

Prof. UPP dr hab. Tomasz Kleiber  
Pracownia Żywienia Roślin, Katedra Fizjologii Roślin  
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 17.8.2022.

DZIEKANAT WYDZIAŁU  
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA  
Wpłynęło dnia 22.08.2022r.

## RECENZJA

### **Rozprawy doktorskiej mgr inż. Marleny Grzanki pt. *Rola wanadu w procesie biofortyfikacji w jod kukurydzy cukrowej i sałaty***

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Sylwestera Smolenia z Zakładu Żywienia Roślin, Katedry Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Recenzja została wykonana na zlecenie Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie i jest zgodna z wytycznymi zawartymi w umowie z dnia 6 lipca 2022 roku.

### **Tytułem wstępu**

Zalecenia WHO wskazują na potrzebę zmniejszenia spożycia przez ludzi soli kuchennej. Jej nadmiar przyczynia się między innymi do problemów z nadciśnieniem i chorobami układu krążenia. Tymczasem to właśnie sól (jodowana) jest źródłem jodu, będącego niezbędnym pierwiastkiem w diecie człowieka, między innymi do prawidłowego funkcjonowania tarczycy. Jedną z alternatywnych metod wprowadzenia jodu do diety może być biofortyfikowanie nim roślin. Badania w tym zakresie, oprócz znaczenia poznawczego, mogą mieć zatem również ważne znaczenie aplikacyjne.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marleny Grzanki ma formę opracowania składającego się z 5 wieloautorskich publikacji naukowych z listy JCR (z kopiami) stanowiącymi jednotematyczny cykl.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

Publikacja 1: Grzanka, M., Smoleń S., Kováčik P. 2020. Effect of vanadium on the uptake and distribution of organic and inorganic forms of iodine in sweetcorn plants during early-stage development. Agronomy 10(11). doi: 10.3390/agronomy10111666.

Punktacja MNiSW<sub>2020</sub>: 100 pkt, IF<sub>2020</sub>: 3,417



Publikacja 2: **Grzanka M.**, Smoleń S., Skoczylas Ł., Grzanka D. 2021. Biofortification of sweetcorn with iodine: Interaction of organic and inorganic forms of iodine combined with vanadium. *Agronomy* 11(9), 1720. doi: 10.3390/agronomy11091720.

Punktacja MNiSW<sub>2021</sub>: 100 pkt, IF<sub>2021</sub>: 3,417

Publikacja 3: **Grzanka M.**, Smoleń S., Skoczylas Ł., Grzanka D. 2022. Synthesis of organic iodine compounds in sweetcorn under the influence of exogenous foliar application of iodine and vanadium. *Molecules* 27, 1822. [https://doi.org/ 10.3390/molecules27061822](https://doi.org/10.3390/molecules27061822).

Punktacja MNiSW<sub>2022</sub>: 140 pkt, IF<sub>2022</sub>: 4,412

Publikacja 4: Smoleń S., Kowalska I., Halka M., Ledwożyw-Smoleń I., **Grzanka M.**, Skoczylas Ł., Czernicka M., Pitala J. 2020. Selected aspects of iodate and iodosalicylate metabolism in lettuce including the activity of vanadium dependent haloperoxidases as affected by exogenous vanadium. *Agronomy* 10(1), 1-21 doi: 10.3390/agronomy10010001.

Punktacja MNiSW<sub>2020</sub>: 100 pkt, IF<sub>2020</sub>: 3,417

Publikacja 5: Smoleń S., Czernicka M., Kowalska I., Kęska K., Halka M., Grzebelus D., **Grzanka M.**, Skoczylas Ł., Pitala J., Koronowicz A., Kováčik P. 2021 New aspects of uptake and metabolism of non-organic and organic iodine compounds—the role of vanadium and plant-derived thyroid hormone analogs in lettuce. *Frontiers in Plant Science* 12, 608. doi: 10.3389/fpls.2021.653168.

Punktacja MNiSW<sub>2021</sub>: 100 pkt, IF<sub>2021</sub>: 5,753

Sumaryczny IF powyższych publikacji wynosi 20,416, a łączna liczba punktów 540.

Doktorantka w 3 publikacjach jest pierwszym autorem, w jednej piątym, a w kolejnej siódmym autorem. Jej udział w poszczególnych publikacjach został podany w załączonych do autoreferatu oświadczeniach.

Wprowadzenie do rozprawy stanowi bardzo wartościowy przegląd literatury, podzielony na 3 podrozdziały, w których przedstawiono kwestie związane z:

- wpływem i znaczeniem jodu i wanadu na funkcjonowanie organizmu człowieka,
- współdziałaniem jodu i wanadu w glonach morskich,
- znaczeniem jodu i wanadu dla roślin lądowych.

