

Prof. dr hab. Izabella Jackowska
Katedra Chemii
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Zapalskiej
p.t.: "Analiza ekspresji wybranych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne
w sadzonkach dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) traktowanych jonami
kadmu"

wykonanej w
Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, na Wydziale Agrobioinżynierii
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Kowalczyk
Promotor pomocniczy: dr Michał Nowak

Ocena problematyki badawczej

Naturalna zdolność niektórych gatunków roślin do akumulacji metali ciężkich może być wykorzystywana w procesie oczyszczania środowiska, czyli fitoremediacji. W grupie roślin o potencjale fitoremediacyjnym coraz częściej uwzględnia się rośliny wieloletnie i drzewiaste. Z kolei techniki inżynierii genetycznej umożliwiają tworzenie drzew o ulepszonych zdolnościach adaptacyjnych do warunków środowiskowych. Pozwala to na zwiększenie możliwości hodowli drzew, wprowadzenie nowych, pożądanych cech użytkowych i zwiększenie odporności na stresy środowiskowe. Wykorzystanie takich najnowszych osiągnięć, może się okazać istotne w sprostaniu wyzwaniom stawianym zrównoważonej gospodarce leśnej i ochronie środowiska zmienionego antropogenicznie.

Celem ocenianej pracy było poznanie mechanizmów odpowiedzi systemu antyoksydacyjnego dębu szypułkowego na działanie jonów kadmu.

Postawiony przez Autorkę cel pracy jest więc jasny i zasadny, a zakres przeprowadzonych badań rokuje powodzenie w realizacji postawionego celu. Praca mieści się w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie **ochrona i kształtowanie środowiska**.

Ocena formalna rozprawy

Recenzowana rozprawa posiada typowy układ dla pracy doktorskiej. Składa się z 7 rozdziałów, które stanowią: 1. wstęp i przegląd literatury, 2. cel pracy, 3. materiał i metody,

4. wyniki, 5. dyskusja wyników, 6. wnioski i 7. literatura. Ponadto, zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim.

Poszczególne rozdziały stanowią logiczną całość, zachowana jest też proporcja objętości poszczególnych rozdziałów. Zarówno rysunki, jak i tabele ułatwiają interpretację rezultatów badań. Omówienie wyników badań, ułatwia studiowanie tak obszernego materiału badawczego. Wnioski są sformułowane poprawnie. Praca jest starannie przygotowana i napisana poprawnym, zrozumiałym językiem.

Podsumowując tę część stwierdzam, że recenzowana praca doktorska mgr inż. Magdaleny Zapalskiej pod względem formalnym nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna rozprawy

Problematyka badawcza dotyczy mechanizmów odpowiedzi systemu antyoksydacyjnego dębu szypułkowego na działanie jonów kadmu.

Dęby pełnią bardzo ważną rolę w kształtowaniu krajobrazu, bowiem korzystnie oddziałują na siedlisko oraz zwiększają stabilizację drzewostanów. Odgrywają także istotną rolę w budowie i zachowaniu różnorodności biologicznej ekosystemów leśnych. Coraz częściej do rekultywacji terenów skażonych przez przemysł i fitoremediacji zanieczyszczeń wykorzystuje się drzewa leśne a najczęściej sosnę zwyczajną. Dąb pomimo powolnego wzrostu może być używany do zalesiania terenów zanieczyszczonych, ponieważ odznacza się wysoką tolerancją na zanieczyszczenia. Dotychczas badania na dębach szypułkowych nie zostały przeprowadzone.

Rośliny pobierają jony kadmu przez system korzeniowy oraz przez blaszki liściowe. Łatwo przyswajalne przez korzenie roślin na drodze wymiany kationowej zachodzącej w błonach komórkowych są transportowane do części nadziemnych przez ksylem. Jony kadmu w roślinie powodują zaburzenia wielu procesów metabolicznych i fizjologicznych. W efekcie maleje biomasa korzeni i pędów. Spadek zawartości chlorofilu i aktywności fotosyntetycznej jest wyznacznikiem stresu powodowanego przez jony kadmu. Do zmniejszenia wydajności procesu fotosyntezy w obecności jonów kadmu dochodzi w wyniku uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego, zmiany ekspresji genów kodujących białka powiązane z fotosyntezą, zmniejszenie zawartości jonów żelaza, hamowania syntezy chlorofilu i karotenoidów, hamowania aktywności enzymów zaangażowanych w przyswajanie CO₂ oraz zamknięcia aparatów szparkowych.

