

Prof. dr hab. Irena Gielwanowska
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie,
i.gielwanowska@uwm.edu.pl
tel. 89 523 35 13

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Rafała Marcińca

**zatytułowanej „Mikrosporogeneza u *Tinantia erecta* (Jack.) Fenzl ze szczególnym
uwzględnieniem rozdziału autonomicznych organelli komórkowych”.**

Formalny aspekt rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr. Rafała Marcińca została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Krystyny Winiarczyk, prof. UMCS, w Instytucie Nauk Biologicznych na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Forma Rozprawy jest zgodna z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym (Dz. U. z 2003 r. nr 65 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Podstawą Rozprawy jest przygotowana w języku polskim monografia. Monografia skonstruowana została w tradycyjny sposób i obejmuje typowe dla tego rodzaju opracowań informacje i rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Hipoteza i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie i wnioski, a także Spis dokumentacji fotograficznej, Bibliografię, Spis rysunków i Spis tabel.

Dodatkowo, na początku Rozprawy zamieszczono Wykaz prac, w których opublikowano część wyników badań uzyskanych podczas realizacji doktoratu. Wykaz ten obejmuje dwie współautorskie publikacje w czasopiśmie z Listy JCR (Protoplasma 2019 i 2020), dwa artykuły opublikowane poza Listą JCR oraz 5 komunikatów zjazdowych i konferencyjnych.

Na końcu Rozprawy doktorskiej znajduje się Aneks zawierający życiorys naukowy mgr. Rafała Marcińca. Zawarte są tu informacje dotyczące wykształcenia, pełny wykaz publikacji powstałych z udziałem Doktoranta (3 z Listy JCR 2018; 2019; 2020 i 2 spoza Listy A czasopism) oraz udziału mgr. Rafała Marcińca w międzynarodowych (2) i krajowych (6) konferencjach naukowych. Przedstawiony jest także udział Pana mgr. Rafała Marcińca w projektach badawczych (3 granty) realizowanych w latach 2016-2019 na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, a także informacje na temat zdobytych doświadczeń zawodowych i dydaktycznych, udziału w seminariach naukowych i szkoleniach metodycznych oraz na temat aktywności Doktoranta związanej z popularyzacją nauki.

Podsumowując uważam, że rozprawa Pana mgr. Rafała Marcińca spełnia warunki formalne.

Ocena merytoryczna rozprawy

Dotychczas dość dobrze poznano i opisano, znane od ponad 130 lat, zjawisko podziału jądra komórkowego i związane z tym procesem przemiany chromosomów. Niewiele natomiast wiadomo na temat zmian morfofizjologicznych plastydów i mitochondriów w poszczególnych stadiach rozwojowych komórek mejotycznych oraz na temat mechanizmu rozdzielania tych wysoce autonomicznych organelli komórkowych, zawierających własne DNA, do komórek potomnych. Znane są liczne przykłady świadczące o tym, że właściwe rozdzielenie organelli do komórek pomejotycznych warunkuje prawidłowe formowanie i funkcjonowanie gamet. Wiadomo również, że różnego rodzaju zaburzenia w tym procesie prowadzą najczęściej do powstawania niepełnowartościowego pyłku. Uważam w związku z tym, że badanie tych zagadnień jest niezwykle istotne i ważne dla nauk podstawowych.

Niewątpliwie, do najbardziej wartościowych wyników Pana mgr. Rafała Marcińca, przedstawionych w rozprawie doktorskiej należą:

1. Zaobserwowanie i opisanie po raz pierwszy u *Tinantia erecta*, jedyne przedstawiciela spośród Commelinaceae, zmian cytoplazmatycznych w mikrosporocytach oraz budowy męskiego gametofitu u tego gatunku.

Opisane w pracy przemiany cytoplazmatyczne w komórkach mejotycznych dotyczyły: (i) zjawiska chondriokinezy obejmującego przemieszczenia plastydów i mitochondriów w mikrosporocytach, ich równomiernego rozpraszania się w cytoplazmie, tworzenia organellowej płytki oraz precyzyjnego rozdzielania organelli do czterech komórek pomejotycznych; (ii) przeorganizowania elementów tubulinowego i aktynowego

cytoszkieletu towarzyszącego przemianom jądra komórkowego i chromosomów oraz autonomicznym organelom cytoplazmatycznym, plastydom i mitochondriom.

2. Opisanie zmian ultrastukturalnych i morfofizjologicznych w komórkach tapetum pylnikowego podczas rozwoju męskiego gametofitu u *Tinantia erecta*.

