



dr hab. Alicja Banasiak, prof. UWrocław
Zakład Biologii Rozwoju Roślin
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

Wrocław, 01.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Nikoliny Skowrońskiej, zatytułowanej „Formation of vascular pattern in Arabidopsis leaf primordia.”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem Pani dr hab. Agaty Burian, prof. UŚ. Część badawcza pracy była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu SONATA BIS6, kierowanego również przez Panią przez dr hab. Agatę Burian, prof. UŚ.

Ocena formalna pracy

Rozprawa została przygotowana w języku angielskim, liczy 125 stron i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Obejmuje sześć głównych rozdziałów: Wstęp, Cele pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję i Spis literatury, a dodatkowo streszczenia w języku polskim i angielskim. Całość pracy jest generalnie napisana w bardzo konkretny i przejrzysty sposób, a zastosowana terminologia naukowa jest na ogół poprawna. Tytuł pracy jest adekwatny do jej treści, cel jasno sformułowany, wyniki omówione w sposób zwięzły i klarowny jak również przedyskutowane w kontekście obecnej wiedzy. Jedyne co budzi zastrzeżenia to brak zgodności pozycji literaturowych cytowanych w pracy i zamieszczonych w spisie literatury. Aż 12 prac cytowanych w tekście nie znalazło się w spisie, a 6 widocznych w spisie, nie było cytowanych w pracy. Jednak, co chciałabym podkreślić, cytowania zawarte w tekście rozprawy zostały dobrane i zastosowane prawidłowo.

Wszystkie prace związane z przygotowaniem rozprawy zostały wykonane przez Doktorantkę, tak więc indywidualny i wyodrębniony wkład Doktorantki w przygotowanie tego opracowania, jako wymóg ustawy, nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna

Regularne rozmieszczenie połączonych ze sobą pasm tkanek przewodzących, według określonych wzorów, jest niezbędne dla efektywnego i równomiernego zaopatrzenia wszystkich rejonów rośliny w wodę, związki odżywcze i cząsteczki regulatorowe. Jednak mechanizmy formowania tych wzorów, nadal pozostają w dużej mierze niezrozumiałe. Podstawowym systemem modelowym w badaniach nad regulującą formowania struktury przestrzennej systemu przewodzącego jest rozwój użyłkowania w liściu *Arabidopsis thaliana*. Badania prowadzone na tym modelu pozwoliły ustalić, że podstawowym czynnikiem, zaangażowanym w ten proces jest auksyna, a tworzenie hierarchicznej waskularyzacji liścia

jest powiązane z obecnością ukierunkowanego jej transportu (PAT), lokalną biosyntezą tego hormonu, powstawaniem tak zwanych punktów zbieżności jako źródeł auksyny w epidermie liści, a także obecnością zróżnicowanego systemu przewodzącego w pędzie. Nie jest jednak dokładnie wyjaśnione jaką funkcję pełni każdy z tych elementów w formowaniu całego wzoru. Wyjaśnienia tego, przynajmniej w pewnym zakresie, podjęła się Doktorantka w ramach przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Celem jej pracy było przede wszystkim ustalenie w jaki sposób na waskularyzację liścia wpływają źródła auksyny w epidermie, a także już istniejący system przewodzący. Starła się również powiązać rozwój użyłkowania z kształtem liścia. W tym celu opracowała nową metodę przyżyciowej analizy najmłodszych zawiązków dorosłych liści inicjowanych na SAM i wykorzystując tę metodę przeprowadziła analizę inicjacji systemu waskularnego poprzez lokalizację markerów odpowiedzi auksynowej i biosyntezy auksyn, jak również przeprowadzając analizy morfologiczne komórek w inicjowanych pasmach. W dalszej części pracy, w podobny sposób analizowała rozwój: zawiązków liściowych u wybranych mutantów *Arabidopsis*, zawiązków traktowanych auksynami i inhibitorem polarnego transportu auksyn – NPA i zawiązków poddawanych eksperymentom z mechaniczną ablacją. Właśnie eksperymenty z ablacją moim zdaniem stanowią najciekawszą i najbardziej nowatorską, poza opracowaniem metody, część ocenianej rozprawy doktorskiej, z dużym potencjałem do dalszych badań.

