



Poznań, 28.11.2023 r.

prof. UPP dr hab. Janetta Niemann  
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**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,  
pod kierunkiem Pani dr hab. Izabeli Joško, profesor uczelni - promotora pracy

Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 25 września 2023 roku, w oparciu o wymagania określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity, Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zmianami).

Miedź (Cu) jest niezbędnym mikroelementem wykorzystywanym przez rośliny do tworzenia białek, witamin, węglowodanów i enzymów. Niedobór miedzi ma zasadniczy wpływ na wzrost i plonowanie roślin. Zboża, w tym jęczmień jary (*Hordeum vulgare* L.) wykazują szczególną wrażliwość zarówno na niedobór, jak i nadmiar miedzi. Deficyt Cu, szczególnie w fazie krzewienia i kłoszenia, może m.in. prowadzić do niewykształcenia ziarniaków lub spadku ich wartości odżywczych. Z powodu niezadawalającej efektywności konwencjonalnych nawozów, coraz więcej uwagi koncentruje się na zastosowaniu nano-nawozów. Ze względu na swoje niewielkie rozmiary (1–100 nm) nanocząstki (ang. engineered nanoparticles, ENPs) wykazują bardziej efektywne właściwości fizyko-chemiczne od swoich mikro-odpowiedników. Wiadomym jest, że metaliczne nanocząstki w zależności od zastosowanego stężenia mogą indukować bądź hamować wzrost roślin. W kontekście nawozowym, zdolność ENPs do stopniowego uwalniania m.in. jonów metali może być wykorzystana w celu zapewnienia roślinom długotrwałej dostępności mikroelementów.

Pomimo licznych, przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących wpływu nanocząsteczek na rośliny, wciąż nie do końca znany jest mechanizm i czynniki wpływające na efektywność przyswajania jonów miedzi z nanocząstek. Nadal nie są znane mechanizmy molekularne, dzięki którym rośliny rozpoznają obecność nanocząstek i odpowiadają na nie poprzez promocję lub inhibicję wzrostu w zależności od ich stężenia. Wyjaśnienie tych mechanizmów umożliwiłoby opracowanie strategii zastosowania nanocząstek ze zminimalizowaną szkodliwością dla środowiska, dlatego też w nanotechnologii upatruje się dużej szansy dla współczesnego rolnictwa.

Mając na uwadze powyższe, badania, które zostały zrealizowane w ramach





przedstawionej do oceny pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Kusiak są niezwykle wartościowe, gdyż przedstawiają wielopoziomowe analizy oddziaływania nanocząstek na roślinę. W swoich badaniach Doktorantka koncentrowała się na ocenie efektywności nanocząstek miedzi w dolistnym dokarmianiu roślin jęczmienia jarego, a głównym celem przedłożonej do oceny pracy była weryfikacja przewagi nanocząstek miedzi nad konwencjonalnymi nawozami miedziowymi. Temat pracy doktorskiej mgr Magdaleny Kusiak uważam za bardzo istotny, ponieważ dokładne poznanie interakcji pomiędzy rośliną a nanocząstkami składników pokarmowych aplikowanymi dolistnie niewątpliwie stanowić będzie podstawę do opracowania nowych i wartościowych nanonawozów.

### Ocena formalna rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Kusiak obejmuje polskojęzyczne opracowanie oraz reprints czterech anglojęzycznych artykułów, wchodzących w skład cyklu publikacji i stanowiących rdzeń pracy. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, indeksowanych przez bazę Web of Science. Publikacje wchodzące w skład rozprawy są spójne tematycznie i stanowią podstawę dysertacji, co dopuszcza art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Powstały one w ramach realizacji projektu pt. „Molekularne i biochemiczne mechanizmy regulujące transport nanocząstek miedzi oraz ich wpływ na wzrost, rozwój i plonowanie roślin jęczmienia jarego”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, SONATA 13 (2017/26/D/NZ9/00067).

