



dr hab. Marta Lenartowska

Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 27 lipca 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Skórki

pt. „*Analiza zmian biochemiczno-strukturalnych pomiędzy wrażliwymi i tolerancyjnymi
odmianami zbóż pod wpływem toksyczności jonów Mn*”

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Apolonii Sieprawskiej

w Katedrze Biochemii i Biofizyki

Instytut Biologii i Nauk o Ziemi

Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy jednego z najbardziej aktualnych zagadnień, jakim jest nadmierna kumulacja mikroelementów w roślinach, co ma negatywny wpływ na ich fizjologię, a w konsekwencji redukcję plonów roślin uprawnych. Jednym z nich jest mangan (Mn), którego rola w podstawowych procesach metabolicznych, w tym w procesie fotosyntezy, jest niekwestionowana. Mn jest ważnym mikroelementem dla zbóż, ale jego nadmiar prowadzi do wystąpienia defektów morfologicznych i anatomicznych, których skala zależy od stopnia tolerancji różnych gatunków lub odmian na stres związany z ponad optymalnym stężeniem tego pierwiastka w środowisku ich wzrostu. Doniesienia literaturowe dokumentujące dynamiczny wzrost poziomu Mn w środowisku naturalnym o potencjalnie szkodliwym wpływie na wzrost i rozwój roślin skłoniły zapewne Autorkę rozprawy doktorskiej do postawienia hipotezy, że jego nadmierna akumulacja w tkankach/komórkach wybranych zbóż wywołuje defekty fenotypowe w zależności od stopnia tolerancji różnych odmian, przy czym jony selenu (Se) mogą niwelować ten szkodliwy efekt. Pozwoliłam sobie sformułować tę bardzo ogólną hipotezę na podstawie lektury pracy doktorskiej przedstawionej mi do oceny, ponieważ nie odnalazłam jej w treści dzieła. Naturalnie nie jest moją intencją ingerencja w zakres merytoryczny pracy doktorskiej. **Jednak z obowiązku recenzentki wskazuję na brak tego elementu i oczekuję, że Doktorantka przedstawi podczas obrony własną hipotezę badawczą, którą weryfikowała w toku badań.** Tym bardziej, że problem, któremu poświęcona jest rozprawa doktorska, jest niezwykle ważny i wartu wnikliwych badań oraz łączy w sobie dwie ścieżki badawcze – teoretyczną i aplikacyjną – obie tak samo istotne dla żywnościowej przyszłości człowieka w kontekście niekorzystnych zmian będących efektem wszelkich działań wyniszczających środowisko naturalne.

W pracy doktorskiej nie ma także wzmianki o tym, że Doktorantka jest współautorką kilku publikacji w tematyce zbieżnej z dysertacją, a spora część wyników pracy doktorskiej została już opublikowana, czego przykładem jest choćby oryginalna praca badawcza pt. „*Significance of selenium supplementation in root-shoot reactions under manganese stress in wheat seedlings – biochemical and cytological studies*”, Plant Soil (2021) 468:389-410. **Brak tej informacji uważam za błąd tym bardziej, że kilka publikacji w dorobku na tym etapie kariery naukowej to bardzo duże osiągnięcie.**

Recenzja szczegółowa

Pani mgr Magdalena Skórka przedstawiła rozprawę doktorską w tradycyjnej formie dzieła liczącego 124 strony, które obejmuje: spis treści, listę skrótów, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz literaturę. Wyodrębnienie rozdziałów i podrozdziałów tematycznych porządkuje obszerny materiał, co ułatwia czytelnikowi śledzenie zamierzeń Autorki i etapy realizacji badań. Lista skrótów jest obszerna ale pomocna, choćby ze względu na fakt, że niekiedy skróty są stosowane w tekście bez stosownego wyjaśnienia (np. SOD, POX, CAT, streszczenie, str. 8) lub nie są konsekwentnie stosowane od pierwszego ich wprowadzenia (np. mangan/Mn – nazwa pierwiastka i symbol stosowane wymiennie, wielokrotnie w tekście pracy).

