

dr hab. Tomasz Wyka
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Zakład Botaniki Ogólnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 9 III 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Marioli Rabskiej, zatytułowanej
„Wpływ warunków środowiskowych na morfologiczne i fizjologiczne zróżnicowanie
między płciowe *Juniperus communis* L. oraz *Adriana tomentosa* Gaudich.”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Grzegorza Iszkuły

Badania ewolucji systemów rozrodczych roślin koncentrują się na ogół na skuteczności zapylania i genetycznych konsekwencjach kojarzenia wsobnego, ale dla uzyskania pełnego obrazu wymagane jest także uwzględnienie konsekwencji zróżnicowania wysiłku reprodukcyjnego związanego z tworzeniem nasion i produkcją pyłku. Można oczekiwać, że takie konsekwencje, dotyczące gospodarki zasobami, powinny prowadzić m.in. do zróżnicowania strategii ekologicznych osobników męskich i żeńskich w gatunkach dwupiennych. Szacunki wskazują, że udział gatunków dwupiennych we florze światowej wynosi ok. 6% (Renner, 2014), z czego stosunkowo nieliczne zostały przebadane pod kątem drugorzędowych cech płciowych oraz funkcjonowania osobników przeciwnych płci w różnych warunkach środowiska. Zaskoczył mnie fakt, że, jak wynika z tekstu rozprawy, do stosunkowo słabo przebadanych pod tym kątem gatunków należy także nasz rodzimy jałowiec pospolity. Wybór problematyki, obiektów badawczych i sformułowanie tematu doktoratu uważam więc za trafne.

Ocena formalna rozprawy

W skład rozprawy wchodzi trzy oryginalne prace naukowe w języku angielskim, z których dwie zostały opublikowane, trzecia zaś została przyjęta do druku. Ten zestaw prac jest bez wątpienia spójny tematycznie, mimo, że trzecia z nich dotyczy gatunku innego niż jałowiec. Czasopisma, w których prace opublikowano mają obieg międzynarodowy i współczynniki wpływu 4,56; 2,25 i 2,29, są więc na przyzwoitym poziomie pod względem bibliometrycznym i wskazują na kompetencje Autorki w zakresie publikowania wyników badań. Udział doktorantki w powstaniu wszystkich prac wydaje się wiodący, choć oświadczenia o wkładzie autorskim mogłyby być mniej lakoniczne. Stwierdzenie, że udział polegał na „pozyskaniu części wyników”, może być i zwyczajowe, ale nie ułatwia recenzowania. Dlatego na potrzeby recenzji przyjmuję, że Autorka odpowiada za wszystkie przedstawione wyniki. Rozprawę opatrzone obszernym wprowadzeniem, wyjaśniającym założenia i metodykę prac oraz omawiającym najważniejsze wyniki, wraz z listą cytowanej literatury. Praca zawiera także streszczenia w językach polskim i angielskim, zgodnie z wymogami ustawowymi. Stwierdzam, że zakres i konstrukcja rozprawy odpowiada oczekiwaniom stawianym pracom doktorskim oraz odnośnym przepisom.

Ocena merytoryczna prac nt. jałowca (prace 1 i 2)

Autorka wysuwa hipotezy dotyczące konsekwencji zróżnicowania wysiłku reprodukcyjnego między płciami. Same hipotezy mają oparcie w literaturze, jednak zwracam uwagę, że są one w większości warunkowe - zależą od rzeczywistych różnic w proporcji zasobów przeznaczanych na reprodukcję. Na przykład oczekiwanie wystąpienia mechanizmów kompensacyjnych u osobników żeńskich jest uzasadnione ich większym wysiłkiem reprodukcyjnym, który jednak należałoby wykazać – nie można

go założyć a priori dla każdego gatunku. Takich danych jednak nie przedstawiono. W ogóle wysiłek reprodukcyjny jest zagadnieniem, które należałoby oceniać jako alokację w skali całej biomasy rośliny, co Autorka słusznie dostrzega w różnych miejscach rozprawy. Domyślam, się, że odnośne dane co do alokacji biomasy jałowca istnieją, bo w pracy 1 jest mowa o sekwencyjnych zbiorach całych roślin. Jednak w dysertacji nie pojawia się choćby wzmianka o ewentualnych różnicach w alokacji czy tempie wzrostu. Fotografie jałowców zawarte w przedmowie wskazują na znacznie silniejszy wzrost roślin żeńskich, którego chyba nie da się pogodzić z ich większym wysiłkiem reprodukcyjnym?

