

Prof. dr hab. Ewa U. Kurczyńska
Katedra Biologii Komórki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowice

Katowice, 05.09.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Moniki Skawińskiej

**pt.: „Identyfikacja komórek macierzystych w merystemie wierzchołkowym korzenia
i w merystemie brodawek korzeniowych u *Medicago truncatula*”**

Praca doktorska mgr Moniki Skawińskiej została wykonana w Katedrze Botaniki Wydziału Rolnictwa i Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod promotorstwem dr hab. Barbary Łotockiej.

Badania, których wyniki zamieszczono w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej miały na celu sprawdzenie czy metody mikroskopii świetlnej i elektronowej oraz metody molekularne pozwalające na analizę ekspresji genów, umożliwią identyfikację komórek macierzystych w merystemach korzenia i brodawki na przykładzie *M. truncatula*, dobrze przebadanego gatunku modelowego w analizie oddziaływań roślina/brodawki korzeniowe.

Przedstawione przez Doktorantkę badania są logiczną kontynuacją problematyki badawczej, która od wielu lat jest wiodącym tematem realizowanym przez Promotora rozprawy doktorskiej, Panią dr hab. Barbarę Łotocką, członka zespołu Katedry Botaniki SGGW.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Skawińskiej składa się z 2 części. I część, licząca 144 strony wydruku komputerowego, składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, krótkiego wstępu, przeglądu literatury, celu pracy, opisu metodyki, opisu uzyskanych wyników, dyskusji, podsumowania obserwacji i wniosków oraz spisu literatury. W drugiej części zamieszczono dokumentację fotograficzną wyników, która zawiera 122 fotografie. Materiały przekazane do recenzji zawierały również elektroniczną wersję pracy, która składa się z: części I rozprawy, części II (znajdują się tutaj opisy do poszczególnych fotografii) oraz figur, a wszystkie te części są w formacie PDF. Niestety wersja elektroniczna nieco różni się od wersji drukowanej, a mianowicie: nie zawiera numeracji stron, ma zupełnie inną kolorystykę schematów, inny podział tekstu na strony, a fotografie mają inne oznaczenie,

lub braki, w szczególności brak fot. 14. Muszę przyznać, że te różnice bardzo utrudniały poszukiwanie odpowiednich fragmentów tekstu w celu naniesienia szczegółowych uwag.

Praca napisana jest poprawnie, układ jest typowy dla prac eksperymentalnych, a treść pracy odpowiada tytułowi rozprawy.

Przegląd literatury obejmuje 38 stron (wydruku komputerowego) i jest ilustrowany 8 rycinami i dwoma tabelami. Można w nim wyróżnić trzy główne tematy: opis merystemu korzenia, opis merystemu brodawki korzeniowej i charakterystykę genów oraz ich ekspresji w merystemach. Wszystkie części opracowano niezwykle starannie z uwzględnieniem właściwych informacji dotyczących poruszanych w rozprawie doktorskiej problemów badawczych. W opisie budowy korzenia uwzględniono szczegóły budowy merystemu wierzchołkowego korzenia (RAM) oraz jego funkcje, a wszystko to przedstawiono nie tylko w ujęciu współczesnym, ale na tle historycznym, poczynając od prac z drugiej połowy XIX wieku. Szczególną uwagę poświęcono komórkom macierzystym podając ich definicję i historię rozwoju tej koncepcji. Zabrakło mi objaśnienia terminu komórka macierzysta i komórka pnia podanej przez Hejnowicza (2002; strona 358), która moim zdaniem w prosty sposób definiuje komórkę macierzystą (danego typu; w botanicznym znaczeniu) jako zdeterminowaną komórkę merystematyczną, podczas gdy komórka pnia jest komórką niezdeterminowaną. Merystem brodawki korzeniowej obszernie opisano na przykładzie *M. truncatula* z uwzględnieniem roli jaką pełni jej merystem w funkcjonowaniu tej struktury. Ostatnia część przeglądu literatury opisuje geny i ich produkty zaangażowane w utrzymanie tożsamości komórek wchodzących w skład RAM. Ze względu na dostępną literaturę opis ten odnosi się głównie do tego co wiemy na podstawie badań molekularnych RAM *Arabidopsis thaliana*. W szczególności opisano białka WUSCHEL, CLAVATA, PLETHORA1 i PLETHORA2, SCARECROW, SHORTROOT, JACKDAW oraz MAGPIE z uwzględnieniem ich wzajemnych oddziaływań. Opisano również rolę hormonów roślinnych w kontekście ekspresji genów i rozwoju korzenia. Istotnym elementem przeglądu literatury było przedstawienie aktualnej wiedzy na temat molekularnego mechanizmu funkcjonowania merystemu brodawki korzeniowej, który jasno pokazał jak niewielka jest obecnie nasza wiedza na ten temat.

