



INSTITUTE OF PLANT GENETICS POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: +48 616550200 or 616550255 E-mail: rma1@igr.poznan.pl
[www.igr.poznan.pl] VAT: PL 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

Poznań 2023-09-17

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Nikoliny Skowrońskiej pt. Formation of vascular pattern in Arabidopsis leaf primordia

Ocena ogólna

Tematyka prezentowanych badań jest ściśle związana z pracami zespołu dr hab. Agaty Burian, będącej promotorem pracy. Wyniki prezentowanych prac osiągnięto dzięki wsparciu finansowemu uzyskanemu przez promotora w ramach projektu SONATA BIS6 pod tytułem Rola systemu waskularnego w tworzeniu wzorów u roślin..

Praca dotyczy zależności pomiędzy transportem i biosyntezą auksyny a rozwojem pasm prokambialnych, z których powstają żyłki wchodzące w skład liścia. Pracę prowadzono na modelu eksperymentalnym *Arabidopsis thaliana*; dzięki temu wyborowi można było zastosować linie transgeniczne, pozwalające na biosyntezy, transportu oraz odpowiedzi sygnałowej dla auksyny.

Tematyka dotycząca komórkowych i molekularnych aspektów odpowiedzialnych za tworzenie się wzorca układu żyłek liściowych jest przedmiotem intensywnych prac prowadzonych przez wiodące grupy biologów rozwoju roślin na całym świecie. Zasadniczo wiele w tym względzie zostało już zrobione i istnieją już prace eksperymentalne, w których określono zależności pomiędzy syntezą i transportem auksyny w rozwijających się primordiach liściowych a tworzeniem się pasm prokambialnych i różnicowaniem tkanek przewodzących. Ze względu na złożoność regulacji i dynamikę wzrostu blaszki liściowej wiele aspektów nie jest jednak wyjaśnionych. To z kolei skutkuje potrzebą prowadzenia eksperymentów, w których dokonuje się obserwacji dynamicznych i wysokorozdzielczych, w tym z wykorzystaniem metod przyżyciowych, dzięki którym można śledzić zmiany z dużą dokładnością. Niniejsza praca jest właśnie tego typu przedsięwzięciem. Autorka pracy uczestniczyła w optymalizacji metody, która pozwoliła na mechaniczne uszkodzenie wybranych rejonów primordium liścia, lokalną aplikację inhibitora transportu auksyny NPA

lub traktowanie całego primordium auksyną i obserwacje badanych zmian na poziomie komórkowym. Obok tego zastosowano metodę utrwalania materiału i wizualizacji sygnałów powstających na skutek aktywacji elementów promotorowych prowadzącej do transkrypcji genów kodujących białka fluorescencyjne (GFP lub YFP). Wykorzystano dwa rodzaje sensorów auksyny, oba oparte o syntetyczny promotor DR5, przy czym w jednym przypadku sekwencja kodująca białko zielonej fluorescencji zawierała sygnał lokalizacji jądrowej a w drugim sekwencja kodująca białko żółtej fluorescencji zawierała sygnał specyficzny dla retikulum endoplazmatycznego. Obok tego wykorzystano także marker różnicowania ATHB8, markery biosyntezy auksyny pTAA1:TAA-GFP and pYUC4:GFP oraz mutanty transporterów auksyny (*pin1-7*) oraz czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za informacje pozycyjną oraz lokalną restrikcję wzrostu (*cuc2 cuc3*).

Rozprawa ma klasyczny układ a proporcja objętościowa poszczególnych rozdziałów jest właściwa dla tego rodzaju prac. Dysertacja jest napisana poprawnym językiem naukowym, wyniki są przedstawione w przejrzysty i jasny sposób.

