



Zakład Botaniki Ogólnej

Instytut Biologii Eksperymentalnej

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

61-614 Poznań, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, tel. 61 829-5611

Dr hab. prof. UAM Magdalena Krzesłowska

Zakład Botaniki Ogólnej

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Poznań, dn. 05.12. 2025 r.

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr Joanny Niny Skrzydeł, pt. „Dynamika składu i struktury ścian komórkowych epidermy działek kielicha u *Arabidopsis thaliana*”.

(Tytuł oryginalny “Dynamics of composition and structure of *Arabidopsis thaliana* cell walls in sepal epidermis”)

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Joanny Skrzydeł, została napisana w języku angielskim i dotyczy obszaru badań związanego z przebudową ściany komórkowej o charakterze pierwotnym, w czasie wzrostu i rozwoju komórek. W tym szczególnym przypadku, badania dotyczyły zmian składu i struktury zewnętrznej, ściany abaksjalnej epidermy działek kielicha u *Arabidopsis thaliana*. Doniesienia literaturowe dotyczące tej problematyki są stosunkowo skromne i większość z nich pojawiła się w ciągu ostatnich lat. Pokazuje to, że podjęta przez Doktorantkę tematyka wpisuje się w stosunkowo nowy, nurt badań. Co ważne, część wyników zawartych w pracy ma aspekt nowości naukowej.

W niniejszej rozprawie doktorskiej możemy wyróżnić dwa główne nurty. Pierwszy dotyczył analizy zmian składu zewnętrznej ściany komórkowej epidermy w czasie rozwoju działki kielicha i porównania tego składu do podobnej ściany u mutantów: *csil-3*, *mad5*, *pme35*, *xyl1-4* - z wykorzystaniem spektroskopii Ramana.

Drugi nurt dotyczył próby wyjaśnienia przyczyn powstawania i zmian wzoru prążków kutykularnych obecnych na powierzchni zewnętrznej ściany abaksjalnej epidermy działek kielicha u *A. thaliana*. W tej części eksperymentów wykorzystano głównie mikroskopię konfokalną oraz nowoczesne narzędzia, takie jak MorphoGraphsX 2.0. W badania te, oprócz roślin typu dzikiego, Col-0, włączono mutant - *mad5*, który wykazywał najsilniejsze różnice fenotypowe w porównaniu do Col-0. Co ważne, różnice te dotyczyły, m.in. wzoru prążków kutykularnych na powierzchni ściany zewnętrznej abaksjalnej epidermy działki kielicha – przedmiotu szczegółowych analiz w tej części pracy.

Ocena formalna pracy

Przedstawiona do oceny praca liczy 151 stron i zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały: wstęp, cele pracy wraz z hipotezami badawczymi, materiał i metody, wyniki wraz z figurami (zdjęciami), tabelami i schematami, dyskusję, wnioski, spis literatury, streszczenie w języku angielskim i polskim oraz tabelę uzupełniającą.

Wstęp liczy 31 stron i jest przeglądem literatury związanej z zagadnieniami podjętymi w niniejszej rozprawie doktorskiej. Co ważne, uwzględnia doniesienia z ostatnich lat. Rozdział ten pokazuje znajomość literatury przedmiotu Doktorantki. Zawiera, m.in. podrozdziały omawiające główne składniki budujące pierwotną ścianę komórkową, modele struktury ściany i jej ekspansji. Ponadto, Doktorantka zamieściła we wstępie podrozdział dotyczący wykorzystania techniki spektroskopii Ramana w badaniach składu ściany komórkowej, przedstawiła dane i dotychczasowe doniesienia literaturowe dotyczącego obiektu niniejszej rozprawy – działki kielicha u *A. thaliana*, a szczególnie ściany zewnętrznej jej epidermy. Ponadto, Doktorantka w osobnym podrozdziale Wstępu omówiła kutykulę pokrywającą zewnętrzną ścianę epidermy – jej skład, powstawanie, jak również modele wyjaśniające tworzenie się wzorów kutykularnych na powierzchni ściany.

