

Prof. dr hab. Elżbieta Bednarska-Kozakiewicz
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

Toruń, 23.06.2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Aleksandry Leszczuk pt. „Immunolokalizacja białek arabinogalaktanowych w zalążkach truskawki *Fragaria x ananasa* Duch. odmiany ‘Mount Everest’” wykonanej w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin UMCS w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Ewy Szczuki, prof. nadzw. UMCS

Uwagi ogólne

Rozprawa doktorska mgr Agaty Leszczuk włącza się w nurt badań zmierzających do poznania mechanizmów decydujących o sukcesie reprodukcyjnym roślin okrytonasiennych. Wybór truskawki jako modelu badawczego wskazuje, że badania te dodatkowo mogą mieć aspekt aplikacyjny. Rozwój zalążka, w tym różnicowanie płodnych woreczków zalążkowych, oraz zapłodnienie i rozwój zarodka są skomplikowanymi, wciąż niedostatecznie poznanymi procesami interakcji między somatycznymi i generatywnymi komórkami zalążka, a następnie z łagiewką pyłkową. W obszarze tej problematyki prowadzone są m.in. badania zmierzające do poznania roli elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, zarówno w różnicowaniu komórek zalążka oraz rozwoju gametofitu męskiego, jak i podczas zapłodnienia i embriogenezy. Elementem ECM o szczególnej roli są arabinogalaktoproteiny. AGP to wielce zróżnicowana grupa białek, które mogą być bądź związane z dwuwarstwą lipidową błony za pomocą kotwicy GPI, bądź być uwalniane do ściany, gdzie mogą pełnić wielorakie funkcje, np. sygnalizacyjne, odżywcze itp. W tym kontekście badanie wzorca lokalizacji AGP o odmiennych epitopach cukrowych w różnicującym się zalążku stanowi ciekawy i ważny problem badawczy.

Recenzja szczegółowa

Recenzowana rozprawa liczy wraz z opisami dokumentacji 120 stron maszynopisu. Dokumentację przedstawiono w formie XXIX tablic, na których zamieszczono 158 zdjęć, spis literatury obejmuje 166 pozycji. Treść pracy podzielono na rozdziały,

których układ jest typowy dla prac eksperymentalnych – Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Abstrakt i Literatura.

Wstęp napisany jest prostym, naukowym językiem, jego treść stanowi dobre wprowadzenie do problematyki badawczej dysertacji. Rozdział ten Autorka rozpoczęła od najbardziej ogólnych zagadnień takich jak różnorodność rozmnażania roślin, omawiając szczegółowo formy rozmnażania u badanego rodzaju *Fragaria*, u którego opisano zarówno rozmnażanie płciowe jak i apomiktyczne. Następnie w sposób syntetyczny przedstawiła budowę ściany komórkowej, w tym budowę i funkcje elementów strukturalnych oraz elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Ostatnią, najobszerniejszą część Wstępu poświęciła omówieniu stanu wiedzy nt. budowy i funkcji AGP. W tym podrozdziale Autorka dokonała przeglądu literatury dotyczącej występowania i roli AGP w organach rozmnażania u roślin nasiennych.

Omawiane we Wstępie zagadnienia są przedstawione w sposób rzeczowy, co świadczy iż Doktorantka dobrze teoretycznie przygotowała się do wykonania badań i zna dane literaturowe dotyczące obranej przez siebie problematyki badawczej.

Cel pracy

Autorka postawiła sobie trzy cele badawcze, które są precyzyjnie sformułowane. Było to (1) poznanie kolejnych etapów różnicowania zalążka, (2) immunolokalizacja AGP w komórkach różnicującego się zalążka, (3) określenie **funkcji** AGP podczas rozwoju zalążka. Mam zastrzeżenie (dyskusyjne) do trzeciego celu – Doktorantka na podstawie analizy dystrybucji AGP mogła domniemywać/proponować funkcje tych białek i rzeczywiście tak najczęściej robiła w Dyskusji. Faktyczne określenie funkcji AGP wymagałoby np. badań na mutantach genów kodujących poszczególne białka.

Materiał i metody

Rozdział ten został napisany poprawnie, wszystkie zastosowane techniki opisano bardzo szczegółowo. Do badań anatomicznych i cytologicznych Autorka wykorzystwała proste metody takie jak barwienie preparatów błękitem toluidyny i reakcję PAS. Budowę słupków *Fragaria x ananasa* pokazano wykorzystując technikę elektronowej mikroskopii skaningowej. Lokalizację AGP przeprowadzono przede wszystkim techniką immunofluorescencyjną z użyciem trzech monoklonalnych przeciwciał JIM13, JIM15 oraz MAC207. Przeciwciało JIM13 użyto także do badań na poziomie ME, lecz tylko w wybranych komórkach, przede wszystkim do potwierdzenia

obecności AGP w amyloplastach i wakuolach z druzami. Podsumowując praca została wykonana stosunkowo prostymi metodami, ale poprawnie dobranymi do określenia anatomii rozwijającego się zalążka oraz poznania lokalizacji badanych AGP w jego komórkach.

