

Poznań 27/06/2020

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Sandry Natonik-Białoń.

Tytuł rozprawy: „Ultrastruktura ściany komórek epidermy łuski cebuli *Allium cepa* oraz jej odkształcenia towarzyszące plazmolizie i deplazmolizie”.

Pomimo znacznego stopnia konserwacji molekularnych mechanizmów regulujących rozwój roślin poszczególne gatunki występujące na naszej planecie wykształciły wiele różnorodnych form. To bardzo fascynujące, że te nie będące w stanie poruszać się organizmy, posiadają niejednokrotnie bardzo wyspecjalizowane organy, dzięki którym mogą opanować różne nisze ekologiczne i przystosować się do środowiska. Każda z wykształconych form jest tak naprawdę wypadkową trzech procesów – podziałów, wzrostu oraz różnicowania komórek. Jednakże każdy z tych procesów może być bardzo precyzyjnie regulowany w czasie i przestrzeni i posiadać wiele składowych. Przykładem może być tu wzrost komórki, którego składowymi są procesy takie jak endoreduplikacja materiału genetycznego, zmiany ciśnienia turgorowego czy też rozluźnianie i synteza ściany komórkowej. Powyższe fakty sugerują, że niejednokrotnie na rośliny warto spojrzeć z nieco innej - biofizycznej perspektywy. Wyobraźmy sobie, że rośliny, podobnie jak budowle wznoszone przez człowieka, muszą posiadać precyzyjnie dobrane parametry materiałowe i muszą być zbudowane według profesjonalnego projektu, w którym wszystko od cegły (komórki) do systemów wentylacji (aparaty szparkowe i przestrzenie komórkowe), ciągów transportowych (tkanka przewodząca) czy też elewacji (epiderma) musi spełniać najbardziej rygorystyczne normy budowlane. Powyższe porównanie pokazuje jak ważny jest biofizyczny aspekt badań, w którym poznajemy w jaki sposób właściwości poszczególnych tkanek i komórek wpływają na zachowanie się roślin w różnych warunkach. To pozwala zrozumieć przystosowania się roślin oraz poznać ukryty wymiar regulacji ich rozwoju. Istotność tego aspektu badań wykazano między innymi w pracach pokazujących, że lokalne rozluźnienie ścian komórkowych w stożku wzrostu pędu prowadzi do zmiany filotaksji (Fleming et al., 1997) a anizotropia naprężeń ściany komórkowej wpływa na polarność lokalizacji białek PIN odpowiedzialnych za regulację transportu auksyny co skutkuje odpowiednim ukierunkowaniem wzrostu komórki (Hamant et al., 2008; Heisler et al., 2010). Rozwój metod mikroskopii oraz modelowania niewątpliwie skutkuje olbrzymim postępem w badaniach biofizycznych jednakże dla powodzenia tego typu badań najważniejszym jest

wybór obiektu oraz odpowiedni dobór metod eksperymentalnych. W tym aspekcie praca Pani mgr Sandry Natonik-Białoń stanowi wzorowy przykład dobrze zaplanowanego eksperymentu naukowego.

