

prof. dr hab. inż. Rafał Barański
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.:

„Metal accumulation and tolerance to zinc and lead of suspension-cultured cells of selected *Viola* L. species from metalliferous and non-metalliferous soils – constitutive tolerance to heavy metals in the genus *Viola*”

autor rozprawy:

mgr Klaudia Sychta

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze zbioru czterech artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opisem w języku angielskim zawierającym krótkie wprowadzenie, cele badań, hipotezy badawcze, opisy poszczególnych artykułów, zbiorczą dyskusję uzyskanych wyników, wnioski i konkluzję. Rozprawę uzupełnia spis cytowanej literatury oraz streszczenia w języku angielskim i polskim. Ponadto dołączone są oświadczenia współautorów artykułów naukowych o ich wkładzie w powstanie publikacji.

Artykuły naukowe z wynikami badań są opublikowane w języku angielskim w trzech czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, indeksowane w najważniejszych bazach bibliometrycznych, rozpowszechniających wyniki prac z zakresu nauk o roślinach (Plant sciences) tj. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, Plant Physiology and Biochemistry (2 artykuły) oraz Environmental and Experimental Botany. Czasopisma te publikują artykuły w zakresie dyscypliny biologia (wynika to także z przypisania tych czasopism do dyscyplin naukowych jakiego dokonało Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w 2019 r.). Jak zostanie wykazane w dalszej części recenzji, zamieszczone w rozprawie artykuły stanowią spójny tematycznie zbiór stanowiący oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Z uwagi na fakt, że artykuły te są wieloautorskie, istotne jest zweryfikowanie indywidualnego wkładu Autorki rozprawy. Mgr Klaudia Sychta jest współautorem w każdym z załączonych artykułów, wymieniona zawsze jako pierwsza w spisie autorów, a w trzech z nich wymieniona jako autor korespondencyjny, co wskazuje na jej znaczący wkład w powstanie wszystkich publikacji. Do rozprawy dołączone zostały oświadczenia Autorki rozprawy i współautorów artykułów o ich wkładzie w wykonanie badań oraz przygotowanie każdej z publikacji. Ich analiza jednoznacznie wskazuje, że mgr Klaudia Sychta miała indywidualny wkład (oszacowany na poziomie 70-77% w zależności od artykułu) w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników, a także przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Oświadczenia Autorki rozprawy są zgodne z oświadczeniami współautorów artykułów oraz są zgodne z informacjami o wkładzie współautorów opublikowane w artykułach.

Podsumowując mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymagania formalne.

Opis i ocena części merytorycznej rozprawy

Część merytoryczna rozprawy obejmuje: cztery artykuły naukowe opatrzone wspólnym krótkim czterostronicowym wprowadzeniem (General introduction), cel i hipotezy badawcze, opis wykorzystywanych materiałów roślinnych i schematycznie zaprezentowany układ doświadczalny. Sformułowanych sześć (w rozprawie jest błąd w numeracji) głównych problemów badawczych omawianych jest w trzech wyodrębnionych rozdziałach, z których każdy obejmuje krótkie 1-3 stronicowe przybliżenie treści artykułu naukowego stanowiącego właściwą część rozdziału, przy czym rozdział I obejmuje dwa artykuły, a pozostałe rozdziały po jednym artykule. Dyskusja uzyskanych wyników prowadzona wspólnie dla wszystkich rozdziałów obejmuje wraz z konkluzją kolejne cztery strony i stanowi raczej podsumowanie wyników. Część merytoryczną kończy siedem głównych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Dołączony spis literatury obejmuje ponad 80 pozycji anglojęzycznych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych, z czego znaczna część w ostatnich dwóch dekadach.

Wprowadzenie przybliży problem skażenia gleb metalami ciężkimi i opis występowania gatunków roślin tolerancyjnych i podatnych na skażenia tego rodzaju. Autorka rozprawy definiuje podstawowe pojęcia związane z tematyką m.in. rozróżniając metalofity i niemetalofity, metalofity obligatoryjne, fakultatywne i przygodne oraz wskazuje główne strategie tolerancji roślin na obecność skażeń glebowych. W dalszej części przedstawia gatunki zdolne do wzrostu w warunkach skażenia gleby metalami ciężkimi, w tym gatunki z rodzaju *Viola* wskazując na ich zróżnicowaną klasyfikację w zależności od miejsca występowania. Obie wymienione części wprowadzenia dostarczają podstawowej wiedzy niezbędnej do zrozumienia problematyki rozprawy i doboru materiału roślinnego wykorzystywanych w badaniach przez Autorkę. Odrębny akapit opisuje przykłady wykorzystania kultur zawiesin komórkowych *in vitro* do badania tolerancji komórek na traktowanie substancjami egzogennymi oraz wymienia podstawowe metody oceny wpływu tych substancji na żywotność komórek. Opis ten odnosi się do wszystkich rozdziałów rozprawy, gdyż Autorka wykorzystuje kultury zawiesinowe do oceny oddziaływania metali ciężkich na komórki pozyskane z roślin gatunków *Viola* we wszystkich czterech artykułach. Wprowadzenie oparte o licznie cytowaną literaturę wskazuje, że Autorka rozprawy posiada wiedzę w zakresie przedstawianej problematyki, niemniej jednak uważam, że ta część rozprawy mogłaby być bardziej szczegółowo opisana, przede wszystkim w zakresie dotychczasowej wiedzy dotyczącej mechanizmów tolerancji roślin, zwłaszcza należących do rodzaju *Viola*, na skażenia gleby oraz charakterystyki głównej metody oznaczania żywotności komórek wykorzystywanej we wszystkich doświadczeniach opisywanych przez Autorkę rozprawy, tj. metody alamarBlue. Pewne informacje znajdują się w dołączonych artykułach lecz są one skrótowe i fragmentaryczne i zwykle ograniczone do odwołań do innych opracowań, co uniemożliwia uzyskanie pełnego obrazu omawianych zagadnień bez sięgania do dalszych źródeł. Pewną niezręcznością tego fragmentu rozprawy jest także sformułowanie o wskazaniu korelacji między reakcją roślin i komórek wybranych gatunków (str. 14), a także wskazanie znaczenia wyników na rozwój nauki i praktycznego wykorzystania (str. 17). Sformułowania te odnoszą się do uzyskanych wyników, a zatem powinny być przedstawione nie we wprowadzeniu czy opisie metod lecz w dyskusji lub konkluzji rozprawy.

Cel badań został jasno sformułowany. Szczegółowe pytania jakie stawia Autorka w dalszej kolejności wskazują jednak na znacznie szerszy zakres badań jakie zrealizowała niż ten wynikający z przedstawionego celu pracy. Znajduje to potwierdzenie w rozdziałach II i III

rozprawy, w których opisane zostały badania nad poznaniem wybranych elementów mechanizmu tolerancji na metale. Nie widzę powodu dla którego badanie mechanizmów tolerancji nie zostało ujęte przez Autorkę jako drugi główny cel, a potraktowane na równi z innymi bardziej szczegółowymi aspektami badań. Niemniej jednak wszystkie cele badań postawione przez Autorkę rozprawy uważam za w pełni uzasadnione i ważne.

Wyniki badań nad tolerancją gatunków *Viola* zebrane są w trzech rozdziałach ściśle ze sobą związanych zarówno pod względem tematycznym jaki i wykorzystywanych metod. Dotyczą one jednak odrębnych problemów badawczych. Elementem wspólnym jest poddanie badanych układów biologicznych działaniu związków zawierających ołów lub cynk, dwóch metali zaliczanych, w zależności od przyjętej nomenklatury, do grupy metali ciężkich, które wykazują efekt toksyczny na rośliny, i tym samym ich komórki, zwłaszcza gdy występują w wysokich stężeniach w środowisku. Skażenie gleb metalami ciężkimi wynikające zarówno z naturalnego występowania tych pierwiastków jak i działania antropogenicznego jest poważnym problemem powszechnie identyfikowanym na świecie. W Polsce również obszary skażone metalami ciężkimi występują i są identyfikowane głównie w silnie zindustrializowanych regionach, w pobliżu kopalń i hut gdzie składowane są rudy metali, odpady wydobywcze i poprodukcyjne. Skażenia te stanowią zagrożenie dla środowiska, zdrowia zwierząt i ludzi. Skażone tereny wymagają remediacji i rekultywacji, a dobór gatunków roślin zdolnych do ich zasiedlania i fitoremediacji jest kluczowy dla powodzenia procesu przywracania bioróżnorodności i równowagi ekosystemów. Rośliny należące do rodzaju *Viola* występują na terenach o wysokich stężeniach Zn i Pb, mają one zatem zdolność do wzrostu w podłożu pomimo występujących w nim związków, które są toksyczne dla większości innych gatunków. Autorka recenzowanej rozprawy doktorskiej podjęła się badań mających na celu określenie, czy istnieje zróżnicowanie pomiędzy gatunkami *Viola* w ich tolerancji na wysokie stężenia Zn i Pb i czy ewentualne różnice powiązane są z występowaniem tych gatunków jakie obserwuje się na terenach skażonych lub nieskażonych.

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem kultur zawiesin komórkowych utrzymywanych *in vitro*, tj. w warunkach kontrolowanych właściwości fizyko-chemicznych podłoża, temperatury i oświetlenia. Tym samym, w odróżnieniu od badań przeprowadzanych na roślinach w uprawie glebowej, wykorzystano układ doświadczalny, w którym oddziaływanie czynników losowych na komórki zostało zmarginalizowane, a jedynymi czynnikami zmiennymi była ekspozycja na Zn i Pb dodawane do podłoża w różnych stężeniach. Reakcja komórek na działanie tych metali była oceniana po 24, 48 i 72 godzinach poprzez określanie frekwencji przeżywających komórek.

W rozdziale I rozprawy przedstawione są wyniki badań metodycznych zmierzających do opracowania właściwych warunków prowadzenia doświadczeń. Autorka rozprawy testowała różne kombinacje regulatorów wzrostu do indukcji tkanki kalusowej z siewek roślin *Viola*. W efekcie wybrała najkorzystniejszą pożywkę, której użycie pozwoliło uzyskać kalus u wszystkich badanych gatunków. Tkanka ta stanowiła materiał wyjściowy do założenia komórkowych kultur zawiesinowych. Wytypowany został także jeden spośród trzech porównywanych testów oceny żywotności komórek. Test alamarBlue został uznany przez Autorkę rozprawy za bardziej wiarygodny niż ocena w oparciu o stosowanie diocjanu fluoresceiny czy barwienie błękitem trypanu z uwagi na możliwość uzyskania wyniku nawet z kilku tysięcy komórek. Test alamarBlue był następnie konsekwentnie wykorzystywany we wszystkich kolejnych doświadczeniach, co dodatkowo pozwala na dokonanie porównań uzyskiwanych wyników, choć z oczywistą ostrożnością przy braku układu referencyjnego.

Dodatkowo Autorka rozprawy wykazała, że dodawanie Pb do pożywki mineralnej w formie soli azotanowej powoduje wytrącanie się związków Pb i mętnienie pożywki oraz, że następuje obniżanie pH pożywki wraz ze zwiększaniem stężenia dodawanego związku Pb. Aby wyeliminować dodatkowe zmienne w doświadczeniu mogące oddziaływać na komórki, Autorka rozprawy zaproponowała modyfikację warunków doświadczenia poprzez wprowadzanie równoważnych ilości NaOH celem utrzymania pH na stałym poziomie, takim samym jak w kontroli, niezależnie od ilości dodanego $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Znaczącą konkluzją badań z dodatkiem Pb do pożywki było stwierdzenie, że toksyczny efekt Pb uwidaczniał się tylko gdy pH podłoża pozostawało na wysokim poziomie tj., ok. 5,7. Choć nie było to przedmiotem dalszych dociekań i doświadczeń, Autorka rozprawy tłumaczy to zjawisko ograniczoną zdolnością roślin do pobierania Pb z zakwaszonego podłoża, na podstawie obserwacji u innych organizmów.

