

Dr hab. inż. Barbara Łotocka, prof. SGGW
Katedra Botaniki, Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-766 Warszawa

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wojciechowskiej z Wydziału Biologii UAM,
kandydatki do stopnia doktora w dyscyplinie biologia, pt. „Mechanisms of leaf and fine
root senescence in black cottonwood (*Populus trichocarpa* Torr & Gray)”**

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dziekana Wydziału Biologii UAM z dnia 20. maja 2020 r. (WB-308-19/20), powołujące się na uchwałę Rady Wydziału Biologii UAM z 21. lutego 2020r.

Praca została wykonana w Zakładzie Botaniki Ogólnej należącej do Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (UAM) pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Bagniewskiej-Zadwornej, prof. UAM.

Strona formalna pracy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zatytułowana „Mechanisms of leaf and fine root senescence in black cottonwood (*Populus trichocarpa* Torr & Gray)”. Moim zdaniem, tytuł pracy powinien być sformułowany w języku polskim (z opcjonalnym podaniem wersji angielskiej), zgodnie z tym, że całość pracy jest w języku polskim, z wyjątkiem załączonych czterech artykułów naukowych. Niemniej jednak, temat pracy doktorskiej mgr Natalii Wojciechowskiej w pełni oddaje problematykę badawczą rozprawy.

Rozprawę stanowi zbiór wspomnianych czterech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacji naukowych, w tym jednego artykułu przeglądowego i trzech oryginalnych, opublikowanych w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W każdym artykule Doktorantka jest pierwszą autorką. W skład zbioru wchodzi następujące publikacje:

1. Wojciechowska N, Sobieszczuk-Nowicka E, Bagniewska-Zadworna A. **2018**. Plant organ senescence – regulation by manifold pathways. *Plant Biology* 20.2: 167-181. DOI: [10.1111/plb.12672](https://doi.org/10.1111/plb.12672) (aktualnie 8 razy cytowany),
2. Wojciechowska N, Marzec-Schmidt K, Kalemba EM, Zarzyńska-Nowak A, Jagodziński A,

- Bagniewska-Zadworna A. **2018**. Autophagy counteracts instantaneous cell death during seasonal senescence of the fine roots and leaves in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol* **18**, 260. DOI: 10.1186/s12870-018-1439-6 (aktualnie 7 razy cytowany),
3. Wojciechowska N, Wilmowicz E, Marzec-Schmidt K, Ludwików A, Bagniewska-Zadworna A. **2020**. Abscisic acid and jasmonate metabolisms are jointly regulated during senescence in roots and leaves of *Populus trichocarpa*. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2042. DOI: [10.3390/ijms21062042](https://doi.org/10.3390/ijms21062042) (aktualnie 1 razy cytowany),
 4. Wojciechowska N, Marzec-Schmidt K, Kalemba EM, Ludwików A, Bagniewska-Zadworna A. **2020**. Seasonal senescence of leaves and roots of *Populus trichocarpa* - is the scenario the same or different? *Tree Physiology*, tpa019, DOI: [10.1093/treephys/tpaa019](https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa019) (aktualnie brak cytowań).

W tym miejscu zapewne powinnam przedstawić IF czasopism, w których Doktorantka opublikowała artykuły składające się na pracę doktorską oraz punktację tych czasopism według kryteriów MNiSW, jednak nie uczynię tego, ponieważ jestem zdecydowaną przeciwniczką stosowania tak kontrowersyjnych wskaźników do oceny uczonych. Ograniczę się jedynie do stwierdzenia, że czasopisma te reprezentują bardzo dobry poziom i są wybrane odpowiednio do tematyki artykułów.

Artykuły stanowiące podstawę rozprawy są napisane w języku angielskim. Warto zaznaczyć, że w kolejnych artykułach zauważalna jest poprawa stylu wypowiedzi, zwłaszcza czwarty artykuł jest napisany w stylu jasnym, zwięzłym i bez komplikacji stylistycznych mających znamiona polonizmów. Mam nadzieję, że jest to przejaw rosnącego doświadczenia Doktorantki w pisaniu publikacji naukowych.

Prace były finansowane w ramach dwóch grantów badawczych, w tym PRELUDIUM 2016/23/N/NZ3/00073, co Doktorantka odpowiednio odnotowała w rozprawie.

