



prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna
Zakład Botaniki Ogólnej
Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Joanny Zyzak,
p.t. „Regulacja różnicowania systemu przewodzącego
w pędzie kwiatostanowym *Arabidopsis thaliana*”

Podstawę formalną do wykonania recenzji stanowi pismo Z-cy Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne we Wrocławiu, pani prof. Małgorzaty Janickiej, z dnia 21 kwietnia 2022 roku, powierzające mi obowiązki recenzenta na podstawie uchwały nr 65/2022 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne.

Informacje formalne

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Rozwoju Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem dr hab. Alicji Banasiak.

Recenzowana rozprawa ma charakter obszernej monografii, obejmującej 206 stron i zawiera typowy dla prac eksperymentalnych układ dysertacji doktorskiej. Składa się z sześciu głównych rozdziałów, wykazu literatury obejmującego 260 pozycji, wykazu skrótów i aneksu w postaci opublikowanej pracy prezentującej wybrane wyniki rozprawy. Dodatkowo całość pracy opatrzono streszczeniem w języku polskim i angielskim. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe, podobnie kompletność treści i zastosowane narzędzia badawcze. Wszystkie prace zostały wykonane przez Autorkę rozprawy, oczywisty jest zatem indywidualny i wyodrębniony wkład kandydatki do stopnia doktora przy opracowywaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej oraz interpretacji wyników tych prac, co jest zgodne z zapisami w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Prace badawcze były finansowane w ramach dwóch projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych - z Narodowego Centrum Nauki, co zostało odnotowane w pracy. Były to: projekt z konkursu OPUS (2014/15/B/NZ3/00858), którego kierownikiem była Pani Promotor dr hab. Alicja Banasiak i Etiuda (2019/32/T/NZ3/00266), którego kierownikiem była sama Doktorantka. Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Zyzak jest zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań, zaś na podkreślenie zasługuje bardzo duża staranność przygotowania rozprawy. Tytuł pracy jest adekwatny, w pełni oddaje treść i cele rozprawy. Cel został jasno i zwięźle sformułowany, a także uszczegółowiony i zaprezentowany w pracy. Wyniki badań zostały omówione wnikliwie i umiejętnie. Cytowania zostały zastosowane prawidłowo, cytowane prace bardzo dobrze odzwierciedlają aktualny stan wiedzy, ponadto ich dobór oraz liczba są odpowiednie. Wszystkie formalne kwestie, związane z pisanem pracy i przedstawieniem wyników badań własnych, nie budzą zastrzeżeń. Język pracy jest przejrzysty, a zastosowana terminologia naukowa jest na ogół prawidłowa.

Ocena merytoryczna

Przedstawiona do recenzji praca doktorska podejmuje trudny temat uwarunkowań i mechanizmów związanych z rozwojem systemu przewodzącego u roślin. Układ przewodzący jest bowiem fascynującą konstrukcją, od której zależy funkcjonowanie całego organizmu roślinnego. Poznanie zatem mechanizmów jego wyodrębniania i działania jest kluczowe dla rozwoju anatomii i histogenezy roślin. W podjętych przez Autorkę badaniach wyłania się obraz funkcjonowania auksyno-zależnego systemu różnicowania elementów waskularnych pędu. Sformułowanie problemu badawczego wymagało z pewnością zastanowienia się nad wyjaśnianym zagadnieniem, kontekstem, aktualnym stanem wiedzy i oryginalnością. Nie bez znaczenia był też odpowiedni model doświadczalny i plan badań. Jako model doświadczalny Autorka wybrała pęd kwiatostanowy *Arabidopsis thaliana*. Zastosowany w badaniach układ eksperymentalny został zaprojektowany z dbałością o szczegółowe etapy podejmowanych zadań badawczych, umożliwiające poznanie mechanizmów regulujących rozwój systemu przewodzącego i jednocześnie roli auksyn i ich polarnego transportu (PAT) w pędzie. W prezentowanych badaniach wykorzystano dwa opracowane układy eksperymentalne, które pozwalają na analizę rozwoju pojedynczego pasma waskularnego, zarówno w warunkach uszkodzonego/niefunkcjonującego, jak i funkcjonującego w sposób niezaburzony, transportu polarnego. W pierwszym modelu doświadczalnym wykorzystano metodę indukcji pojedynczego organu i pasma waskularnego poprzez aplikację egzogennej auksyny na merystem apikalny pędu mutantu *pin1*. W drugim zaś hamowano transport polarny poprzez podanie inhibitora, czyli kwasu 1-N-naftyloftalamowego (NPA), a następnie go przywracano poprzez wycofanie inhibitora z pożywki. Takie podjęcie tematu i koncepcja badań wydaje się jak najbardziej słuszna. Interesujące i intrygujące zarazem jest to, że chociaż w merystemie wierzchołkowym pędu u *Arabidopsis* zależny od PIN1 polarny transport auksyny reguluje dwa kluczowe procesy rozwojowe: organogenezę i tworzenie układu naczyniowego, to jednak mutacja typu knockout w genie *PIN1* nie hamuje w pełni tych dwóch procesów. Dlatego trafnie podjęto próbę identyfikacji potencjalnego źródła auksyny dla organogenezy i waskularyzacji podczas rozwoju łodygi kwiatostanowej. Przedstawione wyniki są w dużej mierze nowatorskie, uzyskane właśnie dzięki stworzeniu unikalnego systemu eksperymentalnego i możliwości wykorzystania szeregu linii transgeniczných rzodkiewnika.