Streszczenie pracy powinno być krótkie i rzeczowe; powinno zawierać najważniejsze wątki pracy w kolejności chronologicznej, takie jak problem naukowy (przedmiot badań), hipotezę badawczą, cel badań (ewentualnie cele szczegółowe/zadania badawcze), zarys metodologii, syntetyczne podsumowanie uzyskanych wyników zmierzające do wniosków końcowych oraz ich znaczenie – wartość naukową i walor aplikacyjny, jeśli taki jest. Spośród wymienionych cech zamieszczone streszczenie zawiera tylko dwie – jest krótkie, a pierwszy akapit nakreśla doskonale przedmiot badań. Dalszy opis jest zbyt szczegółowy lub niejasny, czego przykładem może być informacja odnosząca się do 5-metC: „*Zmianie kierunku różnicowania komórek w wierzchołkowej części korzenia pod wpływem stresu Mn towarzyszył wzrost stężenia 5-metC*” – nie wiadomo, w jakim celu wykonano tę analizę i o czym świadczy uzyskany wynik (odniosę się do tego wątku obszerniej w dalszej części recenzji). Reasumując, streszczenie nie jest najmocniejszym elementem rozprawy, ale rzadko zdarza się, że jest napisane dobrze i zachwyca. Ponieważ zwyczajowo jest to rozdział pracy pisany jako ostatni, zwykle brakuje nam energii i zbyt pochopnie pragniemy postawić „ostatnią kropkę” po dużym wysiłku, jakim niewątpliwie jest napisanie rozprawy doktorskiej – doskonale to rozumiem. Jednak warto pamiętać, że dobrze zredagowane streszczenie obszernej pracy badawczej, które bez względu na swoją pozycję – na początku bądź na jej końcu – jest zawsze czytane w pierwszej kolejności i może być kluczowe dla uzyskania pozytywnej oceny recenzentów podczas publikacji wyników badań w renomowanych czasopismach naukowych.

W dalszej części pracy znajduje się dobrze przemyślany wstęp, sformułowanie celu badań z wyszczególnieniem pytań szczegółowych oraz rozdział metodyczny zawierający opis materiału roślinnego i metod badawczych. Dalej następuje prezentacja uzyskanych wyników badań stanowiąca obszerny segment pracy (w tym 17 tablic prezentujących wykresy lub fotografie i 3 tabele) oraz ich dyskusja. Zostały także przedstawione wnioski końcowe – sformułowane bardzo dobrze – oraz imponujący spis literatury obejmujący aż 300 pozycji. Język dysertacji jest komunikatywny, a sposób podziału treści spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie nauki biologiczne. Nie uszły mojej uwadze nieliczne błędy stylistyczne, interpunkcyjne czy ortograficzne, jak choćby błąd na stronie tytułowej: „*INSTYTUT BIOLOGII I NAUK O ZIEMI*”, ale nie mają one istotnego wpływu na merytoryczną wartość pracy doktorskiej. Autorka zamieściła także oświadczenie, że pracę napisała samodzielnie bez naruszenia praw autorskich innych osób. **Stwierdzam zatem, że przedstawiona do oceny dysertacja ma strukturę klasyczną i kompletną.**

Wstęp jest napisany klarownie i bez zbędnego rozmachu. W pierwszej części Doktorantka opisała Mn i występowanie tego pierwiastka w środowisku (w glebach, wodzie i powietrzu) oraz sposób pobierania i transportu Mn w roślinach, a także jego rolę w procesach metabolicznych. W drugiej części omówione zostało zagadnienie nadmiernej akumulacji Mn w tkankach roślin i jej skutki, następnie stres oksydacyjny i osmotyczny oraz mechanizmy obronne komórek wobec reaktywnych form tlenu wraz z obszerną charakterystyką enzymów antyoksydacyjnych i antyoksydantów. W ostatniej części wstępu Autorka opisała mikro- i makroelementy niezbędne w metabolizmie roślin w kontekście morfogenezy wybranych organów roślinnych, takich jak korzeń i liście, oraz zarys organizacji przestrzennej komórki roślinnej w odniesieniu do chloroplastów i procesu fotosyntezy. W mojej ocenie brakuje logicznego przejścia w opisie pomiędzy podrozdziałami 1.4 i 1.5, które uzasadniałoby obszerne omówienie zagadnienia stresu oksydacyjnego i osmotycznego w kontekście nadmiernej akumulacji Mn w roślinach. **Zakładam, że podczas prezentacji autoreferatu ten wątek zostanie przedstawiony klarownie.** Ponadto Autorka pracy wielokrotnie wspomina o toksycznym wpływie nadmiaru Mn na rozwój roślin, przy czym pomija kwestię organów generatywnych skupiając się głównie na wegetatywnych, co doskonale przedstawia Tabela 1 zamieszczona na str. 21. Jednak plon zbóż w istocie zależy od wytworzenia pylników i słupków w celu uzyskania nasion. **Czy istnieją dane odnoszące się do ewentualnych zaburzeń w formowaniu i/lub funkcjonowaniu organów generatywnych u roślin narażonych na stres nadmiernej kumulacji Mn?** W podrozdziale 1.9 zawarta jest informacja, że: „*Rośliny wyższe charakteryzują się budową biegunową, która jest warunkowana w zygocie, gdzie można wyodrębnić zawiązek korzenia i pędu*”. **Proszę o wyjaśnienie tego zagadnienia.** Zakres literatury, którą Autorka posłużyła się we wstępie pracy świadczy o jej doskonałej orientacji w obranej przez siebie tematyce badawczej, a zamieszczone ryciny ułatwiają lekturę kolejnych części rozprawy. Moja ogólna uwaga odnośnie tego rozdziału (a także kolejnych) dotyczy braku konsekwencji Doktorantki w stosowaniu przyjętych przez nią skrótów i symboli, które od momentu pojawienia się po raz pierwszy w tekście powinny być konsekwentnie używane.

