

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Agaty Aleksandry Leszczuk pod tytułem
Immunolokalizacja białek arabinogalaktanowych w zalążkach truskawki
Fragaria x ananassa Duch. odmiany 'Mount Everest'
wykonanej w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu
Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii
pod kierunkiem dr hab. Ewy Szczuki, prof. nadzw. UMCS

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest ważną i nowatorską pozycją, istotną do poznania zagadnień związanych z immunolokalizacją białek arabinogalaktanowych w zalążkach truskawki.

Białka arabinogalaktanowe są grupą niskocząsteczkowych, rozpuszczalnych w wodzie zewnątrzkomórkowych glikoprotein, zlokalizowanych w ścianie komórkowej różnych organów roślin od strony pazmolemy, w której zakotwiczone są za pomocą fragmentu glikozylofosfatydilinozytolu. Białka arabinogalaktanowe mogą pośrednio oddziaływać z cytoszkieletem. Ekspresja tych białek w tkankach jest regulowana rozwojowo. Oprócz wielu innych funkcji (np. udział w procesie ryzogenezy i embriogenezy somatycznej) białka te odgrywają istotną rolę w procesie rozmnażania generatywnego, jako cząsteczki adhezyjne i chemotaktyczne. Pełnią rolę cząstek sygnałnych między komórkami zalążka podczas ich rozpoznawania się. Białka arabinogalaktanowe są wydzielane i podlegają ekspresji pod kontrolą haploidalnego genomu w dojrzałym woreczku zalążkowym po stronie mikropylarnej. Są obecne w płodnym gametoficie, ale równocześnie znakują miejsce aparatu jajowego, w kierunku wzrostu łagiewki pyłkowej. Dostarczają substancje odżywcze dla rozwijającego się zarodka oraz kontrolują prawidłowy podział jego komórek. Ponadto białka arabinogalaktanowe obecne w komórkach sznureczka ukierunkowują łagiewkę pyłkową. Arabinogalaktany, jako składnik ściany komórkowej aktywują niektóre typy komórek układu

odpornościowego, co może wskazywać na ich znaczenie farmakologiczne. Zróżnicowana struktura arabinogalaktanów decyduje o aktywności biologicznej. Możliwe jest manipulowanie ich syntezą i degradacją w celu uzyskania jak najlepszego efektu terapeutycznego.

Rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim z dołączonym streszczeniem w języku angielskim. Zawiera 120 numerowanych stron maszynopisu. Obejmuje 9 głównych rozdziałów podzielonych na podrozdziały pierwszego i drugiego stopnia. Treść rozprawy odpowiada tytułowi. Całość pracy została logicznie podzielona i rozmieszczona oraz zaprezentowana w poszczególnych rozdziałach we właściwy sposób, typowy dla eksperymentalnych prac badawczych.

Zamieszczony na początku pracy wykaz skrótów znacznie ułatwia czytelnikowi analizę i interpretację tekstu. W liczącym 23 strony, złożonym z 4 podrozdziałów pierwszego stopnia i 10 podrozdziałów drugiego stopnia, rozdziale WSTĘP Autorka przystępnie i zwięźle przedstawiła, w oparciu o najnowszą literaturę, ogólne informacje dotyczące badanych i opisanych w rozprawie zagadnień. Poruszyła między innymi problematykę dotyczącą różnorodności procesu rozmnażania roślin okrytozalążkowych, form rozmnażania przedstawicieli z rodzaju *Fragaria* oraz budowy ściany komórkowej roślin ze zwróceniem szczególnej uwagi na zagadnienia z zakresu występowania, właściwości, budowy oraz lokalizacji i funkcji białek arabinogalaktanowych. Tekst rozdziału wstęp wzbogacono w 2 obszerne tabele dotyczące lokalizacji białek arabinogalaktanowych w rozwoju gametofitu męskiego u 19 i żeńskiego u 17 gatunków roślin oraz 4 przejrzyste i kolorowe ryciny przedstawiające strukturę ściany komórkowej i cząsteczki białka arabinogalaktanowego oraz funkcje tego białka. Zamieszczony we wstępie materiał ilustracyjny znacznie ułatwia czytelnikowi zrozumienie zawartych treści.

