



Prof. dr hab. Dorota Kwiatkowska
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

Katowice, 7.11.2022

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR MAGDALENY JOANNY ZYZAK
ZATYTUŁOWANEJ „REGULACJA RÓŻNICOWANIA SYSTEMU PRZEWODZĄCEGO
W PĘDZIE KWIATOSTANOWYM *ARABIDOPSIS THALIANA*”**

Rozwój postembrionalny roślin jest niezwykle zróżnicowany i często zmienny nawet w przypadku osobników należących do jednego gatunku. Mimo to rozbudowywana wciąż w rosnącym organizmie sieć połączeń waskularnych wydaje się być doskonale dostosowana do powstających nowych organów. Od dawna wiadomo, że w regulacji tego procesu istotną rolę odgrywa auksyna. Wciąż jednak nie znamy odpowiedzi na wiele pytań dotyczących mechanizmu tej regulacji, w tym np. roli polarnego transportu auksyny i uczestniczących w nich białek. Jednocześnie biorąc pod uwagę fundamentalne znaczenie prawidłowo funkcjonującego systemu przewodzącego, można spodziewać się istnienia kilku uzupełniających się bądź zastępujących mechanizmów regulacji jego rozwoju. Rozprawa Pani Mgr Magdaleny Zyzak, dotycząca regulacji różnicowania pierwotnego systemu przewodzącego pędu modelowego gatunku dwuliściennego, *Arabidopsis thaliana*, doskonale wpisuje się w nowoczesny nurt badań tego kluczowego procesu rozwojowego roślin. Pani Mgr Zyzak jest współautorką dwóch publikacji naukowych, które ukazały się w specjalistycznych czasopismach naukowych. Kierowała ponadto grantem ETIUDA finansowanym przez NCN.

Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Mgr Magdaleny Zyzak mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w zakresie dyscypliny nauk biologicznych. Praca została wykonana w Zakładzie Biologii Rozwoju Roślin Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, pod kierunkiem Pani Dr hab. Alicji Banasiak.

Rozprawa została napisana w języku polskim. Ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i obejmuje: *Wstęp*, krótki rozdział *Cel pracy*, *Materiały i Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Wnioski* i *Spis literatury*. Tekst rozprawy jest bardzo długi, liczy bowiem ponad 200 stron. W mojej opinii te same treści mogły być zawarte w znacznie krótszej a przez to łatwiejszej do czytania rozprawie. Omawiając poszczególne części pracy postaram się wskazać fragmenty, które mogłyby być krótsze. W znajdującym się na końcu pracy *Aneksie* zamieszczono oryginalny artykuł naukowy opublikowany w 2019 r. przez koordynowany przez Panią Promotor zespół w *International Journal of Molecular Sciences*, którego drugim autorem jest Doktorantka. Artykuł ten zawiera część wyników prezentowanych w rozprawie. Według opisu udziału autorów w przygotowaniu publikacji zawartego



w artykule, Doktorantka wraz z pozostałymi autorami uczestniczyła w prowadzeniu badań, a samodzielnie opracowała metodykę badań i przeprowadziła analizy mikroskopowe.

Wstęp rozprawy to wprowadzenie do dość szeroko rozumianej tematyki prezentowanych w pracy badań. Mgr Zyzak cytując zarówno starą „klasyczną” jak i najnowszą literaturę, omawia wyczerpująco proces różnicowania pierwotnego systemu przewodzącego i powstawanie jego wzoru przestrzennego oraz biosyntezę auksyny, jej transport i rolę w regulacji powstawania systemu przewodzącego. Szczególną uwagę poświęca polarnemu transportowi auksyny (PAT) u *A. thaliana* oraz efektom zaburzenia PAT, co związane jest bezpośrednio z obiektem prezentowanych badań i przeprowadzonymi doświadczeniami. Mam następujące uwagi krytyczne do tej części pracy: W podrozdziale poświęconym strefowości merystemu apikalnego pędu są nieścisłości. (i) Doktorantka niejednoznacznie używa skrótów L1-3. Nie jest jasne, czy dotyczą one pięter inicjalnych merystemu, czy warstw tuniki. (ii) Wskazanie centrum organizacyjnego (OC) merystemu jako części merystemu słupowego jest wg mnie nieprawidłowe. Faktycznie w niektórych pracach autorstwa biologów molekularnych zastosowano taką klasyfikację, jednak ze względu na ograniczone podziały i wzrost komórek, OC odpowiada raczej proksymalnej części strefy centralnej (centralnym komórkom macierzystym), a nie dystalnej części szybciej rosnącego merystemu słupowego. (iii) Oprócz informacji ważnych dla omawianych w kolejnych rozdziałach wyników badań i ich dyskusji, we *Wstępie* są wiadomości podstawowe (podręcznikowe), np. na temat embriogenezy, czy budowy i funkcji tkanek przewodzących, które można by pominąć i skrócić tekst.

