

Warszawa, 4.09.2024 r.

Prof. dr hab. Anna Mikula
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Bartza
pt. „Funkcjonowanie komórek inicjalnych w merystemach niższych roślin
waskularnych”**

**Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Edyty Goli, prof. UWr oraz promotora
pomocniczego dr hab. Katarzyny Sokołowskiej, prof. UWr w Zakładzie Biologii
Rozwoju Roślin, na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego**

1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 21 kwietnia 2022 r. (nr 68/2022), przesłana w piśmie dr hab. Małgorzaty Janickiej, prof. UWr, Z-cy Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne UWr, z dnia 8 lipca 2024 roku (DWNB.402.1.2018/R), z prośbą o wykonanie recenzji rozprawy i stwierdzenie czy odpowiada ona wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

2. Aspekty formalne

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma formę pracy pisemnej o charakterze monograficznym, przy czym niewielka część przedstawionych w rozprawie wyników została opublikowana w czasopiśmie międzynarodowym (Developmental Biology, 2018). Forma jest zgodna z wykładnią Rady Doskonałości Naukowej w sprawie składania rozpraw doktorskich.

Na 181 stronach rozprawy Autor przedstawił wyniki badań dotyczących poznania uwarunkowań strukturalnych umożliwiających specyfikację komórek inicjalnych, a następnie utrzymanie ich aktywności w merystemach modelowych gatunków widliczek i paproci.

Układ pracy jest typowy dla tego typu dysertacji. Na 28 stronach wstępu Doktorant wprowadził czytelnika w realizowaną problematykę badawczą. Wstęp jest zwarty i nakreśla aktualny stan wiedzy oraz problemy w zakresie poruszanych zagadnień. Następnie przedstawił cel naukowy i hipotezy badawcze. W kolejnej części (12 stron) szczegółowo opisał wykorzystany materiał roślinny i zastosowane metody badawcze. Na dalszych 79 stronach Doktorant przedstawił uzyskane wyniki badań, które zobrazował 4 zestawieniami tabelarycznymi i 41 rycinami, które (poza dwoma schematami) są w większości złożone z kilkunastu fotografii będących wysokiej jakości obrazami mikroskopowymi. Kolejnych 15 stron zajmuje dyskusja podzielona tematycznie zgodnie z omawianymi problemami naukowymi. W osobnym dwustronicowym rozdziale Doktorant przedstawił podsumowanie i wnioski wynikające z uzyskanych wyników. Pracę zamyka zestawienie cytowanej bibliografii

obejmujące w sumie 282 pozycje naukowe (26 stron). Wśród nich 10 prac nie zostało zacytowanych, a dwóch odwołań brakuje w spisie literatury. Opracowanie zostało poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem stosowanych skrótów, rycin i tabel oraz spisem treści.

Należy podkreślić, że praca została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Załączona dokumentacja tabelaryczna jest czytelna, fotografie i rysunki są bardzo dobrej jakości, zostały precyzyjnie wykonane, zestawione i opisane. Rozprawa jest napisana poprawną polszczyzną, ma przemyślany i przejrzysty układ. Jest utrzymana w logicznym porządku, dzięki czemu stanowi spójną całość. Obszerny spis treści umożliwia sprawne poruszanie się w tekście, a wykaz skrótów ułatwia czytanie pracy.

Stwierdzam, iż niniejsza praca doktorska spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187. ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742).

3. Ocena merytoryczna

Celem pracy doktorskiej Pana mgra Mateusza Bartza było zbadanie uwarunkowań strukturalnych dla powstawania i funkcjonowania komórek inicjalnych w merystemach wybranych gatunków widliczek i paproci oraz formowania się prokambium i rozwoju systemu waskularnego. Doktorant wybrał do badań trzy gatunki reprezentujące waskularne rośliny zarodnikowe (widliczki *Selaginella kraussiana* i *S. moellendorffii* oraz paproć *Ceratopteris richardii*), które wykazują szereg cech ancestralnych i progresywnych. Doświadczenia skoncentrował na merystemach sporofitów, które (podobnie jak merystemy roślin nasiennych) wykazują wysoce konserwatywną funkcję podtrzymywania podziałów komórek pozostających w formie niezróżnicowanej, podczas gdy ich komórki potomne różnicują się w różne tkanki i organy. Ponadto wykorzystał gametofity paproci, które (w odróżnieniu od roślin nasiennych) rozwijają merystemy, w tym wierzchołkowe i brzeżne, co zapewnia im niezależny od sporofitu wzrost i rozwój. Podjęte badania dobrze wpisują się w aktualne światowe trendy naukowe zmierzające do poznania i zrozumienia ewolucyjnego pochodzenia, dywersyfikacji cech i funkcjonowania roślin nasiennych. Warto podkreślić, że dotychczasowa wiedza na temat ewolucji roślin lądowych opiera się głównie na porównawczych badaniach rozwojowych między reprezentatywnymi gatunkami modelowymi roślin okrytonasiennych (głównie *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa*) oraz mchem *Physcomitrella patens*. Duża odległość ewolucyjna między tymi dwoma grupami roślin sprawia, że interpretacja porównań jest trudna, a czasami wręcz niemożliwa. Dlatego też za niezwykle cenne uważam podjęcie badań na widliczkach i paprociach, które stanowią doskonały filogenetyczny punkt odniesienia.

