

prof. dr hab. Cezary Mądrzak
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Zakład Biologii Molekularnej

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Moniki Skawińskiej
pod tytułem „Identyfikacja komórek macierzystych w merystemie
wierzchołkowym korzenia i w merystemie brodawek korzeniowych
u *Medicago truncatula*”

Aktywność merystemów i procesy różnicowania się ich komórek prowadzące do powstawania tkanek i organów, a w szczególności mechanizmy, których funkcjonowanie warunkuje prawidłowy przebieg tych procesów, to jeden z najbardziej fascynujących aspektów biologii roślin. Pomimo zgromadzenia wielu danych i stosunkowo bogatej literatury przedmiotu, do rozstrzygnięcia pozostaje wiele kwestii, wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Z tego co już wiemy jasno wynika, że pomimo zasadniczo jednolitych reguł rządzących wzrostem apikalnym, istnieją wyraźne różnice w anatomii wierzchołkowych regionów korzenia i pędu różnych gatunków roślin. Bardzo precyzyjna analiza pozwala stwierdzić różnice nawet pomiędzy gatunkami zaliczanymi do jednej rodziny. Klasyfikacje wyróżniające odrębne typy merystemów nie zawsze mogą w pełni odzwierciedlić poziom zróżnicowania organizacji tych tkanek w różnych gatunkach roślin. Występuje ponadto zmienność osobniczą, która może wynikać bądź z wpływu czynników zewnętrznych bądź też z subtelnych różnic genetycznych – polimorfizmów występujących w sekwencjach tych genów, których produkty sterują podziałami i procesami różnicowania się komórek. Tak jak w przypadku wielu innych aspektów biologii roślin, również w zakresie struktury, organizacji i funkcjonowanie merystemu wierzchołkowego korzenia wiele fundamentalnych informacji uzyskano dzięki badaniom nad *Arabidopsis thaliana* służącym jako gatunek modelowy.

Oceniana rozprawa doktorska, przygotowana w Katedrze Botaniki Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod opieką naukową dr hab. Barbary Łotockiej, opisuje badania, które lokalizują się w głównym nurcie naszkicowanego powyżej zakresu problematyki badawczej. Jej autorka, mgr Monika Skawińska, podjęła próbę identyfikacji komórek macierzystych pełniących kluczową rolę w podtrzymywaniu aktywności merystemu wierzchołkowego korzenia i merystemu brodawki korzeniowej *Medicago truncatula*. Gatunek ten posiada również status modelu biologicznego szczególnie chętnie stosowanego, obok *Lotus japonicus*, w badaniach nad diazotroficzną symbiozą Fabaceae.

Dwie przesłanki sprawiają, że podjęcie badań, których wyniki opisuje praca mgr Moniki Skawińskiej należy uznać za celowe i w pełni uzasadnione. Po pierwsze, istnieją, ja się okazuje, różnice – organizacja merystemu wierzchołkowego *A. thaliana* oraz *M. truncatula* nie jest w pełni analogiczna. Po drugie, drugi z tych gatunków tworzy brodawki korzeniowe – *sui generis* organy roślinne umożliwiające diazotroficzną symbiozę z bakteriami z rodzaju *Sinorhizobium*. Organogeneza tych struktur indukowana przez sygnały bakteryjne zachodzi dzięki powstaniu i nieprzerwanej aktywności merystemu, którego organizacja i funkcjonowanie warte są dogłębnego zbadania.

Ocena merytoryczna pracy

Mgr Monika Skawińska postawiła sobie ambitny cel badawczy, którym była identyfikację komórek macierzystych w merystemie wierzchołkowym korzenia oraz w merystemie brodawek korzeniowych *M. truncatula* uwzględniająca weryfikację trzech hipotez roboczych, z których pierwsza zakładała, co oczywiste, że komórki takie istnieją, druga, że merystemy (RAM) *M. truncatula* oraz *A. thaliana* działają w analogiczny sposób. Trzecia hipoteza robocza zakładała podobieństwo mechanizmu podtrzymywania aktywności merystemów brodawki i wierzchołka wzrostu korzenia.

