

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Brągoszewskiej pt. „Reakcje wybranych gatunków drzew na stres solny w środowisku miejskim”

Drzewa są niezwykle istotnym elementem w zbiorowiskach roślin w miastach i jako całe zespoły i jako pojedyncze okazy. Odgrywają ogromną rolę w kształtowaniu gospodarki wodnej i bezpośrednio jak i pośrednio oddziałują na człowieka. Ich wieloraka rola w środowisku skutkuje silnym oddziaływaniem na jakość życia, zdrowie, jak również na procesy ekonomiczne zachodzące w społeczeństwie. Rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Brągoszewskiej koncentruje się na zjawisku odporności na stres solny kilku gatunków drzew ważnych dla terenów zielonych w obrębie Warszawy. Reakcje roślin na stres solny były opisane w setkach publikacji, ale jego oddziaływanie na drzewa w warunkach semi-naturalnych jak dotychczas był przedmiotem zaledwie niewielu prac naukowych. Na podstawie naszej wiedzy fizjologicznej wiemy, że odporność wszystkich roślin na czynniki stresowe jest związana bezpośrednio z ekspresją szeregu genów, ale kompleksowe zrozumienie kluczowych dla odporności procesów jest jeszcze bardzo odległe, tym bardziej, że nie znamy specyfiki fizjologicznej poszczególnych gatunków. Zainteresowania badaczy koncentrują się często na opisie roli poszczególnych genów, białek i procesów w typowych obiektach doświadczalnych, zaniehbując fakt, że rośliny użytkowe w tym także drzewa, będące przedmiotem niniejszej pracy, wykazują swoistą specyfikę związaną bezpośrednio lub pośrednio właśnie z faktem ich użytkowania. Należy zaznaczyć, że powtarzalność wyników eksperymentów prowadzonych na modelowych gatunkach doświadczalnych uzyskuje się często poprzez przeprowadzanie badań w kontrolowanych warunkach, przy łatwych do opisanie i stabilnych podstawowych parametrach zewnętrznych, a zaniehbuje się badania w naturalnych warunkach. W pracy doktorskiej mgr Brągoszewskiej oceniono wrażliwość badanych gatunków wegetujących w warunkach miejskich, w określonym otoczeniu w warunkach silnego stresu solnego i roślinach kontrolnych, gdzie ten czynnik stresowy odgrywał znikomą rolę. Wiele wątpliwości dotyczących fizjologii roślin poddanych działaniu stresu solnego nie zostało do chwili obecnej rozwiązanych i dysponujemy tylko niepełnymi i często powierzchownymi danymi odnośnie funkcjonowania tych mechanizmów w przypadku

drzew pomimo, że to właśnie drzewa w środowisku miejskim są w ogromnym stopniu narażone na długotrwałe oddziaływanie stresu solnego. Opisywana praca odbiega w kilku punktach od standardowych prac doktorskich. W części wstępnej praca koncentruje się na zagadnieniach środowiskowo-ekologicznych, a drugiej części eksperymentalnej ma charakter fizjologiczno-biochemiczny. Przedstawione eksperymenty zmierzające do opisanie i wyjaśnienia wielu istotnych zależności mają charakter badań podstawowych, ale uzyskane wyniki już na obecnym etapie prac są interesujące dla praktyków i specjalistów od zieleni miejskiej.

Oceniana praca obejmująca 136 stron, 37 tabel, 23 ryciny zawiera elementy typowe dla rozpraw doktorskich z dziedziny nauk biologicznych. Praca składa się ze spisu treści, rycin i tabel, wstępu i przeglądu literatury oraz krótkiego określenia celu i zakresu przeprowadzonych prac, rozdziałów poświęconych zastosowanym w pracy metodom, uzyskanym wynikom i ich dyskusji oraz podsumowaniem, jak również spisem zacytowanej literatury oraz wnioskami wypływającymi z przeprowadzonych badań i zamieszczonymi na początku pracy streszczeń ze słowami kluczowymi w języku polskim i angielskim.