Podobną warunkowość mamy w przypadku hipotezy postulującej większą wrażliwość roślin żeńskich na stres, przy czym stres u jałowca miałby być wywołany niedoborem nutrientów. Danych pozwalających na ocenę, czy taki stres wystąpił, w pracy nie ma (poza fotografiami zamieszczonymi w przedmowie). Natomiast poziom azotu w igłach nawet w wariancie nienawożonym był wyższy niż choćby w igłach zebranych w terenie (Nowak-Dyjeta i wsp., 2017).

Układ doświadczalny zastosowany w doświadczeniu z jałowcem od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń. Zastosowano kompletny układ trójczynnikiowy, z głównymi efektami w postaci daty poboru prób, płci i nawożenia oraz z czterema potencjalnymi interakcjami. W praktyce najwyraźniej okazało się, że stopień złożoności układu doświadczalnego był zbyt wysoki dlatego uproszczono go do analiz dwuczynnikiowych osobno dla każdej z ośmiu dat. Liczba powtórzeń $N=6$ wydaje się w zasadzie wystarczająca przy sekwencyjnych zbiorach, choć zmienność narasta z czasem, więc późniejsze zbiory mogłyby być liczniejsze. Podobnie $N=8$ (a nawet 16 wg ryc. 1) w przypadku pomiarów krzywych fluorescencji jest w zupełności odpowiednią liczbą powtórzeń, pod warunkiem wyrównanego stanu fizjologicznego igieł w ramach wariantu. Brakuje informacji o czasie, jaki zajęło wykonanie wszystkich krzywych fluorescencji i czy zastosowano przemienność badania wariantów.

Oto kilka innych pytań i wątpliwości dotyczących metodyki lub sposobu jej prezentacji:

- 1) Jakie uzasadnienie ma uprawa tak światłoządnego gatunku jak jałowiec w tunelu z 50% zacienieniem? Czy nie ograniczyła różnic między płciami?
- 2) Nie jest jasne, czy dane mikroklimatyczne podane w pracy 2 dotyczą miesiąca poprzedzającego pomiary fluorescencji, czy są tam dane sprzed i po? Jeśli to ten drugi przypadek, to chyba nie mają one wpływu na wynik pomiarów. Ponadto, niektóre temperatury wydają się ekstremalnie wysokie – czy czujnik nie był przypadkiem bezpośrednio nasłoneczniony?
- 3) Przestrzegalbym przed traktowaniem ETR jako miary zdolności fotosyntetycznej, co Autorka kilkakrotnie czyni w pracy 2. Energia uzyskana w fotosyntetycznym transporcie elektronów jest konsumowana także w fotooddychaniu, toteż u roślin C_3 w atmosferze o normalnym poziomie tlenu ETR nie jest dobrym wskaźnikiem tempa poboru CO_2 a relacja między ETR a tempem fotosyntezy jest nieliniowa.
- 4) Mam wątpliwości co do zgodności między zawartością chlorofilu a absorbancją igieł wyliczoną na jej podstawie (Praca 2 ryc. 3 E i h). Chlorofil wykazuje prawie dwukrotne różnice a absorbancja jest prawie niezmienna. Czy nie ma tam błędu rachunkowego?

Wśród deklarowanych celów jest testowanie hipotezy o odmiennej alokacji zasobów przez osobniki różnych płci. Termin alokacja, jak już wskazywałem, nie jest tu użyty w sensie ścisłym, gdyż pomiar alokacji zakłada znajomość puli danego zasobu i jego procentowego podziału między organami rośliny lub funkcjami. Głównym wnioskiem, jaki Autorka wyciąga z doświadczenia z jałowcem (praca 2) jest podwyższona „alokacja” zasobów do puli zapasowej i do substancji ochronnych u roślin żeńskich, określona jednak tylko na podstawie ich stężeń w igłach. W rzeczywistości niewiele dowiadujemy się o nakładach biomasy czy azotu na reprodukcję u badanych osobników, wobec czego trudno wyrokować, czy obserwowane różnice wynikają z konstytutywnych cech płci czy z wysiłku reprodukcyjnego. Żeby np. stwierdzić że wzrost zawartości azotu w igłach męskich przed otwarciem szyszek stanowi przygotowanie do produkcji pyłku, należałoby ilości N w poszczególnych frakcjach

zbilansować. Zresztą okresową akumulację N u roślin męskich obserwowano w roku 2014, w którym rośliny nie tworzyły szyszek.

