

Prof. dr hab. Jerzy Bohdanowicz
Katedra Cytologii i Embriologii Roślin
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 26 sierpnia 2018 roku

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Doniak pt. „Udział etylenu w indukowanym kinetyną procesie śmierci komórek kory pierwotnej korzeni siewek *Vicia faba* ssp. *minor*” wykonanej w Katedrze Cytofizjologii Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Kaźmierczaka prof. nadzw. UŁ.

Badania nad udziałem cytokinin w kontroli programowanej śmierci komórkowej (PCD) u roślin prowadzone są w Katedrze Cytofizjologii UŁ od kilku lat. Doprowadziły one m.in. do wykazania, że traktowanie siewek bobiku (*Vicia faba* ssp. *minor*) kinetyną nie tylko indukuje PCD w komórkach kory pierwotnej korzeni, ale także hamuje ich wzrost wydłużeniowy i stymuluje wzrost na grubość, prowadzi do pojawienia się przestworów aerenchymatycznych oraz haczykowatego zagięcia w szczytowej części korzenia (tzw. root apical hook). Z drugiej strony, zmiany te wskazują na typowe objawy działania etylenu (tzw. potrójna odpowiedź na etylen) co sugeruje, że hormon ten jest włączony w indukowaną kinetyną śmierć komórkową. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest konsekwentną kontynuacją tych badań. Wybór zarówno jej tematu, jak i dróg prowadzących do końcowych wyników uważam za w pełni uzasadnione.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Magdaleny Doniak było pogłębienie wiedzy na temat przejawów programowanej śmierci komórkowej indukowanej kinetyną i wyjaśnienie mechanizmu działania etylenu w tym procesie (zarówno w zakresie recepcji, jak i transdukcji sygnału śmierci) oraz uzyskanie odpowiedzi na pytanie, który z wybranych do badań elementów metabolizmu i struktury komórkowej pozostaje pod kontrolą receptorów wrażliwych na etylen. Dodatkowym celem było zaproponowanie mechanizmu współdziałania

kinetyny i etylenu w transdukcji sygnału w procesie śmierci komórkowej indukowanej kinetyną.

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Doniak ma postać liczącego 184 strony wydruku komputerowego, zawierającego: spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w językach polskim i angielskim oraz 7 głównych rozdziałów, z których część podzielona jest na szereg kolejno ponumerowanych podrozdziałów. W pracy zamieszczonych zostało 60 ilustracji oraz 2 tabele.

Struktura rozprawy, podział jej treści, kolejność rozdziałów są typowe dla prac doktorskich z dziedziny biologii eksperymentalnej.

Rozdział 1. WSTĘP, liczący 19 stron, Doktorantka rozpoczęła od opisu struktury i właściwości chemicznych etylenu oraz dróg jego biosyntezy i metabolizmu u roślin wyższych a następnie przedstawiła budowę, lokalizację i sposób działania receptorów etylenu oraz szlak transdukcji sygnału etylenu w komórkach roślinnych. Te części Wstępu zilustrowane zostały czterema przejrzystymi, schematycznymi rysunkami. W trzecim podrozdziale Doktorantka dokonała przeglądu literatury dotyczącej udziału etylenu, a dokładniej współdziałania etylenu z innymi hormonami, w regulacji szeregu procesów zachodzących zarówno w trakcie normalnego rozwoju organizmu roślinnego, jak i w odpowiedzi na różne czynniki stresowe biotyczne i abiotyczne. Zagadnienia te mgr Doniak przedstawiła w sposób świadczący o bardzo dobrej znajomości danych literaturowych i odpowiednim przygotowaniu do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

W krótkim, jednostronicowym rozdziale 2. CEL PRACY, sformułowane zostały ww. cele badawcze.

Rozdział 3. MATERIAŁ I METODY, liczący 29 stron, rozpoczyna podrozdział 3.1., w którym opisane zostały rośliny *Vicia faba* ssp. *minor* odmiany „Nadwiślański” używane w badaniach. W kolejnym (3.2.) przedstawiono sposób kiełkowania nasion, hodowli siewek, pobierania z nich materiału, właściwości zastosowanych inhibitorów receptorów etylenu oraz zakres zamierzonych badań w określonych układach eksperymentalnych (podsumowanych w Tabeli 1). Podrozdział 3.3. zawiera, w większości przypadków kompletne i przejrzyste, opisy metod użytych w badaniach objętych rozprawą m.in.: spektrofotometrycznych, spektrofluorometrycznych, chromatograficznych, mikroskopii fluorescencyjnej i elektronowej oraz analizy statystycznej. Ponadto wymieniona została stosowana aparatura badawcza i programy jakich używano do rejestracji i analizy obrazów mikroskopowych oraz wskazano, które z badań lub analiz wykonane zostały w jednostkach innych niż macierzysta katedra Doktorantki.

