



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

dr hab. Justyna Wiśniewska, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Instytut Biologii
ul. Lwowska 1,
87-100 Toruń
e-mail: jwisniew@umk.pl

Toruń, 4.08.2023

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Nikoliny Skowrońskiej
pt. „Formation of vascular pattern in *Arabidopsis* leaf primordia”**

Przedmiot i cel rozprawy

Przedmiotem badań opisanych w recenzowanej pracy doktorskiej mgr Nikoliny Skowrońskiej pt. „Formation of vascular pattern in *Arabidopsis* leaf primordia” wykonanej w Katedrze Biofizyki i Morfogenezy Roślin, Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem promotor: dr. hab. Agaty Burian, prof. UŚ jest poznanie tworzenia się wzorca wiązki przewodzącej w primordiach liści *Arabidopsis thaliana*.

Wiązki przewodzące występują we wszystkich organach roślinnych, czyli w łodygach, korzeniach liściach, kwiatach i owocach. Składają się z tkanek przewodzących: floemu i ksylemu. To właśnie nimi transportowane są do organów roślinnych różne substancje, takie jak cukry, białka czy woda, bez których funkcjonowanie rośliny byłoby niemożliwe. Układy waskularne (popularnie nazywane nerwacją) zależą ściśle od kształtu liścia i ulegają rozwojowi w trakcie jego wzrostu. Układ siatkowy jest charakterystyczny dla liści roślin dwuliściennych, a równoległy dla liści roślin jednoliściennych. Muszą zatem istnieć mechanizmy kontrolujące tworzenie się takich układów. Kluczową rolę odgrywają tutaj czynniki endogenne zapewniające ciągłość i integrację nowo powstających struktur z już istniejącymi. Tkanka waskularna może też być wykorzystywana do przesyłania pewnych sygnałów do wierzchołkowej części pędu, dzięki czemu tworzą się nowe organy. Auksyna to hormon kontrolujący m.in. filotakcję czy inicjację tkanki waskularnej, a istnieje wiele różnych hipotez tłumaczących, w jaki sposób hormon ten wpływa i reguluje te procesy.

Doktorantka, pod opieką naukową Pani dr. hab. Agaty Burian, prof. UŚ podjęła ambitne i istotne dla nauki wyzwanie jakim było poznanie tworzenia się wzorca wiązki przewodzącej w primordiach liści *Arabidopsis thaliana*. Badania finansowano z grantu NCN SONATA BIS6 (2016/22/E/NZ3/003442).

Uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej wyniki badań są wartościowe zostaną w przyszłości opublikowane w renomowanym czasopiśmie naukowym, co dodatkowo podkreśla wartość naukową recenzowanej pracy. Oceniając dysertację należy zwrócić szczególną uwagę na fakt, że temat dysertacji jest niezwykle interesujący i nowatorski w zakresie badań podstawowych, gdyż wykorzystano nowoczesne obrazowanie przy pomocy laserowego mikroskopu konfokalnego FV1000 Olympus w warunkach *in vivo* zawiązków liści od momentu ich powstania na wierzchołku pędu do wytworzenia głównej wiązki przewodzącej i kilku bocznych, a jako materiał do badań wykorzystano kilka linii transgenicznnych: DR5v2:GFP, DR5v2:YFP, pATHB8:YFP, pTAA1:TAA-GFP, pYUC4:GFP oraz mutanty *pin1* i *cuc2 cuc3* skrzyżowane z DR5v2:YFP *A. thaliana*.

Ocena merytoryczna – struktura, język rozprawy, najważniejsze osiągnięcia naukowe

Pod względem formalnym rozprawa jest typową monografią o charakterze eksperymentalnym. Praca została napisana w j. angielskim, liczy 125 stron oraz zawiera łącznie 46 figur. W pracy zacytowano 116 pozycji literatury, z wiodących, międzynarodowych czasopism. Zawiera typowe rozdziały: wstęp



(odpowiednik przeglądu literatury), cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis literatury i streszczenie w j. angielskim i j. polskim. Od strony językowej manuskrypt napisany jest dobrze, wszystkie części rozprawy zostały napisane poprawnym, wolnym od poważniejszych błędów gramatycznych i stylistycznych. Zastrzeżenia budzi nieprecyzyjne cytowanie literatury w całej dysertacji (głównie dotyczy to wstępu i dyskusji), co tylko w nieznacznym stopniu obniża poziom recenzowanej dysertacji. Przed opublikowaniem wyników w renomowanym czasopiśmie proszę na ten aspekt zwrócić szczególną uwagę. Poniżej wymieniam popełnione błędy, których należy unikać podczas przygotowania manuskryptu do publikacji:

