

Kraków, dn. 4 grudnia 2023 r.

Dr hab. inż. Anna Gorczyca, prof. URK  
Katedra Mikrobiologii i Biomonitoringu  
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie  
al. Adama Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Magdaleny Kusiak

pt. „Analiza biochemicznej i molekularnej odpowiedzi  
jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na dolistną aplikację nanocząstek i jonów miedzi”  
wykonanej w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie  
pod opieką naukową dr hab. Izabeli Joško, profesor uczelni

### Podstawa formalna

Uchwała Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 25 września 2023 r. wyznaczająca recenzenta rozprawy doktorskiej do przewodu wszczętego w dniu 7 czerwca 2022 r w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

### Podstawa prawna

Procedowanie postępowania o nadanie tytułu doktora na podstawie wymagań określonych w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.).

## 1. CHARAKTERYSTYKA DYSERTACJI

---

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kusiak pt. „Analiza biochemicznej i molekularnej odpowiedzi jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na dolistną aplikację nanocząstek i jonów miedzi” została przygotowana, jako opracowanie opisujące zbiór czterech oryginalnych publikacji z lat 2022-2023, powiązanych tematycznie i zebranych pod wspólnym tytułem jw.

Publikacje wykazane w rozprawie jako zbiór to:

- **PI.** Kusiak M., Oleszczuk P., Joško I. (2022). Cross-examination of engineered nanomaterials in crop production: Application and related implications. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127374
- **PII.** Kusiak M., Sierocka M., Świeca M., Pasieczna-Patkowska S., Sheteiwy M., Joško I. (2023). Unveiling of interactions between foliar-applied Cu nanoparticles and barley suffering from Cu deficiency. *Environmental Pollution*, 320, 121044

- **PIII.** Kusiak M., Sozoniuk M., Larue C., Grillo R., Kowalczyk K., Oleszczuk P., Joško I. (2023). Transcriptional response of Cu-deficient barley (*Hordeum vulgare* L.) to foliar-applied nano-Cu: Molecular crosstalk between Cu loading into plants and changes in Cu homeostasis genes. *NanoImpact*, 31, 100472
- **PIV.** Joško I., Kusiak M., Różyło K., Baranowska-Wójcik E., Sierocka M., Sheteiwy M., Sz wajgier D., Świeca M. (2023). The life cycle study revealed distinct impact of foliar-applied nano-Cu on antioxidant traits of barley grain comparing with conventional agents. *Food Research International*, 164, 112303.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej powstały w ramach realizacji projektu 2017/26/D/NZ9/00067 konkursu Narodowego Centrum Nauki SONATA 13 *Molekularne i biochemiczne mechanizmy regulujące transport nanocząstek miedzi oraz ich wpływ na wzrost, rozwój i plonowanie roślin jęczmienia jarego*, przy czym dane Raportu końcowego na stronie NCN wykazują tylko publikacje oznaczone w rozprawie jako **PI** i **PII**. Publikacje **PIII** i **PIV** nie zostały wykazane w Raporcie końcowym projektu, co prawdopodobnie ma związek z przedłużającym się procesem wydawniczym tych publikacji. Niemniej wszystkie publikacje prezentowane i omówione przez doktorantkę jako rozprawa ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych tj.: publikacja **PI** w *Journal of Hazardous Materials* (MEiN: 200 pkt. m.in. dla dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, IF: 13,6; udział Doktorantki 70%); **PII** w *Environmental Pollution* (MEiN: 100 pkt. m.in. dla dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, IF: 8,9; udział Doktorantki 60%); **PIII** *NanoImpact* (MEiN: 100 pkt., IF: 4,9; udział Doktorantki 51%) i **PVI** w *Food Research International* (MEiN: 140 pkt. m.in. dla dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, IF: 8,1; udział Doktorantki 30%). Wskaźniki bibliometryczne dla publikacji wchodzących w skład rozprawy są imponujące i wynoszą: łączna liczba punktów MEiN 540 oraz łączny wskaźnik cytowań IF 35,5. Publikacje, pomimo, że ukazały się w latach 2022-2023 są już cytowane i na dzień 1 grudnia 2023 r. łączna liczba cytowań w bazie Scopus to 14, w tym 4 autocytowania. W mojej opinii, biorąc pod uwagę prestiż czasopism naukowych oraz siłę oddziaływania publikacji na środowisko naukowe, które uwidoczniło się w tak krótkim okresie czasu, zbiór publikacji uwzględniony w rozprawie należy ocenić jako wybitny dla dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Mgr Magdalena Kusiak wniosła istotny wkład w powstanie publikacji i jest pierwszym autorem w 3 publikacjach. Jedynym mankamentem pozostaje to, że Doktorantka nie była autorem korespondencyjnym żadnej z prac zbioru, co w mojej opinii mogło być zachowane i pozwoliłoby na praktyczne zapoznanie się z procesem wydawniczym publikacji naukowych i byłoby cenne dla jej dalszej pracy naukowej. Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod względem formalnym jest bez zarzutów, a wartość naukową zbioru publikacji będących podstawą rozprawy można ocenić, jako wyróżniającą się.