UWAGI

W mojej ocenie podrozdział opisujący rolę hormonów roślinnych w regulacji ekspresji genów i rozwoju korzenia, jest zbędny. Na stronie 25 użyto określenia „narząd umożliwiający.....”- wydaje się, że w odniesieniu do roślin powszechnie przyjęte jest określenie „organ”. Na ryc. 2.5 czy istotnie cały obszar zaznaczony kolorem różowym to komórki inicjalne kolumelli?

Zabrakło informacji o ekspresji genu WUSHEL w RAM, chociażby z pracy Kamiya i inni, 2003.

Cel pracy liczy 1 stronę wydruku komputerowego, gdzie sformułowano zarówno hipotezy robocze jak i metody wykorzystane do ich weryfikacji. Doktorantka jednak zapomniała o merytemie korzenia (drugi akapit).

W rozdziale „Materiał i metody” (liczącym 28 stron wydruku komputerowego, w tym 20 tabel) Doktorantka bardzo szczegółowo opisała wszystkie zastosowane metody. Opisano materiał doświadczalny i jego pozyskiwanie, zarówno w odniesieniu do roślin jak i kultur ryzobiów. Szczegółowo opisano procedury otrzymania preparatów do analizy w mikroskopie świetlnym i elektronowym oraz drobiazgowo przedstawiono wykorzystane w rozprawie metody molekularne. Na wyróżnienie zasługuje opis cyfrowej obróbki fotografii, co z reguły nie ma miejsca w podobnych rozprawach, a przecież ma kolosalne znaczenie dla poprawności interpretacji obrazu.

UWAGI

Poniżej wskazuję na niektóre niefortunne sformułowania:

1/komora laminarna – raczej komora z laminarnym przepływem powietrza,

2/”korzenie rosły wyprostowane zgodnie z siłą grawitacji” – w normalnych warunkach korzenie zawsze rosną zgodnie z kierunkiem wektora grawitacji; pionowe ustawienie szalek miało na celu zminimalizowanie płaszczyzn, które korzenie musiałyby pokonywać, aby realizować swój wzrost zgodny z kierunkiem działania wektora grawitacji,

3/tytuł rozdziału 4.1.3 jest niefortunny,

4/bardzo niestaranne formatowanie tabel,

5/nazewnictwo odczynników nie jest jednolite; powinno być albo wszystko w języku polskim, albo (jeśli musi) w angielskim, ale nie jak w tab. 4.3: „...tlenek propylenu:glycid ether..”,

6/nie wiadomo ile korzeni oraz brodawek korzeniowych analizowano i czy przedstawione zdjęcia są reprezentatywne dla uzyskanych wyników, czy też pochodzą z analizy jednego korzenia,

7/określenie ”bufor RLT rozbija komórki” powinno być zastąpione określeniem „powoduje lizę komórek”,

8/ nie znalazłam informacji ani o wielkości tkanki wziętej do izolacji całkowitego RNA lub informacji o wadze takich próbek; napisano tylko, że materiał zważono,