- nieprawidłowy rok wydania publikacji (str. 6 Dengler jest 2000 a powinno być 2006, Scarpella i Meijer 2010 a powinno być 2004, str. 10 Zhao 2014 a powinno być 2012, Perico et al. 2021 a powinno być 2022, str. 19 Husbands et al. 2015 a powinno być 2016, str. 23 Sawchuk et al. 2013, str. 33 Kang and Dengler 2002 a powinno być 2004, Wenzel et al. 2021 a powinno być 2007, str. 95 Kastanaki et al. 2022 powinno być a i b)

-nieprawidłowe cytowanie pracy Scarpella et al. 2004 a powinno być Scarpella and Meijer 2004 – na str. 31, 32, 95

- brak zacytowania literatury w spisie literatury (str. 8 Aichinger et al. 2012, Esau 1965, str. 9 Carles and Fletcher 2003, str. 11 Wiśniewska et al. 2006, Keneda et al. 2011, Peret et al. 2012, str. 20, 23, 95, 97 Krishna et al. 2021, str. 63 Caggiano et al. 2017, str. 96 Kang i Dengler 2002, Sawchuk et al. 2023, str. 102 Banasiak and Biedroń 2018, str. 106 Burian et al. 2019, str. 107 i 108 Dengler and Kang 2021, Donnelly et al. 1999

- 5 zamieszczonych pozycji w spisie literatury, które nie zacytowano w dysertacji (pozycje 12, 15, 30, 79, 116).

W całej pracy pojawiają się nieliczne błędy redakcyjne np. opis pod rycinami jest przeniesiony na następną stronę. Praca została pod względem redakcyjnym zredagowana b. starannie. **Autorka poświęciła wiele uwagi przygotowanym figurom, które są niezwykle starannie wykonane, dobrej jakości oraz ułatwiają zrozumienie problemu naukowego (16 figur zamieszczonych we wstępie dysertacji) lub planowanych doświadczeń i uzyskanych wyników (6 figur zamieszczonych w materiałach i metodach oraz 24 figury w wynikach dysertacji), co zasługuje na szczególne podkreślenie.**

Wstęp przejrzysto wprowadza czytelnika w temat i ułatwia zrozumienie celu jak i zaplanowanych badań. Doktorantka przedstawiła, w oparciu o prawidłowo i odpowiednio dobraną literaturę naukową, aktualny stan wiedzy dotyczący: budowy merystemu apikalnego pędu oraz wzorca tkanki przewodzącej w liściach, biosyntezy i mechanizm polarnego transportu auksyny oraz szlaku transdukcji sygnału tego fitohormonu odgrywającego istotną rolę w tworzeniu tkanki przewodzącej, inicjacji liści i utrzymaniu wzorca merystemu apikalnego pędu. Ponadto przedstawiła proces formowania liścia oraz głównej wiązki przewodzącej jak i bocznych w liścieniach i liściach u *A. thaliana* - organizmu modelowego w badaniach podstawowych. W oparciu o odpowiednio dobraną literaturę naukową wyjaśniła też istotną rolę auksyny w tworzeniu tkanki przewodzącej, zwracając szczególną uwagę na rolę polarnego transportu auksyny i udział białka PIN1, opisała tworzenie wzorca gradientu stężenia auksyny w liściu, wynikającego zarówno z biosyntezy jak i transportu tego fitohormonu oraz powstawanie prokambium i pre-prokambium.

Cele pracy zostały jasno zdefiniowane tj.

- stworzenie i dopracowanie protokołu wykorzystującego obrazowanie przy pomocy laserowego mikroskopu konfokalnego do badań inicjacji tkanki waskularnej w warunkach *in vivo* w zawiązku liścia u *A. thaliana*, który ułatwi monitorowanie formowania się tkanki przewodzącej we wczesnych stadiach rozwojowych oraz pozwoli na szczegółową analizę anatomiczną tj. identyfikowanie np. komórek prokambium (co nie było do tej pory nie było wykonywane i opublikowane) oraz umożliwi on zaburzenie rozwoju primordium poprzez traktowanie chemiczne lub mechaniczne.



- wykazanie czy źródła auksyny w liściu (w apikalnym regionie zawiązka liści jak i 2 boczne, w marginalnych regionach zawiązka liścia) mają znaczenie podczas inicjacji i rozwoju wzoru tkanki naczyniowej liścia tj. zarówno nerwu głównego jak i bocznych.

Podsumowując, podjęte w rozprawie badania uważam za aktualne i interesujące dla współczesnej nauki.

