

prof. dr hab. Jerzy Puchalski
Polska Akademia Nauk
Ogród Botaniczny - Centrum
Zachowania Różnorodności Biologicznej
w Warszawie - Powsinie

Recenzja Rozprawy Doktorskiej
Pana mgr Adama Miodka
wykonanej na Wydziale Przyrodniczo - Technicznym
Uniwersytetu Opolskiego

pt. "Mechanizm wzrostu komórek inicjalnych kambium, członów naczyń i włókien drzewnych na przykładzie wybranych gatunków drzew liściastych"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Wiesława Włocha (jako promotora) w Zakładzie Biologii Roślin należącym do Samodzielnej Katedry Biosystematyki Uniwersytetu Opolskiego i dotyczy zagadnień badawczych z zakresu anatomii rozwojowej roślin drzewiastych.

Rozprawę doktorską stanowi obszerna monografia obejmująca 255 stron tekstu, w tym 17 stron spisów tabel i rycin oraz załączników. Składa się z typowych dla tego rodzaju części, a mianowicie: Streszczeń w formie abstraktów w języku polskim i angielskim (1strona), Wstępu zawierającego wprowadzenie do przedmiotu badań wraz z przeglądem literatury napisanego na 51 stronach, Celu badań (1 strona), Materiału i metod (32 strony), Wniosków (1 strona) oraz Literatury (22 strony). W pracy zamieszczono też 14 tabel, 102 ryciny oraz 7 załączników.

Praca doktorska obejmuje bardzo szerokie badania związane z mechanizmami wzrostu promieniowego u gatunków drzew liściastych i dotyczy komórek inicjalnych kambium oraz wybranych komórek pochodnych z działalności kambium - członów naczyń i włókien drzewnych, które wykazują intruzywny typ wzrostu. Takie założenie badań umożliwiło Autorowi porównanie przebiegu wzrostu intruzywnego u tych trzech typów komórek oraz wyciągnięcie wniosków odnośnie ewentualnego wspólnego mechanizmu tego wzrostu. Było to bardzo nowatorskie podejście do badań w tym zakresie, gdyż dawało możliwości dostarczenia nowych informacji o warunkach występujących w kambium waskularnym i w jego najbliższym otoczeniu w aspekcie mechanicznym. Doktorant planując te badania oparł się na tzw. hipotezie tigma - osmotycznej wzrostu promieniowego drzew liściastych przedstawionej przez Dr Pawła Kojasa ze współpracownikami. Ta nowa hipoteza opisywała w formie kompleksowego modelu procesy i mechanizmy zachodzące w czasie wzrostu promieniowego tych drzew z uwzględnieniem cyklicznych okołodobowych odkształceń mechanicznych komórek w kambium waskularnym i korkotwórczym. Doktorant postawił