W rozdziale 2 „Objectives” Doktorantka przedstawiła obiekt badawczy oraz pięć hipotez badawczych, które weryfikowała w kolejnych eksperymentach.

Ocena merytoryczna pracy

Na podkreślenie zasługuje fakt, że zdecydowaną większość badań przeprowadzono *in vivo*, czyli na materiale żywym, nieutrwalonym, niebarwionym, co wpisuje się w ogólny trend współczesnych badań biologicznych.

Zastosowanie mikrospektrofotometrii Ramana pozwoliło na śledzenie zmian składu ściany komórkowej *in situ*, w żywych, nieuszkodzonych komórkach zarówno w typie dzikim jak i u mutantów. Jest to technika szybka i nieinwazyjna. Z drugiej strony wyniki otrzymane z wykorzystaniem tej techniki mogą być niejednoznaczne, szczególnie dotyczące składu ścian komórkowych. Jak napisała bowiem Doktorantka w rozdziale Dyskusja: „Wiele polimerów ścian komórkowych ma podobne grupy chemiczne, co powoduje nakładanie się pasm Ramana, co utrudnia jednoznaczną identyfikację. W szczególności polisacharydy ścian komórkowych mają podobną strukturę chemiczną, co prowadzi do nakładania się pasm Ramana z powodu drgań wspólnych grup funkcyjnych, jak w przypadku celulozy i hemicelulozy (Gierlinger i in. 2012, Zhang i in. 2017B)”. Uważam, za cenne iż Doktorantka zdaje sobie sprawę z ograniczeń stosowanej techniki i z możliwości otrzymania niejednoznacznych wyników, co wielokrotnie przewija się w Dyskusji zamieszczonej w pracy. Co więcej, w rozdziale Dyskusja, Doktorantka poświęciła cały rozdział temu zagadnieniu: (5.4. Zalety i wady zastosowania mikrospektroskopii ramanowskiej w badaniach pierwotnych ścian komórkowych). Rozdział ten zawiera wiele cennych informacji. Niemniej, ma on raczej charakter rozdziału podręcznikowego, bez odniesień do otrzymanych wyników i moim zdaniem nie powinien być włączony do Dyskusji, jeśli już, to raczej do Wstępu.

Również druga część badań zawartych w rozprawie, dotycząca powstawania i wzorów prążków kutykularnych, została przeprowadzona głównie na żywych działkach kielicha (z wyjątkiem obrazów z mikroskopii elektronowej) z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej i autofluorescencji kutikuli (zawartość kutyny). Tak więc i w tych badaniach nie utrwalano materiału, ani nawet nie barwiono. Jak wiemy każde z tych działań może prowadzić do zmian, powstawania artefaktów, nieobecnych w żywej komórce. To również zaleta otrzymanych wyników badań, które zostały bardzo dobrze przedstawione i zilustrowane w rozdziale Wyniki.

Generalnie, cennym rozdziałem rozprawy jest Dyskusja, dojrzała, omawiająca otrzymane wyniki w świetle najnowszej literatury przedmiotu zaiwrająca też próby wyjaśnienia, np. czynników oddziałujących na wzór prążków kutykularnych, w oparciu już istniejące modele, pochodzące z publikacji ostatnich lat. Co również cenne w moim odczuciu, Doktorantka w tym rozdziale wielokrotnie podkreśla swój dystans do otrzymanych wyników, które mogą być niejednoznaczne.

Szczegółowe komentarze, sugestie i pytania

Zastosowane mutanty *Arabidopsis* są dobrze omówione we Wstępie, niemniej, dla łatwiejszej orientacji czytelnika i klarowności wyników, moim zdaniem, niezbędne byłoby zamieszczenie tabeli przedstawiającej krótko cechy mutantów – szczególnie jeśli w doświadczeniach zastosowano więcej niż jeden mutant. Przykładowo.

