

dr hab. Katarzyna Sokołowska, prof. UWr
e-mail: katarzyna.sokolowska@uwr.edu.pl

Wrocław, 02.12.2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra Kornela Mateusza Michalaka
pt. „Charakterystyka mechanizmów różnicowania elementów przewodzących
floemu u roślin”**

Długodystansowy transport za pośrednictwem tkanek przewodzących drewna i łyka jest kluczowy dla funkcjonowania wszystkich roślin lądowych. Mimo różnic w strukturze pasm ksylemu i floemu pomiędzy poszczególnymi grupami systematycznymi roślin, mechanizmy różnicowania konieczne do wytworzenia obu typów prawidłowo funkcjonujących komórek przewodzących są podobne. W przypadku elementów trachealnych konieczne jest usunięcie protoplastu na drodze programowanej śmierci komórkowej aby umożliwić efektywne przewodnictwo soku ksylemowego w świetle tych elementów. Natomiast komórki przewodzące łyka, wysoce specjalizowane do szybkiego transportu soku floemowego, nadal pozostają żywe mimo ograniczonej zawartości i częściowej degradacji organelli. Zatem ich różnicowanie, prowadzące do osiągnięcia stadium tzw. „połowicznej śmierci komórki”, stanowi przykład jednego z intrygujących, choć wciąż słabo poznanych procesów rozwojowych. Stąd tematyka podjęta w ocenianej rozprawie doktorskiej, która skupia się na charakterystyce mechanizmów różnicowania elementów przewodzących floemu, jest niezwykle ciekawe i ważna dla biologii roślin.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. UAM dr hab. Agnieszki Bagniewskiej-Zadwornej (promotor) oraz Pani dr Natalii Wojciechowskiej (promotor pomocniczy) w Zakładzie Botaniki Ogólnej Instytutu Biologii

Eksperymentalnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Badania prezentowane w recenzowanej dysertacji były finansowane z różnych źródeł: zarówno z Narodowego Centrum Nauki (projekt OPUS kierowany przez Panią promotor, prof. UAM dr hab. Agnieszkę Bagniewską-Zadworną) jak również, co istotne, z grantów uzyskanych przez Pana mgr Kornela Michalaka w ramach programu „Uniwersytet Jutra” oraz projektu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”.

Oceniana rozprawa stanowi zbiór trzech oryginalnych, wieloautorskich i anglojęzycznych prac połączonych tematycznie, które stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Cykl ten obejmuje dwa artykuły eksperymetalne i jeden przeglądowy. Jedna z prac eksperymetalnych została już opublikowana w 2024 r. w *Annals of Botany*, uznanym czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej, natomiast pozostałe dwa artykuły, w momencie złożenia dysertacji, znajdowały się albo na etapie manuskryptu gotowego do wysłania (artykuł przeglądowy), albo pracy będącej w trakcie recenzji (artykuł eksperymetalny). Warto podkreślić, że we wszystkich trzech pracach wchodzących w skład rozprawy Doktorant jest nie tylko pierwszym autorem, ale także jednym z autorów korespondencyjnych, a zatem jego udział w przedstawionych w rozprawie pracach jest wiodący. Oprócz wspomnianego cyklu prac rozprawa doktorska zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów i prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz kilkunastostronicowy dział w języku polskim obejmujący wprowadzenie do prezentowanych w dysertacji zagadnień, omówienie uzyskanych wyników a także wnioski wraz z podsumowaniem. Do rozprawy dołączono oświadczenia dotyczące udziału Doktoranta oraz wszystkich pozostałych autorów publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Od strony formalnej rozprawa została przygotowana bardzo starannie, jest przemyślana i ma przejrzysty układ. Schematy, ryciny i tabele są dobrze opisane, a zastosowane języki: polski i angielski są poprawne. Co istotne, cele pracy zostały ściśle określone i jasno powiązane z wynikami badań. W trakcie lektury, szczególnie prac przygotowanych w formie manuskryptu, znalazłam kilka niedociągnięć od strony edytorskiej, które wymienię w dalszej części recenzji. Mam też kilka drobnych uwag i pytań natury merytorycznej, które, co chciałabym wyraźnie podkreślić, nie umniejszają wartości samej rozprawy, a mają jedynie na celu wyjaśnienie i uzupełnienie pewnych

kwestii, a także dyskusję z Doktorantem nad tym ciekawym i wciąż słabo zgłębnionym obszarem badań.

