



dr hab. Edyta Gola, prof. UWr

edyta.gola@uwr.edu.pl

Wrocław, 17.11.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Bieniasz
pt. „Morfo-anatomiczna charakterystyka procesu powstawania twardzieli
w pniach zamierających jesionów (*Fraxinus excelsior* L.)”

Powstawanie i różnicowanie wtórnych tkanek przewodzących jest kluczowym procesem w ontogenezie roślin drzewiastych. O ile mechanizmy leżące u podstaw różnicowania elementów drewna wtórnego są dość dobrze poznane, to tzw. wtórne różnicowanie drewna, które obejmuje proces powstawania twardzieli, jest słabo rozpoznane. Twardziel jako wewnętrzna, zmodyfikowana część pni drzew (drewna wtórnego) nadaje im specyficzne właściwości mechaniczne, a jej powstawanie jest jednym z mechanizmów odpowiedzi rośliny na czynniki stresowe, głównie infekcje bakteryjne czy grzybowe. Wobec jej znaczenia dla integracji procesów wzrostowych i fizjologicznych roślin drzewiastych, a także ze względu na powszechne wykorzystywanie w przemyśle drewna wtórnego jako surowca, którego parametry określa m.in. udział i właściwości części twardzielowej, zaskakujące jest, jak niewiele badań jest poświęconych regulacji powstawania twardzieli na poziomie komórkowym i molekularnym. Proces ten staje się szczególnie interesujący i ważny wobec zmian klimatycznych czy podatności ważnych ekonomicznie gatunków drzew na patogenezę. W tym kontekście badania prowadzone przez Doktorantkę, Panią mgr Annę Bieniasz, pod opieką Pani dr hab. Mireli Tulik, prof. SGGW, z Instytutu Nauk Leśnych SGGW w Warszawie, a stanowiące podstawę recenzowanej rozprawy doktorskiej, bardzo dobrze wpisują się we współczesną problematykę z zakresu biologii roślin drzewiastych.

Na rozprawę doktorską Pani mgr Anny Bieniasz składa się cykl trzech publikacji, których tematem przewodnim jest proces tworzenia twardzieli u roślin drzewiastych. Cykl prac obejmuje dwa artykuły eksperymentalne napisane w języku angielskim, które stanowią oryginalne

opracowanie problemu naukowego, dotyczącego identyfikacji żywych komórek miękiszowych w drewnie wtórnym i ich długo/krótkowieczności u sosny (*Pinus sylvestris*) i jesionu (*Fraxinus excelsior*) oraz artykuł przeglądowy w języku polskim, podsumowujący współczesną wiedzę na temat procesu powstawania twardzieli i jego uwarunkowania. Biorąc pod uwagę obiekty badawcze obu prac eksperymentalnych wydaje mi się, że tytuł cyklu prac, stanowiących rozprawę doktorską, nie został właściwie sformułowany – publikacje dotyczą formowania twardzieli i doprecyzowania metod jej wyznaczania w drewnie wtórnym z wykorzystaniem cech mikroskopowych (wyznaczaniem żywych komórek miększu) i tylko jedna z prac dotyczy charakterystyki twardzieli w drewnie zdrowych i zamierających jesionów (mimo iż taki właśnie jest tytuł całej rozprawy). Bardziej adekwatne byłoby ogólniejsze sformułowanie tytułu.

Zbiór publikacji, tworzących rozprawę, poprzedzają streszczenia w języku polskim i angielskim, autoprezentacja z opisem dorobku naukowego, zestawienie danych bibliometrycznych oraz część merytoryczna, wprowadzająca do lektury załączonych publikacji, na którą składa się krótki wstęp, prezentacja prac (w kolejności chronologicznej) i perspektywy dalszych badań, a także zestawienie cytowanej literatury. Do rozprawy załączono wspomniane wcześniej trzy opublikowane prace, tworzące cykl tematyczny, a po nich zamieszczono oświadczenia Doktorantki i współautorów.