Mutant	cechy
<i>pme32-2</i>	Zredukowana aktywność metyloesterazy pektynianowej (PME); mniej pektyn słabo zestryfikowanych, mniej połączeń łańcuchów pektyn przez Ca^{2+} , mniej sztywne ściany, fenotypowo rośliny pokładające się (Hongo et al. 2012).
<i>xyl1-4</i>	Brak aktywności hydrolazy glikozylowej (α -ksyloglikozylazy); redukcja poziomu ksyloglukanu, nadmiar reszt ksylozy w łańcuchach ksyloglukanu prowadzi do krótszych łuszczyń i zmniejszonej żywotności (fitness) roślin mutantów, redukcja szybkiej elongacji komórek, wpływ na demetylację pektyn – zaburzenie wzrostu, zaburzenie sztywności komórek epidermy działek kielicha, zaburzenie wzrostu anizotropowego
<i>csi1-3</i>	Zaburzenie połączenia celulazy (CESA) z mikrotubulami (MT) – zaburzenie ułożenia mikrofibryli celulozowych (mikrofibryle przy błonie, najmłodsza warstwa, nie są ułożone równolegle do MT korykalnych, czyli prostopadle do głównego kierunku wzrostu komórki) – redukcja wzrostu elongacyjnego komórki, redukcja wzrostu hypokotyla, korzeni i organów kwiatowych w tym działek kielicha. Zmienia rozmiaru i kształt organów
<i>mad5</i>	Brak aktywności <i>microRNA 5</i> – wpływa na kataninę, enzym związany z MTs, niezbędny dla prawidłowej orientacji podziału

	komórki i anizotropowości wzrostu komórki. Fenotypowo mniejsze liście i całe rośliny
--	--

1. Mutant *pme35* został omówiony we wstępie, ale w doświadczeniach zastosowano mutantą *pme32-2*, którego cechy nie zostały wcześniej omówione. Rozumiem, że jest to mutant podobny do *pme35*, czyli o zredukowanej aktywności enzymu - metyloesterazy pektynianowej, ale czym faktycznie różniły się te mutanty? Warto byłoby to wyjaśnić.
2. Stosowano dwa mikroskopy konfokalne w badaniach: Zeiss LSM 700 i Zeiss LSM 800. Doktorantka nie podała, czy różniły się one wyposażeniem, niezbędnym do badań, czy był jakiś inny powód zastosowania dwóch rodzajów sprzętu. Warto byłoby to napisać.
3. Bardzo pomocny dla czytelnika jest schemat obrazujący parametry kształtu komórek należących do trzech grup (Fig. 3.4.) oraz obrazy przykładowych komórek typu Col-0 (górny rząd) z fragmentami komórek wybranymi do analizy wzoru prążków kutykularnych przy użyciu narzędzia FibrilTool (dolny rząd) Fig. 3.5.).
