

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Kornela Mateusza Michalaka
pt. "Charakterystyka mechanizmów różnicowania elementów przewodzących floemu u
roślin"**

Opis ogólny

Rozprawa doktorska Pana mgra **Kornela Mateusza Michalaka** składa się z: Streszczeń w j. polskim i angielskim, Wykazu skrótów, Wykazu opublikowanych i nieopublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wprowadzenia, Omówienia wyników, Wniosków i podsumowania, oraz Bibliografii. Częściami rozprawy są także dwa manuskrypty oraz jeden opublikowany artykuł naukowy. Zamieszczono, także: oświadczenia współautorów artykułu i manuskryptów naukowych.

Według informacji podanych w rozprawie pierwszy manuskrypt pt. "*Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis*" był na etapie recenzji. Drugi manuskrypt pt. "*Exploring specific degradation processes of plant cell components. Vascular tissues reveal that there is more than selective autophagy*" był przygotowywany do submisji do czasopisma. Natomiast artykuł pt. "*Conserved autophagy and diverse cell wall composition: Unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants*" został opublikowany w czasopiśmie *Annals of Botany*. Chciałbym podkreślić merytoryczny i słuszny wybór czasopisma, które Doktorant i współautorzy badań wybrali. *Annals of Botany* jest jednym z najstarszych czasopism botanicznych, prestiżowym i wysoko cenionym przez międzynarodową społeczność naukową. Z niezrozumiałych względów czasopismo to uzyskało tylko 100 punktów na liście ministerstwa. Doceniam, że przy wyborze czasopisma Doktorant i współautorzy wybrali aspekt merytoryczny a nie punktowy.

Zarówno artykuł jak i manuskrypty to prace współautorskie, co jest zrozumiałe ze względu na pracę w zespole naukowym, ogrom włożonej pracy jak i liczne, zastosowane techniki badawcze. W artykule oraz wszystkich wspomnianych manuskryptach Pan Michalak jest pierwszym autorem oraz miał znaczący udział w opracowaniu: koncepcji badań, części metodycznej, wyników oraz pisaniu manuskryptów.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (grant Pani Promotor dr hab. Agnieszki Bagniewskiej-Zadworny prof. UAM) oraz Grantu Doktoranckiego z programu "UNI-

WERSYTET JUTRA” i projektu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”, o które aplikował Doktorant.

Rozprawa liczy 178 stron. Została napisana klarownym, poprawnym językiem polskim (wprowadzenie) oraz angielskim (manuskrypty i artykuł).

Poprawność redakcyjna rozprawy

Układ pracy jest typowy dla obecnie preferowanego typu rozpraw doktorskich opartych na cyklu artykułów.

Nie mam zastrzeżeń co do szaty graficznej.

Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

W części wstępnej rozprawy Doktorant jasno sformułował problem badawczy. Należy podkreślić iż w porównaniu z ksylogenezą nadal mało wiemy o różnicowaniu się elementów floemu. Dodatkowo podejście ewolucyjne, prześledzenie zmian w floemie u przedstawicieli różnych grup roślin, jest jak najbardziej słuszne.

Głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było poszerzenie wiedzy dotyczącej rozwoju floemu oraz zweryfikowanie hipotezy zakładającej, że procesy degradacyjne są zaprogramowane genetycznie podczas różnicowania elementów przewodzących floemu, ale ich działanie jest wysoce selektywne i ulega zatrzymaniu, zapobiegając lizie całego protoplastu. W celu weryfikacji hipotezy Doktorant wykonał cztery zadania badawcze. Pierwszym było opracowanie strategii, umożliwiających identyfikację kluczowych etapów floemogenezy. Stosując topolę kalifornijską jako główny gatunek modelowy Pan Michalak scharakteryzował etapy rozwoju elementów sitowych w korzeniach zarówno na poziomie tkankowym, jak i komórkowym. Etapy te skorelował z obserwacjami ultrastrukturalnymi oraz aktywnością genów. W ten sposób dokonał identyfikacji cytologicznych i molekularnych markerów autofagii w rozwoju elementów sitowych, co stanowiło drugie zadanie badawcze. Zaobserwowano występowanie struktur specyficznych dla wszystkich stadiów makroautofagii. Ponadto stosując immunoznakowanie złotem pokazano białko ATG8 w różnicującym się łyku oraz na poziomie subkomórkowym w błonach autofagosomów występujących w elementach sitowych. Wykazano także występowanie mikroautofagii. Doktorantowi udało się wykazać, że autofagia zachodząca w komórkach podczas floemogenezy jest selektywna. Ponadto otrzymane wyniki przez Doktorata sugerują, że poza autofagią także i inne procesy degradacyjne podczas floemogenezy mogą mieć charakter selektywny. W ten sposób Doktorant wykonał trzecie zadanie badawcze (Analiza procesów degradacyjnych uczestniczących w redukcji zawartości cytoplazmy podczas różnicowania elementów sitowych), do niego należy zaliczyć także manuskrypt drugi dotyczący różnych procesów eliminacji struktur komórkowych. Manuskrypt ten po publikacji, będzie bardzo dobrym kompendium wiedzy o procesach