Doktorantka oraz współautorzy każdej publikacji złożyli oświadczenia dotyczące swojego wkładu w powstanie artykułów. Udział Doktorantki był w każdej z prac bardzo duży i obejmował, ogólnie: udział w opracowaniu koncepcji badań, uprawę topoli od wysiewu po kulturę ryzotronową oraz zbiór materiału (liści i korzeni), preparatykę mikroskopową w zakresie mikroskopii świetlnej, elektronowej transmisyjnej (z wyjątkiem krojenia skrawków ultracienkich i ich kontrastowania) oraz konfokalnej z zastosowaniem immunolokalizacji białek, kwasu abscysynowego i kwasu jasmonowego, wykonanie dokumentacji fotograficznej makroskopowej i mikroskopowej, analizy molekularne (Real-Time qPCR), analizy zawartości azotu i węgla oraz cukrów, analizę statystyczną wyników ilościowych oraz (z pomocą współautorów) interpretację wyników i przygotowanie publikacji. Doktorantka uczestniczyła w eksperymentach z użyciem mikromacierzy oraz w analizach Western-blot. Podsumowując: Doktorantka miała dominujący wkład w zaprojektowanie i realizację badań.

Rozprawa doktorska obejmuje kolejno streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, wprowadzenie, omówienie wyników, wnioski, podsumowanie, literaturę i oświadczenia współautorów po czym włączone są kopie 4 publikacji w kolejności podanej wcześniej. Wprowadzenie, omówienie wyników, wnioski i podsumowanie stanowią licząc 11 stron komentarz Doktorantki, łączący w całość prace stanowiące podstawę rozprawy. Wprowadzenie zawiera krótki przegląd literatury, w którym Doktorantka wyjaśniła krótko problem badawczy, a zakończone jest sformułowaniem celu pracy oraz czterech głównych zadań badawczych. Następnie na ok. 5 stronach Doktorantka podsumowała najważniejsze wyniki przeprowadzonych eksperymentów i sformułowała wnioski; ta część pracy zakończona jest spisem literatury. Moją wątpliwość budzi fakt, że publikacje stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały włączone do rozprawy bez zawartości plików suplementowych (pierwsze 3 artykuły posiadają od 1 do kilku takich plików).

Oceniam, że wszystkie kryteria dotyczące zawartości rozprawy doktorskiej zostały spełnione.

Strona merytoryczna pracy

Celem pracy było „poszerzenie wiedzy dotyczącej starzenia i zamierania korzeni chłonnych oraz zweryfikowanie hipotezy głównej zakładającej istnienie analogii w przebiegu procesu starzenia liści i korzeni chłonnych poprzez wykształcenie wspólnych mechanizmów.” Założony przez Doktorantkę cel dotyczy bardzo ciekawego procesu biologicznego: starzenia się organów u roślin – uporządkowanej i kontrolowanej, stopniowej destrukcji komórek, tkanek i organów -przemiany te są ważne ze względu na to, że umożliwiają remobilizację składników odżywczych ze starzejących się części organizmu i ich ponowne wykorzystanie. Cel jest ponadto nowatorski z uwagi na włączenie do badań korzeni chłonnych, ponieważ ogromna większość dotychczasowej wiedzy dotyczy starzenia się organów „liściopodobnych” – liści i płatków.

Doktorantka weryfikowała hipotezę główną, zgodnie z którą przebieg starzenia się korzeni chłonnych u badanego gatunku rośliny jest analogiczny do tego procesu w liściach poprzez podobne zmiany na poziomie struktury komórek i dzięki wykorzystaniu wspólnych mechanizmów regulacyjnych. Wszystkie doświadczenia konsekwentnie przeprowadzono na młodych osobnikach *Populus trichocarpa* Torr&Grey, uprawianych w częściowo kontrolowanych warunkach z wykorzystaniem ryzotronów, co zagwarantowało możliwość dostępu do korzeni chłonnych, obserwacje ich wzrostu i funkcjonowania w warunkach *in situ*. Materiał roślinny był pobierany do analiz w trzech terminach, konsekwentnie tych samych we wszystkich eksperymentach, dzięki czemu Doktorantka analizowała postęp zjawisk

związanych ze starzeniem w miarę kończenia się sezonu wegetacyjnego. Wszystkie doświadczenia zostały zaprojektowane z odpowiednimi kontrolami, przy czym „kontrolę biologiczną”, czy raczej materiał odniesienia, stanowiły liście lub korzenie chłonne w pełni funkcjonalne. W mojej opinii badanie stanu rośliny w różnych punktach czasowych jest bardzo cenne, ponieważ reakcja rośliny jest często różna w różnych organach i w różnym czasie – i takie zjawisko ujawniło się także w eksperymentach będących podstawą ocenianej rozprawy. W mojej ocenie wielką zaletą rozprawy jest konsekwencja w zaprojektowaniu eksperymentów i wykonywaniu kolejnych analiz – realizowanych wszakże przez kilka lat, a jednak systematycznie prowadzonych w tym samym układzie doświadczalnym. Dzięki temu łatwiej jest interpretować rezultaty różnych doświadczeń, a ich wyniki wzajemnie uzupełniają się. Myślę, że jest to zasługą nie tylko Doktorantki - domyślam się, że jest to efektem Jej bardzo dobrej współpracy z opiekunką naukową, która posiada i doświadczenie, i dorobek naukowy dotyczący przedmiotu pracy.

W pierwszej publikacji (przeglądowej, *Plant Biology* DOI: 10.1111/plb.12672) Doktorantka dokonała kompetentnego i obszernego (doliczyłam się 198 pozycji) przeglądu literatury przedmiotu, dzięki czemu artykuł ten jest ekwiwalentem wstępnej części tradycyjnej rozprawy doktorskiej. Artykuł jest bardzo wartościowym przeglądem wiedzy o procesie starzenia się u roślin: Doktorantka omówiła, skupiając się raczej na efemerycznych organach pędu (liście i płatki), wydarzenia charakterystyczne dla tego procesu na poziomie struktury i na poziomie molekularnym, jego związek z programowaną śmiercią komórki i zjawiskami autofagii, jego regulację hormonalną z uwzględnieniem roli cytokinin, auksyn, kwasu abscysynowego i jasmonowego oraz wpływ regulacyjny poliamin i cukrów.

W drugiej publikacji (*BMC Plant Biology* DOI: 10.1186/s12870-018-1439-6) Doktorantka i współautorzy zamieścili wyniki badań procesu starzenia się efemerycznych organów roślinnych - korzeni chłonnych. Weryfikowano hipotezę zakładającą, że w starzeniu się korzeni chłonnych biorą udział zjawiska autofagii, podobnie jak w liściach oraz, że starzenie się liści i korzeni chłonnych są skorelowane. Określono symptomy morfologiczne i anatomiczno-ultrastrukturalne starzenia w liściach i korzeniach chłonnych, wykazując obecność struktur autofagicznych, zbadano poziom ekspresji kilku genów *ATG* (niezbędnych do zachodzenia autofagii) oraz rozmieszczenie *in situ* białka ATG8, które było eksprymowane na najwyższym poziomie spośród badanych. Praca ta, jako pierwsza, udostępniła wiedzę o molekularnych aspektach starzenia się korzeni chłonnych i odkryła wyraźne podobieństwa pomiędzy różnymi organami efemerycznymi podczas starzenia się. Mój dyskomfort jako recenzenta budzą pewne niedociągnięcia tej publikacji, które powinny być wychwycone

i zlikwidowane w procesie redakcyjnym. Nie wszystkie skrótowce są rozwinięte, występują pewne tautologie (np. „tonoplast membrane”, „flower petals”), niezręczności stylu (np. „strong localization” zamiast „strong signal”) termin „theories” jest użyty zamiast „hypotheses, w podpisach rycin często brak niezbędnych informacji (np. co oznaczają gwiazdki na Fig. 1, strzałki na Fig. 9 i 10), słabo czytelne są zdjęcia wskutek ich zmniejszenia do publikacji, przez co pewne cechy struktury lub immunolokalizacji opisywane w tekście nie są dobrze widoczne. W metodyce nie zamieszczono informacji dotyczących pomiarów stereologicznych pokazanych na Fig. 4, ponadto brakuje informacji o liczbie liści lub korzeni chłonnych w próbce oraz jaka faktycznie liczba tych organów została wzięta do obserwacji mikroskopowych. Są to informacje niezbędne do ocenienia, czy wyniki tych obserwacji są reprezentatywne. (Wyprzedzając tok recenzji: podobne zastrzeżenia, ale w mniejszej liczbie, dotyczą trzeciej pracy). Wymieniając te niedociągnięcia mam pełną świadomość, że 1) są one wynikiem suboptymalnej pracy redakcji i złej praktyki dotyczącej publikowania dokumentacji mikroskopowej w czasopismach ukierunkowanych bardziej na biologię molekularną oraz że 2) nie pomniejszają one znaczących osiągnięć Doktorantki i współautorów, zawartych w omawianej pracy.

