

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Sychty pt. „Metal accumulation and tolerance to zinc and lead of suspension-cultured cells of selected *Viola* L. species from metalliferous and non-metalliferous soils – constitutive tolerance to heavy metals in the genus *Viola*”

Praca doktorska mgr Klaudii Sychty koncentruje się na zjawisku odporności wybranych gatunków *Viola* na stres obecności jonów cynku i ołowiu. Opracowywany temat oddziaływania metali ciężkich na rośliny przyciąga uwagę wielu naukowców. Choć zjawisko reakcji roślin na ten szczególny rodzaj stresu było opisywane od kilku dziesięcioleci w setkach publikacji, to wiele wątpliwości dotyczących tego tematu nie zostało do chwili obecnej rozwiązanych i dysponujemy tylko niepełnymi danymi odnośnie funkcjonowania tych mechanizmów w poszczególnych grupach roślin. W szczególności brakuje nam wiedzy na temat podstaw odporności poszczególnych gatunków, a gatunki bardzo odporne na ten typ stresu są mało poznane. Wiemy, że odporność na czynniki stresowe jest związana bezpośrednio z ekspresją szeregu dobrze opisanych genów, ale wiemy również, że znamy jedynie mały fragment procesów zachodzących w organizmie i to głównie w tkankach liściowych. Ponadto zainteresowania badaczy reprezentujących nauki fizjologiczno-biochemiczno-genetyczne często koncentrują się na opisie roli poszczególnych genów, białek i procesów w typowych często w całości zsekwencjonowanych obiektach doświadczalnych, zaniebując fakt, że rośliny wykazują nierzadko swoistą specyfikę. Autorka najwyraźniej postanowiła wypełnić lukę w naszej wiedzy badając gatunki znane z ich odporności na stres metali ciężkich. W pracy doktorskiej mgr Sychty oceniono wrażliwość badanych gatunków wegetujących często w ściśle określonym otoczeniu w środowisku zanieczyszczonym metalami. Przedstawione eksperymenty mają przede wszystkim charakter badań podstawowych, ale zamysłem Autorki było aby uzyskane wyniki już na obecnym etapie prac mogły zainteresować praktyków.

Oceniana praca doktorska obejmuje 4 przedrukowane prace oryginalne wraz z kilkunasturowym streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz *Wprowadzeniem* do tematu pracy w języku angielskim obejmującym całość wykonanych prac. *Wprowadzenie* stanowi krótką część całości i donosi o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie.

Autorka w bardzo generalnym ujęciu charakteryzuje stan naszej aktualnej wiedzy i znaczenie problemu obecności metali ciężkich dla ochrony środowiska. W tej części pracy wiadomości zaczerpnięte są z wielu pozycji aktualnej światowej literatury, a w kilku przypadkach Doktorantka cytuje prace Zespołu, którego jest członkiem. Należy tutaj zaznaczyć, że Zespół prof. Kuty stworzył podstawy rozwoju konkretnego kierunku badań i ma znaczące osiągnięcia w tym zakresie. *Wprowadzenie* opisuje pokrótce reakcje roślin na oddziaływanie różnych metali ciężkich i w wyczerpujący sposób zestawiała dane literaturowe dotyczące reakcji roślin, koncentrując uwagę na procesie tolerancji stresu. Następnie omówiła badania dotyczących mechanizmów obronnych kontrolujących nadmiar metali. W tym fragmencie skupiła się w dużej mierze na mechanice procesów pobierania kationów dwuwartościowych, które mają decydujące znaczenie w oddziaływaniu na roślinę, a w szczególności dużo uwagi poświęciła procesom hiper(akumulacji). Fragment zapoznający czytelnika z mechanizmami pobierania metali jest dobrze wyważony i uzasadnia sens wykonanych badań. W szczególności jako ważny element pracy wyznaczono zoptymalizowanie metod ekspozycji komórki na Zn i Pb. Prace eksperymentalne zaplanowano na wybranym materiale i w określonych punktach czasowych ważnych dla przebiegu reakcji rośliny na stres. We *Wprowadzeniu* w mojej opinii, nieco zbyt skrótowo potraktowano rolę poszczególnych procesów fizjologicznych na poziomie enzymów odpowiedzialnych za transport do poszczególnych kompartmentów komórkowych i syntezie molekuł zabezpieczających przed stresem i odpowiedzialnych za kształtowanie odporności, bez zrozumienia których szczegółowe analizy nie dają się łatwo interpretować. Dość szczegółowo natomiast przeanalizowano zagadnienie tolerancji na stres metali ciężkich u spokrewnionych roślin w obrębie rodziny *Viola*, co jest centralnym tematem pracy doktorskiej. Temat ten jest tym bardziej frapujący, że wszystkie badane gatunki *Viola* posiadają nieco zbliżoną charakterystykę, a więc dobór materiału do badań można uznać za w pełni uzasadniony. Podsumowując tę część pracy można stwierdzić, że we *Wprowadzeniu* do pracy doktorskiej podobnie jak i w zaprezentowanych opublikowanych pracach Autorka wykazała się znajomością szerokiego fragmentu literatury. Omawiany temat został przedstawiony logicznie i w przejrzysty sposób uzasadnia celowość podjętych badań. Doktorantka wykazała się umiejętnością dostrzeżenia aktualnych, a niezbadanych obszarów i określenia problemu badawczego. Trafność tego wyboru potwierdza też rozpoznawalność czasopism, które wydrukowały wszystkie przedstawione prace. *Wprowadzenie* do tematu zakończone jest sześcioma (pomimo, że ostatni cel ma numer 7.) głównymi pytaniami/celami pracy. Ambitne cele pracy doktorskiej obejmują zarówno pytania podstawowe jak: związek pomiędzy ekspozycją na obecność metali i żywotnością komórek, ich zdolności do

