

Warszawa, 19.12.2024

dr hab. Mirela Tulik, prof. SGGW
Samodzielny Zakład Botaniki Leśnej
Instytut Nauk Leśnych
SGGW w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
mirela_tulik@sggw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Kornela Mateusza Michalaka

pt. „**Charakterystyka mechanizmów różnicowania elementów przewodzących floemu u roślin**”

wykonanej w Zakładzie Botaniki Ogólnej Instytutu Biologii Eksperymentalnej na Wydziale Biologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Promotor dysertacji: prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna

Promotor pomocniczy: dr Natalia Wojciechowska

Uwagi wstępne

Opinię wykonałam na podstawie pisma Pani prof. UAM dr hab. Beaty Messyasz, Dziekan Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 21 października 2024 r. Pismo informuje o decyzji Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. A. Mickiewicza o powierzeniu mi roli recenzenta rozprawy doktorskiej mgra Kornela Michalaka, pt. „Charakterystyka mechanizmów różnicowania elementów przewodzących floemu u roślin”. Dokumentację otrzymałam 28.10.2024 r.

Oświadczam o braku zależności, która wpłynęłaby na obiektywizm mojej opinii.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Na rozprawę doktorską składa się cykl tematycznie powiązanych prac, z których jedna pt. „*Conserved autophagy and diverse cell wall composition: Unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants*” została opublikowana w *Annals of Botany* – prestiżowym czasopiśmie z bazy JCR (IF 3.6). Doktorant podał, że kolejna praca pt. „*Is autophagy always a death senescence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis?*” jest w trybie recenzji, bez podania nazwy czasopisma, do którego został przesłany manuskrypt. Jednakże, wykonując recenzję

sprawdziłam status pracy. Praca ta została opublikowana w *Annals of Botany* pod cyfrowym identyfikatorem elektronicznym doi: 10.1093/aob/mcae195.

Kolejna praca pt. „*Exploring degradation processes of plants cell components. Vascular tissues reveal there is more than selective autophagy*” została przygotowana do wysłania. Doktorant nie zamieścił informacji o czasopiśmie, do którego planuje wysłać manuskrypt.

Praca doktorska w swojej strukturze obejmuje: streszczenie, abstrakt wraz z wykazem skrótów, wykaz prac składających się na dysertację, wprowadzenie, omówienie wyników, wnioski i podsumowanie, bibliografię, maszynopisy prac oraz kserokopię opublikowanego artykułu wraz z oświadczeniami współautorów.

Badania w ramach pracy doktorskiej sfinansowane były w ramach:

- a. projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2020/39/B/NZ/00018 pt. „Znaczenie autofagii selektywnej i autolizy w procesie floemogenezy: Identyfikacja i charakterystyka jej kluczowych etapów”, w którym rolę kierownika pełniła prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna – promotor dysertacji,
- b. grantu doktoranckiego z programu „Uniwersytet Jutra POWR 03.05.00-00-00-Z3-3/17”, w którym Doktorant pełnił rolę kierownika,
- c. projektu: Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” wsparcie publikowania w prestiżowych czasopismach naukowych 121/08/POB2/0004, gdzie Doktorant pełnił rolę kierownika.

Przedstawione informacje są podstawą do wystawienia opinii i końcowej oceny rozprawy doktorskiej w aspekcie kryteriów ustawowych w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Celowość podjętej problematyki badawczej

Kluczowym elementem ontogenezy roślin jest rozwój tkanek waskularnych: floemu i ksylemu. Tkanki te zbudowane są z wysoce wyspecjalizowanych komórek przystosowanych do transportu na duże odległości. Elementy sitowe floemu charakteryzują się grubą ścianą komórkową i niską gęstością cytoplazmy, których różnicowanie jest realizowane na drodze selektywnej autofagii połączonej z enukleacją. Zachowana zostaje błona plazmatyczna i niektóre organelle komórkowe. Natomiast różnicowanie elementów trachealnych ksylemu obejmuje całkowitą autolizę protoplastu, której towarzyszą modyfikacje budowy ściany komórkowej związane m.in. z jej drewnieniem. Autofagia selektywna przejawia symptomy śmierci zaprogramowanej, jednak jest procesem występującym nie na końcu, a na początku życia elementu sitowego. Oznacza to, że elementy trachealne, przewodząc wodę, są martwe, natomiast elementy sitowe, przewodząc głównie cukry, są żywe i zachowują część zubożonej m.in. pod względem obecności organeli komórkowych cytoplazmy. Chociaż proces

genetycznie zaprogramowanej śmierci komórek różnicujących się w elementy trachealne, oparty na megaautofagii, jest dobrze zbadany i opisany w literaturze, to selektywna eliminacja struktur cytoplazmatycznych w elementach sitowych pozostaje znacznie mniej rozpoznana, zwłaszcza jej regulacja na poziomie molekularnym. Uważam zatem, że tematyka pracy doktorskiej, związana z mechanizmami formowania się floemu, jest ważna, dostarcza cennych wyników i stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny - nauki biologiczne.