sobie aż 9 szczegółowych celów badawczych umożliwiających doświadczalną weryfikację wybranych założeń hipotezy tigma - osmotycznej. Pierwszym było określenie lokalizacji wzrostu intruzywnego komórek inicjalnych na przykładzie kambium o charakterze piętrowym i niepiętrowym, a kolejnymi scharakteryzowanie wzrostu intruzywnego i symplastycznego włókien drzewnych we wczesnych etapach wzrostu promieniowego oraz określenie lokalizacji wzrostu intruzywnego członów naczyń. Inne cele dotyczyły badania wpływu obecności naczyń na intensywność podziałów peryklinalnych w rzędach promieniowych kambium, a także wyjaśnienia czasu i miejsca powstania naczynia stosując analizę retrospektywną. Do badań wybrano gatunki drzew rosnących w strefie umiarkowanej, charakteryzujące się różną strukturą kambium, a także typem rozmieszczenia naczyń. Celem badań było więc także porównanie sposobów rozpoczęcia ksylogenezy u gatunków prezentujących pierścieniowy i rozpierzchły typ rozmieszczenia naczyń. Wśród planowanych celów badań było również dokonanie weryfikacji tzw. hipotezy kanalizacji auksyny odnoszącej się do wpływu tego fitohormonu na przebieg determinacji drewna wczesnego. Ostatnim celem badań było określenie wpływu promieniowania słonecznego na wiosenną inicjację wzrostu promieniowego w pniach i gałęziach u dwóch różnych gatunków drzew. Realizacja wszystkich tych celów badawczych stworzyła Autorowi podstawy do poszukiwania wspólnych mechanizmów wzrostu tych trzech typów komórek u drzew liściastych ze strefy umiarkowanej. Dotychczas brak było w literaturze potwierdzonych opisów warunków mechanicznych występujących w kambium waskularnym i w jego otoczeniu, w którym rozpoczynają różnicowanie komórki pochodne, w tym komórki macierzyste członów naczyń i włókien drzewnych. Materiałem badawczym było 5 gatunków drzew liściastych występujących w Polsce. Głównym obiektem badawczym były drzewa akacji białej (*Robinia pseudoacacia* L.), które posiadają drewno z kambium piętrowym oraz z pierścieniowym typem rozmieszczenia naczyń. W badaniach porównywano także gatunki drzew o rozpierzchłonaczyniowym typie drewna z kambium niepiętrowym: grab pospolity (*Carpinus betulus* L.), klon pospolity (*Acer platanoides* L.) i dereń świdwa (*Cornus sanguinea* L.). Do części badań wykorzystywane były również drzewa jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.). W badaniach stosowano typowe metody anatomicznej analizy drewna. Preparaty przygotowywano stosując technikę wysokiej jakości semi-cienkich skrawków eponowych na podstawie których wykonywano rekonstrukcje przekrojów stycznych i promieniowych. Takie podejście było bardzo użyteczne, gdyż umożliwiało obrazowanie tkanek jednocześnie w trzech płaszczyznach: stycznej, poprzecznej i promieniowej, co dawało znacznie lepsze podstawy interpretacyjne. Analizy te wykonywano stosując techniki mikroskopii epifluorescencyjnej i mikroskopii jasnego pola. Dużym osiągnięciem Doktoranta było opracowanie i wprowadzenie do badań techniki tzw. wielkopowierzchniowych przekrojów systemowych dającej możliwości uzyskiwania mikrografii o niezwykle dużej rozdzielczości rzędu kilkunastu tysięcy pikseli dla przekrojów poprzecznych całych gałęzi drzew.

Ocena merytoryczna pracy

Ogólna ocena przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej oraz opisanych w niej badań musi być bardzo wysoka. Pisząc tak obszerną monografię Autor wykazał się dużą erudycją i świetną znajomością przedmiotu badań. Świadczą o tym trzy podstawowe rozdziały monografii: Wstęp, Wyniki i Dyskusja. Rozdział nazwany Wstępem jest bardzo cennym przeglądem literatury odnoszącej się bezpośrednio do tematyki doktoratu, jak i zagadnień z nią związanych. Wydaje się, iż materiały z tego rozdziału mogą posłużyć do przygotowania co najmniej dwóch interesujących publikacji przeglądowych. Jediną uwagą o

charakterze redakcyjnym jest nazwanie całego, liczącego 51 stron, rozdziału wstępem. Prawdziwy wstęp jako wprowadzenie do przedmiotu badań stanowi pierwsza strona z uwagami i komentarzem Autora o charakterze refleksyjno - filozoficznym. Pozostałe 50 stron tekstu należałoby chyba oddzielić jako osobny rozdział i nazwać przeglądem literatury. Cel główny badań został postawiony w sposób jasny z dobrym uzasadnieniem. Dobrze zostały wypunktowane także szczegółowe cele badań. Zakres badawczy tych 9 szczegółowych celów był bardzo szeroki i ambitny. Materiał badawczy został dość skrótowo przedstawiony. Natomiast metodyka badań została opisana bardzo szczegółowo. Dotyczyło to szczególnie teoretycznych podstaw badań. W sposób bardzo wszechstronny i dokładny przedstawione zostały założenia hipotezy tigno - osmotycznej wzrostu promieniowego napisanych na blisko 7 stronach tekstu. Można się zastanowić, czy tę część podrozdziału 3. 2. 2. nie lepiej byłoby umieścić w rozdziale 2 : Wstęp, zamiast w rozdziale o metodyce badań.

