

Warszawa dn. 22.10.2015

dr hab. Wojciech Borucki  
Katedra Botaniki  
Wydział Rolnictwa i Biologii  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Baranowskiego  
pt.: "Wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy w syncytiumach roślin  
porażonych nicieniami".**

**Rozprawa doktorska została zrealizowana na Wydziale Rolnictwa i Biologii w Katedrze Botaniki SGGW pod kierunkiem prof. dr hab. Władysława Golinowskiego oraz dr Mirosława Sobczaka.**

Oceniana rozprawa doktorska zawiera wyniki badań rozwoju syncytium zaindukowanego przez nicienia pasożytniczego, mątwika burakowego na korzeniach rzodkiewnika pospolitego ze szczególnym uwzględnieniem właściwości transportu pęcherzykowego. Komórki roślinne posiadają liczne, obłonione organella, które komunikują się ze sobą za pomocą skomplikowanego systemu transportu pęcherzykowego. System ten podlega modyfikacjom w syncytium, zaindukowanym przez nicienia pasożytniczego, będącym strukturą go odżywiającą. Zatem poznanie właściwości tego systemu na tle zmian cytologicznych zachodzących w syncytium, którego to zadania podjął się doktorant, jest jak najbardziej celowe, ma ogromne znaczenie poznawcze i przyczyni się zapewne do wskazania nowych kierunków badawczych zmierzających do uzyskania przez hodowców odmian roślin odpornych na porażenie nicieniami. Ma ono również istotne znaczenie gospodarcze z uwagi na dotkliwe straty w plonie wielu gatunków roślin uprawnych porażanych przez nicienie.

**Ocena formalna dysertacji**

Recenzowana rozprawa liczy w części pierwszej 98 stron tekstu a w części drugiej będącej dokumentacją fotograficzną 49 tablic wraz ze stosownym opisem, każda złożona z 2-8 mikrofotografii z mikroskopu świetlnego, konfokalnego oraz elektronowego lub zawierających wyniki rozdziału elektroforetycznego.

Pracę charakteryzuje typowy i zarazem prawidłowy układ rozdziałów w następującej kolejności: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz literatura.

**Ocena merytoryczna poszczególnych części dysertacji**

We wstępie Doktorant trafnie uzasadnia konieczność przeprowadzenia badań dotyczących współzależności pomiędzy strukturalnym rozwojem syncytium a zmianami w

transporcie pęcherzykowym na poziomie cytologicznym i molekularnym jako ważnych aspektów interakcji pomiędzy rośliną i nicieniem.

W **przeglądzie literatury** Autor dysertacji w sposób kompetentny opisuje pasożytnicze niecienie glebowe, układ roślina-nicień pasożytniczy w aspekcie systematycznym oraz cykl życiowy nicieni cystowych. Następnie w sposób wyczerpujący, charakteryzujący się dużym znanstwem dokonuje opisu indukcji i rozwoju syncytium, posiłkując się niejednokrotnie odpowiednimi schematami i rysunkami, które sprawiają, że wywód jest klarowny. W kolejnej części przeglądu Autor zajął się charakterystyką wydzielin nicieni i ich rolą w penetracji korzenia a następnie zagnieżdżaniu się w nim nicienia. Doktorant wskazuje też na złożoność interakcji molekularnych prowadzących do rozwoju funkcjonalnego syncytium, w których istotną rolę odgrywają geny roślinne zaindukowane przez pasożytnicze nicienie a także ftohormony. Jednak najwięcej uwagi poświęcił autor dysertacji organizacji i funkcji wewnątrzkomórkowego transportu pęcherzykowego wskazując na jego złożoność i ogromną dynamikę w syncytiach, które są zapewne związane z odżywianiem nicienia pasożytniczego.

Zdaniem recenzenta przegląd literatury już w obecnej formie i treści stanowi trzon bardzo dobrego artykułu przeglądowego.

**Cel pracy** został prawidłowo sformułowany. Doktorant podjął się wyjaśnienia pochodzenia i funkcji licznych pęcherzyków pojawiających się w czasie prawidłowego rozwoju syncytium, struktury odżywiającej nicienia.

Doktorant postawił hipotezę mówiącą o wakuolarnym pochodzeniu pęcherzyków widocznych w syncytium. W celu weryfikacji tej hipotezy zbadał ekspresję genów VAB1, VAB2 i VAB3 kodujących podjednostkę E wakuolarnej ATPazy oraz  $\gamma$ -TIP metodą ilościowego RT-PCR.

Aby powyższy cel zrealizować, doktorant wyznaczył realizację odpowiednich zadań badawczych w tym:

1. analiza cytologiczna rozwoju syncytium,
2. powiązanie rozwoju syncytium z ekspresją genów oraz lokalizacją odpowiednich białek charakterystycznych dla transportu pęcherzykowego
3. zbadanie wpływu inhibitora transportu pęcherzykowego na rozwój syncytium.