Rozdział 4. WYNIKI, stanowiący najobszerniejszą, sześćdziesięcioczęściową część rozprawy, składa się z dwóch części. Pierwsza, obejmująca podrozdziały 4.1 do 4.6., dotyczy poszerzenia wiedzy na temat procesów związanych z ostatnią fazą śmierci komórkowej indukowanej kinetyną w dwucentymetrowych, wierzchołkowych odcinkach korzeni siewek bobiku. Przedstawione zostały obserwacje nad zmianami w kondensacji chromatyny jądrowej i ultrastrukturze komórek kory pierwotnej oraz zawartości kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych, aktywności kinaz histonu H1 i histonów korowych, metylacji DNA i aktywności nukleaz kwaśnych i zasadowych tych fragmentów korzeni. Druga część WYNIKÓW dotyczy udziału etylenu i jego receptorów w śmierci komórkowej indukowanej kinetyną i zawiera rezultaty badań porównawczych, w których wykorzystano takie inhibitory receptorów etylenu jak tiosiarczan srebra i 2,5-norbornadien. Badania obejmowały 6 wariantów układu eksperymentalnego: kontrolny, w którym siewki hodowano w warunkach kontrolnych (CTRL) lub w obecności tiosiarczanu srebra (STS), 2,5-norbornadienu (NBD), kinetyny (KIN), tiosiarczanu srebra i kinetyny (STS-KIN), 2,5-norbornadienu i kinetyny (NBD-KIN). W podrozdziałach 4.7. - 4.34. przedstawione zostały m.in. wyniki badań nad:

- wpływem wybranych stężeń ww. inhibitorów na morfologię korzeni siewek oraz właściwości kory pierwotnej ich dwucentymetrowych odcinków wierzchołkowych [długość i szerokość komórek, stopień zakwaszenia ich cytoplazmy, żywotność / śmiertelność, obecność przestworów aerenchymatycznych],
- zawartością wybranych metabolitów komórkowych oraz aktywnością niektórych enzymów ich metabolizmu w dwucentymetrowych, wierzchołkowych odcinkach korzeni [białek oraz proteaz, kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC; prekursora etylenu) oraz deaminazy ACC, reaktywnych form tlenu (nadtlenku wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego) oraz enzymów ich degradacji (katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej),
- zawartością cukrów całkowitych, rozpuszczalnych, zapasowych oraz związanych ze ścianą komórkową, zawartością kwasów tłuszczowych i fosfolipidów błonowych, poziomem metylacji DNA, aktywnością kwaśnych i zasadowych fosfataz, RNaz i DNaz oraz aktywnością kinaz związanych z transdukcją sygnałów zależnych od etylenu,
- zawartością cytochromu *c* i jonów K^+ i Ca^{2+} w wierzchołkach korzeni i roztworach hodowlanych oraz przewodnictwem właściwym roztworów hodowlanych.

W rozdziale 5. DYSKUSJA, liczącym 35 stron, Doktorantka rzeczowo interpretuje wyniki własnych badań i obserwacji oraz konfrontuje je z danymi uzyskanymi przez innych

autorów, umiejętnie wykorzystując dostępną literaturę. Pierwszy z dwóch podrozdziałów Autorka poświęca na porównanie różnych aspektów śmierci komórkowej indukowanej kinetyną, w komórkach kory pierwotnej korzeni *Vicia faba* ssp. *minor*, z przejawami dotąd opisanych rodzajów śmierci komórkowej u roślin oraz, w pewnym zakresie, zwierząt. W drugim rozważa złożone interakcje pomiędzy etylenem i cytokininami (a szczególnie kinetyną), zachodzące na różnych poziomach procesów komórkowych i obejmujące zarówno szlaki syntezy, jak i recepcji oraz transdukcji sygnałów w procesie programowanej śmierci komórkowej indukowanej kinetyną.

Rozdział 6. WNIOSKI jest składającą się z 5 punktów listą wniosków, sformułowanych w oparciu o analizę wyników przeprowadzonych badań i danych literaturowych, uzupełnioną o schematyczną ilustrację zatytułowaną: „Możliwe szlaki sygnałowe towarzyszące śmierci komórek kory pierwotnej korzeni siewek bobiku angażujące elementy szlaków sygnalizacyjnych etylenu i cytokinin z udziałem kinaz MAP”.