Ocena merytoryczna

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią cykl, który znacząco poszerza wiedzę na temat rozwoju floemu oraz koncentruje się na weryfikacji głównej hipotezy zakładającej, iż procesy degradacyjne protoplastu zachodzące podczas różnicowania elementów przewodzących floemu są nie tylko zaprogramowane genetycznie, ale także wysoce selektywne i ściśle kontrolowane. W celu pogłębienia wiedzy na temat różnicowania elementów przewodzących floemu Doktorant skupił się w swoich badaniach na wytypowaniu głównych etapów floemogenezy, identyfikacji markerów cytologicznych i molekularnych autofagii, szczegółowej analizie procesów degradacyjnych oraz poszukiwaniu wzorców ewolucyjnych związanych z autofagią i kluczowym dla funkcjonowania floemu składem ściany komórkowej.

Badania były prowadzone na korzeniach różnych gatunków: przede wszystkim na korzeniach pionierskich topoli kalifornijskiej (*Populus trichocarpa* Torr.) rosnącej w systemie ryzotronowym, ale również na korzeniach innych przedstawicieli wybranych grup systematycznych roślin naczyniowych: paproci *Ceratopteris richardii* Brongn., rośliny nagozalążkowej *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière oraz roślin okrytozalążkowych: kukurydzy *Zea mays* L. i rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Uprawa roślin, zbiór materiału, izolacja RNA, jak również przygotowanie odpowiednich preparatów mikroskopowych do dalszych analiz z tak zróżnicowanego materiału roślinnego, za co m.in. był odpowiedzialny Doktorant, z pewnością stanowiły wyzwanie. Pan mgr Kornel Michalak przeprowadzał również analizy anatomiczne i ultrastrukturalne oraz brał udział i/lub wykonywał reakcje immunolokalizacyjne. Jednakże, moim zdaniem, najbardziej istotne pod kątem oceny umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta jest Jego uczestnictwo w opracowaniu koncepcji i planu badań prac eksperymentalnych czy opracowanie koncepcji pracy przeglądowej, a także interpretacja uzyskanych wyników, sporządzenie rycin i przygotowanie manuskryptu. Co ważne, Doktorant wykazał się umiejętnością pozyskiwania środków finansowych na prowadzenie badań. Wymienione powyżej aktywności dobitnie świadczą, że Pan mgr Kornel Michalak opanował umiejętność formowania problemów badawczych, planowania układów eksperymentalnych i wyciągania wniosków z przeprowadzonych

analiz, dowodząc swojej dojrzałości jako naukowca, który będzie mógł samodzielnie zdobywać finansowanie i prowadzić własne projekty badawcze.