4. Na str. 33 dowiadujemy się, że do spektrometrii Ramana, były brane działki kielicha ze stadium 10 i 12. Stadia te są oczywiście opisane w zacytowanej w tym miejscu przez Doktorantkę pracy Smyth et al. 1990. Jednakże dopiero w rozdziale „Wyniki” na str. 46 dowiadujemy się, że w stadium 10 działka kielicha nadal rośnie, a prążki kutykularne nie pokrywają jeszcze całej powierzchni działki, podczas gdy w stadium 12 działka kielicha już nie rośnie, a cała jego powierzchnia jest pokryta wyraźnymi prążkami kutykularnymi. Może warto byłoby jednak zamieścić tę charakterystykę już w rozdziale Materiał i Metody oraz zdjęcie działki w stadium 10 i 12 dla zobrazowania różnic w pokryciu prążkami w obu stadiach.
5. Co w pierwszej chwili zaskakujące skład ściany w obszarach z prążkami kutykularnymi i bez prążków nie różnił się znacząco. Zarówno w obszarze ściany z prążkiem jak i bez prążka obecne były takie substancje jak pektyny, celuloza i hemicelulozy. Na Fig. 4.4. z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) warstwa CL (*ang. cuticular layer*), czyli warstwa kutykularna, ma strukturę zbliżoną do ściany pierwotnej z celulozą, pektynami i hemicelulozami, choć może występować tam pewna ilość fenoli i wosków. Gradient tych substancji na terenie kutykuli dobrze przedstawia schemat w pracy Reynoud et al. 2021 cytowanej też przez Doktorantkę. Tak więc po zapoznaniu się z danymi literaturowymi podobne wyniki spektrometrii Ramana dotyczące składu ściany dla obszarów z prążkami kutykularnymi i bez prążków nie są aż tak zaskakujące. Tym bardziej, że jak napisała Doktorantka: „ze względu na niewielką grubość pierwotnej ściany komórkowej w stosunku do rozdzielczości pomiarów ramanowskich (ryc. 4.4), oddzielenie ściany komórkowej od kutykuli podczas pomiarów było niemożliwe: I dalej na stronie 59 „Analiza mikrofotografii z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM -patrz ryc. 4.4B) sugeruje, że prążki działek kielicha zbudowane są nie tylko z kutyny i wosków, ale także zawierają rdzeń bogaty w pektynę, prawdopodobnie z osadzonymi mikrofibrylami celulozowymi”.
6. Na zdjęciach z TEM wykonanych przez Doktorantkę (Fig. 4.17.A,B) w niektórych prążkach obszary rdzenia są wyraźnie ciemniejsze niż ściany pierwotne, a w innych nie. To sugeruje możliwe zróżnicowanie składu ściany rdzenia w różnych prążkach. Analizę składu rdzenia prążków i ewentualnych różnic w składzie ściany między prążkami, można by przeprowadzić