Cel pracy został jasno sformułowany, a wynikające z niego kolejne pytania szczegółowe są wobec niego adekwatne. Moja uwaga – być może dyskusyjna – dotyczy jedynie wątpliwości, czy w kontekście braku hipotezy badawczej nie zastąpił jej po części cel pracy? Otóż brzmi on następująco: „...*celem podjętych badań było wykazanie różnic w działaniu jonów Mn w dawce toksycznej na siewki jarych zbóż różniące się wrażliwością na czynniki stresowe*”. Zatem w celu badań zawarta jest teza, że takie różnice istnieją, a choćby nie istniały lub nie były aż tak istotne, należy je wykazać, bo taki jest cel badań. Oczywiście w oparciu o literaturę przedmiotu założenie to jest jak najbardziej słuszne, ale w mojej opinii cel badań nie został dobrze sformułowany. Konsekwentnie, niektóre pytania szczegółowe zawierają w sobie również element tezy, np. w pytaniu i) Autorka pracy z góry zakłada, że w warunkach nadmiaru jonów Mn zmieniają się wartości świeżej i suchej masy koleoptyli zbóż (pszenicy, jęczmienia i owsa), ponieważ to pytanie brzmi: „*Jak zmieniają się wartości...*”, a powinno brzmieć: „*Czy zmieniają się wartości...*”. Natomiast dodatkowy aspekt badań, odnoszący się do potencjalnie protekcyjnych właściwości Se w warunkach ekspozycji roślin na zwiększone stężenia Mn, jest sformułowany bardzo dobrze, podobnie jak pytania szczegółowe w odniesieniu do wybranych odmian pszenicy.

Materiał roślinny do badań został wybrany właściwie, ponieważ do analiz podstawowych wykorzystano trzy gatunki zbóż – pszenicę, jęczmień i owies – w każdym przypadku co najmniej dwie różne odmiany zbóż charakteryzujące się różnym stopniem tolerancji na toksyczne działanie Mn. Natomiast w drugim etapie badań, obejmującym bardziej szczegółowe analizy, w tym badania immunocytochemiczne, wybrano pszenicę (dwie różne odmiany Nimfa i Alibi) jako najbardziej odporną na wysokie stężenia Mn, co jest uzasadnione. Tak dobrany materiał badawczy gwarantuje otrzymanie wiarygodnych wyników badań o wysokiej wartości poznawczej. Na szczególną uwagę zasługuje złożony **warsztat metodyczny** Doktorantki, która wykorzystwała szereg metod biochemicznych, ale także barwienia histo/cytochemiczne dla obserwacji mikroskopowych skrawków półcienkich utrwalonego materiału roślinnego (korzenie i liście) oraz technikę immunofluorescencyjną w celu identyfikacji miejsc lokalizacji 5-metC w komórkach korzeni i liści dwóch odmian pszenicy w zróżnicowanych wariantach eksperymentalnych. Ta część dysertacji doktorskiej świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia wnikliwych badań. **Korzystając z przywileju recenzentki proszę, aby w trakcie dyskusji Autorka pracy ustosunkowała się do kilku kwestii metodycznych.** Z opisu w podrozdziale 3.15. (str. 54) wynika, że do barwień histo/cytochemicznych zastosowano błękit metylenowy, co pozostaje w sprzeczności z opisem wyników odnoszących się do obserwacji mikroskopowych preparatów barwionych „*błękitem toluidynowym*” (str. 79), przy czym zapewne mowa o błękitie toluidynowym – wkradła się „literówka”. Analogiczną nieścisłość odnalazłam także w publikacji współautorstwa Doktorantki (Plant Soil, 2021, 468:389-410), w odniesieniu do tych samych wyników badań. Czy wykonano analizę Western blot w celu weryfikacji specyficzności komercyjnego przeciwciała pierwszorzędowego anti-5-metC (monoklonalne mysie, Abcam) dla różnych odmian pszenicy? W jakim celu wykonano immunolokalizację 5-metC? Do tego pytania powrócę jeszcze w dalszej części recenzji odnoszącej się do wyników badań.