Załączony wykaz literatury zawiera 66 pozycji, w większości najnowszych, z ostatnich 10 lat.



Struktura ocenianej pracy jest standardowa, zgodna z wymogami pisania rozpraw doktorskich. Uwzględnia między innymi takie rozdziały jak: dorobek naukowy, wykaz stosowanych skrótów i terminów, streszczenie w języku polskim/angielskim; przegląd literatury, hipotezę badawczą oraz cel pracy, materiały i metody, streszczenie publikacji, podsumowanie i wnioski, bibliografie oraz kserokopie opublikowanych artykułów naukowych, składających się na rozprawę doktorską oraz oświadczenia współautorów.

Na pochwałę zasługuje bardzo staranne przygotowanie rozprawy pod względem estetycznym.

Na podkreślenie zasługuje ponadto, oprócz rozprawy doktorskiej, również pozostały dorobek Doktorantki, który stanowią: 3 prace opublikowane w czasopismach z wykazu JCR (sumaryczny IF 11,125), a ponadto 6 doniesień konferencyjnych, zarówno na konferencjach krajowych, jak również zagranicznych. Część badań w ramach pracy doktorskiej zostało sfinansowane w ramach projektu badawczego Grant Opus: UMO-2017/25/B/NZ9/00312): 2018-2021 oraz w ramach badań własnych UR z uprawą kukurydzy finansowanych w subwencji Ministerstwa Edukacji i Nauki dla Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Doktorantka uczestniczyła również w realizacji 2 projektów badawczych nie związanych bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej.

### **Ocena merytoryczna pracy**

W swoich pracach Doktorantka/wraz z pozostałymi Współautorami wykorzystali nowoczesne metody badawcze, korzystając również z nowoczesnej aparatury analityczno-pomiarowej do wykonania pogłębionych analiz laboratoryjnych. Dzięki czemu uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Na pochwałę zasługuje wykorzystanie narzędzia statystycznego (program Statistica), dzięki któremu możliwe było przeanalizowanie dużej liczby danych.

Postawiona przez Doktorantkę hipoteza badawcza zakładała, iż wanad może wspomagać proces pobierania jodu przez kukurydzę cukrową i sałatę, co poprawi skuteczność biofortyfikacji części użytkowych tych roślin w jod.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wanadu na pobieranie i dystrybucję jodu w roślinach modelowych, którymi były: kukurydza cukrowa (*Zea mays* L. subsp. *mays* Grupa Saccharata) i sałata masłowa (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) w zależności od zastosowania mineralnych i organicznych związków jodu. Celem było ponadto określenie wpływu wanadu (metawanadanu amonu), organicznych i nieorganicznych związków jodu oraz ich łącznej aplikacji (wanad wraz z jodem) na wzrost nadziemnych i podziemnych części roślin, jak i ich skład chemiczny.

W przekazanym autoreferacie przedstawiono ogólny zarys zastosowanej metody badawczej. Jest to w pełni uzasadnione, z uwagi na jej złożoność – szczegóły podano w



rozdziałach pt. „Materials and Methods” poszczególnych publikacji. Wartość podkreślić, iż pomimo znacznego stopnia złożoności, badania zostały bardzo starannie i logicznie zaplanowane.

Uzyskane wyniki badań w autoreferacie przedstawiono, ze względu na ich obszerność, w formie bardzo syntetycznej – szczegółowe wyniki zawarto w załączonych publikacjach.