Publikacje zbioru ukazały się w prestiżowych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report (JCR), posiadają wysokie współczynniki wpływu i zostały w procesie wydawniczym ocenione przez recenzentów będących ekspertami w danej dziedzinie. Dlatego chciałabym w tym miejscu zaznaczyć, że w recenzji będę się odnosić przede wszystkim do opracowania wykonanego samodzielnie przez Doktorantkę oraz struktury rozprawy, strony merytorycznej i spójności tematów poszczególnych prac. Biorąc też pod uwagę interdyscyplinarny charakter tematyki badawczej i wysoce prawdopodobny wybór recenzentów rozprawy z różnych dziedzin, których ona dotyczy, moja recenzja będzie skupiona przede wszystkim na dziedzinach mojej specjalizacji naukowej, czyli agronomii, ochrony roślin oraz toksykologii nanozwiązków inżynierskich.



## 2. OCENA MERYTORYCZNA

---

### Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie, postawione cele i hipotezy badawcze

Problematyka podjęta w rozprawie mgr Magdaleny Kusiak dotyczy zagadnień interdyscyplinarnych oraz powiązana jest z ważną gospodarczo uprawą roślin, w tym w Polsce, gdzie w areale uprawy zbóż jęczmień jary w siewie czystym zajmuje czwarte miejsce po zbożach ozimych takich jak pszenica, pszenżyto i żyto, mając istotne znaczenie w całokształcie gospodarki zbóż jarych. Wynika to z wszechstronności zastosowania ziarna jęczmienia, tj. jako paszy, gdzie jest podstawowym zbożem obok owsa, jak również w przemyśle spożywczym. Średni udział jęczmienia w powierzchni uprawy zbóż i mieszanek zbożowych w Polsce wynosi około 11%, a nasz kraj zajmuje 14 miejsce na liście światowych producentów jęczmienia. Biorąc pod uwagę sytuację polityczną i to, że Rosja jest największym producentem jęczmienia na świecie, można przypuszczać, że zainteresowanie uprawą tego gatunku w Polsce będzie wzrastać. Według badań prowadzonych przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach, w glebach Polski najbardziej deficytowymi mikroelementami są bor i miedź. Niską zawartość miedzi stwierdza się w 34% gruntów ornych. Jęczmień jest bardzo wrażliwy na brak tego pierwiastka, dlatego w sytuacji niedożywienia reaguje istotnym spadkiem plonu. Najbardziej typowym objawem niedożywienia miedzią jest więdnienie roślin niezależnie od zaopatrzenia w wodę. Ponadto znacznie zmniejsza się zawartość ligniny w źdźbłach i liściach, co osłabia ich wytrzymałość mechaniczną, zwiększa ryzyko wylegania oraz zmniejsza odporność na atak chorób i szkodników. Skrajny niedobór miedzi u roślin zbożowych ujawnia się w postaci tzw. choroby nowin, a jej symptomy to bielienie wierzchołków, nitkowatość i chloroza liści. Rośliny przy niedoborze miedzi wcześniej rozpoczynają fazę generatywną, ich kłosa są białe i zawierają małą liczbę słabo wykształconych ziaren lub są płonne. Nawożenie miedzią jest więc ważnym elementem agrotechniki zbóż uprawianych w Polsce, w tym jęczmienia.

