

Poznań, dnia 07.08.2022r.

Prof. UPP dr hab. Aleksander Siger  
Katedra Biochemii i Analizy Żywności  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## **RECENZJA**

osiągnięć naukowo-badawczych, aktywności naukowej, dorobku dydaktycznego,  
popularyzatorskiego i współpracy międzynarodowej

**dr Agaty Aleksandry Leszczuk**

w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk  
rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

### **Podstawa prawna opracowania recenzji**

Recenzję wykonano w oparciu o Uchwałę nr 199/P21/2022 Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie z dnia 13 czerwca 2022 r., w sprawie zmiany recenzenta komisji habilitacyjnej w postępowaniu w sprawie o nadanie stopnia doktora habilitowanego dr Agacie Leszczuk. Oceny osiągnięć wykonano zgodnie z art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. 2021 r. poz. 478) na podstawie otrzymanych dokumentów: kopii dokumentu potwierdzającego uzyskanie stopnia doktora, autoreferatu prezentującego opis osiągnięć i dorobku naukowo-badawczego, wykazu osiągnięć naukowych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, oświadczenia współautorów prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, zaświadczenia o aktywności naukowej realizowanej w więcej niż jednej jednostce naukowej, kopii prac stanowiących osiągnięcie naukowe, kopii wybranych publikacji dotyczących osiągnięć naukowo-badawczych powstałych we współpracy z innymi jednostkami oraz wniosku Habilitantki o przeprowadzenie przewodu habilitacyjnego wraz z danymi osobowymi.

### **Ogólne informacje o wykształceniu i przebiegu pracy zawodowej Habilitantki**

Pani dr Agata Leszczuk ukończyła studia licencjackie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 2010 roku. Pracę zatytułowaną *Roślinna macierz zewnątrzkomórkowa* wykonała pod kierunkiem dr hab. Ewy Szczuki, prof. UMCS. Pracę magisterską zatytułowaną *Budowa morfologiczna i anatomiczna łodygi *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby (Malvaceae)* wykonała pod kierunkiem dr hab. Ewy Szczuki, prof. UMCS w 2012 roku w tej samej jednostce. W 2012 roku Habilitantka ukończyła także

Medyczne Studium Zawodowe im. St. Liebharta w Lublinie, uzyskując tytuł technika nauk farmaceutycznych. Stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia Habilitantka uzyskała w 2016 roku na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Promotorem dysertacji zatytułowanej *Immunolokalizacja białek arabinogalaktanowych w zalążkach truskawki *Fragaria x ananasa** Duch. odmiany *Mount Everest* była dr hab. Ewa Szczuka, prof. UMCS. Od 2017 roku dr Agata Leszczuk jest zatrudniona w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, w Zakładzie Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów. Początkowo pracowała na stanowisku asystenta, a od 2019 roku do chwili obecnej pracuje na stanowisku adiunkta. W trakcie działalności naukowej Habilitantka ciągle poszerzała swoją wiedzę i doskonaliła umiejętności biorąc udział w warsztatach, szkoleniach i kursach organizowanych przez jednostki naukowe i różne podmioty gospodarcze.

**Ocena osiągnięcia, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.)**

Z przedstawionej dokumentacji wynika, że Pani dr Agata Leszczuk po raz pierwszy ubiega się o nadane stopnia doktora habilitowanego, a jako podstawę wniosku wskazuje osiągnięcie naukowe obejmujące cykl ośmiu powiązanych tematycznie prac, ujętych pod wspólnym tytułem *Lokalizacja, funkcje i struktura białek arabinogalaktanowych (AGP) w owocach*. Prace zostały opublikowane w latach 2018-2020 w następujących czasopismach: *Postharvest Biology and Technology* (1 praca), *Plant Science* (2 prace), *Plant Physiology and Biochemistry* (1 praca), *Scientific Reports* (2 prace), *Biology* (1 praca), *Horticulture Research* (1 praca). Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) publikacji składających się na osiągnięcie wynosi 35,273, natomiast sumaryczna liczba punktów zgodnie z komunikatami MNiSW z dnia 25 stycznia 2017 roku oraz 1 grudnia 2021 roku to 825 pkt. Prace stanowiące osiągnięcie naukowe były cytowane według bazy *Web of Science Core Collection* 68 razy (stan na 03.08.2022 r.). Wszystkie publikacje, opisane w autoreferacie numerami P1-P8 (Zał. nr 2) są wieloautorskie (3-6 współautorów). Habilitantka występuje w nich jako pierwszy współautor i jednocześnie autor korespondencyjny. W badaniach przedstawionych w tych pracach dr Agata Leszczuk pełniła rolę wiodącą, która polegała na opracowaniu hipotez i koncepcji badań, przeprowadzeniu większości analiz, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów, co potwierdzili w stosownych oświadczeniach współautorzy (Zał. nr 5). Rola współautorów ograniczała się do wykonania wybranych analiz oraz sprawdzenia i naniesienia poprawek w

manuskryptach. Należy podkreślić, że większość wyników zaprezentowanych w osiągnięciu naukowym była rezultatem badań wykonanych w ramach projektów badawczych – w jednym z nich Pani dr Agata Leszczuk była kierownikiem. Grant został przyznany przez Narodowe Centrum Nauki i był realizowany w 2018 roku.

