



Lublin, 23.12.2015 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. MAGDALENY ZAPALSKIEJ

pt. **„Analiza ekspresji wybranych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w sadzonkach dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) traktowanych jonami kadmu”**

(promotor: prof. dr hab. Krzysztof Kowalczyk, promotor pomocniczy: dr Michał Nowak)

Metale ciężkie stanowią jedno z najpowszechniejszych i najniebezpieczniejszych zanieczyszczeń środowiska przyrodniczego człowieka. Ich negatywny wpływ na organizmy żywe potwierdzony został w wielu publikacjach naukowych. Pomimo tak wielu prac poświęconych tej tematyce, wciąż istnieje jednak potrzeba oceny wpływu metali ciężkich na organizmy żywe, w tym rośliny, szczególnie w sytuacji poszukiwania nowych rozwiązań eliminacji tych niebezpiecznych pierwiastków ze środowiska. Wśród metali ciężkich – kadm (Cd) – jest jednym z najniebezpieczniejszych. Ze względu na swoją mobilność oraz niewielkie stężenie potrzebne do wywołania efektów toksyczności metal ten powinien podlegać szczególnej uwadze. Niezmiernie ważne są więc badania, które nie tylko pozwolą na poznanie zagrożeń (efektu toksycznego) powodowanego przez ten metal ale również będą zmierzały do poszukiwania nowych rozwiązań, które wpłynęłyby na zmniejszenie ryzyka związanego z jego obecnością w środowisku. Fitostabilizacja metali ciężkich stanowi w tym zakresie interesujące rozwiązanie. Nie jest metodą kosztowną a poprzez odpowiednie dobrane roślin uzyskuje się efekt unieruchomienia zanieczyszczeń na szereg lat.

Biorąc pod uwagę powyższe, temat przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej doskonale wpisuje się w aktualne trendy badawcze i potrzeby związane z ochroną środowiska. Tematyka podjęta przez Doktorantkę, tj. analiza ekspresji wybranych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w sadzonkach dębu szypułkowego pod wpływem działania kadmu, jak również wybór optymalnej metody izolacji RNA przydatnej do analizy transkryptów, nie została dotychczas wyczerpująco opisana w literaturze przedmiotu. Powyższe badania w połączeniu z oceną biochemiczną efektu toksycznego powodowanego przez kadm dają nie tylko pełny obraz potencjalnego ryzyka ale również wskazują na potencjalne fitostabilizacyjne zdolności dębu szypułkowego w odniesieniu do kadmu. Może to mieć duże znaczenie przy wyborze gatunków drzew używanych do zalesiania terenów skażonych przez ten niebezpieczny metal ciężki.

Praca doktorska zrealizowana została w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydziału Agrobioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Kowalczyka. Rolę promotora pomocniczego pełnił pan dr Michał Nowak.



Dysertacja obejmuje 133 strony, zawiera 20 rysunków, 22 tabele oraz 219 pozycji literaturowych. Rozprawa ma klasyczny układ. Zawiera typowe dla pracy doktorskiej rozdziały, które można podzielić na część literaturową i część badawczą (doświadczalną). Część badawcza stanowi około 70% całości rozprawy doktorskiej. Dysertacja mgr inż. Magdaleny Zapalskiej napisana jest poprawnym językiem polskim, z gruntownym zrozumieniem opisywanej tematyki oraz dużą starannością edytorską (w większości przypadków). Dotyczy to zarówno strony językowej, jak i graficznej dysertacji.

Na początku pracy znajduje się wykaz skrótów. Część literaturowa składa się z krótkiego wprowadzenia do tematu dysertacji. Dalszą część pracy stanowi cel badań. Na część doświadczalną składają się metodyka badań oraz omówienie wyników a następnie dyskusja. Rozprawę zamykają: rozdział z wnioskami, wykaz literatury oraz streszczenie dysertacji w języku polskim i angielskim, który umożliwia zapoznanie się z głównymi тезami pracy, a szczególnie z wynikami i wnioskami.

