Poznań, 21.09.2025

Prof. dr hab. Iwona Morkunas
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Karoliny Stałanowskiej
pt. „Nanocząstki srebra w ochronie nasion i siewek grochu (*Pisum sativum* L.) przed patogennymi grzybami"
„Silver nanoparticles in the protection of pea (*Pisum sativum* L.) seeds and seedlings against fungal pathogens"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Stałanowskiej została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. Lesława Bernarda Lahuty z Katedry Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (UWM) i Pana prof. dr hab. Adama Okorskiego z Katedry Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej UWM.

Recenzowana praca dotyczy wykorzystania biologicznie syntetyzowanych nanocząstek srebra (bioAgNPs) w ochronie grochu przed patogenami grzybowymi *Didymella pinodes* (syn. *Mycosphaerella pinodes*) i *Fusarium avenaceum*. Hipoteza robocza badań Pani mgr inż. Karoliny Stałanowskiej zakłada, że bioAgNPs posiadają właściwości fungistatyczne wobec wyżej wymienionych patogenów grzybowych, a zatem mogą hamować w określonym stężeniu wzrost grzybni i zarodnikowanie. Ponadto aplikacja dolistna bioAgNPs lub pretraktowanie nasion grochu w roztworze bioAgNPs może ograniczać, zarówno rozwój infekcji powodowanej przez patogeny jak i choroby w siewkach i roślinach grochu. Założono także w niniejszych badaniach, że samo nanokondycjonowanie nasion w roztworze bioAgNPs może indukować zmiany aktywności antyoksydacyjnej oraz zmiany profilu i zawartości metabolitów pierwotnych w organach kilkudniowych siewek grochu.

Obiektem badań niniejszej rozprawy doktorskiej były zarówno patogeniczne grzyby, tj. *D. pinodes* (syn. *M. pinodes*) (jeden z trzech patogenów wywołujących u grochu chorobę o nazwie zgorzelowa plamistość grochu) *i F. avenaceum* (powodujący fuzariozę), a także 22 dniowe rośliny grochu (K. Stałanowska i wsp., IJMS, kwiecień 2024) i 7 dniowe siewki grochu (*P. sativum* L. cv. *Nemo*) (K. Stałanowska i wsp., IJMS, październik 2024), które były

pretraktowane bioAgNPs lub nie pretraktowane i inokulowane odpowiednim patogenem lub nie inokulowane oraz pretraktowane określonym fungicydem i inokulowane patogenem. Niezależnie od powyższego, obiektem badań były także kiełkujące nasiona pretraktowane tylko bioAgNPs i kontrolne (K. Stałanowska i wsp., Plants, 2025).

Tematyka badań niniejszej rozprawy doktorskiej jest kontynuacją badań od wielu lat realizowanych pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Lesława Bernarda Lahuty. Należy wspomnieć, że badania prowadzone przez Doktorantkę zostały sfinansowane z projektu „Zaawansowane biokompozyty dla gospodarki jutra BIOG-NET", FNP POIR.04.04.00-00-1792/18-00; projekt został zrealizowany w ramach programu TEAM NET finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl trzech eksperymentalnych monotematycznych publikacji naukowych, opublikowanych w międzynarodowych specjalistycznych czasopismach naukowych. Dwie oryginalne publikacje zostały opublikowane w International Journal of Molecular Sciences w 2024 roku (IF_{2024} 4.9; $IF_{5\text{-Year Impact Factor}}$ 5.7), natomiast trzecia publikacja została opublikowana w czasopiśmie Plants w 2025 roku (IF_{2024} 4.1, $IF_{5\text{-Year Impact Factor}}$ 4.5). Łączny sumaryczny impact factor tych publikacji wynosi 13.9, a łączna wartość według kryteriów MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 350 punktów (tj. 140 pkt., 140 pkt. i 70 pkt. MNiSW, odpowiednio). Wszystkie trzy oryginalne publikacje wchodzące w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej są pracami wieloautorskimi. We wszystkich pracach doświadczalnych Pani mgr inż. Karolina Stałanowska jest pierwszym autorem i Jej udział w tych publikacjach jest znaczący. Zatem polegał na opracowaniu koncepcji i metodologii badań, wykonaniu doświadczeń i analiz laboratoryjnych, przeprowadzeniu statystycznej analizy wyników, ich wizualizacji i interpretacji, napisaniu manuskryptu i udziału w korekcie manuskryptów po recenzjach. Ponadto współautorzy poszczególnych prac złożyli odpowiednie oświadczenia dotyczące ich wkładu w powstanie każdej z publikacji. Prace przed opublikowaniem w czasopismach podlegały zarówno ocenie Edytorów i specjalistów Recenzentów, otrzymując pozytywne opinie i akceptację do opublikowania. Należy nadmienić, że oryginalne publikacje wchodzące w skład dysertacji Pani Karoliny Stałanowskiej zostały opublikowane w czasopismach Open Access, których wydawcą jest MDPI, a zatem są powszechnie dostępne. Należy wspomnieć także, że zastosowanie nanocząstek srebra pozyskanych za pomocą bakterii kwasu mlekowego jako środka fungistatycznego w postaci wodnej zawiesiny do zaprawiania nasion dla ochrony roślin bobowatych (Fabaceae), szczególnie grochu siewnego (*Pisum sativum* L.), przed *Didymella*