Tematyka osiągnięcia naukowego dotyczy roli białek arabinogalaktanowych (AGP) w procesie rozwoju i dojrzewania owoców oraz w trakcie procesu starzenia podczas pozbiornego przechowywania.

Najnowsze zalecenia żywieniowe przedstawione w formie „Talerza zdrowego żywienia” umacniają twierdzenie, że owoce i warzywa powinny być podstawą codziennej diety. W związku z tym istnieje ogromne zapotrzebowanie na owoce wysokiej jakości, dostępne przez cały rok. Dynamiczny model jakości żywności zakłada, że produktom spożywczym przypisuje się funkcje (bezpieczeństwo, wartość odżywcza, cechy sensoryczne, funkcjonalność), które są determinowane przez: skład surowca, właściwości chemiczne, właściwości fizyczne, właściwości mechaniczne, właściwości strukturalne i właściwości mikrobiologiczne. Właściwości jakościowe owoców kształtują się podczas ich rozwoju i dojrzewania, a zależą od odporności na stresy, infekcje patogenami i fizyczny rozpad tkanki. Większość parametrów jakościowych owoców odnosi się do cech mechanicznych, związanych m.in. z przebudową ściany komórkowej. Jednakże wiedza na poziomie molekularnym o procesach, które regulują przyleganie komórek do siebie i przebudowę ścian komórkowych, jest nadal niewystarczająca, aby zrozumieć i kontrolować właściwości mechaniczne całego owocu. Ściana komórkowa odgrywa różne kluczowe role we wzroście i rozwoju roślin, różnicowaniu komórek, wyczuwaniu i sygnalizowaniu środowiska, komunikacji międzykomórkowej, przemieszczaniu wody i obronie przed inwazją patogenów. Polisacharydy stanowią do 90-95% masy ściany komórkowej, podczas gdy białka ściany komórkowej (CWP) stanowią 5-10%. CWP odpowiadają za strukturę, sygnalizację i interakcję z innymi białkami i można je podzielić na kilka kategorii funkcjonalnych. Jedną z takich grup stanowią białka potencjalnie zaangażowane w sygnalizację, do których należą białka arabinogalaktanowe (AGP). AGP są jedną z najbardziej złożonych i zróżnicowanych rodzin glikoprotein występujących u roślin. AGP mogą mieć szkielet białkowy bogaty w Pro/Hyp, Ala, Ser i Thr (PAST) „ozdobiony” różnymi węglowodanami. Część węglowodanowa AGP stanowi ponad 90% ich całkowitej masy cząsteczkowej i składa się głównie z arabinozy (Ara) i galaktozy (Gal), jak również z mniejszych cukrów, takich jak kwas glukuronowy (GlcA), fukoza (Fuc), ramnoza (Rha) i ksyloza. AGP mają różną masę cząsteczkową, która odzwierciedla różny stopień glikozylacji ich specyficznych rdzeni białkowych. Rozległa glikozylacja szkieletu

białkowego zapewnia odporność na proteolizę. Przewiduje się, że około połowa członków rodziny AGP jest związana z błoną plazmatyczną za pomocą kotwicy lipidowej glikozylofosfatydiloinozytolu (GPI), co czyni je idealnymi kandydatami do odbioru i przekazywania sygnałów. AGP są wszechobecne w królestwie roślin, od mszaków do okrytozalążkowe, a także występują u wielu glonów. Te glikoproteiny zostały zachowane w toku ewolucji, prawdopodobnie z powodu ich istotnych funkcji w roślinach. Odkrycie obecności białek arabinogalaktanowych w tkankach owoców sugeruje, że białka te mogą wpływać na skład ściany komórkowej i w konsekwencji mogą być ważnym składnikiem (strukturalno-funkcyjnym) wpływającym na właściwości owoców. Wraz z sekwencjonowaniem wielu genomów roślin, bioinformatyka otworzyła drzwi do identyfikacji kilku genów kandydujących zaangażowanych w biosyntezę AGP. Dużym wyzwaniem jest także przeprowadzenie bardziej pracochłonnych analiz biochemicznych w celu sprawdzenia i potwierdzenia wyników analiz bioinformatycznych i genomicznych, które postępują w tak szybkim tempie.

Brak w literaturze szczegółowych badań nad występowaniem AGP w owocach oraz niekompletność danych dotyczących roli białek arabinogalaktanowych oraz ich struktury i mechanizmu działania podczas wzrostu i dojrzewania owoców powodują, że badania Habilitantki mają pionierski charakter.

