



Lublin, 21 kwietnia 2021 r.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. (081) 537 50 64
email: mwojcik@umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Marty Talarek-Karwel
pt. „The share of 24-epibrassinolide in *Acutodesmus obliquus* adaptation to stress induced by lead ions”

wykonanej w Katedrze Biologii i Ekologii Roślin na Wydziale Biologii
Uniwersytetu w Białymstoku
pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Bajguza, prof. UwB

Na skutek ekspansywnej gospodarki człowieka od wielu lat obserwuje się wzrost zanieczyszczeń środowisk wodnych metalami ciężkimi, co powoduje poważne problemy w funkcjonowaniu i stabilności ekosystemów. Szczególnie niebezpieczne jest skażenie środowisk ołowiem, który uznawany jest za najbardziej fitotoksyczny spośród metali ciężkich. Ołów negatywnie wpływa na wszystkie procesy fizjologiczne i biochemiczne w roślinach, przyczyniając się do zahamowania produkcji roślinnej, a przez to zakłócenia całych łańcuchów troficznych. Bardzo ważną rolę w ekosystemach wodnych pełnią glony, które są tam głównymi producentami materii organicznej. Dzięki ewolucyjnie wykształconym strategiom adaptacyjnym do środowisk zanieczyszczonych metalami, mogą również pełnić ważną rolę w fitoremediacji metali z ekosystemów wodnych. Glony, szczególnie te jednokomórkowe, charakteryzują się szybkim tempem podziałów komórkowych i przyrostu biomasy, dużą zdolnością akumulacji metali w ścianach komórkowych, a także skuteczną wewnątrzkomórkową detoksyfikacją jonów metali poprzez ich chelatowanie z ligandami cytoplazmatycznymi i sekwestrację w wakuoli. Poznanie mechanizmów regulacji tych procesów ma istotne znaczenie nie tylko dla zwiększenia produkcji biomasy roślinnej w zanieczyszczonych zbiornikach wodnych, ale również ich remediacji. W tym kontekście, podjęte przez Doktorantkę badania dotyczące oceny wpływu fitohormonu – 24-epibrassinolidu (EBL) na stymulację wzrostu jednokomórkowej zielonicy *Acutodesmus obliquus* oraz zwiększenie jej tolerancji na ołów są nie tylko interesujące poznawczo lecz również ważne ze względów praktycznych. W mojej ocenie, zarówno tematyka badawcza, jak również gatunek rośliny wykorzystany do badań zostały dobrane właściwie, a wyniki przedstawione w pracy doktorskiej są bardzo interesujące i wartościowe.



Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór 4 publikacji:

1. Rajewska I., **Talarek M.**, Bajguz A. 2016. Brassinosteroids and response of plants to heavy metals action. *Frontiers in Plant Science* 7:629 (IF – 4,42; 40 pkt MNiSW)
2. **Talarek-Karwel M.**, Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A., Rajewska I. 2018. The effect of 24-epibrassinolide on the green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry* 124:175–183 (IF – 3,8; 35 pkt MNiSW)
3. **Talarek-Karwel M.**, Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A. 2020a. 24-Epibrassinolide modulates primary metabolites, antioxidants, and phytochelatins in *Acutodesmus obliquus* exposed to lead stress. *Journal of Applied Phycology* 32:263-276 (IF – 3,016; 70 pkt MEiN)
4. **Talarek-Karwel M.**, Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A. 2020b. Hormonal response of *Acutodesmus obliquus* exposed to combined treatment with 24-epibrassinolide and lead. *Journal of Applied Phycology* 32:2903-2914 (IF – 3,016; 70 pkt MEiN)

