

dr hab. Joanna Czerwik-Marcinkowska prof. UJK
Zakład Botaniki, Instytut Biologii, UJK w Kielcach

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Zagaty Leśnickiej pt. „**Analiza molekularna wybranych fragmentów DNA endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria***” przygotowanej w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. KEN w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Greczek-Stachury prof. UP

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Patrycji Zagaty Leśnickiej, przygotowana pod kierunkiem Promotora, Pani dr hab. Magdaleny Greczek-Stachury prof. UP, wpisuje się w nurt ważnych badań taksonomicznych mających na celu identyfikację gatunków endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* na podstawie analizy molekularnej wybranych fragmentów DNA a także badań środowiskowych, dotyczących wiarygodnej identyfikacji i różnicowania szczepów *Paramecium*. Wybór tematu został dokonany bardzo dobrze, zarówno ze względu na istotność i doniosłość badań dotyczących identyfikacji endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* w oparciu o cechy morfologiczne, fizjologiczne ale także biochemiczne prowadzonych metodami tradycyjnymi a także ze względu na wyzwanie intelektualne, jakim jest zastosowanie nowoczesnych metod analiz molekularnych w badaniach środowiskowych. Identyfikacja gatunków symbiotycznych glonów oparta tylko na różnicach morfologicznych byłaby niekompletna i obarczona błędem natomiast zastosowanie analiz molekularnych przy ustalaniu pokrewieństwa filogenetycznego jest kluczowe do prawidłowego diagnozowania taksonomicznego. Eksperymenty badawcze wykorzystane w projekcie Doktorantki są znane, niemniej postęp badawczy notowany w ostatnich dekadach i oryginalna koncepcja Autorki stały się podstawą postawienia pytań i hipotez oraz zrealizowania ciekawego interdyscyplinarnego projektu badawczego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma układ powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych, typowy dla rozprawy doktorskiej i zawiera 129 stron maszynopisu, 29 rycin i 11 tabel. Praca ma logiczny układ i czyta się ją ze zrozumieniem poszczególnych wątków badawczych. Poprzedzona jest spisem treści i wykazem skrótów stosowanych w pracy. Obejmuje następujące główne części: Wprowadzenie (22 strony) na które składają się 3 podrozdziały rozbudowane odpowiednio do 8, 2 i 5 punktów, sformułowanie celów pracy (1 strona), przedstawienie użytych materiałów laboratoryjnych i zastosowanych metod (12 stron), opis uzyskanych wyników (36 stron), dyskusja (18 stron), podsumowanie sformułowane na 2 stronach oraz bibliografia obejmująca 251 pozycji (23 strony). Praca posiada także streszczenie polskie i angielskie.

Pierwszy rozdział – „Wprowadzenie”, jest poprawnym wstępem do dalszych części rozprawy i dobrze integruje zarysowane cele badań. Autorka wyjaśniła termin symbiozy, podając za Margulis & Sagan (2002), że jest to „długotrwała i ścisła relacja pomiędzy przynajmniej dwoma gatunkami należącymi do różnych typów, gdzie jeden z organizmów jest eukariotyczny”. Doktorantka podała przykłady gatunków symbiotycznych, przy czym najwięcej miejsca poświęciła mutualizmowi fakultatywnemu jednokomórkowego heterotroficznego orzęska *Paramecium bursaria* oraz glonom i warunkom które muszą być spełnione aby ten rodzaj symbiozy mógł zaistnieć. Autorka wyczerpująco opisała mechanizm tworzenia trwałej symbiozy z glonami a także mechanizm rozpoznawania endosymbiontów przez komórkę gospodarza, zwróciła też uwagę na rolę światła w aktywności biologicznej badanego orzęska oraz poziomy transfer genów działający w układzie symbiotycznym. W podrozdziale 2.2.6 – Charakterystyka zielenic – na str. 16, Autorka zaklasyfikowała *Viridiplantae* jako takson, podczas gdy Cavalier-Smith (1981) wprowadził nazwę *Viridiplantae* na określenie kladu organizmów eukariotycznych do których należą m.in. zielenice, niemniej to Leliaert et al. (2012) dokonali filogenetycznego podziału tej grupy. Doktorantka bardzo precyzyjnie przedstawiła wszystkie zawiłości podziału taksonomicznego i filogenetycznego grupy Chlorophyta, klas Trebouxiophyceae i Chlorophyceae wykorzystując najnowszą literaturę badawczą. Czytając rozbudowane wprowadzenie dotyczące biologii molekularnej jako narzędzi do identyfikacji organizmów zastanawiałam się przez moment czy niektóre fragmenty tego podrozdziału nie powinny się jednak znaleźć w rozdziale – Metody i materiały? Np. kiedy autorka pisze o markerach wykorzystywanych w pracy lub szeroko opisuje poszczególne metody badawcze takie jak izolacja DNA, reakcja łańcuchowa polimerazy, elektroforeza w żelu agarozowym, itp. Cel pracy został sformułowany rzeczowo i przedstawiony zwięźle i jasno.