Celem pierwszego etapu badań była analiza *in situ* lokalizacji i uporządkowania epitopów AGP i pektyn w ścianie-błonie komórkowej owoców *Malus x domestica*, przy zastosowaniu technik immunocytochemicznych na poziomie komórkowym i subkomórkowym (P1) oraz opracowanie wzorca występowania epitopów AGP w tkance owoców w trakcie ich dojrzewania oraz jego zmian podczas pozbiornego przechowywania (P2). Wyniki badań zaprezentowano w dwóch pierwszych publikacjach, składających się na oceniane osiągnięcie (P1 i P2, Zał. nr 5). Eksperymenty przeprowadzono na kilku etapach procesu wzrostu i dojrzewania owoców jabłoni (*Malus x domestica*) tj. miesiąc przed zakładaną datą zbioru owoców (1), w dniu zbioru owoców w optymalnym terminie zbioru (2), po miesięcznym (3) i trzy-miesięcznym okresie przechowywania owoców w warunkach chłodniczych (4). Habilitantka analizowała zmiany w mikrostrukturze owoców w komórkach epidermy, warstwy hypodermalnej, tkance parenchymatycznej oraz w tkance sklerenchymatycznej gniazd nasiennych owoców. Badania przeprowadziła również na poziomie subkomórkowym (ultrastrukturalnym), a tym samym rozmieszczenie epitopów AGP opisała w poszczególnych fragmentach komórki. Autorka dokonała analizy lokalizacji AGP na poziomie tkankowym, która pozwoliła na znalezienie różnic w obecności AGP w przekroju poprzecznym owocu i

wskazała na wyraźną specyficzną tkankową. Analizując obecność AGP w tkance owoców zebranych w optymalnym terminie zbioru, Habilitantka wykazała występowanie epitopów JIM13, JIM15, MAC207 w tkance epidermalnej, hypodermalnej i parenchymatycznej. Ponadto, interesującym wynikiem badań była detekcja wspomnianych epitopów również w tkance sklerenchymatycznej budującej gniazdo nasienne owocu oraz w tkance tworzącej wzmocnienia wiązek przewodzących. Autorka wykazała, że wyróżniająca się dystrybucja AGP w elementach ksylemu i w komórkach sklerenchymy prawdopodobnie jest związana z ich zdolnością do wiązania wapnia, a tym samym wpływem AGP na właściwości mechaniczne ścian komórkowych tkanek wzmacniających. Badania przeprowadzone przez Habilitantkę na poziomie komórkowym uwiaryściły zmiany w rozmieszczeniu AGP na różnych etapach procesu dojrzewania i starzenia się komórki oraz wskazały zmiany lokalizacji AGP w różnych przedziałach komórkowych. AGP znakowane przeciwciałami JIM13, JIM15, MAC207 znajdowały się w komórkach owoców zebranych w optymalnym terminie zbioru na obwodzie ściany komórkowej, a dokładnie na granicy ściany i błony komórkowej. Habilitantka wykazała, że w trakcie postępującego procesu starzenia się owoców dochodzi do zaburzenia struktury ściany komórkowej, co jest związane z niższą zawartością AGP, a zależność ta odnotowana została w każdym typie tkanki. W komórkach tworzących zewnętrzne warstwy owocu, AGP były rozproszone w ścianie komórkowej, a ich obecność zarejestrowano również w przedziałach cytoplazmatycznych, co jest spowodowane degradacją łańcuchów cukrowych AGP w trakcie starzenia się owoców. Habilitantka udowodniła obecność AGP w tkance owoców, wskazując na ich specyficzną tkankową i zmiany w ich dystrybucji na przestrzeni zachodzących procesów dojrzewania i starzenia się owoców.

Temat zmiennej lokalizacji AGP na poziomie komórkowym i ultrastrukturalnym został drobiazgowo opisany również w drugiej publikacji (P2, Zał. nr 5). W tym badaniu Autorka wskazuje na zmienną obecność epitopów AGP, arabinanów i homogalakuronianu w poszczególnych fragmentach komórki (centralny obszar ściany komórkowej, przylegająca błona komórkowa i cytoplazma). Wykazała, że obecność epitopów AGP jest ograniczona głównie do błony komórkowej, z ich wyraźną akumulacją wzdłuż granicy ze ścianą komórkową i przestrzeni pomiędzy ścianą a błoną komórkową, w tzw. macierzy zewnątrzkomórkowej. Na podkreślenie zasługuje opracowanie przez Habilitantkę ilościowej analizy dla metody immunozłotowej, którą można zastosować w badaniach zawartości poszczególnych składników komórki *in situ*. Przy pomocy tej metody wraz z obrazowaniem z użyciem mikroskopii elektronowej transmisyjnej (TEM) autorka wykazała korelację pomiędzy ilością epitopów AGP a stadium fizjologicznej dojrzałości owocu. Analiza ilościowa epitopów AGP

