

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29-Listopada 54, 31-425 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.:

„Analiza wybranych cytologicznych efektów działania glinu u *Hordeum vulgare* L.”

autor rozprawy:

mgr Joanna Jaśkowiak

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w formie monografii obejmuje 105 stron maszynopisu z wydzielonymi rozdziałami typowymi dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych, 27 rycin, 22 tablice obrazów mikroskopowych oraz 1 tabelę.

Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane ze środków Narodowego Centrum Badan i Rozwoju w ramach projektu ERA-CAPS-II/2/2015 i zostały wykonane w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska UŚ pod kierunkiem Pani dr hab. Jolanty Kwaśniewskiej, prof. UŚ. Część wyników przedstawionych w recenzowanej monografii została opublikowana w czasopismach naukowych z zakresu nauk biologicznych tj.: *Plos One* (2018) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (2019, 2020), we wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Zasadniczy tekst monografii poprzedzony jest *Wykazem zastosowanych skrótów* – bardzo cenny element każdego opracowania, przy czym, jeśli skrót pochodzi od angielskiej nazwy danego terminu konsekwentnie podawałabym angielską nazwę i jej polski odpowiednik, jak to Doktorantka zrobiła dla większości wylistowanych skrótów (a przeoczyła dla np. DNA, dNTP, dUTP).

Wstęp liczący 22 strony maszynopisu, jest rozdziałem, który stanowi przegląd literatury nt. tematyki badawczej przedstawionej w pracy doktorskiej i został podzielony na cztery podrozdziały. W pierwszym Doktorantka scharakteryzowała czynniki mutagenne, przedstawiła efekty ich działania, wspomniała o ścieżkach naprawy DNA, podała czynniki wpływające na efekt traktowania mutagenicznego, scharakteryzowała testy wykrywające efekty działania mutagenów oraz przybliżyła działanie badanych mutagenów tj. glinu i hydrazynu kwasu maleinowego. W drugim podrozdziale Doktorantka przedstawiła obiekt badawczy tj. jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) uwzględniając systematykę i

morfologię gatunku, charakterystykę genomu wskazując na typowe cechy jego kariotypu oraz przedstawiła zalety stosowania jęczmienia jako rośliny modelowej w badaniach zbóż. Trzeci podrozdział Wstępu dotyczy zagadnień związanych z replikacją DNA. Doktorantka przedstawiła mechanizm replikacji DNA, jego usytuowanie w cyklu życiowym komórki oraz wprowadza czytelnika w metody analizy cyklu komórkowego, szczególnie w kontekście wizualizacji zmian w jego przebiegu po działaniu mutagenów. Ostatni podrozdział poświęcony jest ścianie komórkowej – Doktorantka omówiła skład i strukturę ściany komórkowej uwzględniając funkcję poszczególnych jej komponentów.

Treści przedstawione w tej części rozprawy uważam za właściwie dobrane i wyczerpujące w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej. Tekst został przygotowany w oparciu o liczną, w tym najnowszą, literaturę anglojęzyczną opublikowaną w uznanych czasopismach naukowych. Wynika z niego, że Doktorantka jest dobrze zorientowana o stanie aktualnej wiedzy w zakresie poruszanej tematyki. Drobne uwagi:

1. w przypadku części 1.1.4. *Czynniki wpływające na efekt traktowania mutagenicznego*, oprócz referencji z 1978 r., odwołałbym się do bardziej aktualnych pozycji
2. str. 14, linijka 4 i 8: dwukrotnie wyjaśniony skrót CA
3. str. 22, linijka 19: termin 'wsobny' używamy raczej w kontekście linii a nie gatunku - zakładam, że Doktorantka miała na myśli fakt, że jęczmień jest gatunkiem samopłodnym (a nie wsobnym, jak to zostało napisane), zatem zmieniałbym zdanie na: *Jęczmień jest gatunkiem samopłodnym, ale jego krzyżowanie nie stanowi problemu lub Mimo, że jęczmień jest gatunkiem samopłodnym, jego krzyżowanie nie stanowi problemu*
4. W rozdziale 1.4 *Ściana komórkowa* nie wydzielałbym podrozdziału 1.4.1. *Skład ściany komórkowej roślin*, skoro jest tylko jeden

Rozdział Cel pracy precyzuje zasadność podjętych badań, uzasadnia dobór badanych materiałów roślinnych oraz nakreśla zakres działań poprzez sformułowanie 6. zadań badawczych, istotnych dla poszerzenia wiedzy nt. wpływu glinu na uszkodzenia DNA i zaburzenia cyklu komórkowego w komórkach roślinnych.