„Wstęp” i „Przegląd literatury” stanowią obszerną część rozprawy i donoszą o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie. Autorka charakteryzuje znaczenie terenów zielonych dla miast, a w szczególności ich rolę w usuwaniu zanieczyszczeń powietrza oraz ogólnie znaczenie drzew w środowisku miejskim. Te fragmenty pracy chociaż bardzo ciekawe dla przyrodnika mają ograniczone znaczenie dla sedna analizowanego tematu. Zamieszczone w tej części pracy wiadomości zaczerpnięte są z wielu pozycji prac naukowych, w dużej części anglojęzycznej literatury z ostatnich lat. Prace te bazują w dużej mierze na wiedzy uzyskanej przy analizie drzew liściastych jak i iglastych rosnących w różnych strefach klimatycznych. W oczywisty sposób na kondycję drzew ma wpływ rodzaj i jakość gleb, a ta może być w poważny sposób zniszczona przez doprowadzenie do zasolenia. Negatywne oddziaływanie stresu zasolenia zależy od jego intensywności jak i gatunku drzew. Oddziaływanie zasolenia można rozpatrywać śledząc różnorakie procesy fizjologiczne. Mechanizmy obronne przed tym rodzajem stresem mogą być różnorodne, a szczegóły oprócz generalnych mechanizmów nie są znane. Nie jest dogłębnie przebadane ich powiązanie z innymi mechanizmami fizjologicznymi począwszy od ścieżek sygnalizacyjnych, regulacji szlaków metabolicznych i zmian anatomicznych jak również ich zależność od koegzystujących organizmów (mikoryz, endofitów). Można się spodziewać, że mechanizmy obronne polegają na uruchamianiu bądź modyfikacji aktywności konkretnych ścieżek metabolicznych. Największą trudnością w ich zdefiniowaniu jest trudność w oddzieleniu od równoległych istotnych efektów. Przy analizie



wpływu stresu zasolenia na rośliny kluczowym jest skupienie uwagi na poszczególnych gatunkach istotnych dla konkretnego środowiska miejskiego. Ocena przydatności poszczególnych gatunków drzew do wprowadzenia do miasta i odporności na stres może mieć duże znaczenie ekonomiczne zarówno w trakcie wprowadzania jak i przez wiele kolejnych lat, dlatego taka analiza ma nie tylko znaczenie teoretyczne, ale jest decyzją o dużej wadze ekonomicznej. Podobne analizy można wykonywać na podstawie obserwacji istniejących okazów przy pomocy dostępnych metod analitycznych jak również zapisków historycznych. Wielką wartością niniejszej pracy jest próba dokonania bezpośredniego porównania poszczególnych gatunków w równoległych analizach. Takie prace mogą mieć dużą wartość przy planowaniu zarówno nowych nasadzeń jak i ewentualnych zabiegów agrotechnicznych czy inwestycji w mieście.