Wstęp w sposób przejrzysty i łatwy do zrozumienia prezentuje dotychczasową wiedzę dotyczącą przedmiotu badań. Szczególnie dobrze opisane są wszystkie rozdziały dotyczące regulacji formowania użyłkowania, co pokazuje, że Doktorantka doskonale orientuje się w swojej problematyce badawczej. Należy to szczególnie docenić, biorąc pod uwagę fakt, jak bardzo trudnym i skomplikowanym procesem jest rozwój tej hierarchicznej struktury. Jest jednak kilka kwestii, do których chciałabym, aby Doktorantka się odniosła. **1)** W rozdziale dotyczącym struktury merystemu wierzchołkowego pędu (SAM) stwierdzono, że merystem ten może składać się z kilkuset małych, stale rosnących i dzielących się komórek, które ostatecznie różnicują się i tworzą różne organy (str. 7). Czy rzeczywiście wszystkie komórki wchodzące w skład merystemu przechodzą ostatecznie proces różnicowania? **2)** W tym samym rozdziale Doktorantka napisała również, że po podziale komórki inicjalnej, jedna komórka potomna utrzymuje pozycję na szczycie merystemu (SAM) i zachowuje tożsamość komórki inicjalnej, natomiast druga „opuszcza” wierzchołek i w wyniku wzrostu merystemu przemieszcza się na peryferie, gdzie wchodzi na ścieżkę różnicowania. Chciałabym wyjaśnić, co Doktorantka miała na myśli pisząc „na peryferie”? Strefę peryferyczną? Jeśli tak, to czy wszystkie komórki powstające w wyniku podziału komórki inicjalnej, przechodzące różnicowanie, trafiają do strefy peryferycznej merystemu? **3)** Z kolei w rozdziale dotyczącym różnicowania pasm waskularnych jest podane, że ekspresja markerów prokambium (w tym Q0990) jest wykrywana w komórkach wydłużonych, ale nie w komórkach, które dzieliłyby się równoległe do osi pasma (str. 32-33). Czy ekspresja markera Q0990 rzeczywiście nie występuje w dzielących się komórkach prokambium? **4)** Schemat strefowości merystemu (SAM) przedstawiony w Fig. 1.2 sugeruje, że

komórki strefy OC dają początek niezależnej warstwie merystemu w sposób podobny do komórek inicjalnych, a w podpisie brakuje wyjaśnienia jakie rejony i warstwy pokazują poszczególne kolory i linie zaznaczone na schemacie. Przyznam, że mimo różnych sposobów opisu SAM, z takim przedstawieniem jego strefowości jeszcze się nie spotkałam. Dlatego prosiłabym, aby Doktorantka zinterpretowała nam ten schemat i wyjaśniła co innego/nowego chciała w nim przekazać. Chciałam jednocześnie podkreślić, że opis struktury merystemu w tekście pracy, w przeciwieństwie do schematu, nie odbiega od typowego opisu i nie budzi zastrzeżeń. **5)** Doktorantka podaje także, że transport auksyny na duże odległości odbywa się przez dojrzałe łyko wraz z asymilatami fotosyntetycznymi, podczas gdy kierunkowy transport auksyny na krótkie odległości (lub polarny transport auksyny, PAT) zachodzi z komórki do komórki w sposób bierny poprzez dyfuzję przez błony i plazmodesmy lub aktywnie przez białka nośnikowe (str. 10). Dla mnie ten opis jest zbyt dużym skrótem, dlatego prosiłabym, aby Doktorantka wyjaśniła, czy można powiedzieć o pasywnej dyfuzji przez błony, że jest ukierunkowana? Czy transport przez plazmodesmy można nazwać polarnym transportem auksyny (PAT)? Jaka jest definicja transportu określanego jako PAT?

W rozdziale **Materiały i metody** opisano materiał badawczy i kolejne etapy opracowanej, nowej procedury. Przedstawiono również jej modyfikacje związane z dodatkowym traktowaniem zawiązków liściowych auksynami (IAA, NAA) i NPA, a także poddawaniem ich lokalnej ablacji. Większość procedur została przedstawiona w sposób przejrzysty, typowy dla prac doktorskich, umożliwiając ich wykorzystanie w formie gotowego protokołu. Nasunęło mi się jednak kilka pytań i wątpliwości, które chciałabym wyjaśnić. **1)** Przy opisie roślinnego materiału badawczego wymienione są linie transgeniczne i mutanty wykorzystane w badaniach, z odniesieniem do odpowiedniej literatury. Wyjątek stanowią krzyżówki mutantów z linią transgeniczną DR5v2:YFP, gdzie nie ma odniesienia do literatury. Stąd moje pytanie. Skąd pochodziły analizowane krzyżówki? Czy doktorantka sama krzyżowała? **2)** W jakim celu do lanoliny mieszanej z auksyną dodawano Sephadex? Pytam z czystej ciekawości, ponieważ sama stosuję metodę aplikacji auksyny w lanolinie, ale bez Sephadexu i chciałabym wiedzieć czy ta modyfikacja w jakiś korzystny sposób wpływa na tego typu doświadczenia. **3)** Metoda rekonstrukcji pasm prokambialnych w zawiązkach, wymaga dokładniejszego wyjaśnienia. Z opisu analiz wynika, że komórki prokambialne były zaznaczane manualnie i były rozpoznawane na podstawie proporcji pomiędzy długością i szerokością. Czy to program mierzył komórki i wybierał je na podstawie tych pomiarów, a tylko zaznaczane były manualnie czy też odbywało się to na innej zasadzie? Jak rysowano nerwy, ręcznie czy przy pomocy programu? Zdjęcia zamieszczone w Fig. 3.6, które prawdopodobnie miały obrazować działanie programu są nieczytelne. Ponadto narysowany wzór użytkownika nie do końca odpowiada wzorowi

zaznaczonych komórek. Z tego względu prosiłabym o wyjaśnienie wszystkich kolejnych etapów rekonstrukcji pasm waskularnych.