W głównej części dysertacji Autorka przedstawiła wstęp z przeglądem literatury, cel pracy, zastosowane metody badawcze, wyniki oraz ich dyskusję. W tak obszernym opracowaniu nie brakuje drobnych błędów edytorskich, w tym interpunkcyjnych i tzw. literówek. Rażą też niektóre sformułowania kolokwialne lub pochodzące z laboratoryjnego żargonu, dla przykładu: „badania na zarodku”, „badania nad liściem”, „rośliny hodowano na ziemi”, „ependorfa”, „stok inhibitora”, czy „badania pokazały”. Wymienione drobne uchybienia nie wpływają jednak negatywnie na moją ocenę merytoryczną pracy.

Ocena poszczególnych części rozprawy

Wstęp z przeglądem literatury został zaprezentowany jako dość obszerne omówienie i usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy z przedmiotu badań. Rozdział ten wprowadza czytelnika w tematykę pracy i bywa często bezrefleksyjnym omówieniem stanu wiedzy. W tym przypadku Autorka ustrzegła jednak czytelnika przed bezwiednym „oderwaniem się od tekstu”, wiodąc rozmyślnie kolejne rozważania. Począwszy od wyodrębniania się merystemu wierzchołkowego w zarodku, przez różnicowanie pierwszych elementów układu przewodzącego, aż po transport i rolę auksyn w regulacji waskularyzacji u roślin, Doktorantka prowadzi czytelnika przez zawiłości

strukturalno-funkcjonalne w sposób przemyślany i konsekwentnie zmierzający do przedstawienia zamierzonego konceptu pracy. Zasadniczym dążeniem Autorki było bowiem nakreślenie wyłaniającego się celu pracy, czyli poznania czynników i/lub mechanizmów regulujących rozwój systemu przewodzącego w pędzie kwiatostanowym *Arabidopsis thaliana* i ustalenie jaką rolę w tym procesie odgrywają organy boczne inicjowane na merystemie wierzchołkowym pędu. W rozdziale tym wyodrębniono odpowiednie podrozdziały, w których każdorazowo przywołano właściwe prace i informacje. W rozdziale *Cel pracy* pani mgr Magdalena Zyzak postawiła także pytania badawcze, które miały pomóc zrealizować główny cel badań i na które starała się odpowiedzieć po przeprowadzeniu kolejnych zadań badawczych.

