SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Warszawa, 4 września 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Żanety Gieroń pt.:
„Tolerancja i akumulacja metali ciężkich u *Arabidopsis arenosa* – badania terenowe i laboratoryjne nad mechanizmami hyperakumulacji”
przygotowanej pod kierunkiem promotora – dr. hab. Eugeniusza Małkowskiego, prof. UŚ
i promotora pomocniczego dr. Krzysztofa Sitko
w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie w dniu 30.06.2023 r. przez Radę Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach do pełnienia funkcji recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora Pani mgr Żanecie Gieroń zgodnie z art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2022 r., poz. 574, ze zm.).

Stwierdzam, że przedstawione mi dokumenty, tj. pismo przewodnie, rozprawa doktorska w wersji papierowej i nagranej na nośnik elektroniczny są kompletne i zostały przygotowane w sposób umożliwiający wydanie jednoznacznej opinii czy przedłożona rozprawa doktorska jest zgodna z wymogami określonymi w Ustawie.

Opis formalny rozprawy i sylwetka Doktorantki

Rozprawa doktorska Pani mgr Ż. Gieroń jest kompilacją dwóch spójnych tematycznie, anglojęzycznych artykułów naukowych oraz nieopublikowanych dotychczas wyników badań przedstawionych w formie opracowania naukowego w języku polskim. Dysertacja liczy 76 stron i składa się z następujących rozdziałów: (1) „Wstęp”, którego podstawę stanowi pierwsza publikacja Doktorantki, (2) „Eksperyment I. Ekofizjologia *Arabidopsis arenosa*, nowego hyperakumulatora Cd i Zn”, opisujący wyniki badań przedstawionych w drugiej publikacji, (3) „Eksperyment II. Właściwości fizjologiczne *Arabidopsis arenosa*

dr hab. Ewa Muszyńska-Sadłowska
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Instytut Biologii
Katedra Botaniki
ul. Nowoursynowska 159
02–776 Warszawa
+48 22 59 326 60
ewa_muszynska@sggw.edu.pl

pod wpływem traktowania Zn lub Cd w warunkach kontrolowanych", prezentujący nieopublikowane dane eksperymentalne uzyskane w warunkach kontrolowanych, (4) „Dyskusja" oraz (5) „Podsumowanie i wnioski", łączące ze sobą oba eksperymenty i wskazujące na ich najważniejsze osiągnięcia. Rozdziały pt. „Eksperyment I…" i Eksperyment II…' zostały przygotowane w sposób tożsamy, a ich poszczególne części zawierają po trzy podrozdziały zatytułowane: (i) cel, (ii) materiały i metody oraz (i) wyniki. Dodatkowo, rozprawa została opatrzona (6) streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz (7) spisem literatury.

Artykuły naukowe wchodzące w skład doktoratu ukazały się w 2021 roku w czasopismach notowanych w bazie Journal Citation Reports, tj. Plants oraz Journal of Hazardous Materials, których współczynniki oddziaływania IF_{2021} są bardzo wysokie i wynoszą odpowiednio 4,7 i 14,2. Czasopisma znajdują się w ministerialnym Wykazie Czasopism Naukowych i Recenzowanych Materiałów z Konferencji Międzynarodowych (Komunikat Ministra Edukacji i Nauki z dnia 17 lipca 2023 r.) z punktacją 70 dla Plants i 200 dla J Hazard Mat. W obu pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a dodatkowo w pracy pt. 'The Different Faces of *Arabidopsis arenosa*—A Plant Species for a Special Purpose' (Plants 10, 1342) zespół autorski to oprócz mgr Ż. Gieroń jedynie Promotorzy w postępowaniu doktorskim. Z kolei, praca pt. 'Ecophysiology of *Arabidopsis arenosa*, a new hyperaccumulator of Cd and Zn' (J Hazard Mater, 412, 125052) liczy 8 Autorów, co nie budzi zastrzeżeń, biorąc pod uwagę rangę J Hazard Mat. Niewątpliwie, publikacja wyników badań w tym czasopiśmie stanowi niepodważalne osiągnięcie Doktorantki i Współautorów. **Przytoczone artykuły zostały już zacytowane odpowiednio 3 i 13 razy** (wg bazy Scopus, stan na 24.08.2023r.), co wskazuje, że **podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest niezwykle aktualna, a opublikowane wyniki są cenione przez naukowców na całym świecie**.

Obok artykułów wchodzących w skład dysertacji, Pani mgr Ż. Gieroń jest współautorem 6 artykułów naukowych, których łączny IF zgodny z rokiem opublikowania wynosi 22,987, zaś liczba uzyskanych punktów MEiN - 590. Na dorobek Doktorantki składa się ponadto udział w 2 międzynarodowych konferencjach (w tym jeden z sukcesem - Jej poster został nagrodzony przez organizatorów konferencji), a także udział w 2 grantach finansowanych przez NCN i NCBR. Sama Doktorantka również dwukrotnie starała się o projekt badawczy dla naukowców bez stopnia doktora w konkursie 'Preludium', NCN (rok 2019 i 2020). Podczas studiów doktoranckich uczestniczyła także w kilku szkoleniach, m.in. z zakresu bioinformatyki czy mikroskopii elektronowej. Co więcej, Jej **Indeks Hirsha** jest wysoki jak na osobę dopiero rozpoczynającą karierę naukową i **wynosi 7**, zaś **liczba cytowań - 205** (wg bazy Scopus, stan na 24.08.2023r.). **Biorąc pod uwagę dorobek i wskaźniki naukometryczne mogę stwierdzić, że Pani mgr Ż. Gieroń jest obiecującym naukowcem, który nie tylko chętnie angażuje się w działalność naukową, ale także jest już rozpoznawalna w świecie nauki.**

Ocena merytoryczna rozprawy

Nowoutworzone składowiska odpadów po eksploatacji rud metali nieżelaznych to tereny porośnięte znikomą roślinnością lub jej zupełnie pozbawione. Na opisywanych nieużytkach,

naturalny rozwój pokrywy roślinnej jest bardzo powolny ze względu na panujące tam niekorzystne warunki siedliskowe, szczególnie wysoką zawartość pierwiastków metalicznych w podłożu. Jednakże, wraz z upływem czasu, te metalonośne podłoża są spontanicznie kolonizowane przez gatunki występujące tylko na nielicznych stanowiskach, jak i podgatunki i ekotypy gatunków pospolitych, które wykształciły określone adaptacje morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne, umożliwiające im przetrwanie w tym skrajnie nieprzyjaznym środowisku. Obszary poprzemysłowe są zatem atrakcyjne dla badaczy, gdyż właśnie tu można obserwować jak natura radzi sobie w warunkach ekstremalnych i badać procesy przystosowawcze organizmów. Szczególnie przydatne do tego celu mogą okazać się fakultatywne metalofity (tzw. pseudometalofity), czyli rośliny zdolne do wzrostu i rozwoju zarówno na terenach skażonych jak i niezanieczyszczonych metalami ciężkimi. Dzięki ich wykorzystaniu w eksperymentach możliwe jest porównanie odpowiedzi na czynnik stresowy różnych genotypów tego samego gatunku, reprezentujących populacje występujące w różnych warunkach siedliskowych. Przedstawiona do oceny dysertacja poświęcona jest temu zagadnieniu i prezentuje wyniki porównujące parametry biometryczne i fizjologiczne oraz zawartości jądrowego DNA między populacjami *Arabidopsis arenosa,* rosnącymi na stanowiskach naturalnych, które różnią się między sobą stopniem zanieczyszczenia podłoża i położeniem nad poziomem morza (rozdział 'Eksperyment I'), jak i wybranymi populacjami uprawianymi hydroponicznie w obecności cynku lub kadmu ('Eksperyment II'). W mojej ocenie, to nowatorskie podejście do badań prezentowane przez Doktorantkę może prowadzić do poznania i wyznaczenia mechanizmów nie tylko tolerancji adaptacyjnej, rozwijającej się w wyniku wieloletniego oddziaływania metali na rośliny, ale także tolerancji konstytutywnej, występującej we wszystkich populacjach danego gatunku, niezależnie od obecności stresora w ich środowisku. Z tego względu, podjęta w niniejszej rozprawie **tematyka jest niezwykle ważna i wpisuje się w nurt światowych trendów badawczych z zakresu biologii stresu**.

Rozdział 1 „Wstęp" powstał na podstawie artykułu Gieroń i in. 'The Different Faces of *Arabidopsis arenosa*—A Plant Species for a Special Purpose' (Plants, 2021a 10, 1342) i obejmuje 4 podrozdziały. Prezentuje charakterystykę botaniczną i miejsce występowania obiektu badań, a także przedstawia *A. arenosa* jako modelowy gatunek do badania zjawiska autopoliploidyzacji. Opisuje zdolność *A. arenosa* do hyperakumulacji cynku i kadmu, a także jego przystosowania do wzrostu w obecności metali ciężkich, które zestawia głównie z blisko spokrewnionym gatunkiem – *A. halleri* oraz innymi przedstawicielami z rodziny Brassicaceae – *Alyssum montanum* i *Noccaea caerulescens*. W ostatniej części, podkreśla znaczenie mikroorganizmów w reakcji roślin na stres środowiskowy. Tytuł tego podrozdziału „Tolerancja metali śladowych i interakcja z mikroorganizmami glebowymi" wydaje się być jednak mało adekwatny do treści, która jest bardzo ogólnikowa i w dużej mierze skupia się na omówieniu oddziaływania tylko jednego rodzaju grzyba z pominięciem innych ważnych grup mikroorganizmów. W Rozdziale 1 znajdują się trzy ryciny i jedna tabela zaadaptowane z publikacji Gieroń i in. 2021a, które zostały zmienione. Trudno jednak zauważyć, na czym te zmiany polegają (szczególnie w przypadku fotografii); samo ich przetłumaczenie na język polski w moim odczuciu nie wprowadza żadnych modyfikacji. Rozumiem zamysł Doktorantki, aby Rozdział 1 bazował jedynie na opublikowanej przez Nią pracy

przeglądowej. W efekcie pozostawia on jednak pewien niedosyt informacyjny, związany na przykład z brakiem charakterystyki stanowisk, z których pobierano próby roślin do badań (z uwzględnieniem rysu historycznego, rodzaju prowadzonej działalności przemysłowej w poszczególnych rejonach, poziomu zanieczyszczenia podłoża metalami, itp.). Niewiele miejsca poświęcono również kryteriom, jakie muszą zostać spełnione, aby dany gatunek uznać za hyperakumulatora metali. **Chciałabym prosić Autorkę pracy, aby podczas publicznej obrony wyjaśniła na czym polega hyperakumulacja, zgodnie z najnowszą literaturą z tego zakresu.** Często jest to pojęcie nadużywane w publikacjach; niepoprawnie zastosowano je także w ocenianej dysertacji do określenia zdolności roślin uprawianych hydroponicznie do gromadzenia metali (str. 34).

Rozdział 2 „Eksperyment I. Ekofizjologia *Arabidopsis arenosa*, nowego hyperakumulatora Cd i Zn" przedstawia wyniki badań terenowych opublikowanych w artykule Gieroń i in. pt. 'Ecophysiology of *Arabidopsis arenosa*, a new hyperaccumulator of Cd and Zn' (J Hazard Mater, 2021b, 412, 125052). Wyróżniono w nim 3 podrozdziały. Cel pracy (podrozdział 1) został jasno sprecyzowany, jakkolwiek zbędny jest tu akapit dotyczący miejsca prowadzenia badań i zastosowanych metod. Podrozdział 'Materiały i metody' wymienia stanowiska badawcze, opisuje metody analizy kondycji aparatu fotosyntetycznego, zawartości metali ciężkich w materiale roślinnym i glebie oraz poziomu ploidalności. Trzeci podrozdział 'Wyniki' rozpoczyna się od przedstawienia według Doktorantki rezultatów „analizy fizykochemicznej gleby", choć w rzeczywistości prezentuje jedynie zawartości wybranych pierwiastków w podłożu, a więc charakteryzuje tylko jeden parametr chemiczny (i żadnego fizycznego). Największym mankamentem tego podrozdziału, znacznie utrudniającym percepcję przygotowanej rozprawy, jest brak dołączenia rycin i tabel, do których odwołuje się Doktorantka w swojej dysertacji. Dodatkowo, robi to dość nieprecyzyjnie, przytaczając pracę 'Gieroń et al. 2021', choć posiada 2 publikacje z pierwszym autorstwem w roku 2021. Przy okazji, obie publikacje (tj. Gieroń i in. 2021a i b) są pracami zespołowymi, więc w moim odczuciu do doktoratu dobrze byłoby dołączyć oświadczenia współautorów, dotyczące udziału poszczególnych osób w przygotowaniu każdej pracy. Tymczasem, jedynie na podstawie deklaracji złożonych w publikacjach można wnioskować o roli Doktorantki w ich powstawaniu. Biorąc pod uwagę dość podobny zakres aktywności Doktorantki i dr. K. Sitko w pracy J Hazard Mater **chciałabym zapytać, która część koncepcji badań jest autorstwa Doktorantki oraz jakie konkretnie analizy zostały przez Nią wykonane do tej publikacji**.

