UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii
Zakład Fizjologii Roślin

dr hab. Sławomir Borek, prof. UAM
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Zakład Fizjologii Roślin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Stałanowskiej pt. „Nanocząstki srebra w ochronie nasion i siewek grochu (*Pisum sativum* L.) przed patogennymi grzybami"

Rozprawa doktorska wykonana została w Katedrze Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin Wydziału Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Lesława B. Lahuty (Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) i prof. dr. hab. inż. Adama Okorskiego (Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Wydział Rolnictwa i Leśnictwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie).

Formalną podstawą wykonania recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, prof. dr hab. Niny Smolińskiej, z dnia 27 czerwca 2025 r. informujące o powołaniu mnie na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie w dniu 26 czerwca 2025 r.

Pani mgr inż. Karolina Stałanowska ubiega się o stopień naukowy doktora na podstawie trzech oryginalnych i tematycznie powiązanych artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych, anglojęzycznych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Są to następujące publikacje:

1. Stałanowska K., Szablińska-Piernik J., Pszczółkowska A., Railean V., Wasicki M., Pomastowski P., Lahuta L. B., Okorski A. (2024). Antifungal properties of bio-AgNPs against *D. pinodes* and *F. avenaceum* infection of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4525, DOI 10.3390/ijms25084525;

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

2. Stałanowska K., Głowacka K., Buszewski B., Lahuta L. B. (2025). The resistance of germinating pea (*Pisum sativum* L.) seeds to silver nanoparticles. *Plants*, 14(11), 1594, DOI 10.3390/plants14111594;
3. Stałanowska K., Railean V., Pomastowski P., Pszczółkowska A., Okorski A., Lahuta L. B. (2024). Seeds priming with bio-silver nanoparticles protects pea (*Pisum sativum* L.) seedlings against selected fungal pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11402, DOI 10.3390/ijms252111402.

Sumaryczny, zgodny z rokiem opublikowania współczynnik oddziaływania (IF) wymienionych publikacji wynosi 13,8, a liczba punktów MNiSW 350. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, ale podkreślenia wymaga fakt, że Doktorantka w każdej z nich jest autorką pierwszą. Taka pozycja wśród współautorów oraz załączone oświadczenia wszystkich autorów publikacji, jednoznacznie wskazują na bardzo duży wkład mgr inż. Karoliny Stałanowskiej w zaplanowanie badań, wykonanie eksperymentów, gromadzenie danych, opracowanie, analizę i interpretację wyników oraz przygotowanie pierwotnych i ostatecznych wersji manuskryptów. Poza kopiami artykułów i oświadczeniami współautorów publikacji naukowych, w skład rozprawy doktorskiej wchodzą również: spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin oraz 51-stronicowe opracowanie w języku polskim zawierające:

- informacje literaturowe o gospodarczym znaczeniu grochu, chorobach grzybowych grochu i nanocząstkach srebra w zakresie ich wytwarzania, budowy, oddziaływania na organizm rośliny i grzyba oraz wykorzystania w ochronie roślin przed chorobami;
- uzasadnienie podjęcia badań;
- cel i zakres badań z jasno sformułowanymi hipotezami i zadaniami badawczymi;
- opis materiału badawczego i zastosowanych metod;
- zwięzły przegląd uzyskanych wyników z podziałem na poszczególne zadania badawcze;
- wnioski;
- wykaz literatury liczący 108 pozycji.

W rozprawie znajduje się również informacja o:

- źródle finansowania badań (Zadanie 5 „Zastosowanie nanomateriałów i biokompozytów w produkcji roślinnej" w projekcie „Zaawansowane biokompozyty dla gospodarki jutra – BIOGNET", konkurs TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, nr FNP POIR.04.04.00-00-1792/18-00, 2019-2023);
- zgłoszeniu patentowym (nr P.4451104), w którym wykorzystano wyniki dotyczące zastosowania nanocząstek srebra pozyskanych za pomocą bakterii kwasu mlekowego, jako