Wiedza teoretyczna dotycząca zagadnień poruszanych w ocenianej dysertacji została przedstawiona nie tylko w krótkim wprowadzeniu zamieszczonym na początku rozprawy, ale przede wszystkim zdecydowanie pogłębiona w bardzo dobrej pracy przeglądowej przygotowanej w formie manuskryptu w języku angielskim. Praca przeglądowa szczegółowo opisuje specyficzne procesy degradacyjne różnych organelli komórkowych w trakcie selektywnej autofagii. Doktorant dokonał gruntownej syntezy aktualnej wiedzy dotyczącej odmiennych mechanizmów degradujących poszczególne organella (plastydy, mitochondria, siateczkę śródplazmatyczną, aparat Golgiego czy jądra) podczas autofagii. Praca ta pokazuje, że Doktorant może pochwalić się szeroką wiedzą teoretyczną z zakresu biologii komórki. Jestem pod wrażeniem skrupulatności Pana mgr Kornela Michalaka, szczegółowości zebranych przez Niego informacji, a zarazem umiejętności przekazania ich w sposób przemyślany, logiczny i zrozumiały, także dla niespecjalistów. Wartość pracy zdecydowanie podnosi pięć kolorowych schematów podsumowujących różne szlaki degradacyjne omawianych organelli. Ponadto, na uznanie zasługuje fakt, iż Doktorant w swoich rozważaniach odnosi się do licznych (spis referencji zawiera ponad 200 pozycji) prac prowadzonych nie tylko na komórkach roślinnych ale także i zwierzęcych. Podsumowując, lektura tej pracy przeglądowej była dla mnie przyjemnością. Miałabym tylko sugestię podzielenia tekstu na poszczególne podrozdziały dotyczące procesów przebiegających z udziałem konkretnych organelli – może to poprawić czytelność i odbiór całego artykułu.

W pracach eksperymentalnych ocenianej dysertacji przedstawiono wiele interesujących wyników, w których uzyskaniu Doktorant odgrywał wiodącą rolę. Za szczególnie cenne uważam:

- szczegółową charakterystykę zmian ultrastruktury komórek floemu w kolejnych stadiach autofagii
- przedstawienie etapów selektywnej degradacji przebiegającej na drodze mikroautofagii i makroautofagii, formowania plastolisomów i ciał wielobłonowych, samoistnej degradacji organelli i rozpadu małych wakuoli litycznych
- porównawczą analizę rozmieszczenia białka ATG8 oraz wybranych białek ściany komórkowej u przedstawicieli różnych grup systematycznych roślin naczyniowych.

W pierwszej pracy eksperymentalnej, przygotowanej w formie manuskryptu, poszczególne etapy autofagii zostały bardzo dobrze, logicznie i przejrzysto opisane oraz

wyjaśnione wykorzystując właściwie dobrane oraz czytelne zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Uzyskane wyniki zostały wnikliwie przeanalizowane oraz dogłębnie przedyskutowane w odniesieniu do literatury przedmiotu świadcząc o dojrzałości naukowej Doktoranta. Podczas lektury zwróciłam uwagę na kilka elementów, które, moim zdaniem, warto uzupełnić. Chciałabym podkreślić, że poniższe komentarze nie umniejszają wartości przygotowanej pracy. Mam nadzieję, że okażą się pomocne w ewentualnej korekcie pracy przed jej publikacją.

Opis budowy pierwotnej korzenia pionierskiego *Populus trichocarpa* zamieszczony w części wynikowej jest poprawny, jednakże na dołączonych do ryciny nr 2 zdjęciach z przekrojów poprzecznych przez korzeń brakuje oznaczeń pozwalających precyzyjnie zidentyfikować poszczególne typy komórek. Powinno to zostać uzupełnione albo poprzez dodanie odpowiednich strzałek czy symboli, albo poprzez zaznaczenie na osobnym panelu danych typów komórek różnymi kolorami. Taka zmiana zdecydowanie ułatwi zrozumienie opisywanych zmian w rozwoju korzenia.

Co prawda zdjęcia rurek sitowych z różnych etapów floemogenezy zostały przedstawione na Rycinie nr 2, jednakże poszczególne detale odnoszące się do ultrastruktury omawianych później organelli nie są dobrze widoczne na tych zdjęciach. Może warto dołączyć do materiałów dodatkowych tablice z powiększeniami prezentującymi strukturę wybranych organelli, np. plastydów, mitochondriów czy siateczki śródplazmatycznej obecnych zarówno w fazie inicjalnej rozwoju rurek sitowych jak i w dojrzałych elementach przewodzących floemu?