W rozdziale pierwszym autorka dysertacji wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy dotyczący komórkowych i molekularnych podstaw regulacji rozwojowej stożka wzrostu pędu, różnicowania się primordiów liściowych oraz zasad rządzących różnicowaniem się wiązek przewodzących w liściach *Arabidopsis*. Szczególnie dużo miejsca, co zrozumiałe, poświęcono roli auksyny, w tym jej biosyntezy i transportu. We wstępie przedstawiono również najważniejsze teorie dotyczące zależności pomiędzy informacją pozycyjną mediowaną przez auksynę a różnicowaniem się pasm prokambialnych i dalszym rozwojem żyłek (w tym teoria kanalizacji transportu auksyny odpowiedzialna za przestrzenny układ wiązek). Wstęp jest napisany w sposób jasny i przejrzysty i zasadniczo obejmuje najważniejsze kwestie związane z badaniami, których wyniki zawarto w niniejszej dysertacji. W moim mniemaniu być może warto by było wprowadzić osobny podrozdział dotyczący aspektów biomechanicznych i dotychczasowego stanu wiedzy dotyczącego tego jak zmiany fizyczne następujące w rosnącym primordium liściowym, zarówno na poziomie poszczególnych warstw komórkowych jak i całego organu, wpływają na transport auksyny, tak zwane „maksyma” auksyny oraz inne aspekty kierunku podziałów komórkowych w pasmach prokambialnych. Obok tego również warto by było zamieścić rozdział dotyczący aktualnie istniejących modeli, w których dokonano próby integracji istniejącej wiedzy dotyczącej zależności pomiędzy transportem i biosyntezą auksyny a powstającym wzorcem

użytkowania (z uwzględnieniem różnic pomiędzy żyłką środkową a żyłkami kolejnych rzędów) [np. Corson i wsp., JTB 2009, Bar-Sinai i wsp., PLOS 2016, Holloway i Wenzel, In Silico Plants, 2021; Burian i wsp., J Exp Bot. 2021]. Oczywiście ze względu na to, że te aspekty tylko częściowo poruszane są w niniejszej dysertacji być może skutkowało by to zbyt daleko idącym przesunięciem balansu objętościowego poszczególnych rozdziałów pracy, zatem jest to jedynie ogólna uwaga, nie mająca wpływu na ocenę pracy.

Cele pracy zostały opisane w rozdziale drugim. Pierwszym celem było stworzenie metody pozwalającej na jednoczesną obserwację zdarzeń komórkowych prowadzących do różnicowania tkanki przewodzącej różnicujących się liści przy jednoczesnej wizualizacji kontekstu fizjologicznego. Autorka wspomina również, że ważne było aby model również pozwalał na precyzyjną manipulację właściwościami mechanicznymi. Drugim celem było, zbadanie wpływu zaburzenia dystrybucji auksyny, oraz przekazu sygnału pomiędzy istniejącymi wiązkami (żyłkami) na różnicowanie prokambium i dalszy rozwój wiązek przewodzących ze szczególnym uwzględnieniem wzorca użytkowania liścia oraz wzrostu blaszki liściowej. Umieszczenie takiego rozdziału w pracy jest dobrym zabiegiem edytorskim, dzięki któremu łatwiej zrozumieć do czego dążył autor pracy, a także zweryfikować poprawność planowania eksperymentów oraz dobór metod i narzędzi badawczych.

Opis materiałów i metod jest poprawny a moje drobne uwagi dotyczące tego rozdziału mają charakter merytoryczny, dlatego zostaną zawarte w części poświęconej temu aspektowi pracy.

Zasadniczo wyniki przedstawiono w sposób jasny i przejrzysty chociaż ta część jest bardzo obszerna. Na uwagę zasługuje wysoka jakość uzyskanych obrazów z mikroskopu konfokalnego oraz dopracowanie techniki obserwacji.

Dyskusja jest napisana z dużym zrozumieniem tematyki i widać, że autorka orientuje się w obecnym stanie wiedzy w tej dziedzinie. Uzyskane wyniki są porównywane z rezultatami podobnych prac w tej tematyce i autorka z dużym wyczuciem tłumaczy różnice pomiędzy jej wynikami a rezultatami opublikowanych prac.

Rozdział poświęcony wnioskowi wynikającemu z opisywanej pracy eksperymentalnej jest niestety zbyt długi a same wnioski są źle sformułowane, przez co bardziej przypominają podsumowanie wyników. Ten aspekt będzie przedmiotem dyskusji w merytorycznej części oceny pracy.

Ogólnie zarówno tematykę pracy jak i sposób jej wykonania i opisanie oceniam pozytywnie.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Ogólna wiedza teoretyczna kandydatki w dziedzinie nauk ścisłych, dyscyplinie nauk biologicznych

Kandydatka wykazuje się bardzo dobrym zrozumieniem podstawowych zagadnień dotyczących biologii rozwoju roślin. Zarówno kwestie dotyczące organizacji komórkowej stożka wzrostu jak i inicjacji primordiów liściowych oraz regulacji różnicowania żyłek w liściach są opisane w sposób bardzo poprawny. Zasadniczo rozwój liścia jest procesem tak złożonym, że wymaga znajomości zarówno kwestii fizjologicznych (w tym związanych regulatorami wzrostu), fizycznych (aspekty związane ze wzrostem komórek, ich podziałami oraz koordynacją tych procesów na poziomie tkanek czy organów), oraz genetycznych (znajomość mechanizmów regulatorowych odpowiedzialnych za ustalanie się wzorców rozwojowych). Zasadniczo sam fakt umiejętnego wykonania opisanych w niniejszej pracy eksperymentów świadczy o wysokim poziomie wiedzy w dziedzinie nauk ścisłych i dyscyplinie nauk biologicznych. Nie mam również zastrzeżeń do dyskusji i interpretacji wyników.

Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

Wyniki zawarte w pracy są efektem licznych i żmudnych obserwacji prowadzonych przez autorkę niniejszej dysertacji. Trudność dotycząca pracy z różnicującymi primordiami liści pojawia się już na wstępnym etapie, w którym należy usunąć już rozwinięte liście tak aby mieć dostęp do primordiów. Również izolacja primordiów liści mających niekiedy rozmiar poniżej 100 mikrometrów wymaga olbrzymiej cierpliwości i umiejętności. Tego typu prac nie można prowadzić jedynie z pozycji obserwującego. Obserwacje dokonywane są na bieżąco w trakcie eksperymentów a optymalizacja metody wynika właśnie z samodzielnej pracy. To, obok bardzo sprawnie przeprowadzonego opisu wyników i dyskusji, jak również dobrego doboru narzędzi pozwala mi twierdzić, że kandydatka posiada wiele umiejętności, dzięki którym będzie mogła w przyszłości samodzielnie prowadzić pracę naukową. Jak na razie jest współautorką jednej pracy eksperymentalnej ale, zwarzywszy na dużą konkurencję w tematyce, opublikowanie wszystkich danych eksperymentalnych może zająć więcej czasu i

być może prace będzie trzeba rozszerzyć o aspekty molekularnej regulacji różnicowania pasm prokambialnych, których nie poruszono w niniejszej dysertacji.

Oczywiście jest kilka aspektów związanych z planowaniem bądź prowadzeniem eksperymentów, o które chciałem spytać:

- a. Dlaczego do eksperymentów nie włączono linii transgenicznych pozwalających na obserwację wzorca ekspresji genu LAX2, którego produkt jest również zaangażowany w zależny od auksyny rozwój wiązek przewodzących?
- b. Autorka często podkreśla wartość wykorzystanego systemu eksperymentalnego, dzięki której możliwe są stosunkowo dynamiczne obserwacje odpowiedzi na auksynę i śledzenie transportu tegoż czynnika. Jak w tym kontekście skomentować należy fakt korzystania z syntetycznego promotora DR5 a nie systemu opartego o D2 lub R2D2? Wiem, że doktorantka sama porusza ten problem i rozumie różnice ale chciałbym wiedzieć dlaczego jednak zdecydowano się na DR5.
- c. Ważną kwestią związaną z regulacją kierunku transportu auksyny przez białka PIN są tkankowe naprężenia mechaniczne. Dlaczego do prac nie włączono linii transgenicznej umożliwiającej wizualizację tubuliny lub innego narzędzia, dzięki któremu można by zwizualizować kierunki naprężeń?
- d. Do jakiego stopnia manualna ablacja komórek przy użyciu igły jest precyzyjna i w jaki sposób można oddzielić przy silnych uszkodzeniach efekty zmian wzorca różnicowania się pasm prokambialnych od zmian związanych z indukcją odpowiedzi rozwojowych/wzrostowych poprzez zranienie (proszę zwrócić uwagę na geny PLT). Czy w tym kontekście nie lepiej stosować bardziej precyzyjnych narzędzi i jakie by to mogły być narzędzia?
- e. Dlaczego rośliny uprawiano przy świetle o intensywności PAR wynoszącej jedynie 60 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$ co jest wartością znacznie poniżej optimum dla badanego gatunku i jakie to może mieć konsekwencje dla tworzących się maksimów auksyny? Do jakiego stopnia światło może wpływać na ustalanie się maksimów?
- f. Również nie do końca rozumiem dlaczego w pracy w niektórych eksperymentach obserwacje prowadzono na dwumiesięcznych roślinach.
- g. Kolejnym pytaniem związanym ze stosowanym układem eksperymentalnym jest to, czy sprawdzano jaki jest ewentualny wpływ kinetyny zawartej w pożywce na dynamikę odpowiedzi auksynowych, a co za tym idzie do jakiego stopnia rosnące na takim

podłożu stożki wzrostu przypominają te, które występują naturalnie w roślinie (zwłaszcza w kwestiach różnicowania primordiów liściowych, transportu auksyny, zależności komórkowych pomiędzy poszczególnymi warstwami stożka wzrostu etc.)?

