



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

**dr hab. Renata Kontek, prof. UŁ**  
**Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**  
**Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki**  
**ul. Banacha 12/16**  
**90-237 Łódź**

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Jaśkowiak, pt.:**

**„Analiza wybranych cytologicznych efektów działania glinu u *Hordeum vulgare* L.”**  
**wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Zespole Cytogenetyki**  
**i Biologii Molekularnej Roślin pod kierunkiem dr hab. Jolanty Kwaśniewskiej, prof. UŚ.**

Większość szkodliwych dla środowiska, rolnictwa i bezpieczeństwa zdrowotnego skutków zakwaszenia gleb wiąże się z obecnością glinu w roztworze glebowym, który określany jest jako aktywny lub przyswajalny dla roślin. Im niższe pH gleby (poniżej 5), tym wyższe stężenie glinu. Obecność ww. pierwiastka w formie aktywnej w roztworze glebowym jest dla wielu gatunków roślin uprawnych toksyczna, gdyż jego działanie związane jest m.in. z zaburzeniami pobierania innych, niezbędnych dla życia roślin pierwiastków, z uwagi na osłabiony rozwój systemu korzeniowego, co przekłada się na obniżenie uzyskiwanych plonów. Uprawa na glebach zakwaszonych warzyw i innych ziemioplodów przeznaczonych do spożycia przez ludzi stanowi główne źródło zagrożenia dla ich bezpieczeństwa zdrowotnego. Glin dostający się do organizmu człowieka poprzez produkty spożywcze, jest szybko wydalany z moczem, jednak w przypadku upośledzonej funkcji nerek może dochodzić do gromadzenia glinu, głównie w tkance mózgowej i w kościach, co może predysponować do wystąpienia choroby Alzheimera czy choroby Parkinsona.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Joanny Jaśkowiak. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczący efektów cytologicznych zaobserwowanych w komórkach korzeni jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*) po ich ekspozycji na działanie jonów glinu w podłożu silnie kwaśnym tj. o pH = 4 oraz słabo kwaśnym tj. o pH = 6. W badaniach wykorzystano dwie odmiany jęczmienia: odmianę wyjściową *Sebastian* oraz jego mutantą *hvatr.g* wyselekcjonowanego z populacji HorTILLUS (*Hordeum* – TILLING – University of Silesia) posiadającego mutację w genie *ATR*. Zatem wybór tematu badawczego jest zasadny i trafny.

**Katedra Biotechnologii Molekularnej i Genetyki**  
**ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź**  
**E: [renata.kontek@biol.uni.lodz.pl](mailto:renata.kontek@biol.uni.lodz.pl)**  
**T: 42 635 44 24**

Wyniki przedłożonej do recenzji dysertacji doktorskiej zostały w znacznej części opublikowane (w 2018, 2019 i 2020 roku) w uznanych czasopismach międzynarodowych. Doktorantka jest pierwszym Autorem wszystkich publikacji oryginalnych, co świadczy o Jej dominującym wkładzie w wykonanie i przygotowanie manuskryptów. Warty odnotowania jest także fakt, że środki finansowe na badania, przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy, pochodziły z projektu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr ERA-CAPS-II/2/2015 pt.: „Molekularne mechanizmy genotoksyczności glinu i ich wykorzystanie w kierunku poprawy plonu u jęczmienia w warunkach ekspozycji roślin na glin”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, o typowym układzie dla prac doświadczalnych, liczy 105 stron i została podzielona na 9 rozdziałów, w tym streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Rozdział **Literatura** zawiera łącznie 139 pozycji, z czego ok. 45% stanowią prace z ostatniej dekady. Tekst uzupełniony został 21 tablicami z dokumentacją fotograficzną i 27 rycinami. Praca została wzbogacona o wykaz używanych skrótów stanowiący użyteczny dla czytelnika odnośnik tekstu.

