaczenia LR (Figs A) i HR (Figs B), natomiast przy kwadratach odpowiednio napisy Control i HL 7days.

Publ. nr 5: Zmiany zawartości chlorofilu (Tab.3) byłyby czytelniejsze gdyby przedstawiono je w postaci diagramu słupkowego.

str. 4 Dyskusji. Komentując Fig. 4B Autor konkluduje: „... changes in the content of xanthophyll dyes in *P. bifurcatum* suggest that violaxanthin does not convert to antheraxanthin and zeaxanthin after exposure to high ozone concentrations.” Patrząc jednak na diagram można stwierdzić, że każdemu spadkowi wiolaksantyny odpowiada wzrost zeaksantyny i *vice*

versa, co przeczyłoby takiemu wnioskowi. Ponieważ zawartość każdego barwnika została znormalizowana do wartości wyjściowej (przyjętej za 100%) nie jestem w stanie mojej wątpliwości zweryfikować. Proszę zatem Autora o komentarz.

Pragnę podkreślić, że pozytywnie oceniam rozwój naukowy Doktoranta. Jego najnowsza publikacja wydaje mi się zdecydowanie najciekawsza. Praca ta pokazuje, że Autor zdecydował się wyjść z wąskiego gorsetu metod fluorymetrycznych i refleksjometrycznych, choć nadzwyczaj użytecznych to jednak obarczonych cechą niebezpośredniości, i zastosował do badanych zjawisk znacznie bardziej zróżnicowane podejście eksperymentalne.

Podsumowanie

Zamieszczone wyżej uwagi krytyczne dotyczą przede wszystkim technicznej strony przedstawionej mi do oceny pracy i nie stanowią krytyki jej wartości merytorycznej. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Jakuba Oliwy jest cennym osiągnięciem młodego naukowca, który w sposób profesjonalny wykonał trudną pracę i przedstawił szereg oryginalnych wyników. Z jednej strony wnoszą one nowe elementy do naszej wiedzy o mechanizmach fotomorfogenezy, z drugiej zaś - o mechanizmach obrony roślin przed stresem abiotycznym.

Sposób zaplanowania i wykonania eksperymentów świadczy o tym, że Autor potrafi rozwiązywać skomplikowane problemy badawcze i rzetelnie analizować otrzymane wyniki. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na dogłębną znajomość tematu i umiejętność krytycznej oceny otrzymanych wyników.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie mgr Jakuba Oliwy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Gabrys