Wymienione publikacje zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z bazy JCR, a łączny współczynnik oddziaływania IF tych prac wynosi 14,252. Wszystkie publikacje są pracami zespołowymi, liczba współautorów waha się od 3 do 4. We wszystkich pracach eksperymentalnych (prace 2-4) Doktorantka jest pierwszym autorem i zgodnie z oświadczeniami współautorów Jej udział w ich powstanie był wiodący (55%). Wykonała wszystkie (publikacje 3-4) lub znaczną większość (publikacja 2) eksperymentów i analiz, uczestniczyła w opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptów. Chciałabym się jednak dowiedzieć, jakie konkretnie analizy biochemiczne były wykonywane przez Doktorantkę spośród tych, które stanowiły podstawę do przygotowania publikacji nr 2 (*Plant Physiol. Biochem.*, 2016), ponieważ współudział w otrzymaniu wyników deklaruje również Pani I. Rajewska. Pierwsza z przedstawionych w cyklu publikacji to praca przeglądowa, w której Doktorantka jest drugim autorem, ale Jej udział w powstanie tego artykułu jest równy z udziałem pierwszego autora – 40%. Ma więc pełne prawo do włączenia tej pracy do cyklu publikacji stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest bardzo przejrzysty i poprawny przy tego typu formacie pracy, opartym na monotematycznym cyklu publikacji.

Dysertację doktorską rozpoczyna **Streszczenie** w języku polskim i angielskim (**Abstract**), w którym Autorka zwięźle przedstawiła cele pracy doktorskiej oraz najważniejsze osiągnięcia naukowe opublikowane w kolejnych publikacjach. Wartość tego rozdziału znacznie podnosi syntetyczny schemat przedstawiający różne aspekty działania EBL, ołowiu oraz EBL w obecności ołowiu na liczbę komórek, zawartość metabolitów pierwotnych i barwników fotosyntetycznych, endogennych hormonów, aktywność enzymatycznych i poziom nieenzymatycznych antyoksydantów na kultury *A. obliquus*. Schemat ten bardzo przejrzysto podsumowuje osiągnięte wyniki.

Przedstawiony na kolejnych pięciu stronach wstęp teoretyczny jest napisany w języku angielskim (**Introduction**), podobnie jak wszystkie kolejne rozdziały pracy. W rozdziale tym przedstawiono charakterystykę brassinosteroidów i ich rolę w procesach wzrostu i rozwoju roślin, a także tolerancji na abiotyczne czynniki stresowe środowiska, w tym metale ciężkie. Opisano również aktualny stan wiedzy na temat roli glonów jednokomórkowych w ekosystemach



wodnych i ich reakcji na toksyczność ołowiu. Prezentowane zagadnienia są poparte adekwatną literaturą. Rozdział Introduction stanowi zwięzłą i logicznie poprowadzoną syntezę wiadomości, które stanowią doskonałe wprowadzenie do badań prezentowanych w dalszej części pracy i usprawiedliwiają wybór podjętej tematyki badawczej i obiektu badawczego. Na zakończenie tego rozdziału postawione są cele i hipotezy badawcze, które były konsekwentnie realizowane w podjętych pracach badawczych, przedstawionych w kolejnych rozdziałach. Autorka testowała trzy główne hipotezy badawcze:

- (1) Egzogenny EBL jest efektywnym stymulatorem wzrostu *A. obliquus* w sposób zależny od zastosowanego stężenia;
- (2) Egzogenny EBL jest zaangażowany w tolerancję *A. obliquus* na stres wywołany obecnością ołowiu;
- (3) Egzogenny EBL, ołów i kombinacja tych dwóch czynników ma wpływ na poziom endogennych hormonów w *A. obliquus*.

Kolejne cztery rozdziały stanowią kopie opublikowanych prac naukowych.

