



Dr hab. Katarzyna Maria Marzec, prof. AGH

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki
ul. Kawory 26a, 30-055 Kraków
tel.: +48 12 617 56 65; e-mail: kmarzec@agh.edu.pl

29.11.2025, Kraków

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Joanny Niny Skrzydeł

Tytuł: *Dynamics of Composition and Structure of Arabidopsis thaliana Cell Walls in Sepal Epidermis*
Promotorzy: prof. dr hab. Dorota Kwiatkowska, dr hab. Roman Wrzalik, prof. UŚ

Wprowadzenie i podstawa prawna recenzji

Niniejsza recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, która decyzją z dnia 26 września 2025 r. powołała komisję doktorską w postępowaniu o nadanie stopnia doktora Pani mgr Joannie Ninie Skrzydeł. Recenzja została sporządzona zgodnie z obowiązującą procedurą nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne, na podstawie przepisów ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571).

Przedmiotem oceny jest rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Niny Skrzydeł pt. *Dynamics of Composition and Structure of Arabidopsis thaliana Cell Walls in Sepal Epidermis*, przygotowana w ramach szkoły doktorskiej Uniwersytetu Śląskiego. Praca została wykonana pod opieką naukową prof. dr hab. Doroty Kwiatkowskiej oraz dr hab. Romana Wrzalika, prof. UŚ.

Tematyka rozprawy mieści się w nurcie badań z pogranicza biologii rozwoju roślin, biofizyki oraz mechanobiologii, koncentrując się na analizie struktury, składu chemicznego i funkcji pierwotnej ściany komórkowej w epidermie działek kielicha *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity) oraz jej dynamiki podczas rozwoju organu.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa liczy 151 stron i została podzielona na dziesięć rozdziałów. Część główną poprzedza obszerny i merytorycznie dopracowany wstęp, stanowiący naukowe wprowadzenie do zagadnień związanych z budową, składem i dynamiką pierwotnej ściany komórkowej roślin. Autorka w sposób uporządkowany i syntetyczny przedstawia organizację i skład pierwotnej ściany komórkowej roślin okrytonasiennych, omawia rolę pektyn, hemiceluloz i celulozy w kształtowaniu właściwości mechanicznych ściany oraz opisuje mechanizmy wzrostu komórek epidermy — ze szczególnym uwzględnieniem zależności między orientacją mikrofibrili celulozowych a kierunkowością ekspansji komórkowej.

Istotnym elementem wprowadzenia jest również szczegółowa charakterystyka struktury i biosyntezy kutykuli, ze szczególnym uwzględnieniem formowania się wzoru kutykularnego na epidermie, obejmującego drobne fałdy, listewki oraz inne elementy rzeźby kutykuli (*ang. cuticular ridges*) obserwowane w epidermie działek kielicha *Arabidopsis thaliana*. Autorka omawia ponadto znane modele mechanistyczne dotyczące kształtowania się pofałdowań kutykuli oraz uwarunkowania geometryczne i biomechaniczne tego procesu. W końcowej części wstępu Autorka przedstawia bardzo ogólny zarys zastosowań technik spektroskopii oscylacyjnej, ze szczególnym uwzględnieniem spektroskopii rozpraszania ramanowskiego jako narzędzia do analizy *in situ* składu chemicznego ścian komórkowych. Ten fragment ma charakter raczej syntetyczny i pełni funkcję skrótowego wprowadzenia do metodologii zastosowanej w dalszej części rozprawy.

Część eksperymentalna rozpoczyna się (rozdział drugi) sformułowaniem celów i hipotez badawczych, obejmujących pięć kluczowych zagadnień: zmienność składu pierwotnej ściany komórkowej w trakcie rozwoju działek kielicha, anizotropię strukturalną jej komponentów,

występowanie mechanizmów kompensacyjnych u analizowanych mutantów, a także formowanie oraz modyfikacje wzoru kutykularnego w trakcie ekspansji powierzchni epidermy.