W przedstawionej pracy obiektem badań jest epiderma łusek cebuli, dla której to postanowiono opisać odkształcenia wynikające ze zmiany uwodnienia komórek. Tkanka ta jest bardzo dobrym materiałem do tego celu ponieważ nie jest ona silnie połączona z tkankami miękiszowymi, znajdującymi się poniżej. To pozwala na znaczne uproszczenie modelu eksperymentalnego, w którym obserwacje nie są zaburzone przez naprężenia tkankowe wynikające z silnego powiązania poszczególnych tkanek w obrębie organu. Epidermę cebuli można stosunkowo łatwo wyizolować i poddać procesom plazmolizy i deplazmolizy. Autorka pracy przy pomocy metod mikroskopii polaryzacyjnej, konfokalnej, sił atomowych oraz kontrastu Nomarskiego opisała zależności pomiędzy geometrią komórek epidermy cebuli, układem fibryl celulozowych ściany komórkowej oraz stanem uwodnienia protoplastu i przedstawiła w jaki sposób te czynniki wpływają na stopień odkształcenia poszczególnych komórek. W prezentowanych badaniach zastosowano również bioinformatyczne narzędzia do analizy obrazu mikroskopowego takie jak MorphoGraphX czy Fibril Tool. Przeprowadzone badania dostarczają pierwszego tak kompleksowego opisu zależności biofizycznych występujących w epidermie cebuli i potwierdzają trafność doboru modelu dla testowania wpływu zmian turgoru komórek na ich odkształcenia.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi większych zastrzeżeń. W pierwszym rozdziale (wstęp) czytelnik zostaje wprowadzony w podstawowe zagadnienia dotyczące mechanicznych właściwości ścian komórkowych oraz terminologię biofizyczną dotyczącą opisu naprężeń występujących w ścianach komórkowych roślin czy też zależności pomiędzy ciśnieniem turgorowym a odkształceniami komórek. Rozdział jest dobrze zobrazowany siedmioma ilustracjami, które dodatkowo zwiększają przystępność przedstawianych zagadnień. Kolejne części to cel pracy, w którym również przedstawiono hipotezy badawcze, oraz rozdział opisujący materiały i zastosowaną metodykę. Po tych częściach znajdujemy rozdział, w którym przedstawiono wyniki a po nim dyskusje i wnioski. Praca opatrzona jest odnośnikami do istniejących prac ujętymi w rozdziale literatura, który w moim mniemaniu bardziej elegancko można by nazwać „bibliografią”. Po tych rozdziałach znajdują się streszczenia w języku polskim

oraz angielskim oraz aneks zawierający szczegółowe opisy metod, listę publikacji oraz wydruk pracy, której część stanowią wyniki prezentowane w niniejszej rozprawie a mgr Natonik-Białoń jest wiodącym autorem. Konstrukcja rozprawy doktorskiej jest klasyczna a jej układ przejrzysty. Niestety w pracy brak wykazu stosowanych skrótów.

Ocena strony edytorskiej

Praca napisana jest w sposób przystępny, z zachowaniem odpowiednich proporcji pomiędzy wstępem, wynikami i dyskusją. Generalnie nie znalazłem rażących błędów stylistycznych. Ryciny przedstawione są w sposób estetyczny a dodatkowe zamieszczenie w postaci aneksu opisu metody odsłaniania wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian peryklinalnych komórek epidermy (An.1) jak również metod obliczania kąta nachylenia fibryl celulozowych względem długiej osi komórki (An. 2) ułatwia zrozumienie pracy i podążanie za ujętą w logiczną całość prezentację wyników. Całość rozprawy zajmuje 112 stron tekstu, zawierającego również 35 rycin (33 w głównej części i 2 w aneksie), 4 tabele oraz wydruk publikacji naukowej z czasopisma Botany (70 pkt MNiSW), w której autorka niniejszej dysertacji pełni rolę wiodącą.

Ocena merytoryczna rozprawy

Częścią wprowadzającą w tematykę pracy jest rzecz jasna wstęp, który moim zdaniem w dość wąskim zakresie przedstawia istniejący stan wiedzy dotyczącej wzrostu i właściwości biofizycznych komórek i tkanek roślinnych. Mimo to nie uważam tego za wadę ponieważ odnoszę wrażenie, że ideą autorki było jak najlepsze i najbardziej przyswajalne wprowadzenie czytelnika w tematykę bezpośrednio związaną z dysertacją. Stąd też mamy tu sporo wiadomości książkowych, bez których jednak zrozumienie zagadnienia jest znacznie trudniejsze. Mamy tu odnośniki do podręcznika „Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych” autorstwa Zygmunta Hejnowicza ale również do fundamentalnych prac opisujących przebieg plazmolizy, łączność symplastyczną, obserwacje odkształceń komórek czy też biochemię i biomechanikę ścian komórkowych. Choć czytelnik nie jest „zatopiony” w oceanie najnowszych osiągnięć to zostaje mu przedstawiona wiedza biologiczna i fizyczna leżąca u podstaw badanego zjawiska. Takie podejście, w przeciwieństwie do typowego przeglądu literatury nastawionego na przedstawienie jak największej liczby obserwacji i wyników dotyczących zagadnienia, w moim mniemaniu jest lepsze i skutkuje tym, że praca nie jest zbyt

