



Lublin, 14 sierpnia 2023 r.

dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. (081) 537 50 64
email: malgorzata.wojcik@mail.umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Żanety Gieroń

pt. „Tolerancja i akumulacja metali ciężkich u *Arabidopsis arenosa* – badania terenowe i laboratoryjne nad mechanizmami hyperakumulacji”

wykonanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
pod kierunkiem dr hab. Eugeniusza Małkowskiego, prof. UŚ,
promotor pomocniczy – dr Krzysztof Sitko

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej zaprezentowano wyniki analizy porównawczej parametrów ekofizjologicznych i zawartości jądrowego DNA 14 populacji *Arabidopsis arenosa* (L.) Lawalree zasiedlających naturalne stanowiska niezanieczyszczone oraz zanieczyszczone metalami na terenie Europy, a także pięciu wybranych spośród nich populacji, uprawianych hydroponicznie w obecności kadmu (Cd) lub nadmiaru cynku (Zn) w pożywce. Celem pracy było określenie poziomu akumulacji metali i tolerancji na metale w badanych populacjach, również w nawiązaniu do ploidalności genomu, w warunkach stresu chronicznego i ostrego metali.

Rośliny rosnące na terenach zanieczyszczonych metalami, są narażone na tzw. stres chroniczny, definiowany jako długoterminowa (trwająca przez okres kilku tygodni-miesiący lub całej ontogenezy) ekspozycja na stosunkowo niskie (subletalne) stężenia metali. W takich warunkach, zazwyczaj w ciągu dziesięcio- a nawet stuleci, lecz przy wysokiej presji selekcyjnej, jak ta spotykana na składowiskach odpadów metalonośnych o ekstremalnie wysokich stężeniach metali w podłożu, już w czasie 4-10 lat dochodzi do wykształcenia mechanizmów tolerancji, utrwalonych genetycznie. Występowanie ekotypów metalo-tolerancyjnych nie jest cechą taksonomiczną. Obserwuje się duże zróżnicowanie w tolerancji między gatunkami, a nawet populacjami/ekotypami tego samego gatunku, czy nawet osobnikami w obrębie tej samej populacji. Dlatego, populacje pseudometalofitów, czyli organizmów zdolnych do zasiedlania terenów zanieczyszczonych, jak również niezanieczyszczonych metalami, są doskonałymi obiektami badań mechanizmów tolerancji na metale i adaptacji do terenów zanieczyszczonych metalami. W tym kontekście, za bardzo dużą zaletę przedstawionych w dysertacji doktorskiej badań uważam porównanie parametrów ekofizjologicznych aż 14 populacji *A. arenosa*



zaadaptowanych do wzrostu na terenach o zróżnicowanej zawartości metali w podłożu, w tym 6 populacji metalofitycznych (pochodzących z terenów o podwyższonej zawartości metali) i 8 populacji niemetalofitycznych (z terenów o zawartości metali na poziomie tła geochemicznego, jedna populacja zasiedlająca tereny o podwyższonym poziomie zanieczyszczeń). Dodatkowo, Doktorantka przebadła trzy populacje niemetalofityczne (w tym jedną pochodzącą z terenów o niewielkim zanieczyszczeniu metalami) i dwie metalofityczne w uprawach hydroponicznych, gdzie rośliny poddane były działaniu 10 μM Cd i 200 μM Cd przez 4 tygodnie. Badania roślin uprawianych hydroponicznie, w kontrolowanych warunkach rodzaju i natężenia czynnika stresowego, są niezwykle istotne ze względu na możliwość poznania fizjologicznych i molekularnych mechanizmów tolerancji na poszczególne metale i szybkiej selekcji gatunków/ekotypów/populacji tolerancyjnych. Ich wyniki nie mogą być jednak bezpośrednio odnoszone do roślin występujących na zanieczyszczonych terenach, gdzie działa zazwyczaj kilka czynników stresowych. Dlatego, za bardzo cenne uważam porównanie reakcji roślin tych samych populacji w warunkach chronicznego i ostrego stresu metali, co pozwoliło na odróżnienie mechanizmów tolerancji na metale wrodzonych i nabytych.

