

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH**

ZAKŁAD BIOLOGII ROZWOJU ROŚLIN

ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocław

tel. +48 71 375 40 96 | +48 71 375 40 94

fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

dr hab. Edyta Gola, prof. UWr
Zakład Biologii Rozwoju Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet Wrocławski
e-mail: edyta.gola@uwr.edu.pl

Wrocław, 06.07.2020r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Sandry Natonik-Białoń

„Ultrastruktura ściany komórek epidermy łuski cebuli *Allium cepa* oraz jej odkształcenia towarzyszące plazmolizie i deplazmolizie.”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Sandry Natonik-Białoń została wykonana pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Doroty Kwiatkowskiej oraz opieką promotora pomocniczego Pani dr Doroty Borowskiej-Wykręt w Katedrze Biofizyki i Morfogenezy Roślin Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Była ona realizowana w ramach projektu MAESTRO, finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki (NCN).

Wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w 2020r. w artykule: Natonik-Białoń S., Borowska-Wykręt D., Mosca G., Grelowski M., Wrzalik R., Smith R., Kwiatkowska D. 2020. *Deformation of a cell monolayer due to osmotic treatment: a case study of onion scale epidermis*. *Botany* 98:21–36, w którym Pani mgr Natonik-Białoń jest pierwszym autorem. Ponadto Doktorantka jest współautorką publikacji w *Journal of Experimental Botany* (2018) i anglojęzycznego rozdziału w monografii (2019).

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy właściwości biofizycznych komórek adaksjalnej epidermy łuski cebuli (*Allium cepa*) w trakcie plazmolizy i deplazmolizy. Celem było pozornie proste sprawdzenie, jakie odkształcenia zachodzą w trakcie obu procesów oraz określenie czynników, które potencjalnie decydują o wielkości i anizotropii tych odkształceń. Z literatury wiadomo, że zmiany ciśnienia turgorowego powiązane są z właściwościami ściany komórkowej, takimi jak np. jej pozorna sztywność czy generowane naprężenia i przekładają się na zmiany geometrii i wielkości komórek w trakcie wzrostu, a także uczestniczą w regulacji procesów

morfogenetycznych. Epiderma adaksjalna cebuli ze względu na swoją strukturę i łatwość wypreparowania jej jako monowarstwy jest dobrym obiektem do badań odkształceń komórek i ultrastruktury ściany komórkowej, głównie ułożenia fibryli celulozowych; wyniki przedstawione w rozprawie stanowią więc dobry punkt wyjścia do analizy mechanizmów regulujących depozycję fibryli na poziomie komórkowym i molekularnym, a tym samym decydujących o właściwościach biomechanicznych ściany i anizotropii komórki.

Rozprawa doktorska Pani mgr Natonik-Białoń liczy 112 numerowanych stron i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Zawiera następujące rozdziały: 1. Wstęp, 2. Cel pracy, 3. Materiał i metody, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski, 7. Literatura, 8. Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz cztery aneksy, zawierające opis sposobu preparacji epidermy, obliczania kątów nachylenia mikrofibryl celulozowych i listę publikacji z udziałem Doktorantki oraz dodatkowo (załączony jako Aneks 4) opublikowany artykuł, w którym przedstawiona jest część wyników przedstawiona w pracy. Całość pracy przygotowana jest bardzo starannie, o czym świadczą tylko pojedyncze literówki. Niewątpliwym atutem Doktorantki jest zdolność do zwięzłego, ale przy tym przejrzystego przedstawiania skomplikowanych zagadnień, choć trochę irytujące jest bardzo częste rozpoczynanie zdań od słowa „zaś”. W tekście pojawiają się też nieliczne określenia żargonowe (falówka, mikroskop Nomarskiego). Te drobne potknięcia są na tyle nieliczne, że nie przeszkadzają w dobrym odbiorze pracy.

Wstęp tworzą logicznie powiązane podrozdziały, w których przedstawione są zagadnienia stanowiące tło pracy, m.in. opisane są właściwości mechaniczne ściany komórkowej i ich zależność od ultrastruktury i stanu fizjologicznego komórki, wyjaśnione zagadnienia związane z naprężeniami i odkształceniami (w tym wyboczeniami) ściany, a także scharakteryzowane procesy plazmolizy i deplazmolizy. Doktorantka umiejętnie nakreśla złożoność problematyki badawczej, od poziomu ultrastruktury komórki i mechanizmów molekularnych, po układy tkankowe i funkcjonowanie całego organu. Wieloaspektowość opisywanych we Wstępie zagadnień powoduje jednak, że nie do końca jest jasne, dlaczego podjęto taki właśnie temat badań.

Cel pracy jest jasno sformułowany i uszczegółowiony w postaci czterech hipotez badawczych, które posłużyły do odpowiedzi na postawione pytanie, tj. do określenia odkształceń

objętościowych i powierzchniowych w trakcie plazmolizy i deplazmolizy oraz do ustalenia czynników, od których te odkształcenia są zależne.

W rozdziale **Materiały i metody** w przejrzysty sposób przedstawiono procedury wykorzystane przy analizach. Zastosowanie w tej części licznych schematów i przykładowych zdjęć pozwoliło na jednoznaczne wytłumaczenie, w jaki sposób prowadzono pomiary, a zestawienie w tabelach wariantów eksperymentalnych ułatwiło porównywanie wyników. Uzupełnieniem tego rozdziału są **Aneksy 1 i 2**, w których szczegółowo przedstawiono preparatykę doosiowej epidermy cebuli i sposób pomiaru kąta nachylenia fibryli celulozowych w ścianie.

