

Dr hab. Barbara Hawrylak-Nowak, prof. uczelni
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin
Wydział Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
email: barbara.nowak@up.lublin.pl



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
w Lublinie



WYDZIAŁ
BIOLOGII ŚRODOWISKOWEJ

Lublin, 20 maja 2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kutyriviy-Nowak
pt. „Badania białek arabinogalaktanowych (AGP) jako istotnych składników
ścianny komórkowej w procesie dojrzewania owoców”**

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Cezarego Sławińskiego z dnia 27 marca 2023 r. (RN-431-1/25) informujące o uchwale Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki PAN dotyczącej powołania mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kutyriviy-Nowak.

Informacje o pracy oraz ocena strony formalnej

Rozprawa Pani mgr Natalii Kutyriviy-Nowak na stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo została wykonana pod kierunkiem dr hab. Agaty Leszczuk z Instytutu Agrofizyki PAN. Przedstawioną do oceny pracę przygotowano na podstawie cyklu czterech artykułów naukowych, w tym jednego artykułu przeglądowego, opublikowanych w latach 2023-2024. Publikacje te ukazały się w renomowanych międzynarodowych czasopismach naukowych: *Plant Methods*, *Scientia Horticulturae*, *Frontiers in Plant Science*, *Horticulture Research*. Są to rzetelne opracowania, zawierające bogaty materiał ilustracyjny – mikrofotografie, przejrzyste ryciny oraz czytelne wykresy. We wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką, co wskazuje na jej wiodącą rolę w ich powstaniu. Znajduje to także odzwierciedlenie w dołączonych do pracy oświadczeniach współautorów publikacji. Rozprawa liczy 138 stron i została napisana w języku polskim, z dołączonym streszczeniem w języku angielskim. Posiada czytelną, standardową strukturę: streszczenie, wprowadzenie, hipoteza badawcza i cele rozprawy, materiały i metody badawcze, wyniki, wnioski, bibliografia. Całość poprzedza przejrzysty spis treści oraz wykaz stosowanych symboli i skrótów. Do rozprawy zostały załączone poszczególne publikacje (P.1–P.4), a najważniejsze przedstawione w nich rezultaty zaprezentowano w rozdziale „Omówienie wyników”. Praca dodatkowo zawiera życiorys naukowy Doktorantki. Bibliografia obejmuje 106 aktualnych i ściśle

związanych z tematyką rozprawy doktorskiej pozycji literaturowych, wyłącznie w języku angielskim. Stwierdzam, że rozprawa jest kompletna i została przygotowana w sposób umożliwiający wydanie jednoznacznej opinii w sprawie nadania stopnia doktora zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Wartość naukowa i merytoryczna pracy

Białka arabinogalaktynowe (AGP) to wysoko glikozylowane proteoglikany należące do klasy glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę (HRGP), występujące powszechnie w ścianach komórkowych i apoplasmie roślin. Ich udział w funkcjonowaniu ściany komórkowej jest wielopłaszczyznowy i obejmuje m.in. adhezję komórkową, organizację macierzy ściany oraz tworzenie złożonych struktur z innymi jej składnikami (kompleks APAP1), regulację wzrostu i różnicowania komórek, sygnalizację komórkową oraz modulację dojrzewania owoców. Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kutyrivy-Nowak było określenie roli AGP w formowaniu struktury ściany komórkowej w trakcie procesu dojrzewania owoców. Obiekt badawczy stanowiły owoce pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) uzyskane z roślin „typu dzikiego” oraz linii transgenicznych o zahamowanej lub zwiększonej ekspresji genu *SIP4H3*, kodującego jedną z izoform 4-hydroksylazy prolilowej, katalizującej powstawanie 4-hydroksyproliny w części białkowej AGP podczas postranslacyjnej modyfikacji. Prace badawcze zostały wykonane w ramach projektu „Sonata” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego kierownikiem była dr hab. Agaty Leszczuk oraz we współpracy z naukowcami z Mediterranean Agronomic Institute of Chania (Grecja). Zarówno Pani Promotor, jak i zespół grecki uczestniczący w badaniach posiadają znaczący dorobek w zakresie tematycznym związanym z badaniami właściwości składników roślinnej ściany komórkowej, w tym białek AGP. Doktorantka miała zatem zapewnione doskonałe warunki do przeprowadzenia ciekawych i stojących na wysokim poziomie prac eksperymentalnych z użyciem nowoczesnych metod molekularnych, biochemicznych i mikroskopowych.