Dla osiągnięcia założonego celu Autorka wykorzystwała metody mikroskopii konwencjonalnej oraz metody molekularne (RT-PCR *in situ*). Obserwacje i analizy obrazów mikroskopowych badanych tkanek obejmowały lokalizację komórek macierzystych metodą analizy ciągów komórek siostrzanych starannie dobranych przekrojów RAM i apikalnego regionu brodawki. Podjęto również próbę określenia cech charakterystycznych dla ultrastruktury komórek występujących w poszczególnych regionach badanych merystemów. Metody molekularne posłużyły do analizy ekspresji w genów PLETHORA1, PLETHORA2, SHORTROOT, SCARECROW i WOX5 w merystemie wierzchołkowym korzenia i w brodawce korzeniowej. Wybór genów, których produkty identyfikowano stosując metodę RT-PCR, należy uznać za racjonalny. Geny te pełnią dobrze poznane w *A. thaliana* funkcje regulatorowe odpowiadając za utrzymanie w obrębie RAM komórek macierzystych oraz komórek tworzących centrum spoczynkowe (QC). Autorka podjęła również próbę lokalizacji transkryptów tych samych genów *in situ* – w poszczególnych komórkach badanych merystemów. W tym celu posłużyła się metodą RT-PCR *in situ*.

Cel, który postawiła sobie Autorka został w znacznej mierze osiągnięty. Stwierdzono, że *M. truncatula* posiada RAM typu otwartego poprzecznego Eudicots (OTvD), lecz pewne jego cechy nawiązują do typu zamkniętego. Zastosowana metoda analizy ciągów komórek siostrzanych pozwoliła zidentyfikować komórki macierzyste kolumelli i prokambium (choć nie można ich jednoznacznie rozróżnić),

kolumelli wtórnej (być może wspólne dla tej struktury oraz kory), prakory, proendodermy oraz wspólne komórki macierzyste ryzodermy i bocznej części czapeczki. Analiza ultrastruktury komórek poszczególnych części RAM, choć pozwoliła stwierdzić pewne różnice występujące, w tym względzie, między nimi, nie jest, zdaniem Autorki, wystarczająco pewnym sposobem identyfikacji komórek macierzystych.

Niejako dodatkowym efektem badań mikroskopowych regionu apikalnego korzenia *M. truncatula* było stwierdzenie występowania zjawiska plazmolizy w merystemie wierzchołkowym korzenia bardzo młodych siewek. Autorka poczyniła wysiłki by stwierdzić, że nie jest to artefakt spowodowany zastosowaną metodą utrwalania tkanek.

Co do wyników badań nad merystemem brodawki korzeniowej *M. truncatula* to uzyskane wyniki nie są tak jednoznaczne. Autorka stwierdziła, że metoda zastosowana do analizy RAM nie jest przydatna do identyfikacji komórek macierzystych poszczególnych tkanek brodawki poza wiązkami przewodzącymi. Wynika to z tego, że komórki merystemu tego organu dzielą się w różnych płaszczyznach co prowadzi do powstania ich „nieuporządkowanego” układu.

Obecność komórek macierzystych zarówno w RAM jak i w brodawce korzeniowej *M. truncatula* potwierdzono pośrednio zakładając, że dowodzi jej ekspresja genów SHORTROOT, SCARECROW i WOX5 oraz genów z rodziny PLETHORA, które w *A. thaliana* są uznane za markery tego typu komórek. Autorka przedstawiła wyniki RT-PCR dowodzące obecności transkryptów wspomnianych genów w 5-dniowych wierzchołkach korzenia i 28-dniowych brodawkach oraz ich braku w liściach. Jako kontrola pozytywna posłużył gen kodujący syntazę chalkonową, którego ekspresję wykryto, zgodnie z oczekiwaniami, we wszystkich badanych częściach rośliny. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na błędy występujące w opisie Fotografii 79-81. Na tej, skądinąd bardzo dobrej technicznie, rycinie występują rozbieżności pomiędzy opisem żeli a podpisem zamieszczonym obok.

Zastosowanie bardziej precyzyjnej i jednoznacznej, zdawałoby się, metody molekularnej – RT-PCR *in situ*, nie przyniosło wyników, na które liczyła Autorka. Przeszkodą okazał się wysoki poziom autofluorescencji badanych tkanek, który uniemożliwił detekcję ewentualnych produktów RT-PCR w poszczególnych specyficznych lokalizacjach komórkowych. Należy przyznać, że Autorka włożyła dużo wysiłku w próby usunięcia pojawiających się problemów i przeszkód. Doceniając to w pełni należy jednak zauważyć, że choć opis tych usiłowań (Rozdz. 4.3.10 pt. „Modyfikacje metody RT-PCR *in situ*”) został opracowany bardzo kompetentnie i wyczerpująco, to jednak na stronach 78-84 tomu pierwszego pracy znajdujemy błędy (w liczbie ok. 10) polegające na odsyłaniu do podrozdziałów i tabel o błędnych numerach. Na przykład na str. 80 przywoływana Tabela 8 to najprawdopodobniej

zamieszczona na stronie 73 Tabela 4.10, a nieistniejący lecz wymieniony podrozdział 3.4.1. to zapewne podrozdział 4.3.8.1. (str. 82).