Cel pracy został sformułowany jako cel główny i cele szczegółowe. Celem głównym było poznanie regulacji rozwoju systemu przewodzącego w pędzie kwiatostanowym *A. thaliana* i ustalenie, jaką rolę w tym procesie odgrywają organy boczne inicjowane przez merystem apikalny. Cele szczegółowe to próba odpowiedzi na serię pytań dotyczących roli auksyny i PAT oraz genów *AtHB8* i *MP/ARF5* w regulacji waskularyzacji pędu. Nie postawiono hipotez badawczych.

Rozdział *Materiały i Metody* został opracowany w sposób typowy dla prac doświadczalnych i zawiera większość potrzebnych informacji. Mam jednak kilka drobnych zastrzeżeń: (i) Brakuje paru szczegółów, np. dotyczących przygotowania materiału do krojenia na wibratomie (czy materiał był np. zatopiony w agarze) oraz producenta stosowanych barwników. (ii) Nie jest jasne, czy analizy anatomiczne prowadzono na skrawkach z wibratomu, a jeśli nie, to jak przygotowano skrawki, oraz w jaki sposób przygotowano przekroje do badań reakcji enzymatycznej GUS. (iii) Analizę pasm ksylemu prowadzoną w mikroskopie konfokalnym Doktorantka nazywa wizualizacją trójwymiarowej struktury, podczas gdy na rycinach pokazano wyłącznie rzut prostopadły sygnału fluorescencji jodku propidyny, czyli obraz dwuwymiarowy. (iv) Czytanie byłoby łatwiejsze, jeśli bezpośrednio po omówieniu sposobu przygotowania preparatów znalazłaby się krótka informacja, w jakim mikroskopie były analizowane.

Mgr Zyzak przeprowadziła szereg bardzo ciekawych i dobrze zaplanowanych doświadczeń, które zostały opisane w rozdziale *Wyniki*. Wpływ zahamowania PAT z udziałem białka PIN1, nośnika



wpływu auksyny z komórek, na ontogenezę i waskularyzację pędu kwiatostanowego Doktorantka badała w dwóch układach doświadczalnych: wykorzystując pędy mutantu *pin1* oraz pędy roślin transgenicznych o morfologii typu dzikiego traktowanych NPA, inhibitorem PAT. Te same dwa układy zostały użyte do badań rozwoju pasm pierwotnej tkanki przewodzącej łączących system przewodzący łodygi z zawiązkami powstającymi na merystemie apikalnym. W przypadku pędów roślin *pin1* tworzenie zawiązków było indukowane przez lokalne podanie auksyny na powierzchnię strefy peryferycznej merystemu, natomiast rośliny o morfologii typu dzikiego, w których PAT hamowany był przez NPA, przenoszono na pożywkę bez inhibitora. W traktowanych pędach oraz odpowiednich pędach kontrolnych przeprowadzono szczegółowe analizy rozmieszczenia auksyny i miejsc jej biosyntezy, wzoru przestrzennego ekspresji wybranych genów oraz analizy anatomiczne rozmieszczenia tkanek merystematycznych związanych z tworzeniem systemu przewodzącego i kolejnych stadiów jego rozwoju. Zbadano także poziomy transkrypcji wybranych genów związanych z syntezą auksyny, odpowiedzią na auksynę oraz początkami tworzenia tkanki przewodzącej. Analizy te pozwoliły Mgr Zyzak określić sekwencję zdarzeń związanych z waskularyzacją pędu, takich jak pojawianie się tkanek o morfologii charakterystycznej dla kolejnych stadiów rozwoju systemu przewodzącego, ekspresja genów związanych z różnicowaniem merystemów i tkanek waskularnych oraz pojawianie się auksyny. Ponadto Doktorantka zanalizowała szczegółowo zaburzenia rozwoju systemu przewodzącego na skutek zahamowania PAT. Dało to podstawy to sformułowania przyczynowo skutkowych zależności pomiędzy badanymi czynnikami regulacyjnymi a kolejnymi etapami waskularyzacji pędu. Uważam, że wykorzystanie dwóch układów doświadczalnych (zahamowanie PAT przez mutację *pin1* lub traktowanie NPA) podnosi wartość uzyskanych wyników, ponieważ zahamowanie PAT jest w nich osiąganym w różny sposób. Ponadto takie podejście umożliwia porównanie skutków precyzyjnego zaburzenia PAT z udziałem białka PIN1 w trakcie całej ontogenezy mutantu ze skutkiem mniej specyficznego hamowania aktywności różnych białek PIN przez inhibitor podany w wybranym przez eksperymentatora momencie. Warto podkreślić także wykorzystanie dwóch metod wykrywania auksyny. Oprócz pośredniej metody analizy ekspresji genu reporterowego pod syntetycznym promotorem DR5, metody szeroko wykorzystywanej w badaniach roli auksyny, przeprowadzono bezpośrednie wykrywanie auksyny za pomocą przeciwciał. Obok uzyskanych wyników związanych z tematem rozprawy, zastosowanie dwóch metod pozwoliło na ich porównanie, niewątpliwie cenne ze względów metodycznych. Wyniki badań wpływu zahamowania PAT z udziałem białka PIN1 na ontogenezę i waskularyzację pędu kwiatostanowego z wykorzystaniem mutantu *pin1* (podrozdział 4.1) zostały opublikowane we wspomnianym już artykule w *IJMS*, w przygotowaniu którego udział Doktorantki nie został szczegółowo określony. Niemniej jednak wyniki zaprezentowane w rozprawie są tak bogate, że nawet z pominięciem tego podrozdziału spełniałyby w mojej opinii wymogi stawiane rozprawie doktorskiej.