Brak informacji o ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne dębu szypułkowego, poddanego ekspozycji na metale ciężkie skłonił Autorkę do podjęcia tego

tematu. Uwzględniając silnie toksyczny wpływ jonów kadmu na organizmy żywe uzasadnione jest prowadzenie badań na temat mechanizmów molekularnych chroniących rośliny przed jego szkodliwym działaniem. Wiedza taka może być pomocna w poznawaniu mechanizmów tolerancji. Trudnością jest zastosowanie właściwej metody izolacji RNA dla roślin, pozwalającej na uzyskanie preparatów wolnych od zanieczyszczeń ale o odpowiednio wysokich stężeniach. Powszechnie stosowane metody izolacji RNA nie są jednakowo skuteczne u różnych gatunków roślin. Dlatego Autorka w badaniach własnych podjęła próbę oceny efektywności kilku metod izolacji RNA i dokonania wyboru metody optymalnej dla liści dębu szypułkowego. Przetestowała 5 metod. Materiał badawczy stanowiły rośliny z dwóch szkółek leśnych: Strózek i Borek.

Wybór odpowiedniego genu referencyjnego, charakteryzującego się stałą ekspresją we wszystkich stosowanych wariantach eksperymentalnych jest niezwykle ważny dla prawidłowego wykonania pomiarów ekspresji genów przy zastosowaniu techniki PCR w czasie rzeczywistym. W stosowanych wariantach doświadczalnych najbardziej stabilną ekspresję wykazywał gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Gen ten został wybrany jako gen referencyjny do dalszych etapów badań.

Autorka w badaniach wybrała czasochłonną metodę wg La Provost'a ze względu na osiąganą wyższą wydajność izolacji RNA ze 100 mg tkanki.

Wprowadzenie do środowiska nawet niewielkich ilości metali ciężkich może prowadzić do ich akumulacji w wierzchnich warstwach gleby. W badaniach Autorka zastosowała w pożywce dwa stężenia CdCl_2 - 10 μM i 50 μM . Niższe stężenie jest zbliżone do realnie występującego zanieczyszczenia gleb, a wyższe odpowiada zanieczyszczeniu środowiska na skutek skażenia poprzez składowanie odpadów pogórnictwa, z hut metali i zakładów chemicznych.

System korzeniowy roślin akumuluje największe ilości jonów kadmu, podczas gdy jego stężenie w częściach nadziemnych jest nawet do kilkunastu razy mniejsze. Imobilizacja metali ciężkich w ścianach komórek korzeni drzew jest częstym mechanizmem detoksykacji.

Przeprowadzone badania wykazały, że sadzonki dębu szypułkowego akumulowały jony kadmu głównie w systemie korzeniowym, transportując niewielkie jego ilości do liści. Wyniki te wskazują na potencjalne fitostabilizacyjne zdolności *Quercus robur* w odniesieniu do jonów kadmu, co to może być wykorzystane do zalesiania terenów skażonych. Kadm zaburza gospodarkę mineralną roślin - interferuje z transportem między innymi jonów Zn, Fe, Mn i Cu, konkurując z tymi kationami o przenośniki transbłonowe. W roślinach poddanych działaniu metali ciężkich dochodzi do zmian w ekspresji wielu genów. Niektóre rośliny

posiadają potencjał genetyczny umożliwiający przetrwanie ekspozycji na skażenie środowiska jonami metali ciężkich. Różnica między roślinami tolerancyjnymi a roślinami wrażliwymi wynika m.in. z szybkiej aktywacji właściwych mechanizmów obronnych, w tym odpowiedniej regulacji ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w odpowiedzi na stres. Traktowanie roślin jonami metali ciężkich wywołuje w nich stres oksydacyjny. Jednym z najczęściej badanych procesów związanych z wystąpieniem stresu oksydacyjnego jest peroksydacja lipidów.

