

prof. dr hab. inż. Rafał Barański  
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie  
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:

**„Badania białek arabinogalaktanowych (AGP) jako istotnych składników ściany komórkowej w procesie dojrzewania owoców”**

autor rozprawy: **Natalia Kutyríeva-Nowak**

Zrozumienie mechanizmów regulujących dojrzewanie owoców stanowi istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i w kontekście poprawy jakości, trwałości i wartości odżywczej plonów. Istotnym aspektem jest poznanie zmian zachodzących w obrębie ściany komórkowej, które prowadzą nie tylko do modyfikacji strukturalnych, ale także funkcjonalnych, co ma odzwierciedlenie w zmianach tekstury, jędrności, czy podatności owoców na infekcje przez patogeny. W ostatnich dekadach coraz więcej uwagi poświęca się nie tylko klasycznym składnikom ściany, takim jak pektyny, celuloza czy hemicelulozy, ale również mniej poznanym elementom macierzy pozakomórkowej, takim jak glikoproteiny. Wśród nich białka arabinogalaktanowe (AGP) wyłaniają się jako grupa wysoce złożonych i różnorodnych cząsteczek, pełniących funkcje strukturalne, ale też sygnalizacyjne i rozwojowe. Mimo ich powszechnego występowania w roślinach naczyniowych, rola AGP w fizjologii dojrzewania owoców pozostaje nadal niedostatecznie wyjaśniona, co czyni ten obszar badawczy aktualnym i istotnym dla dalszego rozwoju nauki o roślinach oraz dla zastosowań w rolnictwie i ogrodnictwie.

Rozprawa doktorska mgr Natalii Kutyríevy-Nowak została przygotowana w formie cyklu publikacji. Składa się z części wstępnej, w której zawarto streszczenie rozprawy, przegląd literatury, cele badawcze oraz podsumowanie metod i wyników oraz wnioski końcowe. Rozprawa zawiera także pełne teksty czterech opublikowanych prac naukowych. Całość uzupełniono spisem literatury, wykazem wkładu własnego autorki oraz stosownymi oświadczeniami współautorów publikacji wymaganymi w przewodzie doktorskim.

W skład rozprawy wchodzi następujące publikacje:

1. A practical guide to in situ and ex situ characterisation of arabinogalactan proteins (AGPs) in fruits (2023), Plant Methods [IF: 4,7, punkty MRiRW: 140, liczba cytowań (WoS): 4]

2. Arabinogalactan protein is a molecular and cytological marker of particular stages of the tomato fruit ripening process (2023), *Scientia Horticulturae* [IF: 3,9, punkty MRiRW: 140, liczba cytowań (WoS): 9]
3. The modified activity of prolyl 4 hydroxylases reveals the effect of arabinogalactan proteins on changes in the cell wall during the tomato ripening process (2024), *Frontiers in Plant Science* [IF: 4,1, punkty MRiRW: 140, liczba cytowań (WoS): 4]
4. In vivo and ex vivo study on cell wall components as part of the network in tomato fruit during the ripening process (2024), *Horticulture Research* [IF: 7,6, punkty MRiRW: 200, liczba cytowań (WoS): 2]

Rozdział rozprawy zatytułowany Wprowadzenie zawiera rzetelny przegląd literatury źródłowej, aktualny stan wiedzy dotyczący procesu dojrzewania owoców, ze szczególnym uwzględnieniem zmian zachodzących w ścianie komórkowej, jak również stopniowo wprowadza czytelnika w problematykę białek arabinogalakтанowych. W tekście słusznie zaakcentowano rolę AGP jako potencjalnych komponentów o charakterze sygnalizacyjnym i strukturalnym. Przegląd wiedzy obejmuje zarówno klasyczne badania nad AGP z użyciem przeciwciał, jak i nowsze prace dotyczące lokalizacji tych białek w przestrzeni pomiędzy błoną a ścianą komórkową, ich zmienności w trakcie dojrzewania owoców wybranych gatunków oraz możliwego związku z degradacją struktury ściany komórkowej. Cennym elementem rozdziału jest również nawiązanie do danych ilościowych i lokalizacyjnych AGP, wskazujących na ich dynamikę i zmienność podczas procesu dojrzewania, co stanowi logiczne uzasadnienie dla dalszego pogłębiania badań w tym zakresie. Autorka wskazała też na brak pełnego wyjaśnienia mechanizmu działania AGP w kontekście dojrzewania owoców, co w sposób naturalny prowadzi do sformułowania hipotezy badawczej i celów rozprawy. Przytoczone informacje są dobrze udokumentowane literaturowo, co świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu doktorantki w temacie. Cytowane prace zostały opublikowane praktycznie wyłącznie w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Zawierają też aktualny stan wiedzy w omawianym zakresie; 80% z nich zostało opublikowane w ostatniej dekadzie, a połowa w ciągu ostatnich pięciu lat. Rozdział ten został opracowany z dużą starannością merytoryczną i logiczną.

