

Dr hab. Krystyna Winiarczyk prof. UMCS  
Katedra Biologii Komórki

Recenzja rozprawa doktorskiej mgr Natalii Wiśniewskiej zatytułowanej  
**„Analiza porównawcza kwiatowych struktur wydzielniczych u wybranych gatunków  
Orchidaceae Juss. i Apocynaceae Juss. wabiących muchówki (Diptera)”**

**Formalny aspekt rozprawy**

Podstawę formalno-prawną opracowania recenzji wyżej wymienionej rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wiśniewskiej stanowi pismo Zastępcy Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, Pani dr hab. Joanny N. Izdebską, prof. UG z dnia 18 grudnia 2020 roku.

Rośliny z rodziny Orchidaceae, osiągnęły bardzo wysoki stopień specjalizacji plasując się na szczycie drabiny ewolucyjnej, szczególnie pod względem przystosowania się do zapylania przez zwierzęta. Duża różnorodność morfologiczna kwiatów storczyków powstała na skutek stopniowych zmian, mających na celu dostosowywanie się do budowy morfologicznej swoich zapylaczy oraz ich potrzeb. Ponieważ sukces reprodukcyjny u roślin owadopylnych zależy całkowicie od zapylaczy zatem rośliny wykształciły różne mechanizmy zapylania, wyodrębnione na podstawie wielkości, kształtu, barwy i zapachu kwiatu oraz nagrody oferowanej zapylaczom. Muchówki to ważna grupa owadów biorących udział w przenoszeniu pyłkocin i zapylaniu storczyków. W recenzowanej rozprawie mgr Wiśniewska podjęła badania nad relacjami zapylacz –kwiat zapylany ze szczególnym uwzględnieniem obecności struktur wydzielniczych w kontekście ich atrakcyjności dla zapylaczy. W piśmiennictwie dotyczącym



storczyków niewiele uwagi poświęcono budowie tkanki wydzielniczej w kwiatach, a więc wybór takiego tematu badań jest według mnie jak najbardziej uzasadniony. Wiedza z tego zakresu może być przydatna również przy śledzeniu ewolucyjnych zmian w tej grupie roślin kwiatowych, a morfologiczne i anatomiczne szczegóły budowy tkanki wydzielniczej z pewnością są ważną cechą taksonomiczną.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Natalii Wiśniewskiej liczy 79 stron i składa się z następujących części: streszczenia w języku polskim i angielskim oraz zestawu trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy. Ponieważ prace składające się na rozprawę doktorską są wieloautorskie, dlatego dołączone są oświadczenia pozostałych autorów ze wskazaniem ich udziału w powstanie danego artykułu. Całość rozprawy uzupełnia wykaz publikacji niezwiązanych z rozprawą doktorską oraz lista komunikatów konferencyjnych. Cykl trzech prac, które składają się na rozprawę doktorską stanowią oryginalne artykuły naukowe z listy filadelfijskiej: dwie prace zostały opublikowane w czasopiśmie *Protoplasma* i jedna w *South African Journal of Botany*. Wymienione prace ukazały się w latach 2018-2020. Łączny współczynnik oddziaływania publikacji wynosi 7.176, a liczba punktów MNiSW 200. Należy podkreślić, że Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac, a swój wkład w powstanie kolejnych prac ocenia na 50, 80 i 85%.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Wiśniewskiej składa się z następujących artykułów:

P1. Wiśniewska N, Kowalkowska AK, Kozieradzka-Kiszkurno M, Krawczyńska AT, Bohdanowicz J (2018) Floral features of two species of *Bulbophyllum* section *Lepidorhiza* Schltr.: *B. levanae* Ames and *B. nymphopolitanum* Kraenzl. (Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). *Protoplasma* 255:485-499. DOI:10.1007/s00709-017-1156-2.