W mojej ocenie, zarówno tematyka badawcza, jak i model roślinny zostały dobrane właściwie. *Arabidopsis arenosa*, jako gatunek blisko spokrewniony w dwoma gatunkami modelowymi – *Arabidopsis thaliana* (wykazujący podstawowy poziom tolerancji na metale) oraz *Arabidopsis halleri* (hyperakumulator Zn i Cd), w świetle przedstawionych badań jawi się jako doskonały kolejny organizm modelowy do badania mechanizmów tolerancji i (hyper)akumulacji metali. Poznanie strategii pobierania i akumulacji metali oraz tolerancji na metale w populacjach diploidalnych i tetraploidalnych *A. arenosa* jest bardzo interesujące pod względem poznawczym, ale może mieć również znaczenie praktyczne w kontekście zasiedlania składowisk metalonośnych lub wykorzystania narzędzi biotechnologicznych do konstruowania roślin o zwiększonej tolerancji na metale.

Recenzowana rozprawa doktorska dostarcza oryginalne i bardzo wartościowe dla nauki wyniki. O wysokim poziomie przedstawionych badań świadczy fakt, że część wyników została już opublikowana w czasopiśmie z listy JCR o bardzo wysokim współczynniku oddziaływania IF = 14,224 i liczbie punktów MNiSW oraz MNiE = 200 (Journal of Hazardous Materials, 2021, 412: 125052). Wyniki te cieszą się uznaniem naukowców na świecie, co potwierdza indeks cytowań tego artykułu (12 wg bazy Scopus w dniu 14.08.2023). Wstęp przedstawionej rozprawy doktorskiej został przygotowany w oparciu o kolejny opublikowany artykuł w czasopiśmie z listy JCR (Plants, 2021, 10: 1342) o współczynniku IF = 4,658 i 70 pkt MNiSW oraz MEiN (liczba cytowań wg bazy Scopus – 3).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia ogólnie przyjęte wymagania formalne stawiane pracom doktorskim. Treść pracy, obejmującej 74 strony maszynopisu, została podzielona na 5 rozdziałów, po których zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis bibliografii. Pracę poprzedza wykaz skrótów. W pracy zamieszczono 6 rycin i 6 tabel oraz szereg odnośników do rycin i tabel w opublikowanych artykułach wspomnianych powyżej.



Rozdział 1. – „Wstęp”, przedstawia informacje na temat *A. arenosa* opublikowane w artykule Gieroń i in. pt. *The different faces of Arabidopsis arenosa – a plant species for special purpose* (Plants, 2021a). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje morfologię i występowanie *A. arenosa*, zjawisko autoploidyzacji (duplikacji genomu) stwierdzone w tym gatunku, przystosowania morfologiczne, fizjologiczne i genetyczne do wzrostu w obecności podwyższonych stężeń metali i zdolność do akumulacji metali, w porównaniu do *A. halleri* i *Noccaea caerulescens* – organizmów modelowych w badaniach hyperakumulacji metali. W ostatnim podrozdziale przedstawia wpływ mikroorganizmów glebowych na tolerancję metali, zwłaszcza u *A. arenosa* i *A. halleri*. Autorka ogranicza się tutaj wyłącznie do grzybów endofitycznych i ryzosferowych, pomijając inne grupy mikroorganizmów, dlatego, moim zdaniem, tytuł tego podrozdziału nie do końca adekwatnie oddaje jego treść, a zagadnienia te nie mają związku z prowadzonymi w ramach pracy doktorskiej badaniami. W rozdziale 1. zamieszczono trzy ryciny i dwie tabele, zaadoptowane w wersji polskiej z w/w artykułu.

Rozdział 2. zatytułowany „Eksperyment I. Ekofizjologia *Arabidopsis arenosa*, nowego hyperakumulatora Cd i Zn” przedstawia wyniki badań opublikowanych w artykule Gieroń i in. pt. *Ecophysiology of Arabidopsis arenosa, a new hyperaccumulator of Cd and Zn* (Journal of Hazardous Materials, 2021b). W rozdziale tym wyróżniono trzy podrozdziały: 1) Cel; 2) Materiał i metody oraz 3) Wyniki. Przy opisie materiałów i metod oraz wyników Autorka odwołuje się do rycin i tabel opublikowanych w w/w artykule, nie zamieszczając ich w tekście dysertacji doktorskiej. Poza tym, odwołania są nieprecyzyjne, ponieważ Autorka powołuje się na pracę ‘Gieroń et al., 2021’, a występują dwie publikacje o takiej cytacji opublikowane w 2021 roku. Dobrze byłoby zamieścić ten artykuł jako suplement do pracy doktorskiej, co znacznie ułatwiłoby czytanie manuskryptu i analizę opisywanych wyników, lub wkleić te ryciny i tabele do tekstu manuskryptu, tak jak w poprzednim rozdziale.