pinodes, jest przedmiotem zgłoszenia patentowego nr P445.104. Informacja ta została zamieszczona w publikacji pt. „Seeds Priming with Bio-Silver Nanoparticles Protects Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings Against Selected Fungal Pathogens" (K. Stałanowska i wsp., IJMS, październik 2024.

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej w ramach pierwszej części badań prezentowanych w pierwszej publikacji pt. „Antifungal Properties of Bio-AgNPs against *D. pinodes* and *F. avenaceum*" opublikowanej w IJMS w kwietniu 2024 roku, Doktorantka przetestowała *in vitro* wpływ egzogennego oddziaływania bioAgNPs o różnym stężeniu na zarodnikowanie patogenów grzybowych *D. pinodes* i *F. avenaceum* oraz na wzrost grzybni. Następnie określiła zmiany profilu metabolitów polarnych i ich stężenie w organach siewek grochu po aplikacji bioAgNPs i infekcji patogenami. Równolegle obok kontroli, zastosowany został dla porównania z AgNPs, wpływ fungicydu Amistar 250 SC względem *D. pinodes* i fungicydu Toledo Extra 430 SC względem *F. avenaceum*.

W mojej opinii wykonanie badań do pierwszej wymienionej przeze mnie publikacji dało Doktorantce solidne podstawy do prowadzenia kolejnych etapów badań i realizacji wyznaczonych celów w ramach dysertacji. Doktorantka, po otrzymaniu bioAgNPs z kultur bakterii *Lactobacillus paracasei* (o zróżnicowanej średnicy 5 - 30 nm) przeprowadziła ich obserwacje w mikroskopie skaningowym (SEM) i mikroskopie transmisyjnym elektronowym (TEM). Następnie skoncentrowała się na poznaniu egzogennego oddziaływanie bioAgNPs w zakresie stężeń od 10 do 200 mg/L na badane patogeny grzybowe, porównując otrzymane wyniki w stosunku do kontroli i odpowiednich fungicydów.

Uważam, że wyniki otrzymane przez Doktorantkę w ramach pierwszej części badań dostarczyły ważnej informacji na temat skutecznego wpływu AgNPs w hamowaniu rozwoju infekcji powodowanej przez *D. pinodes* i *F. avenaceum*. Przemawiają za tym wyniki takie jak określenie minimalnego stężenia hamującego rozwój zarodników (MIC, test z resazuryną), stopień hamowania wzrostu grzybni patogenicznych grzybów (MG)I, poziom porażenia [DI %] i określenie poziomu grzybowego genomowego DNA. Wyniki powyższe są istotne ze względu na brak w pełni odpornych odmian grochu na patogeny grzybowe. Ponadto są przesłanką do stosowania biologicznie syntetyzowanych nanocząsteczek srebra (bio-AgNPs) jako nowego środka ochrony grochu względem *D. pinodes* i *F. avenaceum*, alternatywy w stosunku do silnie toksycznych fungicydów. Należy podkreślić, że ważnymi osiągnięciami tej pracy było po raz pierwszy wykazanie, że aplikacja AgNPs w *in vitro* testach może ograniczać rozwój patogenicznych grzybów *D. pinodes* i *F. avenaceum*, a także może ograniczać rozwój infekcji i symptomów chorobowych na roślinach grochu. Ponadto istotnym wynikiem w ramach

dysertacji było określenie zawartości srebra w nanocząstkach stosując spektroskopię fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS), która potwierdziła wysoką obecność metalicznego srebra, co jest bezpośrednio związane z ich potencjałem jako skutecznych środków antymikrobowych. Poza tym ważnym osiągnięciem było także wykazanie, że aplikacja bioAgNPs hamuje rozwój infekcji powodowanej przez patogeniczne grzyby na poziomie porównywalnym z oddziaływaniem zastosowanych fungicydów. Dodatkowo analizy metabolomiczne przeprowadzone dla 22 dniowych roślin grochu z wariantu kontrolnego wykazały, że węglowodany rozpuszczalne, takie jak glukoza i sacharoza dominowały pod względem zawartości w korzeniach, pędach i liścieniach, natomiast spośród kwasów organicznych uwagę zwracały najwyższe zawartości cytrynianu i jabłczanu. Ponadto Doktorantka odnotowała także wysokie stężenie homoseryny i asparaginy, wskazując że są dominującymi aminokwasami, pełniącymi kluczową rolę w metabolizmie azotu w roślinach grochu. Należy podkreślić, że stosując analizę PCA, tj. analizę głównych składowych (*ang.* principal component analysis), Doktorantka wykazała znaczące różnice pomiędzy badanymi grupami, tj. kontrolną, pretraktowaną bioAgNPs, infekowaną *D. pinodes* lub *F. avenaceum* lub pretraktowaną fungicydem.