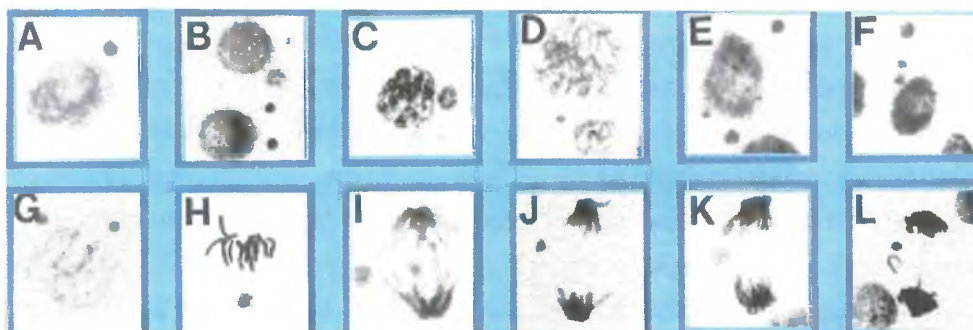
Pracę doktorską rozpoczyna część teoretyczna zawarta na stronach 7-30, w której Doktorantka dokonała omówienia rodzajów czynników mutagennych oraz wywoływanych przez nie efektów w komórkach eukariotycznych. Następnie Autorka rozwinęła zagadnienia związane z charakterystyką glinu, hydrazynu maleinowego oraz charakterystyką rośliny modelowej jaką jest jęczmień zwyczajny, co jest w pełni zrozumiałe ze względu na temat pracy doktorskiej. Ostatnie rozdziały **Wstępu** Doktorantka poświęciła zagadnieniom związanym z replikacją DNA, metodami analizy cyklu komórkowego oraz budowie ściany komórkowej, czym również nawiązała do tematyki dysertacji.

Generalnie, **Wstęp** stanowi syntetyczne wprowadzenie w problematykę zagadnień podejmowanych w rozprawie doktorskiej, choć Autorka nie ustrzegła się drobnych uchybień natury edycyjnej (np. rozdzielanie kilku cytowanych pozycji literaturowych średnikami czy też używanie kursywy w przypadku podawania nazw łacińskich poszczególnych gatunków), jak również kilku niezbyt zręcznych sformułowań. I tak na stronie 11 Autorka napisała: „*Na skutek utraty odcinka chromosomu powstają deficjencje i delecje. W wyniku utraty terminalnego odcinka chromosomu powstaje deficjencja, natomiast delecja zachodzi wtedy, gdy utrata dotyczy interkalarnego odcinka chromosomu*”. Deficjencja określana jest jako delecja czyli utrata fragmentu chromosomu i są to pojęcia synonimiczne oznaczające dokładnie to samo. W wielu opracowaniach naukowych, w tym angielskojęzycznych, występuje tylko termin delecja: terminalna i/lub interkalarna, o której możemy powiedzieć, że jest deficjencją. Deficjencja jest więc delecją, dlatego nie rozumiem podziału utraty odcinka chromosomu na deficjencje i delecje, jaki dokonała Autorka, nawet jeśli dotyczą one odcinków z różnych części chromosomu.

Ponadto, Doktorantka w rozprawie doktorskiej używa terminu „*test mikrojąder*”. W języku polskim wyrazy podlegają odmianie i użyłabym raczej nazwy „**test mikrojądrowy**”, podobnie jak np. test aberracji chromosomalnych czy test kometowy.

Doktorantka podaje również informację, że w teście mikrojądrowym analizowana jest częstość komórek interfazowych z mikrojądrami, z czym do końca nie mogę się zgodzić, gdyż mikrojądra

mogą być widoczne i obserwowane w każdej fazie cyklu komórkowego np. podczas profazy, metafazy, anafazy czy telofazy (zał. 1). Zgadzam się, oczywiście ze stwierdzeniem, że możemy je zaobserwować dopiero po przejściu przez komórkę pełnego cyklu podziałowego.