Rozdział trzeci przedstawia opis przygotowania materiału biologicznego oraz zastosowanych metod pomiarowych. Podstawową technikę analityczną stanowi spektroskopia rozpraszania ramanowskiego sprzężona z mikroskopią konfokalną, wsparta zestawem narzędzi chemometrycznych i zaawansowanych metod analizy danych. Na podkreślenie zasługuje również wykorzystanie komplementarnych technik mikroskopowych — transmisyjnej (TEM) i skaningowej (SEM) mikroskopii elektronowej — które poszerzają możliwości interpretacyjne badań i potwierdzają szeroki zakres umiejętności metodologicznych doktorantki. Integracja tych metod pozwala na spójne zestawienie wyników odnoszących się zarówno do składu chemicznego, jak i morfologii oraz dynamiki zmian struktury powierzchni epidermy, a tym samym znacząco wzmacnia wnioskowanie biologiczne.

Główną część pracy stanowią rozdziały cztery i pięć, w których przedstawiono analizę map spektroskopii rozpraszania ramanowskiego rejestrowanych wzdłuż ścian komórkowych, segmentację widm z wykorzystaniem analizy skupień metodą *k*-średnich (ang. *k-means clustering*), identyfikację widm składowych przy użyciu wielowymiarowej dekonwolucji krzywych metodą naprzemiennych najmniejszych kwadratów (MCR-ALS, ang. *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*), a także badania anizotropii pasm zależnych od polaryzacji, służące ocenie stopnia uporządkowania celulozy oraz komponentów kutykuli. Część spektroskopową uzupełniają ilościowe analizy geometrii komórek oraz dynamiki wzoru kutykularnego, prowadzone na podstawie sekwencji obrazów konfokalnych *in vivo*.

Zwieńczeniem rozprawy jest rozdział szósty, w którym Autorka syntetyzuje uzyskane wyniki, wskazuje ich znaczenie biologiczne i metodologiczne oraz proponuje dalsze kierunki badań — m.in. wykorzystanie technik o wyższej rozdzielczości przestrzennej w analizie architektury kutykuli. Pracę odpowiednio zamykają rozdziały siedem do dziesięć stanowiące uporządkowany alfabetycznie wykaz literatury, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz dane uzupełniające.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Rozprawa Pani mgr Skrzydeł stanowi interdyscyplinarne opracowanie naukowe, łączące metody biologiczne, biofizyczne oraz spektroskopii molekularnej w analizie dynamiki pierwotnej ściany komórkowej epidermy działek kielicha *Arabidopsis thaliana*. Autorka w sposób kompetentny formułuje hipotezy dotyczące zmian składu chemicznego ściany komórkowej, jej anizotropii strukturalnej, potencjalnych mechanizmów kompensacyjnych u mutantów oraz zależności pomiędzy dynamiką wzrostu komórek epidermy a powstawaniem i przebudową elementów rzeźby kutykuli. Cała część eksperymentalna została opracowana z dużym nakładem pracy i obejmuje odpowiednią liczbę pomiarów oraz analiz, co świadczy o wysokim stopniu zaangażowania Autorki. Struktura badań jest logiczna i dobrze powiązana z postawionymi hipotezami, jednak część wyników wymaga pogłębionej analizy oraz rozszerzenia o dodatkowe dane referencyjne, aby wnioski mogły zostać w pełni potwierdzone i jednoznacznie uzasadnione.

Jednym z mocnych elementów rozprawy jest trafny dobór metod analitycznych oraz ich integracja w ramach spójnego podejścia badawczego. Spektroskopia rozpraszania ramanowskiego — kluczowa technika zastosowana w pracy — została poprawnie wykorzystana w kontekście obrazowania i analizy heterogeniczności ściany komórkowej. Niemniej, mimo właściwie przeprowadzonych pomiarów, analiza widm nie zawsze w pełni wykorzystuje potencjał metody, zwłaszcza w zakresie jej czułości na skład chemiczny, konieczności pracy z widmami referencyjnymi oraz jednoznacznego przypisania pasm, co ogranicza precyzję interpretacji. Ważnym elementem pracy jest zastosowanie zaawansowanych narzędzi chemometrycznych, które zwiększają wiarygodność interpretacji i pozwalają na ocenę heterogeniczności składu chemicznego ściany. Wyniki uzyskane w rozprawie zostały konsekwentnie odniesione do przyjętych hipotez. Autorka wnioskuje, że skład