**Materiał i metody.** Doktorant dobrał odpowiedni **model i nowoczesne metody badawcze**. Rośliny rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L. Heyn.) ekotypu Columbia porażał larwami inwazyjnymi nicienia mątwika burakowego (*Heterodera schachtii* Schmidt). Opisu cytologicznego i anatomicznego a także lokalizacji białek dokonał z użyciem mikroskopów: świetlnego, fluorescencyjnego, konfokalnego i transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz wykonanych przez siebie preparatów. Zastosował nowoczesne metody badawcze jak: immunolokalizacja białek na poziomie mikroskopu konfokalnego i elektronowego czy reakcję ilościowego RT-PCR.

Skrupulatność przeprowadzenia doświadczeń i biegłość warsztatowa Autora dysertacji nie budzą wątpliwości.

**Wyniki.** Doktorant uzyskał wartościowe wyniki istotnie poszerzające wiedzę o pochodzeniu i funkcji pęcherzyków, których proliferacja ma ogromne znaczenie dla rozwoju i zapewne funkcjonowania syncytium. Na podkreślenie zasługuje fakt iż Autor dysertacji pokazuje zazwyczaj sekwencję zdarzeń związanych ze zmianami cytologicznymi czy lokalizując odpowiednie białka począwszy od nieporażonego korzenia poprzez młode syncytium aż do dojrzałego. Uzyskuje w ten sposób doskonały materiał porównawczy i kontrolę

prawidłowości przeprowadzonych oznaczeń. Zdaniem recenzenta do najwartościowszych wyników uzyskanych przez Doktoranta zaliczyć do nich należy:

1. Udokumentowanie znacznej proliferacji pęcherzyków, które zastępują centralną wakuolę. Pokazał także proliferację cytoplazmy, która sprawia, że syncytium wykazuje silną hiperplazmię a jest to nietypowe dla korzenia.
2. Pokazał, że geny kodujące podjednostki VAB1 i VAB3 V-ATPazy ulegają zwiększonej ekspresji w syncytiach 3-dniowych w porównaniu z korzeniem nieporażonym. W syncytm 3-dniowym zwiększał się poziom ekspresji genu kodującego podjednostkę  $\gamma$  białka Sec21p wchodzącego w skład płaszcza pęcherzyków COPI natomiast poziom ekspresji genu  $\gamma$ -TIP nie wzrastał w syncytiach.
3. Doktorant dokonał immunodetekcji białek: V-ATPazy,  $\gamma$ -TIP oraz białka Sec21p uzyskując komplementarność z danymi dotyczącymi ekspresji odpowiednich genów. Na podkreślenie zasługuje uzyskanie dowodu na występowanie białka V-ATPazy w drobnych pęcherzykach syncytium oraz w tonoplaście komórek nie włączonych do syncytium. Podobna była lokalizacja białka  $\gamma$ -TIP i Sec21p we wnętrzu i błonach pęcherzyków syncytium. Natomiast zastanawia słaby sygnał fluorescencyjny białka Sec21p wobec stosunkowo wysokiego poziomu ekspresji odpowiedniego genu. Doktorant porównał też dane dotyczące lokalizacji białka  $\gamma$ -TIP w syncytm z lokalizacją białka  $\gamma$ -TIP w linii transgenicznej *A. thaliana* – At- $\gamma$ -TIP-YFP uzyskując potwierdzenie uzyskanych wyników.
4. Autor dysertacji wykazał, że po potraktowaniu korzeni inhibitorem transportu pęcherzykowego tj. brefeldyną A system wakuolarny syncytium ulega modyfikacji np. pojawiają się liczne struktury tubularne ER natomiast nie ma zmian w lokalizacji białek  $\gamma$ -TIP.
5. Wykazał zaangażowanie cytoszkieletu aktynowego w pierwszych etapach rozwoju syncytium i jego powiązanie z systemem pęcherzyków, których błony zawierają białko  $\gamma$ -TIP.
6. Za pomocą barwienia czerwienią obojętną wykazał istnienie znacznego przedziału odczynie kwaśnym w syncytm.

**Dyskusja.** W rozdziale „Dyskusja” doktorant dokonał rzeczowej analizy uzyskanych wyników na tle danych literaturowych. Na podkreślenie zasługuje:

1. Udokumentowanie, że nicien wybiera na komórkę inicjalną syncytium komórkę perycyklu lub prokambium co jest dla badanego układu typowe

2. Udokumentowanie sposobu rozrastania się syncytium przez przyłączanie komórek przylegających do naczyń. Tu zdaniem recenzenta rodzi się pytanie: dlaczego nie są to komórki przylegające do elementów sitowych?