We wstępie Doktorantka krótko opisuje powstawania i różnicowania elementów drewna wtórnego, wprowadza też termin programowanej śmierci komórki (z ang. PCD). Zabrakło mi jednak opisu poszczególnych etapów PCD, prezentujących zmiany zachodzące na poziomie komórkowym i ewentualnie także biochemicznym. Mam w związku z tym także pytanie - w rozprawie pojawia się sformułowanie, iż lignifikacja ścian komórkowych jest etapem PCD. Bardzo proszę o wyjaśnienie, czy i do jakiego stopnia te dwa procesy są powiązane? Rozróżnienie obu procesów – lignifikacji ścian komórkowych i PCD - jest istotne dla prezentowanych w dalszej części opublikowanych prac i interpretacji uzyskanych wyników. Znacznie bardziej szczegółowo scharakteryzowane jest we wstępie zjawisko powstawania twardzieli, a także znaczenie biologiczne tego procesu. Przedstawione są również różnorodne funkcje, pełnione przez komórki miększu w drewnie wtórnym. Zabrakło mi jednak w tej wstępnej części także opisu różnicowania strukturalnego komórek miększu (osiowego i promieniowego) w drewnie

wtórnym roślin iglastych i liściastych (choć w prezentowanych artykułach pojawiają się określenia m.in. miękiszu osiowego, promieni drzewnych, typów komórek miękiszu w promieniach heterogennych), a także wyjaśnienia, czy komórki miękiszu drzewnego, należące do systemów osiowego i poprzecznego, mają takie same właściwości, np. długość życia. Warto byłoby również przedyskutować szerzej, czy wszystkie metabolity wtórne np. polifenole, flawonoidy występujące w drewnie wtórnym są związane wyłącznie z procesem tworzenia ekstraktów twardzielowych. Obecność tego typu związków obserwowana jest także w komórkach żywych, nieulegających jeszcze twardzielowaniu, warto więc byłoby doprecyzować lub zmodyfikować na podstawie własnych obserwacji definicję tego typu związków (kiedy mają one charakter ekstraktów twardzielowych).

Po ogólnym wprowadzeniu Doktorantka przedstawia w porządku chronologicznym prace stanowiące rozprawę doktorską. Poszczególne prace prezentowane są jednak niespójnie: bardzo krótki, wręcz zdawkowy jest opis pierwszej pracy z cyklu, dotyczącej czasoprzestrzennego zróżnicowania procesu twardzielowania w drewnie wtórnym sosny, natomiast opis trzeciej pracy, porównującej powstawanie twardzieli w zdrowych i zamierających drzewach jesionu, jest czasem aż nadmiernie rozbudowany. Na przykład dlaczego zamieszczono opis biologii jesionu i struktury drewna wtórnego, a nie ma porównywalnego opisu dla sosny, drugiego z gatunków, którego dotyczą prace eksperymentalne cyklu? Widać jednak z tego szczegółowego opisu, że temat zamierania jesionów pasjonuje Doktorantkę, jest też głównym przedmiotem Jej badań i być może z tego wynika nadanie całej rozprawie doktorskiej takiego właśnie tytułu.

Chciałabym podkreślić, że drewno wtórne roślin drzewiastych jest materiałem trudnym do manipulacji i wykonywania analiz, często wymagającym dostosowywania standardowych procedur i protokołów (np. barwień cytochemicznych). Tym cenniejsze są wyniki uzyskane i opublikowane przez Doktorantkę.