Prace naukowe będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej:

1. Kusiak M., Oleszczuk P., Joško I. 2022. Cross-examination of engineered nanomaterials in crop production: Application and related implications. *Journal of Hazardous Materials*, T. 424 s. 127374.
2. 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*, T. 320 s. 121044.
3. 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*, T. 31 s. 100472.
4. 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*, T. 164 s. 112303.

zostały opublikowane w latach 2022-2023, a ich sumaryczny wskaźnik wpływu Impact Factor wg listy JCR (*Journal Citation Reports*) wynosi 35.5, natomiast suma punktów wg punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 540 punktów. Tak wysoki sumaryczny IF





wskazuje, że badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone przez Autora oraz reprezentują wysoki poziom naukowy, co zostało pozytywnie ocenione przez recenzentów tych czasopism.

Tytuł pracy doktorskiej odpowiada tematyce analizowanych publikacji. Wszystkie wymienione powyżej prace są opracowaniami współautorskimi, przy czym w trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Wkład Pani Magister obejmuje współudział w opracowaniu koncepcji badań i metodyki, realizacji badań, opracowaniu wyników oraz redakcji publikacji. Świadczy to o znaczącej roli Doktorantki w opracowaniu tych publikacji, co znalazło potwierdzenie w oświadczeniach współautorów, zawartych na końcu rozprawy.

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Kusiak została podzielona na siedem tematycznych rozdziałów, zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozdział I obejmuje wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Rozdział II – to hipotezy i cele badawcze. Rozdział III stanowi zawarty na sześciu stronach tekstu opis materiałów i metod badawczych. Kolejne wyodrębnione rozdziały to: IV - Omówienie wyników i dyskusja, V - Wnioski oraz VI - Bibliografia. Rozdział VII zawiera reprintsy czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy, których treść w pełni koresponduje z tytułem pracy doktorskiej. Zagadnienia poruszane w kolejno załączonych publikacjach dotyczą: omówienia potencjalnych możliwości i wyzwań w stosowaniu nanotechnologii w uprawie roślin, ze szczególnym uwzględnieniem przeglądu literatury dotyczącego wykorzystania nanosensorów, nanopestycydów i nanonawozów (publikacja nr 1), oceny potencjału nawozowego nano-Cu w zakresie ich absorpcji i internalizacji przeprowadzonej na podstawie analizy oddziaływania nanocząstek z rośliną w miejscu ekspozycji (publikacja nr 2), oceny zmian na poziomie molekularnym na podstawie przeprowadzonych analiz dotyczących wpływu zastosowanych związków Cu na zmiany w profilach ekspresji genów transporterów miedzi, akwaporyn oraz enzymów antyoksydacyjnych (publikacja nr 3), a także porównania wpływu związków miedzi aplikowanych jako nanocząstki oraz w formie konwencjonalnej na wartość odżywczą i zawartość antyoksydantów w ziarniakach jęczmienia jarego (publikacja nr 4).

W rozdziale I zatytułowanym Wprowadzenie, Autorka prezentuje obecny stan wiedzy dotyczący zastosowania nanotechnologii w rolnictwie i wskazuje na istotę i zasadność problemu badawczego. Ta część pracy napisana jest zwięźle i poprawnie, choć moim zdaniem niektóre wątki mogłyby zostać pogłębione. Mam na myśli chociażby brak bardziej szczegółowego porównania wpływu nano Cu na znane gatunki roślin uprawnych. Doktorantka powołała się co prawda na Autorów, którzy prowadzili badania na *Spinacia oleracea* oraz *Zea mays*, jednak w rozdziale Bibliografia wskazała aż 108 pozycji literaturowych, do których moim zdaniem warto byłoby się odwołać we wspomnianym rozdziale pracy.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawia trzy hipotezy badawcze sformułowane w pracy oraz cele prowadzonych badań. W mojej opinii zarówno hipotezy badawcze jak i cele badań





zrealizowane w pracy doktorskiej zostały sformułowane poprawnie. Przyjęte w niniejszej pracy hipotezy badawcze zakładały, że: (1) Forma miedzi (nanocząstkowa lub jonowa), jej stężenie oraz czas ekspozycji różnicują pobieranie i dystrybucję miedzi w roślinach ze względu na różny stopień uwalniania  $\text{Cu}^{2+}$  z ENPs i/lub odmienne mechanizmy pobierania nanocząstek i jonów miedzi; (2) Nanocząstki miedzi 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 Cu do roślin oraz że (3) Nanocząstki miedzi w większym stopniu poprawiają bioaktywność ziarniaków niż po aplikacji mikrocząstek i rozpuszczalnych soli, dzięki stopniowemu i długotrwałemu dostarczaniu Cu z ENPs.