Podjęcie tej problematyki przez Doktoranta jest wartościowe i interesujące. Chciałabym podkreślić, że dotychczas nie zostały jednoznacznie opisane mechanizmy kontrolujące procesy chondriokinezy w komórkach mejotycznych roślin kwiatowych. Jedynie w kilku publikacjach autorzy zwracają uwagę na udział elementów cytoszkieletu w procesie przemieszczania się organelli, ich skupiania się i rozpraszania. Nie znamy również mechanizmu odpowiedzialnego za precyzyjny rozdział plastydów i mitochondriów, a tym samym, przekazywania plastydowego i mitochondrialnego DNA do czterech komórek pomejotycznych w mikrosporogenezie. Wiemy natomiast, jakie mogą być konsekwencje nieprecyzyjnego rozdzielenia organelli w procesie wytwarzania ziaren pyłku. *W tym miejscu chciałabym prosić Doktoranta o przedstawienie kilku najnowszych przykładów literaturowych wyników badań na temat skutków nieprawidłowego rozdzielenia plastydów i mitochondriów do komórek pomejotycznych u roślin kwiatowych.*

Analiza zawartości merytorycznej Rozprawy pozwala wyróżnić siedem zasadniczych części stanowiących kompendium i syntezę informacji na temat badanego gatunku, wykorzystanych metod badawczych, wyników obserwacji oraz dyskusji zaobserwowanych zjawisk będących przedmiotem rozprawy. Streszczenie (w języku polskim i angielskim) zwięźle charakteryzuje całość rozprawy doktorskiej. Jest zbiorem najważniejszych i dobrze, poprawnie opisanych wyników badań. W rozdziale Wstęp, Autor prezentuje aktualny stan wiedzy na temat rozwoju męskiego gametofitu u Angiospermae. Szeroko i wyczerpująco przedstawia zasadnicze procesy przebiegające w mikrosporocytach, czyli kariokinezę, cytokinezę oraz chondriokinezę u roślin kwiatowych. Szczególną uwagę zwraca na dotychczasowe badania opisujące przegrupowania plastydów i mitochondriów w kolejnych stadiach mikrosporogenezy oraz tworzenie charakterystycznych organelowych agregatów, np. w postaci mniej lub bardziej zwartych, półpierścieniowych czy pierścieniowych skupień na wysokości metafazowych grup biwalentów lub chromosomów, lub telofazowych zwartych płytek plastydowo-mitochondrialnych. Autor szczegółowo przedstawia typologię procesu chondriokinezy zaproponowaną przez Bąkowskiego w 1938 roku, zmodyfikowaną i uzupełnioną przez nielicznych autorów, m.in., przez Dorotę Tchórzewską w 2017 roku.

Doktorant podkreśla jednocześnie, że w literaturze całkowicie brak jest tego typu informacji na temat mikrosporocytów *Tinantia erecta*.

W dalszej części Wstępu, Doktorant skupił się na analizie problemu cytoplazmatycznego dziedziczenia u roślin kwiatowych. Podkreśla, że na podstawie dotychczasowych wyników badań wiadomo, że mitochondria i plastydy są dziedziczone niezależnie, prawdopodobnie pod kontrolą własnego organelowego DNA. Dodatkowo, w obrębie jednego gatunku mogą mieć miejsce wszystkie rodzaje dziedziczenia organelli, tzn. matczyne, ojcowskie oraz mieszane. Jako przykłady Autor podaje, m.in., np. *Musa acuminata*, u którego występuje ojcowskie dziedziczenie mtDNA przy jednoczesnym matczynym dziedziczeniu plastydów oraz *Medicago sativa* i *Actinidia deliciosa*, u których stwierdzono oburodzicielskie dziedziczenie chlDNA i matczyne mtDNA. ***W trakcie recenzji tej części pracy nasunęło mi się pytanie. Jakie wzory cytologicznego przygotowania gametofitów i gamet do odpowiedniego rodzaju dziedziczenia plastydów i mitochondriów wśród roślin kwiatowych opisano dotychczas w literaturze?***

Wstęp Rozprawy stanowi rzetelne wprowadzenie do realizowanych badań i pozwala w pełni zorientować się w aktualnym stanie wiedzy na temat kluczowych zmian cytoplazmatycznych w mikrosporocytach i komórkach gametofitu męskiego roślin kwiatowych, związanych z przekazywaniem autonomicznych organelli do komórek i organizmów potomnych. Ta część pracy napisana jest zwięźle i wyczerpująco, z wykorzystaniem licznych współczesnych publikacji naukowych, wprowadzając w zagadnienia obejmujące temat pracy, stanowiąc jednocześnie podstawę do podjęcia opisywanych badań.