Struktura Rozdziału 3. zatytułowanego „Eksperyment II. Właściwości fizjologiczne *Arabidopsis arenosa* pod wpływem traktowania Zn lub Cd w warunkach kontrolowanych" jest analogiczna do rozdziału poprzedniego. Analogiczne są również moje uwagi dotyczące podrozdziału 'Cel'. W związku z tym, że cały rozdział 3 dysertacji prezentuje dotychczas nieopublikowane wyniki doświadczeń, na końcu podrozdziału 'Cel' oczekiwałabym postawienia hipotezy lub hipotez badawczych, które miałyby być weryfikowane. Wobec powyższego, **chciałabym zachęcić Doktorantkę, aby podczas publicznej obrony zmierzyła się z tym wyzwaniem i zaproponowała post factum hipotezy badawcze do Eksperymentu II.**

Doświadczenie przeprowadzono na osobnikach reprezentujących 5 populacji *A. arenosa*, które wybrano spośród czternastu badanych w pierwszym etapie eksperymentu. Chciałabym zapytać, **czym kierowała się Doktorantka przy ich wyborze? Czy na terenie naszego kraju występują niemetalotolerancyjne populacje tego gatunku, które można byłoby wykorzystać w badaniach zamiast zagranicznych? Zważywszy, że formy tetraploidalne *A. arenosa* spotykane są w Europie, między innymi w Słowenii i Francji, zaciekawiło mnie również dlaczego nie wzięto ich pod uwagę do porównań z tetraploidalnymi osobnikami populacji metalotolerancyjnych.** Następna część rozdziału została napisana w sposób poprawny i dotyczy opisu schematu doświadczenia oraz zastosowanych metod badawczych. Przygotowując manuskrypt do publikacji proponowałabym jednak doprecyzować, co oznacza: rośliny podlewano ‘zmodyfikowaną pożywką hydroponiczną MS’, ‘w pełni rozwinięty liść’ czy pomiary przeprowadzono ‘pod koniec eksperymentu’. Wyniki przedstawione są na ponad czternastu stronach, zestawione w pięciu tabelach i na trzech rycinach, które w większości składają się z dodatkowych co najmniej dwóch części. Choć ich liczba wydaje się być niewielka, dostarczają wielu istotnych informacji na temat parametrów wzrostu roślin kontrolnych i traktowanych jonami cynku lub kadmu w uprawie hydroponicznej, zawartości wybranych pierwiastków w ich organach, akumulacji chlorofilu i wybranych grup związków fenolowych, a także parametrów wymiany gazowej i fluorescencji chlorofilu *a*. Mam jednak pewne zastrzeżenia co do ich opisu, w którym panuje niewielki chaos. Po pierwsze, odwołania do tabel (i częściowo rycin) są mylące, co prawdopodobnie wynika z ich nieprzemyślanej numeracji w całej pracy. W efekcie niezależnego numerowania tabel w każdym rozdziale, przykładowo, pojawiają się aż trzy tabele 1 – dwie z nich znajdują się w ocenianej dysertacji na stronach 17 i 33, zaś trzecia stanowi tabelę pierwszą publikacji w J Hazard Mat., a jej istnienie zostało wspomniane w opisie na stronie 22. Z kolei ryciny wydają się być ponumerowane w sposób ciągły z Rozdziałem 1 dysertacji, jednakże z pominięciem Rozdziału 2 (więc znów dwukrotnie pojawiają się odwołania do ryciny 1, choć ten przypadek może być dyskusyjny, gdyż w artykule występuje rycina ‘1A’ i ‘1B’ a nie tylko 1). Po drugie, kolejność opisu wyników powinna być spójna z kolejnością ich prezentacji w tabeli/na rycinie, a także wszystkie zaprezentowane w nich dane powinny zostać omówione (obu tych warunków nie spełnia część pracy dotycząca akumulacji pierwiastków). Przygotowując publikacje z wyników uzyskanych w tym eksperymencie, sugerowałabym również zwrócić większą uwagę na to, co określa się mianem ‘kontroli’. Z jednej strony Autorka dysertacji poprawnie nazywa kontrolą brak traktowania metalami, z drugiej zaś pisze o ‘roślinach kontrolnych w traktowaniu metalami’ (np. str. 34). Mam również pewne zastrzeżenia co do interpretacji wyników analizy statystycznej. Jeśli różnice między badanymi parametrami nie są istotne statystycznie, nie powinno się używać sformułowań porównawczych typu wyższy/niższy; dłuższy/krótszy, itp., gdyż wartości parametrów są sobie równe (przykładowo, str. 33, 38). Z drobniejszych uwag, zauważyłam brak wyjaśnienia skrótu BDL w podpisie tabeli 2 i 3 (str. 36-37) oraz znaczenia kolorów w podpisie tabeli 5 (str. 44).

Kolejny rozdział stanowi „Dyskusja”, składająca się z 5 podrozdziałów. Struktura rozdziału jest logiczna, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki, która rzeczowo dokonała interpretacji uzyskanych wyników i przedstawiła je na tle prac innych autorów. Nie znalazłam

jednak odniesienia do parametrów wymiany gazowej, które analizowane były w ramach Eksperymentu II. Moje zainteresowanie wzbudził natomiast termin 'hormeza' na określenie stymulującego działania kadmu na przyrost biomasy pędów roślin populacji z Miasteczka Śląskiego**. Chętnie poznam opinię Doktorantki na temat tego zjawiska, które być może jest pośrednim dowodem na to, że niskie stężenia pierwiastków toksycznych odgrywają ważną funkcję fizjologiczną u roślin, które w toku ewolucji przystosowały się do wzrostu i rozwoju w ich obecności.**

W rozdziale „Podsumowanie i wnioski" Autorka dysertacji w sposób zwięzły przedstawiła najważniejsze osiągnięcia eksperymentów, dotyczące cech morfologicznych i fizjologicznych różnicujących populacje diploidalne od tetraploidanych podczas ich wzrostu w warunkach naturalnych, jak i odpowiedzi osobników populacji z terenów niemetalonośnych i metalonośnych na aplikowane dawki jonów cynku lub kadmu w uprawie hydroponicznej. To nasunęło mi **pytanie do Doktorantki o przedstawienie możliwości aplikacyjnego wykorzystania uzyskanych rezultatów oraz wskazanie dalszych kierunków badań, które warto byłoby podjąć/kontynuować w przyszłości.**

W ocenianej rozprawie doktorskiej wykorzystano zarówno oryginalne, jak i przeglądowe artykuły naukowe o tematyce ściśle powiązanej z prezentowanymi doświadczeniami. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż tylko 1 spośród 119 pozycji literatury jest polskojęzyczna, co znacznie podnosi wartość pracy i wskazuje na swobodne posługiwanie się naukowym językiem angielskim przez Doktorantkę.

Chociaż rozprawa doktorska została napisana poprawną polszczyzną w sposób przejrzysty, Autorka pracy nie uniknęła drobnych błędów edytorskich, skrótów myślowych czy niewłaściwych sformułowań, wśród których można wymienić: populacje metalonośne (choć termin odnosi się do podłoży i obszarów zasobnych w metale; str. 34), pseudometalofit fakultatywny (pleonazm; str. 48), stanowiska naturalne oraz zanieczyszczone metalami (choć oba występują „w naturze"; str. 49), formy tertraploidalne (zamiast tetraploidalne; str. 51), scharakteryzowanie ekofizjologii (choć jest to nauka).

Podsumowując, przedstawione powyżej uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji i moją pozytywną ocenę rozprawy Pani mgr Ż. Gieroń. Przeprowadzone badania objęły zarówno doświadczenia w warunkach naturalnych, jak i laboratoryjnych oraz wymagały opanowania wielu technik badawczych. Dzięki temu, uzyskane przez Doktorantkę **wyniki są cenne i wnoszą wiele nowych informacji naukowych do badań nad adaptacjami roślin do środowiska zanieczyszczonego metalami ciężkimi.** Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki w ocenianej rozprawie uważam:

- przebadanie aż 14 populacji o różnym poziomie tolerancji, w tym 7 populacji zasiedlających tereny niemetalonośne Węgier i Słowacji oraz 7 populacji rosnących w Polsce na obszarach o podwyższonej zawartości metali ciężkich;

- zaklasyfikowanie *A. arenosa* jako nowego hyperakumulatora cynku i kadmu, dzięki czemu gatunek ten dołączył do nielicznej grupy roślin o niezwykłych właściwościach gromadzenia ponadnormatywnych stężeń metali w pędach;
- powiązanie zdolności *A. arenosa* do hyperakumulacji metali z poliploidyzacją genomu;
- wykazanie wyższej tolerancji na cynk lub kadm osobników populacji z terenów zanieczyszczonych metalami w porównaniu do populacji porastających obszar nieskażony.

Wniosek końcowy

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Żanety Gieroń, stwierdzam, że jest to opracowanie spełniające warunki 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 doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Żanety Gieroń do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.