Autor w bardzo staranny sposób opisał wyniki wszystkich wykonanych badań i zilustrował je doskonałymi rycinami - rysunkami oraz świetnej jakości mikrofotografiami. Wyniki badań przedstawiono w 14 tabelach oraz dodatkowo jako załączniki w 7 tabelach na końcu pracy z wynikami pomiarów wymiarów i liczby komórek. Czytając opisywane doświadczenia można zauważyć dużą docieklivość Doktoranta w dochodzeniu do osiągnięcia zakładanych celów badań. Świadczy o tym dynamiczny charakter prowadzonych eksperymentów oraz ciągłe dążenie do udoskonalania metod badawczych, jak i narzędzi interpretacyjnych. Wszystkie, bardzo ambitne cele badań, zostały przez Doktoranta osiągnięte i w sposób precyzyjny udokumentowane. Świadczą o tym wnioski z badań przedstawione jako 12 szczegółowych paragrafów. Wnioski z tych badań zostały następnie przedyskutowane w rozdziale 5: Dyskusja w wyjątkowo obszernej formie na 77 stronach. Autor wykazał się tutaj doskonałą znajomością literatury i w sposób niezwykle dokładny, lecz i krytyczny porównał uzyskane przez siebie wyniki do informacji z dostępnej literatury. Z dużym uznaniem należy przyjąć wykaz cytowanej literatury. Zawiera on imponującą liczbę 339 pozycji, w większości prac oryginalnych w języku angielskim. Zwraca uwagę także znaczna liczba cytowanych prac z ostatnich 10 lat.

Oceniając wartość merytoryczną badań wykonanych w doktoracie można stwierdzić, że wnoszą one istotny wkład do wiedzy na temat mechanizmów wzrostu promieniowego drzew liściastych strefy umiarkowanej. Przedstawione wyniki są cennym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy na ten temat. Przykładem jest tutaj zlokalizowanie wzrostu intruzywnego komórek inicjalnych u drzew z kambium niepiętrowym. Obserwacje poczynione przez Doktoranta potwierdziły zachodzenie wzrostu intruzywnego inicjałów kambialnych pomiędzy ściany styczne sąsiednich komórek inicjalnych i ich komórek pochodnych, natomiast zaprzeczyły postulowanym w części literatury informacjom o zachodzeniu tego wzrostu pomiędzy ściany promieniowe. Dla gatunków uwzględnionych w pracy lokalizacja wzrostu intruzywnego komórek inicjalnych została wykazana po raz pierwszy. Uzyskane wyniki potwierdziły rezultaty serii prac naukowych przedstawiających zunifikowany mechanizm wzrostu obwodu kambium waskularnego – zarówno piętrowego, jak i niepiętrowego. W pracy doktorskiej potwierdzono także dane literaturowe dotyczące lokalizacji wzrostu intruzywnego członów naczyń pomiędzy ścianami stycznymi. Na szczególną uwagę zasługuje rozdział, w którym dokonano charakterystyki wzrostu symplastyczno-intruzywnego końców włókien drzewnych. Ustalenie dokładnego sposobu wzrostu końców włókien drzewnych - w kierunku promieniowym oraz obwodowym, stanowi jedno z najistotniejszych osiągnięć pracy doktorskiej, ponieważ kwestia ta pozostawała do tej