Mimo dużej wartości uzyskanych wyników, mam uwagi merytoryczne i redakcyjne do tej części rozprawy. (i) Wskazanie dla mutantu *pin1* stadiów IV (pędy kończące wzrost poprzez wykształcenie zdeformowanych organów) oraz stadium V (pędy o tej samej wysokości, których wzrost kończy się obumieraniem merystemu) jest mylące, ponieważ sugeruje ich następstwo w



ontogenezie, podczas gdy są to alternatywne ścieżki rozwoju. Można było np. wprowadzić stadia IVa i IVb. Ponadto nie znalazłam informacji, jak wyznaczano stadia rozwoju pędów roślin bez zahamowanego PAT. (ii) W podpisach pod rycinami brakuje informacji o zastosowanych barwnikach (np. Ryc. 2-4), typie mikroskopu i świetle, w jakim prowadzono obserwacje, czyli informacji potrzebnych do interpretacji mikrofotografii ze względu na stosowanie wiele metod przygotowania preparatów i autofluorescencję. (iii) Mam wątpliwości co do precyzji określenia lokalizacji różnych sygnałów na przekrojach podłużnych wierzchołka pędu. Np. na Ryc. 6R, S sygnał odpowiedzi auksynowej (DR5) wg mnie obejmuje nie tylko piętra inicjalne, jak pisze Doktorantka, ale także komórki potomne. Poza tym brak wyjaśnienia, jak rozpoznawano strefę inicjalną. To samo dotyczy centrum organizacyjnego merystemu (OC), wskazanego np. na Ryc. 30, 35, 36. (iv) Opis morfologii organów tworzonych na wierzchołku pędów roślin *pin1* jest niewystarczający. Dlaczego Doktorantka nie próbowała określić ich tożsamości na podstawie morfologii? Na jakiej podstawie wyróżniano stadia „uwypuklenie w miejscu podania auksyny” oraz „formowanie organu”? W jakim stopniu zróżnicowana była morfologia organów? Odpowiedzi na te pytania mogą mieć związek ze zróżnicowanym rozmieszczeniem analizowanych sygnałów. (v) Potrzebne jest wyjaśnienie pewnych szczegółów związanych z analizą rozmieszczenia badanych sygnałów lub tkanek waskularnych na preparatach. Co np. Doktorantka rozumie przez obrazowanie 3D w przypadku lokalizacji ekspresji J1721::GFP? Czy chodzi o obserwacje szczytowych części pędów *in toto* w mikroskopie konfokalnym i obrazowanie na przekrojach optycznych? Jak sprawdzano ciągłość sygnału na przekrojach podłużnych? Jeśli pasmo przebiega na powierzchni cylindrycznej skośnie lub jest zafalowane, może znaleźć się poza podłużnym przekrojem osiowym pędu. Nie kwestionuję wyników, ale należałoby wspomnieć, jak rozwiązano ten problem. Kolejna informacja, której nie znalazłam, to odległość pokazywanych przekrojów poprzecznych od merystemu apikalnego. (vi) W opisie często pojawia się określenie najbardziej bazalna lub bazalna część pędu. Czy nie chodzi raczej o bazalną część szczytowego fragmentu pędu, który badano? (vii) Porównując poziomy transkryptów genów nie należy pisać, który jest wyższy, jeśli testy statystyczne nie wykazały istotnych różnic. (viii) Rozdział *Wyniki* jest zbyt długi i trudny w czytaniu, przede wszystkim dlatego, że sporo w nim powtórzeń. Na przykład w podpisach pod licznymi (prawie 40) całostronicowymi rycinami zamieszczono praktycznie te same szczegółowe informacje, co w tekście głównym. Ponadto, czy nie byłoby łatwiej omawiać równolegle np. wzorów ekspresji różnych genów reporterowych albo sygnału odpowiedzi na auksynę i immunolokalizacji auksyny i na bieżąco je porównywać?