Prezentacja chronologiczna prac w zamyśle miała przedstawić rozwój tematyki i konsekwencję w poszukiwaniu odpowiedzi na pytania pojawiające się w trakcie badań. Przyjęcie takiej formuły opisu skutkuje jednak rozmyciem wspólnego celu badań dla całego cyklu, zwłaszcza, że nie ma osobnego rozdziału, w którym byłyby przedstawione cele ogólne i szczegółowe i/lub hipotezy wspólne dla wszystkich prac stanowiących rozprawę doktorską, a

także brakiem ogólnego podsumowania uzyskanych wyników i wniosków. Zamieszczony podrozdział dotyczący perspektyw dalszych badań, choć niewątpliwie słusznie wskazuje kierunki przyszłych badań i podkreśla konieczność ich podjęcia, jednak skupia się na drzewach liściastych i nie uwzględnia przedstawicieli nagozalążkowych, co w kontekście umieszczenia w cyklu pracy o sośnie jest co najmniej zaskakujące.

Jako recenzent mam kilka uwag i pytań, na których odpowiedzi nie znalazłam ani w części wstępnej, ani w artykułach opublikowanych, lub które wydają mi się niejasne a warte wyjaśnienia. Proszę więc Doktorantkę o ustosunkowanie się do tych uwag w czasie publicznej obrony:

- po pierwsze, nie jest dla mnie jednoznacznie opisane, czy dla danego drzewa żywe komórki miększu należały do miększu osiowego czy promieniowego lub czy w obu systemach miały takie same właściwości/wiek w momencie rozpoczęcia twardejowania, czy też jednak istniały różnice pomiędzy tymi dwoma typami miększu?

- czy u sosny rzeczywiście występuje miększ osiowy? Takie sformułowanie pojawia się w części wstępnej rozprawy, w artykule jest to doprecyzowane jako komórki miększowe pochwy wokół kanału żywicznego. Czy nie chodzi tu jednak o żywe, cienkościennie komórki epitelu, które nie należą do miększu osiowego?

- nie jest dla mnie jasne, w jaki sposób wyniki dotyczące żywych komórek miększu u sosny potwierdzają postulat pola morfogenetycznego?

- w jaki sposób określono rzędowość promieni jesionu, skoro tylko przekroje poprzeczne i promieniowe były wykonane? (praca 3, s. 67: „usually 8-seriate rays were observed”; opis pracy: „występuje w nich zwykle od 1 do 10 rzędów komórek...”). Czy nie chodziło raczej o wysokość promieni?

Mam również kilka uwag od strony edytorskiej i stylistycznej. W tekście pojawiły się skróty myślowe i błędy stylistyczne, np. „wiadomo, że ściana komórek miększowych, w procesie PCD, ulega lignifikacji i trawiona jest treść cytoplazmatyczna” – przede wszystkim lignifikacja nie jest etapem PCD tylko niezależnym procesem, a cytoplazma nie znajduje się w ścianie; „schemat

zmian morfologicznych” w rzeczywistości pokazuje różne modele lignifikacji promieni u przedstawicieli roślin nagozalążkowych i dwuliściennych.

Również w opublikowanych pracach znalazło się sporo nieścisłości, np. w podpisie fig. 1 (praca 3): 1e- Macroscopic sample of ash wood. The first arrow from the left (...) indicates the tree ring, which the micrograph 1c is derived from, the next arrow – accordingly the micrograph 1d. Ale w tym samym opisie figury: a,b,d wood samples derived from healthy trees, and c from declining trees (...). Czyli jeden przekrój z mikrofotografii 1e pokazuje równocześnie dwa różne drzewa? W tym samym artykule (s. 70): „... this referred mainly to procumbent cells, elongated in radial direction (Fig. 1a). Square and procumbent cells, shorter in radial direction, contained.....” – Czyli procumbent cells są wydłużone czy krótsze w kierunku radialnym? Nawiasem mówiąc w polskim opisie te same komórki promienia heterogennego są opisane jako wydłużone promieniowo (=procumbent) i osiowo (=upright wg terminologii IAWA); “A conspicuous feature of the studied sections were thick parenchyma cell walls at the very beginning of the xylem tissue...”. Wydaje mi się też, że u jesionu bardziej poprawnym określeniem jest stwierdzenie, że infekcja wpływa na czas (timing) a nie na wzór różnicowania/ścieżkę rozwojową (developmental pathway) komórek miękiszowych.

