

Prof. dr hab. Konrad Wołowski
Pl. Gen. Sikorskiego 4/6
31-115 Kraków, ul. Lubicz 46.

Kraków, 08.03.2017r.

Recenzja
pracy doktorskiej Pani mgr Patrycji Zagaty-Leśnickiej
pt. „Analiza molekularna wybranych fragmenbtów DNA endosmotycznych glonów
***Paramecium bursaria*”**

Badania nad symbiozą zielenic z pierwotniakami (Protozoa) są prowadzone ponad 100 lat. Zielenice (Chlorophyta) to grupa glonów fotosyntetyzujących eukariotycznych, wśród których znajdujemy wszystkie stopnie rozwojowe od monadowego przez ryzopoidalny, kapsalny, tetrasporalny, kokkalny, dalej trychalny i syfonokladialny. Są organizmami w większości kosmopolitycznymi, występują zarówno w wodach słodkich, morskich, czystych i zanieczyszczonych, w powietrzu, na wilgotnych skałach, glebie, w różnych strefach klimatycznych. Ich liczbę szacuje się na około 13 000 taksonów (w tym opisanych jest 8 000) należących do 12 gromad. Do jednej z nich Trebouxiophyceae należą gatunki z rodzaju *Chlorella* i *Micractinium* znane jako endosymbionty orzęsków (*Paramecium*, *Stentor*, *Climacostomum*, *Coleps*, *Euplotes*) będące przedmiotem badań Pani mgr Patrycji Zagaty-Leśnickiej.

Recenzowana praca jest opracowaniem traktującym o czterech gatunkach symbiotycznych zielenic kokkalnych *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], *Ch. variabilis* I. Shihira & R.W. Krauss, *Ch. sorokiniana* I. Shihira & R.W. Krauss i opisanego w 2010 roku przez grupę badaczy japońskich gatunku *Micractinium reisseri* Hoshina, Iwataki et Imamura, który obecnie jest synonimem dla *Micractinium conductrix* (K. Brandt) Pröschold & Darienko (2011). Wszystkie gatunki należą do słodkowodnych, wolnożyjący glonów, które zostały wyizolowane z 43 szczepów *Paramecium bursaria* pochodzących z różnych siedlisk i kontynentów. Tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest uzasadnioną kontynuacją, dopełnieniem badań prowadzonych z pełnym rozmachem przez Panią prof. Stachurę Greczek, a rozpoczętych przed laty przez profesora Ryszarda Pado. To dobry przykład rozwijania i kontynuacji badań naukowych.

Pani mgr Patrycja Zagata-Leśnicka przedstawiła wyniki badań na 129 stronach, łącznie ze spisem literatury liczącym 23 strony, starannie przygotowanego maszynopisu. Pokażną część zajmuje wprowadzenie liczące 21 stron. Wydaje się, że niepotrzebnie Doktorantka umieściła tu szereg ogólnych, raczej podręcznikowych informacji na temat: np. zjawiska i roli symbiozy w świecie organizmów żywych, czy użyciu biologii molekularnej jako narzędzia do identyfikacji organizmów, czy też wyjaśnień na temat teoretycznych podstaw metodologicznych zastosowanych w pracy. Ta ostatnia część powinna się znaleźć w rozdziale "Materiał i metody". Należy przyznać, że te mankamenty strukturalne układu w rozdziale „Wprowadzenie” nie przysłoniły znajomości literatury przedmiotu i umiejętności jej wykorzystaniu.

Cel pracy „identyfikacja gatunków endosymbiotycznych glonów *Paramecium bursaria* na podstawie analiz molekularnych wybranych fragmentów DNA”, podobnie jak tytuł pracy jest niedookreślony. Autorka zastosowała (zrozumiały dla badaczy protozoologów i fykologów) skrót myślowy, brakuje moim zdaniem przyimka „u” przed *Paramecium bursaria*, gdyż dla nieprofesjonalisty tytuł nie jest jednoznaczny. Proszę więc zwrócić uwagę na ten szczegół podczas przygotowywania pracy do druku. W dalszej części przedstawiła hipotezy badawcze sprecyzowane prosto i poprawnie określone, dobrze też zostały wytyczone kolejne etapy badań. W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka omówiła zastosowane metody badań związane z izolacją DNA, omówiła dokładnie warunki i przebieg elektroforezy oraz sekwencjonowanie, które przeprowadziła bazując na metodzie Sangera.

Wyniki pracy autorka przedstawiła w wielu kolejnych podrozdziałach. Tutaj znalazł się rozdział zatytułowany „Analiza mikrofotografii endosymbiotycznych glonów u *Paramecium bursaria*”, który miał pokazać zróżnicowanie fenotypów zidentyfikowanych gatunków zielenic. Z przykrością stwierdziłem, że nie powinien on się znaleźć w pracy, bowiem zamieszczona dokumentacja jest nieczytelna. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o dotarcie do odpowiednich mikroskopów (w Krakowie jest ich pod dostatkiem) dla opracowania przejrzystej dokumentacji mikrofotograficznej wyizolowanych gatunków. W mojej ocenie jest to najsłabszy punkt rozprawy.