W mojej opinii zastosowanie analizy PCA pokazuje interesujące znaczące różnice dotyczące polarnych metabolitów wykrywanych w poszczególnych badanych grupach. Poza tym, Doktorantka wykazała także w tej publikacji, że infekcja patogenami *D. pinodes* lub *F. avenaceum* powoduje znaczące zmiany zawartości zidentyfikowanych metabolitów polarnych (TIPM), w tym całkowitych rozpuszczalnych węglowodanów (TSC), całkowitych aminokwasów (TAA), całkowitych kwasów organicznych (TOA) i całkowitych pozostałych związków (TRC).

Mam kilka komentarzy w odniesieniu do opisu prac eksperymentalnych w tej publikacji:

- Doktorantka określa 22 dniowe rośliny grochu siewkami, jest to już bardziej wczesna faza rozwoju wegetatywnego, tym bardziej że należy dodatkowo doliczyć czas po inokulacji 14 dni
- Uważam, że można było zamieścić schemat w rozdziale Materiał i Metody, który pokazywałby wszystkie etapy prowadzenia kultur, od sterylizacji nasion do momentu pobierania materiału do analiz
- Opisując wyniki należało wspomnieć o aktywności resazuryny, tak aby czytający publikację nie potrzebował szukać informacji. Poza tym przy podpisie ryciny także należało zamieścić jedno zdanie wyjaśniające. Ponadto w “Materials and Methods, 4.3. MIC Value Determination—Resazurin Assay”, test z wykorzystaniem resazuryny powinien być bardziej

precyzyjnie opisany, szczególnie powinna być zamieszczona informacja o aktywności tego barwnika.

Na przykład, należało wstawić “Resazurin is an oxidation–reduction indicator used for the evaluation of cell growth. It is a blue non-fluorescent and non-toxic dye that becomes pink and fluorescent when reduced to resorufin by oxidoreductases within viable cells.” Lub ”A microtiter plate-based assay with resazurin uses a blue, non-fluorescent dye that turns pink and fluorescent when reduced by metabolically active fungi, indicating cell growth and viability. Next by measuring the change in fluorescence within microplate wells over time to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values.”

- The petri dishes, powinno być napisane “The Petri dishes”

- proszę o komentarz wyjaśniający znaczący spadek całkowitej zawartości węglowodanów (*ang.* Total Soluble Carbohydrates TSCs) w pędach

Z kolei w drugiej eksperymentalnej publikacji pt. „Seeds Priming with Bio-Silver Nanoparticles Protects Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings Against Selected Fungal Pathogens” opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, w październiku 2024 roku, Doktorantka pragnie wykazać, że nanoczastki srebra (bioAgNPs) mogą być wykorzystywane do kondycjonowania nasion w celu ochrony grochu przed patogenami grzybowymi, tj. *D. pinodes* and *F. avenaceum*. W ramach tej pracy Doktorantka określa parametry wzrostu siewek grochu (*P. sativum* L.cv. Nemo), pochodzących z Danko Hodowli Roślin w Polsce, stopień nasilenia choroby powodowanej przez patogeny i ilość gDNA *D. pinodes* i *F. avenaceum* w siewkach grochu po 14 dniach od momentu inokulacji, dowodząc że kondycjonowanie nasion bio-AgNP w stężeniach 50 i 100 mg/L znacząco hamuje rozwój infekcji powodowanej przez patogeniczne grzyby *F. avenaceum* (70%) i *D. pinodes* (90%). Z pewnością wynik dla *D. pinodes* decyduje o zgłoszeniu patentu dotyczącego zastosowania bioAgNPs dla ochrony roślin bobowatych (Fabaceae), szczególnie grochu siewnego (*P. sativum* L.) przed *D. pinodes*, co zostało już wcześniej przez mnie wspomniane. Jest to ważne osiągnięcie zarówno Doktorantki jak i całego zespołu badawczego. Ponadto Doktorantka określiła także zmiany profilu polarnych metabolitów i ich zawartości w siewkach spowodowane kondycjonowaniem w bioAgNPs i infekcją. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki pokazały przede wszystkim zmiany metabolitów pierwotnych, tj. profilu i zawartości węglowodanów rozpuszczalnych i aminokwasów, będące efektem wpływu bioAgNPs, patogena grzybowego i fazy rozwojowej grochu.

