



Katowice, 09.09.2024

Dr hab. Agata Burian, prof. UŚ

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Wydział Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Śląski w Katowicach

e-mail: agata.burian@us.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Barta p.t.: „Funkcjonowanie komórek inicjalnych w merystemach niższych roślin naczyniowych”.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Mateusza Barta została wykonana pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Edyty Goli oraz pod opieką promotora pomocniczego Pani Profesor dr hab. Katarzyny Sokołowskiej w Zakładzie Biologii Rozwoju Roślin Uniwersytetu Wrocławskiego.

Część wyników przedstawionych w rozprawie została opublikowana w *Developmental Biology* (Bartz M, Gola EM. 2018. Meristem development and activity in gametophytes of the model fern, *Ceratopteris richardii*) oraz w *Postęпах Biologii Komórki* (Bartz M. 2020. Modelowa paproć *Ceratopteris richardii* w badaniach nad funkcjonowaniem komórek roślinnych). W obu tych pracach Pan mgr Mateusz Bartz jest pierwszym autorem.

Rozprawa doktorska dotyczy funkcjonowania komórek inicjalnych w merystemach wybranych gatunków widliczek (*Selaginella kraussiana* i *Selaginella moellendorffii*) oraz modelowego gatunku paproci (*Ceratopteris richardii*) w kontekście tworzenia rozgałęzień dychotomicznych oraz rozwoju sporofitu i gametofitu wraz z uwzględnieniem roli auksyny oraz komunikacji symplastowej w tych procesach. Ponadto, opis tworzenia rozgałęzień jest połączony z analizą systemu naczyniowego, co pozwala na kompleksowy opis procesów morfologicznych u tych roślin.

Podjęta tematyka jest niezmiernie ciekawa i znacząca dla biologii roślin, ponieważ komórki inicjalne (odpowiedniki komórek macierzystych u zwierząt) są źródłem wszystkich innych komórek tworzących organy i kluczem do zrozumienia nieograniczonego potencjału rozwojowego u roślin. Ponadto, na uznanie zasługuje wykorzystanie w badaniach gatunków widliczek i paproci, które nie są częstymi przedmiotami badań morfogenezy roślin. Wyjątkowa struktura merystemów i cykl życiowy z wolno żyjącym pokoleniem haploidalnym czynią te rośliny bardzo ciekawym obiektem badawczym, tak odmiennym od powszechnie badanej *Arabidopsis*. Badanie procesów morfologicznych w różnych grupach filogenetycznych jest szczególnie cenne, pozwala bowiem na odróżnienie aspektów specyficznych dla poszczególnych grup od tych uniwersalnych, umożliwiając tworzenie holistycznych teorii tłumaczących procesy życiowe u roślin.

Za najważniejsze **osiągnięcia** tej pracy uważam:

- wykazanie funkcjonowania pojedynczych komórek inicjalnych w merystemach *Selaginella kraussiana* i *Selaginella moellendorffii* oraz analiza ich sekwencji podziałowych;
- opisanie specyfikacji nowych komórek inicjalnych w merystemach *Selaginella kraussiana* podczas rozgałęziania;
- rekonstrukcja sekwencji podziałów komórkowych podczas rozwoju gametofitu *Ceratopteris richardii*, w szczególności podczas tworzenia merystemu brzeżnego oraz specyfikacji komórek inicjalnych;
- wskazanie na rolę izolacji symplastycznej w funkcjonowaniu merystemów i komórek inicjalnych u *Ceratopteris richardii*;
- opis architektury systemu naczyniowego pędów badanych gatunków widliczek i paproci.



Ocena formalna i edytorska rozprawy

Od strony formalnej rozprawa przygotowana jest bardzo starannie, zgodnie z układem typowym dla rozpraw doktorskich. Pracę rozpoczyna Streszczenie w języku polskim i angielskim, a kolejne części to: Wstęp (liczący 26 stron), Cel Naukowy i Hipotezy Badawcze, Materiały i Metody (11 stron), obszernie Wyniki wraz z rycinami (78 stron), Dyskusja (14 stron) oraz końcowe Podsumowanie i Wnioski. Praca zawiera 4 ryciny w rozdziale Wstęp, 41 wielopanelowe ryciny w rozdziale Wyniki oraz 4 tabele. Wszystkie ryciny są bardzo dobrej jakości opatrzone na ogół jasną i szczegółową legendą. Co zasługuje na uznanie, w pracy cytowana jest imponująca ilość publikacji (284 pozycji), z czego prawie wszystkie to publikacje anglojęzyczne, a zdecydowana większość to publikacje oryginalnych badań. W pracy nie znalazłam większych błędów edytorskich.