W rozdziale CEL PRACY Autorka jasno przedstawiła i sprecyzowała założenia pracy. Główne cele badań zostały zrealizowane. W liczącym 7 stron, złożonym z 6 podrozdziałów pierwszego stopnia i 4 podrozdziałów drugiego stopnia, rozdziale MATERIAŁ I METODY w oparciu o dane literaturowe, przedstawiono charakterystykę oraz pochodzenie badanej truskawki - *Fragaria x ananassa* Duch. 'Mount Everest' wskazując również na miejsce pozyskania materiału badawczego oraz lata prowadzenia badań (2012 – 2015). Opis zastosowanych metod jest przedstawiony poprawnie i czytelnie. Autorka skrupulatnie wypunktowała zakres prowadzonych badań. Szczegółowo opisała technikę preparatyki wykorzystaną w mikroskopii świetlnej jasnego pola, laserowej skaningowej konfokalnej oraz elektronowej skaningowej i transmisyjnej. W przeprowadzonych badaniach Autorka

zastosowała między innymi reakcję PAS, metodę immunocytochemiczną z użyciem przeciwciał monoklonalnych (JIM13, JIM 15, MAC207) oraz metodę immunozłotową. Zakres prowadzonych badań był szeroki i obejmował między innymi różne aspekty immunolokalizacji białek arabinogalaktanowych w różnych stadiach rozwojowych zalążka (megasporogeneza, megagametogeneza). Na szczególne podkreślenie zasługuje opanowanie wielu technik mikroskopowych, bardzo żmudne i pracochłonne przygotowanie preparatów półcienkich i ultracienkich oraz zebranie bogatej dokumentacji badań.

Najobszerniejszy z rozdziałów WYNIKI liczy łącznie 76 stron, w tym 47 stron maszynopisu i 29 tablic. Został podzielony na 7 podrozdziałów pierwszego stopnia. W rozdziale tym Autorka przedstawiła wyniki dotyczące budowy kwiatu oraz lokalizacji białek arabinogalaktanowych w różnych stadiach rozwojowych zalążka tj. w młodym zalążku, podczas różnicowania się woreczka zalążkowego, w dojrzałym woreczku zalążkowym i w zalążku z rozwijającym się zarodkiem. Przedstawiła również dane dotyczące obecności kryształów szczawianu wapnia w ścianie zalążni i lokalizacji ziaren skrobi w zalążku.

Autorka uzyskała bardzo bogaty i wartościowy materiał, który starannie zestawiała i umiejętnie zaprezentowała w formie czytelnych, logicznie ułożonych i prawidłowo wkomponowanych w tekst 29 tablic, obejmujących łącznie 158 fotografii. Cenną częścią tego rozdziału są dobrej jakości mikrofotografie z obserwacji w różnych rodzajach mikroskopów. W pracy zamieszczono 3 makrofotografie i 5 fotografii z mikroskopu stereoskopowego prezentujące pokrój roślin i budowę kwiatów, 4 - ze skaningowego mikroskopu elektronowego przedstawiające zalążnię, szyjkę i znamię słupka, 12 - z transmisyjnego mikroskopu elektronowego obrazujące ściany zalążni i fragmenty komórek ośrodka zalążka, w których po zastosowaniu metody immunozłotowej potwierdzono obecność białek arabinogalaktanowych. Na pozostałych 134 fotografiach w tym 61 z mikroskopii świetlnej jasnego pola i 73 (fluorescencja) z laserowej skaningowej mikroskopii konfokalnej, Autorka zaprezentowała immunolokalizację białek arabinogalaktanowych w różnych stadiach zalążka jak również występowanie ziaren skrobi w zalążku i kryształów szczawianu wapnia w ścianie zalążni. Bardzo dużo uwagi poświęciła strukturze zalążka z uwzględnieniem immunolokalizacji białek. Prawidłowy opis ilustracji i właściwe oznaczenia wskazują na dobrą znajomość anatomii i cytologii roślin. Rozdział wyniki przygotowano z wyjątkową starannością i dbałością o szatę graficzną. Zawiera on wiele cennych danych przedstawionych w sposób bardzo przejrzysty z wykorzystaniem różnych typów mikroskopów w celu zestawienia i prezentowania informacji, co znacznie podnosi wartość edytorską rozprawy.