„Wstęp i przegląd literatury” obejmuje jeden rozdział, bez podziału na podrozdziały. W rozdziale tym autorka przedstawiła w skrócie informacje na temat ekologii dębu szypułkowego, korzyści wynikających z wykorzystania drzew do fitostabilizacji metali ciężkich, źródeł i zagrożeń związanych z obecnością jonów kadmu w środowisku oraz ich wpływie na organizmy żywe. Rozdział ten napisany został trochę chaotycznie. Moim zdaniem tę część pracy należało by podzielić na podrozdziały, które wprowadziłyby większą przejrzystość i usystematyzowały informacje prezentowane przez Doktorantkę. Jako zalety należy podkreślić, że rozdział „Wstęp i przegląd literatury” przygotowany został w oparciu o aktualną literaturę (większość pozycji opublikowana została po 2005 roku) oraz głównie w oparciu o literaturę anglojęzyczną opublikowaną w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Wskazuje to na bardzo dobre opanowanie zagadnienia przez doktorantkę. Ponadto uważam, że autorce udało się trafnie wyselekcjonować z bardzo obszernej literatury przedmiotu i przedstawić w zwartej formie najważniejsze zagadnienia odnoszące się do tematu rozprawy.

Po „Wstępie i przeglądzie literatury” znajduje się cel pracy (Rozdział 2), gdzie autorka w sposób syntetyczny przedstawiła główne założenia dysertacji. Celem pracy doktorskiej było:

1. Zbadanie wpływu jonów kadmu na poziom mRNA wybranych genów kodujących Cu/Zn-SOD, CAT oraz APX w liściach dębu szypułkowego oraz wybór optymalnej metody izolacji RNA przydatnej do analizy transkryptów.
2. Ocena wpływu jonów kadmu na aktywność głównych enzymów uczestniczących w odpowiedzi na stres oksydacyjny: dysmutazy ponadtlenukowej, katalazy oraz peroksydazy askorbinianowej.
3. Analiza zależności pomiędzy zmianami w ekspresji badanych genów na poziomie transkryptu, a zmianami aktywności kodowanych przez nie białek.
4. Określenie wpływu regionu pochodzenia na akumulację kadmu w tkankach sadzonek dębu szypułkowego oraz odpowiedź ich systemu antyoksydacyjnego.
5. Określenie zależności między reakcją systemu antyoksydacyjnego a obserwowanymi uszkodzeniami wywołanymi ekspozycją na kadm.





Nie mam wątpliwości, że sformułowane cele pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Zapalskiej należy uznać za ambitne, na miarę wyzwania naukowego o istotnym znaczeniu poznawczym. Po zapoznaniu się z rozprawą dokorską stwierdzam, że postawiony cel został osiągnięty.

Część doświadczalną dysertacji otwiera rozdział „Materiał badawczy” (Rozdział 3), w którym Doktorantka krótko scharakteryzowała pochodzenie sadzonek dębu szypułkowego wykorzystanego w badaniach. W następnej części rozprawy przedstawiona została już bardziej szczegółowo metodyka badań. Opisane zostało doświadczenie oraz wykorzystane metody analityczne. Eksperymenty zostały poprawnie zaplanowane i przeprowadzone.

Wyniki badań zostały przedstawione w rozdziale 4, składającym się z pięciu podrozdziałów. Podrozdział 4.1 dotyczy oceny wpływu stresu abiotycznego na stopień uszkodzenia roślin oraz akumulację jonów kadmu w liściach, łodygach i korzeniach dębu w zależności od ich koncentracji oraz pochodzenia roślin. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono współczynniki biokoncentracji kadmu w poszczególnych organach rośliny. Autorka zaobserwowała, że sadzonki dębu szypułkowego traktowane chlorkiem kadmu przejawiały symptomy stresu w postaci chlorozy oraz brązowienia liści. Stopień nasilenia objawów stresu był zróżnicowany w zależności od pochodzenia roślin doświadczalnych oraz stężenia jonów kadmu w roztworze. Sadzonki dębu szypułkowego o odmiennym regionie pochodzenia różniły się zdolnościami do akumulacji kadmu w swoich organach. W kolejnej części pracy (Podrozdział 4.2) Doktorantka przetestowała pięć procedur izolacji RNA. Izolację RNA przeprowadzono metodą z wykorzystaniem bromku cetylotrimetyloamonu (CTAB) i LiCl według Le Provost i in. (2007), Gambino i in. (2008), za pomocą TRIzol, a także zastosowano dwie kombinacje metod: połączenie izolacji za pomocą TRIzol i komercyjnego zestawu do izolacji RNA oraz połączenie metody z wykorzystaniem CTAB wg Zhao i in. (2012) z izolacją za pomocą TRIzol. Autorka stwierdziła, że zastosowanie podczas izolacji RNA z liści dębu szypułkowego etapu selektywnej precypitacji z wykorzystaniem LiCl oraz ekstrakcji mieszaniną chloroform-alkohol izoamylowy pozwala na uzyskanie wolnych od zanieczyszczeń i wysokiej jakości preparatów RNA.