Chciałabym tu tylko zasugerować wprowadzenie drobnych zmian w rycinach, które ułatwią czytelnikowi odczyt wyników:

- str. 73, Ryc. 4.8 A, B, C, E, F. Sugeruję zaznaczenie zarysu merystemu/liguli we wszystkich zdjęciach, tak jak na zdjęciu D.
- str. 87, Ryc. 4.15; Str. 90, 4.17. Sugeruję wprowadzenie oznaczenia opisywanych struktur (prokambium, protoksylem, metaksylem) na przedstawionych obrazach mikroskopowych.
- str. 118, Ryc. 4.33; Str. 124, Ryc. 4.35. Proszę o dodanie skali.

Szczegółowa ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp jest napisany przystępnym i zrozumiałym językiem. Zagadnienia wprowadzające w tematykę rozwijaną w Wynikach i Dyskusji są omawiane na dużym poziomie ogólności umożliwiając ich zrozumienie bez przytłoczenia czytelnika nadmiarem szczegółowych informacji. Pomimo ogólnego bardzo dobrego odbioru tego rozdziału uważam, że można byłoby wprowadzić większą ilość rysunków, które dopełniłyby opis omawianych tu terminów morfologicznych.

Autor w rozdziale poświęconym widliczkom (str. 19) wspomina, że ich liście (mikrofile) mają odrębne pochodzenie ewolucyjne i rozwojowe w porównaniu do pozostałych roślin waskularnych. Prosiłabym o krótkie wyjaśnienie na czym polegają różnice w rozwoju liści u widliczek i roślin wyższych.

Dalej w rozdziale omawiającym dychotomię pędów, nie jest dla mnie jasna różnica pomiędzy modelami A i C ilustrującymi podziały komórek inicjalnych (str. 29, Ryc. 1.2). Czy schematy te nie pokazują tego samego zjawiska, ale w różnej kolejności chronologicznej: najpierw podział komórki inicjalnej (model A) a następnie tworzenie nowych inicjałów z komórek potomnych (model C)? Chciałabym również zauważyć, że użyte w legendzie sformułowanie "komórka apikalna zanika" jest dość nieprecyzyjne. Możemy mieć tu do czynienia z utratą funkcji komórki inicjalnej, ale sama komórka nie może fizycznie zniknąć.

Cele pracy są ściśle określone i jasno powiązane z wynikami badań przedstawionymi w kolejnych rozdziałach z jednym wyjątkiem. Tematem pracy jest funkcjonowanie komórek inicjalnych, dlaczego zatem celem nr 2 jest opisanie powstawania prokambium i rozwoju systemu waskularnego u *Selaginella* (str. 45)? Same wyniki dotyczące systemu waskularnego uważam za bardzo interesujące, jednak nie rozumiem ich związku z komórkami inicjalnymi.

W **Materiałach i Metodach** autor szczegółowo wyjaśnia pochodzenie materiału roślinnego, warunki uprawy, wykorzystane techniki badawcze oraz metody analizy. Mam tylko jedno zastrzeżenie do nieprecyzyjnego sformułowania „roztwory hormonów lub inhibitora auksyny zostały rozprowadzone w niewielkiej ilości bezwodnej lanoliny i aplikowane w postaci małej kropki” (str. 53). Należy tu podać dokładne ilości, tak żeby było możliwe powtórzenie tego eksperymentu.

W rozdziale **Wyniki** autor opisuje przeprowadzone badania, w pierwszej części dla dwóch gatunków *Selaginella*, a drugiej – dla gametofitu i sporofitu *Ceratopteris richardii*. Kolejność przedstawiania wyników i ich opis jest w na ogół jasny i autor trafnie komentuje obrazy przedstawione w rycinach. Niemniej jednak, czytając ten rozdział zwróciłam uwagę na kilka nieścisłości, do których chciałabym, aby autor się odniósł.

W pierwszych podrozdziałach opisana jest morfologia pędów *Selaginella kraussiana* i *Selaginella moellendorffii*, wzory ich rozgałęziania, struktura merystemu oraz sekwencja podziałów komórek inicjalnych.