Recenzowana praca w dużych fragmentach koncentruje się na fizjologicznych systemach zabezpieczających przed oddziaływaniem stresu jak i mechanizmach obronnych kontrolujących przebieg metabolizmu, w szczególności w warunkach stresu solnego powiązanego ze stresem osmotycznym i stresem suszy. Autorka skupiła się w dużej mierze na relacjach pomiędzy poziomem  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  i pobieraniem innych kationów i anionów, jak również równoległych parametrach fizjologicznych, które mają decydujące znaczenie w oddziaływaniu na roślinę, jej wzrost i aktywność fotosyntetyczną. Pewnych nieścisłości dopatrzyłem się w opisie mechanizmu wiązania dwutlenku węgla na str. 15. Stosowany termin „sekwestracji dwutlenku węgla” jest nieprecyzyjny. Powszechnie stosowany jest termin „wiązanie  $\text{CO}_2$ ” i dlatego użyta w tej pracy terminologia może być myląca i może nasuwać przypuszczenie czasowego przechowywania dwutlenku węgla. Problem wiązania  $\text{CO}_2$  w skali naszego globu ze względu na dobrze znany efekt cieplarniany ma dość fundamentalne znaczenie i konieczna jest tu precyzja. Ponadto pośród różnych strategii obronnych roślin przed stresem wypunktowanie tzw. „ścieżek fotosyntezy” (na stronie 20.) wydaje się prostym tłumaczeniem angielskiego słowa „pathway”, co nie jest poprawne. Podobnie nieprecyzyjne jest mówienie o „destrukcji barwników fotosyntetycznych” (str. 19.) podczas, gdy często jest to proces fizjologiczny optymalizujący zawartość barwników do możliwości wykorzystania absorbowanej energii świetlnej. Opisywane zjawisko prowadzące do obniżenia poziomu barwników chlorofilowych może być mechanizmem zabezpieczającym przed nadmiernym pochłanianiem energii świetlnej prowadzącym do innych negatywnych efektów. Ponadto zastosowany na str. 15. skrót „PM10” powinien zostać wyjaśniony. W następnej kolejności Autorka opisała bardzo podstawowe zależności dotyczące zmian na poziomie biochemicznym koncentrując uwagę na zmianach w poziomie lipidów

prenylowych. Nie można wykluczyć, że lipidy prenylowe są ważnym składnikiem strategii obronnej przed stresem zasolenia, ale też nie mamy jednoznacznych dowodów wskazujących na ich centralną rolę, i nie jest wykluczone, że jest to tylko efekt równoległy do przebiegu reakcji na stres. Gdyby udało się wykazać ściśle współzależności pomiędzy zasoleniem i poziomem lipidów prenylowych byłoby to niezwykle cenne dla nauki. Dotychczasowe dane bazujące na roli tych lipidów w obronie tkanek zwierzęcych przed stresami biotycznymi nie pozwalają na jednoznaczną interpolację wniosków. Podobne zastrzeżenia można mieć w dalszym ciągu prezentowanej pracy przy dyskusji wyników w odniesieniu do roślin.

„Przegląd literatury” pomimo przedstawionych silnych stron w mojej opinii zbyt skrótowo opisuje rolę poszczególnych procesów fizjologicznych odpowiedzialnych za kształtowanie odporności, bez zrozumienia których szczegółowe analizy molekularne nie dają się łatwo interpretować. Zazwyczaj w pracach cenzusowych poświęca się znacznie więcej miejsca takim zagadnieniom. Podsumowując tę część pracy można stwierdzić, że we „Wstępie” i „Przeglądzie literatury” Autorka wykazała się znajomością szerokiego fragmentu piśmiennictwa, a omawiany rozdział został przedstawiony logicznie i poza wypunktowanymi przeoczeniami w przejrzysty sposób uzasadnia celowość podjętych badań. Doktorantka wykazała się też umiejętnością dostrzeżenia aktualnych, a niezbadanych obszarów i określenia problemu badawczego.

W rozdziale „Materiał i Metody” znajdujemy szczegółowy opis materiału badawczego. Jako materiał do analiz Autorka wybrała konkretne egzemplarze drzew rosnące w centrum miasta. Jako kontrolę zastosowała drzewa rosnące w ogrodzie botanicznym w Powsinie (który ściśle rzecz biorąc jest w obrębie Warszawy, a nie poza Warszawą). Prace eksperymentalne zaplanowano na wybranych okazach i w określonych punktach czasowych ważnych dla przebiegu reakcji rośliny na stres. W kompetentny sposób dobrała i pogrupowała materiał do badań ograniczając do minimum błędy wynikające z niewłaściwego doboru materiału. Część prac wykonano na kulturach wazonowych eksponowanych na stres w warunkach podobnych jak kontrola, ale poddanych stresowi zasolenia aplikowanemu w konkretnych stężeniach. Jednakże nie przeanalizowano porównania ze stężeniami panującymi na zasolonych ulicach, co utrudnia dokonywanie bezpośrednich porównań. W pracy znajdujemy opis zastosowanych metod analitycznych, który jest szczegółowy i umożliwiający ich powtórzenie. Szereg drobiazgowych danych zamieszczonych w rozdziale „Metodyka” pozwala wnioskować o stopniu wnikliwości Autorki przy doborze optymalnej metody pomiarowej. Próba statystyczna na jakiej wykonano badania upoważnia do wyciągnięcia jednoznacznych wniosków. Przeprowadzone analizy statystyczne wyników nie budzą



