

## Streszczenie

Ściany komórkowe odgrywają kluczową rolę we właściwościach tkanki owoców, w szczególności właściwościach mechanicznych, które są kształtowane również poprzez wzajemną adhezję komórek. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że właściwości mechaniczne tkanki owoców zależą głównie od stopnia degradacji pektyn, jednak ze względu na różnorodność pektyn w ścianach oraz skomplikowaną budowę samych ścian istnieje konieczność pogłębiania wiedzy w tym zakresie. Analizę zawartości pektyn i innych polisacharydów wykonuje się standardowo metodami biochemicznymi, które nie dostarczają informacji o ich rozlokowaniu w tkance. Dotychczas najpopularniejszą metodą obrazowania polisacharydów ściany komórkowej owoców i warzyw (szczególnie pektyn) jest obrazowanie z wykorzystaniem przeciwciał (metoda immunofluorescencyjna). Metoda ta jest jednak niezwykle czasochłonna, dość droga oraz selektywna. Alternatywą do analiz biochemicznych oraz ich uzupełnieniem mogą być metody wykorzystujące spektroskopię w poczerwieni oraz Ramana, które mogą dostarczyć informacji o składzie jakościowym i ilościowym polisacharydów w ścianie komórkowej. Dotychczas technika obrazowania ramanowskiego z powodzeniem wykorzystywana była w medycynie do badań nad rozróżnieniem tkanki nowotworowej od zdrowej, do obrazowania ścian komórkowych w drewnie, stosowana jest również do obrazowania związków biologicznie czynnych, takich jak witaminy i barwniki. W opublikowanych pracach ze współautorstwem autora niniejszej rozprawy wykazano, że metoda obrazowania ramanowskiego umożliwia również uzyskanie wartościowych informacji o rozlokowaniu polisacharydów w ścianie komórkowej owoców pomidora oraz zmian lokalizacji pektyn w ścianach komórkowych jabłka. Dlatego badania w tym zakresie powinny być kontynuowane.

Głównym celem badań opisanych w pracy doktorskiej była analiza zawartości polisacharydów w ścianie komórkowej i ich naturalnych zmian w owocu pomidora przy pomocy metod biochemicznych, spektroskopowych oraz immunofluorescencyjnych. Wiedza ta jest niezbędna do poznania przyczyn mięknięcia owoców oraz do dalszego rozwoju metod spektroskopowych w badaniu tkanek roślinnych, w tym w szczególności mikrospektroskopii Ramana. Jako materiał do badań wybrano owoc pomidora jadalnego (*Solanum lycopersicum*), który jest uznawany za owoc modelowy w badaniach procesów towarzyszących formowaniu się i dojrzewaniu owoców. Główny cel realizowany był poprzez dwa cele szczegółowe: (1) opracowanie metodyki oceny zawartości i lokalizacji polisacharydów w ścianach komórkowych owoców przy pomocy obrazowania ramanowskiego; (2) interpretacja związku parametrów biochemicznych z właściwościami mechanicznymi mezokarpu owoców oraz zmian w mikrostrukturze ściany komórkowej w czasie fizjologicznego dojrzewania owoców. Plan badań obejmował analizy przeprowadzone na dwóch odmianach pomidora *Czereśniowy* oraz *Pink King* w dwóch różnych stadiach dojrzałości, to jest:

- I. Analizę biochemiczną i fizyczną owoców: zawartości skrobi oraz likopenu, aktywności enzymatycznej poligalakturonazy i pektynometyloesterazy, zawartości kwasu askorbinowego, związków fenolowych oraz właściwości mechanicznych tkanki;
- II. Analizę zawartości polisacharydów wyizolowanych ze ścian komórkowych, w tym zawartości kwasu galakturonowego we frakcjach pektyn rozpuszczalnych w wodzie, chelatorze wapnia oraz węglanie sodu, zawartości celulozy i hemiceluloz;
- III. Analizę widm FT-IR oraz Ramana dla frakcji pektyn oraz hemiceluloz ekstrahowanych ze ścian komórkowych z zastosowaniem metod analizy składowych głównych (PCA);
- IV. Analizę rozlokowania polisacharydów w ścianie komórkowej metodą mikrospektroskopii Ramana oraz immunofluorescencyjną.

W ramach niniejszej pracy zbadano, jak zmienia się rozlokowanie polisacharydów w czasie dojrzewania owocu pomidora. Wyniki przeprowadzonych badań i porównanie różnych metod analizy ścian komórkowych pokazują przydatność techniki obrazowania ramanowskiego w obserwacji rozlokowania i zmian w mikrostrukturze ścian komórkowych owocu pomidora zachodzących w czasie jego fizjologicznego dojrzewania. Wykazano, że w ścianie komórkowej owoców pochodzących z pierwszego stadium dojrzałości istniały regiony z wysoką zawartością pektyn w obrębie blaszki środkowej, na styku sąsiadujących komórek. Natomiast w ścianie komórkowej z owocu w pełni dojrzałego pektyny były jednorodnie rozlokowane w ścianie komórkowej, ponadto tkankę charakteryzował pewien stopień degradacji wynikający prawdopodobnie ze zmniejszającej się ilości pektyn, co prawdopodobnie powoduje zmniejszenie adhezji międzykomórkowej. Wyniki związane z badaniem mikrostruktury poparte zostały wynikami analiz chemicznych, które wskazują na podobne zmiany biochemiczne zachodzące w ścianie komórkowej, tak jak to pokazała metoda mikrospektroskopii Ramana. Wysoki poziom enzymów pektynolitycznych i zwiększająca się zawartość kwasu askorbinowego, a co za tym idzie zmniejszająca się zawartość pektyn w ścianie komórkowej, może mieć znaczący wpływ zarówno na strukturę tkanki poprzez powstanie przestworów międzykomórkowych, jak i na przestrzenne rozlokowanie biopolimerów w ścianie komórkowej.

**Słowa kluczowe:** roślinna ściana komórkowa, polisacharydy, degradacja pektyn, dojrzewanie owoców, FT-IR, FT-Raman, obrazowanie ramanowskie