Opis zastosowanych metod jest adekwatny do przedstawionych wyników. W rozdziale tym przedstawiono akumulację metali w pędach, zawartość chlorofili, antocyjanów, flawonoli, zawartość jądrowego DNA oraz parametry fluorescencji chlorofilu *a* w 14 populacjach *A. arenosa* z ich naturalnych stanowisk, 6 metalonośnych i 8 niemetalonośnych.

Rozdział 3. nosi tytuł „Eksperyment II. Właściwości fizjologiczne *Arabidopsis arenosa* pod wpływem traktowania Zn lub Cd w warunkach kontrolowanych”. Struktura tego rozdziału jest analogiczna do poprzedniego rozdziału. Cel badań został jasno sformułowany, opis warunków eksperymentu i zastosowanych metod badawczych jest poprawny. W kolejnym podrozdziale przedstawiono bardzo interesujące wyniki dotyczące roślin uprawianych hydroponicznie na pożywce kontrolnej lub z dodatkiem Cd lub nadmiaru Zn. Przedstawiono parametry wzrostu, stężenia wybranych pierwiastków w korzeniach i liściach (Cd, Zn, Fe, Mg, Mn, brak opisu przedstawionych w tabeli wartości dotyczących stężeń Ca, Cu, K), zawartości chlorofilu, antocyjanów i flawonoli w liściach, a także parametrów wymiany gazowej i parametrów fluorescencji chlorofilu *a*. Wyniki przedstawiono w 5 tabelach i na 3 rycinach, które są elegancko przedstawione i bardzo czytelne, mimo że dostarczają wielu informacji, zwłaszcza te dotyczące parametrów fotosyntezy (Rys. 5 i 6). W odwołaniach do rycin i tabel występuje jednak pewna niekonsekwencja – o ile kolejne ryciny są numerowane w sposób ciągły w całej dysertacji doktorskiej, o tyle odwołania do tabel w każdym rozdziale są niezależne, w wyniku czego w manuskrypcie występuje np. dwa razy tabela 1 (na str. 17 w rozdziale 1. oraz na str. 33 w rozdziale 3., a nie ma tabeli 1 do której Autorka odwołuje się w rozdziale 2). Mam również



zastrzeżenia dotyczące opisu parametrów wzrostu. Mimo poprawnie wprowadzonych oznaczeń analizy statystycznej w tabeli 1 (str. 33-34), dane przedstawione jako statystycznie nieistotnie różne są opisywane jako ‘największa lub najmniejsza biomasa’, ‘najdłuższe lub najkrótsze korzenie’, ‘traktowanie metalami zmniejszyło ...’, itp. Generalna konkluzja z przedstawionych wyników powinna być taka, że traktowanie metalami nie wpłynęło na parametry wzrostu zarówno w populacjach metalofitycznych, jak i niemetalofitycznych (brak różnic istotnych statystycznie). Podobne błędy występują w dyskusji tych wyników (str. 48). Sugeruję zwrócić na to szczególną uwagę przy przygotowywaniu manuskryptu z wyników tego eksperymentu do druku.

Rozdział 4. – „Dyskusja” został podzielony na 5 podrozdziałów. Struktura podziału treści na podrozdziały jest bardzo logiczna. Autorka dokonała analizy i interpretacji uzyskanych wyników w odniesieniu do wyników opublikowanych w literaturze światowej, w tym wyników zespołu badawczego, którego jest członkiem. Dyskusja została przedstawiona w sposób dojrzały i rzeczowy.

Kolejny rozdział stanowi „Podsumowanie i wnioski”. Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła najważniejsze wyniki uzyskane w pracy doktorskiej, wskazując różnice w badanych parametrach ekofizjologicznych pomiędzy populacjami metalofitycznymi i niemetalofitycznymi, jak również w obrębie tych populacji.