zastrzeżeń. W opisie materiału stosowanego do badań zabrakło zaznaczenia czy do analiz stosowano liście z ewentualnym nekrozami, czy je eliminowano. Ten fakt może mieć kluczowe znaczenie na wysokość zarejestrowanych parametrów. W opisie metody oznaczania siarki mało precyzyjnie opisane istotę analizy. Wyniki podano w „%”, ale nie wiadomo w porównaniu do czego (str. 43).

W części eksperymentalnej opisanej w rozdziale „Omówienie wyników” Doktorantka może pochwalić się obszerną ilością zanotowanych porównań rejestrowanych przez kilka lat i przeanalizowanych metodami statystycznymi. Proste pomiary i obserwacje mogą być użyteczne przy analizie również innego materiału roślinnego. Przeanalizowano poziom szeregu pierwiastków biogennych i składników zanieczyszczeń zarówno w liściach drzew rosnących w warunkach kontrolnych jak i tych wegetujących w warunkach skażonych. Przeprowadzenie analiz w środku sezonu wegetacyjnego jest uzasadnione i umożliwia porównanie poszczególnych gatunków, ale nie pozwoliło to ocenić dynamiki procesu.

Przy opisie uzyskanych danych należałoby zadbać aby w poszczególnych partiach tekstu stosować albo symbole pierwiastków albo ich nazwy (np. str. 57). Ponadto nazwy łacińskie gatunków, o ile to technicznie możliwe (ryciny i tabele), należy zapisywać kursywą. Wartości odchylenia standardowego zwyczajowo oznaczamy jako  $\pm SD$  zamiast „odch. std.”. Należałoby również zdecydować/uściślić czy pisząc o zawartości chloru mówimy o jonach „Cl<sup>-</sup>” czy atomach „Cl”, ponieważ z punktu widzenia reaktywności oddziaływania z tkanką ma to decydujące znaczenie. Przy podawaniu zawartości sumy lipidów prenylowych (Ryc. 21 i 22) brak jest jednostek w jakich wyrażono różnice. Można zapytać czy warto konstruować tabele takie jak Tab. 7 i Tab. 32, w których przedstawia się tylko dwie wartości liczbowe. Czy nie lepiej przedstawić je w tekście?

Wszystkie przeprowadzone serie doświadczalne zaowocowały dużą ilością wyników, umożliwiły wyciągnięcie wielu wniosków, dokonanie pewnych uogólnień i zaproponowanie zmian wybranych parametrów fizjologicznych, które w przyszłości mogą charakteryzować materiał roślinny poddany oddziaływaniu stresu solnego w warunkach naturalnych. Zebrany materiał eksperymentalny pozwala na dyskusję wyników. W rozdziale „Dyskusja” przeanalizowano uzyskane wyniki na tle wielu innych prac z podobnego zakresu. W tej części pracy Autorka wykazała się ostrożnym i krytycznym podejściem do przedstawionych rezultatów. Można sądzić, że wykonane prace będą inspiracją do dalszych prac i badań.