Poniżej przedstawię ocenę poszczególnych części rozprawy doktorskiej i wartości naukowej załączonych prac.

Ocena merytoryczna dysertacji doktorskiej

Streszczenie

W tej części rozprawy Doktorant nakreślił temat pracy doktorskiej, zaprezentował cel i hipotezę badawczą, następnie materiał badawczy i przeprowadzone analizy. Przedstawił najważniejsze wyniki badań. Chociaż informacje te zapisane zostały praktycznie na jednej stronie maszynopisu to zawierają pewne nieścisłości i niezręczne sformułowania. Przykładowo, Doktorant w hipotezie badawczej założył, iż *w różnicowanie komórek przewodzących łyka zaangażowane są procesy degradacyjne, ale ich działanie jest selektywne*. Trudno jednak przypisać procesom działanie selektywne.

Może warto zatem rozważyć nieznaczną modyfikację hipotezy, np. różnicowanie elementów sitowych obejmuje procesy degradacyjne o charakterze selektywnym.

Wprowadzenie

Zawiera podstawowe informacje o tkankach przewodzących roślin, pełnionych przez nie funkcjach oraz etapach ich różnicowania. Doktorant zestawia etapy różnicowania elementów przewodzących ksylemu z tymi dotyczącymi floemu, akcentując przede wszystkim konsekwencję autofagii dla tych komórek. W rozdziale tym scharakteryzował typy autofagii u roślin, które zilustrował stosownymi rycinami. Wskazał na białka ATG, które odpowiedzialne są za autofagię. Rozdział ten kończy hipoteza badawcza wraz z czterema zadaniami badawczymi, które pozwoliły na jej weryfikację. Hipoteza badawcza, chociaż zawiera niefortunne sformułowanie, jest sprawdzalna i obiektywna.

W rozdziale tym zabrakło mi informacji, dotyczących pełnego szlaku różnicowania elementów sitowych, jak i zaakcentowania faktu, że Doktorant analizował tkankę waskularną pochodzenia pierwotnego (protofloem, metafloem, chociaż badał m.in. rośliny, w tym drzewiaste, z przyrostem wtórnym). Okres funkcjonowania elementów sitowych floemu pierwotnego, jak i wtórnego, jest czasowo ograniczony, chociaż elementy sitowe pochodzenia wtórnego (zwykle również krótko żyjące), po śmierci, pełnią inną funkcję - wchodzą w skład martwicy korkowej pnia.

Ponieważ rolą recenzenta jest wskazanie uchybień czy nieścisłości, dlatego chciałabym zwrócić Doktorantowi uwagę, iż w nomenklaturze polskiej na określenie komórki, która wraz z elementem sitowym u okrytozalążkowych ma wspólne pochodzenie stosuje się nazwę komórki przyrurkowej, której synonimem jest komórka towarzysząca, a nie przyrurkowa komórka towarzysząca, który to termin Doktorant używa. Ponadto elementami sitowymi u iglastych są komórki sitowe a u okrytozalążkowych człony rurek sitowych, które łączą się końcami za pośrednictwem płyt sitowych w ciągi zwane rurkami sitowymi. To oznacza, że elementy sitowe u iglastych nie tworzą rurek sitowych. Brakiem precyzji naznaczony jest zatem zapis we Wprowadzeniu, iż „komórki przewodzące floemu to elementy sitowe tworzące ciągi rurek sitowych...” Nie jest też w pełni poprawne zdanie, iż „Drewno składa się z elementów trachealnych tworzących naczynia lub cewki...”. U okrytozalążkowych elementy trachealne to człony naczyniowe połączone końcami tworzą naczynia jednak u iglastych elementy trachealne to komórki zwane cewkami. Ponadto, zastanawiające jest zdanie odnoszące się do procesu różnicowania elementów przewodzących. Doktorant napisał bowiem, że „proces ten w przypadku ksylemu zwany ksylogenezą, a w przypadku floemu floemogenezą, wymaga wielu przemian i dostosowań strukturalnych, gwarantujących niezakłócony transport”. Szkoda, jednak, że Doktorant nie podał, jakie przemiany ma na myśli. Nie dostrzegam bowiem w procesie powstawania komórek ksylemu i floemu przemian, a jedynie zmianę fazy rozwojowej pochodnych komórek merystematycznych różnicujących się np. na cewki, człony naczyniowe czy elementy sitowe.