Opis stosowanych materiałów, metod badań i eksperymentów jest poprawny, podany w sposób wyczerpujący. Dobór metod jest trafny dla realizacji zamierzonych zadań badawczych. Rozdział „Metody i materiały” został napisany zgodnie z naukowymi standardami i w sposób wystarczający, aby czytelnik mógł ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować własny pogląd na temat wartości naukowej uzyskanych wyników.

Kolejny rozdział – „Wyniki” jest najobszerniejszy w całej rozprawie. Autorka uzyskała dużo oryginalnych wyników, które sprawnie zaprezentowała dzieląc ten rozdział na szereg podrozdziałów i punktów, dodatkowo bogato udokumentowanych 22 rycinami i 1 obszerną tabelą. Do najważniejszych osiągnięć mgr Patrycji Zagaty Leśnickiej niewątpliwie należy: i) wyizolowanie czterech gatunków glonów tj. *Chlorella vulgaris*, *Ch. variabilis*, *Ch. sorokiniana* i *Micratinium reisseri* z 43 szczepów *Paramecium bursaria* pochodzących z różnych stanowisk geograficznych i należących do 5 syngenów ii) przeprowadzenie analizy molekularnej trzech fragmentów DNA: fragmentu kodującego dużą podjednostkę rybosomalną (LSU rDNA), uwzględnienie fragmentów wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA oraz fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* kodującego białko L36 i *infA* kodującego czynnik inicjacji translacji IF-1 iii) odczytanie sekwencji LSU rDNA wyizolowanego z 43 szczepów endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* iv) wykonanie analizy kladogramów w programie Mega 5.1 oraz analizy sieci haplotypów w programie Network 4.6.1.3 na podstawie analizy sekwencji fragmentu dużej podjednostki rybosomalnej, fragmentu wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA v) wykonanie analizy sekwencji genów chloroplastowych *rpl36* i *infA* w programie Chromas Lite, BioEdit, analizy kladogramów w programie Mega 5.1 oraz analizy sieci haplotypów w programie Network 4.6.1.3 vi) przeprowadzenie analizy związku pomiędzy pochodzeniem geograficznym szczepów *Paramecium bursaria* a gatunkami endosymbiotycznych glonów. Są to wyniki o dużej wartości naukowej, wnoszące cenne informacje o nowych zastosowaniach warsztatu badawczego, otwierające możliwości stosowania technik molekularnych, wychodzące naprzeciw oczekiwaniom współczesnej taksonomii, morfologii czy fizjologii gatunku.

Dyskusja jest dobrze przeprowadzona, kolejne doświadczenia i wyniki są omawiane krytycznie, metody i wyniki są porównane do danych z piśmiennictwa. Poszczególne etapy pracy są rzeczowo uzasadniane, a konsekwentnie i logicznie wyciągnięte wnioski z kolejnych doświadczeń służą całościowej realizacji zamierzonego celu. Na uwagę zasługuje

przeprowadzona pogłębiona analiza rozmieszczenia geograficznego endosymbiotycznych glonów wyizolowanych ze szczepów *P. bursaria* poparta licznymi zestawieniami tabelarycznymi i rycinami. Słuszny jest wniosek Doktorantki, że na podstawie uzyskanych wyników badań podział symbiotycznych glonów na dwie grupy tj. Amerykańską i Europejską jest umowny i odnosi się do liczby intronów w odcinku SSU rDNA, a wyznaczenie charakterystycznych zasięgów geograficznych dla poszczególnych gatunków jest trudne. Niemniej aby uzyskać jednoznaczną odpowiedź należy kontynuować badania rozszerzając je o nowe regiony geograficzne i odpowiednio zwiększyć liczbę szczepów z nowo pozyskanych stanowisk.