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

środka fungistatycznego do zaprawiania nasion dla ochrony roślin bobowatych (Fabaceae), szczególnie nasion grochu (*Pisum sativum* L.), przed *Didymella pinodes*. Wyniki te zawarte są w Publikacji 3 wchodzącej z zakres rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Stałanowskiej dotyczy oddziaływania nanocząstek srebra pochodzenia biologicznego (bio-nanocząstki, wytworzone z wykorzystaniem medium pohodowlanego po hodowli bakterii *Lactobacillus paracasei*) na kiełkujące nasiona i siewki grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) i ich protekcyjnej roli wobec chorobotwórczych grzybów *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum*. Grzyby te wywołują askochytozę grochu oraz zgorzel korzeni i podstawy pędów grochu. Są to groźne i powszechne występujące choroby powodujące duże straty w uprawach grochu. W mojej opinii badania Doktorantki są nowatorskie, wartościowe i mają bardzo duże znaczenie, gdyż uzyskana wiedza nie tylko ma charakter podstawowy, ale co ważne, cechuje się bardzo wysokim potencjałem aplikacyjnym, o czym świadczy zgłoszenie patentowe opierające się na wynikach zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że wyniki badań przełożą się na uzyskanie nowych, tańszych i mniej toksycznych środków ochrony roślin, które umożliwią skuteczniejszą walkę z chorobami ważnej rośliny uprawnej, przekładając się tym samym na lepsze parametry plonowania, zarówno w ujęciu ilościowym, jak i jakościowym. Aktualnie są to bardzo ważne kwestie, gdyż nasilające się zmiany klimatyczne i stale powiększająca się populacja ludzi, doprowadzają w skali globalnej do sukcesywnego kurczenia się areału rolnego. Pozyskiwanie więc wystarczającej ilości żywności i paszy staje się coraz istotniejsze i trudniejsze, szczególnie jeśli ta produkcja ma nie mieć charakteru rabunkowego i destrukcyjnego dla środowiska i konsumentów. Niemniej jednak poprzez innowacyjne badania i wdrażanie ich efektów w rolnictwie możliwe jest opracowywanie nowych sposobów ochrony roślin uprawnych, których stabilny plon będzie spełniał coraz to większe wymagania, jakie stawia się np. żywności funkcjonalnej, do której bez wątpienia zaliczyć można produkty wytwarzane z nasion czy strąków grochu.

Badania zrealizowane przez mgr inż. Karolinę Stałanowską opisane są szczegółowo w trzech publikacjach, które w rozprawie doktorskiej poprzedzone zostały zbiorczym opracowaniem liczącym 51 stron maszynopisu. Oceniając tę część rozprawy nie mam zastrzeżeń merytorycznych ani redakcyjnych. Jest ona napisana w sposób profesjonalny, czyli uporządkowany, esencjonalny i w bardzo dobry sposób przedstawiający naukowe tło, hipotezy i zadania badawcze, podejście metodyczne, uwypuklając jednocześnie najważniejsze wyniki i wnioski. Opracowanie to zawiera dodatkowe schematy (nie są one elementami publikacji), które ułatwiają uporządkowanie wiedzy teoretycznej z zakresu oddziaływania nanocząstek srebra na organizm grzyba i rośliny, jak i zrozumienie procedur eksperymentalnych. Dobór cytowanej literatury jest prawidłowy. Tak

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

dobrze przygotowany opis badań jednoznacznie świadczy o bardzo dobrej znajomości podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej.

Aby osiągnąć główny cel badań, czyli określić skuteczność zastosowania nanocząstek srebra w ochronie grochu zwyczajnego przed *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum* badania zostały podzielone na zadania badawcze obejmujące:

- zbadanie inhibicyjnej skuteczności nanocząstek srebra we wzroście grzybni badanych patogenów w warunkach *in vitro*;
- wyznaczenie zakresu stężeń i czasu oddziaływania nanocząstek srebra bezpiecznych dla kiełkujących nasion i rozwijających się siewek grochu;
- określenie istotności stężenia i sposobu aplikacji nanocząstek srebra (nanokondycjonowanie nasion lub aplikacja nalistna siewek) dla efektywności ochrony siewek grochu przed *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum*;
- zidentyfikowanie zmian spowodowanych przez nanocząstki srebra i patogeny grzybowe w metabolomie i aktywności systemu antyoksydacyjnego siewek grochu.