Rozdział **Omówienie wyników** Doktorant rozpoczął od opisu materiału badawczego, co budzi zastrzeżenia co do struktury rozprawy doktorskiej. Zwykle w pracach empirycznych wyodrębnia się rozdział Materiał i metody. Rozdział wnioski i podsumowanie wydają się też mieć zaburzoną konstrukcję. Wnioski są poprawnie sformułowane i wynikają z przeprowadzonych badań, jednak w podsumowaniu Doktorant skupił się na wskazaniu osiągnięć rozprawy doktorskiej, a nie przypomniał np. co było celem badań, czy zrealizował go i jakie otrzymał wyniki, na podstawie których dokonał wnioskowania.

Omówienie wyników

Jak wspomniałam rozdział ten rozpoczyna się od charakterystyki materiału badawczego, którym były m.in. fragmenty korzeni pionierskich topoli kalifornijskiej. Doktorant napisał: „Topola kalifornijska jako gatunek roślin drzewiastych jest organizmem modelowym, który cechuje się obecnością korzeni pionierskich o dużej średnicy, umożliwiających osiową obserwację powstających komórek drewna i łyka”. Myślę jednak, że zdanie to jest mało zrozumiałe i warto rozważyć jego sens.

Zasadniczo, Doktorant skupiał się na realizacji czterech zadań badawczych, w tym na:

1. opracowaniu strategii, umożliwiających identyfikację kluczowych etapów floemogenezy,

2. identyfikacji cytologicznych i molekularnych markerów autofagii w rozwoju elementów sitowych,
3. analizie procesów degradacyjnych uczestniczących w redukcji zawartości cytoplazmy podczas różnicowania elementów sitowych,
4. identyfikacji wzorców ewolucyjnych związanych z autofagią i składem ściany komórkowej, które mogą mieć wpływ na wykształcenie i funkcjonalność tkanek przewodzących u roślin.

Doktorant wykorzystując metody badań prowadzonych na poziomie molekularnym, subkomórkowym, komórkowym i tkankowym oraz materiał badawczy w postaci fragmentów korzeni *Populus trichocarpa*, *Ceratopteris richardii*, *Picea stichensis*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* zrealizował ww. zadania

- I. W artykule: “Is autophagy always a death senescence? A case study of highly selective cytoplasmatic degradation during phloemogenesis”, w którym Doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, testował hipotezę zakładającą udział różnych szlaków degradacji zawartości cytoplazmy, z kluczową rolą przypadającą makroautofagii i istotne znaczenie autofagii selektywnej dla funkcjonalności elementów sitowych. W artykule tym przedstawił scenariusz floemogenezy i czynniki ją kontrolujące. Szczegółowe analizy budowy komórek floemu pierwotnego, prowadzone na każdym poziomie ich organizacji, pozwoliły Doktorantowi na zidentyfikowane kolejnych faz rozwojowych powstających elementów sitowych na przykładzie pionierskich korzeni *Populus trichocarpa*, tj. powstanie pochodnych komórek prokambialnych różnicujących się w kierunku centropetalnym na elementy proto- i metafloemu. Fazy te wyróżnił na podstawie modyfikacji zawartości protoplastu i schematycznie zilustrował na rysunkach obrazujących strefy morfologiczne korzeni na przekroju podłużnym i poprzecznym. Wydaje się jednak, że Fig. 1 A w opublikowanej pracy przedstawiająca kolejne fazy rozwojowe elementów sitowych to nie przekrój styczny, a przekrój promieniowy przez korzeń, obejmujący czapeczkę, merystem wierzchołkowy oraz strefę wzrostu elongacyjnego.

Kryteria wyróżnienia komórek macierzystych elementów sitowych, tych różnicujących się i dojrzałych, Doktorant oparł m.in. na obecności w komórce jądra komórkowego, zmianach związanych z liczbą i wielkością wakuoli, czy „zasięgu” autofagii. Dodatkowo uwzględnił poziom molekularny i zidentyfikował potencjalne orthologi genów kodujących markery molekularne floemu, których ekspresja wzrastała wraz z postępowaniem floemogenezy (z wyj. PAX).