Przy omawianiu morfologii pędów (str. 59) wspomniana jest ich grzbietobrzuszną symetrią, jednak nie jest wyjaśnione w czym się ona przejawia. Czy tylko obecnością różnych pod względem wielkości mikrofilii, czy również kształtem przekroju poprzecznego pędu lub steli? Nie jest to oczywiste na Ryc. 4.1 (str. 61) powiązanej z tym fragmentem tekstu.

W opisywanych badaniach oprócz mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej i konfokalnej został wykorzystany również elektronowy mikroskop transmisyjny w celu zbadania ultrastruktury komórek inicjalnych (str. 70-72, Ryc. 4.7). Autor opisuje co prawda szczegółowo strukturę inicjałów z uwzględnieniem obecności plasmodesm w ścianach komórkowych pomiędzy inicjałem i najmłodszym segmentem, ale może warto byłoby dodać informację czy pod jakimiś względami ultrastruktura komórek inicjalnych jest różna od innych komórek w merystemie.

Opisując morfologię pędów, w tym tzw. rozmnózek, w legendzie do Ryc. 4.13A-C oraz 4.14 B-D (str. 83-85) autor pisze o zmianie symetrii szczytowej części pędu. Jednak na obrazach przedstawiających widok z boku na pęd ta zmiana symetrii nie jest widoczna, przynajmniej dla niespecjalisty. W celu lepszej ilustracji symetrii pędów autor mógł przedstawić tutaj poprzeczne przekroje przez pędy.

Dalsza część rozdziału Wyniki dotyczy systemu waskularnego w pędach *Selaginella moellendorffii*. W oparciu o serie przekrojów poprzecznych przez pęd i identyfikację pasm ksylemu autor zrekonstruował architekturę całego systemu waskularnego w rozgałęziającym się pędzie. Po krótkim opisie różnicowania prokambium, autor pisze, że „jako pierwsze różnicują się elementy protoksylemu” (str. 86). Czy rzeczywiście jest to prawda? A jak wygląda różnicowanie protofloemu? U innych roślin, różnicowanie protofloemu poprzedza różnicowanie protoksylemu (K. Esau, Plant Anatomy, 1965).

W tej części pracy zwróciły moją uwagę bardzo dobrej jakości obrazy pokazujące architekturę pasm waskularnych wybarwionych jodkiem propidyny (na przykład str. 92, Ryc. 4.18). U roślin barwnik ten używany jest do wizualizacji ścian komórkowych żywych komórek, jednak w przypadku komórek uszkodzonych jodek propidyny wchodzi do środka komórek i barwi jądra komórkowe. Jestem ciekawa, co dokładnie barwi jodek w przypadku tkanki prześwietlonej po utrwaleniu? Czy jest to barwienie specyficzne dla pasm ksylemu?

Analizując strukturę systemu waskularnego, autor pokazał, że w warunkach kontrolnych wiązka przewodząca mikrofila jest pogrubiona w części szczytowej (str. 99, Ryc. 4.23A). Z czym można powiązać tą obserwację biorąc pod uwagę zmiany w systemie waskularnym po traktowaniu auksyną i NPA?

W kolejnej części Wyników omówiony został cykl życiowy paproci *Ceratopteris richardii* oraz przedstawiono sekwencje podziałów komórek merystematycznych w gametoficie z uwzględnieniem powstania merystemu brzeżnego i wyodrębniania komórek inicjalnych. Następnie analizując rozmieszczenie kalozy pokazano, że tworzenie merystemu brzeżnego jest związane zmianą komunikacji symplastowej. Aby zweryfikować rolę kalozy w tym procesie, monitorowano rozwój gametofitów w obecności inhibitora kalozy DDG w porównaniu do warunków kontrolnych (bez inhibitora).

Zauważyłam, że gametofity kontrolne w 10 i 14 dniu pokazane na Ryc. 4.33A (str. 118) i na Ryc. 4.35A (str. 124) są wyraźnie asymetryczne, natomiast w 16 dniu wyglądają na symetryczne. Czy autor mógłby skomentować co to oznacza? Czy początkowo asymetryczny gametofit rozwija się w symetryczny twór? Czy pozycja merystemu brzeżnego może być zmienna? Ponadto, zauważyłam, że w Tabeli 4.2 (str. 120) nie jest wspomniana symetria gametofitów kontrolnych, przy czym są one widoczne w dniu 16 na Ryc. 4.33A.