długa i dużo łatwiejsze jest zarówno zrozumienie wybranej metodyki jak też i przedstawianych wyników.

Kolejna część dotyczy opisanego celu pracy. Autorka w sposób jasny i jednoznaczny podkreśla, że zaplanowane badania mają posłużyć określeniu tego jakie odkształcenia towarzyszą zmianom uwodnienia komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli. Podkreśla również, że zamierza ustalić jakie czynniki wpływają na owe odkształcenia. Autorka stawia cztery hipotezy badawcze:

1. Plazmolizie komórki towarzyszy zmniejszenie jej objętości oraz powierzchni zewnętrznej ściany peryklinalnej a w przypadku deplazmolizy zjawisko to wygląda odwrotnie.

Założenie to oparte jest w dużej mierze na istniejących pracach prowadzonych na innych modelach więc postawienie takiej hipotezy było jak najbardziej uprawnione.

2. Wielkość odkształcenia objętościowego obserwowanego w trakcie plazmolizy i deplazmolizy zależy od stopnia dojrzałości łuski cebuli, zmiany ciśnienia osmotycznego oraz kształtów i rozmiaru komórek.

Również ta hipoteza jest uprawniona, ponieważ już wcześniej opisywano dla epidermy (w tym epidermy cebuli) wpływ kształtu komórek, grubości ściany komórkowej czy też wielkości komórek na rozkład naprężeń (Vanstreels et al., 2005; Galletti et al., 2016). W tym aspekcie zmiany następujące w trakcie dojrzewania epidermy powinny mieć istotny wpływ na zdolność komórek do odkształceń (np. utraty stateczności układu mechanicznego skutkującej wyboczeniami).

3. Odkształcenie komórek martwych towarzyszące plazmolizie i deplazmolizie zależy od komórek sąsiednich.

Ta hipoteza właściwie została w dużej mierze zweryfikowana w pracy, w której wykorzystano także komórki epidermy cebuli i badano zmiany właściwości fizycznych komórki po nanoindentacji oraz komórek sąsiadujących (Routier-Kierzkowska et al., 2012).

[Proszę o ustosunkowanie się do tej uwagi i wytlumaczenie na ile nowatorska jest problematyka podjęta w tej hipotezie]

4. Anizotropia towarzyszącego plazmolizie odkształcenia zewnętrznej ściany peryklinalnej komórki epidermy cebuli zależy od geometrii komórki, anizotropii naprężenia w ścianie komórki w stanie turgoru oraz anizotropowych właściwości mechanicznych ściany.

Ta hipoteza jest również uprawniona. We wcześniejszych pracach na epidermie cebuli, w których zastosowano mikroskopię polaryzacyjną oraz ekstensjometr wykazano, że ułożenie mikrofibryll celulozy wpływa na anizotropię naprężenia w ścianach komórkowych (Suslov and Verbelen, 2006). W pracy tej jednak nie badano jak ten czynnik wpływa na odkształcenia powstające na skutek zmian uwodnienia protoplastu. Kwestie dotyczące efektu kształtu komórek lub ich wielkości są bardzo interesujące, zwłaszcza gdy uwzględnimy fakt, że komórki epidermy cebuli nie mają (bardzo często spotykanego dla tej tkanki u innych gatunków) kształtu puzzla.