Wyniki zostały zaprezentowane w sposób usystematyzowany, zgodnie z układem hipotez badawczych. W tekście, szczegółowemu opisowi uzyskanych wyników towarzyszą bardzo dobrze opracowane wykresy, tabelaryczne zestawienia statystyk, zdjęcia i schematyczne rysunki, dokumentujące kolejne etapy badań. Wyniki są dobrze przedstawione, choć Doktorantka nie uniknęła kilku mało precyzyjnych określeń, np. porównując wrażliwość epidermy starych i młodych liści na barwienie jodkiem propidyny (PI) dla pierwszej grupy podaje % wybarwionych jąder komórkowych, natomiast dla młodych liści pisze bardzo ogólnie, że „...stwierdzono stosunkowo dużą liczbę komórek...” (s. 45). W poszczególnych podrozdziałach, po przedstawieniu wyników analiz są one częściowo zinterpretowane w oparciu o dostępną literaturę tematu. Należy podkreślić, że choć układ eksperymentalny jest pozornie prosty, to ilość i jakość wykonanych analiz i interpretacji wymagała żmudnej i precyzyjnej pracy.

Za najważniejsze osiągnięcia pracy uważam:

- wykazanie, że zmiany objętości komórek podczas plazmolizy i deplazmolizy związane są ze zmianą geometrii komórek epidermy;
- stwierdzenie, że przy odkształceniu objętościowym istotna jest różnica ciśnienia osmotycznego, elastyczność ścian komórkowych (czyli pośrednio wiek komórek), a także kształt lub wielkość komórek;
- wykazanie, że wielkość odkształceń powstających po deplazmolizie może być większa niż w trakcie plazmolizy, być może w wyniku wiskoelastycznych odkształceń ściany komórkowej;
- pokazanie, że zmiany ciśnienia osmotycznego mogą modyfikować czasowo przepuszczalność błony komórkowej, skutkując wybarwieniem jąder żywych komórek po

traktowaniu jodkiem propidyny; jest to niezwykle ciekawa informacja wobec powszechnego wykorzystywania PI jako markera uszkodzeń i początkowych etapów programowanej śmierci komórki (PCD);

- wykazanie, że w czasie procesu plazmolizy i deplazmolizy, ze względu na specyfikę tkanek roślinnych zmianom objętości (odpowiednio zwiększeniu i zmniejszeniu) ulegają także komórki martwe, choć w sposób bierny - w wyniku oddziaływań sąsiadujących komórek w monowarstwie;

- pokazanie i skorelowanie układu mikrofibryl celulozowych z kształtem komórki i anizotropią ściany;

- wykazanie, że wyboczenia ścian komórkowych, zwizualizowane jako prążki na wewnętrznej, protoplastowej powierzchni ściany komórkowej są osobniczo zmienne i zależne od kształtu komórki.

Dyskusja została dobrze opracowana w oparciu o dostępną literaturę i choć miejscami zawiera powtórzenie informacji z części wynikowej, to jednak czyta się ją z przyjemnością. Kolejne wyniki są syntetycznie omówione w osobnych podrozdziałach. Należy podkreślić krytycyzm Doktorantki i ostrożność w interpretacji danych, uwzględniające ograniczenia metod badawczych i/lub możliwość wystąpienia artefaktów. Świadczy to niewątpliwie o dojrzałości naukowej Pani mgr Natonik-Białoń.

Za szczególnie ciekawą uważam dyskusję zachowania (i żywotności) komórek o zabarwionych jodkiem propidyny jądrach. Możliwość czasowej zmiany przepuszczalności błony w odpowiedzi na czynniki stresowe, takie jak zasolenie, podwyższona lub obniżona temperatura, jest procesem znanym w literaturze; analizy prowadzone przez Doktorantkę wskazują na zmiany ciśnienia osmotycznego jako kolejny, potencjalny czynnik permeabilizujący błony komórkowe. Interesująca jest ponadto interpretacja komórek o jądrach zabarwionych PI – jako komórki martwe lub jako komórki żywe. Chciałam zapytać, czy jedynym kryterium rozróżnienia obu stanów komórek było ich odmienne zachowanie podczas plazmolizy i deplazmolizy, czy też były widoczne dodatkowe symptomy świadczące o kondycji tych komórek?

Bardzo interesujący jest również podrozdział dotyczący analizy prążków na eksponowanej wewnętrznej powierzchni ściany komórkowej. W epidermie cylindrycznych organów, takich jak hypokotyl słonecznika czy koleoptyl jęczmienia, układ prążków po zniesieniu naprężeń jest

w miarę regularny ze względu na silną anizotropię odkształceń powierzchni ścian komórkowych. Ciekawa jestem, w jaki sposób Doktorantka interpretuje odmienność układu prążków u cebuli? I druga sprawa, jakie znaczenie np. dla właściwości mechanicznych komórki/tkanki może mieć powstawanie wzoru supracelularnego prążków?

Wnioski zamieszczone w części końcowej rozprawy stanowią krótkie podsumowanie najważniejszych wyników. Doktorantka odnosi się też do hipotez badawczych, sformułowanych na początku pracy; trzy z nich zostały w pełni potwierdzone, natomiast ostatnia hipoteza, dotycząca zależności anizotropii odkształceń powierzchni i układu fibryli celulozowych została potwierdzona tylko w części.

Podsumowując, uważam, że omawiana praca zawiera niewątpliwie nowe i wartościowe dla nauki dane, kompetentnie opisane w ocenianej rozprawie. Nie mam poważniejszych zastrzeżeń w stosunku do rozprawy, niewielkie uwagi krytyczne zamieściłam powyżej, a potknięcia natury edytorskiej są nieuniknione.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani magister Sandry Natonik-Białoń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Edyta Gola