Dla realizacji głównego celu badań tj., określenia czy poziom tolerancji *Viola* na wysokie stężenia Zn i Pb jest zróżnicowane w obrębie rodzaju, Autorka rozprawy pozyskała nasiona roślin reprezentujących cztery gatunki. Były to: gatunek obligatoryjnie metalofityczny – *V. lutea* ssp. *westfalica* (VW) występujący na stanowisku silnie skażonym Zn i Pb, fakultatywny metalofit – *V. tricolor* reprezentowany przez odrębne populacje, jedna (populacja VTH/MET) pozyskana z terenów skażonych metalami ciężkimi i druga ze środowiska nieskażonego (VTZ/NMET), oraz dwa gatunki ze stanowisk nieskażonych tj., przygodny metalofit *V. arvensis* (VA) i niezaliczany do metalofitów *V. uliginosa* (VU). Z założenia populacje te mogły zatem wykazywać różny stopień tolerancji na metale ciężkie gdyż występowały na stanowiskach o zróżnicowanym stopniu skażenia gleby. Autorka rozprawy wykazała, że komórki wszystkich badanych gatunków, zarówno tych występujących na terenach skażonych jak i nieskażonych, wykazywały tolerancję na wysokie stężenia obu metali, gdyż część z nich przeżywała w takich stresowych warunkach. Wykazała także dzięki użyciu spektroskopii absorpcji atomowej, że komórki akumulowały znaczne ilości Zn i Pb, przy czym akumulacja Pb była silniejsza niż Zn. Ponadto komórki okazały się hiperakumulatorami zdolnymi do akumulacji pierwiastków w znacznie wyższych stężeniach niż stężenie występujące w pożywce. Stosując transmisyjną mikroskopię elektronową wykazała ponadto, że oba pierwiastki były akumulowane głównie w ścianach komórkowych i wakuolach, co było powiązane z zaburzeniami przy formowaniu się ścian komórkowych po podziałach, a Pb także w jądrach komórkowych i cytoplazmie niektórych komórek. Te nowatorskie wyniki wskazują, że w komórkach *Viola* mechanizm tolerancji polega na kompartmentalizacji Zn i Pb do organelli komórkowych i tym samym ich unieruchamianiu, co może być rozpatrywane jako element detoksyfikacji.

W rozdziale II opisane zostały badania nad selekcją komórek *A. arvensis* w obecności wysokich stężeń Zn i Pb, a następnie ich stymulacja do podziałów i rozwoju w rośliny. Autorka wykazała, że część komórek nie tylko przeżywa w warunkach stresowych, ale utrzymuje zdolności do podziałów. Uzyskała rośliny na drodze organogenezy, które skutecznie zaaklimatyzowała do warunków *ex vitro*. Rośliny były płodne i wytworzyły nasiona. Ciekawym aspektem było wykazanie, że frakcja komórek w kulturach zawieszinowych pozyskanych z regenerantów wykazująca tolerancję na Pb, określana na podstawie oceny żywotności komórek, była większa (o ok. 12%) niż w przypadku komórek roślin wyjściowych. Może mieć to znaczenie dla potencjalnej możliwości podniesienia tolerancji *Viola* na skażenie Pb na drodze selekcji *in vitro*. Różnica taka nie była jednak obserwowana w przypadku selekcji w obecności Zn. Badania uzupełniała analiza regenerantów i roślin wyjściowych pod

względem zmian na poziomie genomu przy użyciu cytometrii przepływowej oraz zmian genetycznych na poziomie DNA określanych na podstawie analizy polimorfizmu produktów amplifikacji przy wykorzystaniu markerów ISSR. Autorka rozprawy konkluduje te analizy brakiem występowania zmienności somaklonalnej wśród regenerantów.

Rozdział III poświęcony został głębszemu poznaniu mechanizmu tolerancji. W badaniach komórek roślin *V. tricolor* ze stanowiska nieskażonego zastosowano metodę detekcji fragmentacji DNA tzw. metodę TUNEL do określenia częstości komórek, u których nastąpiła programowana śmierć (PCD) pod wpływem wysokich stężeń Zn i Pb. Wyniki wskazały, że apoptoza występowała częściej u komórek traktowanych Zn niż traktowanych Pb. Ponadto, analiza wyników hybrydyzacji typu Western i hybrydyzacji ligandów z wykorzystaniem inhibitorów enzymów podobnych do kaspaz ukazała, że w procesie apoptozy istotną rolę odgrywała aktywność proteaz cysteinowych podobnych do papainy. Tym samym potwierdzony został jeden z molekularnych mechanizmów oddziaływania badanych metali na komórki i reakcji obronnej polegającej na inicjacji apoptozy skutkującej śmiercią uszkodzonych komórek.

Rozdział zatytułowany General discussion stanowi krótkie podsumowanie wyników wszystkich trzech rozdziałów. W opinii recenzenta dyskusja powinna być bardziej wnikliwa i uwzględniać ocenę zgodności wyników żywotności komórek uzyskanych tą samą metodą dla tego samego gatunku, a opisywanych w różnych publikacjach (*V. tricolor* artykuł I vs. II vs. III, *V. arvensis* artykuł II vs. III vs. IV) oraz znaczenie uzyskanych wyników nad reakcją opisaną w układzie komórkowym w kontekście wiedzy o mechanizmach reakcji roślin *Viola* na skażenie gleby metalami ciężkimi do czego powrócę w dalszej części recenzji.

Uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie wniosków i odpowiedzi na postawione we wstępie rozprawy pytania szczegółowe, a także wskazują, że cel badań został zrealizowany. W tym duchu prowadzona jest krótka dyskusja podsumowująca wyniki opisane w trzech rozdziałach i wskazująca na ich znaczenie. Całość zamyka wykaz siedmiu wniosków znajdujących uzasadnienie w prezentowanych wynikach. Wyjątkiem jest wniosek nr 4 dotyczący *V. arvensis*, a niejednoznaczne sformułowanie wskazuje, że dotyczy wszystkich badanych gatunków *Viola*. W opinii recenzenta nieprecyzyjny jest także wniosek nr 5, w którym Autorka stwierdza, że komórki regenerantów *V. arvensis* uzyskanych po selekcji komórek w obecności Pb miały większy poziom tolerancji niż komórki roślin wyjściowych. Wniosek ten dosłownie odzwierciedla sformułowania jakie pojawiają się w artykule i jego opisie zamieszczone w rozdziale III. W prezentowanych badaniach poziom tolerancji na metale ciężkie był określany na podstawie oceny żywotności komórek. Przyjęta metodyka pozwala na określenie wielkości frakcji komórek zdolnych do przeżycia lub obumarłych w wyniku krótkotrwałego (do 3 dni) stresu. Możliwe było zatem stwierdzenie, że 12% więcej komórek tolerowało obecność wysokiego stężenia Pb w pożywce, a nie że tolerancja komórek wzrosła o 12%.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie uważam:

1. wykazanie wpływu pH środowiska na toksyczność Pb określaną na podstawie oceny żywotności komórek;
2. wykazanie konstytutywnie występującego mechanizmu tolerancji komórek *Viola* na wysokie stężenia Zn i Pb niezależnie od gatunku oraz stopnia skażenia podłoża na którym dany gatunek lub populacja występują;

3. wykazanie, że komórki *Viola* mają zdolność do hiperakumulacji Pb oraz Zn i że akumulacja występuje głównie w ścianach komórkowych i wakuolach, a akumulacja Pb może zachodzić także w jądrze komórkowym i cytoplazmie;
4. wykazanie, że w wyniku selekcji komórek *in vitro* w obecności wysokich stężeń Zn i Pb możliwe jest uzyskanie roślin *V. tricolor* zdolnych do reprodukcji na drodze generatywnej oraz uzyskanie regenerantów, u których frekwencja komórek wykazujących tolerancję na Pb była większa niż u roślin wyjściowych;
5. wykazanie, że komórki *V. arvensis* ulegają apoptozie indukowanej wysokimi stężeniami Zn i Pb oraz, że w procesie apoptozy zaangażowane są proteazy cysteinowe podobne do papainy, a ponadto, że zastosowanie egzogenego inhibitora tych proteaz (E-64-d) skutkowało uzyskaniem większej frakcji komórek przeżywających.

Uwagi i pytania

Chociaż prezentowane w rozprawie wyniki badań były już przedmiotem pozytywnych recenzji przed ich opublikowaniem w czasopiśmie, rolą recenzenta w przewodzie doktorskim jest krytyczne spojrzenie na całokształt przeprowadzonych badań opisanych w rozprawie. Po zapoznaniu się z przedstawioną rozprawą doktorską mogę stwierdzić, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu badawczego polegające na poznaniu wybranych elementów mechanizmu tolerancji komórek na dwa metale ciężkie oraz określenie występowania tolerancji w różnych gatunkach i populacjach *Viola*. Kilka aspektów jest w mojej opinii jednak dyskusyjnych. Autorka rozprawy kilkakrotnie przy podsumowywaniu wyników poszczególnych badań konkluduje i podkreśla, że stosowany układ doświadczalny wykorzystujący komórkowe kultury zawieszinowe jest dobrym układem modelowym pozwalającym na badanie tolerancji na metale ciężkie, a wyciągnięte wnioski z uzyskanych wyników przy stosowaniu tego modelu mogą być odniesione przy rozpatrywaniu tolerancji roślin *Viola*. W przekonaniu recenzenta, wykonanie badań wyłącznie w układach komórkowych, bez jakichkolwiek prób weryfikowania tolerancji roślin na wysokie stężenia Zn i Pb powoduje, że konkluzje takie są nieuprawnione i mają charakter spekulacyjny oparty jedynie o wybrane przesłanki literaturowe na przykładzie innych gatunków, co nie musi znaleźć potwierdzenia w przypadku gatunków *Viola*. Zgadzam się, że zastosowany układ doświadczalny, w którym większość warunków jest kontrolowana można uznać za układ modelowy. Jednak czy układ modelowy można uznać za dobry wymaga potwierdzenia empirycznego. W prezentowanej rozprawie nie znajduję żadnych danych empirycznych pozwalających na weryfikację czy wyniki wyzyskane przy użyciu układu modelowego mają przełożenie w odniesieniu do tolerancji roślin. Aspekty te są tym bardziej istotne, że w układzie modelowym Doktorantka wykazała hiperakumulację Zn i Pb, gdyż współczynnik pobrania wahał się w granicach między 11 a 77, podczas gdy badania innych autorów, które przytaczane są w rozprawie, wskazują, że współczynnik pobierania przez rośliny *Viola* wynosi poniżej jedności. Rodzi się zatem podstawowe pytanie na ile strategia hiperakumulacji przez komórki obserwowana w układzie modelowym może być proponowana jako element konstytutywnego mechanizmu reakcji tolerancji ewolucyjnie wykształconego w rodzaju *Viola*, podczas gdy rośliny *Viola* wystawione na skażenia Zn i Pb nie są ich hiperakumulantami. Prosiłbym, aby w trakcie publicznej obrony Doktorantka ustosunkowała się do powyższego problemu oraz wskazała czym jej zdaniem powinien cechować się dobry układ modelowy i jak dokonałaby jego walidacji.

Prosiłbym także o ustosunkowanie się podczas obrony do poniższych kwestii:

- 1) Dlaczego doświadczenia z użyciem kultur zawieszinowych nie były prowadzone w ciemności skoro stosowanie różnych stężeń Pb powodowało zmianę warunków świetlnych? Czy światło było czynnikiem niezbędnym w stosowanym układzie modelowym?
- 2) Dlaczego badając poziom akumulacji Zn i Pb w komórkach stosowane były różne jednostki przy oznaczaniu zawartości tych pierwiastków w pożywce (μM) i w komórkach (mg/kg)? (dodatkowo we wstępie i metodyce wielkości podawane były także w ppm) Czy wnioskowanie o większej akumulacji Pb niż Zn w komórkach na podstawie wyliczenia masy zakumulowanych pierwiastków jest uzasadnione biorąc po uwagę, że Pb ma ponad trzykrotnie większą masę molową niż Zn?
- 3) Czym zdaniem Doktorantki można wytłumaczyć zmniejszenie wielkości genomu komórek regenerantów po traktowaniu Zn o blisko 10% (artykuł III), jakie to może mieć znaczenie dla funkcjonowania komórek oraz czy zasadne jest zatem stwierdzenie zawarte w dyskusji artykułu o braku zmienności somaklonalnej?
- 4) Kontynuując problem z pkt. 3, czy zdaniem Doktorantki, wykrycie polimorfizmów ISSR polegających na wystąpieniu unikalnych produktów amplifikacji w populacjach regenerantów po traktowaniu Zn jak i Pb (tzw. private markers), tj. nie występujących w populacji roślin wyjściowych, jest mało znaczące w kontekście oceny zmienności genetycznej jaka mogła zostać zaindukowana w trakcie badań, a jeśli tak, to zdaniem Doktorantki jak duże zmiany wykrywane markerami ISSR musiałyby wystąpić, aby można było skonkludować, że wystąpiła zmienność somaklonalna?

Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym ważnego problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych metod pozwalających na weryfikację stawianych hipotez i osiągnięcie zakładanych celów, a uzyskane wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także, że mgr Klaudia Sychta wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie biologia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Konkludując, uważam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, której autorem jest mgr Klaudia Sychta spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm., tekst jednolity Dz.U. z 2016 r. poz. 882).

Kraków, 30 czerwca 2020


prof. dr hab. Rafał Barański