3. Postawienie hipotezy o pochodzeniu licznych pęcherzyków charakterystycznych dla syncytium z rozpadu centralnej wakuoli a nie jak dotychczas zakładano przez dylatację cystern endoplazmatycznego retikulum. Weryfikacji postawionej przez siebie hipotezy dokonał Doktorant w oparciu o odpowiednio zaprojektowane doświadczenia wykazując pokrewieństwo pomiędzy lityczną wakuolą a drobnymi pęcherzykami. Wykazał bowiem obecność białka V-ATPazy w tonoplaście komórek poza syncytm oraz w błonach pęcherzyków na terenie syncytium.

4. Udowodnienie istotnego udziału pęcherzyków COPI w transporcie pęcherzykowym we wczesnych etapach rozwoju syncytium

W rozdziale „**Podsumowanie i wnioski**” autor recenzowanej dysertacji zawarł 9 interesujących i uzasadnionych wniosków będących owocem jego pracy. Wnioski te zostały prawidłowo sformułowane z niewielkim zastrzeżeniem. Zdaniem recenzenta wnioski nr 3 oraz 7 są właściwie tożsame, gdyż mówią o udziale pęcherzyków typu COPI w transporcie pęcherzykowym syncytium. Do najważniejszych wniosków należy zaliczyć wskazanie na udział V-ATPazy,  $\gamma$ -TIP oraz Sec21p w rozwoju syncytium oraz na obecność rozległego przedziału litycznego w postaci drobnych pęcherzyków w syncytium.

### **Uwagi i pytania recenzenta**

Czym różnią się ‘drobne wakuole’ i ‘pęcherzyki’? Jak doktorant je rozróżnia?

Strona 13. Raz jest mowa o roślinach „bobowatych” a potem „strączkowych”. Czy są to synonimy?

Strona 15. Autor pisze o larwach nicienia, które „odnajdują w walcu osiowym komórkę inicjalną syncytium”. Czy ta komórka jest już przygotowana przez roślinę?

Strona 17. Doktorant pisze o „wymianie substancji pokarmowych i wody pomiędzy ksylemem i syncytiami”. Rodzi to pytanie o jakie konkretnie substancja tu chodzi?

Strona 62. Doktorant używa zamiennie terminów: ‘naczynie’ i ‘element trachealny’. Jakie jest tego uzasadnienie?

„Ściany syncytium są nieco pogrubione” – o które ściany chodzi, bo te zewnętrzne są bardzo grube.

Strona 73 i 75. Cytowania (Sobczak i Golinowski 2008) i (Golinowski i in. 1997) nie są właściwie użyte, gdyż autor mówi o własnych wynikach. Ponadto zdaniem recenzenta sformułowanie mówiące o tym, że „trzydniowe syncytia składają się z kilkunastu komórek” (str. 73) jest dość niefortunne. Syncytium powstaje bowiem z połączenia się komórek, nie jest zatem strukturą wielokomórkową!

Strona 76. Centralna wakuola „jest zastąpiona licznymi drobnymi pęcherzykami”. Czy chodzi o zastąpienie strukturalne czy funkcjonalne?

Drobne uwagi co do stylu są zawarte w recenzowanym egzemplarzu pracy doktorskiej.

Brak cytowania „Golecki i in. 2002 w spisie literatury. W spisie literatury jest kilka pozycji, które nie zostały zacytowane:

Gendre i in. 2013; Hicke i Dunn 2003; Hurley i Emr (brak daty); Keen 1990; Maeshima 2001; Mitchum i in. 2008.

Należy podkreślić bardzo dobrą jakość techniczną i merytoryczną dokumentacji fotograficznej stanowiącej Część II dysertacji. Doktorant nie ustrzegł się jednak drobnych błędów.

Tab. 1. Powinna mieć tytuł: „Budowa anatomiczna korzenia z syncytium 3 dpi” a nie „Budowa anatomiczna syncytium.....”. Nie można też opisywać elementów trachealnych jako „X”, gdyż doktorant w ten sposób oznaczył ksylem, na który składają się również komórki innych typów.

Oznaczenia struktur stosowanych w opisie tablic są często zbyt duże i utrudniają niekiedy analizę cytologiczną.

Brak skrótu **Ne** oznaczającego nicienia w spisie objaśnień. To samo dotyczy gwiazdki na Tab. 3.

Tab. 7. Wg recenzenta struktura opisana jako mitochondrium (M) jest w rzeczywistości aparatem Golgiego.

Tab. 40. W opinii recenzenta czerwień obojętna akumuluje się w przedziałach o niskim pH czyli kwaśnych a nie jak podano w przedziałach o wysokim pH.

**Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej dysertacji!**

#### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Łukasza Baranowskiego zatytułowana "Wewnątrzkomórkowy transport pęcherzykowy w syncytiach roślin porażonych nicieniami" dotyczy bardzo ambitnego i w pełni zrealizowanego zadania badawczego, posiada ogromne znaczenie poznawcze, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, i tym samym spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), w brzmieniu ustalonym Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie mgr Łukasza Baranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na szczególne walory naukowe uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej dysertacji.

W. Bonchi