rozpoznawanych przez przeciwciała JIM13, JIM15 i MAC207 wykazała niewielki wzrost ilości AGP w ścianie komórkowej podczas dojrzewania i jej spadek podczas pozbiornego przechowywania. Natomiast w cytoplazmie ilość epitopów AGP jest niezmienna we wszystkich analizowanych etapach procesu dojrzewania. Na podstawie otrzymanych wyników Habilitantka zaproponowała ogólny wzór czasowo-przestrzennych zmian w rozmieszczeniu AGP w owocach oraz postuluje, że obserwowane bardzo specyficzne zmiany w lokalizacji epitopów AGP są związane z przypuszczalną rolą AGP w mechanizmach zachodzących w ścianie komórkowej w procesie dojrzewania owoców. Widoczny wzrost ilości epitopów AGP podczas dojrzewania i spadek ich ilości podczas przechowywania może również posłużyć jako kolejny dowód potwierdzający rolę AGP jako markera dojrzałości owoców. Dodatkowo w swoich badaniach Habilitantka zastosowała przeciwciała LM16 będące wyznacznikiem metabolizmu arabinozy, LM19 wiążące deestryfikowany homogalakturnian oraz LM20 rozpoznające estryfikowany homogalakturnian, co pozwoliło stwierdzić trwającą i postępującą degradację ściany komórkowej oraz obecność i rozmieszczenie homogalakturnianu w tkance owoców podczas ich przechowywania. Analiza ilościowa wyraźnie podkreśliła znacznie większą zawartość pektyn w stosunku do AGP, we wszystkich częściach komórki oraz we wszystkich badanych stadiach procesu dojrzewania. Autorka wykazała, że rosnąca nieregularność w lokalizacji pektyn i spadek ich zawartości wraz z postępującym procesem starzenia się komórki połączona jest z zaburzeniem dystrybucji AGP.

W kolejnych badaniach przeprowadzono enzymatyczną i nieenzymatyczną hydrolizę ściany komórkowej przy użyciu hydrolaz ściany komórkowej i witaminy C, a następnie zbadano ich wpływ na rozmieszczenie epitopów AGP na przykładzie modelowych owoców pomidora. Wyniki przeprowadzonych badań zostały opisane w trzeciej publikacji cyklu – P3. Na tym etapie badań Habilitantka wykazała, że potraktowanie tkanek pomidora enzymami degradacyjnymi (pektynolitycznymi) przyczyniło się do degradacji części cukrowej AGP oraz przearanżowaniem ich występowania w ścianie komórkowej. W doświadczeniu z zastosowaniem wzrastającego gradientu stężenia witaminy C morfologiczne zmiany ściany komórkowej różniły się od zmian wywołanych na drodze hydrolizy enzymatycznej. Epitopy składające się z reszt  $\beta$ GlcA(1→3)- $\alpha$ GalA(1→2)Rha były mniej podatne na działanie witaminy C niż epitopy złożone z AG typu II, GlcA i (1→5)- $\alpha$ -L-Ara. Wyniki otrzymane przez Habilitantkę wskazują, że rozmieszczenie badanych części węglowodanowych AGP zmienia się pod wpływem różnych czynników, które są związane ze zmianami w strukturze tkanek owoców. Chociaż ściana komórkowa owocu składa się z celulozy i polisacharydów pektynowych jako podstawowych elementów i kluczowych czynników w dojrzewaniu

owoców, to wzajemne powiązania pomiędzy tymi składnikami były najbardziej znaczące w kontrolowaniu dojrzewania i fizjologii po zbiorze. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że brak łańcuchów cukrowych powoduje zakłócenia i przebudowę interakcji pomiędzy składnikami ściany komórkowej co powoduje zmiany w całej strukturze ściany komórkowej. Na tym przykładzie habilitantka udowodniła, że to połączenia pomiędzy składnikami są najistotniejszym czynnikiem mającym wpływ na strukturę tkanki owoców.

W pracy P4 wchodzącej w skład osiągnięcia Habilitantka określiła wpływ białek arabinogalaktanowych na właściwości mechaniczne i rozmieszczenie pozostałych składników ściany komórkowej w trakcie jej tworzenia na przykładzie łagiewki pyłkowej *Fragaria x ananassa* (Duch.). Dr Agata Leszczuk oceniła funkcje białek arabinogalaktanowych w rozmieszczeniu pektyny, celulozy i kalozy wzdłuż łagiewki pyłkowej *Fragaria x ananassa* oraz dokonała powiązania struktury ściany komórkowej z jej lokalnymi właściwościami mechanicznymi. Badania Habilitantki wykazały, że zaburzenie struktury AGP obecnych w ścianach komórkowych wpływa na lokalizację celulozy, pektyn i wydzielanie kalozy. Zmiany istotnie przekładają się na właściwości mechaniczne łagiewki pyłkowej. Wykazano, że wierzchołek łagiewki pyłkowej hodowanej w obecności odczynnika Yariv (specyficznie wiążącym AGP) jest sztywniejszy (1,68 MPa) niż odpowiadający mu region łagiewki pyłkowej hodowanej w warunkach kontrolnych (0,13-0,27 MPa). Zaobserwowany po raz pierwszy w badaniach wzrost sztywności wierzchołka łagiewki pyłkowej może być konsekwencją obecności utworzonego kompleksu AGP- $\beta$ GlcY, który "cementuje" strefę wierzchołkową. Tak wysoki wzrost sztywności łagiewki pyłkowej (ponad pięciokrotny) nie został odnotowany we wcześniejszych, dostępnych publikacjach, co podkreśla osiągnięcia Habilitantki. Autorka wyjaśnia, że "utwardzenie" ściany spowodowane jest pojawieniem się deestryfikowanego homogalakturonianu, który posiada zdolność mostkowania  $Ca^{2+}$ , czego efektem jest proces żelowania i wzrost ogólnej sztywności ściany komórkowej. Habilitantka dowodzi poprzez zaobserwowane zmiany rozmieszczenia poszczególnych składników w ścianie formującej się w warunkach eksperymentalnych, że istnieje zależność pomiędzy dystrybucją AGP oraz lokalizacją polisacharydów ściany komórkowej. Jest to również kolejne potwierdzenie strukturalnej roli AGP w kreowaniu połączeń i interakcji w czasie procesu powstawania ściany komórkowej.