Kolejną częścią rozprawy jest opis wykorzystanych materiałów oraz metod. Tu w bardzo umiejętny sposób autorka dysertacji wprowadza czytelnika w istotę wykorzystania modelu jakim jest cebula. Znajdziemy tu również opis metody służącej do rozrywania epidermy tak aby można było badać właściwości ścian od wewnętrznej strony protoplastu. W metodyce bardzo dokładnie opisano sposób prowadzenia plazmolizy i deplazmolizy a także wykorzystania metod mikroskopii (AFM, polaryzacja etc.) i towarzyszącym temu metod obliczeniowych. Niektóre aspekty zostały dokładniej i szerzej opisane w aneksie co na pewno ułatwi w przyszłości praktyczne korzystanie z tych metod. Jedyną uwagą do tej części jest to, że nie opisano warunków wzrostu oraz wieku i stanu fizjologicznego pozyskanych cebul. Niestety, później w rozdziale dyskusja dowiaduję się, że cebul nie uprawiano a jedynie zakupiono je na potrzeby eksperymentu, co skutkuje pewnymi problemami interpretacyjnymi (kwestia usuwania bądź nie łusek cebuli przy przechowywaniu bądź wprowadzaniu do obrotu komercyjnego). Ten aspekt na szczęście nie ma znaczenia dla głównego nurtu pracy i najważniejszych wyników w niej uzyskanych.

W części wynikowej znajdują się opisy względnych odkształceń objętościowych i powierzchniowych towarzyszących plazmolizie i deplazmolizie komórek epidermy adaksjalnej cebuli. Względne odkształcenie objętościowe mierzono z wykorzystaniem

mikroskopii konfokalnej po barwieniu jodkiem propidyny. Uzyskane w ten sposób pomiary, jak z resztą stwierdza sama autorka rozprawy, charakteryzowały się dużą zmiennością chociaż w niektórych wariantach uzyskano statystycznie istotnie różnice. Największe zmiany objętości komórek obserwowano dla epidermy młodych cebul. Co ciekawe wśród badanych komórek znalazły się również takie, które zwiększały swą objętość po plazmolizie lub takie, których objętość spadała po deplazmolizie. **[Tu mam pytanie, czy były to jakieś charakterystyczne komórki i co mogło wpłynąć na ten fakt?]**

Dla badanych komórek zmierzono również kształt tak aby sprawdzić czy istnieje jakaś korelacja pomiędzy zmianami objętości a stosunkiem długości długiej osi komórki do krótkiej lub kolistością komórki. Pomiary te wykazały, że w przypadku młodej epidermy obserwowane odkształcenia objętościowe zależne są od rozmiarów a nie od kształtu komórki. Dla dojrzałej epidermy cebuli (łuski) stwierdzono wpływ kształtu na odkształcenie objętościowe; jednakże należy pamiętać, że tu same odkształcenia są mniejsze niż w przypadku młodej tkanki.

Występowanie odkształceń objętościowych przed i po plazmolizie próbowano skorelować z tym czy komórki są martwe czy nie. Parametrem, który pozwala to zbadać jest zdolność do barwienia jąder jodkiem propidyny. **[Tu przyznam, że autorka pracy mogła również wybarwić komórki FDA – fluorescencyjnym barwnikiem, dzięki któremu można zwizualizować selektywnie cytoplazmę komórek żywych [proszę odnieść się do niniejszego spostrzeżenia].**

Odnosnie barwienia jąder martwych komórek przez jodek propidyny istnieją poglądy, że czynnik ten może przedostawać się również przez błony komórek żywych, które w pewnych momentach mają nieciągłości. Autorka pracy również zwraca na to uwagę w dyskusji wyników. Niezależnie od pewnych technicznych niuansów w pracy wykazano, że martwe komórki niejako podążają za odkształceniami żywych sąsiadujących komórek. Autorka niniejszej dysertacji słusznie podsumowuje swoje obserwacje dotyczące odkształceń komórek potencjalnie martwych a uzyskany wynik jest zgodny z pracą Routier-Kierzkowska et al. (2012).