w przyszłości, np. techniką immunogold do TEM, z wykorzystaniem stosownych przeciwciał. Przydałoby się też zdjęcie z TEM, nieco lepszej jakości, fragmentu ściany z kilkoma prążkami kutykularnymi, w większym powiększeniu, pokazującym strukturę ściany w kilku różnych prążkach.

Chciałabym dodać w tym miejscu, że struktura i skład prążków kutykularnych jest dla mnie szczególnie interesująca, ponieważ w naszych badaniach dotyczących anatomii i ultrastruktury liści klonu i lipy rosnących na szlamach pokopalnianych, w perspektywie wykorzystania tych gatunków do fitoremediacji terenów przemysłowych, również w TEM obserwowaliśmy pojawianie się podobnych prążków, które określaliśmy jako outgrow's, czyli wyrostki. Co ciekawe, u klonu pojawiało się ich dużo więcej w liściach drzew rosnących na szlamie pokopalnianym w porównaniu do kontroli (Krzesłowska et al. 2024), podczas gdy u lipy było odwrotnie.

7. Warto podkreślić, że ciekawym wynikiem rozprawy i jednocześnie nowością naukową, było wykazanie obecności pasma 1678cm^{-1} , charakterystycznego tylko dla obszaru ściany z prążkiem - wskazującego na kutynę, podczas gdy w obszarze bez prążka występowało pasmo 1594cm^{-1} , wskazujące na kutynę z fenolami, co jest często spotykane w obszarze kutikuli – o czym też wspomniała Doktorantka we Wstępie.
8. W rozdziale 4.1.4 Kompensacyjny wpływ składu ściany komórkowej u mutantów – wpływ ten nie był widoczny, np. u mutantów „celulozowych” - z zaburzonym funkcjonowaniem CESA, *csi1* oraz *mad5*. Był natomiast widoczny w mutancie *pme32*, gdzie zwiększony poziom pektyn o wysokim stopniu estryfikacji (raczej unikamy sformułowania zestryfikowanych czy deestryfikowanych ponieważ są nieprecyzyjne - Willats, McCartney, Knox 2001; Planta 213; 37-44), a więc nie tworzących mostków pomiędzy łańcuchami homogalakuronanu (HG) z udziałem Ca^{2+} , wzmacniających strukturę ściany, był kompensowany przez wyższy poziom celulozy (substancji szkieletowej ściany) i hemiceluloz (ksyloglukanu) - składnika łączącego mikrofibryle celulozowe w sieć. Niemniej, obrazy z pracy Hongo et al. 2012, cytowanej również przez Doktorantkę, dla podobnego mutantu - *pme35* - pokazują, że rośliny te (obraz po 40 dniach hodowli), pokładają się/wylegają, a więc ta kompensacja nie jest do końca efektywna. Oczywiście, wyniki Doktorantki dotyczą zewnętrznej ściany komórek abaksjalnej epidermy działek kielicha, a nie całej rośliny, ale chciałabym zapytać jak wyglądały rośliny mutantu *pme32* w hodowli u Doktorantki.

Kompensacja była także widoczna u mutantu z obniżonym poziomem hemiceluloz (ksyloglukanu) *xyl1*, gdzie odnotowano wzrost poziomu celulozy. I tu także chciałabym zapytać, jak wyglądały te rośliny w porównaniu do roślin dzikich Col-0.

9. Z kolei mutanty, u których nie odnotowano kompensacji, np. *csi1* wg. publikacji Birmingham et al. 2012 wykazują, m.in. wyraźną redukcję wzrostu. Co ciekawe, w niniejszych doświadczeniach, w mutancie *csi1* nie odnotowano obniżenia poziomu celulozy (choć prawdopodobnie układ mikrofibrili celulozowych mógł być zaburzony), ale odnotowano wyraźny spadek poziomu pektyn o wysokim stopniu estryfikacji. Jak Doktorantka mogłaby wyjaśnić to zjawisko? Niestety nie mamy danych dla poziomu pektyn o niskim stopniu estryfikacji, które tworzą mostki pomiędzy łańcuchami HG z udziałem Ca^{2+} , co wzmacnia strukturę ściany. Jak Doktoranta sądzi, czy obniżenie poziomu pektyn o wysokim stopniu estryfikacji mogło wiązać się ze wzrostem frakcji pektyn o niskim stopniu estryfikacji i wzmocnieniu ściany w ten sposób? Wówczas też mielibyśmy do czynienia z efektem