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie eksperymentu mającego na celu określenie udziału AGP w odpowiedzi komórkowej na choroby grzybowe owoców na przykładzie owoców *Malus x domestica* w trakcie ich pozbiornego przechowywania (P5). Infekcje grzybicze wpływają na morfologię owoców i ich skład chemiczny. Brak jest danych

w literaturze dotyczących roli i rozmieszczenia AGP podczas rozwoju choroby grzybowej w owocach. Habilitantka przeprowadziła analizę *in situ* rozmieszczenia białek arabinogalaktanowych w jabłkach inokulowanych *Penicillium spinulosum* podczas kolejnych dni rozwoju infekcji. W celu immunolokalizacji AGP próbki inkubowała z przeciwciałami JIM13, MAC207, LM2 i LM14 rozpoznającymi węglowodanowe części AGP. W celu zbadania ścian komórkowych bez prawidłowego działania AGP, przeprowadziła eksperyment z odczynnikiem  $\beta$ -glukozylowym Yariv, specyficznym wiążącym AGP. Autorka wykazała większe ilości badanych epitopów w zmienionych przez infekcję miejscach owocu, w bezpośrednim sąsiedztwie powierzchni wypełnionej zarodnikami grzyba. Dr Agata Leszczuk wykazała, że degradacja ściany komórkowej spowodowana kolonizacją *P. spinulosum* i postęp procesu infekcji są związane z gromadzeniem się złogów kalozy w zmienionej chorobotwórczo tkance i zmianami obecności AGP w egzokarpium i mezokarpium owoców. Ponadto stwierdziła, że szesnastodniowa choroba grzybicza powoduje zaburzenie specyficznego wzorca rozmieszczenia i zwiększenie obecności AGP w tkankach owoców z wyraźną dezorganizacją ściany komórkowej. Natomiast inaktywacja funkcji AGP poprzez wiązanie z  $\beta$ -GlcY powoduje szybszy postęp infekcji grzybowej. Wyniki te potwierdziły udział AGP w obronie przed atakiem patogenów w owocach.

Kolejne dwie publikacje (P6, P7) dotyczą badań *ex situ*, które miały na celu określenie zawartości AGP w owocach, a następnie analizę ich właściwości molekularnych i strukturalnych. Białka arabinogalaktanowe charakteryzują się rozległą glikozylacją i heterogenicznością ich jednostek węglowodanowych i białkowych. Jak sama Autorka podkreśla, dotychczas nie przeprowadzono szczegółowych analiz AGP występujących w owocach, a ich zawartość i struktura w czasie procesu dojrzewania są nieznane. Na podkreślenie zasługuje przygotowanie przez Habilitantkę protokołu ekstrakcji, a następnie optymalizacja procesu izolacji AGP z tkanek owoców. Zaproponowana metoda z użyciem  $\beta$ -GlcY (odczynnik Yariva) pozwoliła uzyskać materiał o ściśle określonych cechach. Celem tego etapu badań była ocena cech strukturalnych AGP obecnych w owocach jabłoni na różnych etapach procesu dojrzewania. AGP ekstrahowano przy użyciu odczynnika Yariva i badano przy użyciu SDS-PAGE, immunoblottingu, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) i mikroskopii sił atomowych (AFM). Przeprowadzono także analizę *in situ*, immunofluorescencję (CLSM) i metodę immunozłotową z wizualizacją z użyciem mikroskopii elektronowej transmisyjnej (TEM). Dr Agata Leszczuk wykazała, że AGP są rzeczywiście obecne w jabłkach na różnych etapach procesu dojrzewania. Zmiany w ilości (1,52- 2,08 mg g<sup>-1</sup>), średnicy (152,73-75,05 nm), masie cząsteczkowej (50-250 kDa) i rozmieszczeniu AGP w



komórce świadczą o zmiennej obecności i zmiennej strukturze białek arabinogalaktanowych podczas procesu dojrzewania. Autorka zaproponowała charakterystyczne pasma w metodzie FT-IR, tj.  $1265\text{ cm}^{-1}$ ,  $1117\text{ cm}^{-1}$  i  $960\text{ cm}^{-1}$ , które można przypisać białkom arabinogalaktanowym, szczególnie ich łańcuchom węglowodanowym, co można próbować wykorzystać do ich oznaczania. Wyniki immunofluorescencji i znakowania immunologicznego wskazują na przeciwciało JIM13 jako najbardziej charakterystyczne dla AGP w jabłkach. Badanie to po raz pierwszy wykazało, że akumulacja AGP występuje w dojrzałych owocach, co potwierdza najwyższa zawartość AGP, największa masa cząsteczkowa i pojawienie się specyficznego wzoru dystrybucji na poziomie komórkowym jak i subkomórkowym.