Kolejnym, istotnym zagadnieniem, wpływającym na znaczenie problematyki rozprawy związanym z rolnictwem są zatwierdzone i wprowadzane w krajach członkowskich UE zmiany Wspólnej Polityki Rolnej w odniesieniu do nawożenia roślin uprawnych, a szczególnie uprawianych na dużych arealach i wymagających intensywnej agrotechniki. Wyznaczone strategie przewidują przejście do zrównoważonej intensyfikacji rolnictwa, a jedną z podstaw tego paradygmatu jest ograniczenie nawożenia mineralnego roślin uprawnych w myśl kilku zasad: zgodnie z zapotrzebowaniem, na podstawie dokładnych analiz, w pierwszym rzędzie nawozami naturalnymi lub biologicznymi, precyzyjnie, bez zbędnego uwalniania makro i mikropierwiastków do środowiska. Zastosowanie nanotechnologii w nawożeniu wpisuje się w wyznaczone strategie, a szczegółowe badania naukowe pomogą wykazać czy jest to podejście właściwe i może być wdrażane do praktyki. Publikacja **PI**, której Doktorantka jest współautorką, omawia prawidłowo i obszernie zagadnienia związane z zastosowaniem nanotechnologii w rolnictwie, w tym istotne problemy toksykologiczne z tym związane, czego syntezę zawarła Autorka w opracowaniu własnym.

Badania rozprawy dotyczą też niezwykle istotnej tematyki zdiagnozowanego już w skali globalnej, a szczególnie dotyczącego kraje rozwijające się problemu zawartości mikroelementów w żywności. Doktorantka krótko opisuje ten problem we wprowadzeniu, co świadczy o jej dobrej orientacji w tematyce, bo nie jest on jeszcze często poruszany w publikacjach naukowych. Niedobór mikroelementów, tzw. ukryty głód, wynika z niskiej zawartości w produktach

spożywczych mikroelementów korzystnych, a nie z niedostatku pożywienia. Miedź jest mikroelementem, którego rola w żywieniu jest istotna – jej niedobór może powodować zaburzenia licznych procesów enzymatycznych i metabolicznych, co może objawiać się w różnych zespołach chorobowych np. anemii, ograniczeniu wzrostu i płodności, zaburzeniu systemu nerwowego, chorobach układu krążenia i osteoporozie. Wprawdzie do badań wybrano odmianę paszową jęczmienia, ale niedobory miedzi u zwierząt hodowlanych i jej podaż w mięsie są również ważne z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności.

Podsumowując, należy podkreślić, że tematyka dysertacji jest istotna i odpowiada na zapotrzebowanie na badania, których wyniki przyczyniają się do rozwiązania istotnych problemów nie tylko w skali lokalnej, ale nawet globalnej.

Celem głównym recenzowanej dysertacji była ocena efektywności nanoform miedzi w dolistnym dokarmianiu roślin jęczmienia, co realizowano poprzez ocenę rzeczywistej absorpcji i translokacji miedzi przez rośliny; analizę biochemicznej odpowiedzi roślin; analizę ekspresji genów regulujących transport i detoksykację miedzi w roślinach oraz ocenę potencjału nanoform do biofortyfikacji oraz poprawy cech jakościowych ziarniaków jęczmienia w porównaniu do mikrocząstek i związków występujących w konwencjonalnych nawozach miedziowych. Doktorantka weryfikowała postawione hipotezy badawcze, tj. (1) czy forma miedzi, jej stężenie oraz czas ekspozycji różnicują pobieranie i dystrybucję tego pierwiastka w roślinach ze względu na różny stopień uwalniania jonów i/lub odmienne mechanizmy pobierania zastosowanych związków; (2) czy nanoformy determinują odmienną reakcję roślin – od poziomu molekularnego do odpowiedzi całego organizmu – w porównaniu do ekspozycji na jony miedzi ze względu na różne tempo i skalę dostarczania miedzi do roślin oraz (3) czy nanoformy w większym stopniu poprawiają jakość ziarniaków, niż po aplikacji mikrocząstek i rozpuszczalnych soli, dzięki stopniowemu i długotrwałemu dostarczaniu tego pierwiastka do tkanek roślin.