akumulacji metali, wzrostu i wykształcania organów roślinnych oraz pytania bardziej szczegółowe jak: wykształcanie mechanizmów detoksyfikujących i natury procesów obumierania komórek w obliczu stresu (PCD) wraz z zaangażowaniem uczestniczącego w tym procesie enzymu (*caspase-like*).

Przedstawione prace oryginalne zostały opublikowane w ostatnich trzech latach, a dwie z nich w bieżącym roku. Cztery prace przedstawiono w trzech rozdziałach i w każdym z nich postawiono określone hipotezy badawcze.

Dwie najbardziej zbliżone tematycznie publikacje zgrupowano jako rozdział pierwszy (Chapter 1). W pracach tych starano się odpowiedzieć na pytania zadawane przez badaczy analizujących podobne zagadnienia czy właściwości komórek w zawieszynie odpowiadają tolerancji roślin. W pracach tych poszukiwano też odpowiedniego materiału badawczego. W rozdziale tym przedstawiono dwie prace opublikowane w *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* w 2017 roku (IF=0,718) i *Plant Physiology and Biochemistry* w roku 2018 (IF=3,404). W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką, a w jednej pracy także autorką korespondencyjną. Warto zaznaczyć, że obie prace zostały już zacytowane (Web of Science), i obie dotyczą ekspozycji kultur zawieszinowych na działanie metali ciężkich. Jako najważniejszy cel wyznaczono opis warunków oddziaływania i akumulacji jonów metali przez komórki pięciu gatunków/genotypów *Viola* o zróżnicowanej tolerancji na ten czynnik stresowy. W pierwszym etapie badań określono warunki ekspozycji na jony metali w zakresie stężeń 0,0-1000 μM i żywotność komórek uzyskanych z testowanego materiału roślinnego. W tym miejscu chciałbym zadać pytanie czym kierowano się podając stężenia w μM zamiast w mM? W opisanych badaniach wykorzystano test „alamarBlue” i zadbano o odpowiednie pH zawiesziny. Zabieg ten okazał się kluczowy i gwarantujący wykluczenie uzyskiwania artefaktów. Pomiar akumulacji badanych metali dokonywano metodą spektrometrii masowej (AAS), a dystrybucję metali przy zastosowaniu mikroskopu transmisyjnego z analizą ugięcia promieni rentgenowskich (X-ray). Uzyskane wyniki wskazują na wysoką tolerancję wszystkich badanych gatunków/genotypów i ich zdolność do hiperakumulacji zarówno Zn jak i Pb. Oba metale kumulowały się silnie w ścianach komórkowych i w wakuolach, nie zaburzając w istotny sposób żywotności komórek. W rezultacie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że opisywane właściwości fizjologiczne są typowe dla szeregu gatunków *Viola*. Przedyskutowanie wyników obu publikacji w jednym rozdziale wydaje się mieć duży sens naukowy pomimo, że pierwsza praca dotyczy tylko jonów Pb, a druga zarówno Pb jak i Zn. Istotne szczegóły metodyczne (stężenia, czas ekspozycji, pH zawiesziny, techniki badawcze) wypracowane w pierwszej pracy znajdują zastosowanie w analizie obu metali i

pozwalają na szerszą interpretację wyników i dokonanie pewnych uogólnień dotyczących się tematu odporności roślin z rodziny *Viola*. W toku dyskusji można było stwierdzić przystosowanie gatunków *Viola* do wegetacji w warunkach zanieczyszczenia środowiska i przybliżyć mechanizm tolerancji na poziomie komórkowym, co stworzyło nadzieje na uzyskanie wyprowadzonych linii odpornych na testowane metale.