Kolejny rozdział wyników opisuje odkształcenia powierzchniowe komórek epidermy występujące na skutek plazmolizy oraz deplazmolizy mierzone jako względna powierzchnia odkształcenia. Tu autorka wykazuje, że wartości obserwowanych odkształceń były niskie oraz to, że nie znaleziono korelacji pomiędzy obserwowanymi wcześniej odkształceniami objętościowymi. Również analiza głównych kierunków odkształceń nie wykazała jakiegoś dominującego wzorca.

Częścią pracy, która bardzo mi się podoba jest przeprowadzona analiza zmian krzywizny zewnętrznej ściany peryklinalnej. Bardzo trafnym jest porównanie zachowania epidermy do dmuchanego, kieszeniowego materaca. Ten aspekt pojawia się również w pracy Routier-Kierzkowska et al. (2012), w której to wykorzystano technikę mikroskopii sił komórkowych (CFM).

W kolejnej części pracy autorka, pomimo niskich wartości dla odkształceń powierzchniowych uzyskanych w pomiarach z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, postanowiła przeprowadzić obserwacje, których podstawą jest opisane wcześniej zjawisko wyboczenia wewnętrznych warstw ścian komórkowych epidermy na skutek zniesienia naprężeń rozciągających, które to przejawia się powstawaniem tak zwanych „prążków”. Zjawisko to można obserwować z wykorzystaniem kontrastu Nomarskiego. Autorka pracy bardzo rzetelnie i dokładnie analizuje układ tychże prążków i wykazuje ciekawe zależności pomiędzy kątem ich odchylenia a specyficznym kształtem komórek epidermy cebuli. W tym aspekcie bardzo ciekawy jest układ prążków na końcach (zwłaszcza tych ostrych) komórek epidermy cebuli. **[Tu od razu nasuwa mi się pytanie jakby autorka skomentowała potrzebę wytworzenia się takiego kształtu komórek epidermy u cebul w kontekście teorii, że to izotropowy bądź anizotropowy wzrost organu wpływa na determinację kształtu komórek epidermy? Czy występują w przyrodzie organy o podobnym typie wzrostu, a co za tym idzie powstających naprężeń, a posiadające np. komórki typu puzel?]**

Przeprowadzone pomiary odkształceń w naturalny sposób sugerują przyjrzenie się temu jak wygląda układ mikrofibryll celulozy w wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian komórkowych epidermy ulegających wyboczeniu jak też i generalnie jak ten układ wygląda na całej powierzchni ścian. W niniejszej pracy wykonano to odpowiednio przy pomocy mikroskopii sił atomowych oraz mikroskopii polaryzacyjnej. Wyniki z obserwacji AFM obliczono automatycznie z wykorzystaniem narzędzia FibrilTool lub poprzez manualną digitalizację danych uzyskanych z obrazów mikroskopowych. Czytając tę część, podobnie jak autorka dysertacji, odnoszę wrażenie, że dobór metodyki bardzo istotnie wpływa na uzyskane dane. **[W przedstawieniu wyników brak mi jednak jednoznacznego stwierdzenia w jaki sposób układ mikrofibryll celulozy w rejonach ulegających wyboczeniu jest specyficzny bądź inny w stosunku do pozostałych rejonów wewnętrznej powierzchni zewnętrznych ścian**

komórkowych epidermy. Proszę o krótkie rozwinięcie/wytłumaczenie znaczenia uzyskanych wyników i powiązanie tego z obserwowanymi prążkami.]

Wyniki mikroskopii polaryzacyjnej opisujące układ mikrofibryll celulozy na całej grubości zewnętrznej ściany peryklinalnej komórek epidermy wskazują na silną korelację ze stanem dojrzałości łusek. Brak jednak ważnych różnic pomiędzy rejonami równowąskimi komórek co sugeruje, że geometria komórki może mieć większe znaczenie niż właściwości ściany komórkowej **[W wynikach trochę brak mi jednoznacznego stwierdzenia jak to się ma do wyboczeń obserwowanych w trakcie zmian uwodnienia. Choć jest to częściowo opisane w dyskusji to proszę o komentarz.]**

Rozprawę zamyka rozdział „Dyskusja” oraz następujące po nim „Wnioski”.