Nadrzędnym celem badań była ocena efektywności nanocząstek miedzi w dolistnym dokarmianiu roślin jęczmienia jarego (*H. vulgare*) w porównaniu do konwencjonalnych środków nawozowych. W ramach głównego celu badań wyróżniono 4 cele szczegółowe, które można uznać za kolejne zadania badawcze realizowane w pracy, tj. (1) Ocena rzeczywistej absorpcji i translokacji miedzi przez rośliny po ekspozycji na nano- miedź i jony miedzi; (2) Analiza biochemicznej odpowiedzi roślin na dolistną aplikację nano-miedzi i ich rozpuszczalnych odpowiedników; (3) Analiza ekspresji genów regulujących transport i detoksykację miedzi w roślinach poddanych działaniu nanocząstek i rozpuszczalnych soli; oraz (4) Ocena potencjału nano-miedzi do biofortyfikacji oraz poprawy cech jakościowych ziarniaków jęczmienia w porównaniu do mikrocząstek i konwencjonalnych nawozów.

Analiza rozdziału Materiały i metody dowodzi umiejętności rozwiązywania przez Doktorantkę postawionych hipotez badawczych na drodze empirycznej. W rozdziale tym Pani Magister przedstawiła materiał roślinny wykorzystany do badań, którym był jęczmień jary (*H. vulgare* L.) odmiany Ella. Ponadto, omówiła różne, zastosowane w pracy związki miedzi tj. nanocząstki miedzi oraz rozpuszczalne związki miedzi, powszechnie stosowane w dolistnym nawożeniu roślin. W dalszej części Doktorantka przedstawiła plan badawczy, z którego jasno wynika schemat założonego w pracy eksperymentu. Podzielony on został na dwa doświadczenia tj. laboratoryjne czyli krótkoterminowe doświadczenie hydroponiczne oraz wazonowe. W tym rozdziale Pani Magister opisała zastosowane metody badawcze – od metod mikroskopii elektronowej za pomocą której scharakteryzowano wykorzystywane w doświadczeniach roztwory Cu pod względem właściwości fizyko-chemicznych, poprzez analizy spektroskopowe liści z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej SEM, analizy biochemiczne próbek roślinnych, analizy molekularne tj. ekspresji genów z zastosowaniem RT qPCR, aż do analiz ilościowych i jakościowych ziarniaków – oceniano plon, zawartość składników pokarmowych, przeciwutleniaczy oraz bioaktywność ziarniaków. Generalnie, rozdział ten jest opisany w sposób prawidłowy na dziesięciu kolejnych stronach dysertacji. Moim zdaniem warto byłoby go uzupełnić o informacje dotyczące np. liczebności odpowiednio roślin lub donic, które były analizowane w ramach poszczególnych doświadczeń. Autorka opisując np. metodykę dla doświadczenia laboratoryjnego na stronie 19 pracy stwierdza: „Grupę kontrolną stanowiły rośliny spryskane roztworem wody Milli-Q z dodatkiem





0.05% Tween20” bez wskazania ile roślin stanowiło kontrolę, a ile było traktowanych odpowiednimi roztworami. Szkoda, że w metodyce nie podano masy liści flagowych pobranych do analiz chemicznych i biologicznych po ekspozycji na Cu. Uważam, że warto byłoby w tym miejscu przedstawić bardziej precyzyjnie schemat doświadczenia.

Kolejny rozdział zatytułowany Omówienie wyników i dyskusja stanowi zasadniczą część dysertacji i poświęcony jest przedstawieniu opublikowanych już wyników badań w pracach, których notę bibliograficzną podałam we wcześniejszym fragmencie recenzji.

Autorka zaprezentowała w tym rozdziale najważniejsze wyniki dotyczące charakterystyki właściwości fizyko-chemicznych zastosowanych roztworów Cu (publikacja 2 i 3); wyniki przeprowadzonych analiz *in situ* interakcji związków Cu z liśćmi *H. vulgare* (publikacja 2 i 3) oraz wyniki badań dotyczących oceny odpowiedzi roślin jęczmienia jarego na dolistną aplikację związków miedzi w zależności od formy i stężenia w warunkach deficytu Cu. W tym zakresie analizowano wpływ ekspozycji związków miedzi na wzrost roślin oraz przeprowadzono analizy biochemiczne i analizy ekspresji genów (publikacja 2 i 3). Ostatni etap badań dotyczył analizy wpływu związków miedzi na wartość odżywczą i zawartość antyoksydantów ziarniaków jęczmienia jarego (publikacja 4).

