

Prof. dr hab. Zbigniew Miszalski
Instytut Botaniki PAN
w Krakowie

Kraków, 4.09.2023

R E C E N Z J A

rozprawy doktorskiej mgra Bartosza Plucińskiego pt. „Mikroewolucyjne i biochemiczne aspekty tolerancji *Chlamydomonas reinhardtii* na toksyczne stężenia jonów miedzi”

Praca doktorska mgra Bartosza Plucińskiego koncentruje się na zjawisku odporności *Chlamydomonas reinhardtii* na stres obecności jonów miedzi. 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 odporne na ten typ stresu są jeszcze stale 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, zaniehbując fakt, że rośliny wykazują nierzadko swoistą specyfikę. Niewiele wiadomo na temat ewolucji układów odpornościowych. Autor pracował nad wypełnieniem tej luki w naszej wiedzy badając gatunek już wcześniej badany w aspekcie odporności na stres metali ciężkich. W pracy doktorskiej mgra Plucińskiego oceniono wrażliwość wybranych linii utrzymywanych w ściśle określonych warunkach w obecności jonów miedzi. Przedstawione eksperymenty mają przede wszystkim charakter badań podstawowych, ale uzyskane dane w aspekcie mechanizmu odporności roślin naczyniowych mogą zainteresować praktyków.

Oceniana praca doktorska obejmuje trzy przedrukowane prace oryginalne wraz z kilkustronicowym *Wstępem* do tematu pracy w języku polskim, obejmującym całość wykonanych prac, a także wyszczególnione *Cele rozprawy* oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. *Wstęp* stanowi bardzo krótką część całości i donosi o aktualnym stanie wiedzy w omawianej dziedzinie. Autor w bardzo generalnym ujęciu charakteryzuje stan

naszej aktualnej wiedzy i znaczenie problemu obecności metali ciężkich w środowisku. W tej części pracy wiadomości zaczerpnięte są z wielu pozycji aktualnej światowej literatury, a w kilku przypadkach Doktorant cytuje prace Zespołu, którego jest członkiem. Należy tutaj zaznaczyć, że Zespół w którym pracuje ma istotny udział w rozwoju konkretnego kierunku badań. We *Wstępie* Autor zestawiał najważniejsze dane literaturowe dotyczące reakcji na oddziaływanie różnych metali ciężkich koncentrując uwagę na procesie tolerancji stresu. Omówił też badania dotyczące mechanizmów obronnych kontrolujących metabolizm w warunkach nadmiaru jonów metali. Prace eksperymentalne wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej zaplanowano na wybranym materiale i w określonych punktach czasowych ważnych dla przebiegu reakcji na stres. W mojej opinii, zbyt skrótowo potraktowano rolę poszczególnych procesów fizjologicznych na poziomie enzymów odpowiedzialnych za transport do poszczególnych kompartmentów komórkowych i syntezie enzymów zabezpieczających przed stresem i odpowiedzialnych za kształtowanie odporności, bez zrozumienia których szczegółowe analizy nie dają się łatwo interpretować. Podobnie przy omawianiu efektów metabolicznych wywoływanych obecnością jonów metali ciężkich nie dokonano rozróżnienia pomiędzy bezpośrednimi i pośrednimi efektami, co w rozważaniach na temat ewolucji odporności zapewne może mieć istotne znaczenie, a co zostało zauważone w poszczególnych publikacjach zarówno tych wchodzących w skład pracy doktorskiej jak i innych publikacjach Doktoranta. Podsumowując tę część pracy można stwierdzić, że we *Wstępie* do pracy doktorskiej podobnie jak i w zaprezentowanych opublikowanych pracach Autor wykazał się znajomością odpowiedniego fragmentu literatury. Omawiany temat został przedstawiony logicznie i w przejrzysty sposób uzasadnia celowość podjętych badań. Doktorant wykazał się umiejętnością dostrzeżenia aktualnych a niezbadanych obszarów i określenia problemu badawczego. *Wstęp* do całości zakończony jest trzema głównymi pytaniami/**celami pracy**, spośród których pierwszy jest sformułowany jak wyjaśnienie zjawiska. Trzy prace przedstawiono w rozdziale 5 (błąd w tytule) i w każdej z nich postawiono określone hipotezy badawcze. Pierwsza przedstawiona praca oryginalna została opublikowana w 2018 roku, a szczególną uwagę zwraca **praca trzecia opublikowana w czasopiśmie o współczynniku rozpoznawalności IF=5,19**.