W dalszej kolejności habilitantka przeprowadziła kolejne analizy izolowanego AGP, w których określiła jego skład monosacharydowy oraz zawartość części białkowej i kwasów uronowych. Stwierdziła, że AGP izolowane z owoców składają się głównie z łańcuchów węglowodanowych, w których dominują arabinoza, galaktoza, glukoza, kwas galakturonowy i ksyloza. Część białkowa stanowi 3,15-4,58%, zależna jest od różnych faz dojrzewania owoców. Wszystkie przeprowadzone badania morfologiczno-molekularno-strukturalne AGP przeprowadzone przez Habilitantkę, wskazują, że cechy AGP wyekstrahowanych z owoców zmieniają się na różnych etapach procesu dojrzewania. Wykazano, że wraz z postępem procesu dojrzewania ilość arabinogalaktanu i kwasów uronowych, czyli dominujących składników łańcuchów węglowodanowych AGP, zmniejsza się. Dodatkowo obserwowano zmianę kształtu cząsteczki AGP, zmniejszenie masy molekularnej i spadek tendencji do agregacji. Prawdopodobnie tworzenie agregatów jest skorelowane z obecnością łańcuchów węglowodanowych w cząsteczce AGP. Może to wskazywać, że utrata bocznych rozgałęzień lub silniejsze splątanie polimerów indukuje występowanie dodatkowych oddziaływań międzycząsteczkowych między resztami węglowodanowymi a polipeptydowym rdzeniem. Habilitantka wnioskuje, że właściwa budowa łańcuchów węglowodanowych AGP jest niezbędna do tworzenia "typowej" struktury AGP. Zmiany strukturalne AGP potwierdzają ciągły metabolizm ich części węglowodanowej podczas postępującego procesu dojrzewania owoców.

Ostatnia publikacja cyklu (P8) jest podsumowaniem badań prowadzonych przez dr Agatę Leszczuk oraz próbą powiązania uzyskanych wyników z dostępnymi wiadomościami na temat struktury i funkcji AGP. Celem pracy było zrewidowanie poznanych właściwości AGP ich wpływu na metabolizm owoców, a tym samym wskazanie kierunku i możliwości podjęcia kolejnych badań, co dowodzi pełną dojrzałość i samodzielność naukową dr Agaty Leszczuk. Habilitantka podkreśla, że badania dotyczące występowania i właściwości AGP istotnie

wpływają na metabolizm owoców a tym samym na ich i jakość. Ściana komórkowa wpływa na cechy teksturalne owoców, takie jak mięknięcie podczas dojrzewania i przechowywania po zbiorze, co jest bezpośrednio skorelowane z rozmieszczeniem polisacharydów w poszczególnych przedziałach ściany komórkowej, jak również zmianami ściany komórkowej związanymi z dojrzewaniem, tj. depolimeryzacją węglowodanów macierzowych. Niektóre z funkcji AGP, np. ich rola jako substancji sieciujących w macierzy zewnątrzkomórkowej, wynikają z zależnego od pH wiązania jonów wapnia przez AGP. Biorąc pod uwagę ilościowe zmiany AGP podczas dojrzewania owoców oraz funkcję AGP jako substancji sieciujących polisacharydy pektynowe, możliwe jest, że zmiany w zawartości i/lub strukturze AGP mogą zmienić ich związek z domenami glikanów pektynowych i arabinoksylowych oraz wpłynąć na ich dostępność dla metylesteraz pektynowych i poligalakturonaz, co wpływa na rozpuszczanie ściany komórkowej owoców, a następnie na ich miękkość. Podsumowując uzyskane wyniki Habilitantka podkreśla, że uzyskane do tej pory wyniki dają mocne dowody na to, że AGP biorą udział w budowie ściany komórkowej i interakcji komórka – błona plazmatyczna, co oznacza, że AGP są również zaangażowane w biomechanikę tkanek. Jednak ta hipoteza nie została jeszcze w pełni potwierdzona i rzeczywiście niezbędne są dalsze kompleksowe badania nad udziałem AGP w powstawaniu ściany komórkowej. Na szczególne podkreślenie zasługują możliwości aplikacyjne uzyskanych wyników badań, szczególnie opracowanie metody ekstrakcji AGP z owoców, co pozwoliło na oszacowanie ich zawartości. Wykazano, że zawartość AGP w tkance owoców jest znacznie wyższa niż w innych organach roślin. Zatem dojrzałe owoce *Malus x domestica* można uznać za cenne źródło AGP.