Wykaz piśmiennictwa (rozdział 8. – „Bibliografia”) liczy 119 pozycji literatury, w tym tylko jedna, obowiązkowy podręcznik pt. „Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin” autorstwa Kalaji i Łobody (Wydawnictwo SGGW, 2010) jest pozycją polskojęzyczną. Dobór pozycji literaturowych jest jak najbardziej odpowiedni, bardzo dobrze powiązany z tematyką pracy.

Wszystkie rozdziały dysertacji zostały przedstawione poprawnie, dostarczając wszelkich niezbędnych informacji, wskazując na dobrą orientację Pani mgr Żanety Gieroń w problematyce badawczej oraz umiejętność prowadzenia wyводу naukowego.

Jak już wspomniałam, oceniana rozprawa doktorska prezentuje wysoką wartość naukową ze względu na kompleksowe podejście do realizowanego tematu. Wśród najważniejszych osiągnięć badawczych ocenianej rozprawy należy wymienić:

- wykazanie po raz pierwszy, że populacje *Arabidopsis arenosa* zasiedlające tereny o wysokiej zawartości Zn i Cd w podłożu są zdolne do hyperakumulacji tych metali (na 6 przebadanych populacji metalofitycznych 5 wykazywało cechy hyperakumulacji Zn, a 3 hyperakumulacji Cd), co uzasadnia nazwanie tego gatunku nowym hyperakumulatorem Zn i Cd;
- wykazanie, że hyperakumulacja metali u *A. arenosa* jest związana z poliploidyzacją genomu, ponieważ tylko populacje autotetraploidalne wykazywały cechy hyperakumulatorów;
- wykazanie, że rośliny populacji niemetalofitycznych – diploidalnych były bardziej wrażliwe na toksyczność metali, mierzoną sprawnością aparatu fotosyntetycznego, oraz akumulowały więcej metali w częściach nadziemnych w uprawach hydroponicznych, co wskazuje na wykształcenie na drodze ewolucji efektywnych mechanizmów tolerancji na metale w tetraploidalnych populacjach metalofitycznych, co z kolei może mieć związek z poliploidyzacją genomu u tego gatunku.



Generalnie, rozprawa doktorska jest napisana starannie i estetycznie, a Autorka swobodnie posługuje się językiem polskim, co sprawia, że praca jest przyjemna do czytania. Nie udało się jednak uniknąć pewnych nieścisłości i „skrótów myślowych”, których kilka ważniejszych przykładów podaję poniżej:

- Autorka często używa niewłaściwego terminu rośliny/populacje „niemetalonośne” lub „metalonośne”; słowo „metalonośny” stosuje się do opisu terenu o wysokiej zawartości metali w podłożu; w odniesieniu do roślinności zasiedlającej takie tereny (populacji) powinno używać się terminu „rośliny/populacje metalofityczne”, analogicznie populacje z terenów o niskich zawartościach metali w podłożu są nazywane „niemetalofitycznymi”; równie niepoprawny jest termin „populacja metaliczna” (str. 55);
- w odniesieniu do podłoża, termin „metaliczne” czy „niemetaliczne” jest również nieprawidłowy (np. rys. 3 str. 16, str. 50), powinno używać się sformułowania „metalonośne” lub „niemetalonośne”;
- w tabeli 1 na str. 17, przy opisie funkcji genów ZIP podano „wychwytywanie metali w komórkach” – co to oznacza?, na czym polega to „wychwytywanie”?
- zamiast terminu „ekofizjologia *Arabidopsis arenosa*” lub „scharakteryzowanie ekofizjologii *Arabidopsis arenosa*” lub „zbadanie ekofizjologii” powinien być użyty termin „właściwości ekofizjologiczne” lub „parametry ekofizjologiczne”; termin ekofizjologia oznacza naukę zajmującą się fizjologicznymi przystosowaniami osobników, populacji i biocenoz do środowiska;
- na str. 34, przy opisie stężeń metali w częściach nadziemnych roślin uprawianych w kulturach hydroponicznych stwierdzono: „Wszystkie populacje traktowane Cd wykazywały akumulację tego metalu w pędach powyżej wartości świadczącej o hyperakumulacji” – w przypadku roślin uprawianych hydroponicznie nie można mówić o hyperakumulacji. Stosując odpowiednie stężenia metali w pożywce i odpowiedni czas uprawy każdą roślinę można „zmusić” do akumulacji metali w stężeniach znacznie przekraczających progi hyperakumulacji (co zazwyczaj jest letalne dla rośliny). Progi te są ustalone dla roślin z terenów naturalnych, które akumulując tak wysokie stężenia metali w częściach nadziemnych nie wykazują objawów toksyczności i tylko w odniesieniu do takich roślin można używać terminu „hyperakumulacja”;
- nieprawidłowym „skrótom myślowym” jest użycie terminu „siedliska diploidalne” (str. 51) czy „populacjach ekstremalnie zanieczyszczonych” (str. 57).