W mojej opinii, postawiono ambitne cele, których realizacja wymagała opracowania skomplikowanego planu badawczego wymagającego nowoczesnych metod i technik badawczych, a ich realizacja pozwoliła w pełni zweryfikować umiejętność prowadzenia przez Doktorantkę pracy naukowej na wysokim poziomie.

## **Materiały i metody badań**

Nanotechnologia stanowi już od lat priorytetową, rewolucyjną dziedzinę nauki zajmującą się syntezą, charakterystyką i zastosowaniem nanomateriałów. Niezwykłe właściwości, szczególnie powierzchniowe nanomateriałów odróżniają je od ich odpowiedników masowych. Stosunek powierzchni nanomateriałów do ich objętości powoduje ich specyficzną reaktywność względem organizmów. Zjawisko to jest już dość powszechnie wykorzystywane w praktyce w licznych dziedzinach naszego życia. Do nanozwiązków najczęściej badanych i aplikowanych należą nanocząstki metali i tlenków metali, przy czym najpopularniejsze wydają się nanocząstki srebra, tlenku tytanu i tlenku cynku. Badania przedstawione w rozprawie dotyczyły oceny efektywności działania nanocząstek miedzi i tlenku miedzi w porównaniu do mikrocząstek miedzi i łatwo rozpuszczalnych związków miedzi, które są powszechnie stosowane w dolistnym nawożeniu roślin, czyli siarczanu miedzi oraz soli disodowej kwasu etylenodiaminotetraoctowego miedzi (II) na rośliny jęczmienia w warunkach niedoboru tego pierwiastka. Dobór związków miedzi zastosowanych w badaniach jest właściwy – rośliny pobierają miedź w formie kationu  $\text{Cu}^{2+}$  oraz chelatów. W badaniu zastosowano aplikację nalistną, co też jest właściwe, bo liście roślin bardzo dobrze absorbują miedź z roztworów o bardzo niskim stężeniu, a aplikacja



doglebowa wymaga wielokrotnie większej od potrzeb metabolicznych roślin dawki ze względu na koncentrację składnika w apoplacie korzenia wynikającej z silnego wiązania przez kwasy organiczne kationów miedzi w ścianie, co zmniejsza ich transport do komórki. Na ograniczenie pobierania tego pierwiastka mogą też wpływać właściwości gleby takie jak odczyn i zawartość materii organicznej. Podstawowym procesem biochemicznym zależnym od odżywienia roślin miedzią jest biosynteza ligniny, co decyduje o kilku ważnych procesach fizjologicznych i są to: transport wody i składników organicznych wynikający ze stopnia lignifikacji ścian komórkowych ksylemu, floemu; odporność na stresy biotyczne oraz reprodukcja (wpływ na sprawność aparatu uwalniającego ziarna pyłku z pręcika).

W rozprawie Doktorantka omawia doświadczenia przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych i wazonowych. Nanozwiązki miedzi wykorzystane w badaniach, przed ich zastosowaniem, zostały scharakteryzowane pod kątem rozkładu wielkości i morfologii nanocząstek przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), powierzchni właściwej poprzez adsorpcję  $N_2$  stosując metodę Brunauer-Emmett-Teller'a (BET), struktury krystalicznej i składu fazowego wykorzystując dyfrakcję proszkową (XRD), potencjału zeta, ładunku i rozkładu wielkości agregatów z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz stopnia uwalniania jonów przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ICP-OES). Jest to bardzo cenna część badań, która często bywa pomijana w publikacjach związanych z tematyką oddziaływania nanocząstek metali i tlenków metali. Wykonanie tej szczegółowej charakterystyki pozwala na wykorzystanie wyników badań w licznych już analizach metadanych mających na celu porównanie oddziaływania tych związków na rośliny w zależności od ich cech (wielkości, kształtu, ładunku, właściwości powierzchniowych, potencjału uwalniania jonów itp.). W efekcie przyczyni się do kompleksowego zrozumienia jeszcze nierozpoznanego do końca mechanizmu oddziaływania nanocząstek na organizmy.

W doświadczeniu laboratoryjnym stosowano nalistne traktowanie nano-Cu względem  $CuSO_4$  w dwóch stężeniach 100 i 1000 mg Cu  $L^{-1}$  [publikacje **PII**, **PIII**]. W ocenie zastosowano najnowsze, nowoczesne metody spektroskopowe (ICP-OES, spektroskopia UV-VIS, spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni, FTIR/ATR) i mikroskopowe (skaningowa mikroskopia elektronowa z systemem EDS, SEM-EDS). Ocenie podlegały całkowita zawartość Cu w tkankach roślinnych (korzeniach i częściach nadziemnych), profile zawartości pigmentów, peroksydacja lipidów, aktywność enzymatycznych i zawartość nieenzymatycznych antyoksydantów oraz ekspresja genów transporterów Cu, akwaporyn oraz antyoksydantów enzymatycznych w roślinach po 1 i 7 dniach ekspozycji. W doświadczeniu wazonowym [publikacja **PIV**] przeprowadzono ocenę ilościową i jakościową plonu ziarniaków po nalistnym traktowaniu roślin jęczmienia nano-Cu, nano-CuO, mikro Cu,  $CuSO_4$  i Cu-EDTA. Oceniano ilość plonu, skład mineralny, zawartość składników pokarmowych, zawartość przeciwutleniaczy oraz bioaktywność. Wszystkie uzyskane wyniki liczbowe poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem jedno- i dwukierunkowej analizy wariancji (ANOVA) oraz przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA).

Podsumowując, materiał i metody badań zaplanowano starannie, a rzeczowe opracowanie wykonane przez Doktorantkę w ramach rozprawy pozwala w pełni na zapoznanie się z metodyką badań, przez co stwarza możliwość ich odtworzenia. Do realizacji badań wykorzystano najnowsze, dostępne techniki badawcze. Moje drobne uwagi związane z metodyką przedstawię w końcowej części recenzji, pozostawiając je do dyskusji na obronie.



## Analiza wyników i wnioski

W przedstawionym opracowaniu Doktorantka wyczerpująco i zwięźle prezentuje uzyskane wyniki badań, co było trudne ze względu na ich ilość. Szczególnie cenne wydaje mi się szczegółowe rozpoznanie procesu agregacji nanoform miedzi i poziomu uwalniania jonów miedzi z nanozwiązków, co ma istotne znaczenie dla ich oddziaływania na rośliny. Nieco niefortunne jest określenie oddziaływania miedzi na rośliny w warunkach laboratoryjnych terminem *in situ*, który odnosi się do badań prowadzonych w środowisku naturalnym. Jednak ogólny plan badań jest poprawny i logiczny. Rozpoczęto od szczegółowej oceny oddziaływania testowanych form miedzi w warunkach ściśle kontrolowanych i uzyskano wyniki wstępne, które pozwoliły na przejście do etapu wazonowego, zbliżonego do warunków naturalnych. Potwierdzono wolniejsze pobieranie miedzi z formy nano w porównaniu do siarczanu miedzi. Udokumentowano tendencję nano miedzi do tworzenia agregatów na powierzchni liści, co może być korzystne z punktu widzenia nawożenia roślin ze względu na przewidywaną dłuższą ekspozycję na miedź. Dokonana szczegółowa ocena reakcji metabolicznej roślin na zastosowane traktowania dostarczyła cennych wyników, które Doktorantka systematycznie i syntetycznie omówiła w opracowaniu własnym. Wyniki są analizowane w odniesieniu do formy nawożenia, zastosowanej dawki i konfrontowane z danymi literatury w sposób logiczny. Pewne problemy w interpretacji wyników mogły być spowodowane brakiem obiektu z pożywką suplementowaną miedzią, ponieważ trudno było zdiagnozować np. stres antyoksydacyjny, gdy wszystkie rośliny były narażone na niedobór miedzi łącznie z kontrolą. Takie podejście metodyczne zostało wyjaśnione w publikacjach zbioru **PII** i **PIII**, ale w mojej opinii pomimo słabej translokacji miedzi niektóre procesy metaboliczne w warunkach optymalnego odżywienia roślin mogą być lepiej wyjaśnione, co oczywiście może być kwestią dyskusyjną.

W przedstawionym opracowaniu wyników Doktorantka dokonała bardzo szczegółowej analizy ekspresji genów – analizując nie tylko geny transporterów miedzi, ale i akwaporyn oraz w sposób bardzo szczegółowy geny enzymów antyoksydacyjnych. Uważam ten fragment opracowania za wyjątkowo cenny, który wskazuje na wysokie kompetencje Doktorantki i umiejętność interpretacji oraz dyskusji naukowej. W mojej opinii właśnie ta część pracy dokumentuje innowacyjne rozwiązanie problemu naukowego dokonane przez Doktorantkę oraz wysoką umiejętność pozyskiwania wyników z wykorzystaniem najnowszych narzędzi badawczych i wnikliwą interpretację danych bioinformatycznych. Jest to szczególnie cenne, ponieważ obecnie otwiera się zupełnie inna perspektywa pracy naukowej, a naukowiec pozbawiony umiejętności analizy danych z wykorzystaniem narzędzi komputerowych szczególnie w dziedzinach związanych z biotechnologią, która obecnie ma fundamentalne znaczenie dla dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo, nie ma szans na sprostanie konkurencji i znaczące osiągnięcia naukowe.

Ostatnia część badań, które zostały wykonane w warunkach wazonowych jest logicznym podsumowaniem całego cyklu. Przejście do warunków bliskich naturalnym i ocena wartości odżywczej i zawartości antyoksydantów w plonie jęczmienia, jakim jest ziarno jest dobrym podsumowaniem znaczenia tematyki badawczej przedstawionego przez Doktorantkę we wprowadzeniu, a szczególnie odnosi się do globalnego problemu określonego jako ukryty głód. Doktorantka prawidłowo zaznacza, że nawożenie miedzią może mieć większe znaczenie dla jakości plonu, niż jego ilości. W wykonanych badaniach stwierdzono brak wpływu zastosowanych traktowań na biomasa plonu, ale analiza zawartości miedzi w ziarniakach wykazała ok. 2-krotnie większą jej zawartość u roślin traktowanych nanozwiązkami miedzi, mikro-Cu oraz rozpuszczalnymi związkami miedzi ( $\text{CuSO}_4$  i Cu-EDTA) w porównaniu do kontroli. Analiza

statystyczna wykazała, że najkorzystniej i podobnie jak dla Cu-EDTA wypadło traktowanie nanocząstkami miedzi. Nanocząstki tlenku miedzi i mikrocząstki miedzi nie okazały się efektywne tak jak Cu-EDTA, czyli forma miedzi stosowana w miedziowych nawozach dolistnych najnowszej generacji. Pozostałe analizy potwierdziły, że spośród zastosowanych form miedzi, nanocząstki miedzi wykazują potencjał w poprawie właściwości prozdrowotnych plonu jęczmienia, co niewątpliwie powinno się stać przyczynkiem do przeprowadzenia dalszych szczegółowych badań polowych przed próbami komercyjnych formułacji nowych, innowacyjnych nawozów na bazie nanoform miedzi. Jest to cenna wskazówka dla praktyki wynikająca z wyników pracy. Tym bardziej, że na rynku agrochemikaliów występują już środki z tzw. miedzią systemiczną. Ocenę tej formułacji nawozów miedziowych w porównaniu do zastosowanych przez Doktorantkę związków miedzi pozostawiam do dyskusji na obronie.

W przedstawionym opracowaniu Doktorantka sformułowała 9 wniosków, które prawidłowo i syntetycznie podsumowują uzyskane wyniki badań, co było dość trudne ze względu na ilość i złożoność wyników. Doktorantka jasno określiła napotkane we wnioskowaniu problemy, ale i krótko merytorycznie opisała ich przyczyny oraz przedstawiła poprawną argumentację, co do możliwej korelacji pewnych wyników.

Drobnym, dyskusyjnym mankamentem jest zapisanie wniosków w czasie przeszłym, co zawsze nieznacznie obniża przekonanie o potwierdzeniu hipotez badawczych. W mojej opinii przynajmniej wybrane wnioski mogły być sformułowane w trybie oznajmującym i czasie teraźniejszym.

### **Struktura i edycja opracowania**

Doktorantka wykonała bardzo staranne, rzeczowe i wyczerpujące opracowanie, w którym przedstawiła w logicznym układzie całość badań opublikowanych w pracach stanowiących zbiór dysertacji. Opracowanie to świadczy o doskonałej orientacji w tematyce badań i wysokich umiejętnościach edytorskich Autorki. Na 56 stronach Doktorantka opisuje w logicznym układzie rozdziałów i podrozdziałów; prawidłowym, zrozumiałym językiem obszernie treści publikacji, co świadczy o jej wiedzy związanej z tematyką badawczą, a zarazem umiejętności dokonania prawidłowej syntezy, co wymaga wnikliwego przemyślenia i dużego wkładu pracy. Zaprezentowane w opracowaniu 24 rysunki i 6 tabel oceniam jako niezwykle staranne, czytelne i świadczące o doskonałej umiejętności pracy Autorki w zakresie edycji komputerowej. Jedynym drobnym mankamentem jest to, że Doktorantka nie podała dla wykonanych grafik komputerowych czy stanowią one jej opracowanie własne oraz podstawy ich wykonania (źródła literatury, jeżeli je wykorzystywała). Jednak całość struktury i edycji opracowania oceniam jako wzorową.

### **Wykorzystana literatura**

Doktorantka w wykonanym opracowaniu wykorzystywała 108 pozycji literatury naukowej. Pod względem jakościowym literatura jest dobrana prawidłowo. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystywania najnowszej literatury przedmiotu i liczne odwołania do najnowszych badań światowych w podjętej tematyce. Tu należy przyznać, że Doktorantka właściwie nie miała innego wyjścia, gdyż wartościowe publikacje w tematyce rozprawy ukazują się jedynie w renomowanych czasopismach naukowych w języku angielskim od kilkunastu lat. W związku z tym wszystkie pozycje bibliografii to najnowsze pozycje literatury naukowej w języku angielskim lub prawidłowo dobrane publikacje metodyczne, które ukazały się



w większości w renomowanych, recenzowanych czasopismach naukowych. 29 pozycji (prawie 30%) to publikacje, które ukazały się w ostatnich 5 latach. Doktorantka zachowała należyta staranność i wykazała się profesjonalizmem w opracowaniu spisu literatury, co jak myślę świadczy o umiejętności obsługi oprogramowania do zarządzania bibliografią.

### 3. PYTANIA PROBLEMOWE

---

Proponuję, żeby w trakcie obrony Doktorantka przedstawiła swoje stanowisko do kilku dyskusyjnych w mojej opinii, ale nieobniżających ogólnej wartości merytorycznej rozprawy, kwestii. Przedstawiam je poniżej.