Dla pełnego unaocznienia fungistatycznej skuteczności nanocząstek srebra i ich protekcyjnej efektywności w postępie objawów chorobowych wywoływanych przez *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum* w eksperymentach wykorzystano również komercyjnie dostępne i stosowane w rolnictwie fungicydy Amistar 250 SC, Toledo Extra 430 SC oraz Maxim 025 FS.

Spośród efektów badań opisanych w rozprawie doktorskiej na szczególną uwagę zasługuje:

- wykazanie wysokiej skuteczności nanocząstek srebra w przeciwdziałaniu infekcji *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum* i rozwojowi askochytozy i zgorzeli podstawy pędu siewek grochu. Poziom tej skuteczności może być taki sam lub nawet wyższy niż efektywność komercyjne dostępnych fungicydy, co bez wątpliwości pozwala uznać badane nanocząstki srebra za substancje fungistatyczne, potencjalnie przydatne w pracach rozwojowych nastawionych na tworzenie innowacyjnych środków ochrony roślin uprawnych;
- potwierdzenie wyższej skuteczności zabiegu nanokondycjonowania nasion grochu w zawiesinach nanocząstek srebra w porównaniu do aplikacji nalistnej w przeciwdziałaniu infekcji *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum*, z zastrzeżeniem konieczności optymalizacji procedury nanokondycjonowania dla różnych odmian grochu;
- pokazanie braku toksyczności nanocząstek srebra dla kiełkujących nasion i siewek grochu aplikowanych w procesie nanokondycjonowania, głównie poprzez określenie zmian w wartościach podstawowych parametrów morfometrycznych, zawartości wybranych reaktywnych form tlenu oraz wydajności enzymatycznego komponentu systemu antyoksydacyjnego;

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

- zidentyfikowanie zmian w profilach metabolicznych korzeni, epikotyla lub pędu oraz liścieni w trakcie wzrostu i rozwoju siewek grochu w warunkach kontrolnych, aplikowania nanocząstek srebra oraz infekcji *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum*. Obserwowane zmiany w profilach metabolicznych siewek traktowanych nanocząstkami srebra lub infekowanych grzybami nie były zmianami jakościowymi, lecz ilościowymi, głównie w zawartości dominujących ilościowo sacharozy, homoseryny, asparaginy, kwasu jabłkowego i cytrynowego, a akumulacja proliny w korzeniach siewek infekowanych sugerować może udział tego aminokwasu w reakcjach obronnych grochu wobec obu badanych patogenów grzybowych;
- skonkludowanie, iż nie jest możliwe wytypowanie wspólnych metabolicznych markerów reakcji (odporności) siewek grochu na infekcję *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum* wyłącznie na podstawie zmian w profilach metabolicznych wywołanych przez nanocząstki srebra, każdego z patogenów, jak i jednoczesnego oddziaływania nanocząstek srebra i patogenów;
- zgłoszenie patentowe nr P.445104, które w głównej mierze dotyczy zastosowania nanocząstek srebra, jako środka fungistatycznego w ochronie nasion grochu przed *Didymella pinodes*.

W trakcie lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań, dlatego poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących kwestii.