7/w tym rozdziale rozprawy doktorskiej najczęściej błędnie zapisywano wartości liczbowe z ich literowym oznaczeniem, czyli bez spacji, a zgodnie z przyjętymi regułami „**między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary, czyli skrótem lub skrótowcem, stawiamy spację, natomiast między wartością liczbową a oznaczeniem miary za pomocą symbolu albo połączenia skrótu/skrótowca i symbolu spacji nie stawiamy**. Poprawny zapis to zatem: np. 5 proc., 5 m, 5 s, 20 V, 13 Ω , 7,5 rd, 10,5 rad, 98 Hz oraz 5% (nie: 5 %, choć: 5 proc.), 3‰ (nie: 3 ‰), 10°C (nie: 10 °C ani 10 ° C), 212°F (nie: 212 °F ani 212 ° F), 3' (nie: 3 ´), 35" (nie: 35 ´´), 25^g (nie: 25 ^g) itd.” (materiał źródłowy przesłałam drogą mailową).

Wyniki badań przedstawiono w kolejnym rozdziale obejmującym 30 stron maszynopisu, 122 fotografie (II Część Rozprawy), 2 ryciny i 2 tabele. W pierwszej kolejności, zgodnie z logiką badań, przeanalizowano budowę histologiczną korzenia zarówno o budowie pierwotnej jak i wtórnej, wykorzystując w tym celu szczegółową analizę preparatów na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego, stwierdzając że analizowany materiał ma budowę typową dla roślin okrytonasiennych zielnych co stanowiło właściwy punkt wyjściowy do dalszych analiz. Kolejne badania wykorzystujące mikroskopię świetlną i elektronową miały na celu poznanie przestrzennej organizacji RAM ze szczególnym uwzględnieniem komórek inicjalnych dla poszczególnych tkanek korzenia oraz wskazanie cech, które pozwoliłyby na scharakteryzowanie ultrastrukturalnych markerów komórek inicjalnych RAM. W przypadku korzenia młodej siewki (jak rozumiem, korzenia o budowie pierwotnej) na podstawie analizy ciągów komórek wskazano komórki inicjalne kolumelli, prokambium i prakory, ale stwierdzono, że nie ma spektakularnych różnic w ultrastrukturze pozwalających na identyfikacje komórek inicjalnych. Analiza histologiczna i ultrastrukturalna brodawki korzeniowej ze szczególnym uwzględnieniem jej merystemu została przeprowadzona równie dokładnie i wyczerpująco. Wykazano, że nie można wskazać komórek inicjalnych tkanki bakteroidalnej i tkanek korowych brodawki, natomiast wskazano na komórki merystemu, które mogą być potencjalnie komórkami inicjalnymi wiązek przewodzących. Trzecia grupa wyników dotyczy analizy ekspresji genów z wykorzystaniem metody RT-PCR *in situ* i różnych jej modyfikacji wynikających z problemów metodycznych napotykanym w trakcie tych badań. Analizy molekularne wykazały, że w przypadku genów *MtSCR*, *MtSHR* i *MtWOX5* ich ekspresja występowała zarówno w merystemie korzenia jak i brodawki. Bardziej zróżnicowana ekspresja charakteryzowała geny z grupy *MtPLT*, a zróżnicowanie to dotyczyło lokalizacji (merystem korzenia i brodawki) i intensywności

ekspresji. Badania lokalizacji ekspresji genów metodą RT-PCR in situ z różnymi jej modyfikacjami w przypadku obiektu badawczego wykorzystanego w prezentowanej rozprawie nie dały jednoznacznych, pozytywnych wyników. Niemniej jednak ze względu na szeroki wachlarz modyfikacji tej metody dla *M. truncatula* przybliżyło możliwość uzyskanie w przyszłości pozytywnych rezultatów.

Wszystkie przedstawione wyniki są dobrze udokumentowane. Większość rozdziałów opisujących wyniki jest zakończona krótkim podsumowaniem, co uważam za niezwykle cenne.