W rozdziale *Materiał i metody* krótko omówiono materiał badawczy i opracowany układ eksperymentalny. Do realizacji głównych założeń pracy wykorzystano w pełni odpowiednie, nowoczesne techniki i metody z zakresu biologii komórki oraz biologii molekularnej. Zastosowane metody badawcze zostały opisane zgodnie ze standardami przyjętymi dla prac doktorskich, jasno przedstawiając sposób i zakres przeprowadzonych analiz, które mogą stanowić rodzaj gotowego protokołu postępowania dla analogicznych badań. Przy okazji lektury tego rozdziału nasunęło mi się kilka pytań lub wątpliwości, które z obowiązku recenzenta chciałabym wyjaśnić:

- 1) We wstępie, przy omawianiu szeregu opublikowanych wyników (innych autorów), Autorka używa określenia uprawa roślin. Tymczasem w rozdziale poświęconym opisowi zastosowanej metodyki decyduje się na termin „hodowla”. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii w aspekcie powszechnie przyjętej definicji hodowli roślin, zakładającej, że jest to „nauka traktująca o polepszaniu cech dziedzicznych u roślin uprawnych, obejmującą również praktyczne działania, których celem jest wytworzenie odmian lepszych jakościowo i plenniejszych”. Czy zatem w przypadku zastosowanego podczas realizacji pracy doktorskiej układu eksperymentalnego była to uprawa czy hodowla roślin?
- 2) Materiał roślinny, w tym konkretnym przypadku nasiona rzodkiewnika, jest poddawany raczej odkażaniu - dezynfekcji powierzchniowej, a nie jak to określono „sterylizacji”; sterylizacja bowiem w języku polskim i dodatkowo w sensie biologicznym odnosi się do ubezplodnienia.
- 3) Podobnie, wnioskuję, że rośliny rzodkiewnika były ukorzenione, zatem uprawiano je raczej w ziemi, a nie „na ziemi”, jak opisano w pracy. Zresztą w tym konkretnym przypadku rekomendowałabym raczej zmianę terminu na uprawa w podłożu stałym.
- 4) Dlaczego, w trakcie uprawy w podłożu stałym, w przypadku roślin o fenotypie dzikim pozostawiano 3 rośliny na doniczkę, a w przypadku mutanta 5? Czy owe różnice w liczebności, rozmieszczeniu lub/i zagęszczeniu w tym konkretnym przypadku mogły mieć istotny wpływ na uzyskane rezultaty?
- 5) Dlaczego podczas normalizacji wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano tylko jeden gen referencyjny *Aktyna2* (*ACTIN2*)? Normalizacja względem pojedynczego genu referencyjnego nie jest już obecnie akceptowalna, chyba że badacze przedstawiają dla recenzentów jasne dowody potwierdzające jego niezmienną ekspresję w opisanych warunkach eksperymentalnych (szczegóły w pracy: Bustin i in. 2009, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments). Optymalną liczbę i wybór genów referencyjnych należy określić doświadczalnie, podając szczegółowo zastosowaną metodykę. Obecnie zaleca się, aby zawsze używać co najmniej dwóch genów referencyjnych, ponieważ użycie tylko jednego może prowadzić do stosunkowo dużych błędów. W przypadku recenzowanej pracy doktorskiej, z pewnością normalizacja z wykorzystaniem większej adekwatnej liczby genów referencyjnych pozwoliłaby na uzyskanie wyników istotnych statycznie. Różnice między próbkami i powtórzeniami

biologicznymi, a co za tym idzie duże wartości odchyłeń standardowych, mogą wynikać bowiem właśnie z zastosowania pojedynczego genu referencyjnego. Wszelkie nawet niewielkie zmiany w ekspresji genu normalizatora zaciemniają rzeczywiste różnice i powodują zmiany artefaktyczne.

6) Dlaczego przy analizie i weryfikacji istotności statystycznej wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym zdecydowano się na wykorzystanie testu t-studenta, metody statystycznej umożliwiającej porównania DWÓCH grup średnich między sobą? Wg mojej wiedzy korzysta się z niej wówczas, gdy mamy wyniki jedynie dla dwóch grup i chcemy porównać je ze sobą - tzn. stwierdzić, czy wyniki w jednej grupie są większe bądź mniejsze niż w drugiej grupie. Nie można porównywać ze sobą kilku grup, wykonując kilkakrotnie test t-Studenta. Jeżeli mamy więcej niż 2 grupy to musimy skorzystać z innych testów statystycznych. W tej sytuacji test t-studenta można było zastosować w przypadku wyników zaprezentowanych na Fig. 39A, ale w przypadku wyników prezentowanych na Fig. 39B należało pewnie zastosować analizę wariancji ANOVA i następnie jeden z testów typu post-hoc. Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do powyższej kwestii.