Uważam, że zaprezentowane w pracy doktorskiej wyniki badań są interesujące, spójne tematycznie i kompleksowe. Doktorantka bardzo skrupulatnie i logicznie zaplanowała cały cykl badawczy. Składał się on z trzech zasadniczych etapów: (i) wyodrębnienia i charakterystyki AGP jako potencjalnych markerów procesu dojrzewania owoców, (ii) określenia zmian zawartości oraz lokalizacji epitopów AGP w owocach pomidora pochodzących z roślin linii transgenicznych o zmodyfikowanej ekspresji genu *SIP4H3* w odniesieniu do „typu dzikiego”, (iii) określenia wpływu zmian w strukturze i lokalizacji AGP na organizację i strukturę ściany komórkowej. Tego typu badania wymagają szerokiej i interdyscyplinarnej wiedzy, dużego zaangażowania oraz odpowiednich umiejętności analitycznych. Doktorantka nie obawiała się podjąć tego trudnego tematu, a tak kompleksowe podejście stanowi niewątpliwą atut recenzowanej pracy. Oceniając wartość merytoryczną uzyskanych wyników należy podkreślić, że jednym z ważniejszych osiągnięć naukowych było wykazanie, że w początkowych etapach dojrzewania owoców dominują frakcje AGP o masie molekularnej w zakresie 60-120 kDa, natomiast w kolejnych fazach masa molekularna AGP ulega obniżeniu z przewagą frakcji o masie 20-25 kDa.

W końcowych stadiach tego procesu odnotowano obecność znacznych ilości AGP o masie 30 kDa, które uznano za molekularny wskaźnik zakończenia dojrzewania owoców. Ponadto wykazano, że w początkowych etapach dojrzewania epitopy AGP zlokalizowane były głównie w epidermalnej warstwie owoców, natomiast w miarę postępu tego procesu ich obecność notowano przede wszystkim w warstwie hypodermalnej. Może to sugerować specyficzność tkankową AGP zależną od stadium dojrzewania owoców. Z kolei zaburzenia natywnej struktury AGP, wynikające z modyfikacji hydroksylacji reszt proliny w domenie białkowej AGP, skutkowały zmianami ich zawartości oraz właściwości strukturalnych i funkcjonalnych. W konsekwencji wpływało to na lokalizację tych proteoglikanów w ścianie komórkowej oraz zakłócenia czasowo-przestrzennej dystrybucji i organizacji pozostałych składników ściany komórkowej. W roślinach linii transgenicznych odnotowano także nieoczekiwaną obecność AGP w cytoplazmie oraz brak charakterystycznej frakcji AGP o masie ok. 30 kDa, którą uznano za marker pełnej dojrzałości owoców. Na poziomie tkankowym stwierdzono modyfikacje anatomiczne owoców oraz zaburzenie przebiegu dojrzewania. Całokształt przeprowadzonych badań pozwolił na potwierdzenie roli AGP jako istotnego elementu strukturalnego niezbędnego do właściwego przebiegu procesu dojrzewania owoców pomidora.

Warto także podkreślić pozostały dorobek naukowy mgr Natalii Kutyrivoy-Nowak, przedstawiony w końcowej części rozprawy. Jest ona współautorem 10 publikacji naukowych, z których 4 stanowi podstawę rozprawy doktorskiej, 8 referatów, 3 posterów oraz 5 doniesień konferencyjnych. Odbyla także dwumiesięczny staż zagraniczny w Laboratorium Biologii Molekularnej Roślin Uniwersytetu w Belgradzie (Serbia). Wskazuje to, że Doktorantka jest obiecującym młodym naukowcem, aktywnym publikacyjnie oraz chętnie prezentującym wyniki swoich badań w ramach konferencji naukowych oraz działań popularyzujących naukę.