Praca została przygotowana bardzo starannie. Tekst jest napisany zwięzłym, przejrzystym stylem, zdania są pełne i zrównoważone. Czytanie pracy budzi zainteresowanie czytelnika. Uwagi natury redakcyjnej podane poniżej, nie mają żadnego znaczenia merytorycznego i nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy, natomiast przed wysłaniem manuskryptu do druku należy/można je uwzględnić, a mianowicie:

- i) Podczas charakteryzowania zielenic (Chlorophyta) autorka przejęzyczyła się wprowadzając na str. 16 określenie takson podczas gdy powinno być kład.
- ii) Warto wprowadzić korektę nazwy na str. 17 – autorka pisze „wśród zielenic znany jest także gatunek pasożyta z rodzaju Iprothoteca” podczas gdy – prototekozy wywoływane są przez glony z rodzaju Prototheca obejmującego tylko trzy gatunki. Obecna taksonomia zalicza te bezchlorofilowe glony, które w wyniku mutacji utraciły chlorofil i przystosowały się do heterotroficznego sposobu odżywiania, do gromady Trebouxiophyceae, rzędu Chlorellales.
- iii) Przygotowując manuskrypt do druku można wprowadzić najnowszy podział systematyczny grupy Chlorophyta zaproponowany przez Silara (2016) i Novikov & Barabaš-Krasni (2015).
- iv) Uzupełnić informację, na str. 19, dotyczącą XVI Międzynarodowego Kongresu Botanicznego w St. Louis. Nieprecyzyjne podano informacje odnoszące się do rodzaju Chlorella, czytelnik czuje się co najmniej zagubiony. Ponadto charakteryzując wirusy należące do Phycodnaviridae powinno się nadmienić, że tylko jeden z nich tj. Chlorovirus infekuje glony słodkowodne natomiast pozostałe pięć grup odnosi się do zielenic morskich i brunatnic.
- v) Stwierdzenie na str. 25 „Pierwsze eksperymenty z zakresu biologii molekularnej...” powinno zostać poprawione stylistycznie.

- vi) Zamieszczone na str. 43 Ryciny 6 i 7, podobnie jak na str. 44 Ryciny 8 i 9 są niskiej jakości (są niewyraźne, brak ostrości obrazu) i powinny być zastąpione innymi. Autorka pisze, „...że można zaobserwować występowanie kubkowatego chloroplastu u wszystkich czterech gatunków”, podczas gdy prezentowane fotografie nie pozwalają dostrzec takich szczegółów.
- vii) W opisie Ryciny 18, na str. 61, brakuje przyimka prostego „za” w miejsce wprowadzonego czasownika „są”.
- viii) Należy wprowadzić, na str. 62, pełną nazwę gatunkową szczepu *Actinastrum hantzschii* (wykorzystanego jako grupa zewnętrzna) co niewątpliwie ułatwi czytającemu rozszyfrowanie pojawiającego się w tekście skrótu *A. hantzschii*.
- ix) Należy uzupełnić dane dotyczące publikacji Finlay B.J. 2002. Autorka podała tylko nr Vol. 296 – Powinno być: Science, 296(5570):1061-1063.
- x) Pozycja Huss V.A.R. 1999, na str. 113, posiada niekompletny tytuł. Powinno być: Huss V.A.R. 1999. Freshwater algal symbioses in protozoa and invertebrates. In: Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments, Seckbach J. (ed.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 641-650.
- xi) Brak pełnego tytułu publikacji Reissera na str. 122. Powinno być: Reisser W. 1986. Endosymbiotic associations of freshwater protozoa and algae. In: Corliss JO, Patterson DJ (eds) Progress in Protistology, 1:195-214.

Reasumując, pragnę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, a ponadto wnosi nowe elementy do wiedzy o morfologii, taksonomii, fizjologii i biologii molekularnej gatunków glonów z grupy zielenic. Doktorantka wykazała się znajomością piśmiennictwa, które jest właściwie wykorzystane, co dowodzi swobodnego poruszania się w omawianym zagadnieniu. Ponadto dorobek naukowy Pani mgr Patrycji Zagaty Leśnickiej jest solidny i jednoznacznie wskazuje na bardzo dobre kwalifikacje Doktorantki. Na uwagę zasługują zarówno uzyskane oryginalne wyniki jak i odwaga badawcza oraz naukowa inwencja Doktorantki.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Patrycji Zagaty Leśnickiej zawiera oryginalny materiał doświadczalny, została wykonana i zredagowana zgodnie z przyjętym kanonem, stanowi nowość naukową i spełnia wszystkie wymagania formalne Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455). Wnoszę zatem

do Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Zagaty Leśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pozwolę sobie złożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na dużą wartość merytoryczną i bardzo dobre wykonanie części doświadczalnej rozprawy.

Joanna Czerwik-Marcinkowska

Dr hab. Joanna Czerwik-Marcinkowska prof. UJK

Kielce, 08.03.2017 r.