pory niewyjaśniona. Analiza sposobu wzrostu końców włókien drzewnych polegała na wykonaniu pomiarów redukcji długości ścian antyklinalnych i peryklinalnych komórek przez rosnące końce włókien, z uwzględnieniem równoczesnego zachodzenia wzrostu symplastycznego tkanki. Na wyróżnienie zasługuje zastosowana metodyka. W pracy sprawdzono aż pięć wariantów wykonywania pomiarów dla napotykaných konfiguracji tkankowych. O stopniu szczegółowości przeprowadzonej analizy świadczy nie uwzględnienie „brzegowych antyklin”, co zostało skrupulatnie wyjaśnione w podrozdziale 3.3.3. Dodatkowo Autor świadomie do analizy wybrał jedną z dwóch napotykaných sytuacji tkankowych – tj. sytuację dogodniejszą z perspektywy zaplanowanych analiz, w której nie dochodzi do rozszerzenia sektora międzypromieniowego w strefie różnicowania. W drugim typie sytuacji dochodzi natomiast do zwiększenia wymiaru stycznego analizowanego obszaru pomiędzy promieniami wraz z oddalaniem się od warstwy inicjalnej, co komplikuje analizę udziału wzrostu intruzywnego i symplastycznego końca włókna w kierunku obwodowym i promieniowym. Wykonane pomiary charakteryzowały się wysoką precyzją, na przykład uwzględniono krzywizny ścian komórek. Bardzo dokładne przeprowadzenie pomiarów komórek we fragmencie tkanek na preparacie anatomicznym, jak również dokładne obliczenia matematyczne, uwzględniające geometrię kołowo-symetryczną cylindra kambium waskularnego, umożliwiły Autorowi poprowadzenie wywodu myślowego w sposób spójny i logiczny. Na podstawie precyzyjnie przeprowadzonego badania redukcji ścian przez rosnące końce włókien Autor stwierdził, iż końce włókien drzewnych w początkowej fazie wzrostu rosną w kierunku obwodowym wyłącznie w sposób intruzywny - pomiędzy ścianami stycznymi. Z kolei w kierunku promieniowym częściowo w sposób symplastyczny, a częściowo w sposób intruzywny - pomiędzy ścianami antyklinalnymi. Dokonane obserwacje i wyciągnięte wnioski stanowią nowy, istotny wkład w stan wiedzy naukowej na temat wzrostu promieniowego drzew. Autor przedstawił silne argumenty świadczące o istnieniu wspólnego mechanizmu wzrostu komórek inicjalnych kambium, członów naczyń i włókien drzewnych. Dokonał też weryfikacji założeń jakościowego modelu wzrostu promieniowego drzew liściastych, uwzględniającego występujące w cyklu dobowym odkształcenia tkanek roślinnych. Według założeń wykorzystanego narzędzia teoretycznego, to znaczy hipotezy tigno-osmotycznej, Autor potwierdził, że wzrost stanowi proces adaptacyjny do naprzemiennie występującego stresu mechanicznego i osmotycznego. To nowatorskie podejście pozwoliło stwierdzić, iż wzrost komórek inicjalnych kambium, członów naczyń i włókien drzewnych prawdopodobnie zachodzi w warunkach działania naprężenia rozciągającego w kierunku promieniowym. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji Autor umiejętnie wykazał, że wszystkie te komórki rosną w sposób intruzywny pomiędzy ścianami stycznymi sąsiednich komórek – w kierunku obwodowym. W zaproponowanym, zunifikowanym mechanizmie wzrostu wymienionych typów komórek Autor uwzględnił działanie auksyny jako substancji bardzo istotnej dla zachodzenia wzrostu, jednak nie jako czynnika nadrzędnego. W oparciu o przemyślenia odnoszące się do wyników badań przedstawionych w pracy doktorskiej oraz w licznych danych literaturowych, w tym anatomicznych, fizjologicznych, biomechanicznych i molekularnych Doktorant zaproponował istnienie interferencyjnego pola naprężeń mechanicznych, pełniącego nadrzędną rolę w stosunku do znanych czynników morfogenetycznych. Podejście to wydaje się wartościowe i powinno być dalej rozwijane. Było to istotnym rozwinięciem założeń hipotezy tigno - osmotycznej wzrostu promieniowego drzew.

Zawarte w pracy doktorskiej rozważania, dotyczące roli naprężeń mechanicznych, są interesujące z uwagi na fakt, że w literaturze funkcjonują różne wytłumaczenia zjawisk związanych z funkcjonowaniem i wzrostem komórek kambium i komórek pochodnych, które