Należy zaznaczyć, że podjęte przez Doktorantkę problemy badawcze były pionierskie przede wszystkim ze względu na obiekt badawczy charakteryzujący się merystemem wierzchołkowym otwartym, więc znacznie trudniejszym do analizy w porównaniu do merystemu zamkniętego. Obiekt badawczy wykorzystany przez Doktorantkę również był trudny do analizy, chociażby dlatego, że nie ma tak dużej liczby (jak w przypadku *Arabidopsis*) stosownych linii transgenicznych czy mutantów, które pozwoliłyby uzyskać precyzyjną odpowiedź na stawiane w pracy badawczej pytania. W przypadku analiz molekularnych ich wykonanie ze względu na gatunek wykorzystany w badaniach było również trudne. Te same wyzwania stały przed Doktorantką w badaniach merystemu brodawki. Należy więc docenić wytrwałość w poszukiwaniu odpowiedzi na stawiane w rozprawie pytania.

Mimo trudności, przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na uzyskanie szeregu nowatorskich wyników, a podsumowując przedstawione wyniki, za ważne ustalenia pracy uważam:

- przeprowadzenie szczegółowej analizy merystemów wierzchołkowych korzenia i brodawki korzeniowej *M. truncatula*, co poszerzyło naszą wiedzę o ich strukturze i ultrastrukturze; niewątpliwie wyniki te będą materiałem wyjściowym do dalszych badań nie tylko Pani mgr Skawińskiej, ale po opublikowaniu, także dla innych naukowców,
- wskazanie zmian rozwojowych RAM, w aspekcie położenia komórek inicjalnych w merystemie,
- wskazanie różnic cech ultrastrukturalnych komórek merystemów, które w dalszych badaniach mogą być wykorzystane do identyfikacji komórek inicjalnych,

- wykazanie w analizowanych merystemach ekspresji genów, które u *Arabidopsis* charakteryzują komórki macierzyste.

UWAGI

Główna uwaga dotyczy oznaczeń stosowanych na fotografiach. Mianowicie, w większości przypadków oznaczenia te są prawie niewidoczne na zdjęciach (na przykład fot. 14; grotty strzałek czy gwiazdki są praktycznie niewidoczne; fot. 53 – trzeba dużo samozaparcie, aby znaleźć czarną rozetę). Na fotografiach, gdzie zastosowano kolory do wyróżnienia poszczególnych warstw korzenia należy zastosować bardziej kontrastową kolorystykę, bo na przykład na fot. 14, kolor pomarańczowy jest praktycznie niewidoczny. Proponuję również w opisie nazw barw zastosować uznane nazewnictwo, gdyż na przykład na fot. 12 użyto określenia „kolor różowy”, ale moim zdaniem to amarant. Na fot. 72 brak odcinka skalującego. Na fot. 21-23 – bardzo słabo widoczne odcinki skalujące. Strzałki mają grotty, a nie główki. Na fot. 3 w opisie podano „czerwone kropki” a znajdują się tam czerwone kwadraty.

Te wszystkie uwagi mają na celu ułatwienie wychwycenia niedociągnięć przy przygotowywaniu dokumentacji do publikacji.

Dyskusja liczy 14 stron wydruku komputerowego i jest podzielona na stosowne podrozdziały, w których przedyskutowano takie problemy jak: organizację i ultrastrukturę merystemu korzenia *M. truncatula* oraz brodawki korzeniowej, a także wyniki uzyskane w trakcie badań molekularnych ekspresji genów w obu merystemach. Doktorantka wyczerpująco przedyskutowała uzyskane przez siebie wyniki dotyczące organizacji RAM u *M. truncatula* z literaturą. Pokazała, że dobrze jest obeznana z literaturą zarówno starszą, jak i aktualną i posiada umiejętność obiektywnego porównywania uzyskanych przez siebie wyników z danymi literaturowymi. Na podkreślenie zasługuje wskazanie przez Doktorantkę kierunków dalszych badań wraz z metodami, które w jej mniemaniu powinny dać dodatkowe informacje na temat organizacji RAM u *M. truncatula*. Pani mgr Skawińska wskazuje między innymi na technikę mikrotomografii i muszę przyznać, że jestem ciekawa wyników, gdyż prowadzone przeze mnie badania z wykorzystaniem tej techniki nie dały oczekiwanych rezultatów.