Rozdział *Wyniki* został przedstawiony na blisko 100 stronach. Na uwagę zasługuje ogrom analizowanych rezultatów i jednocześnie z reguły klarowna ich prezentacja, rzeczowa analiza oraz trafne spostrzeżenia w każdym z przedstawionych podrozdziałów. Wyniki są oryginalne i bez wątpienia zawierają element nowatorski. Niestety z uwagi na objętość pracy i mnogość efektów pracy dość trudno jest czytelnikowi szybko i skutecznie interpretować wyniki i jednocześnie podążać za tekstem. Z pewnością warty ulepszenia jest sam sposób prezentacji i eksponowania dokumentacji fotograficznej. Poszczególne plansze zawierały bardzo dużo pojedynczych zdjęć, co znacznie utrudniało proces analizy dokumentacji. W tym konkretnym przypadku, niejednokrotnie dodanie jeszcze tylko jednej fotografii do planszy spowodowałoby brak odpowiedniej liczby liter w polskim alfabecie do oznaczenia poszczególnych składowych. Zdecydowanie klarowniej byłoby zamieścić opisy poszczególnych plansz na tej samej stronie co obrazy, których one dotyczą. Wskazana też byłaby pewnie selekcja prezentowanych obrazów lub też schemat/diagram podsumowujący najważniejsze z uzyskanych wyników. Tego rodzaju schemat może jednak zostać zaprezentowany podczas obrony pracy doktorskiej. Chciałabym też zwrócić uwagę, że przy omawianiu poszczególnych wyników prac zauważalna jest zmienna liczba prób – analizowanych pędów, co w efekcie potencjalnie odmiennej reakcji u mutantów może mieć istotne znaczenie i z pewnością bywa kłopotliwe przy interpretacji wyników. Zakładając doświadczenie, najlepiej byłoby przeznaczyć do analizy taką samą liczbę roślin (np. $n=20$ czy $n=30$) w tym samym eksperymencie i z każdego analizowanego wariantu. Do najcenniejszych wyników pracy doktorskiej jednak należy zaliczyć przedstawienie dowodów na niezależne funkcjonowanie co najmniej dwóch auksyno-zależnych mechanizmów regulujących proces waskularyzacji pędu kwiatostanowego i tworzenie ciągłych połączeń waskularnych pomiędzy organami bocznymi a pędem. Stwierdzono, że polarny transport auksyn z udziałem białek PIN1 nie jest niezbędny dla waskularyzacji pędu i organogenezy. Auksyna może być bowiem syntetyzowana bezpośrednio w merystemie lub też być transportowana w miejsce przeznaczenia systemem przewodzącym. Transport polarny nie powinien być zatem rozpatrywany jako jedyne i konieczne źródło auksyny dla procesów różnicowania i histogenezy. Detaliczny sposób dowiedzenia powyższych stwierdzeń wymagał jednak wielu czasochłonnych analiz mikroskopowych, z wykorzystaniem wielu różnych linii transgenicznych roślin i zastosowania różnorodnych metod histochemicznych, immunohistochemicznych i enzymatycznych, a także szeregu godzin spędzonych nad interpretacją uzyskanych obrazów, co należy szczególnie docenić przy ocenie wyników badań. Dodatkowo, jak już odnotowano, wybrane wyniki badań, dotyczące wpływu mutacji w genie *PIN1*