Podsumowując przedstawione do oceny osiągnięcie Pani dr Agaty Leszczuk, należy stwierdzić, że stanowi ono znaczący wkład w rozwój dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Osiągnięcie Habilitantki charakteryzuje się kompleksowym podejściem do zagadnień związanych z rolą, strukturą i mechanizmem działania białek arabinogalaktanowych w owocach. Cykl przedstawionych publikacji (P1-P8) prezentuje ciąg uzupełniających się wiadomości, stanowiący kontynuację ściśle zaplanowanych doświadczeń. Wyniki zaprezentowane w pracach mają dużą wartość poznawczą i aplikacyjną oraz dostarczają nowej wiedzy w zakresie istotnej roli AGP w procesie dojrzewania owoców. Habilitantka odpowiednio planując i realizując zadania badawcze w ramach osiągnięcia wykazała, że posiada dużą wiedzę i umiejętności niezbędne do samodzielnej pracy naukowej.

**Ocena aktywności naukowej, o której mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.)**

Pani doktor Agata Leszczuk wykazuje się znaczącą aktywnością naukową. Jej dorobek obejmuje 56 prac naukowych, z czego 28 opracowań ukazało się po uzyskaniu stopnia doktora. Habilitantka znacząco ilościowo i jakościowo powiększyła swój dorobek w okresie po nadaniu stopnia naukowego doktora, szczególnie w odniesieniu do prac indeksowanych w bazie JCR (2 prace przed uzyskaniem stopnia doktora i 16 prac po obronie doktoratu). Łączna liczba punktów wynosi 1395, z czego 825 punktów przypada za publikacje stanowiące osiągnięcie będące podstawą wniosku habilitacyjnego. Piętnaście prac zostało opublikowanych w czasopiśmie zawartych w bazie JCR, z czego osiem prac stanowi osiągnięcie naukowe wyodrębnione przez Panią doktor Leszczuk do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Habilitantka publikowała wyniki swoich badań głównie w czasopiśmie z najwyższego kwartyłu – Q1, który obejmuje 25% czasopiśmie z najwyższym IF w danej dziedzinie, między innymi w takich czasopiśmie jak: *Postharvest Biology and Technology* (1 praca), *Plant Science* (2 prace), *Cells* (1 praca), *Scientific Reports* (2 prace), *Horticulture Research* (1 praca), *Biology* (1 praca), *Plant Physiology and Biochemistry* (3 prace), *Journal of Plant Growth Regulation* (1 praca), *Annals of Botany* (1 praca), *Scientia Horticulturae* (1 praca), *Environmental and Experimental Botany* (1 praca). Kandydatka ma również w swoim dorobku 2 rozdziały w monografii oraz jest współautorem 3 publikacji w czasopiśmie nieposiadających współczynnika IF. Sumaryczny wskaźnik Impact factor (wg bazy Web of Science) wszystkich prac wynosi 62,709, z czego 35,273 przypada na osiągnięcie habilitacyjne. Liczba cytowań na dzień 04.08.2022 r. – 120 (bez autocytałów – 91), a Index Hirscha – 7.

Ponadto Pani doktor Agata Leszczuk brała udział w trzech projektach badawczych (dwa projekty finansowane przez Narodowe Centrum Nauki oraz jeden przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej – NAWA). We wszystkich tych projektach pełniła funkcję kierownika. Habilitantka wykonała również 32 recenzje prac naukowych publikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Wyniki swoich prac prezentowała na 34 konferencjach międzynarodowych i krajowych, z czego 12 na konferencjach po uzyskaniu stopnia doktora.

W swojej pracy naukowej Habilitantka współpracuje z krajowymi ośrodkami naukowymi w tym z Wydziałem Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Laboratorium Mikroskopii Konfokalnej i Elektronowej w Interdyscyplinarnym Centrum Badań Naukowych, Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. W

2019 roku została Członkiem Zarządzającym (Management Committee Member) w międzynarodowym projekcie *Oxygen sensing a novel mean for biology and technology of fruit quality*” o numerze CA18210 w ramach European Cooperation in Science & Technology (COST). Głównym założeniem prac badawczych w tym projekcie jest dogłębne poznanie fizjologii owoców, w tym określenie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw procesu dojrzewania, co skorelowane jest z kontrolą jakości owoców podczas ich pozbiornego przechowywania. Habilitantka podczas jednego ze spotkań uczestników projektu – Annual Meeting (18-20.10.2021 Chania) wygłosiła wykład pt. *Specific features of arabinogalactan proteins (AGPs) during fruit ripening process*. W 2021 roku Habilitantka odbyła trzymiesięczny staż naukowy (finansowany przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej – NAWA) w Mediterranean Agronomic Institute of Chania w Grecji (International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies). W trakcie pobytu w Grecji uzyskała certyfikat ‘Master in Science in Blotting’ firmy BIO-RAD (12.07.2021 r.). Nawiązana współpraca umożliwiła Habilitantce poszerzenie zakresu swoich badań nad AGP w owocach, czego dowodem są nie tylko publikacje naukowe, ale projekt badawczy zatytułowany *Badania białek arabinogalaktanowych (AGPs) jako istotnych składników ściany komórkowej podczas procesu dojrzewania owoców* (2020/39/D/NZ9/00232), który został zakwalifikowany do finansowania przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w 2021 roku. W projekcie tym dr Agata Leszczuk pełni funkcję kierownika i jest on realizowany wspólnie z dr Panagiotis Kalaitzis z Mediterranean Agronomic Institute of Chania w Grecji. Tym samym Habilitantka wykazała się udokumentowaną istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej.