- Zarówno w publikacjach jak i w opisie badań dokładnie wskazano miejsce infekowania siewek grochu zawiesiną zarodników dwóch badanych grzybów, jakim była nasada korzenia i podstawa pędu. Precyzyjnie określono również liczbę zarodników w inokulum, ale nie znalazłem informacji o objętości inokulum, i co ważniejsze, o sposobie inokulowania siewek grochu. Czy inokulum nanoszone było powierzchniowo, czy była to może mikroiniekcja?
- W badaniach poświęcono bardzo dużo miejsca na analizę zmian w metabolomie siewek grochu spowodowanymi nanocząstkami srebra i patogennymi grzybami. Badania metabolomiczne generują bardzo dużą ilość danych, które zostały przedstawione w bardzo przystępny i zrozumiały sposób, za co należą się słowa uznania dla Doktorantki. Wyniki tych analiz zostały też szeroko skonfrontowane z danymi literaturowymi, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zmiany w obrębie rozpuszczalnych cukrowców, aminokwasów i kwasów organicznych. Zaobserwowane zmiany w zawartości poszczególnych metabolitów interpretowane są w rozprawie jako efekt syntezy, rozkładu, translokacji w siewce, np. z pędu do korzenia czy zużywania pewnych metabolitów przez patogeny grzybowe. Zwracam jednak uwagę, że badania prowadzone były na kiełkujących nasionach i rozwijających się siewkach, czyli na takich stadiach wzrostu i rozwoju roślin, kiedy są one jeszcze hetero-autotroficzne, czyli wykorzystują materiały zapasowe zdeponowane w nasionach przez roślinę macierzystą.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

Zastanawiam się, dlaczego w interpretacji danych matabolomicznych nie uwzględniono podarzy metabolitów z degradowanych materiałów zapasowych? Nasiona grochu niemal w 50 procentach wypełnione są skrobią, której degradacja ostatecznie prowadzi do podarzy glukozy czy sacharozy. Źródłem tych cukrów może być też zapasowy tłuszcz, którego w nasionach grochu jest kilka procent. Wspomnieć też trzeba o co najmniej kilkunastu procentach zapasowego białka, które jest bezpośrednim źródłem wolnych aminokwasów, a łącznie z zapasowym tłuszczem, pośrednio, również kwasów organicznych. Czy znane są Doktorantce dane literaturowe dotyczące oddziaływania nanocząstek srebra albo innych metali na intensywność uruchamiania materiałów zapasowych w trakcie kiełkowania nasion i wzrostu siewki grochu albo innych gatunków, w tym gatunków roślin Bobowatych? Czy Doktorantka brała pod uwagę albo planuje takie analizy? Można by się też zastanowić nad podażą niektórych metabolitów przez grzyba do rośliny. I tutaj pojawia się moja druga wątpliwość dotycząca analizy metabolomicznej. Napisano, że do badań pobierano całe siewki, czyli, jak rozumiem, w próbkach wykorzystywanych do zidentyfikowania zmian w metabolomie siewek grochu infekowanych *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum* znalazł się też komponent grzybowy. A może jednak fragmenty siewek z widocznymi objawami chorobowymi były usuwane z siewek przed ich przygotowaniem do analiz metabolomicznych?

Z obowiązku recenzenta wspomnieć muszę o niewłaściwym sformułowaniu i jednym błędzie, które zauważyłem w rozprawie doktorskiej.

- W polskojęzycznym opisie zrealizowanych badań Doktorantka zazwyczaj używa terminu 'stres' dla określenia 'czynnika stresowego'. Wprawdzie w języku angielskim takie rozgraniczenie nie jest powszechne, ale w tekście napisanym w języku polskim nie powinno używać się tych dwóch terminów dowolnie. Z łatwością bowiem można 'stresem' nazwać efekt czy stan organizmu, który spowodowany został 'czynnikiem stresowym'. Zatem patogenne grzyby zaliczyłbym do biotycznych czynników stresowych, a nie stresów, jak jest to napisane np. na stronie 10 rozprawy.
- Na stronie 6 Publikacji 3 (2 linia ostatniego akapitu) błędnie nazwany został typ kiełkowania nasion grochu, gdyż nasiona grochu kiełkują hypogeicznie, a nie epigeicznie. Dodać jednak muszę, że opis kiełkowania nasion grochu w dalszej części zdania jest już prawidłowy. Błąd dotyczy więc tylko jednego wyrazu.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr inż. Karoliny Stałanowskiej oceniam bardzo wysoko, zarówno w aspekcie naukowej i aplikacyjnej wartości uzyskanych wyników jak i jakości prezentacji badań. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Stałanowskiej spełnia wymogi określone dla prac doktorskich w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571), stanowiąc bardzo ważną