Wskazał, że selektywna degradacja treści cytoplazmatycznej odbywa się na drodze zarówno makro- jak i mikroautofagii. Oprócz autofagosomów, zidentyfikował plastoliosomy oraz zaobserwował samoistny rozpad organelli bądź ich fragmentów na drodze fragmentacji lub stopniowej eliminacji zawartości (np. otoczki jądrowej, chromatyny jądra). Wskazał na „ochronną” rolę błon wywodzących się od retikulum endoplazmatycznego w zabezpieczeniu cytoplazmy wraz z niezdegradowanymi organellami komórkowymi. Jako proces kluczowy autofagii wskazał enukleację potwierdzoną procedurą TUNEL. Dla zmian histologicznych dokonał identyfikacji markerów molekularnych. **W mojej ocenie opisana na poziomie komórkowym, subkomórkowym i molekularnym sekwencja zdarzeń od momentu fazy merystematycznej do wykształcenia dojrzałego członu rurki sitowej, zawierającego cytoplazmę o niezbyt dużej gęstości elektronowej i z nielicznymi organellami zepchniętymi do części parietalnej komórki, wskazuje na dużą sprawność Doktoranta w badaniach eksperymentalnych, bogaty warsztat badawczy i Jego wiedzę z różnych dziedzin biologii.**

W artykule Doktorant dwukrotnie użył sformułowania „phloem initial cells”. Komórki inicjalne zarezerwowane są do merystemów i są niezróżnicowane w odróżnieniu od komórek floemu, czyli zróżnicowanych. Prosiłabym zatem o komentarz.

- II. Manuskrypt pt. “Exploring specific degradation process of plant components. Vascular tissues reveal that there is more than autophagy” to praca, w której Doktorant występuje jako pierwszy i korespondencyjny autor. W pracy tej dokonał szczegółowego przeglądu literatury dotyczącej procesów degradacyjnych. Praca oparta jest na przeglądzie 211 pozycji literaturowych z ostatnich 25 lat, chociaż jest kilka prac z lat 70, 80 i 90 XX wieku. Wszystkie prace są anglojęzyczne. W pracy Doktorant opisał autofagię, która jest genetycznie zaprogramowana i jej klasycznym przykładem jest ksylogeneza (głównie megaautofagia z wiodącą rolą wakuoli), jak i tą o charakterze selektywnym (głównie makroautofagia), która ostatecznie nie doprowadza do śmierci komórki a jest „pomostem” między dwoma jej stanami fizjologicznymi tj. komórką żywą (ze zredukowaną treścią cytoplazmatyczną) i funkcjonującą, a martwą komórką (pustą w środku) i niefunkcjonującą. Przykładem selektywnej autofagii jest niewątpliwie proces różnicowania elementów sitowych floemu, tkanki, która stanowi obiekt zainteresowań badawczych Doktoranta. W pracy tej Doktorant jednak nie ograniczył się do mechanizmów autofagii towarzyszących powstawaniu elementów sitowych. Opisał również procesy degradacyjne organelli komórkowych, w tym zależne od autofagii, które uruchamiane są jako reakcja rośliny na stres, czy też zachodzące na różnym etapie jej rozwoju. Wykazał, że

procesy degradacyjne mogą być właśnie selektywne, polegające na rozkładzie konkretnych, w tym i uszkodzonych, organelli komórkowych bądź ich fragmentów, np. chlorofagia w przypadku chloroplastów, mitofagia w przypadku mitochondriów czy nukleofagia w przypadku fragmentów jądra komórkowego. Zwrócił też uwagę na niespecyficzną autofagię, która występuje wtedy, gdy degradacji ulega wiele różnych „zbędnych” struktur, które po strawieniu stają się budulcem dla nowych oraz źródłem energii do prawidłowego funkcjonowania komórek. Zestawił je także na tle tych, zachodzących w komórkach zwierzęcych. Ponadto, Doktorant wskazał czynniki uwikłane w procesy degradacyjne, zarówno te wewnątrzkomórkowe, jak i zewnątrzkomórkowe. **Jest to zatem cenna praca, przedstawiająca stan wiedzy z zakresu degradacji struktur komórkowych i ich szczególnych cech, a jej przygotowanie wymagało od Doktoranta głębokich studiów literatury przedmiotu.**