W moim odczuciu opis prób pobieranych i utrwalanych do analiz jest niewystarczający i powinien zostać uszczegółowiony. Jakie były orientacyjne wymiary pobieranych fragmentów korzeni? W poprzednich pracach zespołu, w których analizowano budowę pierwotną i wtórną korzenia (np. Wojciechowska i in., 2019. *Planta* 250: 1789-1801), podawane były odległości w centymetrach od wierzchołka korzenia, co odpowiadało poszczególnym stadiom rozwojowym. Które fragmenty korzeni były pobierane w badaniach opisanych w rozprawie? Czy brana była pod uwagę odległość od wierzchołka korzenia? W jaki sposób rozróżniano poszczególne stadia rozwojowe floemu podczas zbioru materiału? Jest to istotne nie tylko dla prowadzonych badań ultrastrukturalnych, ale także analiz poziomu ekspresji wytypowanych genów w wytypowanych trzech stadiach rozwojowych. Proszę o doprecyzowanie tej kwestii.

Analiza statystyczna przeprowadzona dla wyników z qRT-PCR została wykonana testem Tukey'a. Czy wszystkie warunki konieczne do przeprowadzenia tego testu

statystycznego zostały spełnione? Mam na myśli przede wszystkim rozkład normalny i jednorodność wariancji?

Pozostałe drobne uwagi: 1) Do materiałów dodatkowych nie dołączono Tabeli S1; 2) Który z autorów przeprowadził reakcję TUNEL? Nie znalazłam tej informacji w oświadczeniach autorów; 3) Warto również ujednoczyć kolejność wykresów w materiałach dodatkowych w stosunku do kolejności genów zaprezentowanych na rycinach głównych; 4) Dlaczego gen *MYB46* odpowiedzialny za regulację syntezy ściany wtórnej został zamieszczony w sekcji odnoszącej się do rozwoju floemu?; 5) Na ilu próbach biologicznych przeprowadzono immunolokalizację białka ATG8?

Druga praca eksperymentalna wchodząca w skład rozprawy została już bardzo dobrze opublikowana w czasopiśmie *Annals of Botany* (Michalak i in., 2024; Ann Bot 133: 559-571). W artykule tym autorzy potwierdzają uniwersalizm procesu autofagii w rozwoju elementów trachealnych drewna i łyka wykorzystując analizy bioinformatyczne oraz metody immunocytochemiczne. Dowiedziono nie tylko kluczowej roli białka ATG8, ale wskazano również na potencjalną rolę arabinogalaktanów oraz β -1,4-galaktanu w rozwoju i funkcjonowaniu floemu. Co ciekawe, chociaż wyniki analizy porównawczej dotyczącej lokalizacji poszczególnych komponentów ściany komórkowej w korzeniach przedstawicieli różnych grup systematycznych nie potwierdziły istnienia ewolucyjnych podstaw formowania i zmienności składu ściany komórkowej, to te chwilami sprzeczne dane są intrygujące, skłaniają do dyskusji i do dalszych badań. Moją szczególną uwagę zwróciła lokalizacja białka ATG8 w komórkach miękiszowych pomiędzy floemem i perycyklem korzeni *Populus trichocarpa*. Czy Doktorant może podzielić się swoimi przypuszczeniami dotyczącymi potencjalnej roli białek ATG8 we wspomnianych komórkach? Zaintrygowała mnie również specyficzna lokalizacja β -1-4-galaktanów w miękiszu drzewnym korzeni *Arabidopsis thaliana* i *Zea mays*? Jaką rolę mogą pełnić β -1-4-galaktany w tym przypadku?

Podsumowanie

Uważam, że badania prowadzone przez Pana mgr Kornela Mateusza Michalaka, przedstawione w cyklu trzech prac tworzących rozprawę doktorską, dostarczyły niewątpliwie nowych dla nauki oraz niezmiernie ważnych i interesujących danych, które przybliżają nas do zrozumienia etapów i mechanizmów floemogenezy w korzeniach roślin naczyniowych. Praca 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 interpretacją wyników i trafnym ich przedyskutowaniem. Co istotne, przedstawione badania prowokują do dyskusji i otwierają nowe ścieżki do kolejnych badań

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Kornela Mateusza Michalaka spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pana mgr Kornela Michalaka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.