Rozdział Materiały i metody obejmuje 16 stron maszynopisu i standardowo opisuje materiał badawczy wykorzystany w badaniach i stosowane metody. Dodatkowo Doktorantka wprowadza podrozdział *Plan badań*, który uważam za cenny element tej części rozprawy, porządkuje on bowiem informacje o przygotowaniu materiału roślinnego do badań, zastosowanych mutagenach oraz przedstawia układ przeprowadzonych eksperymentów w postaci 4 czytelnych rycin uwzględniających wybrane materiały roślinne (nie w każdym eksperymencie była to ta sama pula materiałów), warunki prowadzenia eksperymentu, metody zastosowane do analizy zmian cytologicznych oraz badane parametry. Natomiast nie odnajduję w tej części rozprawy podrozdziału/akapitu o statystycznej analizie wyników. Oprócz wyników opisowych, pochodzących z analizy przekrojów poprzecznych i podłużnych korzeni z wykorzystaniem różnych technik, Doktorantka wygenerowała wyniki liczbowe jak np. indeks mitotyczny, liczba komórek z mikrojądrami, liczba uszkodzonych jąder komórkowych, średnica korzeni i in.. W mojej opinii, dla omówienia/porównania tych

wyników analiza statystyczna jest konieczna, tym bardziej, że uwzględniono powtórzenia biologiczne, co wynika z lektury tekstu. Zatem proszę Doktorantkę o uzupełnienie tego elementu i przedstawienie go w trakcie publicznej obrony. Także brakuje mi akapitu/podrozdziału zbierającego informację nt. analizowanych parametrów i sposobu ich wyrażania. Wprawdzie ryciny 7-10 dają obraz prowadzonych analiz, ale zupełnie nie odpowiadają na pytanie co np. obejmowała analiza histologiczna przekrojów korzeniowych albo jak liczono indeks mitotyczny – dla cytogenetyka jest to (indeks mitotyczny) oczywiste, ale dla porządku w metodyce taka informacja powinna być podana. Poniżej kilka dodatkowych uwag szczegółowych, które nasunęły mi się podczas lektury tego rozdziału:

1. *średnio 35±50 wierzchołków korzeni (str. 36) i 20±40 jąder komórkowych na sekundę (str. 37)* – rozumiem, że powinno być odpowiednio 35±5 i 20±4, a wartość po znaku ± to odchylenie standardowy? błąd standardowy?
2. str. 38: brak stężenia BSA
3. str. 39 i 45: brak stężenia DAPI
4. str. 40: *DAPI (2g/ml w 1xPBS)* - nie powinno być: *DAPI (2mg/ml w 1xPBS)*?
5. str. 43: podano 50 µl kalkofluoru i 50 µl DAPI – o jakim stężeniu?
6. str. 47: skład jakościowy buforu 10xPBS jest różny w obu tabelach – chyba powinien być taki sam
7. str. 48:
 - o bufor cytrynianowy – w polskim nazewnictwie raczej roztwór cytrynianu sodu a nie cytrynianu sodowego
 - o enzym maceracyjny – czym uzupełniano do 10 ml? wodą destylowaną? buforem cytrynianowym?

Mimo powyższych uwag, cały rozdział pozwala zapoznać się na wystarczającym poziomie dla zrozumienia opisanych później wyników, z zastosowanymi materiałami roślinnymi i wykonanymi analizami.

Rozdział Wyniki obejmuje 23 strony maszynopisu z 16 rycinami i dodatkowo 22 tablice z obrazami mikroskopowymi. Doktorantka opisuje działanie glinu na komórki merystematyczne korzeni jęczmienia odmiany Sebastian oraz jego mutantu *hvatr.g* o podwyższonej tolerancji na glin analizując: (1) indeks mitotyczny komórek, (2) powstawanie mikrojąder, (3) uszkodzenia (fragmentacje) jąder komórkowych, (4) liczebność jąder w fazie S cyklu komórkowego oraz (5) wybrane parametry korzenia strefy różnicowania tj. średnicę korzenia, średnicę komórek ryzodermy i rozmiar walca osiowego. Dodatkowo dla odmiany analizuje wpływ glinu na: (1) częstotliwość występowania jąder komórkowych z pęknięciami DNA, (2) przebieg cyklu komórkowego oraz (3) rozmieszczenie epitopów pektynowych w ścianach komórkowych korzeni (na ryc. 8 błędnie zaznaczono, że ta analiza była także przeprowadzona dla mutantu). Ostatni podrozdział tej części rozprawy przedstawia wyniki analizy wpływu hydrazynu kwasu maleinowego na komórki merystematyczne korzeni jęczmienia odmiany Sebastian oraz jego mutantu na: (1) indeks mitotyczny, (2) powstawanie mikrojąder, (3) częstotliwość występowania jąder komórkowych z pęknięciami DNA oraz (4) przebieg cyklu komórkowego. Badania te przeprowadzono dla zweryfikowania czy mechanizm odpowiedzi komórek na mutagenne działanie glinu jest uniwersalny.