W **Wynikach** zaprezentowano szereg ciekawych doświadczeń opisanych w 11 rozdziałach. Opis jest w większości klarowny i syntetyczny, towarzyszą mu dobrze opracowane figury zawierające zdjęcia, schematyczne rysunki i wykresy. Wszystkie elementy figur ważne dla interpretacji wyników są bardzo dobrze oznaczone. Zabrakło mi jednak, w przypadku figur dotyczących analiz morfologicznych, pokazania, oprócz zdjęć z narysami pasm waskularnych, także oryginalnych skanów, z widocznym układem komórek. Ponadto liczba analizowanych prób dla każdej linii i każdego wariantu eksperymentu i nie zawsze jest wyraźnie podana. Wielkość prób jest generalnie bardzo zmienna, co może wynikać z trudności technicznych podczas preparacji. Tutaj chciałabym podkreślić, że analizy przeprowadzone w ramach prezentowanej rozprawy są bardzo trudne zarówno technicznie jak i w interpretacji. Są one czasochłonne, wymagają koncentracji, cierpliwości i zdolności manualnych. Biorąc pod uwagę liczbę różnych wariantów eksperymentów przeprowadzonych w ramach tej rozprawy, chciałabym zwrócić uwagę na ogrom pracy włożony przez Doktorantkę w jej przygotowanie.

Doktorantka uzyskała wiele niewątpliwie ważnych wyników, chciałabym jednak wyjaśnić kilka aspektów. **1)** Rozdział odnoszący się do podawania NPA, wymaga wyjaśnienia. Traktowanie NPA całkowicie zmienia wzór użytkowania w liściu, co zostało pokazane w pracy Mattsson i in. 1999. Stwierdzono w niej, że już przy stężeniu $80\mu\text{M}$ NPA nie rozwija się żyłka środkowa. Stężenie NPA stosowane przez Doktorantkę wynosiło aż 100mM . Jestem ciekawa z czego wynikał wybór aż tak wysokiego stężenia? Ponadto chciałabym spytać, w jaki sposób doktorantka rozpoznawała i wyznaczała poszczególne analizowane parametry (nerw główny, nerwy drugorzędowe, rozgałęzienia i pętle) przy całkowicie zmienionym wzorze użytkowania i kształcie liścia, jaki powinien mieć miejsce przy zastosowaniu tak wysokiego stężenia inhibitora? Doktorantka stwierdziła, że aplikacja NPA powoduje zmniejszenie liczby pętli drugorzędowych, podczas gdy Mattsson i in. 1999 pokazują wzrost liczby tych nerwów. Podaje również, że uzyskane przez Nią dane sugerują zwiększenie liczby pasm nerwów pierwszorzędowych (Fig. 4.14C). Tymczasem Mattsson i in. 1999. dowodzą, że przy wysokim stężeniu NPA nerw środkowy nie powstaje. Prosiłabym, aby Doktorantka odniosła się do tych różnic podczas obrony. Chciałabym jednocześnie zaznaczyć, że badania Mattsson i in. opierały się na analizach rozwoju pasm ksylemu, natomiast badania Doktorantki dotyczyły innego, znacznie wcześniejszego etapu, jakim jest rozwój prokambium. **2)** W opisie wyników dotyczących ablacji często pada termin liść starszy lub młodszy, a także jest mowa o opóźnieniu tworzenia pętli. W jaki sposób ustalano wiek liści w tych eksperymentach, aby móc to stwierdzić? **3)** Kolejne pytanie dotyczy analizy rozwoju prokambium w nerwach drugorzędowych przed i po apikalnej ablacji. Doktorantka podaje, że w zawiązkach po ablacji, komórki prokambium w pasmach drugorzędowych są znacznie słabiej rozwinięte, co objawia się ich mniej wydłużonym kształtem w porównaniu do kontroli, gdzie komórki prokambium są prawie 3-4 razy dłuższe niż szersze. W Fig. 4.20 zaznaczono analizowane rejony, ale wydają

się one nie do końca porównywalne, a metodyka tych analiz nie jest wyjaśniona. Stąd moje pytania: Czy porównywano tylko te zaznaczone obszary i także inne? Czy komórki były analizowane na podstawie pomiarów np. przy pomocy programu stosowanego do innych analiz, czy tylko na podstawie obserwacji morfologicznych?