Na drugi rozdział (Chapter 2) składa się jedna praca opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie *Plant Physiology and Biochemistry* (IF=3,404), w której Doktorantka jest zarówno pierwszą jak i korespondencyjną autorką. W publikacji wypracowano i opisano kolejne etapy regeneracji roślin z komórek z zawiesin komórkowych traktowanych wysokimi stężeniami Zn i Pb. Co warto podkreślić, praca ta stanowi kolejny konsekwentny etap badań rozpoczęty i opisany w pierwszym rozdziale. Zastosowany materiał jak i stężenia soli metali są takie same. Kolejne etapy prac obejmują uzyskanie kalusa i wyprowadzenie regenerantów zdolnych do wegetacji w warunkach polowych. Przy pomocy markerów ISSR stwierdzono także niewielkie zróżnicowanie genetyczne regenerantów w porównaniu do populacji z której uzyskano komórki zawiesinowe. Ponadto komórki uzyskane z regenerantów wyprowadzonych z komórek odpornych na Pb utrzymywały tę właściwość, a nawet cecha ta była wzmocniona, natomiast w przypadku komórek traktowanych Zn właściwość ta pozostawała na podobnym poziomie.

Do rozdziału trzeciego (Chapter 3) zakwalifikowano pracę opublikowaną w *Environmental and Experimental Botany* w 2020 (IF=3,712). Także w tej pracy Doktorantka jest zarówno pierwszą jak i korespondencyjną autorką. Publikacja poświęcona jest analizie procesu PCD komórek traktowanych solami metali. Zawiesinę komórek *V. tricolor* użyto jako modelu badawczego i zastosowano ponownie te same co we wcześniejszych pracach stężenia i czas ekspozycji. Z zastosowaniem metody TUNEL określono intensywność procesu PCD, a metodą *westernblott* określono aktywność inhibitora roślinnego enzymu określanego jako *caspase-like*. Stwierdzono jednoznacznie, że w porównaniu do materiału kontrolnego proces PCD występuje częściej w obecności soli metali czemu towarzyszy podwyższona aktywność proteaz enzymu *caspase-like*. Wyniki te wskazują na istotną rolę aktywności odpowiedniej proteazy w komórkach poddanych stresowi metali ciężkich. Wykazano również, że jony ołowiu oddziałują silniej niż jony cynku na częstość występowania PCD i wyższą aktywność proteaz *caspase-like*.

Wszystkie pomysłowo przeprowadzone serie doświadczalne opisane w pracach zaowocowały dużą ilością wyników, umożliwiły wyciągnięcie wielu wniosków, dokonanie pewnych uogólnień oraz zaproponowanie zmian wybranych parametrów fizjologicznych,

które mogą charakteryzować materiał roślinny poddany oddziaływaniu stresu metali ciężkich w warunkach naturalnych. Całość zwięźczy ogólna dyskusja wyników uzyskanych w poszczególnych publikacjach. W rozdziale *Dyskusja* Autorka przeanalizowała uzyskane wyniki na tle innych prac z podobnego zakresu. Badań wykonanych na innym materiale, analizujących omawiany problem jest stosunkowo dużo i w tej części pracy Doktorantka wykazała się ostrożnym i krytycznym podejściem do przedstawionych rezultatów. *Dyskusja* dostarcza czytelnikowi dużej porcji informacji i jest rzeczowa. Wykonane prace będą inspiracją do dalszych prac i badań. Całość opisanych prac składających się na spójną całość ma znaczenie poznawcze, ale też jest ważna z punktu widzenia praktycznego. Nowa wiedza wynikająca z czterech opublikowanych prac pozwala nam zrozumieć szereg detali dotyczących oddziaływania nadmiaru metali ciężkich na organizmy żywe i stwarza perspektywy pozwalające na patrzenie z optymizmem na proces poszukiwania roślin odpornych i wykorzystaniu ich do ograniczenia oddziaływania metali skażających środowisko jak i fitoremediacji.