Zał. 1: autor R. Kontek (mikrojądra w komórkach merystematycznych *Vicia faba ss. minor*)

Stwierdzenie, że mikrojądra są charakterystyczne dla komórek interfazowych jest prawdziwe tylko w przypadku, kiedy test mikrojądrowy wykonywany jest z blokowaniem cytokinezy poprzez zastosowanie cytochalazyny B np. w limfocytach krwi obwodowej człowieka, gdzie dokonuje się analizy częstości mikrojąder w komórkach dwujądrowych, czyli takich, które podzieliły się tylko raz i znajdują się w pierwszej postmitotycznej interfazie.

Na stronie 16, Autorka podaje rozwinięcie skrótu DDR jako *DNA Damage Pathway* co jednak przetłumaczyłabym jako *DNA Damage Response*.

Na stronie 23, Doktorantka napisała, że: „*ATR jest kinazą sygnalizującą uszkodzenia DNA...*”, sugerowałabym raczej stwierdzenie, że ATR jest kinazą *aktywowaną* uszkodzeniami DNA.

Ponadto, pragnę zwrócić Doktorantce uwagę, iż w licznych opracowaniach naukowych przyjęty jest zapis mówiący o tym, że nazwy genów zapisujemy kursywą, a białek literami prostymi bez kursywy. Warto jest o tym pamiętać przy kolejnych opracowaniach dokonywanych przez Autorkę.

Nie odnalazłam w tekście **Wstępu** odniesienia do rycin 1, 5 i 6 w niniejszej pracy doktorskiej. Szkoda, że Autorka nie umieściła w części teoretycznej ciekawych schematów czy też grafik, które na pewno wzbogaciłyby treści w niej zawarte.

**Wstęp** pracy doktorskiej mgr Joanny Jaśkowiak napisany jest w sposób syntetyczny, poprawny jednak nie mogę oprzeć się wrażeniu, że zawarta w nim treść została przedstawiona przez Autorkę na dość podstawowym poziomie, bez podawania szczegółowych informacji dotyczących omawianych zagadnień. Fakt ten nie umniejsza poprawności merytorycznej tej części dysertacji.

**Cel pracy** doktorskiej i sposób jego realizacji został jasno sprecyzowany i nie budzi zastrzeżeń.

**Materiał i metody** zastosowane w pracy doktorskiej zostały opisane w rozdziale 3. Konstrukcja przeprowadzonych badań i ich opis są bardzo czytelne i wyczerpujące, a zastosowana metodyka jest adekwatna do wytyczonego celu.

**Wyniki** wykonanych analiz Doktorantka przedstawiła w sposób czytelny, a dane zostały starannie zobrazowane w postaci wykresów i licznych tablic z dokumentacją fotograficzną przeprowadzonych testów.