We wstępie Doktorant scharakteryzował krótko pochodzenie, morfologię i cykl życiowy widliczek. W przypadku paproci nakreślił ich pochodzenie, a następnie skupił się na przybliżeniu badanego gatunku *Ceratopteris richardii* jako rośliny modelowej. Następnie wyczerpująco opisał strukturę i funkcjonowanie merystemów w sporofitach widliczek i paproci wskazując różnice między nimi a roślinami nasennymi, przedstawił prezentowane przez różnych badaczy koncepcje jedno- i wielokomórkowego merystemu, przybliżył wiedzę nt. rozgałęzień (w tym dichotomii). Dalej opisał strukturę i funkcjonowanie merystemów w gametofitach paproci oraz wpływ anteridiogenu na rozwój gametofitu *C. richardii*. Doktorant przedstawił także informacje dotyczące powstawania i budowy systemu

waskularnego, funkcjonowania plasmodesm oraz roli kalozy w regulacji procesów rozwojowych. Ostatnią część wstępu poświęcił omówieniu auksyny jako czynnika wpływającego na rozwój gametofitów i sporofitów. Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w problematykę podjętych badań. Został on uzupełniony czterema rycinami-schematami, które ułatwiają zrozumienie omawianych kwestii rozwojowych. **Brakuje tu jednak charakterystyki cyklu życiowego paproci *Ceratopteris richardii*, który w przeciwieństwie do widliczek został zamieszczony dopiero w rozdziale Wyniki (str. 101). Proszę o informację z czego wynikała ta decyzja.**

Główny cel badań został jasno sformułowany. Jakkolwiek Doktorant niezbyt precyzyjnie określił w nim obiekt badań pisząc, że badania dotyczą „merystemów niższych roślin”. Poprawnie powinno być niższych roślin waskularnych. **W celach szczegółowych zabrakło wskazania celu badań nad merystemem sporofitu paproci.**

Rozdział dedykowany materiałom i metodom badawczym nie budzi większych zastrzeżeń. **Brakuje w nim jednak danych o liczbie przeanalizowanych obiektów roślinnych. Informacje na ten temat można znaleźć w niektórych rozdziałach Wyników, jednakże tego rodzaju dane są nierozdzielalnym elementem rozdziału „Materiał i metody” każdej eksperymentalnej pracy naukowej, również takiej, która bazuje na analizach mikroskopowych. Proszę zatem o przygotowanie zwięzłego uzupełnienia. W rozdziale tym powinno znaleźć się także wyjaśnienie co oznacza używany w wynikach parametr „n” i jak był liczony. Proszę również o podanie jakie natężenie światła stosowano podczas kultury gametofitów w warunkach sterylnych.**