Wyniki przeprowadzonych badań są w zdecydowanej większości dobrze udokumentowane zestawem przejrzystych wykresów, fotografii i tabel zamieszczonych kolejno w tekście, co znacznie ułatwia jego lekturę. W toku badań Doktorantka uzyskała wiele ciekawych wyników, które zebrała w postaci wniosków przedstawionych w skrócie poniżej:

- odmiany zbóż wrażliwe na stres oksydacyjny akumulują wyższe ilości Mn w porównaniu do odmian tolerancyjnych, czego fizjologicznym efektem jest m.in. zahamowanie wzrostu;
- aplikacja Mn w stężeniu toksycznym uruchamia enzymatyczne reakcje ochronne o różnej intensywności u różnych zbóż;
- stres Mn powoduje zaburzenia osmotyczne (wzrost syntezy rozpuszczalnych cukrów i proliny), przy czym poziom ochrony jest zależny od genotypu;
- zaburzenia metabolizmu komórkowego w warunkach stresu Mn powodują defekty w strukturze plastydów oraz gromadzenie zwiększonych ilości skrobi;
- nadmierna akumulacja Mn przez system korzeniowy prowadzi do powstania zaburzeń w jego strukturze, zwłaszcza w częściach wierzchołkowych korzeni;
- Se może stymulować mechanizmy ochronne roślin w warunkach stresu Mn, które nie są związane z bezpośrednim blokowaniem dopływu Mn do komórek;
- biofortyfikacja Se wobec toksycznych stężeń Mn zwiększa aktywację układów ochronnych w komórkach pszenicy przed wzmożoną generacją RFT w tych warunkach;

- stymulowany przez Se wychwyt jonów Ca wydaje się być ważnym elementem reakcji ochronnych, umożliwiającym m. in. regenerację tkanek korzeni;
- strefa merystematyczna korzeni ma potencjalną zdolność do modyfikowania wzorca różnicowania pod wpływem stresu Mn, zwłaszcza w przypadku silnego uszkodzenia komórek merystematycznych;
- stres Mn powoduje podwyższenie poziomu metylacji DNA mierzone globalnym poziomem 5-metC wskazując na prawdopodobną inicjację apoptozy w komórkach i obumieranie głównego wierzchołka wzrostu.

Co do trafności niektórych wniosków mam pewne wątpliwości, które przedstawię poniżej. Podsumowując ten rozdział rozprawy stwierdzam, że Doktorantka przeprowadziła dobrze zaplanowane i przemyślane eksperymenty, które udokumentowała w postaci wartościowych wyników badań nie budzących większych wątpliwości. Są one dobrym przykładem obiektywnej i uzasadnionej naukowo metodologii badawczej, co sprawia, że rozprawa Pani mgr Magdaleny Skórki ma dużą wartość poznawczą. Niemniej, mam kilka pytań i uwag w odniesieniu do tego rozdziału, w szczególności do obserwacji mikroskopowych.

Po pierwsze, dlaczego dokumentacja barwień histo/cytochemicznych (Fig. 19, str. 79) jest przedstawiona w postaci czarno-białych fotografii zamiast w kolorze oddającym charakter barwienia błękitem metylenowym (toluidynowym)? Przez to zdjęcia mikroskopowe tracą na jakości i trudniej zweryfikować różnice w strukturze komórek opisywane przez Autorkę. Dostrzegam tylko jedno zdjęcie dokumentujące warunki kontrolne dla jednej odmiany pszenicy, podczas gdy w opisie mowa o dwóch. Ponadto rozważania na temat dynamicznych zmian w akumulacji skrobi w plastydach w określonych warunkach eksperymentalnych są nie do końca uprawnione bez wykonania barwień cytochemicznych stosowanych standardowo dla skrobi – dlaczego ich nie wykonano? Niezabarwione błękitem metylenowym (toluidynowym) obszary plastydów, definiowane przez Autorkę jako ziarna skrobi, mogą odzwierciedlać w istocie degradację tylakoidów, co byłoby równie interesującą obserwacją. Mam też wątpliwości co do objaśnienia skrótu „e”; w moim przekonaniu to epiderma (skórka), a nie naskórek.