Pierwsza praca (nr 1) została opublikowana w *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* i stanowi punkt wyjściowy do całości, gdyż opisuje uzyskanie i charakterystykę kultur o podwyższonej tolerancji na jony miedzi, które były przedmiotem dalszych prac. Już na tym etapie prac można było stwierdzić, że mechanizmy adaptacyjne wiążą się z ochroną aparatu fotosyntetycznego lub kontrolują poziom jonów metalu w przedziałach

komórkowych. Cel pracy został osiągnięty, opublikowany i uzyskano odpowiedni materiał badawczy do dalszych prac. Pozwolę sobie jednakże zauważyć, że w abstrakcie tej pracy nie zachowano porządku redakcyjnego. Nie jest dla mnie jasne wg jakiej reguły pewne określenia są zamieszczane w cudzysłowie, na jakiej zasadzie stosowano font „italic” i dlaczego w całej pracy stosuje się pełną nazwę gatunkową badanego szczepu. Jako najważniejszy cel pracy wyznaczono opis wrażliwości linii *C. reinhardtii* o zróżnicowanej tolerancji na czynniki stresowe po ekspozycji zadanych stężeń jonów miedzi. Do szacunkowej szybkiej oceny wzrostu kultur poprzez ocenę zawartości chlorofilu zastosowano pomiar maksymalnej fluorescencji chlorofilu *a* (F_M), ale nie wiemy czy zawartość podana jest w jednostkach objętości próbki czy komórek. Aktywność fotochemiczną (a nie fotosyntetyczną) określono metodą pomiarów potencjalnej wydajności kwantowej PSII przy świetle wysycającym 600-680 nm o intensywności $5000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ale nie podano jak dobrano tę intensywność, co w przypadku testowania zawiesin komórkowych może mieć istotne znaczenie. Przebadano także wrażliwość uzyskanych populacji na jony miedzi w zależności od intensywności światła oraz reakcje tych kultur na obecność wysokiego stężenia jonów kadmu i cynku. W toku dyskusji można było wnioskować o przystosowaniu wyprowadzonych linii do rozwoju w warunkach zanieczyszczenia środowiska i przybliżyć mechanizm tolerancji na poziomie komórkowym. W dość jednoznaczny sposób wykazano, że toksyczność jonów miedzi jest powiązana z procesem generowania ROS. W publikacji tej Doktorant jest pierwszym autorem i co warto zaznaczyć praca została już kilkakrotnie zacytowana (Web of Science).

Jako kolejną **pracę (nr 2)** przedstawiono opublikowaną w 2021 roku również w czasopiśmie *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, w której Doktorant jest zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem. Publikacja jest kontynuacją poprzedniej i przedstawia kolejne analizy z zastosowaniem podobnego materiału i metod badawczych. Praca ta stanowi kolejny konsekwentny etap badań. Z poprzednio uzyskanych i przebadanych populacji wyizolowano pojedyncze komórki, po których namnożeniu przeprowadzono podobne testy jak poprzednio. Ten stosunkowo prosty trik doświadczalny byłby znacznie trudniejszy do przeprowadzenia w badaniach na organizmach tkankowych. Zastosowany materiał jak i stężenia jonów metali miedzi były takie same, co pozwoliło na dywagacje dotyczące zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego i możliwości kombinacji zmian w poszczególnych allelach genów w procesie mikroewolucji, a do analizy danych koniecznym było zastosowanie dość wyrafinowanych testów statystycznych. Uzyskane wyniki pozwoliły dedukować co do zmian w procesie pobierania i detoksyfikacji, a także związku z procesem generacji ROS i oddziaływaniem na podziały komórkowe. Zasadnicza część rozważań

koncentruje się wokół oddziaływania na funkcjonowanie systemu antyoksydantów i chloroplastowego łańcucha transportu elektronów. Materiały przedstawione w publikacji wzbogacają dane dotyczące wzrostu uzyskanych populacji przedstawione w suplemencie.