na rozwój ontogenetyczny i waskularyzację pędu kwiatostanowego, zostały już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Na nie mniejszą uwagę zasługuje umiejętność *Dyskusji* uzyskanych wyników badań i zestawienia ich z danymi literaturowymi. Nie było to zadanie proste, biorąc pod uwagę mnogość badanych czynników i zastosowany model eksperymentalny, który obejmował liczne doświadczenia z wykorzystaniem szerokiego wachlarza odpowiednio dobranego materiału roślinnego. Nieco ułatwia fakt podziału dyskusji na podrozdziały. Dyskusje w poszczególnych podrozdziałach dowodzą, że pani mgr Magdalena Zyzak posiadała umiejętność właściwej, krytycznej interpretacji otrzymanych wyników badań własnych oraz wyciągnięcia z nich trafnych wniosków. Autorka prawidłowo konfrontuje wyniki badań własnych z dostępnymi danymi literaturowymi. Wszystkie cytowane prace zostały dobrane właściwie i wskazują na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Z niezwykłą łatwością dochodzi Doktorantka do kluczowych, jasno sprecyzowanych wniosków, wskazując czynniki decydujące o możliwości uruchomienia konkretnej ścieżki auksyno-zależnego rozwoju waskularyzacji pędu. Tego rodzaju wnioski i usystematyzowanie wyników znajdują się na końcu dyskusji. Przy tej jednak okazji chciałabym zapytać doktorantkę o stosowanie terminów „rozwój” i „różnicowanie”. Dlaczego w pracy użyto (zaznaczyć należy, że słusznie) sformułowań „rozwój prokambium” i „wyróżnicowanie prokambium”, ale także i „rozwój floemu” i „różnicowanie floemu”. Z przekory recenzenckiej i chęci wzbudzenia polemiki akademickiej zapytam, czy można je stosować zamiennie? Czy w powszechnym rozumieniu różnicowanie nie jest li tylko uzyskaniem ostatecznej tożsamości typu komórki i tylko jednym z etapów rozwoju tkanek roślinnych? Czy też powinna zostać zastosowana inna nomenklatura i definicje?

Lektura recenzowanej tak obszernej pracy doktorskiej nasuwa także pytanie o możliwe dalsze plany badawcze i drogi, które niniejsza praca nakreśla w obrębie dyscypliny. Czy w oparciu o uzyskane wyniki możliwa jest odmienna conceptualizacja i przedstawienie pewnych hipotez do weryfikacji w przyszłości? Proszę o ustosunkowanie się Doktorantki do tej kwestii podczas obrony.

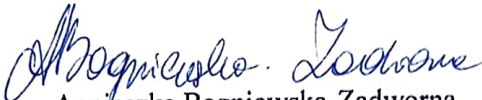
Wniosek końcowy

Podsumowując, wartość merytoryczną rozprawy, znaczenie uzyskanych wyników oraz kompetencje Doktorantki oceniam bardzo wysoko. Praca jest dojrzałym studium i znakomitą wkładem w dziedzinę biologii rozwoju roślin. Przedstawione nieliczne zapytania są podyktowane chęcią pobudzenia dyskusji i poznania opinii Doktorantki, zaś w niczym nie umniejszają wartości prezentowanej dysertacji. Uważam, że jest ona bardzo dobrym opracowaniem naukowym i wnosi nowe, istotne odkrycia, pozwalające lepiej poznać proces i regulację indukcji waskularyzacji w pędzie kwiatostanowym *Arabidopsis thaliana* oraz wskazać jego główne mechanizmy. Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że podjęto badania w ważnej dziedzinie nauki, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia, jako że uzyskana wiedza w zakresie czynników determinujących prawidłową waskularyzację roślin może przyczynić się do potencjalnego jej wykorzystania do poprawy i modulacji wzrostu i rozwoju roślin. Przedstawiona do oceny praca doktorska dowodzi, że Pani mgr Magdalena Zyzak posiadała umiejętność stawiania problemów badawczych, planowania badań i formułowania celu pracy wraz z jego konsekwentną realizacją, jak również także konfrontowania wyników badań własnych z tymi uzyskanymi przez inne zespoły badaczy.

Przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Uwzględniając również przepisy prawne zawarte w art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Zyzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego, celem nadania stopnia doktora w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową, jakość i oryginalność przeprowadzonych badań wnioskuję o uhonorowanie i wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Zyzak stosowną nagrodą.

Poznań, 21.11.2022


Agnieszka Bagniewska-Zadworna