Dyskusja jest, zwarta i konkretna. Nie przytacza się w niej prac nieistotnych dla prezentowanych wyników i to wyniki są tematem wiodącym dla dyskusji. Podobnie jak w rozdziale dotyczącym metodyki, autorka dysertacji podkreśla najbardziej istotną cechę epidermy cebuli, dzięki której obiekt ten jest bardzo przydatny dla badania reakcji biofizycznych komórek na różny stan uwodnienia. Możliwość wyeliminowania wpływu komórek znajdujących się pod spodem jest bardzo ważna. W dyskusji autorka dysertacji również częściowo odpowiada na poruszone przez mnie w niniejszej recenzji aspekty dotyczące anizotropii odkształcenia powierzchniowego komórek i zależności od układu mikrofibryll ściany komórkowej oraz geometrii komórek. Dobrze i umiejętnie są również dyskutowane zalety i ograniczenia metod barwienia jodkiem propidyny czy też stosowania mikroskopii AFM.

Część VII zawiera wnioski, które są bardzo opisowe przez co czasem są to tak naprawdę podsumowujące opisy wyników kończące się konkluzją. Często jest to poważny błąd edytorski ale w tym przypadku istnieje duża potrzeba takiego opisowego wnioskowania ponieważ praca dotyczy często delikatnych niuansów. Dużą zaletą jest dookreślenie tego czy w pracy potwierdzono lub odrzucono konkretne założenia. Dlatego, choć moim zdaniem ta część nie zawiera wniosków w czystej formie to jestem w stanie zaakceptować styl autorki dysertacji.

Uważam, że praca została napisana bardzo dobrze i zwięźle. Choć nie jest ona bardzo obszerna a niektóre zagadnienia w niej poruszane są również przedmiotem niezależnych prac innych zespołów to bardzo, dojrzały, krytyczny i wyważony sposób napisania rozprawy oraz wysoka jakość przedstawionych wyników w mojej ocenie zasługuje na wyróżnienie. Praca spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o stosowne wyróżnienie rozprawy.

poważaniem

Dr hab. Robert Malinowski, prof. IGR PAN



Bibliografia:

- Fleming, A.J., McQueen-Mason, S., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (1997). Induction of Leaf Primordia by the Cell Wall Protein Expansin. *Science* **276**, 1415-1418.
- Galletti, R., Verger, S., Hamant, O., and Ingram, G.C.** (2016). Developing a 'thick skin': a paradoxical role for mechanical tension in maintaining epidermal integrity? *Development* **143**, 3249-3258.
- Hamant, O., Heisler, M.G., Jönsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlín, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E.M., Couder, Y., and Traas, J.** (2008). Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* **322**, 1650-1655.
- Heisler, M.G., Hamant, O., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Ohno, C., Jönsson, H., Traas, J., and Meyerowitz, E.M.** (2010). Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS biology* **8**, e1000516.
- Routier-Kierzkowska, A.-L., Weber, A., Kochova, P., Felekis, D., Nelson, B.J., Kuhlemeier, C., and Smith, R.S.** (2012). Cellular Force Microscopy for in Vivo Measurements of Plant Tissue Mechanics. *Plant Physiology* **158**, 1514-1522.
- Suslov, D., and Verbelen, J.-P.** (2006). Cellulose orientation determines mechanical anisotropy in onion epidermis cell walls. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2183-2192.

Vanstreels, E., Alamar, M.C., Verlinden, B.E., Enninghorst, A., Loodts, J.K.A., Tijskens, E., Ramon, H., and Nicolaï, B.M. (2005). Micromechanical behaviour of onion epidermal tissue. *Postharvest Biology and Technology* **37, 163-173.**