



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD BIOLOGII ROZWOJU ROŚLIN
ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 40 96 | +48 71 375 40 94
fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

Dr hab. Alicja Banasiak, prof. UWr
Zakład Biologii Rozwoju Roślin
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
alicja.banasiak@uwr.edu.pl

Wrocław, 4.12.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Niny Skrzydeł, pt. „Dynamics of composition and structure of *Arabidopsis thaliana* cell walls in sepal epidermis.”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem Prof. dr hab. Doroty Kwiatkowskiej i Dr hab. Romana Wrzaliaka, prof. UŚ. Badania były finansowane z projektu ERA-CAPS finansowanego przez NCN, kierowanego przez promotora pracy, Prof. dr hab. Dorotę Kwiatkowską.

Ściana komórkowa otaczająca komórki roślinne jest złożoną strukturą zbudowaną z wielu polimerów, głównie polisacharydów, ale również związków aromatycznych i glikoprotein, które są ze sobą powiązane tworząc skomplikowaną sieć. Skład ściany i interakcje pomiędzy poszczególnymi polimerami ulegają ciągłym modyfikacjom i przebudowie zapewniając ochronę mechaniczną komórkom, determinując ich wzrost i morfogenezę, jak również wpływając na odpowiedź komórkową na stres biotyczny i abiotyczny. Z tego względu poznanie sposobu w jaki rośliny budują ścianę komórkową i zrozumienie procesów, które w niej zachodzą jest jednym z głównych kierunków badań w biologii roślin. Mimo rozwoju nowych technik badawczych i wielu ważnych odkryć dotyczących interakcji pomiędzy poszczególnymi polimerami, powiązanie ich dynamiki z konkretnymi procesami morfogenetycznymi pozostaje nadal dużym wyzwaniem. Pani Joanna Skrzydeł w ramach pracy doktorskiej podjęła się zbadania, w jaki sposób zmienia się struktura i skład ściany komórkowej podczas wzrostu komórek epidermy działek kielicha, kwiatów *Arabidopsis thaliana*, które są obecnie jedną ze struktur modelowych w badaniach nad ścianą komórkową. W swoich badaniach skoncentrowała się na ustaleniu czy zmiany składu i anizotropii strukturalnej ściany komórkowej, anizotropia wzrostu komórek i rozwój wzoru przestrzennego kutykuli są ze sobą

powiązane, a jeśli tak, to w jaki sposób, co stanowi bardzo **ważne zagadnienie** z punktu widzenia zrozumienia oddziaływań pomiędzy elementami ściany komórkowej, warunkujących morfogenezę komórek roślinnych, a tym samym **dla rozwoju dyscypliny nauki biologiczne**.

Ocena formalna i merytoryczna

Ocenę rozprawy oparłam głównie na kryteriach określonych, zgodnie z obowiązującą ustawą jako wymaganych do spełnienia od osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma formę manuskryptu przygotowanego w języku angielskim, który liczy 151 stron. Zwraca uwagę jego bardzo klarowna i spójna struktura. Wstęp jest konkretny i przemyślany, cel przejrzysty i wyraźnie określony w formie pięciu hipotez, uzyskane wyniki ułożone w formie trzech głównych rozdziałów, a następnie obszernie przedyskutowane, wnioski, albo może raczej podsumowania, są czytelne, odnoszące się bezpośrednio do postawionych hipotez. Jako suplement została załączona również szczegółowa tabela zbierająca wszystkie najważniejsze wyniki, umożliwiającą ich porównanie na różnych poziomach. Cytowana literatura zgodnie ze spisem zawiera 201 pozycji, chociaż można zauważyć kilka rozbieżności pomiędzy cytacjami w tekście pracy, a spisem literatury: cztery prace nie są zacytowane w tekście (Boudaoud et al. 2014, Burda et al. 2024, Caffall & Mohnen 2009, Ochoa-Villarreal et al. 2012), dwóch prac brakuje w spisie (Chylińska 2016 i Gierlinger et al. 2019), dwie prace są podane w spisie dwukrotnie: Mazurek et al. 2013 i Stępiński et al. 2020), a w dwóch jest niezgodność w datach publikacji. Do rozprawy, która została napisana w języku angielskim, załączono streszczenie w języku polskim, spełniając tym samym wymóg ustawowy. Całość pracy jest generalnie dobrze napisana i przemyślana, a jej zwięzły i przejrzysty styl sprawia, że czyta się ją bardzo dobrze.

Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w określonej dyscyplinie

Po zapoznaniu się z całością pracy nie mam wątpliwości, że Doktorantka prezentuje szeroką ogólną wiedzę z zakresu tematyki jej badań i potrafi ją wykorzystać. Przygotowany przez nią wstęp do manuskryptu zawiera zwięzły, przejrzysty opis wszystkich zagadnień ważnych dla zrozumienia pracy, w oparciu o bogatą literaturę, która została odpowiednio dobrana i zacytowana. W jego pierwszej części Doktorantka opisuje strukturę, skład i niektóre aspekty związane z biosyntezą i przebudową pierwotnej ściany komórkowej, zwłaszcza te mające bezpośredni związek ze zmianami właściwości mechanicznych. Później wyjaśnia czym jest spektroskopia Ramana i w jaki sposób jest wykorzystywana w analizach ścian komórkowych, a następnie opisuje działki kielicha *Arabidopsis* jako układu modelowego w badaniach nad morfogenezą. W ostatniej części charakteryzuje kutykulę

jako element zewnętrznej ściany komórek epidermy i opisuje teorie próbujące wyjaśnić powstawanie specyficznych wzorów kutykularnych. Tekst został uzupełniony bardzo pomocnymi ilustracjami. Wszystkie zagadnienia są dobrze opisane w bardzo przystępny sposób, chociaż układ rozdziałów mógłby być nieco inny. Szczególnie mylące było rozdzielenie opisu podstawowego składu ścian komórkowych i ich przebudowy od modyfikacji ściany jaką jest odkładanie kutyny, rozdziałami dotyczącymi spektroskopii Ramana i modelu badawczego. Połączenie tych dwóch rozdziałów mogłoby poprawić odbiór przygotowanego wstępu merytorycznego. Również osobne przedstawienie dwóch rozdziałów, w których były wyszczególnione identyczne podsekcje (celuloza, hemicelulozy, pektyny) wprowadza nieco zamieszania. Gdyby rozdziały te zostały połączone, można byłoby uniknąć pewnych powtórzeń i poczucia, podczas czytania pierwszego rozdziału, że pewne informacje są niepełne. Mam jeszcze kilka dodatkowych uwag. 1) W przypadku jednego z mutantów wykorzystanych w badaniach - pme32 brakuje jakiegokolwiek opisu i odniesienia do literatury. Doktorantka odnosi się natomiast do jednego z innych mutantów metyl-esterazy pektyn - pme35. Dlaczego właśnie do tego mutantu i co wiadomo o mutancie pme32, wybranym przez Nią do analizy? 2) Na str.26 Doktorantka podaje, że w kutykuli czasami występują polisacharydy ściany komórkowej, nie podając odniesienia do literatury. Natomiast dwa zdania wcześniej napisała o polisacharydach ściany jako jednym z głównych składników kutykuli. Proszę o wyjaśnienie tych rozbieżności i informację, co wiadomo na ten temat w przypadku zewnętrznej ściany epidermy działek kielicha *Arabidopsis*, które są w tej pracy obiektem badań. 3) Na str. 29 pojawia się też drobna pomyłka dotycząca skrótu nazwy mutantu, która jest powtarzana w rozprawie (zamiast cdr powinno być dcr).

Te drobne uwagi nie zmieniają oczywiście faktu, że Doktorantka wykazała, iż posiada szeroką wiedzę dotyczącą tematu prezentowanych badań. Jest to dobrze widoczne również w dyskusji, gdzie omawia wyniki swoich badań odnosząc się do bardzo szerokich danych literaturowych i prezentuje dużo bardziej szczegółowe opisy wielu zagadnień, trafnie odnosząc do nich swoje wyniki. Świadectwem wiedzy teoretycznej Doktorantki, ale również opanowania przez nią umiejętności formułowania problemów badawczych jest także przemyślane sformułowanie przez Nią celów pracy i zaproponowanie hipotez badawczych.

Mogę więc stwierdzić, że rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauk biologicznych, spełniając kryterium ustawowe.

Ocena wraz z uzasadnieniem czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora.

Osiągnięcie postawionych celów badawczych wymagało od Doktorantki zaplanowania w sposób przemyślany eksperymentów, ich przeprowadzenia z wykorzystaniem różnorodnych technik