#### **W przeprowadzonych badaniach wykazano między innymi:**

- **Publikacja nr 1:** istotne różnice w morfologii roślin kukurydzy cukrowej po zastosowaniu badanych związków jodu i wanadu. Masa i długość korzeni oraz masa części nadziemnej były istotnie większe po aplikacji związków jodu+wanadu w stosunku do kontroli. Aktywności wanadozależnej haloperoksydazy (vHPO) była większa aktywność w korzeniach niż w liściach. Największą zawartość jodu w liściach oznaczono po zastosowaniu organicznej formy jodu z wanadem (2-IBeA+V), a w korzeniach w połączeniu nieorganicznej formy jodu z wanadem (KIO<sub>3</sub>+V). Wysłunęto teorię, iż wanad działał stymulująco na akumulację jodu w roślinach. Oznaczony niemal dwukrotnie większy poziom akumulacji wanadu w korzeniach niż w liściach, świadczy o słabej reutilizacji tego pierwiastka. Doglebowa aplikacja jodu i wanadu wpłynęła na zmniejszenie zawartości większości makro- i mikrośladników w roślinach w porównaniu do kontroli, ale jeszcze bez efektu ilościowego pogorszenia plonowania.
- **Publikacja nr 2:** Zastosowane związki jodu i wanadu nie miały istotnego wpływu na plonowanie roślin. Ziarniaki były najbardziej wzbogacone w jod po aplikacji związków jodoorganicznych 5-ISA oraz 2IBeA (niezależnie od nawożenia wanadem). Wanad w dawce 0,1 μmol·dm<sup>-3</sup> w połączeniu z nieorganicznymi formami jodu KI, KIO<sub>3</sub> powodował zwiększenie akumulacji jodu w liściach, korzeniach i ziarnie w porównaniu do kombinacji bez jego dodatku. Aplikacja 5-ISA i wanadu spowodowała wzrost akumulacji wanadu w korzeniach, jak i antagonistyczny wpływ wanadu w połączeniu z 5-ISA na akumulacje jodu w korzeniach, liściach i ziarnie kukurydzy. Łączna aplikacja wanadu w obu dawkach z 2IBeA stymulowała z kolei transport i akumulacje jodu w ziarniakach kukurydzy.
- **Publikacja nr 3:** najefektywniejszą dawką w aplikacji dolistnej pod względem wzbogacenia ziaren kukurydzy w jod było 100 μM I w relacji do 10 μM I. Najlepsze efekty przy zastosowaniu dokarmiania dolistnego uzyskano wykonując zabiegi co 3 dni w fazie BBCH od 61 do 69. Nie obserwowano jakichkolwiek objawów fitotoksyczności dolistnego stosowania związków jodu i wanadu. W eksperymencie nr 2 i 3, w których zastosowano jod w dawce 100 μM, najwyższy całkowity poziom akumulacji tego pierwiastka w ziarnie otrzymano po dolistnym zastosowaniu organicznego związku jodu 2IBeA. Również najwyższy poziom akumulacji jodków (I-) w ziarnie oznaczono po aplikacji 2IBeA – a zawartość jodanów (IO<sub>3</sub>-) w ziarnie była na poziomie porównywalnym z ziarnem z roślin dokarmianych dolistnie KIO<sub>3</sub>. Taki efekt mógł być



spowodowany metabolizmem 2IBeA do form jonów nieorganicznych (I- i IO<sub>3</sub>-). Szlaki metaboliczne takich reakcji w roślinach nie zostały dotychczas opisane w literaturze. Stymulujący wpływ wanadu na akumulacje jodu w liściach (ale nie w ziarnie) został zaobserwowany w połączeniu aplikacji tego pierwiastka z KI oraz KIO<sub>3</sub>. Zastosowanie dolistnie roztworów zawierających KI, KIO<sub>3</sub> i 5-ISA z metawanadanem amonu powodowało tendencję do obniżenia zawartości 2,3,5-triIBeA w liściach i ziarniakach. Badane czynniki modyfikowały ponadto zawartość witaminy C oraz cukrów w ziarniakach.

- **Publikacja nr 4:** wykazano stymulujący wpływ wanadu na akumulacje jodu w korzeniach sałaty (w przypadku kontroli o śladowej zawartości tego pierwiastka). Stymulujący efekt wanadu został stwierdzony również w korzeniach w eksperymencie nr 2 z zastosowaniem KIO<sub>3</sub> (najefektywniejsza dawka V 0,10 μM) oraz w eksperymencie nr 4 z wprowadzeniem do pożywki 3,5-diISA z wanadem w dawce 0,10 μM. Wanad nie miał wpływu na biomasę roślin. Aplikowane jodosalicylany 5-ISA oraz 3,5-diISA były tak efektywnie pobrane przez rośliny sałaty, że powodowały istotny (7-krotny i 9-krotny) spadek biomasy w porównaniu z kontrolą i nawożeniem roślin KIO<sub>3</sub>. Aktywność vHPO wzrastała w korzeniach w obecności nieorganicznego związku jodu (IO<sub>3</sub>-) w pożywce. Mechanizmy regulujące procesy dystrybucji, pobierania oraz metabolizmu jakim podlegały zastosowane w dwóch eksperymentach jodosalicylany nie były powiązane z poziomem aktywności vHPO. Udowodniono, że 5-ISA oraz 3,5-diISA są związkami endogennymi - fizjologicznie obecnymi w roślinach sałaty. Z kolei egzogenne ich zastosowanie może zwiększyć syntezę związków jodoorganicznych przez rośliny. Nawożenie roślin 5-ISA i 3,5-diISA ukierunkowało metabolizm jodu w roślinach na syntezę T3 w liściach. W obecności śladowych ilości jodu w obiekcie kontrolnym, a także dla jodu stosowanego jako KIO<sub>3</sub>, procesy przekształcenia jodosalicylanów do T3 były bardziej wydajne w korzeniach niż w liściach. Zastosowanie egzogenne KIO<sub>3</sub> aktywowało także inne szlaki metaboliczne w roślinach sałaty.
- **Publikacja nr 5:** Zastosowane jodosalicylany ulegały degradacji do jonów I- lub służyły jako prekursorzy syntezy trijodotyroniny (T3) i tyroksyny (T4), które są klasyfikowane jako PDTHA (analogi hormonów tarczycy pochodzenia roślinnego). Wykazano wyższy poziom ekspresji genu *per64-like* w korzeniach niż w liściach, była ona skorelowana z większą koncentracją wanadu w korzeniach, jak i aktywnością vHPO – enzymem biorącym udział w procesie pobierania jodu. W korzeniach, po egzogennej aplikacji jodosalicylanów, stwierdzono nadekspresję genu *msams5*, który można połączyć z funkcją enzymów HMT/HTMT. We wszystkich doświadczeniach najwyższą zawartość jodu w liściach stwierdzono po aplikacji 5-ISA. Aplikacja jodosalicylanów poprzez fertygację wykazała wyższą efektywność wzbogacenia roślin w jod niż zastosowanie KIO<sub>3</sub>. Okazała się ona bezpieczna dla roślin jak i (przeliczeniowo) dla potencjalnych konsumentów. Sałata uprawiana w substracie torfowym charakteryzowała się najniższą zawartością jodu. Wanad dodany do pożywki spowodował wzrost akumulacji jodu w liściach w kombinacji 3,5-diISA+V vs. 3,5-