Uzyskane wyniki, dotyczące merystemu brodawki korzeniowej zarówno te odnoszące się do analiz histologiczno-ultrastrukturalnych jak i molekularnych zostały poprawnie przedyskutowane w oparciu o aktualną literaturę.

Badania molekularne dotyczące lokalizacji transkryptów genów przeprowadzone w prezentowanej rozprawie doktorskiej, zostały przedyskutowane z punktu widzenia metodyki i uważam te rozważania za dobrze przeprowadzone i wyczerpujące. Istotne jest również, że doktorantka na podstawie przeanalizowanej literatury potrafi wskazać dalsze modyfikacje metody, które pozwolą uzyskać satysfakcjonujące wyniki.

UWAGI

Jednym z aspektów diskutowanych przez Doktorantkę jest zagadnienie „liza komórek bocznych czapeczki”. Przedstawione wyniki wskazują, i jednocześnie potwierdzają ustalenia pochodzące z badań na innych obiektach, że proces ten, to programowana śmierć komórkowa (PCD). Mianowicie, liza to raczej proces rozpadu obłonionych organelli komórkowych czy plazmolemy, natomiast na prezentowanych elektronogramach (na przykład fot. 48) wyraźnie widać, że struktury błoniaste ciągle są obecne i typowe dla tych obrazów, co wskazuje na PCD zachodzącą w komórkach czapeczki. Uważam, że warto wziąć pod uwagę ten aspekt przy przygotowywaniu wyników do druku.

„Podsumowanie obserwacji i wnioski” to rozdział, w którym moim zdaniem powinno być rozróżnienie na: podsumowanie obserwacji i wnioski, czego jednak nie znalazłam.

Wykaz cytowanej literatury obejmuje 176 pozycji. Muszę przyznać, że wyjątkowo rzetelnie został przygotowany ten rozdział rozprawy, gdyż poza niejednorodnym formatowaniem znalazłam tylko jedną pozycję, która nie była wspomniana w tekście rozprawy i tylko jedną pozycję literaturową, która była w tekście, ale nie znalazła się w spisie literatury.

Dodatkowe uwagi

Błędy stylistyczne, interpunkcyjne i edytorskie zaznaczyłam w wersji elektronicznej dostarczonej rozprawy doktorskiej. Radzę unikać wstawiania myślników w zdaniach złożonych i zastąpić ten sposób używaniem przecinków lub zdań prostych.

W trakcie czytania pracy nasunęło mi się dwa problemy do dyskusji i proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

- jaka jest rola plazmodesm w molekularnym mechanizmie regulacji funkcjonowania RAM oraz w specyfikacji trichoblastów i atrichoblastów
- w dyskusji zwrócono uwagę na kanały wodne; chciałabym prosić o szersze ich omówienie, w kontekście przedstawionych badań; na przykład co wiadomo

o obecności akwaporyn w komórkach merystematycznych, jakie są mechanizmy regulujące funkcjonowanie kanałów wodnych.

Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają znaczenia rozprawy doktorskiej mgr Moniki Skawińskiej. Pragnę podkreślić, że należy je traktować jako podstawę do dyskusji oraz jako wyraz troski o jeszcze lepszą formę opracowania wyników do przyszłych publikacji.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że wysoko oceniam przedstawioną mi do oceny pracę oraz, że spełnia ona warunki wymagane dla rozpraw doktorskich zawarte w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz.U. 2003r. Nr 65, poz.595 z późn. zmi.).

W związku z tym stawiam wniosek do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW o dopuszczenie mgr Moniki Skawińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

K I E R O W N I K
Katedry Biologii Komórki

Prof. dr hab. Ewa U. Kurczyńska

Ewa Kurczyńska
Prof. dr hab. Ewa Kurczyńska