Rozdział ten zawiera wartościowe, bogate, oryginalne wyniki naukowe. Należy podkreślić, że zebranie, zestawienie i opisanie obszernego materiału bez wątpienia wymagało systematycznych i pracochłonnych badań.

W podzielonym na 8 podrozdziałów 19-stronicowym rozdziale DYSKUSJA Doktorantka zwięźle i rzeczowo interpretuje i porównuje wyniki własnych badań i obserwacji z danymi uzyskanymi przez innych autorów, umiejętnie wykorzystując dostępną literaturę. Interesująca i wnikliwa dyskusja świadczy o dobrym przygotowaniu naukowym Autorki. W oparciu o cytowaną literaturę wyjaśnia znaczenie i rolę białek arabinogalaktanowych w strukturze załączka truskawki. Na szczególne podkreślenie zasługuje naukowy język pracy, który świadczy o doskonałym opanowaniu i właściwym używaniu przez Autorkę fachowego nazewnictwa.

Całość dysertacji doktorskiej podsumowuje zestawienie 15 dobrze sformułowanych wniosków końcowych, które obejmują najważniejsze zagadnienia objęte prezentowanym zakresem pracy badawczej. Wnioski wynikające z analizy wyników przeprowadzonych badań są trafne i precyzyjne.

Do zredagowania rozprawy doktorskiej, a zwłaszcza dyskusji Autorka wykorzystwała 166 pozycji literaturowych, w tym 144 oryginalnych publikacji naukowych w języku angielskim i 6 w języku polskim oraz 13 pozycji książkowych - 6 anglojęzycznych i 7 w języku polskim. Trzy pozycje książkowe obejmowały tematykę z zakresu metodyki przygotowania preparatów mikroskopowych. Autorka w większości cytowała najnowsze pozycje literaturowe, które ukazały się w ostatnich latach i przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat rozwiązywanego problemu. Ponadto w pracy wykorzystano również informacje powołując się na dwa adresy z netografii.

W przygotowaniu uzyskanego materiału badawczego do druku w formie oryginalnych prac naukowych sugeruję zwrócić uwagę na kilka następujących aspektów:

- zamieścić krótką informację o sposobie uprawy badanego gatunku,
- w rozdziale materiał i metody jasno uzasadnić dobór gatunku, który stanowi materiał biologiczny badań. Informacje te można wyłowić z fragmentów różnych rozdziałów pracy, ale lepiej zebrać w jedną całość,
- podkreślić znaczenie praktyczne badań,
- zmodyfikować opis fotografii 1, tablica I, strona 39 „Uprawa roślin doświadczalnych *F. x ananassa*”.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy.

Podsumowując, Autorka trafnie wypunktowała i podkreśliła swoje największe osiągnięcia w odniesieniu do zagadnień dotyczących immunolokalizacji białek arabinogalaktanowych w zalążkach *Fragaria x ananassa* – mieszańca międzygatunkowego, u którego obserwowano apomiksję fakultatywną. W prezentowanej pracy, oprócz powszechnie stosowanych przeciwciał JIM13 i MAC207, Autorka po raz pierwszy zastosowała w badaniach przeciwciała JIM15 do określenia lokalizacji rozpoznawanych przez nie determinant antygenowych białek arabinogalaktanowych w zalążkach. Należy podkreślić, że dotychczas nie stosowano przeciwciał JIM15 do określenia obecności białek arabinogalaktanowych w komórkach linii żeńskiej. Nowatorskie osiągnięcia Autorki są bardzo wartościowe i wnoszą cenny wkład w uzupełnienie aktualnego stanu wiedzy na ten temat. Uzyskane wyniki mogą stanowić rzetelną podstawę do dalszych badań nad funkcją białek arabinogalaktanowych w trakcie rozwoju zalążka, a szczególnie apomiktów fakultatywnych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Aleksandry Leszczuk pt.: „Immunolokalizacja białek arabinogalaktanowych w zalążkach truskawki *Fragaria x ananassa* Duch. odmiany 'Mount Everest'” spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim, określone w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U Nr 65 z 2003 r., poz. 595) z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U Nr 164 z 2005 r., poz. 1365). W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Agaty Aleksandry Leszczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Mirosława Chwil