- kompensacyjnym. Czy są jakieś dane literaturowe na ten temat? Szkoda, że nie sprawdzono poziomu tej frakcji pektyn w doświadczeniach zaplanowanych w tej rozprawie.
10. We wnioskach końcowych Doktorantka napisała, że hipoteza 3, dotycząca kompensacji obniżenia poziomu danego składnika w ścianie mutantów, została potwierdzona, ale została ona potwierdzona częściowo, tylko dla niektórych mutantów. Jest taka informacja w rozdziale Dyskusja, ale brakuje jej we Wnioskach Końcowych.
 11. W drugiej części pracy dotyczącej dynamicznych zmian we wzorze kutykularnym na powierzchni ściany działki kielicha, na stronie 72, Doktorantka dobrze uzasadnia wybór mutantu *mad5* do dalszych badań podając jego cechy. Jednak w pierwszym zdaniu tego akapitu Doktorantka napisała: „Spośród wszystkich analizowanych genotypów, mutant *mad5* wykazuje najsilniejszy fenotyp pod względem morfologii i wzrostu działek kielicha”. Jest to skrót myślowy/żargon laboratoryjny. Powinno być napisane raczej: najsilniejsze różnice fenotypowe w porównaniu do roślin dzikich Col-0.
 12. Również na str. 72 Doktorantka napisała, że spektroskopia Ramana umożliwiła badania składu zewnętrznych ścian pierwotnych komórek epidermy działek *A. thaliana* i że badania te wykazały subtelne zmiany w składzie ścian w końcowych etapach rozwoju działek. Rozumiem, że wybrano do analiz ostatnie stadia rozwoju działek kielicha, ponieważ od stadium 8 zaczyna się formowanie prążków kutykularnych i tego problemu dotyczyła znaczna część dalszych analiz. Niemniej, wydaje się bardzo prawdopodobne, że we wcześniejszych stadiach rozwoju działek kielicha, skład zewnętrznej ściany zmieniał się bardziej znacząco. Czy są jakiekolwiek dane na temat zmian składu ściany komórkowej we wcześniejszych stadiach rozwoju działek?
 13. Str. 73. Fig. 4.17. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego skaningowego (SEM) są dobrej jakości i klarownie ilustrują cechy pąków, występowanie działek kielicha oraz wzory prążków kutykularnych na ścianie zewnętrznej epidermy u rośliny dzikiej i u mutantu *mad5*, które były analizowane w dalszej części pracy. Bardzo dobrze, że Doktorantka zamieściła takie porównanie. Jednak zdjęcia z TEM, szczególnie 4.17B, są przeciętnej jakości. Byłoby dobrze poprawić ich jakość oraz pokazać warstwy ściany łącznie z regionem kutikuli w większym powiększeniu, na większym zdjęciu.
Chciałam też zapytać - dlaczego Doktorantka nie zamieściła zdjęć z TEM zewnętrznej ściany peryklinalnej z prążkami u mutantu *mad5*, a jedynie z rośliny dzikiej? Szczególnie, że pozostała część tej figury (zdjęcia z SEM) zawiera takie porównania i dobrze są widoczne różnice wzoru i wielkości prążków kutykularnych pomiędzy rośliną dziką i *mad5*. Jednakże, na zdjęciach z SEM możemy zobaczyć tylko ich powierzchnie, a niestety brak obrazu ultrastruktury.
 14. Brak tytułów wielu figur zamieszczonych w pracy. Doktorantka od razu opisuje poszczególne zdjęcia w tablicach.
 15. Fig. 4.18 Col 0 i 4.19 *mad5* – w *mad 5* komórki są większe i o innych kształtach niż w Col -0 – warto byłoby o tym wspomnieć.
 16. Str. 79 i 80 Figury 4.21A i 4.22A – Niestety, nie są dla mnie widoczne czerwone ramiona krzyżyków pokazujących kierunek wpuklenia powierzchni komórki, nawet po powiększeniu na ekranie komputera.
 17. Str. 82 Formowanie prążków kutykularnych w grupie 1. Do analiz wzięto 6 komórek linii Col-0 i aż 18 komórek mutantu *mad5*. Brak informacji skąd ta różnica w liczbie. Myślę, że

wynika to z faktu iż patrząc na Fig. 4.21 ilustrującą komórki typu dzikiego Col-0 oraz Fig. 4.22 ilustrującą komórki mutantu *mad5* można zauważyć, że komórek grupy 1 jest znacznie więcej w *mad5* niż u Col-0. Uważam jednak, że w tym miejscu warto, aby Doktorantka zaznaczyła dlaczego jest aż taka różnica w liczbie analizowanych komórek pomiędzy wariantami. Ta sama uwaga dotyczy analiz dla komórek grupy 3, gdzie analizie poddano 11 komórek Col-0 i tylko 3 mutantu *mad5*. To również wskazuje na różnice pomiędzy Col-1 i *mad5*.

18. W trzeciej grupie komórek, o wyraźnie wydłużonym kształcie - komórki genotypu *mad5* wykazują zaburzenia zarówno w uwypukleniach (curvature) – szczególnie komórka 2, jak i ułożeniu prążków kutykularnych - wszystkie 3 pokazane komórki. Ponadto w tej grupie u *mad5* występują obszary pozbawione prążków kutykularnych – chyba, że wynika z obróbki obrazów w programie komputerowym.