Moje zastrzeżenia budzi fakt, **nie umieszczenia przez Doktorantkę w niniejszej pracy doktorskiej wyników analizy statystycznej**. Co prawda, można ją w znacznej części odnaleźć w publikacjach Autorki, w których zostały zamieszczone wyniki recenzowanej pracy doktorskiej (1. Jaskowiak J., Tkaczyk O., Słota M., Kwasniewska J., Szarejko I. 2018. *Analysis of aluminum toxicity in Hordeum vulgare roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. PLoS ONE 13(2): e0193156*; 2. Jaskowiak J., Kwasniewska J., Milewska-Hendel A., Kurczynska E.U., Szurman-Zubrzycka M., Szarejko I. 2019. *Aluminum Alters the Histology and Pectin Cell Wall Composition of Barley Roots. International Journal of Molecular Sciences 20: 3039*; 3. Jaskowiak J., Kwasniewska J., Szurman-Zubrzycka M., Rojek-Jelonek M., Larsen P.B., Szarejko I. 2020. *Al-Tolerant Barley Mutant hvatr.g Shows the ATR-Regulated DNA Damage Response to Maleic Acid Hydrazide. International Journal of Molecular Sciences 21(22): 8500*), niemniej **powinna ona zostać naniesiona również na wyniki przedstawiane w przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej, wraz z opisem jakie konkretnie testy statystyczne zostały wykonane**. Niestety nie odnalazłam w publikacjach Autorki analizy statystycznej adekwatnej do Rycin 14-18 zamieszczonych w rozprawie. **Doktorantka powinna niezwłocznie dokonać takiego uzupełnienia przygotowując prezentację autoreferatu dotyczącą otrzymanych wyników badań**. Nie zamieszczenie przez Doktorantkę w przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej, wyników analizy statystycznej podaje w wątpliwość interpretację wyników uzyskanych badań i wyciągnięte przez Autorkę wnioski. Pewne zastrzeżenia budzi także wynik testu mikrojądrowego, którego wyniki Autorka uznała za wskazujące na indukowanie przez chlorek glinu mikrojąderek w badanym materiale. Uważam, że indukcja mikrojąderek przez badany czynnik na poziomie 1% to nie jest wynik, który jednoznacznie wskazywałby na klastogeniczne działanie glinu w badanych komórkach. Najczęściej w seriach doświadczalnych obok kontroli negatywnej czyli serii pozbawionej substancji badanej powinna zostać zastosowana kontrola pozytywna w postaci wzorcowego mutagenu, który stanowi punkt odniesienia/referencję do zmian odnotowanych po przeprowadzeniu danego testu, a potem do interpretacji wyników badań. W prezentowanej pracy doktorskiej tym mutagenem jest bez wątpienia hydrazyd kwasu maleinowego i szkoda, że Doktorantka nie umieściła wyników serii z MH na wykresach dotyczących serii doświadczalnych z wykorzystaniem chlorku glinu w badanym materiale, a nie traktować ją jako osobny eksperyment.

Kolejna moja uwaga dotyczy uszkodzeń jąder komórkowych, które zaobserwowała Doktorantka podczas prowadzonych analiz, a które w mojej opinii są przykładem tzw. ***karioreksji***, która jest następstwem degeneracji jądra komórkowego w wyniku śmierci komórki. Sugerowałabym Autorce o wykorzystanie powyższej informacji w dalszych opracowaniach dotyczących omawianych zagadnień.

Na szczególną uwagę w rozdziale **Wyniki** zasługuje obszerna dokumentacja zdjęciowa w postaci licznych Tablic, które Doktorantka wykonała z niezwykłą starannością, a które to stanowią wartościowe dopełnienie rozprawy doktorskiej i wyników w niej zawartych.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały, że glin działa genotoksycznie w badanych komórkach korzeni jęczmienia. Ponadto, Autorka odnotowała obniżenie aktywności mitotycznej komórek, zmniejszenie częstości występowania jąder komórkowych w fazie S i zwiększenie ich częstości w fazie G2/M. Doktorantka przeprowadziła interesujące analizy histologiczno-anatomiczne korzeni odmiany wyjściowej *Sebastian* i mutantu *hvatr.g* rosnących w pożywkach o różnych pH i z dodatkiem chlorku glinu. Ponadto Autorka wykazała, że odpowiedź komórek roślinnych na glin może być wyrażona przez specyficzne rozmieszczenie pektyn w ścianie komórkowej, a tym samym brać udział w mechanizmie hamowania wzrostu korzeni, co należy do niezwykle cennych informacji dotyczących korelacji między stresem wywołanym glinem a zmianami w budowie korzeni jęczmienia.