W trzeciej pracy (*Int. J. Mol. Sci.* DOI: 10.3390/ijms21062042) Doktorantka i współautorzy opublikowali wyniki badań nad rolą kwasu abscysynowego (ABA) i jasmonowego (JA) w regulowaniu starzenia się korzeni chłonnych w porównaniu do liści. Podobnie jak praca poprzednia, także i ta oparta była na wykorzystaniu kilku uzupełniających się metod: detekcji immunohistochemicznej analizowanych fitohormonów, chromatografii oraz analiz transkryptomów i mikromacierzy w celu wykrycia deregulowanych genów, w szczególności związanych z ABA i JA. Jest to bardzo ciekawa praca, zwłaszcza wyniki dotyczące porównania genów deregulowanych podczas starzenia się w liściach i w korzeniach. Chyba wbrew oczekiwaniu (moim na pewno!), okazało się, że wzór ekspresji jest w badanych organach odmienny i bardzo mało jest genów “wspólnych” dla starzenia się korzeni chłonnych i liści (Fig. 2). Podobnie wzrost zawartości ABA i JA w czasie starzenia nie był identyczny w badanych organach. Zatem pomimo podobieństw w procesie starzenia ujawnionych w pracy pierwszej, Doktorantka i współautorzy odkryli, że jego regulacja poprzez ABA i JA jest organowo-specyficzna. W dyskusji tej pracy pojawiło się przypuszczenie, że pewne odmienności charakterystyczne dla korzeni chłonnych mogą być skutkiem niebezpośredniego zaangażowania fitohormonów w regulację starzenia, ale wynikać raczej z ich zaangażowania w procesy tolerancji chłodu (ABA) i oporności na patogeny glebowe (JA). W związku z tym przypuszczeniem mam pytanie do Doktorantki: jaki był status mikoryzowy korzeni wziętych

do analiz? W rozprawie można znaleźć informację, że do napełnienia ryzotronów zastosowano glebę naturalną ze stanowisk, na których występuje topola. Mogło to skutkować nabyciem mikoryzy arbuskularnej, dlatego warto zastanowić się, czy symbioza ta nie wpłynęła na pojawienie się cech w transkryptomie słabo wytłumaczalnych samym procesem starzenia.

W czwartej pracy (*Tree Physiology* DOI: 10.1093/treephys/tpaa019) Doktorantka i współpracownicy uzupełnili dotychczasowe odkrycia o fakty, dotyczące procesu remobilizacji pierwiastków (N i C) ze starzejących się korzeni chłonnych w porównaniu do starzejących się liści. W eksperymentach ponownie wykorzystano kilka różnych uzupełniających się metod. Jest to bardzo ważna praca, ponieważ udowodniła, że remobilizacja faktycznie ma miejsce, aczkolwiek dotyczy N raczej niż C. Co ciekawe, odkryto nagromadzenie się skrobi (akumulację C) w korzeniach chłonnych. Autorzy interpretują ten fakt jako adaptację zapewniającą postęp remobilizacji w warunkach jesiennego chłodu. Z przekory recenzenckiej 😊 uprzejmie proszę Doktorantkę o przedyskutowanie tego faktu także w kontekście udziału korzeni, zwłaszcza efemerycznych, w tworzeniu ryzosfery (w literaturze można znaleźć informację, że roślina inwestuje do 12% produkcji fotosyntetycznej w stworzenie środowiska sprzyjającego funkcjonowaniu korzeni) i inwestowaniu poprzez ten proces w promowanie rozwoju mikroorganizmów korzystnych dla rośliny.

Uwagi ogólne

Oceniając całość rozprawy chcę silnie podkreślić, że stanowi ona prawidłowo zaplanowany, przeprowadzony i opisany ciąg eksperymentów o charakterze nowatorskim pod względem problematyki badawczej. Doktorantka i współpracownicy z sukcesem zmierzali się z trudnym metodycznie materiałem, wymagającym dużo pracy i cierpliwości, dzięki czemu odkryli nowe zjawiska związane z procesem starzenia się i remobilizacji pierwiastków w organach roślinnych bardzo słabo dotąd poznanych pod tym względem. Rozdział *Wyniki* w analizowanych publikacjach jest napisany precyzyjnie i jasno, co świadczy o umiejętności właściwej analizy wyników przez Doktorantkę. Ponadto na szczególną uwagę zasługuje rozdział *Dyskusja* w przedstawionych do oceny publikacjach: jest bardzo dobrze napisany, co świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w problematyce badawczej, dobrej znajomości literatury i dojrzałości naukowej. Poza tym *Konkluzje* prezentowane w ocenianych artykułach jak i *Podsumowanie* w rozprawie są syntetyczne i trafne.

Moja ocena merytorycznej strony rozprawy jest bardzo wysoka. Pragnę ponownie podkreślić, że zawarte w recenzji nieliczne zarzuty nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy.

Wniosek końcowy

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Natalii Wojciechowskiej pt. „Mechanisms of leaf and fine root senescence in black cottonwood (*Populus trichocarpa* Torr & Gray)” spełnia wszystkie wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 3. 07. 2018 (Dz.U. poz. 1669).

Na tej podstawie wnioskuję o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Natalii Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nakład pracy Doktorantki, ciekawie zaplanowane, poprowadzone i dobrze opisane eksperymenty, wykorzystanie szeregu metod badawczych, zrealizowanie celu pracy oraz ze względu na nowatorstwo wyników badań wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



dr hab. inż. Barbara Łotocka, prof. SGGW