W pracy Autorka podjęła próbę scharakteryzowania odpowiedzi systemu antyoksydacyjnego *Quercus robur* na stres wywołany obecnością jonów kadmu. Porównała wpływ dwóch stężeń CdCl_2 na sadzonki dębu szypułkowego z dwóch odmiennych regionów. Oceniała poziom uszkodzeń wywołanych przez zadany stres, zbadała zmiany w poziomie transkryptów i aktywności najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych, określiła akumulację jonów kadmu w organach sadzonek dębu oraz zbadała wpływ kadmu na gospodarkę mineralną roślin.

Wybór obiektów badań oraz postawione cele nie budzą zastrzeżeń i są konsekwentnie rozwiązywane za pomocą szerokiego spektrum analiz laboratoryjnych (biochemicznych, chemicznych). Metodyka badań jest nowoczesna i świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę bogatego warsztatu z zakresu ochrony środowiska, genetyki i dyscyplin pokrewnych. Interpretację wyników badań przeprowadziła uwzględniając analizy bioinformatyczne oraz statystyczne. Ten rozdział ułatwia studiowanie wyników uporządkowanych wg schematu zastosowanego w rozdziale: materiał i metody. Umiejętnie przeprowadzona dyskusja łącząca wyniki badań własnych z danymi zawartymi w bogato cytowanej literaturze przedmiotu stanowi najciekawszą część pracy. Jednocześnie świadczy o bardzo dobrym opracowaniu przez Autorkę niezwykle trudnych zagadnień obejmujących kilka specjalności naukowych. Autorka połączyła interpretację i porównanie wyników badań z dostępnymi w publikacjach naukowych w jeden rozdział. Jednocześnie podjęła próbę wyjaśnienia rozbieżności wyników własnych badań i innych autorów. Tym samym potwierdziła, że bardzo wnikliwie zapoznała się z literaturą związaną z tematyką badań, a zakres cytowanych prac jest wystarczający i porządkuje wiedzę w tym zakresie.

Przeprowadzone badania są pierwszymi na *Quercus robur* i dostarczają nowych informacji odnośnie odpowiedzi systemu antyoksydacyjnego dębu szypułkowego na wzrost w warunkach stresu powodowanego jonami kadmu.

Uwagi

1. w opracowaniach naukowych należy precyzyjnie określać, że badania dotyczą jonów metali (jony kadmu a nie kadm);

2. str. 12 w10d jest: niski odczyn, powinno być: niskie pH;
3. str. 27 w12d jest: popiół zadano rozcieńczonym kwasem solnym w proporcji 1:2. Czy stosując takie stężenie uzyskano całkowite rozтворzenie popiołu?
4. str. 38 w4g jest 1-butanol, powinno być: butan-1-ol.

Ocena końcowa

Oceniana rozprawa doktorska jest opracowaniem dobrze wpisującym się w badania dotyczące poszukiwania gatunków drzew o szerokich możliwościach adaptacyjnych i potwierdzonych zdolnościach fitoremediacyjnych. Merytorycznie podjęty został trudny i złożony problem wykorzystania technik biologii molekularnej w ochronie środowiska zanieczyszczonego w wyniku działalności człowieka.

Realizacja procesu badawczego wymagała dobrego przygotowania metodycznego i wykonania ogromnej ilości różnych analiz. Praca mgr inż. Magdaleny Zapalskiej stanowi wartościowe opracowanie, zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznym.

Rozprawa doktorska wzbogaca wiedzę naukową i praktyczną z szerokiego zakresu nauk rolniczych, obejmujących intensywne prace badawcze z zakresu ochrony i kształtowania środowiska

Stwierdzam, że rozprawa przedłożona przez mgr inż. Magdalenę Zapalską spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

Wnioskuję do Członków Rady Wydziału Agrobioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Zapalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając szeroki zakres wykonanych badań, ogromną ilość uzyskanych wyników oraz opracowanie ich na bardzo dobrym poziomie naukowym, stawiam wniosek o wyróżnienie ocenionej rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Zapalskiej stosowną nagrodą

Lublin, 11.12.2015 r.