Autorka sformułowała hipotezę badawczą jasno i precyzyjnie, wskazując na korelację między procesem dojrzewania owoców pomidora a zmianami w dystrybucji i właściwościach molekularnych białek arabinogalakтанowych (AGP): „*Dojrzewanie owoców pomidora jest ściśle związane ze zmianami dystrybucji i właściwościami molekularnymi AGP*”. Hipoteza ta wynika logicznie z przeglądu literatury zawartego we wcześniejszym rozdziale i dobrze odzwierciedla luki poznawcze obecne w aktualnym stanie wiedzy. Głównym celem badań było zrozumienie roli AGP w kształtowaniu struktury ściany komórkowej oraz ich wpływu na organizację jej składników podczas

dojrzwiania owoców. Cele szczegółowe zostały wyraźnie zdefiniowane, a każdy z nich odnosi się do konkretnego etapu badań i w następstwie odpowiada jednej publikacji. Taka struktura celów zasługuje na pochwałę, jest bowiem klarowna, logicznie powiązana z hipotezą, a przy tym spójna z konstrukcją rozprawy opartej na cyklu publikacji.

Rozdział metodyczny został opracowany z dbałością o przejrzystość i zrozumiałość dla czytelnika. Przedstawiono w nim użyty materiał badawczy tj., linie transgeniczne pomidora z represją ekspresji (linie RNAi) i nadekspresją (linie OEX oraz GFP) genu hydroksylazy 4-prolinowej typu 3 (*SIP4H3*) odpowiedzialnej za posttranslacyjną modyfikację białek strukturalnych ściany komórkowej. W doświadczeniach, kontrolę stanowiły rośliny typu dzikiego (nietransgeniczne). Pokazany został zestaw metod badawczych, zarówno na poziomie molekularnym, biochemicznym, jak i mikroskopowym, stosowanych do analizy białek arabinogalaktanowych (AGP) w owocach pomidora. W prezentowanych badaniach wykorzystano szerokie spektrum metod *in situ* i *ex situ*, w tym m.in.: Western blot, dot blot i ELISA, techniki mikroskopowe CLSM, TEM i SEM, znakowanie immunofluorescencyjne oraz immunozłotowe. Dobór materiałów i metod był ściśle powiązany z postawionymi celami badawczymi i pozwalał na ich realizację, a w efekcie dane o charakterze ilościowym i jakościowym. Szczegółowe protokoły znajdują się w kolejnych publikacjach stanowiących rozprawę, co jest zgodne z zasadami pisania rozpraw opartych na cyklu artykułów.

Bardzo wysoko oceniam osiągnięcia zaprezentowane w publikacjach i skrótkowo omówione w tekście rozprawy. Pierwsza z publikacji (w Plant Methods) pełni funkcję wyraźnie metodyczną i stanowi istotne ogniwo łączące dla całej struktury rozprawy. Celem publikacji było przedstawienie zoptymalizowanych procedur zestawu metod umożliwiających oznaczanie i lokalizację AGP w tkankach owoców pomidora. Zaprezentowano tu kompleksowy i dobrze udokumentowany przegląd technik, od immunofluorescencji, przez mikroskopię konfokalną i elektronową, aż po Western blot i ELISA. Publikacja ta wyróżnia się precyzyjnym podejściem do detekcji epitopów AGP i stanowi narzędzie mogące być wykorzystywane szerzej w badaniach nad glikoproteinami ściany komórkowej. Ryciny są czytelne, dobrze opisane i mają także wartość dydaktyczną, szczególnie te przedstawiające schematy protokołów i przykładowe obrazy mikroskopowe. Autorka rozprawy jednak trochę na wyrost stwierdza w głównym teście rozprawy, że publikacja ta opisuje optymalizację technik. Zapewne wcześniej zostały wykonane badania optymalizujące, jednak sama publikacja prezentuje tylko efekt końcowy tych badań. Nie zawiera ona żadnych wyników pozwalających zweryfikować jakie badania optymalizujące były wykonane, ani jak znacząco optymalizacja wpłynęła na efekt stosowania opisanej procedury w stosunku do tej sprzed optymalizacji.