Szkoda, że nie udało się wskazać komórek, w których lokalizują się transkrypty genów uznawane, na podstawie wyników badań *A. thaliana* za markery komórek macierzystych. Być może pozwoliłoby to na wskazanie w merystemie brodawki korzeniowej komórek dających początek korze i tkance bakteroidalnej oraz dodatkowo potwierdziłoby dokonaną identyfikację komórek macierzystych w RAM. To niepowodzenie z pewnością sprawiło, że Autorka zdobyła znaczne doświadczenie i wypracowała swój własny pogląd na kwestię autofluorescencji jako zjawiska sprawiającego wiele problemów badawczych. Być może warto by wiedzą w tym zakresie zdobytą podzieliła się publikując, na przykład pracę przeglądową. Taką sugestią wzmacnia konstatacja, że Autorka dobrze radzi sobie z pisaniem tekstów naukowych – cennym fragmentem pracy jest interesujący, kompetentnie przygotowany przegląd literatury, który dobrze przygotowuje czytelnika do lektury części eksperymentalnej.

Podsumowując ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że jej poziom jest wysoki. Autorka wykazała się doskonałym warształem w zakresie technik mikroskopowych i umiejętnościami w zakresie analizy obrazów mikroskopowych. Niepowodzenie w zakresie zastosowania jednego z podejść badawczych (RT-PCR *in situ*) nie zmienia faktu, iż cel pracy została osiągnięty.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska mgr Moniki Skawińskiej to obszerne, przedstawione w formie dwóch tomów opracowanie obejmujące 144 strony tekstu (tom pierwszy) ilustrowanego jedenastoma rysunkami, zawierającego 23 tabele. Wykaz cytowanej literatury obejmuje 176 dobrze dobranych pozycji. Integralną częścią rozprawy jest obejmująca 122 fotografie dokumentacja fotograficzna stanowiąca tom drugi.

Poza uwagami zamieszczonymi wcześniej nie ma zastrzeżeń co do strony redakcyjnej i edytorskiej pracy. Przeciwnie, należy zwrócić uwagę, w szczególności, na bardzo staranne, profesjonalne przygotowanie i opracowanie dokumentacji fotograficznej.

Praca została napisana starannie, nie budzi zastrzeżeń, poza nielicznymi, wskazanymi poniżej przypadkami, jej strona językowa. Tekst jest jasny i czytelny pomimo złożoności materii, którą opisuje. Wspomniane powyżej drobne niedoskonałości językowe to:

- występujące na stronie 34 niezręczne sformułowanie „...u daleko z nimi spokrewnionych...”,

- niekonsekwentną, czasem błędną pisownię nazwy „kwas abscysynowy” (patrz ss. 44, 52, 54),
- również niekonsekwentne stosowanie terminu „czynniki transkrypcyjne”, które bywają w tekście nazywane, raczej niepoprawnie, „czynnikami transkrypcji” (np. str. 45, 46),
- błąd liczbowy na stronie 46 sugerujący, że homeodomenę stanowi 5 aminokwasów podczas, gdy w istocie jest to region obejmujący ok. 60 reszt aa,
- użycie, na tej samej stronie, terminu „homeodomena” zamiast terminu „białko homeotyczne”,
- błędne tłumaczenie terminu „ankyrin”; na stronie 55 powinno być „ankirynowa” zamiast „ankyrinowa”.

Wymienione powyżej usterki nie zmieniają ogólnie pozytywnego obrazu pracy. Pod względem formalny rozprawa zasługuje na dobrą ocenę.

Podsumowanie

Po analizie ocenianej rozprawy stwierdzam, że jej Autorka mgr Monika Skawińska zdobyła znaczny zasób wiedzy oraz posiadała wysokie kwalifikacje badawcze. Praca przygotowana przez nią na podstawie zgromadzonych danych eksperymentalnych stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w rozumieniu Art. 13 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

Na tej podstawie przedstawiam Wysokiej Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego wniosek o dopuszczenie mgr Moniki Skawińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. Cezary Mądrzak

Poznań, 17 września 2016 r.