Dyskusja jest dobrze napisana, w oparciu o dostępną literaturę i pokazuje, że Pani mgr Nikolina Skowrońska posiadała umiejętność krytycznej interpretacji otrzymanych wyników oraz wyciągania właściwych wniosków. Całość dyskusji jest podzielona na pięć podrozdziałów zgodnych z postawionymi celami pracy. W pierwszym z nich dyskutowana jest użyteczność opracowanej przez Doktorantkę metody analizy, w drugim Doktorantka odnosi się do powstawania i roli epidermalnych źródeł auksyny dla rozwoju użyłkowania, w kolejnych dwóch rozdziałach dyskutuje mechanizmy regulujące powstawanie nerwu głównego i pętli nerwów drugorzędowych, a w ostatnim, odnosi się do związku pomiędzy wzrostem blaszki liściowej a formowaniem użyłkowania. Omawianie każdego z zagadnień w osobnym rozdziale sprawia, że dyskusja jest przejrzysta i dobrze się ją czyta. **Wnioski** zamieszczone w części końcowej rozprawy są bardziej podsumowaniem najważniejszych wyników, w którym Doktorantka odnosi się dosyć szczegółowo zarówno do głównych jak i szczegółowych celów postawionych w pracy.

Do najważniejszych wyników uzyskanych przez Doktorantkę moim zdaniem należy zaliczyć: **1)** Wykazanie różnic w morfologii komórek prokambialnych w obrębie pojedynczych nerwów drugorzędowych, co wskazuje na niejednoczesny rozwój prokambium w obrębie pojedynczego pasma i pozwala na określenie kierunków jego progresywnego wyodrębniania, **2)** Pokazanie, że podczas wczesnego etapu rozwoju prokambium, wydłużony kształt komórek jest efektem podziałów a nie elongacji, co wciąż pozostaje kwestią dyskusyjną, **3)** Wykazanie, że epidermalne źródła auksyny nie są konieczne dla prawidłowego rozwoju nerwu głównego i nerwów drugorzędowych, **4)** Udowodnienie znaczenia sygnału, prawdopodobnie auksyny, pochodzącego z już istniejącej waskulatury, dla rozwoju nowych pasm waskularnych.

Jestem również ciekawa zdania Doktorantki odnośnie dwóch dodatkowych aspektów, prosiłabym, aby odniosła się do nich podczas obrony:

1) We wstępie Doktorantka napisała, że pierwszym etapem rozwoju waskularnego i powstawania wzoru jest specyfikacja komórek prokambialnych w obrębie tkanek podstawowych. Czy specyfikację komórek prokambialnych rzeczywiście można uznać za pierwszy etap rozwoju waskularnego? Czym w takim razie jest preprokambium i czy może mieć znaczenie dla rozwoju systemu przewodzącego w liściu?

2) Czy pasmo waskularne wyznaczane przez polarny, bazypetalny transport auksyny z miejsca inicjacji zawiązka w stronę istniejącej waskulatury pędu (zanim pojawi się uwypuklenie zawiązka) można nazywać nerwem głównym (środkowym). Czym jest w takim razie ślad

liściowy? Jaka jest różnica pomiędzy śladem liściowym a nerwem głównym? Czy jest możliwe ich rozróżnienie podczas wczesnych etapów waskularyzacji nowego organu?

Wniosek końcowy

Podsumowując, uważam, że oceniana rozprawa doktorska przedstawia nowe i wartościowe dla nauki wyniki, które pozwalają inaczej spojrzeć na przedstawiany dotychczas model waskularyzacji liścia. Rozprawa zawiera również aspekty nowatorskie jak np. opracowanie nowej metody analizy dorosłych liści czy zastosowanie ablacji mechanicznej różnych rejonów rozwijającego się zawiązka. Doktorantka wykazała, że posiadała umiejętność formułowania problemów badawczych, planowania eksperymentów i ich realizacji, jak również wyciągania wniosków i ich interpretowania w odniesieniu do obecnego stanu wiedzy. Moje, zamieszczone powyżej pytania i uwagi nie podważają w żaden sposób wartości merytorycznej pracy jako całości, mają na celu jedynie wyjaśnienie kwestii, które mogły zostać przeoczone, lub nie do końca wyjaśnione w pracy, wynikają także z chęci dyskusji z Doktorantką nad niektórymi problemami badawczymi związanymi z waskularyzacją, którymi jestem szczególnie zainteresowana.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 18.07.2018 r. (art. 187, Dz. U. 2022 poz. 574. ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Nikoliny Skowrońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 1.09.2023

Alicja Banasiak