Na koniec omawiania tej części pracy doktorskiej chciałam Doktorantce zadać pytania nawiązujące do przedstawionych wyników pracy: *Jakie Autorka dostrzega oryginalne/nowatorskie cechy przeprowadzonych przez Siebie badań (w omówieniu wyników Doktorantka często potwierdza pewne informacje), oraz w jaki sposób badania przeprowadzone przez Doktorantkę mogą być praktycznie wykorzystane w kierunku poprawy plonu u jęczmienia w warunkach ekspozycji roślin na glin?*

**Dyskusja** przedstawionej do recenzji dysertacji świadczy o dobrym „poruszaniu się” Autorki w zagadnieniu będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zawarte w **Dyskusji** informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują wyniki z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa. Doktorantka formułuje w poprawny sposób hipotezy, które popiera wynikami badań własnych oraz dostępnych w literaturze naukowej.

W tym miejscu chciałabym skierować pytanie do Doktorantki dotyczące szerszego wyjaśnienia zdania umieszczonego w **Dyskusji** na str. 78: *„Komórki TUNEL-pozytywne obserwowano z wyższą częstością niż uszkodzone, pofragmentowane jądra komórkowe i mikrojądra. Te wyniki mogą wskazywać, że większość pęknięć DNA indukowanych przez glin może być efektywnie naprawiona”*.

**Wnioski** stanowią podsumowanie pracy oraz wynikają z konstrukcji badań i są uzasadnione, chociaż wniosek nr 1 dotyczący m.in. indukowania przez glin mikrojąder w komórkach korzeni jęczmienia powinien ulec weryfikacji, gdyż tak jak wcześniej wspomniałam, generowanie mikrojąder było na bardzo niskim poziomie.

**Literatura** zawiera 139 pozycji, które są adekwatne i świadczą o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Doktorantka mogłaby zamieścić więcej publikacji z ostatnich 5 lat, bo tutaj czuję lekki niedosyt. W tym miejscu muszę Doktorantce zasygnalizować błędy, które dotyczą niektórych cytowań, a w kilku przypadkach ich braku:

1. Nie odnalazłam w tekście dysertacji pracy zacytowanej w spisie literaturowym o następujących danych: **Gall HL, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C. 2015. Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. Plants 4: 112-166.**

2. Brak następujących prac w spisie literaturowym: **Juchimiuk i in. 2007; Matsumoto i in. 2015; Round i Larsen, 2008; Sjogren i Larsen, 2017; Terzoudi i in., 2003;**

3. W tekście pracy pozycja **Jones L. i in. 2006**, a w spisie literaturowym widnieje rok **1997?** (**Jones L, Seymour GB, Knox JP. 1997**).

Z kolei, w pozycji **Magnavaca R, Gardner C, Clark R. 1987. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition. Gabelman H, Longhman B. (Eds.) Dordrecht, Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers: 255-265** w spisie literaturowym widzimy rok 1987, a w tekście jest **1957?**

Pozycja ze spisu literatury **Matsumoto H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. Int. Rev. Cytol. 200: 1-46** w tekście widnieje rok **2001?**

4. W przypadku cytowania pozycji **Brown TA. 2009, Genomy**, Doktorantka podaje informacje z dwóch różnych rozdziałów ww. pozycji literaturowej i w związku z tym, powinny one mieć oznaczenia w spisie odpowiednio dla danego rozdziału tj. **Brown TA. 2009a**.....oraz **Brown TA. 2009b**. Podając odnośnik w tekście pracy Brown 2009 czytelnik nie wie z jakiego rozdziału w danym miejscu korzystała Autorka.

#### **Podsumowanie**

Praca doktorska mgr Joanny Jaśkowiak stanowi spójne tematycznie dzieło, które wskazuje, że Doktorantka posiada zadowalającą wiedzę w dyscyplinie naukowej będącej przedmiotem Jej zainteresowania, a także umiejętność planowania i prowadzenia badań oraz interpretowania i komentowania ich wyników w świetle dostępnej literatury. Stwierdzam, iż pomimo wysuniętych w recenzji uwag krytycznych i komentarzy, przedłożona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku. Zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Joanny Jaśkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.