Druga publikacja (w Scientia Horticulturae) przedstawia wyniki badań zmian ilościowych i jakościowych AGP zachodzących w trakcie dojrzwiania owoców pomidora. Wykazano, że wybrane epitopy AGP ulegają wyraźnym przemianom w miarę

dojrzewania, zarówno pod względem lokalizacji w tkance, jak i składu frakcyjnego. Szczególnie interesujące jest wykazanie obecności frakcji o niskiej masie molekularnej w końcowym stadium dojrzewania. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano, aby obecność frakcji 30 kDa AGP uznać za potencjalny marker fizjologicznej dojrzałości owoców. Wydaje się jednak, że przydatność markera wymaga dalszego potwierdzenia w oparciu o analizy w szerszym zestawie odmian. Cennym aspektem tej pracy jest równoczesne zastosowanie metod ilościowych (ELISA, Western blot) oraz lokalizacyjnych (mikroskopia konfokalna), co pozwoliło uzyskać pełniejszy obraz dynamiki zmian AGP zachodzących w czasie rozwoju owoców. W części graficznej tej publikacji wyróżniają się mikrofotografie ilustrujące rozkład epitopów w przekrojach tkankowych. Jednak uzupełnienie obrazów opisami anatomicznymi byłoby pomocne dla czytelników z mniejszym doświadczeniem w analizie obrazów histologicznych.

Trzecia publikacja (w *Frontiers in Plant Science*) stanowi kluczowy element rozprawy, nadając jej wymiar funkcjonalny. Celem badania było określenie roli AGP w kontekście regulacji struktury ściany komórkowej poprzez wykorzystanie do tego celu zestawu linii o zmodyfikowanej ekspresji genu *SIP4H3*, kodującego hydroksylazę 4-prolinową. Wprowadzenie transgenicznych linii pomidora, zarówno z wyciszoną ekspresją genu, jak i jego nadekspresją, umożliwiło analizę zależności między modyfikacjami potranslacyjnymi AGP a ich strukturą i funkcją. Zaobserwowano istotne różnice w zawartości AGP, ich rozkładzie w komórkach, a także w anatomicznej organizacji ściany komórkowej. Uwagę zwraca fakt, że charakterystyczne frakcje AGP o masie 30 kDa występujące w kontrolnych roślinach nie były obecne w liniach transgenicznych, co autorka interpretuje jako dowód zakłócenia fizjologicznego przebiegu dojrzewania. Chętnie dowiedziałbym się czy Autorka podjęła próbę wyjaśnienia przyczyn braku frakcji 30 kDa w liniach transgenicznych. Zastosowanie mikroskopii elektronowej i kwantyfikacja umożliwiło obiektywną ocenę różnic. Imponujące jest wizualne przedstawienie dokumentacji danych. Ryciny i tabele przedstawiające te dane są przemyślane, dobrze opisane i informatywne.

Czwarta publikacja (w *Horticulture Research*) zamyka cykl badawczy i stanowi próbę integracji danych w szerszym kontekście strukturalnym. Skupia się na analizie kompleksu APAP1 tj., złożonej sieci powiązań pomiędzy AGP, pektynami, ksylanem, RG-I i celulozą oraz roli AGP jako stabilizatorów tej struktury. Badania przeprowadzono przy użyciu zestawu technik dot blot i ELISA do wykazania powinowactwa cząsteczek, analizy immunolokalizacyjnej z przeciwciałami dla poszczególnych komponentów ściany, a także wizualizacji rozmieszczenia jonów wapnia metodą SEM-EDS i z użyciem sond fluorescencyjnych. Wyniki mogą wskazywać, że zmiany w poziomie AGP prowadzą do przemieszczenia wapnia, fragmentacji sieci polisacharydowej i zaburzeń architektury ściany. Jest to jeden z najbardziej oryginalnych i wartościowych aspektów całej rozprawy. Pożądane byłoby kontynuowanie analiz celem potwierdzenia funkcjonalności APAP1. Ryciny prezentujące różnice między liniami transgenicznymi i

dzikimi są bardzo dobrze opisane, prezentacja rozkładu jonów Ca muszą być jednak interpretowane z większą ostrożnością po analizie alternatywnych mechanizmów mogących wpływać na dystrybucję Ca. W pracy wykorzystano trafnie połączenie obrazowania mikroskopowego i danych ilościowych, choć nieco trudności sprawia interpretacja układu wielu zaprezentowanych rycin.