chemiczny pierwotnej ściany epidermy ulega ilościowym zmianom podczas dojrzewania działek kielicha, a zastosowanie metody MCR-ALS potwierdza przebudowę ściany w czasie ontogenezy. U mutantów zidentyfikowano dodatkowo subtelne różnice jakościowe — m.in. brak jednego z pasm kutykularnych w obszarach pomiędzy elementami wzoru kutykularnego u mutantu *csi1* oraz przesunięcie pasma hemicelulozowego w *xy11* — co potwierdza drugą część hipotezy 1. Autorka wykazała obecność anizotropii strukturalnej pierwotnej ściany komórkowej, odzwierciedlonej w pasmach zależnych od polaryzacji, które obejmują nie tylko celulozę, ale także komponenty kutykuli. Wyniki te potwierdzają hipotezę 2 i są spójne z literaturą dotyczącą m.in. mutantów zaburzających działanie kataniny. Analiza udziału sygnałów przypisanych głównym polisacharydom — pektynom, celulozie i hemicelulozie — wskazuje na występowanie mechanizmu kompensacyjnego u mutantów, co potwierdza hipotezę 3. Z kolei dane uzyskane z obrazowania *in vivo* przedstawiają dynamiczny proces morfogenezy elementów rzeźby kutykuli, zależny od anizotropii wzrostu i geometrii ściany, wspierając hipotezy 4 i 5. Szczególnie interesujące są obserwacje dotyczące mutantu *mad5*, u którego złożoność wzoru kutykularnego oraz obniżony stopień uporządkowania mikrofibrili celulozowych odzwierciedlają zaburzoną architekturę ściany.

Pomimo licznych zalet pracy, część zagadnień związanych z interpretacją danych spektroskopowych wymaga doprecyzowania. Uwagi poniższe nie podważają wartości merytorycznej rozprawy, lecz wskazują obszary, w których uzupełnienie lub pogłębienie analiz mogłoby dodatkowo wzmocnić jej naukowy charakter.

W kontekście pracy, w której spektroskopia rozpraszania ramanowskiego stanowi podstawową i decydującą technikę analityczną, należy wskazać, że część teoretyczna poświęcona tej metodzie jest niewystarczająco rozwinięta. Autorka trafnie identyfikuje pasma charakterystyczne dla celulozy, hemiceluloz, pektyn oraz komponentów kutykuli, jedynie na podstawie danych literaturowych. W rozprawie szczególnie brakuje widm referencyjnych (standardów) wszystkich głównych komponentów ściany komórkowej oraz — co kluczowe — wosków epikutykularnych. Wskazaniem byłoby aby pomiary tych standardów odbyły się w identycznych warunkach instrumentalnych jak badanych tkanek roślinnych. Brak jest również szczegółowej analizy i dyskusji dotyczącej nakładania się pasm i trudności w ich dekonwolucji, co jest niezwykle istotne przy analizie materiału biologicznego.

Segmentacja map ramanowskich zaprezentowana na rycinach 4.5 i 4.7 pozwoliła na wyodrębnienie dwóch głównych populacji widm odpowiadających obszarom ściany wykazującym uformowany wzór kutykularny oraz obszarom o powierzchni gładkiej. Na podstawie przedstawionych widm należy stwierdzić, że sygnały przypisane klastrom niebieskim mają wyraźnie bardziej lipidowy charakter. Świadczą o tym intensywne pasma rozciągających drgań C–H, w tym maksimum w okolicy $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$, a także profil w zakresie fingerprint, typowy dla długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i estrów lipidowych. Powyższe wyniki sugerują, że w preparatach mogły pozostać śladowe ilości wosków występujących w warstwie kutykularnej, co — ze względu na duży przekrój czynny rozpraszania ramanowskiego — może znacząco wpływać na charakter widma. Z uwagi na brak widm referencyjnych oraz brak ilościowych danych dotyczących skuteczności usuwania wosków powierzchniowych, interpretacja różnic pomiędzy klastrami powinna być prowadzona z większą ostrożnością. Rozszerzenie badań o komplementarne techniki analityczne, takie jak GC-MS frakcji woskowej, umożliwiłoby jednoznaczne potwierdzenie, czy obserwowane różnice widmowe wynikają z przebudowy polisacharydów ściany komórkowej, czy też — co jest równie prawdopodobne patrząc na profil widm — z niejednorodnej dystrybucji pozostałości kutykularnych lipidów.