Komentarze i pytania

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko. Jednak w trakcie jej lektury nasunęły mi się następujące komentarze i pytania, o ustosunkowanie się do których proszę Doktorantkę w trakcie publicznej obrony rozprawy.

- 1) Jak Doktorantka może uzasadnić wybór pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum* L.) jako gatunku modelowego do badań? Jakie są zalety i ograniczenia takiego wyboru?
- 2) Czy w opinii Doktorantki pojawienie się frakcji AGP o masie ok. 30 kDa w późnym etapie dojrzewania owoców pomidora jest markerem molekularnym ich pełnej dojrzałości czy jedynie produktem degradacji większych cząsteczek AGP? Czy rozważano możliwość przeprowadzenia analizy degradacji proteolitycznej?
- 3) W publikacjach P.3 oraz P.4 w części dotyczącej opisu metod badawczych brakuje mi trochę odniesienia do roślin „typu dzikiego”, chociaż opis wyników jasno wskazuje, że ich owoce poddano analizom. Wprawdzie w pracy także wskazano, że rośliny te stanowiły kontrolę badawczą, ale czy były one uprawiane równolegle z roślinami linii transgenicznych? Interesujące jest również czy fenotyp roślin transgenicznych znacząco odbiegał od tych „typu dzikiego”?

- 4) Jakie praktyczne zastosowanie mogą mieć wyniki przeprowadzonych badań w uprawie lub hodowli pomidora (np. w selekcji linii o podwyższonej trwałości pozbiorczej)? Jakie markery molekularne można wykorzystać w tym zakresie?
- 5) Ponieważ dojrzewanie owoców jest procesem ściśle związanym z etylenem, a AGP mogą przynajmniej pośrednio wpływać na szlak etylenowy (lub być przez niego regulowane), nieco brakuje mi odniesień do poziomu tego fitohormonu lub ekspresji genów związanych z jego biosyntezą. Czy rozważano taką możliwość jako potencjalny kierunek przyszłych badań?
- 6) Pomimo bardzo starannego przygotowania tekstu pracy pod względem redakcyjnym, miejscami pojawiają się drobne niedociągnięcia stylistyczne (np. „detałiczny opis zmian” zamiast „szczegółowy opis zmian”; „dane uzyskane dzięki przeprowadzeniu obu metod” zamiast „dane uzyskane dzięki wykorzystaniu obu metod”) oraz sporadyczne błędy literowe i tym interpunkcyjne. Zastrzeżenia te nie mają wpływu na wartość merytoryczną rozprawy.

Podsumowanie

Pani mgr Natalia Kutyríeva-Nowak poprzez wiodący udział w badaniach, których wyniki zostały opublikowane jako cykl czterech artykułów w renomowanych czasopismach naukowych, wykazała się niezbędną wiedzą teoretyczną, a także dowiodła umiejętności prowadzenia badań naukowych, prowadzących do rozwiązania istotnych zagadnień dotyczących roli AGP w procesie dojrzewania owoców. Tym samym należy uznać, że Doktorantka spełniła ustawowe kryteria merytoryczne wymagane od kandydatów do nadania stopnia doktora.

Wniosek końcowy:

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Kutyríevy-Nowak zatytułowana „Badania białek arabinogalaktanowych (AGP) jako istotnych składników ściany komórkowej w procesie dojrzewania owoców” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.). Na podstawie powyższej oceny wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk wniosek o dopuszczenie rozprawy mgr Natalii Kutyríevy-Nowak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Biorąc pod uwagę rzetelne i kompleksowe podejście do rozwiązania problemu naukowego oraz wysoki poziom merytoryczny recenzowanej pracy wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kutyríevy-Nowak stosowną nagrodą.

Barbara Kurylak-Nowak