W rozdziale Materiały i Metody, Doktorant omawia badany materiał roślinny oraz metody i techniki badawcze wykorzystane w badaniach. Przedstawione materiały zostały dobrane adekwatnie do realizowanych prac. Chciałabym szczególnie podkreślić szeroki wachlarz stosowanych w pracy metod. Były to obserwacje mikroskopowe prowadzone z wykorzystaniem licznych technik histochemicznych oraz immunocytochemicznych (mikroskopia świetlna zwykła oraz fluorescencyjna, w tym konfokalna, a także mikroskopia elektronowa transmisyjna i skaningowa) oraz badania genetyczne i zróżnicowane analizy statystyczne.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób jasny, czytelny i wyczerpujący. Doktorant precyzyjnie opisał cechy morfologiczne *Tinantia erecta*. Skupił się głównie na cechach

zróznicowanego pręcikowia. Zauważył, że mimo występujących różnic w budowie zewnętrznej pylników, budowa anatomiczna i cytologiczne cechy komórek macierzystych pyłku oraz poszczególne mikrospory nie wykazywały różnic. Dojrzałe, bezporusowe, jednobruzdowe ziarna pyłku *T. erecta* w momencie wypylecia zawierały dwukomórkowe gametofity męskie. Kolejne stadia mikrosporogenezy ze szczególnym uwzględnieniem chondriokinezy Doktorant opisał bardzo szczegółowo i poprawnie. Zauważył, że we wczesnoprofazowych mikrosporocytach nieliczne organella, początkowo rozmieszczone równomiernie w cytoplazmie, gromadziły się po jednej stronie jądra komórkowego. Następnie, w metafazie I podziału rozpraszają się i były rozmieszczone głównie w peryferycznej części cytoplazmy komórki mejotycznej. W anafazie pierwszej, plastydy i mitochondria gromadziły się w przestrzeni pomiędzy grupami chromosomów i formującymi się jądrami komórkowymi, a w I telofazie tworzyły już płytkę plastydowo-mitochondrialną w równikowej płaszczyźnie mikrosporocytu. W obrębie organellowej płytki, centryfugalnie, zakładała się przegroda pierwotna i budowana była ściana komórkowa, a organella zostały ostatecznie precyzyjnie rozdzielone pomiędzy dwie komórki diady. W cytoplazmie komórek diady plastydy i mitochondria rozpraszają się, a po drugim podziale mejotycznym były równomiernie rozdzielone do każdej z mejospor. Jednocześnie, Doktorant zaobserwował zmiany morfofizjologiczne w plastydach i mitochondriach w kolejnych stadiach mikrosporogenezy. Uwidoczniał występowanie skrobi w plastydach oraz zmiany gęstości macierzy związane prawdopodobnie ze zmianami konformacyjnymi w mitochondriach.

Bardzo dobrym uzupełnieniem precyzyjnych opisów, zarówno chondriokinezy, jak i procesów morfofizjologicznych zaobserwowanych podczas prowadzonych badań, są doskonałej jakości, liczne foto- i elektronogramy umieszczone na 29 Tablicach Rozprawy. Opisy Tablic są skromne, ale jasne i czytelne. Stanowią one cenną dokumentację opisywanych zmian cytoplazmatycznych w obrębie mikrosporangium *T. erecta*.

Oprócz zmian w komórkach mejotycznych Autor dokładnie opisał przemiany w komórkach tapetalnych badanego gatunku. Zauważył, że tapetum *T. erecta* należy zakwalifikować do typu ameboidalnego. Szczególną uwagę Autor zwrócił na pojawianie się w wakuolach komórek tapetalnych licznych, igłokształtnych rafidów. Zauważył, że liczba kryształów szczawianu wapnia zmniejszała się wyraźnie w miarę dojrzewania komórek tapetum. Kolejnym interesującym zagadnieniem opisanym w pracy i bardzo dobrze, czytelnie udokumentowanym, są zmiany konfiguracji elementów cytoszkieletu, zestawu

mikrofilamentów aktynowych oraz figur tworzonych przez zestawy mikrotubul. Autor podkreślił, że mikrofilamenty aktynowe tworzyły kolejno, sieć kortykalną w profazowych mikrosporocytach, zwarte pasmo oddzielające jądra potomne w telofazie I oraz długie włókna aktynowe pomiędzy potomnymi jądrami komórkowymi w telofazie II. Natomiast mikrotubule w mikrosporocytach *T. erecta*, formowały charakterystyczne dla mikrosporogenezy u roślin kwiatowych, trzy podstawowe konfiguracje. Była to sieć mikrotubul w profazie I, wrzeciono kariokinetyczne w metafazie I i II oraz fragmoplast w telofazie pierwszego i drugiego podziału mejotycznego.

Dyskutując otrzymane wyniki i dane literaturowe, Pan mgr Rafał Marciniec szeroko omówił, porównał i podsumował obecny stan wiedzy na temat wykształcania mikrospor oraz powstawania i budowy gametofitu męskiego wśród roślin kwiatowych, głównie przedstawicieli Commelinaceae. Zwrócił uwagę, że w dostępnej literaturze naukowej brak jest opracowań na temat wytwarzania pełnowartościowych ziaren pyłku przez zróżnicowane morfologicznie i funkcjonalnie pręciki u roślin kwiatowych oraz podkreślił, że wśród przedstawicieli Commelinaceae przeważają gatunki ze zróżnicowanymi morfologicznie pręcikami, które wytwarzają jednorodne ziarna pyłkowe, jak u badanego gatunku *T. erecta*, ale są również gatunki, które wytwarzają zróżnicowane pod względem morfologicznym ziarna pyłkowe.

Ciekawym zagadnieniem i niewątpliwym osiągnięciem Doktoranta, było zaobserwowanie i udokumentowanie sekwencji zmian w obrębie chondriomu podczas mikrosporogenezy w pylnikach *T. erecta*. Autor podkreśla, że proces chondriokinezy, przebiegający z taką samą precyzją jak rozdział chromosomów podczas kariokinezy, gwarantuje równomierne rozdzielenie organelli pomiędzy komórki tetrady przyczyniając się w ten sposób do wytworzenia aktywnych metabolicznie mikrospor. Podkreśla jednocześnie, że struktury chondriomu, takie jak otoczka, pierścieniowaty agregat, czy płytka, wypełniając pewien obszar cytoplazmy komórki mejotycznej, pełnią istotną rolę i przyczyniają się do prawidłowego przebiegu podziału mejotycznego w komórkach macierzystych gametofitu męskiego u *T. erecta*, ale także u innych gatunków roślin, zwłaszcza u gatunków z cytokinezą sukcesywną w mikrosporogenezie. Słusznie zauważa, że skupiska organelli tworzone w obszarze pomiędzy grupami chromosomów oraz jądrami komórkowymi mogą zapobiegać fuzji jąder komórkowych w I telofazie oraz łączeniu się mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego w metafazie II i jąder komórkowych w II telofazie.

Kolejnym interesującym zagadnieniem diskutowanym w pracy, jest zależność pomiędzy plastydami, a przeorganizowaniem elementów szkieletu cytoplazmatycznego, mikrotubularnego i towarzyszącego mu systemu mikrofilamentów aktynowych. Na podkreślenie zasługuje tu rzetelne i pełne udokumentowanie sekwencji zmian, zarówno w obrębie cytoszkieletu aktynowego, jak i tubulinowego w kolejnych stadiach dzielących się mejotycznie komórek *T. erecta* z wykorzystaniem skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego. Przygotowanie tak doskonałej, starannej i pełnej dokumentacji z pewnością wymagało od Doktoranta wykonania niezliczonej liczby preparatów mikroskopowych bardzo dobrej jakości, a także wiedzy i umiejętności związanych z wykorzystaniem najbardziej nowoczesnej aparatury badawczej.

Szeroko przeprowadzone badania, po dyskusji wyników i danych literaturowych, zostały logicznie i zwięźle podsumowane.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr. Rafała Marcińca jest wieloaspektowym, bardzo interesującym opracowaniem naukowym, stanowiącym istotny wkład w poznanie procesów embriologicznych u roślin kwiatowych. Doktorant wykazał się znajomością warsztatu laboratoryjnego, zdolnością wnikliwego, dociekliwego obserwowania i dokumentowania oraz syntezą danych.

W związku z tym uważam, że recenzowana Rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w art. 13 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.). W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej wniosek o dopuszczenie Pana mgr. Rafała Marcińca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 02.09.2020

Marek Cydzikowski

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII
Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin
10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 1A
tel. 89 523 48 24, 89 523 49 52, fax 89 523 48 81