

Poznań, 22.04.2021 r.

Prof. dr hab. Iwona Morkunas
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

**Ocena pracy doktorskiej mgr Marty Talarek-Karwel
pt. "The share of 24-epibrassinolide in *Acutodesmus obliquus* adaptation
to stress induced by lead ion"
„Udział 24-epibrassinolidu w adaptacji *Acutodesmus obliquus*
do stresu indukowanego jonami ołowiu”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Marty Talarek-Karwel została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. UwB dr. hab. Andrzeja Bajguza z Wydziału Biologii Uniwersytetu w Białymstoku. Promotorem pomocniczym w tym przewodzie doktorskim jest Pani dr Alicja Piotrowska-Niczyporuk. Recenzowana praca dotyczy egzogenne wpływu 24-epibrassinolidu (EBL) w adaptacji glonu *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald & Hanagata 2000 (szcep SAG 276-6) do stresu powodowanego jonami ołowiu. Hipoteza robocza badań Pani mgr Marty Talarek-Karwel zakłada, że egzogenicznie zastosowany epibrassinolid ogranicza toksyczny wpływ jonów ołowiu na jednokomórkową zielenicę *Acutodesmus obliquus*. W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej w pierwszej kolejności przetestowano wpływ 24-epibrassinolidu o różnym stężeniu i w różnych punktach czasowych na wzrost *A. obliquus* i poziom wybranych wskaźników fizjologiczno-biochemicznych w celu wytypowania stężenia fitohormonu o najsilniejszym stymulującym oddziaływaniu. W ramach pierwszej części badań określono liczbę komórek glonu *A. obliquus* podczas prowadzenia kultur, zawartość barwników fotosyntetycznych i monosacharydów. Ponadto oznaczono poziom wskaźników stresu oksydacyjnego, tj. stężenie nadtlenu wodoru (H₂O₂), jako jednej z reaktywnych form tlenu (RFT), aktywność enzymów antyoksydacyjnych i poziom nieenzymatycznych antyoksydantów oraz zawartość produktu peroksydacji lipidów.

Uważam, że wyniki otrzymane przez Doktorantkę w ramach pierwszej części badań dostarczyły ważnej informacji na temat aktywnego udziału 24-epibrassinolidu w aktywacji systemu antyoksydacyjnego w komórkach glonu *A. obliquus*, co stanowiło przesłankę do planowania dalszych etapów badań dysertacji. Zatem po ustaleniu najbardziej optymalnego stężenia 24-epibrassinolidu dla wzrostu *A. obliquus*, zawartości chlorofilu i karotenów oraz

aktywności systemu antyoksydacyjnego, Doktorantka wprowadziła do swojego układu doświadczalnego abiotyczny czynnik stresowy ołów w formie azotanu ołowiu ($Pb(NO_3)_2$) i określiła te same wskaźniki fizjologiczno-biochemiczne, co dla układu tylko z EBL.

W mojej opinii interesującym w ramach tego układu doświadczalnego było określenie przez Doktorantkę, jednoczesnego wpływu EBL i ołowiu na biosyntezę fitochelatyn–niskocząsteczkowych peptydów, syntetyzowanych enzymatycznie z glutationu (GSH), które pełnią najważniejszą rolę w detoksykacji metali, kompleksując metale przez grupy tiolowe cysteiny. Kolejnym zadaniem jakiego się podjęła Pani mgr Marta Talarek-Karwel było wyjaśnienie czy egzogenne oddziaływanie EBL i ołowiu moduluje poziom endogennych fitohormonów w *A. obliquus*. Zadanie powyższe było całkowicie nowatorskie i bardzo ambitne.