Doktorantka wygenerowała dużo ciekawych wyników, mam jednak zastrzeżenia do ich omówienia i prezentacji na rycinach:

1. Omówienie poszczególnych eksperymentów poprzedzone jest detalami metodycznymi, na tyle szczegółowymi, że powinny się one znaleźć w rozdziale Materiały i metody. Dla przykładu cała str. 49 to metodyka. Czasami, dla zrozumienia wyników, pewne detale metodyczne należy przypomnieć, ale powinno to być zrobione w sposób syntetyczny.
2. Dla wszystkich rycin z wykresami słupkowymi brak opisu osi X i Y, brak słupków błędów dla poszczególnych wartości średnich prezentowanych na wykresach, brak informacji o analizie statystycznej, a tym samym o istotnych/nieistotnych różnicach pomiędzy porównywanymi średnimi. Oczekuję, że Doktorantka ustosunkuje się do tych uwag podczas publicznej obrony i omówi otrzymane wyniki z uwzględnieniem właściwej analizy statystycznej.
3. Tablice z obrazami mikroskopowymi zostały starannie wykonane. Drobną uwagę do tablicy VI – nie wskazano, które obrazy reprezentują korzenie kontrolne a które traktowane chlorkiem glinu. Na str. 68 i 71 jest odwołanie do nieistniejących rycin tj. odpowiednio do ryciny 40A i 42.

Dyskusja obejmuje 14 stron i stanowi właściwe uzupełnienie i komentarz do sekcji opisującej wyniki przeprowadzonych eksperymentów, umieszczając je w szerszym kontekście. Jest ciekawie napisana i starannie zorganizowana.

Wnioski to zbiór siedmiu prawidłowo sformułowanych punktów zestawiających najważniejsze informacje z przeprowadzonych badań i odpowiadających postawionym celom badawczym.

Streszczenia w j. polskim i angielskim właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Doktorantkę.

Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej to Literatura, w którym wylistowano 139 pozycji zacytowanych w manuskrypcie. Jest to bardzo wartościowe zestawienie piśmiennictwa z zakresu prowadzonych badań i świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do prowadzenia badań i analizy ich wyników. W kilku przypadkach odnotowałam brak konsekwencji zapisu nazwy czasopisma kursywą, jak przyjęła Doktorantka dla większości pozycji.

Poniżej dodatkowe pytania do Doktorantki, które są efektem lektury recenzowanej rozprawy:

1. Czy aberracje chromosomowe (jeśli tak, to jakie) można u roślin analizować wykorzystując barwienia prążkowe?
2. Skoro biodostępność glinu jest ograniczona do środowisk kwaśnych to jak zabezpieczają się rośliny kwasolubne przed jego pobieraniem?

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Joanny Jaśkowiak jest wartościowym opracowaniem nt. genotoksycznego i klastogennego działania glinu na komórki merystematyczne korzeni jęczmienia zwyczajnego, a otrzymane wyniki są oryginalne i w mojej opinii mają dużą wartość poznawczą. W badaniach Doktorantka wykorzystwała mutanta z uszkodzoną ścieżką naprawy DNA i zwiększoną tolerancją na glin, należącego do unikatowej populacji mutantów Uniwersytetu Śląskiego o nazwie HorTILLUS wyprowadzonej w oparciu o strategię TILLING. Wykorzystanie takiego mutantu pozwoliło przybliżyć rolę kinazy serynowo-treoninowej (ATR) kodowanej przez gen *HvATR* w aktywacji szlaku naprawy DNA u jęczmienia oraz scharakteryzować funkcję tego genu w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane toksycznością glinu. Do oceny cytotoksycznego działania glinu Doktorantka zastosowała szereg technik analizy komórkowej i tkankowej obejmujących metody cytogenetyki klasycznej (barwienie Feulgena) jak i cytogenetyki molekularnej (cytometria przepływowa, test TUNEL) oraz barwienia immunocytochemiczne. Przeprowadzone analizy mikroskopowe były w większości czasochłonne (m.in. dlatego, że odpowiednio reprezentacyjna populacja komórek musiała być przeanalizowana dla każdego badanego parametru), ponadto wymagały precyzji, staranności, cierpliwości a także perfekcyjnego opanowania zaawansowanego warsztatu mikroskopowego oraz specyficznej, często nie prostej akwizycji i obróbki obrazów mikroskopowych. Na podkreślenie zasługuje bardzo staranna dokumentacja graficzna tych analiz. Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych materiałów i metod dla uzyskania zakładanych celów. Zaprezentowane wyniki są ciekawe, bez wątpienia poszerzają dotychczasową wiedzę, ale ich interpretacja musi być wsparta o analizę statystyczną. Zakładam, że Doktorantka uzupełni to podczas publicznej obrony. Ponadto przedstawiona rozprawa wskazuje na odpowiednie przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie prowadzonych badań oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując uważam, że złożona dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. 2011, Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust. 2 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (Dz. U. 2018, poz. 1669) i mimo wskazanych powyżej uwag **wniosuję o dopuszczenie Pani mgr Joanny Jaśkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kraków, 12 września 2022


dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK