

dr hab. Aneta Słomka, prof. UJ
Instytut Botaniki
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Gronostajowa 9
30-387 Kraków
Email: aneta.slomka@uj.edu.pl
Tel. 12 664 50 20

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Żanety Gieroń
pt. Tolerancja i akumulacja metali ciężkich u *Arabidopsis arenosa* –
badania terenowe i laboratoryjne nad mechanizmami
hyperakumulacji wykonanej pod kierunkiem
prof. dr. hab. Eugeniusza Małkowskiego, prof. UŚ
oraz dr. Krzysztofa Sitko**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani magister Żanety Gieroń wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pt. *Tolerancja i akumulacja metali ciężkich u Arabidopsis arenosa – badania terenowe i laboratoryjne nad mechanizmami hyperakumulacji*, wpisuje się w zakres przedmiotowy dyscypliny naukowej nauki biologiczne. Część wyników została opublikowana w ośmioautorskiej pracy Gieroń i in. 2021 (*Journal of Hazardous Materials* 412: 125052), ponadto Doktorantka jest współautorką, wraz ze swoim Promotorem i Promotorem Pomocniczym, pracy przeglądowej opublikowanej w 2021 r. w czasopiśmie *Plants* (10: 1342). Praca ma układ nieco odbiegający od typowego w naukach eksperymentalnych, tj. podziału na Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki oraz Dyskusję. Obejmuje 76 stron i jest podzielona na 7 rozdziałów, Wstęp, Eksperyment I, Eksperyment II, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, Streszczenie, Summary, Bibliografia. Rozdział 2. i 3. (Eksperyment I i II) podzielone są z kolei na podrozdziały obejmujące: Cel Badań, Materiały i Metody oraz Wyniki. Wydawać by się mogło, że taki układ może dobrze spełniać swoją rolę w eksperymentalnej pracy biologicznej, tym nie mniej w tym przypadku taki zabieg uważam za nietrafiony. Dużo łatwiejszym w odbiorze i interpretacji wyników dla czytelnika byłoby zestawienie wyników Eksperymentu I z wynikami Eksperymentu II. Przede wszystkim, z powodu zbieżności kilku metod badawczych użytych w obu eksperymentach (np. zawartość metali, zawartość barwników, pomiar fluorescencji chlorofilu). Tak zresztą w niektórych miejscach, i bardzo słusznie, prowadzona jest dyskusja wyników. W przypadku wyciągania wniosków o tym, czy daną populację można zakwalifikować jako hiperakumulującą, istotna jest porównawcza ocena reakcji roślin na metale śladowe w naturalnym środowisku vs. warunki eksperymentalne. Na stanowiskach naturalnych rośliny mogą nie wykazywać oznak hiperakumulacji, ze względu na przykład na ograniczoną biodostępność metali, bądź inne czynniki, tj. pH gleby. Ponieważ te same metody stosowane były na roślinach pochodzących bezpośrednio z terenu

(Eksperyment I) jak i wyprowadzonych i uprawianych w kontrolowanych warunkach w szklarni (Eksperyment II), większość wyników można było zestawiać razem. Wyniki z Eksperymentu I i II powinny być analizowane równolegle.

Doktorantka przebadła *in situ* 14 populacji *Arabidopsis arenosa* z różnych stanowisk. Badała fluorescencję chlorofilu *a*, zawartości barwników (chlorofilów, antocyjanów, flawonoli), zawartości metali w organach, w glebie, poziom zawartości DNA w komórkach roślin (Eksperyment I). Z kolei w uprawie hydroponicznej, w warunkach szklarniowych badała rośliny uzyskane z nasion z łącznie z 5 wybranych spośród 14 populacji *A. arenosa* (Eksperyment II). Eksperyment II obejmował te same analizy co Eksperyment I (z wyjątkiem pomiarów zawartości metali w glebie) i dodatkowo zmierzono parametry wymiany gazowej oraz przeprowadzono pomiary morfometryczne roślin (biomasa pędów i korzeni oraz długość korzeni). Nowością w stosunku do pracy Szopińskiego i współautorów z 2020 opublikowanej w *Plant Cell and Environment* (43: 3002–3019) jest wykorzystanie do badań dużo większej liczby populacji *A. arenosa* (14 vs. 2). Wszystkie metody za wyjątkiem pomiarów wymiany gazowej były zastosowane wcześniej i są opisane w tej pracy. Przesłanką do podjęcia szerzej zakrojonych badań było wykazanie w artykule Szopiński i in. (2020), że populacja metaliczna (M) (nie metalonośna jak ją Doktorantka nazywa – gleby są metalonośne, a rośliny metaliczne) z Piekar Śląskich wykazuje zdolności hiperakumulacji Zn i Cd. Tak przynajmniej miemam, na podstawie wstępu - rozdział 1.3. *Arabidopsis arenosa a toksyczne metale śladowe*. Tym nie mniej, co zaskakujące, już w tej części pracy doktorskiej (Wstęp) Doktorantka zamiast przywołać wspomniane badania Szopińskiego i współautorów z 2020 r. pisze, że Jej wyniki (powołując się na swój opublikowany artykuł z *J. Hazard. Mater.* opisujący Eksperyment I i swoją pracę przeglądową) wykazały zdolność *A. arenosa* do hiperakumulacji Cd i Zn (str. 13). Z jednej strony więc Doktorantka traktuje już swoje wyniki jako opublikowane i przywołuje je we wstępie, z drugiej, prezentuje je w wynikach swojej pracy doktorskiej. Po wnikliwej ocenie Wyników rozdziału Eksperyment I w pracy doktorskiej można stwierdzić, że podobnie jak i Materiały i Metody Eksperymentu I ta część, jest dużo szerzej opisana w opublikowanym artykule, w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Odbiór rozdziałów Materiały i Metody oraz Wyniki Eksperymentu I w pracy doktorskiej był dla mnie bardzo utrudniony przez nieustanne powoływanie się na opublikowany artykuł.

Badania nad ewolucją, tolerancją na metale ciężkie *A. arenosa* prowadzone są od ok. 20 lat. Gatunek *A. arenosa* uznawany jest za tolerancyjnego niemetalofita występującego na stanowiskach suchych lub za pseudometalofita i choć zwykle częściej hiperakumulatorami metali są metalofity obligatoryjne, wśród pseudometalofitów również potwierdza się występowanie populacji o zdolnościach do hiperakumulacji. Takie gatunki/populacje są atrakcyjne z praktycznego punktu widzenia ze względu na swój potencjał do oczyszczania gleby z metali ciężkich, a

zatem wykorzystanie w procesie fitoremediacji. Niestety *A. arenosa* jest rośliną stosunkowo niewielkich rozmiarów. Na uwagę jednak zasługuje fakt, że tworzy populacje diploidalne ($2n = 2x$) i tetraploidalne ($2n = 4x$), co mogłoby być obiecujące, albowiem zwykle cytotypy o wyższym stopniu ploidalności mają, w porównaniu do cytotypów o niższym stopniu ploidalności, większą biomasa. Większa biomasa przekłada się na lepszą wydajność roślin w procesie fitoremediacji. Doktorantka napisała we wstępie, że populacje metaliczne (M) ($2n = 4x$) mają mniejszą biomasa niż niemetaliczne (NM) na tym samym stopniu ploidalności, w odniesieniu, jak miemam z rysunku 3 na stronie 16., do osobników diploidalnych ($2n = 2x$). Nie jest to oparte o wnioski płynące z wyników przedstawionych w pracy doktorskiej, a z wniosków płynących z wyników uzyskanych przez innych badaczy, natomiast sama Doktorantka wykazała, że populacje metaliczne mają zdolności hiperakumulacyjne, a niemetaliczne takich zdolności nie posiadają. Niepotrzebnie jednak pisze już o tym we Wstępie, skoro jest to wynik przeprowadzonych przez nią eksperymentów w pracy doktorskiej, nieważne, że na moment pisania pracy doktorskiej, już opublikowanych. Jeśli w naturze występują zatem, jak pisze Doktorantka, upraszczając, trzy rozmiary roślin: małe - $2x$ NM, średnie - $4x$ M oraz duże - $4x$ NM, to bardziej zasadnym w moim odczuciu byłoby porównywanie w jednakowych warunkach hodowlanych roślin $4x$ M z $4x$ NM, a nie jak to było to czynione, czyli $4x$ M z $2x$ NM. Wprawdzie w wynikach Eksperymentu I Doktorantka pisze, że „... ploidalność ma marginalny wpływ na zróżnicowanie pomiędzy badanymi populacjami.”, aczkolwiek, skoro wielkość roślin w obrębie $4x$ (M vs. NM) jest zależna od warunków edaficznych w jakich żyją (tereny metalnośne vs. niemetalonośne), a nie od innych czynników (np. rozważana wysokość n.p.m.), jak można wnioskować z tego co pisze Doktorantka we Wstępie, to wydaje mi się, że do Eksperymentu II kontrolą dla roślin $4x$ M powinny być rośliny z populacji $4x$ NM, a nie $2x$ NM. Przy tej okazji, pragnę również zwrócić uwagę, że nie jest uprawnionym nazywanie populacji położonych na wysokościach 425-772 m n.p.m. populacjami górskimi. W Krakowie są punkty osiągające 350 m n.p.m., podobnie jak w Katowicach. Biorąc pod uwagę nawet najwyższe położone stanowisko (ponad 700 m), warunki tam występujące nie powinny być trudnymi dla życia *A. arenosa* - to raptem poziom Regła Dolnego w Tatrach. W przedstawionych w opublikowanym artykule parametrach meteorologicznych (Tabela 1), ani średnia temperatura, ani suma opadów, obie roczne, jak miemam, nie różnicują w żaden sposób istotnie populacji (górskie vs. nizinne), a przynajmniej zdaje się, że Doktorantka tego nie sprawdzała.

Uważam, że cel pracy powinien być inaczej sformułowany, w takim ujęciu „Celem badań było scharakteryzowanie ekofizjologii *Arabidopsis arenosa*” (s. 22) jest mało atrakcyjny i nie zawiera w sobie hipotezy badawczej, mimo, że hipotezy operacyjne znajdują się w opublikowanej pracy. Pomijam sformułowanie - błąd semantyczny. Nie można scharakteryzować ekofizjologii gatunku, bo ekofizjologia to nauka zajmująca się fizjologicznymi przystosowaniami gatunku/osobnika/populacji do środowiska.

Można prowadzić badania ekofizjologiczne wykorzystując jako model dany gatunek. Błędów tego rodzaju jest w pracy dużo więcej, przykładowo:

1/ Błędy logiczne: „Wskazuje to, że interakcja z grzybem ma korzystny wpływ na zarządzanie i dystrybucję toksycznych metali w tkankach roślinnych w celu zminimalizowania szkodliwego działania w korzeniach i detoksyfikacji w pędach.” (s. 20). Jest to błąd formalny, bo z przedstawionych przesłanek nie wynika, aby grzyb „działał” w celu zminimalizowania negatywnych skutków obecności metali. Podobnie: „Także wyższy poziom wskaźnika zawartości antocyjanów odnotowano w populacjach *A. arenosa* pochodzących ze stanowisk metalonośnych niż niemetalonośnych (rys.1), co wskazuje na zwiększoną tolerancję populacji metalonośnych na toksyczne działanie metali śladowych (Szopiński et al., 2020; Gieroń et al., 2021b, 2021a).” Zawartość antocyjanów może wskazywać na zwiększoną tolerancję, a nie wskazuje na nią bezpośrednio. Przeprowadzone badania wprost tego nie wykazały. Moją wątpliwość budzi sam tytuł, jego druga część – *badania terenowe i laboratoryjne nad mechanizmami hiperakumulacji*. Nie znalazłam w pracy doktorskiej ani w opublikowanych artykułach badań, które miałyby te mechanizmy opisywać. Doktorantka badała jedynie ilościowo zawartość metali w organach. Nie wiadomo co przyczynia się do tego, że populacje *A. arenosa* potrafią tolerować tak duże zawartości metali. Nie prowadzono badań metabolomicznych i transkryptomomicznych, czy choćby oznaczania poziomu ważnych metabolitów związanych z mechanizmami tolerancji/hiperakumulacji tj. kwasy organiczne, fitochelatyny. Błędem językowym jest również stosowanie w całej pracy hiperakumulacja/hyperakumulator zamiast hiperakumulacja/hyperakumulator.

2/ Błędy leksykalne: „Analiza porównawcza genomów populacji diploidalnych i autotetraploidalnych pozwoliła na wyodrębnienie 44 genów o rozbieżnej selekcji pomiędzy poziomami ploidalności, odpowiedzialnych za zdolność *A. arenosa* do stabilnej mejozy, a w konsekwencji do tworzenia pokoleń autotetraploidalnych populacji tego gatunku” (s. 11). Zdanie jest niezrozumiałe, niejasne, trzeba się domyślać intencji Autorki.

W wielu miejscach styl jest nienaukowy, np. „Obecnie odnotowano ok. 721 gatunków roślin, które wykazują hiperakumulację metali śladowych. Liczba ta stanowi 0,2% wszystkich znanych gatunków roślin, a nowych gatunków hiperakumulujących przybywa (Brooks, 1998; Baker, 2000; Kramer, 2010; Rascio i Navari-Izzo, 2011; van der Ent et al., 2013; Pollard et al., 2014; Reeves et al., 2018; Gieroń et al. 2021 a). Z tej grupy roślin (z której?) hiperakumulujące Cd i Zn wykazano głównie w rodzinie Brassicaceae oraz u kilku gatunków z innych rodzin, na przykład Crassulaceae (*Sedum alfredii*, *Sedum plumbizincicola*).”

Moje uwagi do poszczególnych części pracy doktorskiej są następujące:

1/ Wstęp: Mógł lepiej oddawać zawartość pracy doktorskiej. Powinno się znaleźć w nim więcej informacji o definicji hiperakumulacji, rozdzielnie jej od hipertolerancji, skoro szczególnie na to położony jest nacisk w pracy. Powinny znaleźć się definicje, dawki

metali, rodzaje hiperakumulatorów, przykłady. Doktorantka pisze o tym tylko w kilkunastu liniijkach na str. 12 pracy doktorskiej. Bezzasadnym w moim odczuciu jest zamieszczanie na trzech stronach szczegółowego opisu genów odpowiedzialnych za hiperakumulację i hipertolerancję zidentyfikowanych u innych gatunków, skoro ekspresja żadnego z nich nie została dotychczas potwierdzona u *A. arenosa*. Nie uważam za dobry pomysł stawianie 20 znaków zapytania przy 20 wymienionych genach (tabela 1 s. 17 w pracy doktorskiej). Niepotrzebny jest również cały podrozdział 1.4. *Tolerancja metali śladowych i interakcja z mikroorganizmami glebowym* (sic!). Doktorantka nie prowadziła badań nad wpływem endofitów na pobieranie metali u *A. arenosa*, więc ten rozdział jest niepotrzebny, a ewentualnie pewne informacje z niego mogły być się znaleźć w rozdziale poświęconym biologii gatunku lub tolerancji badanego gatunku na metale.

2/ Materiały i Metody w Eksperymentach I: Nie można odwoływać się do kilkunastolinijkowego opisu metody w opublikowanej pracy jedynie stwierdzeniem „Próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego CyFlow Space (Sysmex, Kobe, Japonia) jak w pracy Szopiński et al., 2020” (s. 24). Rzetelność naukowa nakazuje wskazanie przynajmniej jakie barwienie jąder zastosowano, jakie były wartości współczynnika CV, na ilu jądrach komórkowych dokonywano analiz, jak analizowano histogramy.

W przypadku opisu przygotowania próbek roślinnych do oznaczania zawartości metali Doktorantka powołuje się na dwie prace: Sitko et al., 2017 i Szopiński et al., 2020, po raz kolejny zmuszając czytelnika do poszukiwania i czytania długich fragmentów innych artykułów. Opis Materiałów i Metod jest chaotyczny, brakuje informacji czy rośliny były umyte i jeśli tak, to w jaki sposób – to bardzo ważne w pracy, która wykazuje zdolności hiperakumulacyjne roślin. W szczególności w świetle uzyskanych wyników. Analizując bowiem Tabelę 3 (s. 37), stwierdziłam, że wzrosty zawartości cynku po traktowaniach w stosunku do kontroli wynosiły maksymalnie dziesięć razy, natomiast w przypadku Cd nawet ponad dwa tysiące razy (wzrost z 1 µg/g do 2000 µg/g s.m.), co jest bardzo zaskakującym wynikiem. Niejasny jest sposób pobierania próbek. Co oznacza?: „W każdym miejscu pobrano 10 pojedynczych roślin (czy chodzi o stanowisko?, czemu pojedynczych?) z bryłką ziemi w celu ochrony systemów korzeniowych z 15 roślin, które zostały użyte do pomiarów zawartości barwników i fluorescencji (czego? czy chlorofilu?). Dodatkowo z każdego stanowiska pobrano 3 próbki gleby, które zostały wymieszane i uśrednione do dalszych analiz.” Co to znaczy? Czy, że z każdego stanowiska ostatecznie była jedna próba mieszana? Czy ta próba mieszana była poza tymi dziesięcioma, pobranymi spod roślin? Czy spod roślin już gleby nie pobierano?

W Materiałach i Metodach Eksperymentu I brakuje opisu (podrozdziału) *Analiza statystyczna*. Wykonywana była przecież analiza wariancji, analiza składowych głównych (PCA). Te informacje są tylko w opublikowanej pracy. Brakuje informacji w jakiej fazie rozwoju były rośliny, czy wszystkie były na podobnym etapie rozwoju? Próby były pobierane w maju, co nazywa Doktorantka połową sezonu wegetacyjnego

(s. 26). Wydaje mi się jednak, że maj to początek sezonu wegetacyjnego *A. arenosa*. Jest to istotne między innymi dlatego, że zawartość chlorofilu może się różnić w zależności od stadium rozwojowego roślin, inna może być na etapie młodych roślin, inna podczas kwitnienia czy owocowania.

W Materiałach i Metodach Eksperymentu II: Czy nasiona były poddawane stratyfikacji? Czy kiełkowały bez przechłodzenia? Wydaje mi się, że jest to niezbędny zabieg, aby uzyskać siewki *A. arenosa*. Czy zasadnym jest stosowanie jednoczynnikowej analizy wariacji w przypadku danych w których każdy parametr, np. zawartość antocyjanów jest określany przez minimum dwa czynniki, tj. populacja oraz rodzaj traktowania (Zn/Cd/0)? Oznaczenia literowe w Tabeli 1, str. 33 wskazują jakby nie każdy parametr morfometryczny był analizowany oddzielnie, a wszystkie razem. Czy tak było?

3/ Wyniki Eksperymentu I: czy wyliczono bezwzględną wielkość genomu w pg? Nie ma ani w pracy doktorskiej, ani w opublikowanym artykule żadnych informacji na ten temat poza lapidarnym stwierdzeniem: „Populacje z Polski charakteryzowały się zazwyczaj obecnością jądrowego DNA 4C.” Jest to błędnie sformułowane zdanie, przypuszczam, że chodziło o to, że uzyskane histogramy wskazywały na to, że większość jąder komórkowych miała zawartość DNA na poziomie 4C. Ale jaką? Czy tylko dokonywano porównywania względnych pików między sobą i na tej podstawie wnioskowano, który pik wskazuje poziom diploidalny, a który poliploidalny? Dlaczego nie oszacowano wielkości genomu, skoro zastosowano standard o znanej wielkości? Jeśli dobrze zrozumiałam, to wykazano endoploidalność roślin z populacji Wełnowiec. Mam wrażenie, że Doktorantka nie do końca wie i rozumie co mierzyła. Wnioskuje, na podstawie przedstawionych opisów, że poziom endoploidalności komórek, co zresztą już było opisane w rozdziale autorstwa Rostańskiego i współautorów w 2005 r. (Variability of *Cardaminopsis arenosa* (L.) HAYEK populations in areas polluted with heavy metals. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu A. Mickiewicza w Poznaniu. Red. Prus-Głowacki W. & Pawlaczyk E.M.) dla populacji z Miasteczka Śląskiego (i innych), a nie zostało przywołane/przedyskutowane przez Doktorantkę. Również Kurdziel i in. (2023; *Applied Sciences* 2023, 13(3): 1617) badała endoploidalność *A. arenosa* oraz ustalała wielkość genomu roślin z Bukowna.

Czytając wyniki rozdziału Eksperyment II można również odnieść wrażenie, że Doktorantka nie do końca rozumie istotę zastosowanych analiz statystycznych. Przykładowo, na str. 33 napisała: „Traktowanie Zn populacji diploidalnych (C i Su) istotnie zmniejszyło biomasę pędów i korzeni”. Analiza Tabeli 1 (str. 33 i 34) pozwala stwierdzić, że istotnie wpływało tylko na rośliny z populacji C (różne oznaczenia literowe - *ab* dla kontroli i *c* dla Zn w populacji C), natomiast nie wpływało na rośliny z populacji S (oznaczenia dla populacji S tego nie wskazują - *ab* dla kontroli i *bc* dla Zn – zatem brak różnic).

Kolejno, s. 35, 36: „Ponadto odnotowano, że w przypadku roślin nietraktowanych metalami obie diploidalne populacje (C i Su) wykazywały niższą zawartość Fe w pędach, w porównaniu do populacji z terenów zanieczyszczonych.” Jest to nieprawda

– z oznaczeń analizy statystycznej wynika tylko tyle, że najwięcej żelaza zawierały pędy roślin z Piekar Śląskich (51,1 $\mu\text{g/g}$) oraz z Miasteczka Śląskiego (43,8 $\mu\text{g/g}$). Zawartość Fe w pędach roślin z Piekar Śląskich różniła się istotnie od roślin z populacji K, C, Su, gdzie odnotowano najmniejsze średnie wartości; 38,78; 34,4; 35,93 $\mu\text{g/g}$ s.m. Przy tej okazji, pytanie, skąd pochodził Cd w korzeniach i pędach roślin nietraktowanych w Eksperymentie II w wartościach osiągających nawet 10 $\mu\text{g/g}$ s.m. Nie był dodawany do pożywki, nie jest jej składnikiem, również rośliny rosnące na glebach niezanieczyszczonych nie powinny go zawierać. I dalej, na przykład: „Zbadano również poziomu (sic!) akumulacji pierwiastków w korzeniach roślin traktowanych toksycznymi metalami śladowymi. Populacje z terenów zanieczyszczonych (MS, PS oraz K) wykazywały wyższą zawartość Cd w korzeniach w porównaniu do populacji z terenów kontrolnych.” Ponownie, nie jest to prawdą, bo populacja C (niemetaliczna) miała statystycznie tyle samo metali co populacje PS i MS (metaliczne) (s. 35, 37) (te same oznaczenia literowe – a).

Takich błędów interpretacyjnych jest kilka w tym podrozdziale. Nie można napisać, że „... najniższą wartość spośród wszystkich wariantów odnotowano dla korzeni kontrolnych roślin PS” (s. 35), bo ta populacja nie różni się od populacji Klucze (K). Należało więc napisać, że najniższe wartości stwierdzono w K i PS. Zaskakujące, że w rozdziale Wyniki Eksperyment II 3.3.3. *Zawartość barwników* Doktorantka już prawidłowo interpretuje wyniki analizy statystycznej. Jest to bardzo dobrze napisany rozdział. Poza drobnymi uchybieniami, wszystko napisane jest jasno i klarownie, bez błędów interpretacyjnych.