Rozdział 7. LITERATURA zawiera wykaz 315 pozycji bibliograficznych, z których 314 jest cytowanych w rozprawie.

W mojej ocenie Pani mgr Magdalena Doniak bardzo dobrze wywiązała się z podjętych zadań i zrealizowała założone cele pracy. Do wykonania zaplanowanych eksperymentów badawczych posłużyła się wieloma nowoczesnymi metodami i technikami laboratoryjnymi, a uzyskane dzięki temu wyniki świadczą o warsztatowej i organizacyjnej sprawności doktorantki.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w recenzowanej rozprawie należy:

- potwierdzenie, że traktowanie siewek *Vicia faba* ssp. *minor* kinetyną indukuje śmierć komórek kory pierwotnej ich korzeni, co prowadzi do powstania przestworów aerenchymatycznych, które są największe po 72 godzinach traktowania;
- ustalenie, że programowana śmierć komórkowa indukowana kinetyną (KIN-PCD) w komórkach kory pierwotnej korzeni bobiku wykazuje cechy śmierci wakuolarnej, na co wskazuje m.in. tworzenie się wakuol litycznych, kondensacja chromatyny (a szczególnie rejonów heterochromatynowych), wzrost aktywności kinaz histonów korowych i obniżenie aktywności kinaz histonu H1, wzrost aktywności DNaz, wzrost zakwaszenia cytoplazmy i aktywności fosfataz kwaśnych, spadek zawartości komórkowego ATP;

- wykazanie, że kinetyna może być zarówno czynnikiem stymulującym, jak i hamującym proces śmierci komórkowej;
- ustalenie, że głównym czynnikiem inicjującym w KIN-PCD może być prekursor etylenu (kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy) oraz elementy szlaku transdukcji sygnałów zależnych od cytokinin, natomiast etylen jest wtórnym przekaźnikiem śmierci komórkowej, który poprzez specyficzne dla niego receptory uruchamia szlaki PCD;
- przedstawienie proponowanej sekwencji możliwych zdarzeń w indukcji i przebiegu KIN-PCD.

Nie mam poważniejszych zastrzeżeń do jakości wyników przedstawionych w rozprawie oraz sposobu ich interpretacji i udokumentowania. Język i styl rozprawy są w zdecydowanej części poprawne, stosowana terminologia na ogół nie budzi zastrzeżeń. Dokumentacja fotograficzna, wykresy, schematyczne rysunki i tablice zawarte w pracy są starannie wykonane i klarownie opisane.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić także kilka uwag krytycznych. Tytuły podrozdziałów 4.1., 4.6. i 4.7. niezupełnie odpowiadają ich treści. Ponadto tekst rozprawy zawiera nieco błędów literowych, nomenklaturowych, niepoprawnych skrótów czasopism i niewielką liczbę innych, drobnych uchybień. Wymienione (tutaj i w UWAGACH SZCZEGÓŁOWYCH) błędy są w większości natury redakcyjnej, nie podważają w najmniejszym stopniu uzyskanych wyników i nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości rozprawy.

Proszę także Doktorantkę o wyjaśnienie:

- czy w zdaniu ze str. 30 „Etylen kontroluje także ekspresję innych genów związanych z metabolizmem ściany komórkowej, między innymi hemicelulaz, takich jak endo- β -1,4-glukanaza i XTH [...] oraz ekspresję enzymów, takich jak hydrolazy, ekspansyny i β -galaktozydazy” widzi jakąś nieścisłość;
- czy w zdaniu ze str. 32 „Pewne odmiany *Dianthus caryophyllus* L. [...] charakteryzują się przedłużoną żywotnością i opóźnieniem starzenia się kwiatów, jednak w tych kwiatach szyjka słupka i liście nie przypominają typowych organów rozrodczych tego gatunku” chciałaby coś zmienić;

- rozbieżności między opisami Fig. 1b zamieszczonej w publikacji Doniak i wsp. (2016) i Fig. 21d z niniejszej rozprawy, obrazujących identyczne, jak się wydaje, siewki bobiku; oraz
- co w Tabeli 2 oznacza parametr „Mięknienie błony komórkowej”?