Za osiągnięcia w dziedzinie naukowej rolnictwo i ogrodnictwo dr Agata Leszczuk w 2019 roku decyzją Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego została stypendystką Ministra dla Wybitnych Młodych Naukowców (grant nr 965/E-184/STYP/14/2019).

Przedstawiony do oceny dorobek naukowy Pani dr Agaty Leszczuk jest duży, zwłaszcza po doktoracie. Habilitantka ma znaczne doświadczenie w wykonywaniu badań w zespołach naukowych, w tym międzynarodowych oraz we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi krajowymi i zagranicznymi co zaowocowało publikacjami wieloautorskimi i stale powiększającym się dorobkiem naukowym. Podjęta przez Nią tematyka badawcza jest nowatorska i łączy w sobie zagadnienia z dziedziny nauk rolniczych, ścisłych i przyrodniczych. Habilitantka bardzo aktywnie uczestniczy w wielu seminariach i szkoleniach oraz warsztatach poszerzając tym samym swoją wiedzę i umiejętności.

## **Ocena działalności dydaktycznej, popularyzatorskiej oraz współpracy z otoczeniem gospodarczym**

Pani dr inż. Agata Leszczuk realizowała zajęcia dydaktyczne w ramach praktyk zawodowych w czasie studiów doktoranckich na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej dla studentów biologii i biotechnologii z przedmiotów: *Embriologia roślin, Techniki mikroskopowe, Metody kultur tkankowych in vitro* oraz *Praktikum z hodowli komórek i tkanek*. Prowadziła również anglojęzyczne zajęcia *Plant reproduction* i *Plant in vitro culture* dla studentów z Programu Erasmus. W 2017 roku wraz z Politechniką Lubelską i 'UNIKIDS' została laureatką konkursu „Uniwersytet Młodego Odkrywcy”, koordynowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Operacyjnego 'Wiedza Edukacja Rozwój' (PO WER), finansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W ramach tego projektu habilitantka opracowała cykl zajęć dydaktyczno-badawczych z mikroskopii, który zrealizowała w szkołach województwa lubelskiego. Ponadto, w latach 2012-2017 realizowała własny autorski program cyklu warsztatów o tematyce biologicznej na Uniwersytecie Dziecięcym 'UNIKIDS' lubelskim oddziale międzynarodowej organizacji EUCUNET, propagującej ideę Lifelong Learning. Projekt Uniwersytetów Dziecięcych (Die Kinder-Uni) otrzymał od Komisji Europejskiej nagrodę Descartes Prize for Science Communication. Habilitantka zaangażowana była także w organizację międzynarodowej akcji "Fascination of International Plants Day" (FoPD) pod auspicjami European Plant Science Organization (EPSO), w ramach której prowadziła zajęcia z embriologii roślin dla uczniów lubelskich szkół podstawowych i liceów. Angażowała się także w prace w komitecie organizacyjnego 57. Ogólnopolskiego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Botanicznego (PTB) w Lublinie.

Pani doktor była opiekunem praktyk studenckich w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie, studentów z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Od 2021 roku pani Doktor pełni funkcje promotora pomocniczego mgr Joanny Kulik, doktorantki Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo w Instytucie Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie.

Habilitantka podejmuje również działania na rzecz popularyzacji nauki poprzez uczestnictwo w projektach festiwalowych adresowanych do młodzieży szkolnej. Przygotowała zajęcia laboratoryjne pt. *Kultury in vitro, czyli jak wyhodować rośliny w probówce?* i *Kolorowy świat w mikroskopie* podczas Lubelskiego Festiwalu Nauki (20-26.09.2014 r.) oraz zajęcia *Wybierz swój klucz do sukcesu* podczas Drzwi Otwartych Uniwersytetu Marii Curie-

Skłodowskiej w Lublinie (21.03.2014 r.). Ponadto dwukrotnie (2019, 2020) brała udział w programie telewizyjnym "Login: Nauka" (TVP), na łamach którego zaprezentowała rezultaty prowadzonych przez siebie badań.

### **Wniosek końcowy**

Biorąc pod uwagę przedstawione do oceny przez Panią dr Agatę Leszczuk osiągnięcie naukowe stanowiące cykl ośmiu powiązanych tematycznie artykułów, stwierdzam, że stanowi ono cenny i znaczący wkład w rozwój dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Habilitantka wykazała się również udokumentowaną działalnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej. Tym samym Pani dr Agata Leszczuk spełnia wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, o których mowa w art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku: Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Stawiam również wniosek do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie o dopuszczenie Pani dr Agaty Leszczuk do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Aleksander Siger