Co więcej, w mutancie *mad5* zagęszczenie prążków kutykularnych i związana z tym intensywność fluorescencji jest najwyższa w czasie T48 (dla 1 i 2 grupy komórek *mad5*, oraz T24 dla trzeciej grupy komórek, a zdecydowanie najniższa i najmniej prążków kutykularnych w czasie T72. Tendencji takiej nie obserwujemy w przypadku działek kielicha roślin Col-0, gdzie intensywność fluorescencji oraz gęstość prążków kutykularnych jest podobna od T24 do T72. Szkoda, że Doktorantka nie zwróciła na to uwagi w swojej pracy. Chciałam też zapytać jak Doktorantka wyjaśniłaby te zmiany u mutantu *mad5*.

19. Wyniki przedstawione w rozdziale 4.2 (Dynamika zmian wzoru kutykularnego na powierzchni ściany komórkowej działki kielicha) pokazują cenną prawidłowość, która jest jednocześnie nowością naukową, że kierunek formowania prążków kutykularnych na powierzchni zewnętrznej ściany komórkowej abaksjalnej epidermy działki kielicha zależy przede wszystkim od głównego kierunku wydłużania się komórki (PDG_{max}), prążki są w większości komórek równoległe lub skośne do tego kierunku zarówno w działkach Col-0 jak i *mad5*. Widoczne jest to zarówno na zamieszczonych zdjęciach jak i w tabeli 4.4. Mniejszy jest związek wzoru prążków kutykularnych z kierunkiem zagięcia komórki (uwypuklenia) oraz lokalnymi kierunkami wzrostu komórki. Niemniej, w każdej grupie występują komórki, gdzie kierunek ułożenia prążków kutykularnych jest prostopadły do PDG_{max}. Jak Doktorantka sądzi, co może być tego przyczyną?
20. Na str.94 Doktorantka napisała: "W komórkach Col-0 grzbiety były wyrównane wzdłuż długiej osi komórki lub bardzo blisko niej (patrz komórki 1, 2, 6 i 9 na rys. 4.27A), podczas gdy w *mad5* orientacja prążków kutykularnych względem długiej osi komórki była zmienna (porównaj np. komórki 3, 5 i 9 na rys. 4.27B)". Moim zdaniem, jest trochę inaczej - w genotypie Col-0, ułożenie prążków kutykularnych równoległe lub zbliżone do równoległego do dłuższej osi komórki występuje w kom. 1,2,3,4 i 9. Niemniej, w *mad5* również - szczególnie w mniejszych komórkach, np. 1,2,7,8,9. Z kolei, w największej komórce nr. 10 genotypu *mad5* wzór prążków kutykularnych jest faktycznie bardzo skomplikowany.
21. Doktorantka napisała, w Dyskusji że „mutacja *csi1* wpływa na układ celulozy, anizotropię wzrostu i koordynację wzrostu w późniejszych etapach rozwoju działek kielicha, co prowadzi do zmiany wielkości i kształtu działek kielicha (Mollier i in. 2023)”. Skoro mutacja *csi1* wpływa na anizotropię wzrostu komórki to może ciekawe byłoby zobaczyć wzór prążków w tym mutancie, może w kolejnych badaniach?