Mimo tych krytycznych uwag uważam, że cykl prac poświęcony jest ważnemu, a słabo rozpoznanemu na poziomie komórkowym zjawisku tworzenia twardzieli oraz że Doktorantka uzyskała ciekawe i nowe dla nauki wyniki. Do najważniejszych osiągnięć prezentowanych prac, choć nie zawsze wyartykułowanych w publikacjach, zaliczam:

- wykorzystanie analiz mikroskopowych (a nie tylko makroskopowo widocznych zmian w drewnie wtórnym) w celu określenia stanu komórek miękiszowych, a tym samym wyznaczenie w sposób jednoznaczny czasowych i przestrzennych ram procesu twardzielowania (i/lub tworzenia strefy przejściowej); ta sama metoda może być stosowana w drewnie roślin nagozalążkowych i

liściastych wskazując na jej uniwersalność. Jest to niewątpliwie ważne osiągnięcie metodyczne dla przyszłych badań.

- określenie wieku długowiecznych komórek miękiszowych jesionu oraz żywych komórek miękiszowych i ich przestrzennej dystrybucji w drewnie wtórnym sosny;

- możliwość doprecyzowania definicji powstawania twardzieli i cech pozwalających na jej wyznaczenie u różnych gatunków roślin drzewiastych;

- wykazanie, że synteza metabolitów wtórnych nie zawsze i nie od samego początku oznacza zamieranie komórki i jest jednoznacznym symptomem przekształcania komórek miękiszu; wydaje się, że jest to cecha gatunkowo specyficzna i być może dopiero wtórne przemiany biochemiczne prowadzą do wytworzenia końcowych ekstraktów twardzielowych;

- analiza porównawcza zdrowych i zamierających osobników jesionu wskazuje na wczesną reakcję komórek drewna w odpowiedzi na patogenezę;

- pokazanie różnych modeli i ich przydatności w badaniach nad procesem twardzielowania, ale również w analizach odpowiedzi roślin drzewiastych na stres środowiskowy;

- cenne podsumowanie stanu obecnego wiedzy na temat procesu twardzielowania – praca przeglądowa w języku polskim niewątpliwie może być wykorzystana przez studentów a także praktyków zajmujących się biologią drzew.

Jak wspomniałam wcześniej, rozprawa doktorska Pani mgr Anny Bieniasz jest oparta na zbiorze trzech artykułów: dwóch eksperymentalnych opublikowanych w 2019 i 2022 r. i jednego artykułu przeglądowego z 2020 r. w języku polskim; wszystkie czasopisma są przypisane do dyscypliny nauki leśnej i znajdują się na tzw. liście filadelfijskiej, a ich sumaryczny współczynnik wpływu wynosi 4,284. Warto podkreślić, że w dwóch pracach wchodzących w skład rozprawy Pani mgr Anna Bieniasz jest pierwszym autorem, w ostatniej z nich także autorem korespondencyjnym. Doktorantka m.in. brała udział w zbieraniu materiału, dopracowała protokoły, przeprowadzała analizy i opracowywała wyniki, a także uczestniczyła w pisaniu i edycji manuskryptów. Wskazuje to na znaczący udział Pani mgr Anny Bieniasz przy przygotowaniu

publikacji. Podsumowując, Pani mgr Anna Bieniasz spełnia wymogi stawiane Doktorantom przedstawiającym rozprawy doktorskie oparte o zbiór publikacji.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669, z 2019 r. poz. 39, 534, z 2020 r. poz. 695, 875, 1086, z 2021 r. poz. 1630, 2232, z 2022 r. poz. 1010, 1117, 2306, z 2023 r. poz. 212, 1672) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Leśnych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW) w Warszawie o dopuszczenie Pani magister Anny Bieniasz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ewelina Górska