Rozdział „Podsumowanie i wnioski” jest logiczny i spójny, zawiera odpowiedzi na pytania wynikające z celów badawczych, a jego treść jest dobrze umotywowana danymi empirycznymi zawartymi w rozprawie. Wnioski są poprawnie sformułowane i wynikają z przeprowadzonych badań. Część końcowa rozdziału podkreśla aktualność i interdyscyplinarność badań nad AGP. Warto również zauważyć, że podsumowanie pracy nie ogranicza się wyłącznie do weryfikacji hipotezy. Autorka wskazuje także na potencjalne znaczenie praktyczne wyników, np. w kierunku poprawy jakości owoców, choć większe uszczegółowienie tego aspektu wzmocniłoby przekaz znaczenia osiągnięć Autorki.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć Autorki uzyskanych w ramach pracy doktorskiej zaliczyłbym:

1. wykazanie zmienności ilościowej i jakościowej AGP w zależności od stadium dojrzałości owocu;
2. określenie zmian poziomu, dystrybucji i funkcjoanalnych AGP związanych z ekspresją genu *SIP4H3*;
3. zidentyfikowanie roli AGP w integracji kompleksu APAP1 i organizacji ściany komórkowej;
4. zaproponowanie AGP jako biomarkerów dojrzewania owoców;

Cykl przedstawionych publikacji jest spójny merytorycznie, a każda publikacja wnosi osobną wartość: metodyczną, diagnostyczną, funkcjonalną i integracyjną. Prezentacja wyników, zarówno tekstowa, jak i graficzna, jest rzetelna i w większości czytelna. Uważam jednak, że pokazanie w rozdziale rozprawy zatytułowanym „Omówienie wyników”, zbiorczych zestawień wyników uzyskanych różnymi technikami, właśnie w formie wizualnej, ale uproszczonej, wręcz schematycznej, znacznie poprawiałby czytelność i zrozumienie zależności uzyskanych wyników opisanych w publikacjach. Na podkreślenie zasługuje fakt wykorzystania różnorodnych, komplementarnych technik oraz szczegółowość i wnikliwość analizy, pozwalająca na pogłębioną interpretację uzyskanych wyników. Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny, zakres badań, dobór materiałów i licznych komplementarnych metod został trafnie dobrany. Wyniki zostały doskonale udokumentowane, przeanalizowane właściwymi metodami i poprawnie zinterpretowane. Całość jest zaprezentowana w sposób czytelny i zrozumiały. Struktura rozprawy jest klarowna i logiczna. Sporadycznie pojawiają się niefortunne sformułowania, które nie umniejszają znaczenia i jakości

przeprowadzonych badań, ani uzyskanych wyników np.: „...na C- lub N-końcu DNA”, „Analizy z wykorzystaniem przeciwciała LM1 pozwoliły na potwierdzenie specyficzności ekspresji genu SIP4H3 względem HRGP.”, „... aktywność hydroksylazy 4-prolinowej (SIP4H3) wpływa na ekspresję AGP”, „...wyniki znakowania owoców linii z nadekspresją .... ”.

W trakcie analizy rozprawy nasunęły mi się pytania, które kieruję do Autorki.

1. Czy dane uzyskane w testach dot blot i ELISA wykazujące możliwość wiązania pomiędzy AGP a innymi składnikami (RG-I, ksylan, HG, celuloza) uprawniają do wnioskowania o obecności kompleksu APAP1 w komórkach owoców?
2. Jak można tłumaczyć rozbieżność wyników zwiększonej zawartości AGP uzyskanych w analizach Yariv i ELISA dla linii OEX w stosunku do zmniejszonej obecności AGP obserwowanej w ścianie komórkowej (TEM i immunolokalizacja) ?
3. Jakie znaczenie biologiczne i funkcjonalne mają zmiany AGP dla właściwości owocu np., jego jędrności, trwałości, odporności?
4. Czy oprócz funkcji strukturalnych, AGP mogą działać również jako cząsteczki sygnałowe i pośrednio wpływać na dojrzewanie owoców np., przez szlaki hormonalne?

### Konkluzja

W mojej ocenie rozprawa doktorska autorstwa mgr Natalii Kutyrivoy-Nowak pt. „Badania białek arabinogalaktanowych (AGP) jako istotnych składników ściany komórkowej w procesie dojrzewania owoców” jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego. Na podstawie przedłożonej rozprawy mogę także potwierdzić, że mgr Natalia Kutyrivoy-Nowak wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN o dopuszczenie pani mgr Natalii Kutyrivoy-Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką ocenę całej rozprawy, a zwłaszcza zaplanowanie i przeprowadzenie złożonych, kompleksowych badań eksperymentalnych prowadzących do uzyskania nowych wyników o dużym znaczeniu poznawczym w zakresie dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Natalii Kutyrivoy-Nowak.

Kraków, 27 maja 2025

prof. dr hab. inż. Rafał Barański