niezadko mogą się wzajemnie wykluczać. Autor pracy wielokrotnie wykazał, że nawet na pozór odległe spostrzeżenia i obserwacje można połączyć w spójną całość biorąc pod uwagę kluczową rolę bodźca mechanicznego. Zaproponowana koncepcja odnosząca się do roli naprężeń mechanicznych umożliwia wytłumaczenie dokonanych w pracy doktorskiej obserwacji, to znaczy redukcji liczby podziałów peryklinalnych komórek kambium w rzędach naczyniowych, zachodzenia wzrostu intruzywnego członów naczyń w kierunku zbliżonym do osiowego po wcześniejszej reorientacji komórek macierzystych członów naczyń względem inicjałów kambium, stymulacji wzrostu promieniowego przez promieniowanie słoneczne, które wpływa na warunki osmotyczne i związaną z tym zmianę warunków mechanicznych. Stwierdzone w badaniach podstawowe znaczenie bodźca mechanicznego pozwala uzasadnić, że założenia hipotezy kanalizacji auksyny nie są wystarczające do wyjaśnienia determinacji przebiegu naczyń drewna wczesnego.

Mało przebadanym dotąd zagadnieniem o istotnym znaczeniu dla zrozumienia mechanizmu wzrostu promieniowego oraz mechanizmów odpowiedzialnych za procesy morfogenetyczne u roślin drzewiastych jest wpływ obecności członów naczyń w rzędzie promieniowym komórek na liczbę zachodzących w nim podziałów komórkowych. Autor zaproponował interesującą hipotezę, że powstanie członu naczynia, poprzez lokalną modyfikację układu naprężeń mechanicznych, wpływa na częstotliwość zachodzenia podziałów peryklinalnych kambium waskularnego. Uzyskane w pracy wyniki świadczą o związku pomiędzy pojawieniem się członu naczynia i redukcją liczby podziałów peryklinalnych w określonym rzędzie promieniowym komórek na przestrzeni sezonu wzrostowego. Wszystkie te informacje bardzo istotnie poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmów anatomicznych i fizjologicznych wzrostu promieniowego drzew liściastych, a także świadczą o wybitnie nowatorskim charakterze badań i ich istotnym wkładzie do rozwoju anatomii rozwojowej drzew.

Ostatnie uwagi recenzenta odnoszą się do strony redakcyjnej rozprawy doktorskiej. Jak już wspomniano jest to wyjątkowo obszerna monografia z olbrzymią ilością informacji. Dlatego też czytanie rozprawy było dość trudne i wymagało dużego skupienia i uwagi. Wyniki zawarte w tej monografii mogą być jednak podzielone na kilka odrębnych zagadnień i następnie przedstawione jako różne prace oryginalne. Będzie to jednak wymagało dokonania znacznych skrótów tekstu. Praca pod względem stylistycznym została napisana bardzo poprawnie. Nie zauważono żadnych istotnych błędów stylistycznych, czy ortograficznych. Bardzo nieliczne błędy interpunkcyjne zaznaczono w tekście manuskryptu. Recenzent może mieć jednak propozycję zmiany niektórych wyrażen. Na przykład o osobach wykonujących badania Autor zawsze pisze naukowcy. Chyba lepiej byłoby używać słów badacze lub uczeni. Może warto byłoby zamienić użycie przez Autora niektórych neologizmów, na przykład "uprotonowana cząsteczka" czy "sfalsyfikowano". Te drobne uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają bardzo wysokiej wartości całej rozprawy doktorskiej i opisanych w niej badań.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. "Mechanizm wzrostu komórek inicjalnych kambium, członków naczyń i włókien drzewnych na przykładzie wybranych gatunków drzew liściastych" wykonana przez mgr Adama Miodka pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Włocha zdaniem recenzenta spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w świetle art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.nr65 poz.595

z późn. zmianami) oraz w § 6 ust.5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora. W związku z tym zwracam się do Rady Wydziału Przyrodniczo - Technicznego Uniwersytetu Opolskiego o dopuszczenie Pana mgr Adama Miodka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Jerzy Puchalski

Wniosek dodatkowy

Biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą wykonanych badań i ich wybitnie nowatorski charakter, a także wyjątkową staranność i dociekliwość badawczą Autora, zgłaszam Wysokiej Radzie Wydziału propozycję wyróżnienia tej rozprawy doktorskiej w przyjętej na uczelni formie.

prof. dr hab. Jerzy Puchalski

Warszawa, 3 września 2018 r.