Otrzymane wyniki zostały omówione przez Doktorantkę na 15 stronach rozprawy doktorskiej, a treść rozdziału w zasadzie w pełni oddaje istotę opublikowanych badań, które dostarczają odpowiedzi na zarysowane we wstępie problemy badawcze. W tej części pracy za najbardziej interesujący i zarazem najtrudniejszy problem badawczy uznaję analizy *in situ* interakcji związków Cu z liśćmi *H. vulgare*, których wyniki szczegółowo przedstawione zostały w publikacjach nr 2 i 3.

Analizy dotyczące ekspresji poszczególnych genów również wydają się bardzo interesujące. W tym kontekście niezrozumiałe dla mnie wydaje się wskazanie na stronie 24 w tabeli 2, że jednym z badanych genów był NIP 2.1, gdyż analiza wyników pracy świadczy o tym, iż wśród analizowanych genów akwaporyn znajdował się gen NIP2.2.

„Wnioski” to rozdział pracy stanowiący podsumowanie badań, których wyniki już wcześniej zostały opublikowane. Pani Magister sformułowała 9 wniosków, które znajdują pełne uzasadnienie w uzyskanych wynikach pracy i są logicznym następstwem przyjętej formy ich omówienia (kompilacja opublikowanych prac). Wielowątkowe podejście Autorki pracy do zagadnień związanych z badaniem wpływu nanocząstek miedzi na dolistne nawożenie jęczmienia i zastosowanie metod statystycznych dodatkowo podnosi walory recenzowanego opracowania oraz dowodzi dociekliwości i pracowitości Doktorantki. Za najcenniejsze, mające znaczenie dla praktyki uważam wnioski dotyczące wpływu zastosowanych związków miedzi na zdrowotność roślin i ziarniaków, czyli odpowiednio wnioski numer 4, 5 i 8, tj.:

4. Krótkotrwała ekspozycja na sole miedzi prowadziła do większego przyrostu biomasy roślin (korzeni i części nadziemnej) niż nano-Cu, co mogło wynikać z dostarczenia pełnej puli deficytowego mikroelementu w fazie intensywnego wzrostu. Jednak po 7 dniach zaobserwowano chlorozę liści po ekspozycji roślin na CuSO<sub>4</sub>, co prawdopodobnie wynikało z





absorpcji toksycznych ilości Cu.

5. Istotne zmiany aktywności antyoksydantów zaobserwowano głównie po 1 dniu od ekspozycji na związki Cu. Oba badane stężenia CuSO<sub>4</sub> jak i wyższa dawka nano-Cu powodowały znacząco większe zmiany w poziomach antyoksydacyjnych markerów wskazujące na wywołanie większego stresu u roślin. Natomiast niższa dawka nano-Cu, zwiększając zawartość niskocząsteczkowych antyoksydantów, mogła wspierać mechanizmy obronne roślin.

8. Mimo, iż aplikacja związków Cu nie zwiększała plonowania jęczmienia jarego, nano-Cu, w przeciwieństwie do pozostałych form Cu, poprawił niektóre cechy jakościowe ziarniaków np. zawartość składników odżywczych (błonnik i flawonoli).

Zastanawiającym jest wniosek drugi:” Ze względu na silną adhezję ENPs do powierzchni liści, jednoznaczne wykazanie pobranej ilości Cu było utrudnione. Jednakże, w oparciu o szereg parametrów biochemicznych i molekularnych istnieją przesłanki potwierdzające pobieranie Cu (nanocząstkowej i/lub jonowej). Analizy te wskazują również na istotny wpływ dawki oraz formy Cu na kinetykę pobierania miedzi”, który jest moim zdaniem zbyt ogólny i mógłby zostać doprecyzowany. Szkoda, że Doktorantka nie wskazała w tym miejscu jakie dawki i formy miedzi ma na myśli, pisząc o ich istotnym wpływie na kinetykę pobierania.