Pierwsza praca (1 – *Front. Plant Sci.*, 2016) stanowi przegląd literatury dotyczącej funkcji brassinosteroidów w roślinach ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w tolerancji stresu metali. W kolejnej pracy (2 – *Plant Physiol. Biochem.*, 2018) Autorka skupia się na określeniu wpływu EBL zastosowanego w szerokim zakresie stężeń (0,0001-10 μM) na wzrost oraz parametry fizjologiczne i biochemiczne (zawartość białek i cukrów prostych, barwników fotosyntetycznych, poziomu peroksydacji lipidów i H_2O_2 oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych) *A. obliquus* podczas 7-dniowej uprawy. Trzecia praca w cyklu publikacji (3 – *J. Appl. Phycol.*, 2020a) dotyczy roli EBL w niwelowaniu toksyczności ołowiu (zastosowanego w stężeniach 0,01 μM – poziom spotykany w środowiskach zanieczyszczonych oraz 500 μM – wysokie, ale nie letalne dla tej zielenicy stężenie metalu). Analizowano te same parametry fizjologiczne i biochemiczne jak w poprzedniej pracy, ponadto zbadano akumulację nieenzymatycznych antyoksydantów (askorbinian, glutation) i fitochelatyn oraz aktywność syntazy fitochelatynowej. W ostatniej pracy (4 – *J. Appl. Phycol.*, 2020b) przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu egzogenego EBL na poziom endogennych hormonów w komórkach *A. obliquus* hodowanych przez 5 dni w pożywce kontrolnej lub z dodatkiem jonów ołowiu. Zastosowane metody analityczne (m.in. ekstrakcja do fazy stałej, SPE; spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową, LC-QTOF-MS) pozwoliły na identyfikację 30 endogennych fitohormonów, określono ich zawartość i wzajemne korelacje. Sekwencja przedstawionych prac świadczy o rozwoju naukowym Doktorantki i dążeniu do rozwiązywania konkretnego problemu badawczego.

Rozdział **Summary** przedstawia weryfikację postawionych hipotez badawczych, odwołując się do odpowiednich prac eksperymentalnych i dokonując w syntetyczny i logiczny sposób podsumowania uzyskanych wyników. Na ich podstawie Autorka wyciągnęła wnioski przedstawione w kolejnym rozdziale – **Conclusions**.

Wśród najważniejszych osiągnięć badawczych ocenianej rozprawy, w której po raz pierwszy podjęto tematykę wpływu EBL na jednokomórkową zielenicę *A. obliquus*, należy wymienić:

- wykazanie, że egzogenny EBL, już w bardzo niskich stężeniach, ok. 100 razy niższych niż inne regulatory wzrostu, stymuluje proliferację i wzrost komórek *A. obliquus*, co może znaleźć zastosowanie w produkcji mikroglonów na szeroką skalę;



- wykazanie, że egzogenny EBL obniża toksyczność jonów ołowiu w *A. obliquus*, co wiąże się ze zwiększoną produkcją metabolitów pierwotnych (białka, cukry), stymulacją systemu antyoksydacyjnego oraz mechanizmów detoksyfikacji ołowiu w komórce poprzez zwiększenie syntezy fitochelatyn; EBL obniża również zawartość ołowiu w komórkach – implikuje to potencjalne zastosowanie tego fitohormonu i zielenic do remediacji środowisk wodnych skażonych ołowiem;

- stwierdzenie po raz pierwszy obecności 30 regulatorów wzrostu w komórkach *A. obliquus*, określenie ich profilu oraz wykazanie, że ich stężenie ulegało w większości redukcji pod wpływem ołowiu (z wyjątkiem kwasu abscysynowego oraz N- i O-gikozylowych form cytokinin, których zawartość rosła), ale zwiększeniu pod wpływem egzogenego EBL w komórkach traktowanych i nie traktowanych ołowiem (auksyny, brassinosteroidy, gibereliny, cytokininy, z wyjątkiem ABA).

Uważam, że wnioski, choć poprawne, są sformułowane dość lakonicznie i nie oddają w pełni osiągnięć prezentowanych badań. Zwłaszcza wniosek piąty, dotyczący wzrostu poziomu fitohormonów w *A. obliquus* pod wpływem EBL, niezależnie od obecności ołowiu w środowisku wzrostu jest na tyle lakoniczny i nieprecyzyjny, że sugeruje wzrost poziomu wszystkich hormonów, podczas gdy akumulacja kwasu abscysynowego wyraźnie ulegała obniżeniu.