4/ Dyskusja: Jest to dobrze napisany rozdział. W mojej ocenie, brakuje jedynie rozważań jak zawartość chlorofilu koreluje z biomasą i ilością magnezu w glebie i roślinie oraz ogólnych podsumowań uzyskanych wyników i nakreślenia ich w szerszym kontekście.

5/ Streszczenie, które wg mnie powinno znaleźć się na początku, a nie na końcu pracy doktorskiej, świadczy o tym, że Doktorantka ma wciąż trudności z dokonywaniem syntezy uzyskanych wyników. Jest to prawie dwustronicowe, właściwie sekwencyjne streszczenie rozdziałów pracy doktorskiej.

Reasumując, ze względu na wszystkie moje uwagi, proszę aby Doktorantka podczas publicznej obrony, oprócz odniesienia się do postawionych zarzutów, zdefiniowała szczegółowo hiperakumulatora z uwzględnieniem cech/właściwości wewnątrz i między-populacyjnych. Ponieważ na str. 15. We Wstępie Doktorantka zakłada, że o wydajności PSII decyduje przede wszystkim miejsce depozycji metali, czyli ich bezpośredni wpływ, proszę o wyjaśnienie, czy metale muszą być bezpośrednio zaangażowane w reakcje, aby negatywnie oddziaływać na fotosystem II. Proszę również o wyjaśnienie jaka jest różnica między aklimatyzacją i adaptacją (s. 15).

Rozprawa doktorska zgodnie z Ustawą z dn. 18 lipca 2018 r. (art. 187) Dz. U. 2022 poz. 574 „... prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo

dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej...". W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej widać, że mimo licznych błędów, Doktorantka posiada dobrą, wystarczającą wiedzę do uzyskania stopnia Doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biologia. Posiada pewne braki metodyczne i/albo popełnione błędy wynikają z niedokładności. Doktorantka przeprowadziła wiele analiz, przebadła wiele osobników, słabiej lub gorzej poznała wiele metod badawczych z zakresu hodowli roślin, ekofizjologii, analizy statystycznej. Jak deklaruje również w opublikowanym artykule w rozdziale opisującym udział autorów, uczestniczyła również w planowaniu i opracowywaniu koncepcji badań (ang. *conceptualization*), potrafi zatem samodzielnie prowadzić badania. Ponadto, rzeczona ustawa mówi, że „Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego ...”. Praca Pani mgr Żanety Gieroń jest oryginalną, wartościową dla nauki. Dostarcza nowych, interesujących danych. Doktorantka uzyskała ciekawe wyniki, chociaż dosyć słabo, być może przez skromność, podkreśla ich ogólną wartość i znaczenie, zwłaszcza w szerszym kontekście. Według mnie, oprócz często podkreślanej hiperakumulacji w populacjach M i NM, istotnym jest również wykazanie w badaniach Doktorantki, że zmiany w tych pierwszych (w warunkach kontrolowanych, co świadczy o utrwalonych genetycznie różnicach międzypopulacyjnych) są dużo mniej wyraźne, niż w tych drugich. Wyraża się to w mniej istotnych spadkach zawartości chlorofilu, niewielkich wzrostach zawartości antocyjanów i flawonoli. Ponadto, uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego wywołane działaniem Zn i Cd są dużo mniejsze w roślinach z populacji M w porównaniu z NM.

Reasumując, ja niżej podpisana, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Żanety Gieroń pt. *Tolerancja i akumulacja metali ciężkich u Arabidopsis arenosa – badania terenowe i laboratoryjne nad mechanizmami hiperakumulacji* spełnia wymogi zawarte w Ustawie z dn. 18 lipca 2018 r. (art. 187) Dz. U. 2022 poz. 574 i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Żanety Gieroń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 08.09.2023 r.

Aneta Stawka