diISA w eksperymencie nr 2 i 3 oraz w korzeniach sałaty 3,5-diISA+V vs. 3,5-diISA oraz 5ISA +V vs. 5ISA w eksperymencie nr 1. Wanad akumulowany był głównie w korzeniach sałaty i był w małym stopniu transportowany do liści.

W każdej z publikacji przeprowadzono dyskusję uzyskanych wyników z dostępną literaturą.

**Reasumując, do głównych osiągnięć pracy doktorskiej** o znaczeniu poznawczym i praktycznym można zaliczyć między innymi:

- wykazanie zróżnicowanego wpływu organicznych i nieorganicznych związków jodu zastosowanych pojedynczo, jak i w połączeniu z wanadem na wzrost roślin kukurydzy we wczesnych fazach rozwojowych,
- wykazanie, iż stosowanie jodu i wanadu stymulowało rozwój systemu korzeniowego,
- efektywniejsze wzbogacenie w jod ziarniaków kukurydzy uzyskano po aplikacji jodoorganicznego związku 2IBeA, a efekt był niezależny od sposobu aplikacji związku. Najskuteczniejszą metodą biofortyfikacji w jod była dolistna aplikacja 2IBeA w dawce 100  $\mu\text{M}$  (BBCH od 61 do 69), z krótszym interwałem czasowym pomiędzy kolejnymi aplikacjami,
- W przypadku uprawianej hydroponicznie sałaty zastosowane jodosalicylany (5-ISA, 3,5-diISA) były bardziej efektywne w procesie wzbogacenia liści w jod niż  $\text{KIO}_3$ ,
- 5-ISA oraz 3,5-diISA powodowały efekt osłabienia wzrostu sałaty oraz przekroczenie wskaźnika bezpieczeństwa akumulacji jodu dla konsumenta. Efekt był zróżnicowany w zależności od zastosowanego podłoża uprawowego,
- 5-ISA oraz 3,5-diISA są naturalnie syntetyzowane w roślinach sałaty, a ich zawartość ulega zwiększeniu po egzogennym zastosowaniu tych związków.
- Zastosowanie wanadu (0,1  $\mu\text{M}$ ) oddziaływało synergistycznie na akumulację jodu w liściach. W przeprowadzonych badaniach wykazano jednak słabą jego reutilizację z korzeni do nadziemnych części roślin: liści i ziarna kukurydzy oraz liści (główek) sałaty.
- Najwyższy poziom akumulacji wanadu był w korzeniach zarówno w przypadku kukurydzy, jak i sałaty.

### Wniosek końcowy

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marleny Grzanki pt. Rola wanadu w procesie biofortyfikacji w jod kukurydzy cukrowej i sałaty, jest opracowaniem wartościowym i oryginalnym. Praca charakteryzuje się dużą wartością poznawczą i praktyczną w zakresie wpływu jodu i wanadu na reakcję wspomnianych gatunków

roślin. Rozprawa stanowi oryginalne, bardzo wnikliwe rozwiązanie wspomnianego problemu naukowego przy użyciu właściwie dobranej metodyki badawczej. Otrzymane wyniki wnoszą oryginalny wkład do rozwoju wiedzy z zakresu stosowania jodu oraz wanadu.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy, mając na uwadze zapisy Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r. (poz. 1789), Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r, poz. 478 z późn. zm.) i w związku z ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.), stwierdzam, że przedstawiona praca doktorska mgr inż. Marleny Grzanki pt. „Rola wanadu w procesie biofortyfikacji w jod kukurydzy cukrowej i sałaty” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. UPP dr hab. Tomasz Kleiber