Wyniki badań przedstawione przez Doktoranta łączą obrazowanie z wykorzystaniem preparatów przyżyciowych i utrwalonych, analizowanych z zastosowaniem mikroskopii świetlnej, transmisyjnej elektronowej i konfokalnej. Dzięki bogatemu materiałowi ilustracyjnemu, na który składa się szereg zestawów fotografii preparatów barwionych, znakowanych, prześwietlanych lub bazujących na autofluorescencji, rozdział dedykowany wynikom czyta się i analizuje z przyjemnością. Autor prowadzi czytelnika przez subtelne morfologiczne i anatomiczne szczegóły budowy pędów, mikrofilii i systemu ryzoforowo-korzeniowego widliczek *Selaginella kraussiana* i *S. moellendorffii*, strukturę ich merystemów oraz ultrastrukturę komórki inicjalnej, a także budowę kłosów zarodnikowych, powstawanie i rozwój rozmnożeń wegetatywnych. W celu opisu systemu regulacji różnicowania się inicjalów w pędzie widliczek rejestruje zmiany w rozmieszczeniu kalozy, zaś w przypadku elementów waskularnych stosuje aplikowaną w dwojaki sposób (oprysk lub kropla lanolinowa) auksynę i inhibitor jej polarnego transportu (NPA). **Do tej części pracy mam kilka uwag. W tabeli 4.1. liczba par mikrofilii I rzędu stanowi 200%. Czy to jest poprawna wartość? Doktorant opisując w wynikach ultrastrukturę komórki inicjalnej (str. 70) zwraca uwagę na obecność licznych osmofilnych struktur błoniastych, o których pisze, że „być może gromadzą związki lipidowe”. Jak można to sprawdzić? Bizonoplasty wskazane na Ryc. 4.11.H (str. 78) są niewidoczne z powodu zbyt małego powiększenia. Czy ich obecność została potwierdzona przez Doktoranta?**

Druga, obszerna część wyników poświęcona jest badaniu komórki inicjalnej i regionu merystematycznego w gametoficie paproci *Ceratopteris richardii*. Analizując sekwencję podziałów komórkowych Doktorant opisał i zobrazował rozwój gametofitu poczynając od

pierwszego podziału komórki zarodnikowej, przez kolejne 5 stadiów rozwojowych, aż po zmiany w gametoficie będące efektem zapłodnienia komórki jajowej i rozwoju sporofitu. Dzięki znakowaniu DNA w fazie S cyklu komórkowego metodą EdU oraz jąder z użyciem barwnika fluorescencyjnego DAPI udokumentował aktywność podziałową komórek i inicjowanie w gametoficie centrum merystematycznego, i dalej powstawanie merystemu brzeżnego. Analizując obecność kalozy i przemieszczanie się barwnika transportu symplastowego (CFDA) wykazał, że ściśle centrum merystematyczne gametofitu pozostaje w izolacji symplastowej od pozostałych komórek. Zaburzenie tej izolacji poprzez zastosowanie inhibitora syntezy kalozy (DDG) zaburza lub hamuje (w zależności od stężenia DDG) tworzenie strefy merystemu i rozwój gametofitu. Doktorant wykazał również, że zaburzenie równowagi hormonalnej (poprzez zastosowanie egzogennej auksyny lub inhibitora polarnego transportu auksyny) hamuje kiełkowanie zarodników i modyfikuje rozwój gametofitów.

Ostatni rozdział wyników dotyczy badań, których obiektem jest sporofit paproci. Tu, podobnie jak w przypadku gametofitu, Doktorant wykazał, że obecność kalozy jest związana z aktywnością komórek inicjalnych pędu i korzenia, ich najmłodszych pochodnych, jak również zawiązków liści. Prześledził i udokumentował wpływ egzogennej auksyny, inhibitora polarnego transportu auksyny (NPA) oraz inhibitora syntezy kalozy (DDG) na rozwój sporofitu. **Proszę o informację nt. barwienia preparatów na Ryc. 4.36.E-G.**

Dyskusja stanowi syntetyczny komentarz do kolejnych partii uzyskanych wyników badań. Doktorant podzielił dyskusję na dwa główne rozdziały, z których pierwszy (5.1.) podsumowuje wyniki związane z funkcjonowaniem merystemów w pokoleniu diploidalnym, zaś drugi (5.2.) w haploidalnym. **Niekonsekwencją jest więc umieszczenie rozważań nad specyfikacją merystemów w sporofitach paproci (5.2.2.1) i widliczek (5.2.2.2.3) w części drugiej dedykowanej pokoleniu haploidalnemu.** Wydaje się, że podrozdział 5.2.2. pt. „Mechanizmy specyfikacji komórek inicjalnych”, wraz z zawartymi w nim podrozdziałami, mógłby stanowić osobny rozdział 5.3. Poza tym uchybieniem dyskusja jest poprowadzona w sposób przemyślany i konsekwentny. Jest wyczerpująca i dobrze osadzona w dostępnej literaturze, z częstymi odwołaniami do wyników badań opublikowanych dla roślin nasiennych.