P2. Wiśniewska N, Lipińska MM, Gołębiowski M, Kowalkowska AK (2019) Labellum structure of *Bulbophyllum echinolabium* J.J. Sm. (section *Lepidorhiza* Schltr., *Bulbophyllinae* Schltr., Orchidaceae Juss.). *Protoplasma* 256:1185-1203. DOI:10.1007/s00709-019-01372-4.

P3. Wiśniewska N, Gdaniec A, Kowalkowska AK (2021) Micromorphological, histochemical and ultrastructural analysis of flower secretory structures in two species pollinated by flies



(Diptera) of Asclepiadoideae Burnett. South African Journal of Botany 137:60-67.  
DOI:10.1016/j.sajb.2020.10.007.

### **Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej**

Ponieważ oryginalne prace badawcze, które stanowią podstawę rozprawy doktorskiej, były już wcześniej recenzowane przez niezależnych recenzentów oraz redaktorów czasopism naukowych, moja ocena powinna dotyczyć głównie autoreferatu lub streszczenia. Zazwyczaj w rozprawach, na które składa się cykl publikacji (zwłaszcza kiedy są to prace wieloautorskie) to właśnie autoreferat jest autorskim opracowaniem Doktorantki. Zatem ta część rozprawy powinna pokazywać umiejętność formułowania hipotezy badawczej, odpowiedniego doboru metod badawczych, sposobu prezentowania wyników oraz ich interpretacji na tle literatury przedmiotu. Niestety w rozprawie mgr Natalii Wiśniewskiej znajduje się jedynie krótkie 5-stronicowe streszczenie, w którym 2 strony zajmuje literatura. W streszczeniu brak postawionej hipotezy badawczej, uzasadnienia jakimi kryteriami kierowano się przy wyborze gatunków do badań, a co najważniejsze, brak analizy uzyskanych wyników na tle piśmiennictwa z tego zakresu. Stwierdzenie, Doktorantki że cykl „poszerza wiedzę o gatunkach wabiących muchówki i pozwala na lepsze zrozumienie relacji kwiat-owad zapylający” oraz, że badania stanowią „wstęp do analiz porównawczych pomiędzy oddalonymi filogenetycznie rodzinami roślin okrytonasiennych” wydaje się zbyt ogólny i absolutnie nie wykorzystuje wyników prezentowanych w cyklu publikacji. Poza tym fakt, że Pani mgr Natalia Wiśniewska zgromadziła w swoim dorobku naukowym prace, które są licznie cytowane (indeks Hirscha 3), pozwalały oczekiwać spektakularnej dyskusji uzyskanych wyników, poszukiwania korelacji pomiędzy zapylaczem a rośliną zapylaną, tak jak to zostało zawarte w tytule rozprawy doktorskiej oraz konkluzji o zrealizowaniu celu pracy.

Mgr Wiśniewska jako cel rozprawy doktorskiej wskazuje analizę cech kwiatowej tkanki wydzielniczej u wybranych gatunków Orchidaceae i Apocynaceae zapylanych przez muchówki. Lokalizacja i aktywność tkanek wydzielniczych odgrywa ważną rolę w procesie zapylenia kwiatów, a szczególnie kwiatów wysoce wyspecjalizowanych z rodziny Orchidaceae. Aby



przedstawić rzetelną analizę. Autorka słusznie wskazuje, że należy dokonać nie tylko oceny histochemicznej struktur wabiących owady zapylające, ale także przeprowadzić analizę chemiczną substancji wydzielanych przez kwiaty.