#### **Pytania nawiązujące bezpośrednio do badań przedstawionych w rozprawie**

W opracowaniu używa Pani stale nazwy jęczmień jary (*Hordeum vulgare* L.). O ile w tytule rozprawy nie budzi to moich zastrzeżeń, bo powinien być jak najbardziej zwięzły, to w metodyce powinna Pani podać pełną, prawidłową nazwę roślin testowej, w tym gatunkową w języku polskim tj. jęczmień zwyczajny (j. wielorzędowy) z odpowiednikiem łacińskim nazwy *Hordeum vulgare* L., forma jara, odmiana paszowa, typ pastewny (oplewiony) Ella. Proszę o podanie, jakie gatunki, formy i typy jęczmienia są uprawiane i czym się ogólnie charakteryzują oraz wyjaśnić dlaczego w badaniach zastosowano odmianę paszową Ella.

We wprowadzeniu i dyskusji wyników wspomniano o znaczeniu nawożenia miedzią dla procesu lignifikacji tkanek roślin. Proszę wyjaśnić jak można ocenić zmiany dotyczące przebiegu lignifikacji oraz analizować zawartość ligniny w tkankach roślin oraz wyjaśnić dlaczego nie zaplanowano takiej oceny, w mojej opinii istotnej dla oceny nawożenia miedzią.

Proszę szerzej wyjaśnić dlaczego nie zastosowano w badaniach obiektu z roślinami optymalnie (zgodnie z zapotrzebowaniem) suplementowanymi miedzią oraz w doświadczeniu wazonowym do podlewania roślin zastosowano wodę redestylowaną. Czy mogło to mieć jakieś znaczenie dla uzyskanych wyników badań i ich interpretacji w Pani opinii?

W dyskusji wyników (str. 29) powiązано chlorozę określoną jako zmiany w fenotypie ze zdolnością roślin do pobierania i transportowania miedzi. Proszę o wyjaśnienie tej argumentacji ponieważ w mojej opinii jest to dość duży skrót myślowy.

#### **Pytanie związane z tematyką rozprawy**

We wprowadzeniu wyraża Pani pogląd, że „strategie zwiększania produktywności upraw roślinnych, takie jak nawożenie czy uprawy roślin genetycznie modyfikowanych są kosztowne, mało skuteczne lub ich stosowanie jest ograniczane przez obowiązujące ustawodawstwo ze względu na potencjalne zagrożenia dla zdrowia ludzi (m.in. alergenicność, toksyczność) i bezpieczeństwo środowiskowe (np. niekontrolowane rozprzestrzenianie się transgenów w środowisku)”. Nie zgadzam się z tym poglądem i chciałabym, żeby na obronie przedstawiła Pani co najmniej kilka pozytywnych aspektów szczególnie w odniesieniu do upraw GMO w skali globalnej opartych na rzeczywistej sytuacji współczesnego światowego rolnictwa.

Proszę o porównanie tzw. miedzi systemicznej wprowadzanej już na światowy rynek agrochemikaliów z nanoformami miedzi zastosowanymi w badaniach własnych.



#### 4. PODSUMOWANIE I KONKLUZJA KOŃCOWA

---

W odniesieniu do wymagań określonych w *Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami), Rozdział 2. *Stopień doktora*, Oddział 1. *Nadawanie stopnia doktora*, Art. 187, po zapoznaniu się z rozprawą, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Kusiak pt. „Analiza biochemicznej i molekularnej odpowiedzi jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) na dolistną aplikację nanocząstek i jonów miedzi” wykonana w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod opieką naukową dr hab. Izabeli Joško, prof. uczelni, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz jej wysokie umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, na co wskazuje przygotowane przez Doktorantkę opracowanie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie wieloautorskich artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy.

Przedmiotem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest wstępna ocena potencjału nawozowego nanoform i mikroform miedzi w dokarmianiu dolistnym jęczmienia w odniesieniu do konwencjonalnych form miedzi stosowanych w nawozach syntetycznych, co wymagało interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności zastosowania najnowszych technik badawczych.

Konkludując, wnoszę do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową prezentowanej rozprawy oraz potencjalne znaczenie aplikacyjne zaprezentowanych wyników badań wnioskuję o wyróżnienie dysertacji.