Doktorant w dziewięciu punktach podsumował kolejne uzyskane wyniki. **Brakuje jednak ogólnego wniosku końcowego. Bardzo proszę o jego przedstawienie.**

Autor nie ustrzegł się od drobnych błędów:

1. Zarodnik jako struktura jednokomórkowa okryty jest ścianą komórkową lub sporoderumą. Używanie określenia łupina zarodnika (str. 35, 119, 125) jest niepoprawne.
2. Na stronie 58 znajduje się odwołanie do Tab. 3.2., której nie ma.
3. Na str. 63, wiersz 7, powinno być „rozgałęzień pędowych”, jest „rozgałęzień pędów pędowych”.
4. Tytuł rozdziału 4.2.3. (Wyniki) sugeruje, że badano rolę kalozy podczas gdy badano zmiany rozmieszczenia kalozy.
5. Str. 99: w opisie Ryc. 4.23.E powinno być 10 μ M (jest 10 μ m).
6. Str. 111: „barwnik symplastowy” - skrót myślowy.
7. Kiełkują zarodniki, a nie gametofity (np. str. 125 trzeci akapit, str. 143 trzeci wiersz).

8. Pomyłki w roku cytowanych w tekście prac: (str. 164) Harrison C.J., Morris J.L., 2018. (powinno być 2017); (str. 176) Stahl Y., Simon R., 2004. (powinno być 2005); (str. 37 i 38) Wardlaw 1925 (powinno być 1926).
9. Brak w spisie literatury: Tomlinson i Moore, 1966 (autorzy cytowani na str. 27); Wardlaw i Cutter, 1948 (str. 43)
10. Pozycje obecne w spisie literatury, ale niecytowane w pracy: 1) Barclay B.D., 1931; 2) Currier H.B., Strugger S., 1956; 3) Imaichi R., Hiratsuka R., 2007; 4) Jacobs W.P., 1988; 5) Jermy A.C., 1986; 6) Otero S., Helariutta Y., Benitez-Alfonso Y., 2016; 7) Sorefan K., ... , Leyser O., 2003; 8) Wardlaw i Cutter, 1956; 9) Zambryski P., 2004; 10) Zambryski P., Crawford K., 2000.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktoranta w przedstawionej dysertacji uważam:

1. Udokumentowanie obecności pojedynczej komórki inicjalnej w merystemie pędu badanych widliczek i funkcjonowania obok niej inicjału nowego pędu. Dzięki tym badaniom Doktorant uporządkował dotychczasową wiedzę obalając spotykaną w literaturze koncepcję o obecności dwóch komórek inicjalnych.
2. Opracowanie podstaw mechanizmu specyfikacji komórek inicjalnych w sporofitach i gametofitach niższych roślin waskularnych bazującego na kalozie jako czynnika regulującym komunikację międzykomórkową oraz na auksynie odpowiadającej za równowagę hormonalną.
3. Wyjaśnienie mechanizmu powstawania rozmnózek wegetatywnych u *Selaginella moellendorffii*. Jest to zagadnienie, które Doktorant opisał jako pierwszy.
4. Opisanie morfologii struktur wegetatywnych i reproduktywnych *Selaginella moellendorffii*.

Na koniec chciałabym prosić Doktoranta o rozwinięcie podczas publicznej obrony następujących zagadnień:

1. Jaka jest budowa i rola bizonoplastów, u jakich roślin występują? Jaka jest różnica w budowie pomiędzy bizonoplastem a typowym chloroplastem?
2. Jaka jest rola merystemu w rozwoju zarodka zygocycznego paproci?
3. Czy istnieją specyficzne cechy anatomiczno-morfologiczne odróżniające sporofit paproci zielnych od drzewiastych?

4. Ocena końcowa rozprawy doktorskiej

Przedstawiona dysertacja mgra Mateusza Bartza zawiera nowe elementy poznawcze, które są dobrą podstawą teoretyczną do prowadzenia dalszych badań nad niższymi roślinami waskularnymi. Praca, dzięki zastosowaniu różnorodnych technik mikroskopowania, barwienia i znakowania materiału roślinnego w połączeniu z eksperymentalnym podejściem, prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Doktorant wykazał się ogólną wiedzą teoretyczną pozwalającą na właściwe omówienie rozwiązywanego problemu, rzetelną interpretację wyników i ich trafne przedyskutowanie. Na szczególne podkreślenie zasługuje doskonała umiejętność Doktoranta przygotowywania profesjonalnych preparatów mikroskopowych.

Kandydat spełnił warunki Ustawy 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 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgra Mateusza Bartza do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Anna Mikula