Pierwsza praca składająca się na rozprawę doktorską jest zatytułowana: „Floral features of two species of *Bulbophyllum* section *Lepidorhiza* Schltr.: *B. levanae* Ames and *B. nymphopolitanum* Kraenzl. (Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae)”

Materiał do badań pochodził z różnych źródeł: *B. levanae* z wiedeńskiego ogrodu botanicznego i z Królewskich Ogródów Botanicznych w Kew, natomiast *B. nymphopolitanum* z Ogródu Botanicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego i Ogródu Botanicznego w Pradze. Celem tej pracy było zbadanie i porównanie mikromorfologii, anatomii i ultrastruktury kwiatowych struktur wydzielniczych tych dwóch gatunków. Analiza elementów wydzielniczych w kwiatach badanych gatunków wskazała, że osmofory były położone na wydłużonych wierzchołkowych częściach sepali i petali. Ultrastruktura elementów wydzielniczych wskazuje na ich wysoką aktywność metaboliczną. Komórki posiadały gęstą cytoplazmę z licznymi mitochondriami, obfite ER, duże plastydy. Ponadto w komórkach elementów okwiatu obu gatunków stwierdzono obecność kulistych osmofilnych ciał. Autorzy stwierdzają, że te plastoglobule w plastydach są zaangażowane w syntezę substancji lotnych (związków fenolowych) które zwabiają muchy. W podsumowaniu autorzy stwierdzają, że kwiaty obu gatunków wykazują aktywność wydzielniczą. Zasadnicze różnice anatomiczne pomiędzy *B. levanae* i *B. nymphopolitanum*, dotyczą wielkości przestrzeni peryplazmatycznej w komórkach doosiowej epidermy warżki. Drugą cechą różniącą dwa badane gatunki jest obecność mikrokanalików w kutykuli pokrywającej ściany epidermy doosiowej warżki. Te mikrokanaly występowały jedynie u *B. levanae* i autorzy przypuszczają, że są one prawdopodobnie zaangażowane w proces wydzielniczy.

W pracy „Labellum structure of *Bulbophyllum echinolabium* J.J. Sm. (section *Lepidorhiza* Schltr., Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae Juss.)” do badań wykorzystano materiał uprawiany w szklarni Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.



Według mnie najcenniejsze w tej pracy jest określenie składu chemicznego sekrecji w labellum. U obu badanych gatunków były to mono oraz disacharydy występujące w różnych stężeniach. Na podstawie uzyskanych wyników Autorzy postulują, że występowanie w komórkach epidermy dużych przestrzeni peryplazmatycznych było związane z wydzielaniem merokrynowym, kiedy to komórka po uwolnieniu wydzieliny pozostaje żywa i nadal podejmuje aktywność wydzielniczą. Wyprodukowane przez roślinę substancje mogły być transportowane przy udziale pęcherzyków do przestrzeni peryplazmatycznych, a następnie na powierzchnię komórki. Zróżnicowane proporcje cukrów w nektarze potwierdzają tezę, że u badanych gatunków jest on oferowany nie tylko muchom, a także pszczołom. W niniejszej pracy cenne są również obserwacje ultrastrukturalne poparte doskonałej jakości elektronogramami. Ujawniają one obecność nieregularnej plazmalemy, zlewających się z nią pęcherzyków wydzielniczych i w pełni rozwiniętych dictyosomów, co wskazuje na typowe dla storczyków wydzielanie granulokrynowe. Natomiast powiększone jądro, a także obfitość mitochondriów wskazują na wysoką aktywność komórkową w labellum.

Trzecia praca jest zatytułowana “Micromorphological, histochemical and ultrastructural analysis of flower secretory structures in two species pollinated by flies (Diptera) of Asclepiadoideae Burnett.

W tej pracy autorzy dokonują analizy tkanki wydzielniczej dwóch gatunków sapromiofilnych należących do rodzin: Apocynaceae i Orchidaceae. Badane gatunki sukulentów są znacznie oddalone filogenetycznie od storczyków, ale ich cechą wspólną jest zdolność do tworzenia pyłkowni oraz wskazanie muchówek jako zapylaczy. Autorzy wykazali zróżnicowanie składu chemicznego wydzieliny na powierzchni kwiatów badanych gatunków. U *Stapelia scitula* był to materiał bogaty w lipidy, natomiast w wydzielinie *Echidnopsis cereiformis* dominowały związki białkowe. Obserwacje te mogą sugerować rolę odżywczą aminokwasów w wydzielanym materiale *E. cereiformis*. Natomiast ciała tłuszczowe w wydzielinie w *S. scitula* mogą być odpowiedzialne za błyszczący efekt wizualny działek kwiatowych, które imitując obrazy atrakcyjne dla zapylaczy angażują je do transferu pyłkowni.