Dyskusja jest najkrótszym rozdziałem i w mojej opinii najlepiej napisanym. Mgr Zyzak krytycznie analizuje i interpretuje wyniki własnych badań wskazując na zgodność z pracami innych autorów lub wyjaśniając i uzasadniając rozbieżności, powołując się na bogatą literaturę. Sprawnie wykazuje, co nowego wnoszą Jej badania. Cenne jest też porównanie terminów stosowanych w opisie waskularyzacji liścia i pędu. Cały ten rozdział świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Jedyna sugestia, jaką mam do tej części pracy, to przygotowanie uproszczonego graficznego zestawienia rozmieszczenia badanych sygnałów i tkanek w kolejnych stadiach rozwojowych, które ułatwiłoby dyskusję tak bogatych wyników.

Mam też ogólne uwagi, głównie redakcyjne, do rozprawy. Zastrzeżenia budzą niektóre terminy: (i) roślin nie hodowano, ale uprawiano (hoduje się nowe odmiany); (ii) uprawia się w ziemi, nie na ziemi; (iii) akropetalny oznacza w kierunku apikalnym, analogicznie bazypetalny, dlatego określenie „kierunek akropetalny” jest nieprawidłowe; (iv) czy terminu „stok” jakiegoś związku chemicznego nie można by zastąpić terminem „roztwór roboczy”? (v) „uszkodzony PAT” brzmi dziwnie, to raczej zaburzony, czy zahamowany PAT. PAT to proces/zjawisko a nie obiekt; (vi) ontogeneza to rozwój osobniczy, więc lepiej nie używać sformułowania „rozwój ontogenetyczny”. W tekście jest ponadto sporo błędów interpunkcyjnych i nieco mniej pomyłek stylistycznych, czy też niezręcznych sformułowań (np. „egzogenna aplikacja auksyn”).

Moje krytyczne komentarze nie umniejszają oczywiście znaczenia merytorycznego ocenianej rozprawy, którą czytałam z dużym zainteresowaniem. Za szczególnie ważne i cenne wyniki prezentowane w rozprawie Pani Mgr Magdaleny Zyzak uważam:

- Próbę wyjaśnienia, dlaczego PAT z udziałem nośników PIN1 nie jest konieczny do waskularyzacji pędu
- Wskazanie na istnienie dwóch źródeł auksyny biorącej udział w waskularyzacji pędu oraz mechanizmów jej transportu
- Rozpoznanie etapów powstawania systemu przewodzącego, które w różny sposób zależą od obecności i transportu auksyny oraz ekspresji badanych genów
- Uszczegółowienie roli w regulacji rozwoju systemu przewodzącego czynnika transkrypcyjnego AtHB8, którego ekspresja jest często wykorzystywana do identyfikacji inicjalnego wzoru waskularnego

W trakcie czytania nasunęło mi się kilka pytań. Prosiłabym, by w czasie obrony Doktorantka wyraziła Swoją opinię na temat następujących zagadnień:

1. Czy wykorzystana w pracy immunolokalizacja auksyny pozwala odróżnić jej obecność w cytoplazmie i apoplazmie (wydaje się np., że sygnał ze ściany komórkowej widać na Ryc. 6)?
2. Jak można by wytłumaczyć obserwowane różnice w reakcji enzymatycznej GUS pod promotorem genu *AtHB8* prowadzonej na całych szczytowych fragmentach pędu i na przekrojach a jednocześnie brak takich jakościowych różnic w przypadku promotora genu *MONOPTEROS*?
3. Vernoux et al. (2000) wykazali, że w merystemie apikalnym *pin1* obszary ekspresji genów związanych z inicjacją zawiązka i partycją merystemu tworzą wspólną domenę otaczającą strefę centralną. Podobnie analiza wzrostu i geometrii wierzchołka *pin1* (Kwiatkowska 2004) sugeruje unikalną strefowość merystemu mutantu. Jak do tych postulatów mają się wyniki uzyskane przez Doktorantkę?



Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, chciałabym zwrócić uwagę na znaczenie i szeroki zakres badań przeprowadzonych przez Doktorantkę. Obok prowadzonych nowoczesnymi metodami badań mechanizmów rozwoju rozprawa zawiera solidną analizę histologiczną. Jeszcze raz pragnę podkreślić dużą wartość naukową i oryginalność prezentowanych w rozprawie Pani Mgr Zyzak wyników.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim w *ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* i zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani Mgr Magdaleny Joanny Zyzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Dorota Kwiatkowska