W podsumowaniu chcę podkreślić, że Doktorantka zrealizowała założone cele pracy. Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera wyniki właściwie zaprojektowanych, starannie wykonanych i dobrze udokumentowanych obserwacji naukowych. Sposób ich przedstawienia i omówienia potwierdzają, z jednej strony, bardzo dobrą orientację Doktorantki w problematyce badawczej, w ramach której praca powstała, zaś z drugiej, Jej umiejętność sprawnego prowadzenia pracy badawczej. Rozprawa wnosi konkretny i wymierny wkład do wiedzy o programowanej śmierci komórkowej u roślin, o czym świadczy fakt, że część z zawartych w niej wyników badań została już opublikowana w czasopismach naukowych o wysokim współczynniku wpływu (Doniak i wsp. 2014, *Plant Cell Rep*; Doniak i wsp. 2016, *Plant Growth Regul*; Doniak i wsp. 2017, *Biol Plant*).

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Doniak pt. „Udział etylenu w indukowanym kinetyną procesie śmierci komórek kory pierwotnej korzeni siewek *Vicia faba* ssp. *minor*” spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim, określone w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595, z późniejszymi zmianami). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Jerzy Bohdanowicz

UWAGI SZCZEGÓŁOWE

do rozprawy doktorskiej Pani Magdaleny Doniak pt. „Udział etylenu w indukowanym kinetyną procesie śmierci komórek kory pierwotnej korzeni siewek *Vicia faba* ssp. *minor*”

strona/wiersz		
27/17	(lumen) ER	winno być: (światła) ER
30/14	oddechowych ale także produkują	winno być: oddechowych, ale także produkcję
34/24	Trochacher	winno być: Trobacher
42/24	plazmolemę	winno być: plazmolemę
44/1	kokadylowym	winno być: kakodylowym
44/3	kokadylowego	winno być: kokadylowego
45/6	Brillant	winno być: Brilliant
67	4.1. Zawartość kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych komórek kory pierwotnej w 2-cm apikalnych fragmentach korzeni siewek bobiku	
	winno być: 4.1. Zawartość kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych w 2-cm apikalnych fragmentach korzeni siewek bobiku	
69/Fig. 11	Ultrafotografie	winno być: Mikrografie elektronowe
71	4.6. Nukleolityczna degradacja DNA w komórkach kory pierwotnej w 2-cm apikalnych fragmentach korzeni siewek bobiku	
	winno być: 4.6. Degradacja DNA przez nukleazy z 2-cm apikalnych fragmentów korzeni siewek bobiku	
72	4.7. Wpływ inhibitorów etylenu na poziom śmiertelności komórek kory pierwotnej korzeni siewek bobiku	
	winno być: 4.7. Wpływ inhibitorów receptorów etylenu na poziom śmiertelności komórek kory pierwotnej korzeni siewek bobiku	
75/8-9	...W związku z tym, że przestwory aerenchymatyczne są kluczowym przejawem aktywności etylenu... styl!	
135/27	formownia	winno być: formowania
138/26	lumen ER	winno być: świetle ER
139/5	plazmolemmy ale	winno być: plazmolemmy, ale
168/18	FEBS	winno być: FEBS Lettr
169/15	Białkowska K (2013)	nie jest cytowana w rozprawie
170/25	Mol Plant Microbe In	winno być: Mol Plant Microbe Interact

170/16	Postharvest Biol Tec	winno być: Postharvest Biol Technol
171/7	PNAS	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
172/3-4	Trend Plant Sci	winno być: Trends Plant Sci
172/24	Appearance	winno być: Appearance
173/3	JCB	winno być: J Cell Biol
174/11	PNAS	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
175/5	PNAS	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
175/8	Postharvest Biol Tec	winno być: Postharvest Biol Technol
177/13 i 16	PNAS	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
177/23	MPMI	winno być: Mol Plant Microbe Interact
179/41	PNAS	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
179/25	Postharvest Biol Tec	winno być: Postharvest Biol Technol
180/7	FEBS	winno być: FEBS J
180/34	PNAS	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
181/6	Proc Natl Acad Sci	winno być: Proc Natl Acad Sci USA
181/43	Matacaspases	winno być: Metacaspases
183/12	Plant Cell Tiss Organ Cult	winno być: Plant Cell Tissue Organ Cult

W przypadku artykułów, które ukazały się drukiem (np. w takich czasopismach jak Ann Bot, J Exp Bot, New Phytol czy Plant Sci) należy podać numery tomu i stron. Dodanie cyfrowego identyfikatora dokumentu elektronicznego (DOI) jest w takich przypadkach opcjonalne.



prof. dr hab. Jerzy Bohdanowicz