W ramach kolejnych badań zidentyfikowano sekwencje kodujące dysmutazy ponadtlenkowe, katalazę i peroksydazę askorbinianową (Podrozdział 4.3), dokonano wyboru genu referencyjnego oraz określono wpływ jonów kadmu na ekspresję genów kodujących miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenkową (Cu/Zn-SOD), peroksydazę askorbinianową (APX) i katalazę (CAT). Wpływ jonów kadmu na ekspresję genów zależał od ich stężenia oraz rodzaju genu. Doktorantka zaobserwowała, że ekspresja analizowanego genu kodującego cytoplazmatyczną APX ulega indukcji po traktowaniu jej jonami kadmu podczas gdy ekspresja analizowanych genów kodujących CAT i Cu/Zn-SOD ulega inhibicji.

Ostatni podrozdział rozdziału „Wyniki” dotyczy oceny wpływu kadmu na właściwości biochemiczne dębu szypułkowego. Doktorantka określiła zawartość białka w liściach sadzonek oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy askorbinianowej (APX) i katalazy (CAT). Badała również peroksydację lipidów. Stwierdziła, że peroksydaza askorbinianowa oraz dysmutaza ponadtlenkowa stanowią pierwszą barierę ochronną w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany obecnością jonów kadmu. Istotną rolę w ograniczeniu negatywnych skutków dłuższej ekspozycji sadzonek dębu szypułkowego na jony kadmu pełniła katalaza. Na podkreślenie zasługuje fakt, że poziom transkryptów badanych genów nie korespondował ze



zmianami aktywności enzymatycznej, co wskazuje na odmienną regulację ekspresji pozostałych genów kodujących badane enzymy oraz udział ich innych izoform w odpowiedzi na stres wywołany przez jony kadmu.

Dyskusja wyników opracowana została jako oddzielny rozdział (Rozdział V). W rozdziale tym Doktorantka dokonała szczegółowego porównania własnych wyników z wynikami uzyskiwanymi przez innych autorów. Rozdział oparty jest – podobnie jak wstęp i przegląd literatury – głównie na pracach nowych i anglojęzycznych. Rozdział ten przygotowany został poprawnie, choć w wielu miejscach zabrakło mi próby wyjaśnienia obserwowanych zjawisk czy też zaproponowania mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane zjawiska.

Ostatnią główną część pracy stanowią „Wnioski”. W jedenastu punktach doktorantka sprawnie podsumowała przeprowadzone badania. Choć podobnie jak w przypadku dyskusji zabrakło mi w niektórych miejscach (np. wniosek 11) próby wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane zjawisko.

Za szczególne osiągnięcia Doktorantki uważam:

1. wykazanie zróżnicowanej akumulacji jonów kadmu przez sadzonki o różnym pochodzeniu,
2. przetestowanie szeregu metod izolacji RNA i zaproponowanie najskuteczniejszej metody dla dębu szypułkowego,
3. określenie wpływu jonów kadmu na ekspresję genów kodujących miedziowo-cynkową dysmutazę ponadtlenkową (Cu/Zn-SOD), peroksydazę askorbinianową (APX) i katalazę (CAT).
4. wykazanie braku zależności między aktywnością enzymatyczną a poziomem transkryptów badanych genów, co może wskazywać na odmienną regulację ekspresji pozostałych genów kodujących badane enzymy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest przykładem bardzo dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Niestety z obowiązku recenzenta muszę również wskazać na błędy i nieścisłości.

1. Opis wyników zaczyna się od rozdziału dotyczącego stresu abiotycznego, podczas gdy dyskusja i wnioski rozpoczynają się od dyskusji na temat metod izolacji RNA. Według mnie logicznym byłoby w dyskusji podążanie za logiką przyjętą we wcześniejszym rozdziale. Wniosek do podrozdziału pierwszego w opisie wyników znalazł się na ostatniej pozycji we „Wnioskach”.
2. Materiały i metody badań:
  - Jeżeli jony  $\text{Cd}^{2+}$  zostały wprowadzone do roztworu jako  $\text{CdCl}_2$ , do roztworu poza jonami kadmu wprowadzono również jony  $\text{Cl}^-$ . Czy nie powinna zostać przeprowadzona również kontrola dla samych jonów  $\text{Cl}^-$ ?
  - Czym doktorantka kierowała się wybierając 7-dobowy okresu badań?
  - Uzasadnienie wybranego do badań stężenia jonów kadmu powinno zostać umieszczone przy opisie eksperymentu.