Analiza anizotropii pasm celulozy zależnych od polaryzacji została przeprowadzona poprawnie i stanowi istotny element pracy, szczególnie w odniesieniu do mutantu *mad5*. W przypadku tego genotypu Autorka wykazała wyraźnie obniżony stopień uporządkowania mikrofibrili celulozowych, co jest zgodne z fenotypem mutantów o zaburzonym działaniu kataniny. Jednocześnie obserwowaną w

pracy zwiększoną zmienność wyników dla *mad5* warto byłoby szerzej omówić; na podstawie obrazów przedstawionych w części mikroskopowej można przypuszczać, że przyczyną mogą być bardziej pofałdowane, nieregularne ściany peryklinalne oraz większa heterogeniczność topografii powierzchni, które istotnie wpływają na lokalną orientację komponentów ściany.

W toku lektury odnotowano jedynie drobne nieścisłości redakcyjne i językowe, które nie wpływają na merytoryczną wartość rozprawy. Należą do nich sporadyczne literówki, niekiedy nieprecyzyjne nazwy technik oraz powtórzenia. Np. określenia takie jak „Raman imaging”, „Raman microscopy” czy „Raman spectroscopy” są stosowane w rozprawie wymiennie, bez doprecyzowania ich znaczenia ani użycia pełnej, poprawnej nazwy techniki, tj. „spektroskopia rozpraszania ramanowskiego” (ang. *Raman scattering spectroscopy*). Brakuje również wyjaśnienia, że mikrospektroskopia ramanowska stanowi rozwinięcie tej metody i nie jest techniką odrębną, lecz rozszerzeniem spektroskopii rozpraszania ramanowskiego o obrazowanie przestrzenne. W spisie literatury — w szczególności duplikaty pozycji Mazurek et al. (2013) oraz Stępiński et al. (2020). Uwagi te nie obniżają jakości edytorskiej pracy.

W analizie rozprawy pojawiło się kilka kwestii wymagających doprecyzowania. Poniższe pytania dotyczą kluczowych aspektów metodologicznych i interpretacyjnych; odpowiedzi na nie podczas obrony pozwolą pełniej zaprezentować intencje badawcze Autorki oraz jej kompetencje merytoryczne.

1. W rozprawie część teoretyczna dotycząca spektroskopii oscylacyjnej jest dość skrótowa. Jakie są, Pani zdaniem, największe trudności w analizie widm pierwotnych ścian komórkowych z zastosowaniem spektroskopii rozpraszania ramanowskiego przy wzbudzeniu 532 nm?
2. Co było powodem rezygnacji z pomiarów widm związków standardowych — zarówno składowych ściany komórkowej, jak i składników kutykuli oraz wosków — zarejestrowanych w identycznych warunkach eksperymentalnych ($\lambda = 532$ nm, ten sam obiekt, ta sama procedura obróbki widm)? W jaki sposób, Pani zdaniem, włączenie takich widm referencyjnych oraz pełnego, precyzyjnego przypisania pasm mogłoby wpłynąć na interpretację i jednoznaczność wniosków?
3. W jaki sposób w praktyce oceniała Pani skuteczność usunięcia wosków z powierzchni ściany? Czy rozważała Pani metody ilościowe do oceny preparatyki?
4. W segmentacji map (Fig. 4.5, 4.7) klastr niebieski wykazuje widma jednoznacznie bardziej lipidowe. Jak ocenia Pani możliwość, że różnice między klastrami odzwierciedlają w większym stopniu resztkową obecność wosków niż różnice w składzie polisacharydów ściany?
5. Czy mogłaby Pani wyjaśnić, w jaki sposób topografia powierzchni oraz zmienna krzywizna ściany komórkowej wpływają na jakość i interpretację rejestrowanych widm ramanowskich? Jak dokładnie przygotowywano i pozycjonowano próbki na podłożu pomiarowym? Czy rozważano alternatywne metody przygotowania przekrojów — np. kriotomie — które mogłyby ograniczyć artefakty wynikające z geometrii próbki, zwłaszcza w przypadku mutantu *mad5*?
6. Jakie kryteria zastosowała Pani, wybierając liczbę klastrów w algorytmie K-means? Czy analizowano również modele wieloklasowe?
7. W przypadku mutantu *mad5* obserwuje Pani dużą zmienność wartości anizotropii. Jakie czynniki — biologiczne lub instrumentalne — uważa Pani za najbardziej prawdopodobne źródło tej zmienności?

Ocena osiągnięć naukowych doktorantki

Dorobek naukowy mgr Joanny Niny Skrzydeł, oceniany na podstawie profilu Scopus (Author ID: 57222992134), świadczy o dobrze ukształtowanym profilu badawczym w obszarze biologii rozwoju roślin, mechanobiologii i badań nad strukturą ściany komórkowej. Doktorantka jest współautorką artykułu oryginalnego opublikowanego w *Cell Reports* (2023, IF=7.5), poświęconego roli białka CSI1 w

koordynacji kierunku wzrostu komórek, w którym przedstawiono analizy organizacji mikrofibryli celulozowych oraz dynamiki morfogenezy organów. Tematyka i metodologia tej pracy — obejmująca m.in. analizę struktury ściany komórkowej oraz zależności między mikrofibrylami a kierunkiem wzrostu — pozostają bezpośrednio zgodne z kluczowymi zagadnieniami rozprawy doktorskiej, a Pani mgr Skrzydeł jest drugą autorką. Drugą publikacją pierwszoautorską Pani mgr Skrzydeł jest artykuł przeglądowy opublikowany w *International Journal of Molecular Sciences* w roku 2021 (IF=6.2). Tekst ten przedstawia współczesną wiedzę o budowie, organizacji i mechanicznych właściwościach kutykuli, ze szczególnym uwzględnieniem mikromorfologii kutykuli w *perianthium* — zagadnień będących osią centralnych rozdziałów rozprawy. Obie publikacje są dobrze cytowane, tematycznie spójne z pracą doktorską i stanowią dowód zarówno kompetencji merytorycznych, jak i samodzielności badawczej doktorantki. Dodatkowo mgr Skrzydeł uczestniczyła w realizacji projektu międzynarodowego ERA-CAPS (NCN), którego zakres — obejmujący mechaniczne podstawy rozwoju organów roślinnych i rolę CSI1 — pozostaje ściśle powiązany z tematyką rozprawy. Wszystkie te elementy wskazują, że osiągnięcia naukowe doktorantki spełniają wymagania stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie nauki biologiczne.

Podsumowanie i końcowa ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Niny Skrzydeł pt. „*Dynamics of Composition and Structure of Arabidopsis thaliana Cell Walls in Sepal Epidermis*” stanowi interdyscyplinarny wkład w badania nad strukturą, dynamiką i mechanobiologią pierwotnej ściany komórkowej oraz kutykuli roślin okrytonasiennych. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka — z wykształcenia biolog — podjęła się zastosowania zaawansowanych technik spektroskopii oscylacyjnej, w tym mikrospektroskopii rozpraszania ramanowskiego, które należą do metod szczególnie wymagających zarówno pod względem eksperymentalnym, jak i interpretacyjnym. Prawidłowe wykorzystanie tych narzędzi, w połączeniu z analizą chemometryczną i komplementarnymi technikami mikroskopowymi, świadczy o samodzielności badawczej oraz wysokiej kulturze metodologicznej doktorantki. Całość badań została przeprowadzona w sposób spójny z postawionymi hipotezami. Pomimo przedstawionych uwag, rozprawa prezentuje wysoki poziom merytoryczny i metodologiczny. Praca w pełni wpisuje się w aktualne kierunki badań nad mechanobiologią roślin.

Rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571). Wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Niny Skrzydeł do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