Przedstawiam również kilka drobnych niedociągnięć w pracy:

- w języku polskim, a w takim pisany jest manuskrypt rozprawy doktorskiej, poprawniejsze jest stosowanie w odniesieniu do współautorów publikacji skrótu „i in.” lub „i współaut.” zamiast „et al.”; w odniesieniu do rycin skrótu „ryc.” lub „rys.” (używany w pracy) zamiast „fig.” (np. str. 55); w odniesieniu do jednostek względnych powinien być stosowany skrót „j.w.” zamiast „r.u.” (np. str. 54);
- w podpisie do tabeli 2 (str. 36) brakuje wyjaśnienia stosowanego w tabeli skrótu BDL;
- w tabeli 5 (str. 44) brakuje wyjaśnienia zastosowanych kolorów (różne odcienie zielonego i czerwonego);
- spis literatury – niejednolity styl przedstawiania pozycji literatury, brak kursywy w nazwach łacińskich gatunków roślin.



Podczas lektury rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne pytania, z którymi chciałabym zwrócić się do Doktorantki:

- Czym różniło się stanowisko niemetalonośne, ale zanieczyszczone metalami (NMP – Klucze) od stanowisk metalonośnych (M)?
- W nawiązaniu do rys. 3 (str. 16) – czy na terenach metalonośnych są spotykane populacje diploidalne *A. arenosa*?
- Badano gleby i rośliny *A. arenosa* ze stanowisk zagranicznych – na Słowacji (3 stanowiska) i na Węgrzech (4 stanowiska) – czym kierowano się przy wyborze tych stanowisk? Czy Doktorantka odwiedziła te lokalizacje w celu pobrania próbek i przeprowadzenia badań?
- Na jakiej podstawie wybrano stężenia metali do badań w warunkach kontrolowanych: 10 μM Cd i 200 μM Zn?
- Bardzo interesującym i wartościowym aspektem badań jest porównanie reakcji na metale populacji metalofitycznych i niemetalofitycznych w warunkach naturalnych i uprawach kontrolowanych – chciałabym prosić o opinię, które doświadczenia umożliwiają identyfikację mechanizmów adaptacji do wzrostu na zanieczyszczonych metalami terenach, a które poznanie mechanizmów aklimatyzacji (aklimacji)? Czy można wskazać takie mechanizmy na podstawie uzyskanych wyników?
- Doktorantka podsumowując swoje wyniki wskazuje, że konieczne są dalsze badania w celu poznania mechanizmów tolerancji metali i hyperakumulacji u *A. arenosa*. Jakie kierunki badań można wskazać w celu rozwiązania tego problemu badawczego?

Przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Żanety Gieroń. Uważam, że Doktorantka bardzo dobrze zaplanowała i przeprowadziła swoje badania przedstawiając oryginalne rozwiązanie postawionego problemu naukowego i wnosząc istotny wkład do poznania adaptacji *A. arenosa* do zasiedlania stanowisk zanieczyszczonych w zróżnicowanym stopniu metalami oraz poznania fizjologicznych i genetycznych mechanizmów hyperakumulacji metali u tego gatunku. O dużej wartości uzyskanych wyników świadczy również opublikowanie części z nich w bardzo renomowanym czasopiśmie naukowym i jestem głęboko przekonana, że pozostałe wyniki, które są już opracowane do publikacji, zostaną również opublikowane w czasopiśmie o wysokim IF. Doktorantka opanowała różnorodne metody badawcze, od badań środowiskowych glebowych i roślinnych po wyszukane analizy fizjologiczne i genetyczne, oraz wykazała się dojrzałością w prowadzeniu wywodu naukowego.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 (Dz.U. 2022 poz. 574). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Żanety Gieroń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