Rozprawa doktorska zawiera również rozdział „Spis literatury” obejmujący 108 pozycji literaturowych. Należy zaznaczyć, że większość cytowań stanowią publikacje z ostatnich dziesięciu lat (2012-2023), przy czym są one starannie dobrane i odnoszą się bezpośrednio do adresowanej w rozprawie problematyki. Dodatkowo piśmiennictwo zawarte jest w każdej z opublikowanych prac.

#### **Uzyskane wyniki i główne walory rozprawy doktorskiej**

Przyjęta koncepcja pracy, w tym zastosowanie innowacyjnych i zróżnicowanych metod badawczych od biochemicznych poprzez mikroskopowe, w tym skaningową mikroskopię elektronową (SEM-EDS) i metody spektroskopowe, aż po nowoczesne techniki molekularne oraz opracowanie statystyczne pozwoliły zrealizować wyznaczony cel rozprawy jakim była ocena efektywności nanocząstek miedzi w dolistnym dokarmianiu roślin jęczmienia jarego w porównaniu do związków miedzi stosowanych w nawozach tradycyjnych.

Wartość merytoryczną przedstawionej do recenzji pracy oceniam bardzo wysoko, a do jej najważniejszych osiągnięć zaliczam:

- wykazanie, że mimo, iż aplikacja związków Cu nie zwiększała plonowania jęczmienia jarego, zastosowanie nano-Cu, w przeciwieństwie do pozostałych form Cu, poprawiło niektóre cechy jakościowe ziarniaków np. zawartość składników odżywczych (błonnik i flawonoli),
- wykazanie istotnego wpływu dawki oraz formy Cu na kinetykę pobierania miedzi,
- stwierdzenie na podstawie poziomu ekspresji genów antyoksydantów, że reakcja na jony Cu (CuSO<sub>4</sub>) była szybsza i silniejsza niż nano-Cu, co świadczy o łagodniejszym wpływie ENPs na rośliny.

Wartym podkreślenia jest fakt, iż wyniki przeprowadzonych badań, poza wartością poznawczą, mają duże znaczenie praktyczne i mogą zostać wykorzystane przez firmy





nawozowe i ośrodki badawcze zajmujące się produkcją nawozów. Wyniki tych badań z pewnością przyczynią się do osiągnięcia szybszego postępu w produkcji nanonawozów.

Analiza tekstu polskojęzycznego opracowania oraz czterech publikacji naukowych, stanowiących niniejszą rozprawę doktorską pozwoliła mi sformułować następujące pytania:

- Jakimi kryteriami sugerowała się Pani wybierając jęczmień jary jako obiekt badawczy?
- Czy w przyszłości w celu pełniejszego poznania interakcji pomiędzy roślinami a nanocząstkami sugerowałaby Pani przeprowadzenie dodatkowych analiz? Jeśli tak, to jakich?
- Ostatni wniosek wydaje się nieco kontrowersyjny. Skoro przeprowadzone przez Panią analizy wykazały spadek mocy do neutralizacji wolnych rodników pod wpływem aplikacji nanocząstek i mikro-Cu, to czy w związku z tym nie należy obawiać się stosowania nanonawozów ze względu na ewentualne obniżenie właściwości prozdrowotnych ziarniaków?
- Dlaczego największe różnice w ekspresji genów związanych z transportem Cu między formą „nano”, a jonami Cu obserwowano przy niższej dawce, krótko po aplikacji tych związków?
- Czy otrzymane wyniki stanowią podstawę/przesłankę do generalnego wnioskowania i bezpośredniego przełożenia na inne gatunki roślin uprawnych?

Pragnę zaznaczyć, iż przytoczone przeze mnie komentarze i wątpliwości mają charakter dyskusyjny i w niczym nie umniejszają wysokich walorów ocenianej pracy, a niektóre z nich mogą być inspiracją dla dalszych badań.

### **Konkluzja**

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Kusiak przedstawiona w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Pani Magister wykazała się bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego niezbędnego dla prowadzenia badań naukowych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest rzetelnym opracowaniem naukowym o istotnej wartości poznawczej, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki mają duże znaczenie praktyczne dla uprawy i ochrony roślin, a zwłaszcza jęczmienia.

W świetle powyższego stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1688 z późn. zm.), stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr Magdaleny Kusiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając wysoką wartość merytoryczną rozprawy i wysoki Impact Factor publikacji, włączonych do cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską, wnoszę o jej wyróżnienie.