- Zbyt ogólnie opisana została część dotycząca oznaczania jonów kadmu metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej. Zabrakło ważnych z punktu widzenia analitycznego informacji, takich jak limit detekcji, odzysk analitu, itd.
- 3. Pomimo, że rozdziały 4 i 5 przedstawiają kompleksowe badania związane z wpływem jonów kadmu na stres abiotyczny i ich bioakumulację przez roślinę, nie wszystkie kwestie związane z omawianym tematem zostały wyczerpująco wyjaśnione. W szczególności:
  - Zabrakło mi informacji/wyjaśnienia skuteczności akumulacji jonów kadmu przez dąb szypułkowy na tle innych roślin (badań innych autorów),
  - Doktorantka bardzo powierzchownie wyjaśniła zróżnicowaną zdolność do akumulacji jonów kadmu przez rośliny różnego pochodzenia. Moim zdaniem jest to bardzo ważna obserwacja i powinna zostać bardziej zaakcentowana w dyskusji czy też we wnioskach.
  - Jeżeli zamiarem autorki jest wykorzystanie dębu szypułkowego w fitoremediacji, to czy negatywny wpływ kadmu na rośliny nie jest barierą, która ograniczałaby jego wykorzystanie. Zwykle rośliny, które wykorzystywane są w fitoremediacji, charakteryzują się nie tylko wysokim współczynnikiem akumulacji ale również wysoką tolerancją na obecność konkretnych zanieczyszczeń. Czy mogłaby doktorantka ustosunkować się do tego zagadnienia?
- 4. Inne drobne uwagi:
  - Mapa jest słabej jakości (s. 23).
  - Tytuły podrozdziałów i pod-podrozdziałów powinny być wyróżnione inną czcionką.
  - W wykazie skrótów zabrakło użytego w pracy skrótu „PP” (s. 25, 4 wiersz od góry).
  - „istotnie statystycznie **związków** w większości przypadków” właściwie byłoby zastąpienie związków terminem „korelacji” lub „zależności” (s. 52, 4 wiersz od góry)
  - stosowanie skrótu „n.i.” dla wartości nie istotnych statystycznie może zostać pominięte.
  - „przydatnym” zamiast „przydanym” (s. 89, 11 wiersz od góry).
  - naprzemienne stosowanie wyrażen „próba” i „próbka” (np. s. 27). W całej pracy powinno zostać zamienione na „próbka”.
- 5. Bardzo ciekawym rozszerzeniem badań byłoby uzupełnienie ich o warunki naturalne, a przynajmniej o doświadczenie z glebą. Sama autorka wspomina w dyskusji *„Kultura hydroponiczna jest przydanym (przydatnym ?) narzędziem do badania akumulacji metali ciężkich w drzewach leśnych oraz wstępnego określenia ich tolerancji na określone dawki zanieczyszczenia podłoża ....”*. *„Jednak, jak podkreślają ...., wyniki uzyskane w kulturach hydroponicznych powinny być potwierdzone poprzez przeprowadzanie odpowiednich doświadczeń wazonowych”* (s. 89, wiersz 11 od dołu).

Powyższe uwagi poczynione z obowiązku recenzenta, w najmniejszym stopniu nie pomniejszają wartości poznawczej i aplikacyjnej rozprawy. Uważam, że Doktorantka wykazała dobre opanowanie trudnych technik eksperymentalnych oraz umiejętność wykorzystania posiadanej wiedzy do analizy danych doświadczalnych. Przedstawiona dysertacja stanowi istotny wkład w rozwój badań i bez wątpienia zaowocuje publikacjami w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Uzyskane wyniki nie budzą wątpliwości. W sposób perfekcyjny doktorantka



połączyła zagadnienia biologii molekularnej z badaniami środowiskowymi, co idealnie wpisuje się w dyscyplinę ochrony i kształtowania środowiska.

**Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Magdaleny Zapalskiej spełnia w pełni wymogi ustawy „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki” (Dz. U. Nr 65 poz. 595) i wnioskuję do Rady Wydziału Agrobiotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