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

pozycję w badaniach mających na celu poznanie oddziaływań nanocząstek srebra na kiełkujące nasiona i siewki grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) i chorobotwórcze grzyby *Didymella pinodes* i *Fusarium avenaceum* oraz w pracach rozwojowych nastawionych na opracowanie innowacyjnych środków ochrony upraw grochu przed patogenami grzybowymi. Wnoszę tym samym do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Stałanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na innowacyjność badań i wysoką wartość naukowo-aplikacyjną uzyskanych wyników, wnioskuję do Rady Naukowej o wyróżnienie rozprawy.

Uzasadnienie wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Stałanowskiej

Badania opisane przez mgr inż. Karolinę Stałanowską w trzech oryginalnych publikacjach naukowych składających się na Jej rozprawę doktorską mają charakter nie tylko podstawowy, ale ich efekty mogą mieć bezpośrednie przełożenie aplikacyjne i być wykorzystane w rolnictwie. Świadczy o tym zgłoszenie patentowe (nr P.445104) bazujące na wynikach badań opisanych w Publikacji 3. Groch jest źródłem nie tylko wartościowego plonu w aspekcie żywnościowym i paszowym, ale jego uprawa może też wyraźnie obniżyć koszty uprawy i zwiększyć plonowanie roślin następczych. Niestety, podobnie jak wiele innych gatunków roślin Bobowatych, groch nie jest powszechnie uprawiany w Polsce, ale stabilizacja plonowania, na którą składa się m.in. odporność na choroby grzybowe zapewne przyniosłaby większe zainteresowanie rolników tym gatunkiem. I tutaj ważną rolę odegrać mogą wyniki badań mgr inż. Karoliny Stałanowskiej. Gromadzenie wiedzy podstawowej i jej wykorzystywanie do tworzenia nowych, innowacyjnych środków ochrony roślin jest konieczne nie tylko dla zwiększenia stabilności, opłacalności i upowszechnienia upraw, ale też dbania o środowisko naturalne.

Uwzględniając publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Stałanowskiej, chcę wyrazić uznanie dla szerokiego zakresu badań oraz za ogrom pracy, jaki musiał być włożony w zaplanowanie i wykonanie eksperymentów, zgromadzenie, opracowanie, przeanalizowanie i opublikowanie wyników badań. W szczególności mam tutaj na myśli profilowanie metaboliczne, którego surowe dane często trudno jest przedstawić w zwięzłej i zrozumiałej formie. Wysoka wartość naukowo-aplikacyjna i opublikowanie wyników badań zrealizowanych przez mgr inż. Karolinę Stałanowską świadczy o Jej umiejętności sprawnego i efektywnego planowania i wykonywania eksperymentów, opracowywania i analizowania

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/

wyników oraz wyciągania właściwych wniosków. Wprawdzie publikacje są wieloautorskie, ale zamieszczony w rozprawie opis badań i wyników jednoznacznie wskazują też na dużą swobodę Doktorantki w przygotowywaniu tekstów naukowych, co ma kluczowe znaczenie dla upubliczniania uzyskiwanych wyników czy przygotowywania wniosków grantowych. Ponadto pierwsza pozycja w gronie współautorów wszystkich trzech publikacji świadczy o bardzo dużym angażowaniu się w badania i zdolności Doktorantki do pracy w zespołach badawczych, co jednoznacznie pozytywnie rokuje na dalszy rozwój naukowy mgr inż. Karoliny Stałanowskiej, a wyróżnienie Jej rozprawy doktorskiej zapewne byłoby znaczącym wzmocnieniem tego procesu.

Sławomir Borek

Poznań, 01 września 2025 r.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. +48 61 829 58 87
https://ibe.amu.edu.pl/zfr/