Do pracy dołączono wykaz literatury (**References**) cytowanej we wstępie i podsumowaniu – liczy on 31 pozycji. Dobór literatury jest jak najbardziej odpowiedni, powiązany z tematyką pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w badanej tematyce i umiejętności korzystania ze źródeł literaturowych, w tym najnowszych, opublikowanych w ostatnim roku przed przygotowaniem dysertacji doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje wyjątkowa staranność w przygotowaniu spisu literatury i odwoływaniu się do niej w tekście. Dysertację doktorską zamyka zestaw oświadczeń współautorów (**Co-authors' statements**), wskazujących zakres ich pracy i procentowy udział w przygotowanie publikacji naukowych, które stanowią monotematyczny cykl publikacji będący podstawą o ubieganie się o stopień naukowy doktora.

Należy docenić wysiłek Doktorantki w przygotowanie części opisowej pracy w języku angielskim, choć pojawiają się w niej błędy językowe. Mimo widocznej dużej staranności w przygotowaniu tych opisowych rozdziałów pracy, nie udało się Autorce uniknąć również innych drobnych pomyłek i nieścisłości. Należy wymienić tutaj np. nieprawidłowe użycie słowa endogeny/endogenous w odniesieniu do stężenia jonów ołowiu w komórce (str. 5, 7, 9, 11, 15, 62). Termin „endogeny” oznacza „powstający wewnątrz organizmu”, nie może być zatem odnoszony do ołowiu. Właściwe tutaj byłoby użycie stwierdzenia „wewnątrzkomórkowe stężenie ołowiu” zamiast „zawartość endogenego ołowiu” (str. 5) czy „Pb w komórce” zamiast „endogeny Pb” (Ryc. 1). Analogiczne stwierdzenia powinny być wprowadzone w języku angielskim. Pojawiło się również niewłaściwe użycie słowa „endogeny EBL” w odniesieniu do zastosowanego/dodanego do pożywki z zewnątrz EBL (str. 5, 9) – w tym przypadku należałoby użyć słowa egzogeny/exogenous (pochodzący spoza organizmu).

Mimo, że przedstawione prace przed opublikowaniem przeszły przez proces recenzji, nie udało się w nich również ustrzec pewnych błędów czy niezręczności. Na przykład w pracy trzeciej (*J. Appl. Phycol.*, 2020a) już w abstrakcie pojawia się zwrot ‘endogenous Pb’. Niejasne jest dla mnie również ostatnie zdanie z abstraktu pracy 2 (‘The positive effect of EBL resulting from the



cellular oxidative state can be alleviated by antioxidants such as ascorbate peroxidase, catalase, superoxide dismutase, and ascorbate’).

Chciałabym poprosić Doktorantkę o wyjaśnienie, czy i w jaki sposób przygotowywano zawiesiny komórek *A. obliquus* do wykonywania oznaczeń zawartości ołowiu. W pracy 3 (*J. Appl. Phycol.*, 2020a) podano wyniki określające ‘the intracellular Pb level’, czyli wewnątrzkomórkowy poziom ołowiu, podczas gdy wiadomo, że znaczna frakcja jonów metalu jest zatrzymywana w ścianach komórkowych – czy stosowano jakąś metodę odpłukiwania tych jonów ołowiu zaadsorbowanych na powierzchni komórki? W większości analiz statystycznych, w tym również tych dotyczących analizy wyników prezentowanych w tej samej publikacji, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA). Jak jest uzasadnienie wyboru tej metody statystycznej do analizy wyników, w których występują trzy czynniki na różnych poziomach: ołów, EBL i czas?

Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i bardzo wartościowych wyników uzyskanych w pracy, opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Talarek-Karwel.

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka znakomicie wywiązała się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celach pracy. Uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe i nowatorskie, i wnoszą istotny wkład w poznanie roli EBL w regulacji wzrostu jednokomórkowych glonów i ich tolerancji na stres metali – a konkretnie ołowiu. Wierzę, że prace, stanowiące integralną część rozprawy doktorskiej, w których powstaniu Doktorantka miała wiodącą rolę, znajdą uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym. Praca przeglądowa opublikowana w 2016 roku była do tej pory cytowana 46 razy, praca opublikowana w 2018 roku – trzy razy, a dwie prace z 2020 roku były już cytowane po dwa razy przez autorów spoza grona współautorów tej publikacji (Baza Web of Science, 21.04.2021).

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania 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 roku, poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Marty Talarek-Karwel do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomendując jednocześnie wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS

