

Warszawa, 18 lutego 2025 r.

dr hab. inż. Anna Bzducha-Wróbel, prof. SGGW

e-mail: anna_bzducha_wrobel@sggw.edu.pl

Tel: +48 22 593 76 56

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza

pt.: „Wykorzystanie naturalnych ekstraktów z *Lamium album*
w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*”

tytuł w oryginale: „Use of natural extracts from *Lamium album* in the
biological protection of cereals against *Fusarium* pathogens”

wykonanej w Katedrze Chemii

Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod opieką promotorką prof. dr hab. Agnieszki Waśkiewicz

Niniejszą opinię sporządzono w zakresie oceny spełnienia warunków, jakie stawiane są pracy doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w świetle obowiązujących przepisów prawa, zdefiniowanych w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Podstawą formalno-prawną wykonania niniejszej recenzji była uchwała nr 3/IV/2024 Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 28 listopada 2024 r.

Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności

ul. Nowoursynowska 159C
02-776 Warszawa
+48 22 593 76 53
kbmz@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl

Wybór tematu pracy doktorskiej

Utrzymanie jakości i wysokich plonów zbóż, stanowiących jedno z podstawowych źródeł składników odżywczych w diecie ludzi i zwierząt, wymaga stosowania środków ochrony ograniczających choroby roślin. Grzyby fitopatogeniczne, szczególnie z rodzaju *Fusarium*, powodują poważne choroby zbóż na różnych etapach wzrostu roślin oraz podczas przechowywania ziarna. Przyczyniają się do znaczących strat w produkcji rolnej, ograniczają jakość



i przydatność technologiczną ziarna oraz bezpieczeństwo zdrowotne tego rodzaju surowców w związku z syntezą mykotoksyn. Gatunki *Fusarium culmorum* i *Fusarium proliferatum* wskazywane są jako jedne z podstawowych patogenów zbóż w Europie. Stosowanie syntetycznych fungicydów, czyli pestycydów hamujących aktywność fitopatogenów grzybowych, jest powszechnym podejściem w konwencjonalnej praktyce rolniczej produkcji zbóż. Za koniecznością ograniczenia stosowania tych substancji przemawia udokumentowany szkodliwy wpływ pestycydów na zdrowie ludzi, zwierząt oraz naturalne ekosystemy, związany z nieukierunkowaną toksycznością oraz niebiodegradowalnością, skutkującą zanieczyszczeniem środowiska naturalnego. Trwała obecność pozostałości tych substancji w środowisku przyczynia się do rozwoju oporności wśród ewolucyjnie adaptujących się fitopatogenów mikrobiologicznych.

Globalna tendencja wzrostu liczebności populacji ludzi wskazuje potrzebę zwiększania produktywności rolnictwa, co w obliczu ograniczonej dostępności gruntów ornych oraz zmian klimatycznych stwarza dodatkowe wyzwania. Jednocześnie założenia strategii Europejskiego Zielonego Ładu oraz wynikającej z niej strategii „Od pola do stołu” kładą nacisk na konieczność eliminacji zanieczyszczeń chemicznych emitowanych do środowiska oraz przekształcenie obecnego unijnego systemu żywnościowego w model zrównoważony, m.in. poprzez ograniczenie korzystania z pestycydów. Jako alternatywne rozwiązanie dla stosowania syntetycznych środków ochrony roślin do zwalczania chorób o etiologii mikrobiologicznej wskazuje się biokontrolę opartą na wykorzystaniu konkurencyjnych zależności między żywymi mikroorganizmami lub na wykorzystaniu przeciwdrobnoustrojowych właściwości substancji pochodzenia roślinnego. Ekstrakty roślinne są uznawane za skuteczne rozwiązanie w walce z chorobami roślin, jednakże większość badań z tego zakresu dotyczy określenia ich aktywności w skali laboratoryjnej w badaniach *in vitro* lub *in planta*, przy nielicznych danych z realnych warunków hodowli roślin na polu. W pracy doktorskiej Pani **mgr Pascaline Aimee Uwineza** skoncentrowała się na ocenie możliwości wykorzystania mało poznanej aktywności ekstraktów z kwiatów zielonej rośliny leczniczej *Lamium album* do hamowania wzrostu i syntezy mykotoksyn przez pleśnie *Fusarium culmorum* i *Fusarium proliferatum*. Badania zrealizowano zarówno w skali laboratoryjnej jak i na polu doświadczalnym, infekując pszenicę wytypowanym gatunkiem pleśni.

Podsumowując stwierdzam, że podjęta tematyka i zakres badań są bardzo istotne dla opracowania nowych rozwiązań ograniczających ryzyko związane z bezpieczeństwem mikrobiologicznym żywności. Praca wpisuje się tym samym we współczesne trendy badawcze w ramach dyscypliny technologia żywności i żywienia.

**Przedstawienie informacji o rozprawie doktorskiej w odniesieniu do elementów
podlegających ocenie wraz z uzasadnieniem oceny**

Wskazane przez Doktorantkę osiągnięcie naukowe pt: „Wykorzystanie naturalnych ekstraktów z *Lamium album* w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*” jest zbiorem 5 powiązanych tematycznie artykułów naukowych o łącznym współczynniku wpływu IF = 17,900 (zgodnie z rokiem publikacji) oraz 540 pkt. MEiN. Wyniki badań oraz przegląd zagadnień teoretycznych powiązany z metodyką pracy opublikowano w latach 2020-2024 w czasopismach specjalistycznych z listy JCR, takich jak *Molecules*, *Applied Science*, *Toxins*, *Frontiers in Microbiology* oraz *Agriculture*. Są to następujące prace:

- P1:** Uwineza, P.A.; and Waśkiewicz, A. 2020. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules* 25, 3847. <https://doi.org/10.3390/molecules25173847>. (IF=4.2, MEiN₂₀₂₄=140)
- P2:** Uwineza, P.A.; Gramza-Michałowska, A.; Bryła, M.; and Waśkiewicz, A. 2021. Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of *Lamium album* Flower Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction. *Appl. Sci.* 11, 7419. <https://doi.org/10.3390/app11167419>. (IF= 2.5, MEiN₂₀₂₄=100)
- P3:** Uwineza, P. A.; Urbaniak, M.; Stępień, Ł.; Gramza-Michałowska, A. and Waśkiewicz, A. 2023. *Lamium album* Flower Extracts: A Novel Approach for Controlling *Fusarium* Growth and Mycotoxin Biosynthesis. *Toxins*, 15(11), 651. <https://doi.org/10.3390/toxins15110651>. (IF=3.9, MEiN₂₀₂₄=100)
- P4:** Uwineza, P. A.; Urbaniak, M.; Stępień, Ł.; Gramza-Michałowska, A. and Waśkiewicz, A. 2024. Efficacy of *Lamium Album* as a Natural Fungicide: Impact on Seed Germination, Ergosterol, and Mycotoxins in *Fusarium culmorum*-Infected Wheat Seedlings. *Front. Microbiol.* 5, 1363204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1363204>. (IF=4.0, MEiN₂₀₂₄=100)
- P5:** Uwineza, P.A.; Kwiatkowska, M.; Gwiazdowski, R.; Stępień, Ł.; Bryła, M.; Waśkiewicz, A. 2024. Field Assessment of *Lamium album* in Reducing Mycotoxin Biosynthesis in Winter Wheat Infected by *Fusarium culmorum*. *Agriculture*, 14, 647. <https://doi.org/10.3390/agriculture14050647>. (IF=3.3, MEiN₂₀₂₄=100)

Wskazane publikacje to efekt współpracy kilku autorów (od 2 do 6 autorów), jednakże we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Do wszystkich artykułów załączono oświadczenia autorów dotyczące ich wkładu. Prace wykazane w ramach dysertacji charakteryzowały się rozbudowanym zakresem badawczym i metodycznym (od testów laboratoryjnych po realizację badań na polu doświadczalnym), co uzasadnia podjętą współpracę. Umożliwiła ona Doktorantce weryfikację założonych hipotez i realizację celów szczegółowych



z wykorzystaniem bardzo dobrego, zróżnicowanego warsztatu analitycznego we wsparciu specjalistów z różnych obszarów badawczych. Niewątpliwie taka współpraca rozwinęła umiejętności badawcze Pani Magister. Na podstawie załączonych oświadczeń można stwierdzić, że udział Pani **mgr Pascaline Aimee Uwineza** w przygotowaniu artykułów był wiodący. Współtworzyła koncepcję wszystkich badań, uczestniczyła w opracowywaniu i walidacji metod, wykonywała prace doświadczalne, opracowywała, interpretowała i dyskutowała uzyskane wyniki, przygotowywała treść manuskryptów, odpowiadała na uwagi recenzentów oraz edytowała prace zgodnie z tymi uwagami. Należy podkreślić, że badania zostały wsparte finansowaniem przez **Narodowe Centrum Nauki** w ramach grantu **OPUS 16, nr: UMO-2018/31/B/NZ9/03485**. Doktorantka wskazała, że uczestniczyła w zarządzaniu projektem, co jest bardzo ważnym doświadczeniem dla młodego naukowca.

Reasumując, zakres prac wykonanych przez Panią mgr inż. mgr Pascaline Aimee Uwineza potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz dobrą organizację Doktorantki.

Dysertację zawarto na 124 stronach, z czego 46 stanowi autoreferat, 5 stron to oświadczenia o wkładzie poszczególnych autorów w przygotowanie manuskryptów, pozostałe 73 strony prezentują treść artykułów składających się na monotematyczne osiągnięcie Doktorantki. Autoreferat składa się z wykazu zastosowanych skrótów, streszczenia w języku angielskim i polskim, wstępu teoretycznego wprowadzającego czytelnika w problematykę pracy i uzasadniającego celowość podjętych badań, rozdziału, w którym zdefiniowano 5 celów badawczych powiązanych z opublikowanymi pracami (P1-P5), jak również sformułowano 4 hipotezy badawcze. W rozdziale poświęconym metodom badawczym Doktorantka w przedstawiła w skrócie metodykę eksperymentów dokładnie opisaną w publikacjach P2-P4, po czym omówiła i przedyskutowała najważniejsze wyniki badań oraz przedstawiła sformułowane na ich podstawie stwierdzenia i wnioski. W pracy zawarto także wykaz literatury źródłowej, listę tabel i rysunków oraz teksty wspomnianych już publikacji własnych.

W rozdziale Wstęp, powiązany z zagadnieniami teoretycznymi wszystkich opublikowanych prac (P1-P5), Doktorantka scharakteryzowała problem związany z rozwojem grzybów z rodzaju *Fusarium*, na uprawach i zbiorach zbóż. Szczególną uwagę poświęciła charakterystyce i negatywnemu znaczeniu dwóch gatunków grzybów mikroskopowych - *Fusarium culmorum* i *Fusarium proliferatum*, stanowiących jedne z najczęstszych patogenów zbóż, w tym pszenicy. Wspomniane fitopatogeny przyczyniają się do globalnych strat żywności, aktualnie pogłębianych zmianami klimatycznymi.



Mikroorganizmy te zagrażają bezpieczeństwu żywności i pasz ze względu na wytwarzanie toksycznych metabolitów wtórnych, takich jak deoksyniwalenol (DON) i jego pochodne - 3- i 15-acetylodeoksyniwalenol (3- i 15-AcDON), niwalenol (NIV), zearalenon (ZEN) i jego pochodne, m.in. beta-zearalenol (β -ZOL), alfa-zearalenol (α -ZOL) oraz siarczan zearalenonu-14 (ZEN-14S).

Doktorantka wskazała, że w podejściu konwencjonalnym walka z grzybowymi patogenami roślin uprawnych opiera się na wykorzystaniu różnych strategii, m.in. stosowaniu płodozmianu czy nasion genetycznie odpornych na wzrost patogenów, ale przede wszystkim na wykorzystywaniu syntetycznych pestycydów o działaniu przeciwwgrzybiczym, tj. fungicydów. Długoterminowe dane naukowe dokumentują szkodliwy wpływ wspomnianych substancji na zdrowie ludzi, zwierząt i naturalne ekosystemy. **Biorąc powyższe pod uwagę Doktorantka nakreśliła konieczność opracowywania i wrażeń zrównoważonych, przyjaznych środowisku praktyk rolniczych w uprawie zbóż.** W tym kontekście nakreśliła możliwość wykorzystania naturalnych ekstraktów roślinnych do ochrony zbóż przed patogenami z rodzaju *Fusarium*, co też stało się przedmiotem jej pracy doktorskiej.

Ekstrakty roślinne pozyskiwane z różnych roślin i ich części zawierają szereg wtórnych bioaktywnych metabolitów roślinnych, takich jak kwasy fenolowe, flawonoidy, garbniki, terpeny czy alkaloidy. Substancje te indywidualnie lub na drodze synergii ograniczają wzrost grzybów chorobotwórczych m.in. zaburzając równowagę oksydacyjną komórek, czy też zwiększając przepuszczalność błon komórkowych, m.in. w wyniku ograniczenia syntezy ergosterolu lub ograniczając syntezę istotnych dla kolonizacji środowiska mykotoksyn. Doktorantka zwróciła uwagę na brak wystarczających danych odnośnie wpływu naturalnych biopestycydów na syntezę mykotoksyn, co stało się dla niej podstawą podjęcia badań dokumentujących taki wpływ ekstraktów roślinnych na aktywność metaboliczną fitopatogenów z rodzaju *Fusarium*. Podkreśliła niewystarczająco zbadany potencjał przeciwdrobnoustrojowy białej pokrzywy martwej/ pokrzywy nieparzącej - ***Lamium album***, jadalnej rośliny leczniczej powszechnie występującej w Europie, Azji Zachodniej i Afryce Północnej. **Za interesującą i zasadną należy zatem uznać potrzebę oceny aktywności przeciwwgrzybiczej ekstraktów z kwiatów *Lamium album* w odniesieniu do patogenów *Fusarium*, powszechnych w rolnictwie.**

Doktorantka omówiła następnie konwencjonalne metody pozyskiwania ekstraktów roślinnych bogatych w związki bioaktywne, zwracając uwagę na ich ograniczenia związane z długim czasem ekstrakcji, koniecznością stosowania drogich, czystych rozpuszczalników, niską wydajnością i stratami związków bioaktywnych, czy



słabą selektywnością ekstrakcji. Przedstawiła jednocześnie możliwość wykorzystania rozpuszczalników w stanie nadkrytycznym, szczególnie dwutlenku węgla, do ekstrakcji związków biologicznie czynnych z materiałów roślinnych. Taką technikę ekstrakcji Doktorantka zastosowała w części eksperymentalnej pracy, a jej bardzo dokładną charakterystykę przedstawiła w pracy przeglądowej [P1], włączonej w cykl monotematyczny rozprawy doktorskiej.

Praca P1, powiązana przez Doktorantkę z pierwszym celem badawczym, zestawia informacje dotyczące wykorzystania ekstrakcji rozpuszczalnikami w stanie nadkrytycznym do izolacji związków bioaktywnych z materiałów roślinnych. W artykule Doktorantka omówiła podstawy teoretyczne ekstrakcji z wykorzystaniem różnych rozpuszczalników w stanie nadkrytycznym, ze szczególnym uwzględnieniem najpowszechniej stosowanego dwutlenku węgla. Przedstawiła dane odnośnie wpływu wybranych czynników, jak temperatura ekstrakcji, ciśnienie, rodzaj i ilość współrozpuszczalnika, rodzaj i wielkość próbki oraz czas ekstrakcji na wydajność procesu, wskazując potrzebę optymalizacji wskazanych parametrów dla osiągnięcia maksymalnej rozpuszczalności ekstrahowanych związków, a przez to wydajnej wymiany masy. W pracy zestawiono ponadto szczegółowe informacje dotyczące wykorzystania omawianej techniki do selektywnej ekstrakcji roślinnych związków bioaktywnych należących do alkaloidów, terpenoidów i związków fenolowych. Podkreślić należy wkład pracy włożonej przez Doktorantkę w przygotowanie opracowania, bowiem oparto je na przeglądzie 131 pozycji bibliograficznych.

Na podstawie informacji zawartych w części teoretycznej pracy oraz przygotowanym artykule przeglądowym należy podkreślić, że Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza bardzo dobrze orientuje się w aktualnej problematyce badań związanych z dysertacją, dzięki czemu koncepcja realizowanych prac odpowiada aktualnym wyzwaniom w zakresie poszukiwania nowych rozwiązań w ochronie zbóż przed patogenami z rodzaju *Fusarium*. Wnikliwe zapoznanie się przez Doktorantkę z zagadnieniami teoretycznymi związanymi z tematem doktoratu umożliwiło poprawne zdefiniowanie przez nią luk w wiedzy, które stały się podstawą do przedstawienia własnych założeń badawczych. Bibliografia wykorzystana do przygotowania rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej aktualna i nie budzi moich zastrzeżeń.

Doktorantka zdefiniowała następujące cele badawcze pracy:

1. Opracowanie i optymalizacja warunków ekstrakcji kwiatów *Lamium album* przy użyciu nadkrytycznego dwutlenku węgla (SC-CO₂) z metanolem jako współrozpuszczalnikiem,

z oceną wpływu temperatury, ciśnienia, szybkości przepływu CO₂ i czasu ekstrakcji na wydajność i skład ekstraktu (P1 i P2).

2. Scharakteryzowanie związków bioaktywnych w ekstraktach z kwiatów *Lamium album* poprzez analizę zawartości związków lotnych i fenolowych, a także ocenę ich aktywności antyoksydacyjnej, aby kompleksowo ustalić szczegółowy profil metabolomiczny ekstraktów i ocenić ich zdolności antyoksydacyjne (P2).
3. Ocena *in vitro* aktywności przeciwgrzybiczej ekstraktów z kwiatów *Lamium album* w różnych stężeniach w hamowaniu wzrostu grzybnii wybranych gatunków *Fusarium* (*F. culmorum* i *F. proliferatum*) oraz ich wpływu na biosyntezę mykotoksyn (P3).
4. Zbadanie fitotoksycznego wpływu ekstraktów z kwiatów *L. album* w różnych stężeniach na kiełkowanie nasion pszenicy i wzrost siewek w celu określenia potencjalnie negatywnego wpływu ekstraktów na pszenicę poddawaną ochronie z ich wykorzystaniem (P4).
5. Ocena potencjału przeciwgrzybiczego *in vivo* ekstraktów z kwiatów *L. album* przeciwko infekcjom *F. culmorum* w pszenicy w kontrolowanych warunkach wzrostu i doświadczeniach polowych na wybranych odmianach pszenicy ozimej (Julius i Arkadia) (P4 i P5).

Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza sformułowała także następujące hipotezy badawcze:

- H1:** Związki lotne i fenolowe oraz aktywność antyoksydacyjna ekstraktów z kwiatów *Lamium album* zależą znacząco od warunków ekstrakcji SC-CO₂, w tym temperatury, ciśnienia, szybkości przepływu CO₂ i współrozpuszczalnika oraz czasu ekstrakcji. Optymalizacja tych parametrów poprawia jakość ekstraktów.
- H2:** Aktywność przeciwgrzybicza *in vitro* ekstraktów z kwiatów *Lamium album* przeciwko *Fusarium culmorum* i *Fusarium proliferatum* zależy od stężenia ekstraktu i gatunku z rodzaju *Fusarium*
- H3:** Ekstrakty z kwiatów *Lamium album* mogą wykazywać działanie fitotoksyczne na kiełkowanie nasion pszenicy i wzrost siewek, przy czym poziom oddziaływania może być różny w zależności od stężenia ekstraktu, co pozwala na uzyskanie wglądu w bezpieczne poziomy stosowania ekstraktów w kontroli biologicznej w warunkach rolniczych.
- H4:** Zastosowanie ekstraktów z kwiatów *Lamium album* może wykazać potencjał przeciwgrzybiczy *in vivo* przeciwko infekcjom *F. culmorum* w siewkach pszenicy w kontrolowanych warunkach wzrostu i w próbach polowych z odmianami pszenicy ozimej poprzez potencjalne hamowanie infekcji grzybiczych i biosyntezy mykotoksyn.

W ramach uwagi ogólnej wskazuję, że Doktorantka nie powiązała niestety postawionych hipotez badawczych z publikacjami, co ułatwiłoby ocenę poprawności ich weryfikacji. Co prawda powiązała z nimi stwierdzenia i wnioski końcowe zawarte w autoreferacie.

W pracy P2, powiązanej z 1. oraz 2. celem badawczym, oraz 1 hipotezą badawczą, Doktorantka zaprezentowała wyniki eksperymentów nad oceną wpływu warunków ekstrakcji suszonych kwiatów *Lamium album* na aktywność antyoksydacyjną i skład chemiczny ekstraktów. Ekstrakty scharakteryzowano pod względem aktywności



przeciwutleniającej z zastosowaniem standardowych testów spektrofotometrycznych (DPPH, ABTS, FRAP). Oznaczono zawartość związków fenolowych ogółem testem Folin-Ciocalteu, a zawartość 16 związków fenolowych, takich jak: mirycetyna, kwercetyna, rutyna, ester fenetylowy kwasu kawowego, apigenina, pinokembryna, pinostrobin, galangina, chryzyna, kwas wanilinowy, kwas syringowy, kwas trans-3-hydroksycynamonowy, kwas transcynamonowy chromatograficznie techniką UPLC/PDA-TQD. Najlepsze właściwości przeciwutleniające, skorelowane z najwyższą zawartością związków fenolowych, pośród których dominowały chryzyna, pinostrobin, mirycetyna i kwas trans-3-hydroksycynamonowy, odnotowano dla ekstraktów uzyskanych w temperaturze procesu wynoszącej 50°C. Na tej podstawie wskazane warunki temperaturowe wykorzystywano do otrzymywania ekstraktów na cele kolejnych etapów badań. **Zwracam uwagę na stwierdzenie Doktorantki w postaci:** „wyniki wskazują, że SC-CO₂ można uznać za alternatywną metodę ekstrakcji związków bioaktywnych z *Lamium album*” – moim zdaniem Doktorantka nie była uprawniona do nazywania zastosowanej techniki ekstrakcji „alternatywną metodą”, bo jeśli alternatywna, to w stosunku do czego? Doktorantka nie przedstawiła wyników uzyskanych z zastosowaniem innych rozwiązań ekstrakcyjnych.

Po zapoznaniu się ze zdefiniowanymi celami badań, postawionymi hipotezami, metodyką części eksperymentalnej oraz uzyskanymi wynikami, szczególnie zawartymi w pracy P2 nasunęły mi się następujące uwagi i pytania, które mają charakter uzupełniający, a także dyskusyjny. W rozdziale 3. dysertacji pt. Metody Doktorantka przedstawiła materiał roślinny wykorzystywany w badaniach, którym były suszone kwiaty *Lamium album* zakupione w firmie certyfikowanej Dary Natury. Doktorantka wskazała, że wybór rośliny został zrealizowany na podstawie badań przesiewowych określających właściwości antyoksydacyjne i przeciwgrzybicze ekstraktów roślinnych. Nie jest dla mnie jednak jasne czy Doktorantka miała tu na myśli wyniki badań własnych nieopublikowanych czy dokonany przegląd literatury zamieszczony w pracy P1. Prosiłabym o wyjaśnienie zastosowanego podejścia, mając także na uwadze informacje zawarte na str. 12, w akapicie 1 rozdziału 4. **Najważniejsze wyniki wraz z dyskusją.**

Analizując metodykę zrealizowanych eksperymentów oraz uzyskane wyniki badań powiązane z celem 1. oraz pierwszą hipotezą badawczą H1 muszę zauważyć, że Doktorantka zrealizowała cel pierwszy tylko częściowo, jak również tylko częściowo zweryfikowała pierwszą z postawionych hipotez. W artykule P2 dokumentuje samodzielnie przeprowadzoną ocenę jedynie w odniesieniu do wpływu temperatury



procesu (40°C, 50°C i 60°C) na ekstrakcję związków bioaktywnych z kwiatów *Lamium album* przy użyciu dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym w połączeniu z metanolem. Zgodnie z opisem metodyki pozostałe parametry procesu były stałe, tj. wartość ciśnienia (250 bar), przepływ CO₂ (4 ml/min), przepływ metanolu (1ml/ min) i czas ekstrakcji wynoszący 180 min. Nie odnajduję w pracy wyników dla wartości ciśnienia innych niż 250 bar mimo, że w skróconym opisie metodyki pracy Doktorantka wskazuje zastosowanie ciśnienia również na poziomie 300 bar. Podobnie brak danych dla wartości przepływu rozpuszczalników i czasu procesu ekstrakcji innych niż wskazane powyżej. Zastanawiam się skąd ta rozbieżność? Zakładam, że część wyników nie została prawdopodobnie opublikowana ani zawarta w autoreferacie.

Moją uwagę zwrócił również fakt, że Doktorantka na różnych etapach badań stosowała zróżnicowane naważki surowca do ekstrakcji związków bioaktywnych zachowując stałe parametry ciśnienia, temperatury, przepływu rozpuszczalników oraz czasu ekstrakcji. W publikacji P2 wskazano otrzymanie ekstraktu z 2g surowca, w pracy P3 z 9g materiału roślinnego, a w pracy P5 z 10g suszonych kwiatów. Biorąc pod uwagę fakt, że ilość surowca wpływa na wydajność ekstrakcji nie widzę zrozumienia zastosowanym podejściu metodycznym. Jednocześnie charakterystykę składu i aktywność przeciwutleniającą ekstraktów przedstawiono tylko w pracy P2. **Czy Doktorantka podziela moją wątpliwość odnośnie porównywalności składu poszczególnych ekstraktów? Czy skład ekstraktu mógł mieć wpływ na wyniki aktywności przeciwmykotoksycznej przedstawione w pracy P5?** Zastanawiam się, dlaczego nie przygotowano większej ilości ekstraktu w postaci zliofilizowanej do wykorzystania na różnych etapach badań (oczywiście w powtórzeniach).

Jednocześnie chciałabym prosić o wyjaśnienie w jaki sposób Doktorantka definiuje wydajność zastosowanej metody ekstrakcji? Nie znalazłam w pracy takiego wyjaśnienia. W tym kontekście zainteresowało mnie czy Doktorantka określała zawartość suchej substancji w uzyskiwanych ekstraktach w zależności od temperatury procesu, a następnie udział związków bioaktywnych wśród wyekstrahowanych składników składających się na suchą masę? Wydaje się, że uzupełnienie danych o takie informacje byłoby interesujące, ale też zasadne w kontekście przygotowywania rozcieńczeń o pożądanej koncentracji ekstraktu.

Zwracam także uwagę, że Doktorantka nie była do końca precyzyjna wskazując powiązanie celu 2. pracy z publikacją P2. We wskazanym manuskrypcie nie zawarto bowiem wyników analizy związków lotnych wyekstrahowanych z kwiatów badanej rośliny - wyniki tych analiz zawarto tylko w autoreferacie pracy. Być może



w planach jest przygotowanie kolejnej publikacji uwzględniającej wyniki analizy związków lotnych zidentyfikowanych w badanych ekstraktach.

W pracy P3, powiązanej z 3 celem badawczym oraz hipotezą H2, Doktorantka zamieściła wyniki badań *in vitro* nad skutecznością ekstraktu z kwiatów *Lamium album* w hamowaniu wzrostu, ograniczaniu syntezy ergosterolu i mykotoksyn przez dwa szczepy grzybów mikroskopowych *F. proliferatum* (PEA 1) oraz *F. culmorum* (KF 846). Wytypowano je jako materiał biologiczny badań ze względu znaczący wpływ tych gatunków na jakość zbóż w Europie, szczególnie w Polsce. Określano aktywność przeciwgrzybiczą ekstraktu w zależności od dawki (2,5%, 5%, 7,5% i 10%) namnażając wskazane pleśnie na podłożu PDA w obecności wskazanych dawek ekstraktu. Ekstrakt z kwiatów *L. album* hamował wzrost grzybnii badanych pleśni z intensywnością zależną od dawki i szczepu pleśni (od 0 do ok. 30% w przypadku gatunku *F. culmorum* odpowiednio dla dawki 2,5% oraz 10% ekstraktu, a w przypadku *F. proliferatum* w granicach od ok. 28% do ok. 43% dla analogicznych stężeń ekstraktu). Zawartość ergosterolu w biomacie pleśni uległa zmniejszeniu w największym stopniu w obecności 10% ekstraktu. W przypadku *F. culmorum* redukcja wyniosła ok. 89%, a w przypadku *F. proliferatum* ok. 93%. Zaobserwowano także istotne ograniczenie syntezy mykotoksyn w hodowlach obu szczepów w porównaniu z próbami kontrolnymi. Stopień ograniczenia syntezy tych substancji zależał od dawki ekstraktu, szczepu pleśni oraz rodzaju mykotoksyny. W przypadku *F. proliferatum* zaobserwowano ograniczenie syntezy beauwercyny - BEA (48.50–86.76), FB1 (39.35–87%) FB2 (31.48–81%) oraz FB3 (51.51–90%), a przypadku *F. culmorum* ograniczeniu uległa synteza DON (44.39–96.41%), 3- i 15-AcDON (61.64–96.94%), ZEN (49.38–89.71%), ZEN-14S (52.33–92.61%), β -ZOL (55.57–99.86%), α -ZOL (68.42–100%) oraz FUS-X (55.57–99.51%).

Biorąc pod uwagę zakres zrealizowanych analiz, uważam, że cel 3 pracy należało uzupełnić o analizę wpływu ekstraktów z kwiatów *Lamium album* na biosyntezę ergosterolu. Jego oznaczeniom Doktorantka poświęciła uwagę w pracy P3, ale także P4 i P5. Doktorantka krytycznie podkreśliła w publikacji P3, że redukcja w zawartości ergosterolu nie zawsze koreluje z redukcją syntezy mykotoksyn i *vice versa*

W pracy P4, powiązanej z celem 4 badań i hipotezą H3, przedstawiono wyniki oceny wpływu ekstraktu z kwiatów *Lamium album* stosowanego w stężeniach 5% i 10% na kiełkowanie nasion i wzrost siewek pszenicy w kontrolowanych warunkach eksperymentu doniczkowego. Doktorantka słusznie założyła potencjalne działanie niepożądane ekstraktu na wzrost pszenicy, mogące wystąpić obok właściwości przeciwgrzybiczych. Siewki pszenicy sztucznie infekowano zarodnikami pleśni



F. culmorum, wytypowanej do tego etapu doświadczeń. Prowadzono analizę parametrów wzrostu siewek, zwracając uwagę na procent skielkowania nasion, długość korzeni i pędów sadzonek. Ponadto oznaczano zawartość ergosterolu i mykotoksyn w korzeniach oraz liściach siewek badanej pszenicy. Ekstrakt z kwiatów *L. album* wykazywał niewielki efekt fitotoksyczny i allelopatyczny, utrudniając kiełkowanie nasion i wzrost siewek, ale jednocześnie skutecznie ograniczał infekcję *F. culmorum*, całkowicie hamował syntezę DON, 3- i 15-AcDON oraz w znacznym stopniu ZEN i ZEN-14S. Obserwowano zmniejszenie zawartości ergosterolu w korzeniach siewek, co potwierdziło negatywny wpływ ekstraktu na rozwój *F. culmorum*. **Na podkreślenie zasługuje moim zdaniem bardzo ciekawa, głęboka i krytyczna analiza oraz dyskusja wyników zawarta w publikacji P4.** Potwierdza ona rozwój poziomu dojrzałości naukowej Doktorantki na kolejnych etapach realizacji prac badawczych.

W pracy P5, powiązanej z celem 5 badań i hipotezą 4, Doktorantka udokumentowała wyniki doświadczeń przeprowadzonych w Polowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Winnej Górze. Badania zrealizowano w sezonie 2022/2023 na dwóch odmianach pszenicy ozimej (Arkadia i Julius) oceniając aktywność ekstraktu z kwiatów *Lamium album* w postaci oprysku dolistnego przeciwko gatunkowi mykotoksynotwórczemu *F. culmorum*. Zaobserwowano istotną redukcję zawartości ergosterolu w badanych odmianach pszenicy Arkadia i Juliusz traktowanych badanym ekstraktem roślinnym. Stwierdzono, że odmiana Arkadia wykazała większą odporność na infekcję *Fusarium*, a aktywność przeciwgrzybicza *L. album* była wyraźniejsza w odniesieniu do odmiany Julius. Tym samym Doktorantce udało się podkreślić znaczenie czynników genetycznych w interakcjach roślina-grzyb i ich istotę w opracowaniu skutecznych rozwiązań w walce z chorobami roślin uprawnych. Odmiana pszenicy Julius wykazywała większą akumulację mykotoksyn w porównaniu do odmiany Arkadia. Ekstrakt roślinny ograniczał biosyntezę wszystkich analizowanych mykotoksyn (DON, 3-/15-AcDON, ZEN, ZEN-14S) w obu odmianach pszenicy, przy czym w największym stopniu zjawisko to dotyczyło odmiany Arkadia, a w przypadku mykotoksyn - deoksyniwalenolu (DON) i zearalenonu (ZEN). **Z czystej ciekawości zapytam, czy aby osiągnąć podobny poziom ochrony przeciwgrzybiczej zużycie ekstraktu roślinnego byłoby podobne do zużycia środka syntetycznego na taką samą powierzchnię upraw?** Zastanawiam się, czy Doktorantka robiła takie porównanie.

W autoreferacie pracy Doktorantka zawarła dodatkowe, nieopublikowane wyniki analizy porównawczej wpływu metody sterylizacji ziarna pszenicy (autoklawowanie

i działanie mikrofalami) na skuteczność ekstraktu *L. album* w ograniczaniu wzrostu *F. culmorum*. Wyniki te sugerują, że mikroorganizmy zasiedlające ziarno konkurują z fitopatogenami z rodzaju *Fusarium* ograniczając ich wzrost i biosyntezę mykotoksyn.

Moim zdaniem prace P4 oraz P5 są najważniejszymi składowymi osiągnięciami Doktorantki. Przedstawiają bowiem kluczowe wyniki w odniesieniu do możliwości wykorzystania naturalnych ekstraktów otrzymanych z lokalnie dostępnej rośliny zielarskiej *Lamium album* w biologicznej ochronie zbóż na przykładzie *F. culmorum*, jednego z najpowszechniejszych patogenów zbóż w Europie. Oczywiście konieczna jest jeszcze kontynuacja badań włącznie z oszacowaniem ekonomicznych podstaw proponowanego rozwiązania.

Podsumowując tę część oceny stwierdzam, że zrealizowane badania zakończyły się uzyskaniem interesujących wyników. Stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego łączącego się z praktyką w zakresie kształtowania jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego zbóż. Sformułowane przeze mnie uwagi i wątpliwości do ocenianej pracy mają charakter konstruktywny.

Konkluzja końcowa oceny

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji dysertacja mgr mgr Pascaline Aimee Uwinea pt.: „Wykorzystanie naturalnych ekstraktów z *Lamium album* w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*” tytuł oryginalny: „Use of natural extracts from *Lamium album* in the biological protection of cereals against *Fusarium pathogens*”, odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim zdefiniowanym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce wraz z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów postępowania, celem uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.



dr hab. Anna Bzducha-Wróbel, prof. SGGW