- III. W opublikowanym artykule “Conserved autophagy and diverse cell wall composition: unifying features of vascular tissues in evolutionary distinct plants”, Doktorant, występujący jako pierwszy i korespondencyjny autor, poddał weryfikacji hipotezę zakładającą kluczową rolę autofagii w procesie nie tylko ksylogenezы, ale i floemogenezy, ale w przypadku formowania się floemu - o ograniczonym zasięgu tzn. nieobejmującej całego protoplastu, a więc autofagii selektywnej. W badaniach swoich zwrócił również uwagę na skład ściany komórkowej, której chemizm w procesie powstawania tkanek przewodzących ulega modyfikacjom, chociażby związanej z jej grubieniem. Strukturalne i chemiczne modyfikacje ściany komórkowej mają bowiem zapewnić możliwość długodystansowego transportu związków chemicznych, niezbędnych dla wzrostu i rozwoju roślin. Doktorant, badania prowadził na korzeniach gatunków roślin odległych ewolucyjnie tj. cienkozarodniowej paproci *Ceratopteris richardii* oraz *Picea stichensis*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* i *Populus trichocarpa*. Prowadził analizy budowy anatomicznej, bioinformatyczne oraz wykorzystał metody immunocytochemiczne pozwalające na lokalizację molekularnego markera autofagii, którym jest białko AGT8 wraz z wybranymi składnikami ściany komórkowej. Wykazał, że u badanych roślin białko to występowało zarówno w elementach floemu, jak i ksylemu, natomiast skład ściany komórkowej znacząco się zmieniał, zwłaszcza w odniesieniu do składników podłoża ściany komórkowej tych tkanek. Jedyne składniki ściany komórkowej zidentyfikowanymi u wszystkich badanych roślin w komórkach floemu był β -1,4-galaktan oraz kompleksy białkowe arabinogalaktanu, co może wskazywać na ew. rolę tych związków w procesie powstawania floemu i jego fizjologicznej funkcji, chociaż brak danych dotyczących

innej niż budulcowa i biomechaniczna (w przypadku β -1,4-galaktan) rola tych związków. Ponadto, Doktorant wykazał, że ewolucja genów ATG8 związana była z ich powieleniem, bez zasadniczych zmian w ich sekwencji. **Uzyskane przez Doktoranta wyniki badań wskazują zatem jednoznacznie na ewolucyjnie konserwatywny charakter autofagii będącej elementem różnicowania się elementów tkanek waskularnych roślin, który nie występuje w przypadku składu ściany komórkowej. Występowanie związków chemicznych w ścianie komórkowej nie jest bowiem uniwersalne.** Wykazana zaś rosnąca liczba izoform białka AGT8 w trakcie ewolucji roślin może tłumaczyć zakres procesów degradacyjnych organelli w komórkach tkanek waskularnych roślin naczyniowych, chociaż funkcje poszczególnych izoform białka ATG8 nie są zasadniczo poznane.

Najważniejsze cechy recenzowanej pracy doktorskiej:

- a. praca została przygotowana w zgodzie z wymogami formalnymi stawianymi dysertacjom doktorskim,
- b. Doktorant wykazał ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne,
- c. tematyka pracy jest aktualna i istotna dla rozwoju dyscypliny,
- d. Doktorant rozpoznał lukę w danych literaturowych, sformułował problem badawczy, wybrał właściwe metody badawcze, umiejętnie interpretował wyniki badań potwierdzając w ten sposób predyspozycje do prowadzenia samodzielnej pracy badawczej,
- e. praca ma walor zachęcający do kontynuowania badań.

Konkluzja

Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską mgra Kornela M. Michalaka pt. „Charakterystyka mechanizmów różnicowania elementów przewodzących floemu u roślin”, mimo kilku krytycznych uwag, oceniam bardzo pozytywnie. Jej wartość merytoryczna, jak i naukowa jest wysoka. Jakość zawartych w tekście mikrofotografii jest imponująca. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a dokładnie zaplanowane badania, które przeprowadzono z wykorzystaniem złożonego warsztatu badawczego, dały nowatorskie wyniki, które inspirują do stawiania kolejnych pytań. Doktorant jawi się zatem jako badacz z łatwością konfrontujący swoje rezultaty z danymi literaturowymi. Posiada rozległą wiedzę w odniesieniu do różnych poziomów struktury ciała rośliny, jak i wysoką sprawność w prowadzeniu badań eksperymentalnych. Jestem przekonana o Jego dojrzałości naukowej, umiejętności stawiania pytań badawczych i poszukiwania odpowiedzi.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka mechanizmów różnicowania elementów przewodzących floemu u roślin” spełnia warunki określone

w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM o dopuszczenie mgra Kornela M. Michalaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Jednocześnie, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Kornela M. Michalaka ze względu na jej wysoką wartość naukową.

M. Turk