- h. Na koniec mam jeszcze pytanie techniczne dotyczące doboru stosowanego mikroskopu. Wykorzystano mikroskop odwrócony. Czy to był dobry wybór a jeśli tak to proszę to uzasadnić.

Oryginalność rozwiązania problemu naukowego

Rozważenie tego aspektu jest dość trudne, głównie ze względu na wielość prac prowadzonych w tym kierunku. Na podstawie prac zespołu Enrico Scarpelli, w których uwzględniono transport i biosyntezę auksyny a nawet rolę komunikacji poprzez plazmodesmy w tworzeniu się żyłek liści można by szybko stwierdzić, że sam problem naukowy nie jest nowy. To jednak nie świadczy o tym, że autorka nie podjęła się rozwiązania problemu w sposób oryginalny. Możliwość śledzenia losów komórek pasm prokambialnych połączona ze śledzeniem transportu i syntezy auksyny na pewno dostarczyła nowych obserwacji związanych z procesem powstawania żyłek. Sam proces jest bardzo złożony i nawet zrozumienie różnic w determinacji rozwoju wiązki głównej (ang. midvein) a wiązek dalszego rzędu nie jest rzeczą trywialną. Dzięki dokładnym obserwacjom oraz wykorzystaniu metod ablacji czy też lokalnego zastosowania NPA bądź auksyny w niniejszej pracy wykazano, że epiderma i transport auksyny z tej warstwy nie są kluczowe dla rozwoju głównej wiązki przewodzącej (midvein) w primordium liściowym. Wykazano, że rozwój nerwu głównego jest zależny od jego własnej wewnętrznej koncentracji auksyny, która ustala się dzięki połączeniu z wiązkami które łączą rozwijające się primordium a później liść z pozostałą częścią rośliny. Wykazano, również że synteza czy akumulacja auksyny w epidermie nie wpływa na wzorzec różnicowania żyłek w liściu. W związku z tym, że kwestie dotyczące przepływu auksyny zaobserwowane niezależnie przez autorkę wydają mi się w pewnym stopniu zbieżne z wynikami badań już opublikowanych chciałbym aby autorka dokładnie, w zwięzły sposób, podkreśliła na ile jej obserwacje są w tym względzie nowatorskie. Ta uwaga dotyczy również wniosków, które w moim mniemaniu są napisane w zły sposób i są podsumowaniem wyników a nie wnioskami. Bardzo proszę o przerehabilitację tej części i sformułowanie krótkich i zwięzłych wniosków wynikających z uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w oparciu o istniejący stan wiedzy w tematyce.

Jeśli to możliwe proszę o ustosunkowanie się we wnioskach do celów pracy oraz do istniejących hipotez i teorii zależnego od auksyny różnicowania się żyłek. Pracę oceniam bardzo wysoko, zarówno pod względem formalnym, technicznym jak i merytorycznym. Niestety ten ostatni fragment bardzo profesjonalnie napisanej dysertacji jest niedoskonały, dlatego proszę o ponowne napisanie wniosków i przedstawienie ich w trakcie publicznej obrony.

Podsumowanie oceny

Autorka dysertacji przedstawiła osiągnięcie naukowe, które przybliżyło nasze zrozumienie regulacji rozwoju wiązek przewodzących w liściach u modelu *Arabidopsis thaliana*. Autorka pracy wykazała się również bardzo dobrym zrozumieniem tematyki badawczej a jakość prezentowanych danych świadczy o jej wysokich umiejętnościach, zwłaszcza z zakresu mikroskopii konfokalnej i fluorescencyjnej dla obiektów roślinnych.

Niniejsza rozprawa doktorska spełnia kryteria zawarte w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dziennik ustaw 2023, poz. 742 z późn. zm.). Uwzględniając powyższy fakt oraz pozostałe aspekty, które poruszono w niniejszej recenzji wnoszę o dopuszczenie niniejszej dysertacji do publicznej obrony oraz nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych, dyscyplinie nauk biologicznych Pani mgr Nikolinie Skowrońskiej.

Z poważaniem

dr hab. Robert Malinowski prof. IGR PAN



Kierownik Zakładu Zintegrowanej Biologii Roślin

Instytut Genetyki Roślin PAN