Mam pytanie dotyczące przygotowywania materiału roślinnego, dlaczego po imbibicji nasion grochu, nasiona grochu suszono w temperaturze 30°C przez 24 godz.?

Z kolei w trzeciej eksperymentalnej publikacji pt. „The Resistance of Germinating Pea (Pisum sativum L.) Seeds to Silver Nanoparticles" opublikowanej w Plants w 2025 roku, Doktorantka skoncentrowała się głównie na wczesnej fazie kiełkowania nasion i rozwoju kilkudniowej siewki grochu. Zatem Doktorantka podjęła próbę określenia wpływu samego bioAgNPs w dwóch stężeniach, tj. 50 i 200 mg/L na żywotność komórek, względne generowanie intermediatów reaktywnych form tlenu, całkowitą zdolność antyoksydacyjną, aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych oraz profil polarnych metabolitów w organach siewek grochu. Jednym z ważniejszych wyników tej części badań było wykazanie przez Doktorantkę, że bioAgNPs przy niższej koncentracji indukowały aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną w korzeniach siewek grochu. Ponadto istotnymi odnotowanymi przez Doktorantkę wynikami był zwiększony poziom jabłczanu, kwasu fosforowego, proliny, GABA i alaniny w korzeniach i epikotylach siewek grochu.

W mojej opinii zastosowana przez Doktorantkę analiza głównych składowych (PCA) ujawniła wyraźnie odrębne grupy polarnych metabolitów dla kontrolnych organów siewek grochu i po ekspozycji na powyższe stężenia AgNPs. Jest to bardzo obrazowy wynik. Według mnie jest to najbardziej interesujący wynik, ponieważ pokazuje, że profile metaboliczne badanych grup eksperymentalnych znacząco różnią się od siebie.

Prace doświadczalne wchodzące w skład dysertacji pokazują, że Doktorantka opanowała szereg metod, tj. metodę prowadzenia *in vitro* kultur grzybów, metody aplikacji bioAgNPs i inokulacji patogenami, metody przygotowania kiełkujących nasion grochu i kultur siewek grochu, a także metody badawcze dotyczące oznaczania genomowgo grzybowego DNA stosując NanoDrop, wykonanie reakcji qPCR, metody ekstrakcji polarnych metabolitów i metody ich oznaczania stosując chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) i chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrią mas (GC-MS), przygotowanie materiału do obserwacji w mikroskopie konfokalnym w celu określenia intermediatów reaktywnych form tlenu, barwienia histochemiczne z wykorzystaniem 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) dla lokalizacji H_2O_2, 2,3,5-trifenylotetrazoliowego chlorku (TTC) w celu określenia żywotności komórek i chlorku błękitu tetrazolowego w celu określenia lokalizacji anionorodnika ponadtlenkowego, metody spektrofotometryczne oznaczania aktywności enzymów antyoksydacyjnych i całkowitej zdolności antyoksydacyjnej. Chciałabym zaznaczyć, że całość wyników prezentowanych w publikacjach jest solidnie opracowana. Ponadto należy pokreślić, że wyniki badań przedstawione we wszystkich trzech publikacjach zostały opracowane statystycznie.

We wnioskach końcowych wysoko oceniam osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę pracy doktorskiej Doktorantki. Ponadto należy podkreślić, że Doktorantka pracowała w zespole specjalistów z zakresu fizjologii roślin, fitopatologii i nanotechnologii, realizując projekt finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowany przez Unię Europejską, w związku z powyższym otrzymała dobre, solidne przygotowanie i pomoc w realizacji badań stanowiących podstawę dysertacji. W moim przekonaniu, Doktorantka będąc włączona w realizację projektu, osiągnęła dojrzałość naukową. Stopień skomplikowania badań wymagał z pewnością od mgr inż. Karoliny Stałanowskiej wielkiego nakładu pracy doświadczalnej i wytrwałości, nawet przy wsparciu Promotorów pracy doktorskiej i całego zespołu badawczego.

Uważam, że osiągnięcia prezentowane we wszystkich trzech oryginalnych publikacjach stanowiące rozprawę doktorską Pani mgr inż. Karoliny Stałanowskiej wnoszą znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne w zakresie oddziaływań zarówno bioAgNPs - patogen grzybowy jak i bioAgNPs - roślina gospodarz - patogen grzybowy. Stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr inż. Karolinę Stałanowską rozprawa doktorska pt. „Nanocząstki srebra w ochronie nasion i siewek grochu (*Pisum sativum* L.) przed patogennymi grzybami" spełnia warunki określone w art. 187 i 190 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Stałanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

J. Markuwas