Wyniki doświadczenia z jałowcem wskazują, że głównym regulatorem zmienności dla znacznej części cech jest sezonowość: fenologia i pogoda. Jest to w mojej opinii najciekawszy aspekt pracy, który potwierdza trafność strategii wielokrotnego pobierania prób. Autorka czyni próby powiązania zawartości poszczególnych składników chemicznych w igłach z rozwojem szyszek, jednak tylko na podstawie luźnych obserwacji. Szkoda, że nie zebrano dokładniejszych danych nt. rozwoju fenologicznego osobników obu płci. Np. sezonowa akumulacja skrobi w igłach może odzwierciedlać dynamikę fotosyntezy i wzrostu, także systemu korzeniowego, co Autorka słusznie zaznacza. Podobnie, sezonowe wahania zawartości barwników asymilacyjnych i związków fenolowych u roślin zimozielonych często wynikają z aklimatyzacji do niskich temperatur zimą. W pracach brak odniesień do tego zjawiska, choć omawiany jest wpływ wysokich temperatur latem.

Chyba najtrudniejszy do interpretacji element pracy to wyniki analiz enzymów antyoksydacyjnych i ROS. Trudno dopatrzeć się w nich nawet trendów sezonowych, a postulowany przez Autorkę wpływ płci na stężenie H_2O_2 przejawia się wyższym stężeniem u os. męskich w jednym terminie, u żeńskich w dwóch terminach i brakiem różnic w pięciu pozostałych terminach. Jestem zdania, że prezentowanie wyników, których zupełnie nie da się zinterpretować osłabia pracę i że decyzja o ich publikacji była nietrafna. Dyskusja dotycząca tej części jest zupełnie karkołomna.

Podsumowując doświadczenie z jałowcem, Autorka oczekiwała zapewne wyraźnego zróżnicowania międzypłciowego, tymczasem większość badanych cech takich różnic nie wykazała lub wykazywała je tylko efemerycznie. Jest to naturalnie w pełni wartościowy naukowo efekt doświadczenia. Ma się jednak wrażenie, że Autorka in extenso omawiając każdą statystycznie potwierdzoną różnicę, próbuje wykazać zróżnicowanie płciowe tam, gdzie różnice te występowały w skali trywialnej. Zalecałbym większy dystans i krytycyzm wobec uzyskiwanych danych oraz akceptację dla wyników negatywnych. Na plus należy zaliczyć to, że we Wnioskach Autorka trafnie dostrzega niepewność związaną z ograniczeniem badań do samych igieł i roślin w młodym wieku oraz wskazuje na potrzebę skoncentrowania badań cech płciowych na sezonie reprodukcyjnym.

Do prac nt. jałowca mam jeszcze kilka uwag redakcyjnych. Rośliny jałowca nazywane są „siewkami”, podczas gdy były to przecież klony uzyskane wegetatywnie. W pracy 1 wyniki omawiane są szalenie detalicznie, z obszernym wymienianiem danych liczbowych w tekście. Lepiej byłoby wskazać tylko te najistotniejsze dla oceny hipotez a resztę potraktować w sposób syntetyczny. W pracy 2 nie podano wyników analizy wariancji, odnotowując jedynie w tekście fakt braku interakcji.

Merytoryczna ocena pracy nt. Adriana tomentosa (Praca 3)