Po drugie, ponawiam pytanie odnośnie celu wykonania immunolokalizacji 5-metC w komórkach korzeni i liści dla dwóch odmian pszenicy (Nimfa i Alibi) w zróżnicowanych wariantach eksperymentalnych – nie znajduję jasno sformułowanego uzasadnienia dla wykonania tych analiz, chociaż zapewne takie istnieje. Co więcej, wniosek końcowy odnoszący się do tych wyników w brzmieniu: „*stres Mn powoduje podwyższenie poziomu metylacji DNA mierzone globalnym poziomem 5-metC wskazując na prawdopodobną inicjację apoptozy w komórkach....*” jest spekulacją, ponieważ nie przedstawiono wystarczających dowodów na poparcie tej tezy. W publikacji współautorstwa Doktorantki (Plant Soil, 2021, 468:389-410), w odniesieniu do tych samych wyników badań, przedstawiono analizę porównawczą poziomu 5-metC bazującą na pomiarze intensywności fluorescencji, której brak w pracy doktorskiej. Dlaczego? Natomiast w żadnej z tych prac (ani w publikacji, ani w pracy doktorskiej) nie odnalazłam dowodów na poparcie tezy o wzmożonej apoptozie w warunkach stresu Mn. Dlatego proszę Doktorantkę, aby wyjaśniła ten problem podczas obrony i wskazała, jakie analizy powinny być wykonane, aby wniosek był potencjalnie uprawniony. Powiększenia zdjęć dokumentujących immunofluorescencję powinny być większe, w szczególności fragmenty fotografii obrazujące barwienie jąder komórkowych, co zdecydowanie podniosłoby jakość dokumentacji fotograficznej. Na zdjęciach z mikroskopu fluorescencyjnego zamieszczonych w



pracy (jak i w publikacji) nie widać niestety opisywanych defektów w strukturze chloroplastów. Aby je zweryfikować, należałoby wykonać analizę ultrastrukturalną z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, do czego gorąco zachęcam Doktorantkę, jeśli będzie kontynuować te badania w przyszłości.

Po trzecie, jakkolwiek dokumentacja analizy mikroskopowej struktury korzeni po barwieniu błękitem metylenowym jest bardzo dobra, ponieważ zdecydowanie widoczne są defekty będące skutkiem toksycznego wpływu Mn oraz efekt protekcyjnych właściwości Se, na zamieszczonych zdjęciach nie widać degeneracji jąder komórkowych, opisywanych jako zanik chromatyny albo wyższy stopień jej kondensacji – aby to stwierdzić niezbędne jest inne podejście metodyczne. Proszę o zaproponowanie przynajmniej jednego z możliwych.

Dojrzała **dyskusja** wzbogaca rozprawę doktorską. Autorka umiejętnie konfrontuje wyniki swoich prac eksperymentalnych z osiągnięciami innych badaczy oraz formułuje śmiało lecz w znakomitej większości uzasadnione wnioski. Sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz doskonałej orientacji w najnowszych kierunkach badań, które stanowią przedmiot jej naukowych zainteresowań. Zdecydowanie podkreślam, że wszystkie moje uwagi i sugestie wynikają nie tyle z przywileju, co z obowiązku recenzentki. Nie mają one istotnego wpływu na wartość merytoryczną pracy doktorskiej zasługującej na uznanie, głównie ze względu na umiejętne wykorzystanie wybranych metod eksperymentalnych oraz kompetentną interpretację interesujących wyników badań, które są oryginalne, rzetelne i w znakomitej większości dobrze udokumentowane.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Skórki ma dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca dotychczasową wiedzę w temacie badań. Praca jest spójna tematycznie z wyraźnie postawionym celem i właściwie weryfikowaną hipotezą, której co prawda brak, ale która pojawia się w pracy w sposób nieoczywisty. Kolejne rozdziały są zwarte, a główny problem badawczy znajduje w każdym z nich właściwe miejsce. Obszerny materiał doświadczalny, bogaty warsztat metodyczny oraz oryginalne wyniki badań świadczą o dobrym przygotowaniu Autorki do samodzielnej pracy naukowej, umiejętności zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także o znajomości piśmiennictwa w literaturze przedmiotu i zdolności krytycznej dyskusji własnych wyników badań w jego kontekście.

W świetle powyższej oceny nie mam wątpliwości, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Skórki pt. *„Analiza zmian biochemiczno-strukturalnych pomiędzy wrażliwymi i tolerancyjnymi odmianami zbóż pod wpływem toksyczności jonów Mn”* spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie pracy doktorskiej do publicznej obrony.

Toruń, 27 lipca 2023 r.

Z poważaniem