22. Również w rozdziale Dyskusja Doktorantka napisała: “Co zaskakujące, analiza ilościowa nie wykazała żadnych efektów mutacji *mad5*, chociaż kształt i rozmiar działek kielicha *mad5* są znacznie bardziej zmienione niż w przypadku *csi1* (Mollier et al. 2023, Trinh et al. 2024)”. Czy może się to wiązać z zaburzeniami podziałów komórkowych w tym mutancie w związku z zaburzeniami kataniny? Jak Doktorantka sądzi?
23. Również w przypadku *pme32* Doktorantka napisała, że nie zaobserwowano żadnych efektów mutacji, z czym nie mogę się do końca zgodzić. Myślę, że jest to pewien skrót myślowy. Jak w dalszym ciągu Dyskusji napisała Doktorantka „W przypadku mutanta spodziewany jest wyższy stopień metyloestryfikacji pektyn, o którym wiadomo, że wpływa na wzrost i właściwości mechaniczne ścian i tu Doktorantka cytuje pracę Hongo i in. 2012. Właśnie w tej pracy widać było efekt morfologiczny wylegania roślin mutanta *pme35*, o którym napisałam powyżej, z załączonym pytaniem - jak wyglądała morfologia roślin mutanta *pme32* w doświadczeniach Doktorantki. Efekt ten bowiem prawdopodobnie spowodowany był wyższym poziomem pektyn o wysokim stopniu estryfikacji i obniżonym poziomie pektyn o niskim stopniu estryfikacji, a co za tym idzie, mniej sztywną ścianą tego mutanta. O tym napisała też Doktorantka w dalszej części Dyskusji. Szkoda, że nie zbadano poziomu pektyn o niskim stopniu estryfikacji w ścianach. Jeśli analizy spektrometrii Ramana dały wynik niejednoznaczny, czy zaskakujący, w kwestii poziomu pektyn - można przeprowadzić dodatkowe badania innymi technikami, np. immunocytochemiczne (immunolabelling). O takiej możliwości Doktorantka wspomina też na stronie 107 Dyskusji wyjaśniając zmiany u mutanta *xy11*. Dokładnie takie rozwiązanie chciałam też zasugerować. Ponadto w rozdziale Wyniki Doktorantka napisała, że odnotowano u mutanta *pme32* wyższy poziom celulozy. Czyli pewne efekty mutacji były widoczne, niektóre - jak wyższy poziom celulozy - jako efekty pośrednie.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Chciałabym podkreślić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Joanny Skrzydeł jest ciekawa zarówno pod względem koncepcji, jak i wartości merytorycznej. Uwagi, które zawarłam w recenzji nie obniżają, w mojej ocenie, wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej i mają raczej na celu zwrócenie uwagi Doktorantki na pewne kwestie w przyszłości. Chciałam podkreślić, że doceniam fakt iż Doktorantka podjęła się trudnego zadania analizy cienkich kutykuli pokrywających organy kwiatowe, w których bezpośrednie pomiary mechaniczne są technicznie trudne i w związku z tym dostępnych danych jest niewiele (Domínguez i in. 2017, Skrzydeł i in. 2021, Airoidi i in. 2024). Jednymi z cenniejszych wyników uzyskanych przez Doktorantkę i co ważne nowych dla Nauki było, m.in. (1) pokazanie, że na powierzchni komórek abaksjalnej epidermy działek kielicha u *A. thaliana*, reprezentujących wszystkie grupy kształtów zdefiniowane w tym badaniu (od komórek niemal izotropowych do silnie wydłużonych), nowo powstałe prążki są w większości przypadków równoległe do kierunku maksymalnego wzrostu (PDG_{max}), zarówno w skali komórkowej, jak i subkomórkowej, (2) wykazanie, że wzór prążków kutykularnych zależy od anizotropii wzrostu i krzywizny powierzchni oraz jej geometrii, (3) stwierdzenie mniejszej anizotropowości wzrostu działek kielicha w porównaniu, np. do płatków Hibiskus, czy (4) wykazanie na terenie ściany z prążkiem kutykularnym obecności pasma 1678cm⁻¹ wskazującego na kutynę co pokazało, że te regiony ściany zawierały pasmo charakterystyczne tylko dla tego obszaru,

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Skrzydeł spełnia wszystkie wymogi zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1668, ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, o dopuszczenie Pani mgr Joanny Skrzydeł do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.


Dr hab. prof. UAM Magdalena Krzesłowska