Trzecia praca (nr 3) przedstawiona w dysertacji opublikowana została w *Environmental Science and Pollution Research* w 2023. Także w tej pracy Doktorant jest zarówno pierwszym jak i korespondencyjnym autorem. Publikacja poświęcona jest analizie poziomu szeregu składników uczestniczących w reakcji komórek na stres jonów miedzi w liniach *C. reinhardtii*, które były przedmiotem poprzednich prac, a w kilku seriach doświadczalnych dwóch dodatkowych linii. Badania skupiły się na aktywności peroksydazowej i niefotochemicznemu wygaszaniu. Z zastosowaniem metody HPLC oznaczano lipidy prenylowe, a parametry fluorescencyjne przy pomocy Fluorcam FC 800-0 z zastosowaniem niższej niż poprzednich pracach intensywności światła wysycającego ustalonej na wysokości $2600 \mu\text{moli m}^{-2}\text{s}^{-1}$. W pracy przedstawiono między innymi zmiany zawartości chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w poszczególnych testowanych populacjach i to zarówno w świetle $50 \mu\text{moli m}^{-2}\text{s}^{-1}$ jak i $10 \mu\text{moli m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Czy Autor nie zgodziłby się z tezą, że bardziej informatywne dla zrozumienia dostosowania aparatu fotosyntetycznego do warunków stresu byłoby przedstawienie tych wartości jako stosunek $\text{chl}a/\text{chl}b$ w poszczególnych wariantach doświadczeń? Wartość stosunku $\text{chl}a/\text{chl}b$ pozwala określać w jakim stopniu aparat fotosyntetyczny dostosowany jest do warunków wysokiej intensywności światła. W pracy wykazano, że ekspozycja komórek na obecność jonów Cu zwiększa poziom tokoferolu oraz plastochinonu i obniża zawartość plastochinonu utlenionego. Zarówno te zmiany jak i zmiany aktywności peroksydazy pozwalają sądzić, że tolerancja na obecność jonów miedzi u określonych linii *C. reinhardtii* jest powiązana z aktywnością łańcucha transportu elektronów i zdolnością wygaszania niefotochemicznego. Opisane zmiany porządkują naszą wiedzę na temat przystosowywania się aparatu fotosyntetycznego do warunków skażonego środowiska.

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 *Podsumowanie* Autor dostarczył kilka dodatkowych informacji pozwalających zrozumieć sekwencję poszczególnych poczynionych kroków w trakcie prowadzenia badań. Dyskusje wyników zamieszczone w poszczególnych

pracach dostarczają czytelnikowi dużej porcji informacji i są rzeczowe, a Doktorant wykazał się ostrożnym i krytycznym podejściem do przedstawionych rezultatów. Całość opisanych prac składających się na spójną całość ma duże znaczenie poznawcze. Nowa wiedza wynikająca z trzech opublikowanych prac pozwala nam zrozumieć szereg detali dotyczących oddziaływania nadmiaru metali ciężkich na organizmy żywe.

W rozdziałach „*Material i Metody*” poszczególnych opublikowanych prac znajdujemy w miarę szczegółowy opis materiału i metod badawczych. Z zaciekawieniem czyta się te fragmenty prac. Szczegółowość opisów jest podyktowana wymaganiami redakcji poszczególnych czasopism. Testy statystyczne zastosowane w pracach są właściwie dobrane i upoważniają do wyciągnięcia jednoznacznych wniosków.

Całość opisywanej pracy doktorskiej w **pierwszej części koncentruje się na problemie dobrania właściwego do badań materiału, a w drugiej ma charakter fizjologiczno-biochemiczny**. Wyniki i rezultaty są przedstawione w sposób skondensowany. Doktorant jest współautorem szeregu innych prac oryginalnych i najwyraźniej zdobył już pewne doświadczenie, które zaowocowało w trakcie zestawiania publikacji wybranych do pracy doktorskiej. Na uwagę zasługuje też fakt, że rozdziały *Wstęp* i *Podsumowanie* napisane są **zwięzłym, treściwym i poprawnym językiem**, co bardzo ułatwia lekturę. *Podsumowanie* unaocznia 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 trzech prac 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 **dogłębną interpretację wyników dzięki równoległym pomiarom na podobnym materiale, co stanowi o wartości eksperymentów**. Wartym podkreślenia jest fakt **udziału Doktoranta w szeregu innych jedynastu (11) publikacji** dotyczących zbliżonych zagadnień, które zostały zacytowane dotychczas już 117 razy (WEB of Science).

Sprecyzowane w pracy wnioski pokazują ogólny wkład Doktoranta w postęp w badaniach nad opisywanym gatunkiem 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 Doktoranta:

1. Znaczna część dyskusji toczy się wokół problemów zmiany wybranych parametrów fizjologicznych w zależności od stosowanego natężenia stresu obecności jonów miedzi. 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 mikroewolucji gatunków roślin naczyniowych 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. Doktorant wykonał badania tolerancji kultur *Chlamydomonas reinhardtii* na stres nadmiaru jonów miedzi, a wyniki bez wątpienia będą w przyszłości eksploatowane także przez badaczy zajmujących się innymi gatunkami. Wykonał dużą ilość analiz, które stanowią znaczący wkład w postęp badań dotyczących oceny tolerancji organizmów fotosyntetyzujących na ten typ stresu abiotycznego. Autor wykazał się wiedzą, konsekwencją, skrupulatnością i przygotowaniem do prowadzenia prac badawczych. W związku z tym z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgra Bartosza Plucińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/-/ Zbigniew Miszański