degradacyjnych zachodzących w komórkach roślinnych. Omówiono i zilustrowano dokładnie mikroautofagię i makroautofagię, ale także formowanie plastolisomów i ciał wielobłonowych, samoistną degradację organelli oraz rozpad małych wakuol litycznych. Do dwóch pierwszych manuskryptów mam uwagę dotyczącą interpretacji obrazów z mikroskopu transmisyjnego wyłącznie na podstawie analizy przekrojów. Wizualizacja 3D pozwoliłaby na dokładniejszą interpretację omawianych struktur. Na przykład, plastydy, które są interpretowane w dysertacji jako plastolisomy mogą być plastydami o zwiększonej aktywności o pofałdowanym kształcie a nie ma pewności, że fragmenty cytoplazmy rzeczywiście znajdują się w ich obrębie. Szczególnie, że podobne plastydy były obserwowane w komórkach nektarników czy haustoriów. Techniki obrazowania 3D ultrastruktury są już dostępne w kilku laboratoriach w Polsce.

Ostatnim zadaniem badawczym, które zrealizował Doktorant, była identyfikacja wzorców ewolucyjnych związanych z autofagią i składem ściany komórkowej, które mogły mieć wpływ na wykształcenie i funkcjonalność tkanek przewodzących u roślin. Zagadnie to zostało zrealizowane dzięki zbadaniu niespokrewnionych gatunków pochodzących z różnych grup taksonomicznych: *Ceratopteris richardii* Brongn., *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière, *Zea mays* L., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i *Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook. Najważniejszym osiągnięciem jest wykazanie, iż konserwatywny charakter autofagii, rosnąca liczba izoform ATG8 oraz adaptacja tkanek roślinnych do transportu substancji wskazują na potencjalny wpływ autofagii na rozwój w toku ewolucji komórek przewodzących o silnie zróżnicowanym składzie cytoplazmy. Ponadto Doktorant wykazał pewien wzór w występowaniu białek AGP i β -1,4-galaktanu w korzeniach wszystkich badanych gatunków. Występowanie tych białek Doktorant wiąże z ich potencjalnym znaczeniem w różnicowaniu i późniejszym funkcjonowaniu floemu. Rzeczywiście występowanie AGP obserwowano podczas PCD. Natomiast te glikoproteidy uczestniczą także w przemodelowaniu ściany komórkowej oraz jako cząsteczki sygnałowe w komórkach roślinnych. Dlatego rola AGP w floemogenezie wymaga dalszych badań. Niezwykle interesująca jest detekcja β -1,4-galaktanu w komórkach floemu przedstawicieli odległych linii ewolucyjnych, dalsze badania pozwolą stwierdzić czy ilość β -1,4-galaktanu rośnie wraz z zwiększaniem rozmiarów organów roślin oraz zwiększaniem turgoru.

Uważam, że Doktorant w pełni rozwiązał oryginalny problem badawczy, jaki przed sobą postawił. Ponadto wykazał się dojrzałością naukową, umiejętnością pracy w zespole oraz potrafił zdobyć środki finansowe na prowadzenie badań. Należy podkreślić, iż zarówno dysertacja Pana Kornela jak i inne prace naukowe zespołu Pani prof. Agnieszki Bagniewskiej-Zadworny stanowią kamień milowy w zrozumieniu różnicowania się floemu u roślin.

Podczas czytania rozprawy nasunęły mi się następujące pytania:

- Czy znana jest rola cytoszkieletu podczas floemogenezy?

- W swojej pracy Doktorant zastosował utrwalanie chemiczne, czy znane są prace w których różnicowanie floemu analizowano przy zastosowaniu utrwalania niską temperaturą?

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja doktorska Pana mgra Kornela Mateusza Michalaka spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoki merytoryczny poziom przedstawionej dysertacji wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o nagrodzenie Pana Kornela Mateusza Michalaka.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Bar R' followed by a long horizontal stroke.