Dyskusja dostarcza dużej porcji informacji i jest konkretna, a we fragmencie dotyczącym kwestii fizjologicznych powiedziałbym nazbyt lakoniczna. Widziałbym szereg możliwości rozbudowania tych wątków. Obszerny materiał eksperymentalny jak najbardziej

upoważnia do snucia przypuszczeń i formułowania teorii. W swojej podstawowej części potwierdza wcześniej opisywane obserwacje i oczekiwane kierunki zmian, ale donosi też o braku zgodności z wcześniej opisywanymi zmianami. Przykładowo, zastanawiającym jest dlaczego w szeregu przypadkach przedstawionych w pracy stwierdzono obniżenie zawartości kwasów organicznych w miarę wzrostu skażenia środowiska. Intencją Autorki było przebadanie ekstraktów liściowych uzyskanych z różnych drzew w celu określenia oddziaływania nadmiaru soli w glebie. Można oczekiwać, że rośliny eksponowane na działanie czynnika stresowego będą produkowały większą ilość kwasów organicznych w wyniku przesunięcia metabolizmu w kierunku  $\beta$ -karboksylacji, jak i konieczności eksportowania anionów kwasów organicznych do środowiska glebowego. Jak zatem wytłumaczyć zmniejszenie poziomu kwasów organicznych w tkankach liściowych obserwowane w tej pracy jak i w poprzednich pracach publikowanych przez Zespół? Podobny kierunek zmian uzyskano zarówno w badaniach terenowych jak i w doświadczeniach na kulturach wazonowych. Sugerowałbym, że taki wielokrotnie obserwowany kierunek zmian można próbować wytłumaczyć silnym eksportem kwasów organicznych do tkanek korzeniowych lub obniżeniem poziomu  $\beta$ -karboksylacji. Gdyby okazało się, że takie wytłumaczenie pomaga w odróżnieniu gatunków wrażliwych od odpornych to mogłoby to pomóc w prostym rozpoznaniu gatunków odpornych na zasolenie. W tym fragmencie prac eksperymentalnych widziałbym możliwość wypracowania dość „przełomowych” parametrów przydatnych do zrozumienia fizjologii badanych drzew w warunkach stresu. W dalszych analizach Autorka skupiła uwagę na zmianach w poziomie lipidów prenylowych. Doktorantka opisała zmiany poziomu kilku wybranych prenoli izolowanych z liści opisanych drzew. Wysokość wykazanych zmian w przypadku niektórych związków prenylowych stanowi jeden z ważnych rezultatów przedstawionych w niniejszej pracy. W moim przekonaniu zebranie tych faktów jest istotnym osiągnięciem rozprawy. Obserwacje te mogą wprowadzić nowe istotne elementy do naszej wiedzy na temat adaptacji roślin do zmiennych warunków środowiskowych. Przedstawione badania umożliwiają znacznie dogłębszą interpretację dzięki równoległym pomiarom na podobnym materiale, co stanowi o wartości eksperymentów.

Niezależnie od zalet ocenianej pracy dyskusja wyników ujawniła trudności interpretacji uzyskanych wyników. Przeprowadzone analizy ukazały jak trudnym w interpretacji zagadnieniem jest powiązanie obserwacji fizjologicznych z analizami biochemicznymi. W swoich doświadczeniach Doktorantka natrafiła na luki w naszej wiedzy fizjologicznej opartej na analizie modeli doświadczalnych, które zachowują się odmiennie od