W tekście opisującym morfologię gametofitów po traktowaniu inhibitorem syntezy kalozy (str. 117), chciałabym zasugerować podanie dokładnej liczby osobników amerysystematycznych po traktowaniu 0.1 mM DDA zamiast mało precyzyjnego stwierdzenia „u części osobników” i podanie tej liczby w Tabeli 4.2.



Podobna uwaga dotyczy opisu traktowania auksyną i NPA (str. 123). Sformułowania typu „u niektórych osobników” zawsze powinny być opatrzone liczbą. Ponadto, opis w tekście nie zawsze ściśle odpowiada wynikom opisanym w Tabeli 4.3 (str. 126). Na przykład, autor pisze, że po traktowaniu 10 μ M NAA u niektórych osobników merystem tworzył się w części szczytowej dając początek symetrycznym płatom. W Tabeli 4.3 wykazana jest jedynie asymetria płatów.

W rozdziale **Dyskusja** autor umiejętnie komentuje otrzymane wyniki w kontekście innych publikacji wyraźnie podkreślając swoje najważniejsze osiągnięcia. Jednym z nich jest wykazanie funkcjonowania pojedynczej komórki inicjalnej u obu gatunków *Selaginella*. Jednakże, co autor sam wspomina, ilość funkcjonujących inicjałów jest sprawą dyskusyjną. Badania Harrison et al. (2007, Development) sugerują funkcjonowanie 2 komórek inicjalnych. Pogląd ten jest utrzymany również w kolejnej publikacji tych autorów (Harrison i Langdale 2010, Int J Plant Sci) krytykującej wyniki innej publikacji (Jones i Drinnan 2010, Int J Plant Sci), w której podobnie jak w przypadku niniejszej pracy doktorskiej, wykazano funkcjonowanie pojedynczego inicjału. W Dyskusji (str. 139) autor wyjaśnia, że przyczyną rozbieżności może być to, że w pracach Harrison obserwowano 2 inicjały ale w rozgałęziającym się wierzchołku. Chciałabym tu pogłębić nieco tą dyskusję. Prace Harrison są oparte nie tylko na obserwacjach mikroskopowych, ale również na analizie klonalnej, a w szczególności na analizie kształtów zmutowanych sektorów. Czy wyniki tej analizy klonalnej są sprzeczne z wynikami otrzymanymi przez autora lub czy można je również zinterpretować w kontekście pojedynczego inicjału? Proszę o komentarz.

Ponadto, jestem ciekawa czy analizując sekwencje podziałowe w merystemach *Selaginella*, autor może stwierdzić czy komórki inicjalne funkcjonują w sposób ciągły? Praca Harrison et al. 2007 sugeruje, że komórki inicjalne u *Selaginella kraussiana* mogą funkcjonować tylko przez pewien okres czasu będąc następnie zastępowane przez najbliższe komórki potomne.

W dalszej części Dyskusji, autor komentuje bardzo istotny moim zdaniem wynik pokazujący, że dychotomiczne rozgałęzianie u *Selaginella*, gdzie oryginalny inicjał jest odpowiedzialny za wzrost większego rozgałęzienia a nowy inicjał wyodrębniony z komórek potomnych tworzy mniejsze odgałęzienie, jest podobne do rozgałęziania monopodialnego u roślin wyższych. Zatem obserwacja to prawdopodobnie ilustruje stopniową ewolucję sposobu rozgałęziania pędu w kierunku większego oddzielenia w czasie i przestrzeni specyfikacji pędów bocznych od głównej osi wzrostu.

Całą pracę kończy rozdział **Podsumowanie i Wnioski**. Rozdział ten w sposób zwięzły prezentuje najważniejsze osiągnięcia pracy wraz z ich krótką interpretacją.

Podsumowując, badania przedstawione w niniejszej rozprawie stanowią istotny i oryginalny wkład do naszej wiedzy o funkcjonowaniu komórek inicjalnych i merystemów, mechanizmach rozgałęziania pędu oraz dostarczają kompleksowego opisu złożonego cyklu życiowego u niższych roślin waskularnych. Dodatkowo, analiza architektury systemu waskularnego, choć odbiegająca od głównego tematu pracy, przekazuje ważne informacje o rozwoju systemu waskularnego w kontekście wzrostu pędu i tworzenia rozgałęzień. Co istotne, przedstawione badania prowokują do dyskusji i otwierają nowe ścieżki do kolejnych badań.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) w związku z art. 179 Ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) oraz wnioskuje o dopuszczenie Pana mgr Mateusza Barta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Agata Bonian