Tematyka badań niniejszej rozprawy doktorskiej jest kontynuacją badań od wielu lat realizowanych pod kierunkiem Pana Prof. UwB dr. hab. Andrzeja Bajguza. Należy wspomnieć, że badania prowadzone przez Doktorantkę były finansowane w ramach projektu badawczego pt. „, Oddziaływanie auksyn, brassinosteroidów i cytokinin na glony z rodzaju *Scenedesmus* traktowane ołowiem” finansowanego przez NCN 2012/05/B/NZ8/00958 i z puli dotacji na utrzymanie potencjału badawczego przyznanej Wydziałowi Biologii i Chemii Uniwersytetu w Białymstoku przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech monotematycznych publikacji naukowych opublikowanych w międzynarodowych specjalistycznych czasopismach naukowych, z których jedna jest pracą przeglądową opublikowaną w 2016 roku w *Frontiers in Plant Science*, natomiast pozostałe trzy prace są oryginalnymi publikacjami, z których pierwsza opublikowana jest w *Plant Physiology and Biochemistry* w 2018, natomiast dwie pozostałe doświadczalne prace zostały opublikowane w *Journal of Applied Phycology* w 2020. Łączny sumaryczny impact factor tych publikacji wynosi 14.05 (4.298; 3.720; 3.016; 3.016, odpowiednio), a łączna wartość według kryteriów MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 215 punktów (35 pkt.; 40 pkt.; 70 pkt.; 70 pkt. MNiSW, odpowiednio). Zarówno praca przeglądowa jak i prace doświadczalne wchodzące w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej są pracami wieloautorskimi. We wszystkich pracach doświadczalnych Pani mgr Marta Talarek-Karwel jest pierwszym autorem i Jej udział w tych publikacjach wynosi 55%, natomiast w pracy przeglądowej jest drugim autorem i Jej wkład wynosi 44%. Doktorantka przedstawiła informacje, że Jej wkład w wykonanie doświadczeń i przygotowanie artykułów był znaczący. Ponadto współautorzy poszczególnych prac także złożyli oświadczenia. Prace przed opublikowaniem w czasopismach podlegały zarówno ocenie specjalistów Recenzentów jak i Edytorów otrzymując ich pozytywne opinie i akceptację do opublikowania. Ponadto dwie

publikacje oryginalne jak i praca przeglądowa wchodzące w skład dysertacji zostały opublikowane w czasopismach Open Access, zatem są powszechnie dostępne.

W mojej opinii przygotowanie pierwszej publikacji przeglądowej pt. „Brassinosteroids and response of plants to heavy metals action” opublikowanej w *Frontiers in Plant Science* było niezmiernie ważnym etapem przed przystąpieniem Doktorantki do badań, ponieważ pozwoliło na zapoznanie się ze stanem wiedzy dotyczącej funkcji fizjologicznej brassinosteroidów jako steroidowych hormonów roślinnych i ich znaczenia w odpowiedzi roślin na stres, fitotoksyczności metali ciężkich i ich detoksykacji oraz roli systemu antyoksydacyjnego roślin w warunkach stresowych. Opisanie mechanizmów działania steroidowych hormonów roślinnych na poziomie metabolomicznym umożliwiło Doktorance nie tylko zrozumienie złożoność ich oddziaływania wraz z innymi fitohormonami w warunkach fizjologicznych, ale także w warunkach oddziaływania czynników stresowych, w tym metali ciężkich.

W następnej kolejności skoncentruje się na omówieniu prac doświadczalnych, w których przedstawione zostały wyniki badań otrzymane przez Doktorantkę. W mojej opinii prace doświadczalne są najistotniejsze, ponieważ są zarówno odzwierciedleniem jakości wykonanych badań w ramach dysertacji jak i sprawdzeniem postawionych celów i hipotez.

W pierwszej oryginalnej publikacji (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), Doktorantka wykazała stymulujący wpływ EBL na wzrost zielenicy i aktywację systemu antyoksydacyjnego (wzrost poziomu nieenzymatycznych antyoksydantów i aktywności enzymów antyoksydacyjnych), wzrost zawartości wybranych metabolitów i barwników fotosyntetycznych. Dodatkowo udowodniła, że EBL hamuje generowanie RFT i uszkodzenia oksydacyjne.

W drugiej oryginalnej publikacji (Talarek-Karwel M., Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A. 2020. 24-Epibrassinolide modulates primary metabolites, antioxidants, and phytochelatins in *Acutodesmus obliquus* exposed to lead stress. *Journal of Applied Phycology* 32:263-276), mgr Marta Talarek-Karwel wykazała, że 24-epibrassinolid niweluje skutki wpływu abiotycznego czynnika stresowego, tj. ołowiu (w stężeniu 0.01 i 500 μM ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)) na komórki glonu *A. obliquus*. Doktorantka przedstawiła, że ochronna rola tego fitohormonu przejawiała się nie tylko w indukcji system antyoksydacyjnego i zawartości metabolitów pierwotnych, ale także w ograniczaniu akumulacji ołowiu w komórkach *A. obliquus* poprzez indukcję biosyntezy fitochelatyn, odpowiedzialnych zarówno za wiązanie jak i detoksykację ołowiu oraz w hamowaniu generowania H_2O_2 i stopnia uszkodzeń błonowych powodowanych przez ołów.