Wyniki

W rozdziale Wyniki Doktorantka opisała i udokumentowała na mikrofotografiach kolejne etapy dojrzewania zalążka otoczonego ścianą zalążni. Analizie poddała wszystkie elementy strukturalne, tj. ścianę zalążni, osłonkę oraz ośrodek. Badania te pozwoliły stwierdzić, że u *Fragaria x ananasa* w zalążni z reguły rozwija się jeden gruboosrodkowy zalążek, a nucelus otoczony jest pojedynczą osłonką. Zatem rozwój zalążka u badanego gatunku w zasadzie nie odbiega od rozwoju zalążków u innych gatunków tego rodzaju. Szczególną uwagę poświęciła komórkom linii generatywnej – od wielokomórkowego archesporu poprzez wyróżnicowanie megasporocytu, następnie komórki powstałe w wyniku podziału mejotycznego (diady, triady/tetrazy) aż do rozwoju megaspori funkcjonalnej w woreczek zalążkowy, w którym po zapłodnieniu rozwijał się globularny zarodek. Analizę badań anatomicznych Autorka podsumowała stwierdzeniem, że u *Fragaria x ananasa* woreczek zalążkowy rozwija się wg typu Polygonum. Z kolei w Wynikach opisuje również jako megasporę funkcjonalną komórkę zlokalizowaną na mikropylarnym biegunie zalążka. Czy jest to odstępstwo od reguły?

W każdym z badanych stadiów rozwoju zalążka Doktorantka określiła lokalizację AGP rozpoznawanych przez monoklonalne przeciwciała wiążące epitopy cukrowe tych białek: JIM13, JIM 15 oraz MAC207. Uważam, że wyniki tych badań są najbardziej interesujące. Ujawniły bowiem wzorzec dystrybucji badanych AGP w komórkach ściany zalążni oraz w poszczególnych elementach strukturalnych zalążka podczas jego rozwoju. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła Autorce wykazać, że w **komórkach linii generatywnej:**

- AGP wiążące przeciwciała JIM13 obecne są w ścianie różnicujących się komórek archesporialnych oraz w ścianie megasporocytu, co wskazuje na ich udział w determinacji w ośrodku tych komórek, które mogą wejść (komórki archesporialne), a następnie wchodzi na drogę rozwoju generatywnego (megasporocyt),
- AGP rozpoznawane zarówno przez przeciwciała JIM13 jak i JIM15 występują w ścianie megaspori funkcjonalnej, co wskazuje na ich zaangażowanie w

proces selekcji megaspory rozwijającej się w gametofit (megaspory funkcjonalnej),

- występowanie AGP rozpoznawanych przez przeciwciała JIM13 i JIM15 w ścianie woreczka zalążkowego wskazuje, że są one markerem żeńskiego gametofitu,
- w 7-komórkowym woreczku zalążkowym badane AGP obecne są zarówno w ścianie gametofitu jak i w cytoplazmie komórek aparatu jajowego i komórki centralnej; można zatem przypuszczać że cytoplazmatyczna pula tych białek uczestniczy w procesie podwójnego zapłodnienia,
- AGP zlokalizowane w komórkach linii generatywnej mogą również uczestniczyć w interakcji z somatycznymi komórkami nucelusa.

Na załączonych mikrofotografiach praktycznie brak sygnału badanych AGP w ścianie otaczającej i oddzielającej komórki diady i młodej tetrady (Tabl. XIII i IX). Białka te lokalizowano dopiero w ścianach triad/tetrad z różnicującą się megasporą funkcjonalną. Szkoda, że Doktorantka nie przedyskutowała tego wyniku w kontekście znanych zmian w budowie ścian komórkowych podczas megasporogenezy, tj. obecności ściany kalozowej, która ulega lizie po zakończeniu mejozy.

Komórki somatyczne

W komórkach **nucelusa** szczególne nagromadzenie AGP wiążących JIM13 i JIM15 występowało w ścianach pionowej warstwy komórek od mikropylarnego szczytu ośrodka do woreczka zalążkowego. Uzasadniony jest zatem wniosek, że taka lokalizacja wskazuje na ich udział w wytwarzaniu odpowiedniego środowiska dla rosnącej łagiewki pyłkowej i jej ukierunkowaniu na gametofit. Na podstawie obecności sygnału, tym razem wszystkich użytych przeciwciał wokół i w ziarnach skrobi, Doktorantka sugeruje, że AGP mogą uczestniczyć w mobilizacji rezerw pokarmowych zgromadzonych w komórkach ośrodka. Oczywiście nie można wykluczyć tej hipotezy, tym bardziej że jest dyskutowana w świetle doniesień literaturowych, jednakże w świetle moich doświadczeń w stosowaniu technik immunocytochemicznych, powinna zostać zweryfikowana przez zastosowanie reakcji kontrolnych. Skrobia jest niezwykle immunogenna i mogą „lepić się” do niej różne niespecyficzne przeciwciała.

Bardzo interesująca jest obecność AGP rozpoznawanych przez JIM13 w warstwie komórek ściany zalążni, w których występują druzy. Wiadomo, że AGP mają zdolność wiązania wapnia, więc jest prawdopodobne że biorą udział w metabolizmie

wapniowym w miejscu, gdzie jony te są immobilizowane w kryształach szczawianu wapnia.

Po zapłodnieniu wszystkie badane AGP lokalizowano w ścianach wieszadełka i różnicującego się globularnego zarodka oraz bielma. Na tablicach XXVIII i XXIX zamieszczono zdjęcia, które pokazują że w tym stadium rozwoju załążka po raz pierwszy silny sygnał pochodzi od epitopów wiążących przeciwciało MAC207 - z komórek zarodka i szczególnie bielma. Obecność sygnału MAC207 w zarodku i bielmie znalazła się w opisie zdjęć, ale szkoda że Doktorantka nie podjęła tego zagadnienia w Dyskusji. Na podstawie zamieszczonej dokumentacji proponuję zwrócić uwagę na zmianę wzorca badanych AGP. Podczas gdy przed zapłodnieniem sygnał AGP rozpoznawanych przez MAC207 był bardzo niski lub całkowicie nie był widoczny, po zapłodnieniu staje się wysoki w zarodku i bielmie. Chciałabym poznać opinię Doktorantki na ten temat.

W **Dyskusji** pani Leszczuk w sposób uporządkowany omówiła uzyskane wyniki i skonfrontowała je z piśmiennictwem dotyczącym badanego problemu.

Tok prowadzenia dyskusji jest poprawny, Autorka kolejno przedyskutowała przypuszczalne funkcje badanych AGP w okresie od wyróżnicowania archesporu do rozwoju zarodka. Wszystkie proponowane funkcje zostały poparte danymi literaturowymi. Proszę w tym miejscu Doktorantkę o ustosunkowanie się do omawianych w Dyskusji dwu przeciwstawnych funkcji arabinogalaktoprotein: AGP rozpoznawane przez te same przeciwciała są proponowane zarówno jako markery komórek rozwijających się (megasporocyt, megaspora funkcjonalna) jak i komórek degenerujących.

Wnioski wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych badań są poprawne, ale w mojej ocenie jest ich zbyt wiele (15). Może należałoby w jednym wniosku określić typ rozwoju załążka i woreczka załążkowego, a w kilku następnych - bez podsumowywania wyników - proponowane funkcje badanych AGP.

Pod względem redakcyjnym praca napisana jest jasnym, poprawnym językiem, aczkolwiek byłaby bardziej przejrzysta dla czytelnika, gdyby osobny rozdział poświęcono opisowi rozwoju załążka ze wskazaniem na to co jest typowe, a co obserwowano sporadycznie.

- Mam natomiast uwagę do zamieszczonej dokumentacji. Dlaczego fotografie przedstawiające anatomię załążka są odpowiednio duże, natomiast te po reakcjach immunofluorescencyjnych często bardzo małe?

- W Dyskusji Doktorantka pisze, że u truskawki może dochodzić do rozwoju woreczków zalążkowych na drodze apomiksji. Szkoda, że w opisie wyników nie ma informacji, które z analizowanych megaspor funkcjonalnych prawdopodobnie są pochodzenia apomiktycznego. Czy te pokazane na Fot. 69?
- Na str. 16 Autorka określa AGP raz jako glikoproteiny raz jako proteoglikany. W moim odczuciu pojęcia te nie są synonimami. O glikoproteinach mówimy wtedy gdy część cukrowa cząsteczki jest mniejsza niż białkowa, natomiast w proteoglikanach jest odwrotnie, a jak sama Doktorantka napisała w AGP łańcuch białkowy stanowi tylko ok. 10%, 90% to reszty cukrowe.
- U roślin poprawne pojęcie to **nasiono** a nie nasienie.

Moje uwagi w większości są dyskusyjne i zostały przedstawione głównie w celu udoskonalenia analizy otrzymanych przez Doktorantkę wyników.

Reasumując uważam, że rozprawa doktorska pani mgr Agaty Aleksandry Leszczuk wnosi nowe dane do poznania udziału białek AGP w rozwoju zarodka, szczególnie komórek linii generatywnej i zarodka. Przedstawiona praca wskazuje, że Autorka dobrze opanowała klasyczne metody cytologiczne i nowoczesną technikę immunocytochemiczną na poziomie mikroskopu konfokalnego i elektronowego. Pracę oceniam pozytywnie uważając, że spełnia ona wymagania **ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami)**. Stawiam w związku z tym wniosek do Wysokiej Rady o opuszczenie Doktorantki do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