Następne podrozdziały przedstawiają wyniki kolejnych analizy molekularnych wybranych fragmentów DNA. Doktorantka przedstawiła zwięzłą analizę sekwencji wybranych fragmentów DNA (fragment kodujący dużą podjednostkę rybosomalną (LSU rDNA), fragmenty wewnętrznych sekwencji transkrybowanych ITS1 i ITS2 wraz z genem 5.8S rDNA). To właśnie pozwoliło Jej na oznaczenie wśród 43 badanych szczepów *Paramecium bursaria* czterech endosymbiotycznych zielenic kokkalnych: *Chlorella vulgaris*,

Ch. variabilis, *Ch. sorokiniana* oraz *Micractinium reisseri* obecnie znane pod nazwą *Micractinium conductrix*. Ciekawe czy poza oznaczonymi przez Doktorantkę gatunkami zielenic inne wchodzi w symbiozę z *Paramecium bursaria* lub innymi orzęskami.

Pani mgr Zagata-Leśnicka wykazała się bardzo dobrą znajomością metod badawczych i analizą wyników oraz umiejętnością ich wykorzystania. Przedstawione w pracy analizy kladogramów z wykorzystaniem metody Największej Wiarygodności (ML) wyraźnie wskazała zgrupowanie szczepów w trzy odrębne klady. Pierwszy z nich składa się ze szczepów należących do gatunków: *Ch. vulgaris* i *Ch. variabilis* co świadczy o wysokim pokrewieństwie tych dwóch gatunków. Cenne jest to, że do tych badań użyła taksonów glonów izolowanych z różnych szczepów *Paramecium*, pochodzących z różnych siedlisk i kontynentów. Analizując wyniki sekwencjonowania otrzymane z użyciem wspomnianych wyżej trzech markerów oraz fragmentów genów chloroplastowych: *rpl36* i *infA*, Doktorantka dowiodła, że fragment genomu jądrowego ITS1-5.8S rDNA-ITS2 charakteryzuje się w tym przypadku najwyższym zróżnicowaniem międzygatunkowym i można ten fragment uznać za najbardziej odpowiedni do ustalenia pokrewieństwa filogenetycznego między endosymbiotycznymi glonami występującymi u *Paramecium bursaria*.

Bardzo ciekawym i inspirującym do dalszych badań jest poruszony w pracy problem związku pomiędzy zasięgami występowania endosymbiotycznych glonów, a *P. bursaria*. Okazało się, że *Chlorella vulgaris* ma bardzo szeroki zasięg w porównaniu do pozostałych symbiontów. Autorka przeprowadziła szczegółową analizę pochodzenia geograficznego szczepów *Paramecium bursaria* i gatunków endosymbiotycznych glonów w odniesieniu do badań własnych i literatury. Na tej podstawie stwierdziła, że podział symbiotycznych glonów na dwie grupy: Amerykańską i Europejską jest umowny i odnosi się jedynie do liczby intronów w odcinku SSU rDNA. Budujące jest to, że Doktorantka nie zamyka rozdziału badań nad problemem podziału symbiontów na dwie grupy, lecz sugeruje konieczność rozszerzenia analiz o nowe regiony geograficzne i liczbę badanych szczepów pochodzących z nowych siedlisk.

Przeprowadzone badania na tak dużej grupie *Paramecium bursaria* i endosymbiotycznych glonów pozwoliły Doktorantce na stwierdzenie, że można jednoznacznie odrzucić hipotezę istnienia zależności pomiędzy syngeniem *P. bursaria*, a gatunkiem glonu żyjącego w komórce. Występujące nieliczne związki mogą być wynikiem ograniczonego zasięgu szczepów syngenu R4, jak również zbyt małej liczby prób zebranych na terenie USA. Na szczególną uwagę zasługuje zawarta w pracy konkluzja o tym, że wyodrębnianie się syngenu u *P. bursaria* jest zdarzeniem młodszym ewolucyjnie niż

powstawanie związków symbiotycznych, na co wskazuje różnorodność gatunków symbiontów w każdym z syngenów.

Uzyskane wyniki w mojej ocenie są oryginalne i wnoszą nowe spojrzenie na symbionty syngenów *Paramecium* pochodzących z różnych kontynentów. Uwagi i sugestie zawarte w niniejszej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej Pani mgr. Patrycji Zagaty-Leśnickiej. Doktorantka wykazała umiejętność posługiwania się metodami badawczymi, wszechstronną znajomością literatury przedmiotu oraz umiejętnością jej wykorzystania. Uważam, że praca jest oryginalnym opracowaniem wnoszącym nowe dane o gatunkach symbiotycznych zielenic wyizolowanych z 43 szczepów *Paramecium bursaria*. Stanowi bardzo dobrą podstawę do dalszych badań biogeograficznych i autekologii zarówno szczepów *Paramecium bursaria* jak i zidentyfikowanych gatunków rodzaju *Chlorella* i *Micractinium*.

Przedstawiony maszynopis spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Stawiam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr. Patrycji Zagaty-Leśnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



.....

Prof. dr hab. Konrad Wołowski