Praca 3, mieści się w temacie dysertacji, choć wykorzystuje odmienny obiekt badawczy, jakim jest australijski dwupienny gatunek *Adriana tomentosa*, u którego uprzednio na podstawie okazów zielnikowych udokumentowano spektakularny dymorfizm płciowy liści. Autorka dostarcza wartościowych danych z zakresu charakterystyki geometrycznej liści zebranych in situ, potwierdzających i rozszerzających uprzednie obserwacje. Wykazuje też interesujący fakt, że wbrew regule dominującej u innych gatunków, liście osobników męskich są większe niż u okazów żeńskich. Nie znalazła jednak różnic międzypłciowych pod względem parametrów ekofizjologicznych (niefortunnie określanych jako „czynniki ekofizjologiczne”). Za ciekawe uznaję odniesienie do hipotezy tłumaczącej rozmiar liści rozmiarem kwiatostanów w oparciu o reguły Cornera, choć brak jest wyrażenia tej hipotezy *explicite*. Są natomiast niejasne odwołania do „hipotezy allometrycznej” ponownie bez jej jasnego sformułowania. Nie zebrano też danych o morfologii pędów lub kwiatostanów, które mogłyby pozwolić na ocenę tych hipotez. A przecież, zgodnie z uwagą Autorki,

kwiatostany męskie u tego gatunku są większe od żeńskich. W retrospektywie wydaje się, że byłby to kierunek bardziej produktywny niż badanie ekofizjologicznych cech liści.

Nie jest jasne, czy uzasadnione było uwzględnienie w analizach młodych liści, które były „prawie w pełni rozwinięte”, zwłaszcza skoro analizowano parametry kształtu i wielkości. Sama Autorka wydaje się sugerować, że kształt liści zmieni się jeszcze przed osiągnięciem wieku dojrzałego, co nawet wynika z miary ząbkowania (Ryc.1 e, f), ale też wskazuje że liście młode były po prostu niedojrzałe albo, że należą do osobnej kohorty wiosennej, zaś liście stare reprezentują kohortę letnią z ub. sezonu, zaś obie kohorty różnią się morfologicznie. Przydałaby się tu zatem informacja o fenologii listowia. Mam zresztą wrażenie, że Autorka niezbyt głęboko przemyślała kwestie fenologii, skoro deklaruje, że zbiór liści miał miejsce po opadzie liści ubiegłorocznych a jednocześnie zbiera te właśnie liście. Ostatecznie zebrano liście stare i bardzo młode, zatem miary „parametrów ekofizjologicznych” typu zawartość wody czy sygnatury izotopów, mogą nie być typowe dla głównego sezonu wegetacyjnego. Nie jest jasne jaką hipotezę miało testować badanie zawartości pigmentów asymilacyjnych u *Adriana*, zwłaszcza że tych danych nawet nie przedstawiono. Mankamentem pracy jest również fakt eksponowania i interpretowania „różnic”, które nie są istotne statystycznie (C:N, SLA, zawartość suchej masy i wody).

Podsumowanie

Główny celem deklarowanym przez Autorkę było określenie stopnia nasilenia drugorzędowego dymorfizmu płciowego u badanych gatunków. Cel ten, stanowiący bez wątpienia „problemem naukowym” w rozumieniu Ustawy, w sporym zakresie udało się osiągnąć, choć wydaje się, że Autorka przywiązuje nadmierną wagę do drobnych lub efemerycznych różnic między płciami, nie mogąc pogodzić się z faktem, że w przypadku wielu, jeśli nie większości, badanych cech różnic takich nie ma. Efektownym wyjątkiem jest tu zróżnicowanie morfologiczne liści *A. tomentosa*. Podobnie za godne uwagi oraz dalszych badań wyniki uważam zróżnicowanie fenologiczne oraz międzypłciowe poziomu azotu, innych makroelementów, węglowodanów i związków fenolowych w igłach jałowca.

Najtrwalszym efektem każdej pracy naukowej są dane. O ile można mieć zastrzeżenia do części interpretacji formułowanych przez Autorkę, to najważniejsze dane wydają się zebrane prawidłowo i będą mogły być wykorzystane przez innych badaczy w ewentualnych meta-analizach. Na pochwałę zasługuje udostępnienie ich w tabelach w postaci załączników do prac i ogólnie staranne, klarowne wykonanie rycin. Dysertację oceniam zatem jako niewyrównaną, łączącą wyniki rzeczywiście rzetelne naukowo z interpretacjami opartymi w pewnej mierze na spekulacjach. Jednak doceniając wysiłek badawczy, kompetentne zastosowanie różnorodnych metod, od analiz biochemicznych przez analizy fluorescencji po analizy morfologiczne, oraz fakt opublikowania wyników w recenzowanych czasopismach wystawiam rozprawie pani mgr Marioli Rabskiej ocenę pozytywną i stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Dr hab. Tomasz Wyka