W rozdziałach „Materiał i Metody” poszczególnych opublikowanych prac znajdujemy w miarę szczegółowy opis materiału i metod badawczych. Z zaciekawieniem czyta się te fragmenty prac, tym bardziej, że paleta zastosowanych metod jest bogata. Szczegółowość opisów jest podyktowana wymaganiami redakcji poszczególnych czasopism. Autorka udokumentowała potrzebę stosowania pewnych modyfikacji, ułatwiając tym samym pracę ewentualnym kontynuatorom doświadczeń. Próba statystyczna na jakiej wykonano badania upoważnia do wyciągnięcia jednoznacznych wniosków.

Opisywana praca odbiega w kilku punktach od standardowych prac doktorskich. W pierwszej części koncentruje się na zagadnieniach typowo metodycznych, a w drugiej ma charakter fizjologiczno-biochemiczny. Wyniki i rezultaty są przedstawione w sposób skondensowany. Doktorantka jest współautorem kilku innych prac oryginalnych i najwyraźniej zdobyła już pewne doświadczenie, które zaowocowało w trakcie zestawiania publikacji wybranych do pracy doktorskiej. Na uwagę zasługuje też fakt, że rozdziały *Wprowadzenia* i *Dyskusji* napisane są zwięzłym, treściwym i poprawnym językiem, co bardzo ułatwia lekturę. *Dyskusja* unaocznia jak ogromną pracę wykonała Doktorantka i jak uzyskane wyniki mogą być jeszcze eksploatowane, i to w szerszym kontekście, niekoniecznie tylko w analizie wybranego materiału roślinnego i analizowanego czynnika stresowego. W moim przekonaniu zebranie w jednym dokumencie wszystkich faktów jest istotnym osiągnięciem rozprawy. Obserwacje te mogą wprowadzić istotne nowe elementy do naszej wiedzy na temat adaptacji roślin do zmiennych warunków środowiskowych. Przedstawione

badania umożliwiają znacznie dogłębniejszą interpretację wyników dzięki równoległym pomiarom na podobnym materiale, co stanowi o wartości eksperymentów. Zarówno aktualność analizowanego tematu jak i jego wartość praktyczna stanowią o wartości całego zamierzenia badawczego. Warty podkreślenia jest konsekwentna realizacja poszczególnych etapów prac i ich publikacja w czasopiśmie o dużym zasięgu międzynarodowym. Wszystkie wypunktowane tu walory pracy doktorskiej wskazują, że jest ona ponadprzeciętna i dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny o rozważenie wyróżnienia pracy doktorskiej pani mgr Klaudii Sychty.

Sprecyzowane w pracy wnioski pokazują ogólny wkład Doktorantki w postęp w badaniach nad badanymi gatunkami jak również mają zastosowanie w analizie wpływu na innym materiale roślinnym. Opisane powyżej spostrzeżenia dotyczące ocenianej pracy skłaniają mnie do sformułowania następujących pytań pod adresem Doktorantki:

1. Znaczna część dyskusji toczy się wokół problemów zmiany wybranych parametrów fizjologicznych w zależności od stosowanego stresu metali ciężkich. W jakim stopniu na podstawie przedstawionych wyników doświadczeń można spekulować na temat różnic lub podobieństw reakcji rośliny na inne metale ciężkie?

2. Czy w kontekście przedstawionych wyników i danych literaturowych można dyskutować na temat podobieństwa reakcji gatunków *Viola* na inne czynniki stresowe?

Podsumowanie:

Oceniana praca cenzusowa zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich i spełnia wszelkie wymagania formalne i merytoryczne określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, stawiane tego typu opracowaniom. Doktorantka wykonała badania wrażliwości roślin z rodziny *Viola* na stres metali ciężkich, a wyniki bez wątpliwości będą w przyszłości eksploatowane także przez badaczy zajmujących się innymi roślinami. Wykonała ogromną ilość analiz, które stanowią znaczący wkład w postęp badań dotyczących oceny tolerancji roślin na ten typ stresu abiotycznego. Autorka wykazała się wiedzą, konsekwencją, skrupulatnością i przygotowaniem do prowadzenia prac badawczych. W związku z tym z pełnym przekonaniem stawiam wnioski do Rady Dyscypliny Nauki biologicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczeniu mgr Klaudii Sychty do dalszych etapów przewodu doktorskiego i proponuję rozważenie wyróżnienia Jej pracy doktorskiej.

/-/ Zbigniew Miszański