Materiału i metody. W pracy wyszczególniono materiał badawczy - linie transgeniczne: DR5v2:GFP, DR5v2:YFP, pATHB8:YFP, pTAA1:TAA-GFP, pYUC4:GFP oraz mutanty *pin1* i *cuc2 cuc3* skrzyżowane z DR5v2:YFP *A. thaliana*. Szczegółowo opisano i zobrazowano metody badawcze. Nowatorskie podejście do uzyskania materiału wyjściowego do badań tj. 150-200 µm długości zawiązków pędu z rozwiniętymi zawiązkami liści kulturowanymi w warunkach *in vitro* jest bardzo ciekawym rozwiązaniem. Interesujący jest fakt, że pożywka Murashige i Skoog (MS) w której przez 3-4 dni zawiązki pędu z rozwiniętymi zawiązkami liści *A. thaliana* były kulturowane zawierała dodatkowo giberelinę - GA3 i kinetynę, ale Autorka nie wyjaśnia dlaczego te 2 hormony dodawano do pożywki i czy mogą mieć one wpływ na uzyskane wyniki badań. Metoda clearing of leaf primordia (podrozdział 3.2.2, str. 37) została opracowana przez Wuyts et al. (2010) i zmodyfikowana. W opisie brakuje mi jednak szczegółowego wyjaśnienia dlaczego dodawano poszczególnych roztworów i na czy polegały modyfikacje. Dopiero w dyskusji wyjaśniono dlaczego zastosowano roztwór pseudo-Schiff, ale nie wyjaśniono czy to miało duże znaczenie dla bioobrazowania i uzyskania lepszych rezultatów. Brak też informacji czy zanurzenie materiału w roztworze Hoyer's (str. 37) miało znaczenie dla bioobrazowania. Cenna byłaby też mała adnotacja czy testowano inne stężenia i czasy traktowania primordium NAA (5 mM, 2 dni), IAA(5 mM, 100 µl, 2 dni) czy NPA (100 mM, 5 dni) niż te opisane w dysertacji. Zwróciłam też uwagę, że zastosowano stosunkowo wysoką moc lasera 15-20%. Pytanie czym to było podyktowane i nie miało wpływu na uzyskane wyniki lub mogłoby przyczyną uzyskania artefaktów. Doświadczenia z ablacją komórek b. dobrze zaprojektowano, a uzyskane wyniki są niezwykle interesujące. **Autorka zastosowała w pracy, co należy podkreślić, nowatorskie metody badawcze - obrazowanie przy pomocy laserowego mikroskopu konfokalnego FV1000 Olympus, które nie należy do łatwych technik i zbieranie wyników jest czasochłonne i pracochłonne. Do opracowania wyników wykorzystano od 6 do 40 zdjęć primordiów, w zależności od wariantu doświadczenia. Nowością godną zauważenia jest też fakt, że do określania komórek prokambium Doktorantka wykorzystwała nowatorski program napisany w Pythonie. Bardzo mocną stroną pracy jest część metodyczna pracy, gdyż aby rozwiązać wspomniane problemy badawcze Doktorantka wykazała się dużą starannością i włożyła wiele wysiłku, co zasługuje na szczególne uznanie chociażby np.: w przygotowywaniu preparatów mikroskopowych i analizę przestrzennego wzoru aktywności białek reporterowych - GFP, YFP.**

Opracowanie uzyskanych wyników i dyskusja też nie budzi zastrzeżeń. Wyniki ilustrowane są prawidłowo opisanymi i wykonanymi figurami. Zostały one przedstawione kompaktowo, syntetycznie i jasno usystematyzowane, zakończone poprawnie sformułowanymi wnioskami. **Ta część dysertacji cechuje się wysoką jakością i starannością. Należy też podkreślić kompleksowość uzyskanych wyników, co świadczy o dociekliwości i poszukiwaniu rozwiązań problemów badawczych. Ponadto podczas analizy uzyskanych wyników Doktorantka zastosowała prawidłowe analizy statystyczne (Student's test, Pearson's correlation significance, U Mann-Whitney's test).** Dyskusja uzyskanych wyników to bardzo istotna część prac naukowych, która najczęściej jest wyzwaniem dla Doktorantów. Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań:

- Dlaczego zaobserwowała Pani różnice w uzyskanym obrazie po traktowaniu primordium DR5v2:YFP auksyną syntetyczną - NAA lub auksyna naturalną - IAA (Fig 4.8 i Fig 4.11 oraz Fig 4.9 i Fig 4.12 oraz Fig 4.10 i Fig 4.13) (str. 64 i 69).



- Jaki wg Pani (na podstawie dostępnej literatury) może być połączenie pomiędzy polarnym transportem auksyny a jej biosyntezą, skoro obserwuje się w literaturze (badania prof. J. Frimla na wierzchołku wzrostu korzenia *A. thaliana*), że zaburzenie jednego z nich wpływa na drugi (str. 100)?
- Czy w literaturze znany jest jakiś czynnik, który jest transportowany przez tkankę przewodzącą i może stymulować różnicowanie prokambium w łyko lub drewno? (str. 108)

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe w przedstawionej pracy doktorskiej uznaję:

- zastosowanie nowatorskiej metody badawczej - obrazowania przy pomocy laserowego mikroskopu konfokalnego FV1000 Olympus w warunkach *in vivo*, co umożliwiło śledzenie pośrednio wzorca podwyższonego poziomu auksyny oraz wzorca tkanki naczyniowej w rozwijającym się primordium liści od momentu ich powstania na wierzchołku pędu do wytworzenia głównej wiązki przewodzącej i kilku bocznych w liniach transgenicznych *A. thaliana*: DR5v2:YFP, pATHB8:YFP, pTAA1:TAA-GFP, pYUC4:GFP oraz mutantach *pin1* i *cuc2 cuc3* skrzyżowanych z DR5v2:YFP,
- wykazanie, że lokalnie podwyższony poziom ekspresji DR5v2:YFP oznacza nie tylko inicjowanie tkanki naczyniowej, ale też prawdopodobne miejsca źródła auksyny w apikalnym i lateralnym regionach primordium,
- analiza lokalizacji ekspresji pTAA1:TAA-GFP i pYUC4:GFP sugeruje, że synteza auksyny występuje w określonych lateralnych regionach primordium i zależy od jej biosyntezy ale też i polarnego transportu auksyny,
- występowanie w apikalnym regionie primordium podwyższonego poziomu auksyn nie zależy od jej biosyntezy, gdyż nie stwierdzono lokalnej regulacji TAA1 i YUC4 w tym regionie, ale raczej od jej polarnego transportu,
- główna wiązka przewodząca w primordiach liści przechodzi zmiany rozwojowe tj. długość komórek prokambialnych i ich szerokość zmienia się podczas wzrostu primordium, r
- różnicowanie komórek w głównej wiązce przewodzącej zachodzi w kierunku akropetalnym, co objawia się bardziej wydłużonymi komórkami prokambialnymi i ich większą liczbą w regionie basalnym primordium, zaś powstawanie pasm wiązki przewodzącej drugiego rzędu odbywa się w kierunku basalnym w primordiach,
- podczas rozwoju następuje wzrost długości primordium liści, co jest skorelowane odpowiednio z elongacją komórek prokambium oraz ich szerokością i jest on symetryczny (co wykazano po raz pierwszy),
- dowiedziono, że główna wiązka przewodząca w primordiach liści jest połączona z apikalnym źródłem auksyny, ale nie jest ono kluczowe w kształtowaniu tej głównej wiązki przewodzącej, zaś lateralne źródła auksyny konieczne są do indukcji wolno zakończonych wiązek przewodzących,
- traktowanie auksyną powoduje wzrost długości primordium, co jest skorelowane odpowiednio z elongacją komórek prokambium oraz podnosi poziom auksyny nie tylko w apikalnym i lateralnych źródłach auksyny ale i innych wewnętrznych tkankach,
- ablacja komórek, która objęła apikalne lub lateralne źródła auksyny spowodowała zmianę kształtu primordium i lokalizację ekspresji DR5v2, co wskazuje na ważne znaczenie w wroście i rozwoju primordium oraz formowaniu wzorca wiązki przewodzącej.

Wniosek końcowy

Nie mam wątpliwości, że w swojej rozprawie **doktorskiej mgr Nikoliny Skowrońskiej** podjęła istotny problem badawczy oraz przedstawiła w sposób satysfakcjonujący jego rozwiązanie. **Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Nikoliny Skowrońskiej pt. „Formation of vascular pattern in *Arabidopsis* leaf primordia” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 18 lipca 2018 r. art. 187 (Dz.U. 2022 poz. 574) i wnioskuję do Rady**

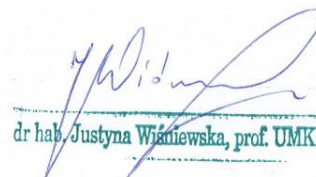


UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Nikoliny Skowrońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoki poziom przedstawionej dysertacji wnioskuję do Wysokiej Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Nikoliny Skowrońskiej stosowną nagrodą.



dr hab. Justyna Wiśniewska, prof. UMK