drzew w semi-naturalnym i dodatkowo skażonym środowisku. Ponadto pokazała jak ułomna jest nasza wiedza przy próbie określenia oddziaływania na roślinę jednego czynnika przy równoległym oddziaływaniu innych stresów. Uzyskane wyniki pomimo zastosowania nowoczesnych technik nie doprowadziły do jednoznacznych wniosków wyjaśniających przyczyny wrażliwości/odporności badanych drzew. Fakt wykonania prac na mało przebadanym od strony biochemicznej materiale roślinnym dodatkowo utrudnia dyskusję, ale też usprawiedliwia tą słabość. Dyskusja wyników w sposób bardzo ogólny podejmuje próbę oceny mechanizmów adaptacyjnych. Bardzo ciekawym elementem jest wykazanie dużych różnic w doświadczeniu terenowym i wazonowym. Różnice te podkreślają, że określenie zawartości soli w liściu nie upoważnia do jednoznacznego wnioskowania o przyczynach zmian fizjologicznych. Okres i siła oddziaływania stresu, wiek materiału roślinnego, i to niekiedy wiek liści, decydują o końcowym efekcie.

W „Dyskusji” zauważyłem kilka następujących stwierdzeń wymagających weryfikacji. Oparte na fakcie literaturowym przypuszczenie jakoby lipidy prenylowe miały być tymi metabolitami, które niwelują negatywne skutki stresów uważam za mało prawdopodobne. Tym bardziej, że jak zacytowano akumulacja poliprenoli/dolicholi jest uważana za wskaźnik stresu. Pisząc o zawartości makroelementów w liściach (str. 102) nieścisłością jest stwierdzenie, że nadmiar Fe nie daje charakterystycznych objawów, podczas gdy jest to jeden z czynników powodujących reakcje Fentona. Zastrzeżenia budzi też sformułowanie, że substancje reagują ze sobą w zależności od masy atomowej. Podobnie uważam, że oddzielanie „osmotycznego” oddziaływania Cl od toksycznego efektu nie da się rozdzielić (str. 96).

Sprecyzowane wnioski pokazują ogólny wkład Doktorantki w postęp w badaniach nad badanymi gatunkami jak również mają zastosowanie w analizie wpływu na innym materiale roślinnym. Nie mogę się zgodzić z wnioskiem nr 2. zakładającym, że zwiększona odporność określonych gatunków na stres solny polega na zdolności do syntezy lipidów prenylowych. Równie prawdopodobne jest spowolnienie ich rozkładu, a ponadto zmiana poziomu tych związków może być po prostu efektem występującym równolegle. Wniosek ten jest zbyt śmiały. Ponadto wniosek ten należałoby połączyć z wnioskiem nr 7. Jednak w przypadku połączenia trzeba założyć, że młode drzewa nie wykazują tej zależności i konieczna jest aklimatyzacja w trakcie rozwoju drzewa. Innym wytłumaczeniem może być modyfikujące oddziaływanie innych czynników warunkujących reakcje na stres solny.

Moje uwagi nie ujmują wartości merytorycznej pracy i stanowią jedynie rady, które powinny być rozważone przy dalszym opracowywaniu tekstu. Doktorantka jest współautorem

kilku prac oryginalnych i o charakterze popularyzatorskim i ma pewne doświadczenie, które zaowocowało w trakcie redagowania ocenianej pracy, która jest napisana zwięzłym i poprawnym językiem, co bardzo ułatwia lekturę.

Wszystkie opisane powyżej spostrzeżenia dotyczące ocenianej pracy doktorskiej skłaniają mnie do zadania następującego pytania: Czy na podstawie przedstawionych wyników doświadczeń można dywagować na temat różnic lub podobieństw reakcji rośliny na inne czynniki stresowe?

#### **Podsumowanie:**

Oceniana praca zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich i spełnia wszelkie wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Autorka wykazała się wiedzą, skrupulatnością i przygotowaniem do prowadzenia prac badawczych. Ponadto wykonała dużą ilość badań, które stanowią znaczący wkład w postęp badań dotyczących oceny wrażliwości roślin na stres solny w warunkach semi-naturalnych. Badania bez wątpienia mogą stanowić podstawę przy podejmowaniu decyzji przez praktyków jak i mogą być użyteczne dla badaczy zajmujących się czynnikami stresowymi u roślin. W związku z tym z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Brągoszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
/-/ Zbigniew Miszański