badawczych, a następnie krytycznej oceny uzyskanych wyników i wyciągnięcia adekwatnych wniosków, co zostało przez Doktorantkę w pełni zrealizowane. W swojej pracy zastosowała nowoczesne metody badawcze jakimi są: spektroskopia Ramana, obrazowanie przyżyciowe z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, SEM, TEM i analizy danych z wykorzystaniem specjalistycznego oprogramowania, udowadniając, że opanowała szeroki warsztat badawczy i jest dobrze przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Zastosowane metody zostały z reguły dobrze opisane, ale prosiłabym o ustosunkowanie się do kilku moich drobnych uwag: 1) W metodyce, przy podaniu mutantów uwzględnionych w analizie brakuje odniesienia do literatury i informacji o źródle/sposobie uzyskania nasion. Proszę o uzupełnienie tych informacji, 2) Prosiłabym również o wyjaśnienie, dlaczego rośliny *Arabidopsis* do obrazowania Ramana rosły w warunkach innego natężenia światła niż te do przyżyciowego obrazowania w mikroskopie konfokalnym. Czy mogło to mieć znaczenie dla uzyskanych wyników? 3) W opisie metodyki Doktorantka podaje, że obrazowanie przyżyciowe wykonywano na pąkach w 8-12 stadium rozwojowym, natomiast do analiz Ramana pobierano pąki kwiatowe w 10-12 stadium rozwojowym. Dlaczego te stadia się różniły? 4) Przy opisie mikroskopii konfokalnej podane są dwa mikroskopy, czy dany typ analizy był zawsze wykonany w jednym mikroskopie, tak żeby wyniki były porównywalne? 5) Dlaczego w mikroskopii konfokalnej użyto lasera 488 opisanego w pracy jako optymalnego dla YFP? Czy analizowano linie z tym markerem? W metodyce brakuje takiej informacji.

Cześć eksperymentalna pracy realizowana przez Doktorantkę obejmowała trzy główne grupy eksperymentów. Najpierw analizowano skład i strukturalną anizotropię ścian komórkowych w działkach kielicha roślin typu dzikiego (ekotyp Columbia) i czterech mutantów o potencjalnie zmienionych tych parametrach. Następnie sprawdzano dynamikę zmian wzoru kutykularnego na powierzchni ściany epidermy u roślin WT (Col.) i mutantu - *mad5*, a w ostatnim etapie zmiany we wzorze grzbietów kutykularnych towarzyszące wzrostowi powierzchni komórek. Przeprowadzone analizy dostarczyły wartościowych wyników, które zostały z reguły dobrze zilustrowane i właściwie zinterpretowane, co pokazuje zrozumienie przez Doktorantkę omawianych procesów biologicznych. Kilka moich uwag do tej części rozprawy: 1) W eksperymentach wykorzystano technikę SEM i TEM, a wyniki porównujące rośliny WT i mutantu *mad5* zostały zamieszczone w Fig. 4.17. Dlaczego zdjęcia z TEM, pokazujące warstwowanie ściany, zamieszczono tylko dla roślin WT? Brakowało takiej informacji dla mutantu. Czy coś wiadomo na ten temat na podstawie literatury? 2) W Fig. 4.18 i 4.19 fioletowe obrysy komórek były prawie niewidoczne nawet przy bardzo dużym powiększeniu wersji elektronicznej pracy, 3) W Fig. 4.19, na mapie A, są komórki zaznaczone gwiazdkami, których wzrost nie jest pokazany na mapie B, 4) W przypadku Fig. 4.21 i 4.22 nie ma opisywanych, czerwonych ramion krzyżyków wyznaczających kierunki wzrostu, co utrudnia zrozumienie tekstu i

czytanie map. 5) Dlaczego dla poszczególnych paneli na tych figurach zastosowano bardzo zmienne skale? To utrudnia porównanie intensywności sygnału. 5) Część podpisu do Fig. 4.22 jest podana jako taka sama jak w Fig. 4.21. Jednak oznaczenie komórek „5” jest na tych figurach inne. Na figurze 4.21 są one zaznaczone gwiazdką, co oznacza, że są to komórki przylegające do komórek szparkowych, podczas gdy na Fig. 4.22 nie ma takiego oznaczenia. Czy to są w takim razie inne typy komórek? 6) W rozdziale 4.2.2.1., w analizach formowania grzbietów kutykularnych w komórkach izodiametrycznych uwzględniono tylko 6 komórek WT i aż 18 mutanta *mad5*, podobnie w Fig. 4.2.2.3 – odpowiednio 8 i 3 komórki. Skąd wynikają te różnice i czy mają znaczenie dla wnioskowania?

Podsumowując: dobrze przygotowany wstęp, trafnie sformułowane cele pracy, przejrzysty opis stosowanej metodyki, przeprowadzone eksperymenty, wnioski i dyskusja wyników oraz właściwy dobór cytowań pokazują, że Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając kolejne kryterium ustawowe.

Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Doktorantka zrealizowała cel pracy, którym było połączenie analiz dynamiki zmian lokalnego składu ścian komórkowych, anizotropii strukturalnej ścian, wzrostu anizotropowego komórek i formowania wzoru przestrzennego kutykuli na powierzchni komórek epidermy, aby sprawdzić czy i jak te procesy są ze sobą powiązane i przybliżyć się do zrozumienia ich regulacji. Uzyskane przez nią wyniki poszerzają w sposób znaczący naszą wiedzę zarówno z zakresu funkcjonowania komórki roślinnej jak i biologii rozwoju roślin. Oryginalność rozwiązania przez nią problemu naukowego przejawia się w kilku aspektach: 1) Zbadaniu przy pomocy spektroskopii Ramana składu ścian komórkowych młodszych i starszych komórek epidermy działek kielicha roślin WT i czterech mutantów, a następnie stwierdzeniu na podstawie rozdzielonych dwóch komponentów, że skład ten zmienia się podczas ontogenezy i że zmiany te mają charakter ilościowy a nie jakościowy, 2) Zidentyfikowaniu w ścianach pierwotnych pasm spektroskopii Ramana wrażliwych na polaryzację, które są związane nie tylko z celulozą, ale także z kutyną, 3) Wykazaniu, że u mutantów, obniżony spadek poziomu jednego z głównych typów polisacharydów może być kompensowany przez inne typy tych związków, 4) Zbadaniu procesu formowania wzoru kutykuli na poziomie pojedynczej komórki i wykazaniu związku pomiędzy formowaniem grzbietów kutykularnych a anizotropią wzrostu komórki w skali komórkowej i subkomórkowej, jak również pokazaniu, że procesy te są do siebie równoległe. 5) Ujawnieniu potencjalnego związku pomiędzy zmianami w formowaniu grzbietów kutykularnych, a zmianami stanu mechanicznego ścian komórkowych. 6) Wskazaniu

słabych stron i ograniczeń spektroskopii Ramana w badaniach zewnętrznej ściany epidermy działek kielicha, pokrytej złożonym wzorem kutykularnym, które powinny być brane pod uwagę w tego typu analizach.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani Joanny Skrzydeł stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, co jest zgodne z wymogiem ustawowym.

Zagadnienia do omówienia podczas obrony:

1. Doktorantka napisała w dyskusji, że Komponent 1 i Komponent 2, wyodrębnione z widma ramanowskiego w celu analizy ilościowej, były do siebie podobne pod kątem pasm chemicznych dla polisacharydów ściany. Prosiłabym o dokładniejsze wyjaśnienie, co było podstawą rozdzielenia tych dwóch komponentów i czy ich podobieństwo nie zaburza w istotny sposób wniosków wyciąganych z analiz.
2. W dyskusji, na stronie 115, Doktorantka opisuje ograniczenia spektroskopii Ramana i jako jedno z nich podaje ograniczoną głębokość penetracji. W związku z tym prosiłabym o wyjaśnienie jaki jest jej zakres i czy na tyle głęboki, że można uzyskać widma z całej grubości badanej ściany komórkowej? Jakie może mieć tutaj znaczenie różna grubość ściany epidermy w rejonach grzbietów kutykularnych i pomiędzy nimi?
3. Wnioski zamieszczone w rozprawie są bardzo opisowe i stanowią bardziej podsumowanie wyników. Z tego względu prosiłabym o przedstawienie krótkich, konkretnych wniosków, z zaznaczeniem, które są zupełnie nowe, a które potwierdzają wnioski/hipotezy wcześniejsze.
4. Jestem również ciekawa, które wyniki Doktorantka uważa za najistotniejsze i dlaczego? A także jak widzi perspektywy dalszych badań, w oparciu o uzyskane przez Nią wyniki?

Podsumowanie:

Uważam, że oceniana rozprawa doktorska przedstawia istotne dla nauki wyniki, które przybliżają nas do zrozumienia, w jaki sposób modyfikacje struktury i składu ściany komórkowej zarówno lokalne jak i na poziomie całej komórki, regulują procesy morfogenetyczne u roślin. Przygotowana rozprawa doktorska pokazuje, że Pani Joanna Skrzydeł posiada odpowiednią wiedzę i umiejętności, aby formułować hipotezy badawcze, planować i realizować eksperymenty, wyciągać właściwe wnioski i interpretować je w odniesieniu do aktualnej wiedzy. Jest więc, w mojej opinii, dobrze przygotowana do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Moje pytania i sugestie nie podważają wartości merytorycznej pracy, mają jedynie na celu wyjaśnienie pewnych kwestii i ich przedyskutowanie, co może być pomocne podczas przygotowywania pracy do druku.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668, ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Joanny Niny Skrzydeł do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, reading "A. Banasiak". The signature is written in a cursive, flowing style.

dr hab. Alicja Banasiak, prof. UWr