Autorzy sugerują, że pomimo odległości taksonomicznej, odmiennej biologii kwitnienia oraz zróżnicowanych wymagań środowiskowych, niektóre wspólne cechy anatomiczne, histochemiczne i ultrastrukturalne występujące między stapeliowymi a wcześniej opisanymi gatunkami storczyków, mogły powstać w wyniku presji zapylaczy.

We wszystkich pracach składających się na rozprawę doktorską autorzy zwracają uwagę na obecność przestrzeni peryplazmatycznych w komórkach doosiowej epidermy płatków korony i wnioskują, że ich tworzenie jest związane z granulokrynowym typem wydzielania. Dlatego nasuwa się pytanie, czy nie warto przy badaniach aktywności wydzielniczej ustalić precyzyjnie który dzień antezy jest analizowany i takie same kryteria zastosować we wszystkich obserwacjach. Ponadto uważam za zbyt ogólny wniosek: „, mimo wielu podobieństw, występują znaczne różnice w morfometrii płatków, budowie mikromorfologicznej oraz ultrastrukturalnej kwiatów tych gatunków.” Ponieważ w rozprawie doktorskiej oczekujemy oryginalnego rozwiązania problemu naukowego i czytelnik musi wynieść przekonanie, że postawiony problem został rozwiązany.

Podczas publicznej obrony chciałabym uzyskać odpowiedzi na następujące pytania:

- 1- Proszę o uzasadnienie wyboru gatunków angiospermae zapylanych przez Diptera. Dlaczego, z tak licznej rodziny storczykowatych, wybrano właśnie te gatunki do badań? Ponadto wszystkie gatunki pochodziły z różnych źródeł i były uprawiane w odmiennych warunkach, co może /ale nie musi/ przełożyć się na obrazy anatomiczne i histochemiczne tkanek wydzielniczych. Próbki do badań były pobierane w stadium antezy, a u storczyków to stadium trwa bardzo długo. W czasie antezy obserwuje się różną receptywność znamion oraz odmienną aktywność tkanek wydzielniczych w kwiatach, dlatego według mnie należy w badaniach uwzględnić te parametry.
- 2- Czy różne warunki uprawy roślin oraz nie ustalony precyzyjnie moment pobierania materiału do badań, pozwalają badaczowi na porównanie uzyskanych wyników?
- 3- Czy na podstawie przeprowadzonych badań i wiedzy z literatury przedmiotu można ustalić korelację pomiędzy systemem zapylania sapromiofilnych kwiatów z dwóch odległych taksonomicznie rodzin a charakterem atraktantów?



### **Wniosek końcowy**

Badania zawarte w publikacjach stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wiśniewskiej wniosły nową wiedzę dotyczącą budowy kwiatów i lokalizacji struktur wydzielniczych u wybranych przedstawicieli Orchidaceae i Apocynaceae. Ponieważ dane dotyczące struktur wydzielniczych są nadal bardzo nieliczne, a powiązanie ich z badaniami filogenetycznymi mogą być istotne w poznaniu ewolucji storczyków i ich systemów zapylania, zatem uzyskane przez mgr Natalię Wiśniewską wyniki są cenne i stanowią istotny wkład w rozwój nauk biologicznych.

Reasumując uważam, że praca przygotowana przez mgr Natalię Wiśniewską w oparciu o oryginalny materiał badawczy spełnia wymagania 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; Dz.U. z 2005 nr 164 poz. 1365; Dz.U. z 2011 nr 84, poz. 455) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