W trzeciej oryginalnej publikacji (Talarek-Karwel M., Bajguz A., Piotrowska-Niczyporuk A. 2020. Hormonal response of *Acutodesmus obliquus* exposed to combined treatment with 24-epibrassinolide and lead. *Journal of Applied Phycology* 32:2903-2914), Doktorantka stosując LC-QToF-MS, tj. wysokorozdzielczą spektrometrię mas z analizatorem typu kwadrupol i czasu przelotu jonów (QTOF)) sprzężoną z chromatografią cieczową wykryła i zidentyfikowała 30 fitohormonów takich jak kwas abscysynowy (ABA), kwas giberelinowy (GA3), auksyny (kwas indolilo-3-octowy, IAA; kwas fenylooctowy, PAA), BR-brassinosteroidy (brassinolid, BL; EBL; 28-homobrassinolid, HBL; kastasteron, CS; 24-epikastasteron, ECS; tyfasterol, TY; katasteronu, CT; 6-deoksotyfasterolu, dTY) oraz różne formy cytokinin (formy wolnych zasad, w połączeniach z rybozą, N-glikozydowych, O-glikozydowych) występujące w zielenicy *A. obliquus*. Bardzo ciekawe i ważne są wyniki dotyczące wpływu EBL, a także wpływu samego ołowiu na syntezę fitohormonów w komórkach zielenicy. Pani mgr Marta Talarek-Karwel dowiodła, że ołów jako abiotyczny czynnik stresowy spowodował zmniejszenie zawartości fitohormonów takich jak BR, GA3, auksyny oraz wolnych form cytokinin i ich rybozydowych koniugatów oraz udowodniła, że jednoczesne traktowanie EBL i ołowiem spowodowało wzrost zawartości BR, GA3, auksyn i cytokinin w komórkach glonu, co może wskazywać na ich zaangażowanie w odpowiedź obronną *A. obliquus*.

Stopień skomplikowania badań wymagał z pewnością od Autorki wielkiego nakładu pracy doświadczalnej i wytrwałości, nawet przy wsparciu Promotora pracy doktorskiej. Wyniki badań przedstawione w tej oryginalnej publikacji zostały solidnie opracowane statystycznie. Należy także wspomnieć, że prezentowane badania są pierwszymi, które dowodzą nie tylko występowania wyżej wspomnianych fitohormonów w komórkach *A. obliquus*, ale ujawniają jakie fitohormony są generowane w odpowiedzi na zastosowanie egzogenego 24-epibrassinolidu (EBL) i podczas jednoczesnego oddziaływania EBL i ołowiu. Uważam, że wyniki badań otrzymane przez Doktorantkę są istotne ze względów poznawczych, ponieważ obecnie wzrasta problem zanieczyszczenia ekosystemów wodnych toksycznymi metalami ciężkimi, w tym ołowiem co negatywnie wpływa na glony, które są głównymi producentami ekosystemów wodnych i pierwszym ogniwem w łańcuchu pokarmowym.

Prace doświadczalne wchodzące w skład dysertacji pokazują, że Doktorantka opanowała metodę prowadzenia kultur *A. obliquus* i metody badawcze takie jak oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i syntazy fitochelatynowej spektrofotometrycznie, izolacje białek, pomiar stężenia monosacharydów metodą spektrofotometryczną, zawartości barwników chloroplastowych oraz glutationu i fitochelatyn używając HPLC, określenie zawartości ołowiu wykorzystując absorpcyjną spektrometrię atomową z atomizacją w

plomieniu oraz zawartość fitohormonów stosując LC-QToF-MS. Chciałabym zaznaczyć, że całość wyników prezentowanych w publikacjach jest solidnie opracowana.

Mam kilka pytań w odniesieniu do prac eksperymentalnych:

- jakie przesłanki zdecydowały o podjęciu badań na jednokomórkowym glonie *A. obliquus*?
- dlaczego w dyskusji nie brano pod uwagę znaczenia H₂O₂ jako cząsteczki sygnałowej?, proszę o wyjaśnienie
- czy stężenie glutationu w komórkach glonu było skorelowane z poziomem fitochelatyn?
- czy próbowano ustalić sekwencje generowania fitohormonów w czasie prowadzenia kultur i oddziaływania czynnika stresowego?

W podsumowaniu rozprawa doktorska mgr Marty Talarek-Karwel przedstawiona jako cykl monotematycznych publikacji naukowych spełnia wszystkie wymogi formalne zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r., w związku z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669).

Pragnę podkreślić, że badania prezentowane w ramach dysertacji są interesujące i nowatorskie. Doktorantka podczas przygotowywania publikacji przeanalizowała bogatą literaturę, co świadczy o dobrej orientacji w problematyce badawczej. Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu w Białymstoku o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Marty Talarek-Karwel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę opublikowanie wyników badań w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym oraz ich znaczenie dla ekologii i ochrony środowiska wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

J. Morkus
