



UNIWERSYTET ROLNICZY

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Technologii Żywności

Katedra Technologii Produktów Roślinnych i Higieny Żywienia

Ul. Balicka 122 30-149 Kraków

Tel.: 12 662 48 25 tel./fax: 12 662 48 25

prof. dr hab. Magdalena Surma

Kraków, 03 luty 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pascaline Aimee Uwineza

pt. „Use of natural extracts from *Lamium album* in the biological protection of cereals against *Fusarium* pathogens” (Zastosowanie naturalnych ekstraktów pozyskanych z *Lamium album* w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*)

wykonanej w Katedrze Chemii

Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Waśkiewicz

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały nr NZDT-4000-30/2024 Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 28 listopada 2024 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej mgr Pascaline Aimee Uwineza.

Recenzję przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej przygotowano zgodnie z obowiązującymi regulacjami prawnymi w tym zakresie – Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami) i składa się zgodnie z zaleceniami Rady Doskonałości Naukowej z oceny następujących elementów:

- 1) czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia;
- 2) czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora;
- 3) czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej;
- 4) oceny końcowej.

Czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia?

W ostatnich latach dążenie do zastosowania metod uprawy, które muszą być nie tylko efektywne, ale także przyjazne dla środowiska i łączyć tradycyjne techniki z nowoczesnymi rozwiązaniami, które minimalizują negatywny wpływ na ekosystemy, jednocześnie zwiększając efektywność produkcji doprowadziło do wzrostu zainteresowania wykorzystaniem naturalnych ekstraktów roślinnych w celu

ochrony zbóż przed patogenami z rodzaju *Fusarium*. Trend ten w dużej mierze wynika z rosnących obaw dotyczących negatywnego wpływu syntetycznych fungicydów na zdrowie ludzi i środowisko. Pestycydy odgrywają kluczową rolę w ochronie upraw przed szkodnikami, chorobami i chwastami, jednak ich stosowanie wiąże się także z licznymi negatywnymi skutkami dla środowiska, zdrowia ludzi oraz organizmów pożytecznych. Nadużywanie lub niewłaściwe aplikowanie tych środków może prowadzić do poważnych konsekwencji. Dlatego konieczne jest ograniczenie ich stosowania i wdrażanie bardziej zrównoważonych praktyk rolniczych.

Rolnictwo odgrywa kluczową rolę, jako główne źródło zasobów żywnościowych dla ludności na całym świecie. Jest to podstawowy sektor gospodarki, zapewniający produkcję żywności, surowców przemysłowych oraz pasz dla zwierząt. Jego rozwój i efektywność są niezbędne dla zaspokojenia rosnącego zapotrzebowania na żywność w kontekście wzrostu populacji globalnej. Zboża stanowią podstawę światowego systemu żywnościowego i są kluczowym elementem w walce z głodem oraz zapewniają bezpieczeństwo żywnościowe dla rosnącej populacji. Według danych FAO (Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa), dostarczają około 50% kalorii spożywanych na całym świecie. Ze względu na ich szerokie zastosowanie i znaczenie ekonomiczne, rozwój ich produkcji jest niezbędny do zaspokojenia przyszłego zapotrzebowania na żywność. Jednak te kluczowe uprawy stają w obliczu poważnych zagrożeń ze strony grzybów fitopatogennych, które przyczyniają się w znacznym stopniu do globalnych strat żywności potęgowanych przez zmiany klimatyczne i kwestie środowiskowe.

Mikotoksyny to toksyczne produkty przemiany materii niektórych rodzajów pleśni, które mogą powodować patologiczne zmiany u ludzi, zwierząt i roślin. Dotychczas zidentyfikowano kilkaset różnych substancji toksycznych wytwarzanych przez pleśnie należące do gatunków *Aspergillus*, *Penicillium* oraz *Fusarium*, które są szczególnie istotne w kontekście badań. Zanieczyszczenie żywności mikotoksynami stanowi poważny problem dla rolnictwa i przemysłu spożywczego na całym świecie. Największe zagrożenie dla człowieka wynika z ich spożycia wraz z pokarmem. Mikotoksyny mogą znajdować się w produktach roślinnych, takich jak zboża, rośliny oleiste, kawa, owoce, przyprawy i orzechy, a także w produktach pochodzenia zwierzęcego, m.in. mleku, mięsie i podrobach. W ostatnich latach rozwój toksykologii żywności oraz nowoczesnych metod analitycznych pozwolił skupić większą uwagę na toksynach wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, powszechnie występujących w klimacie umiarkowanym, w tym w Europie. Mikotoksyny te stanowią zróżnicowaną grupę związków o szerokim spektrum toksycznych właściwości. Wzrost grzybów *Fusarium* oraz produkcja mikotoksyn zależą od wielu czynników środowiskowych, takich jak skład i konsystencja podłoża, obecność mikroelementów oraz mikroflory towarzyszącej. Kluczowe znaczenie mają także wilgotność i temperatura, które bezpośrednio wpływają na intensywność ich rozwoju i toksynotwórczość.

Jak słusznie zauważyła doktorantka, ze względu na fakt, że pszenica, jest jednym z najważniejszych zbóż na świecie, zarówno pod względem powierzchni upraw, jak i znaczenia żywieniowego, jest podstawowym składnikiem diety miliardów ludzi, a także surowcem w wielu gałęziach przemysłu spożywczego, jej ochrona przed patogenami *Fusarium* i ich toksycznymi metabolitami staje się bezwzględnie ważna dla globalnego bezpieczeństwa żywnościowego. Jedną z alternatyw dla syntetycznych fungicydów okazało się stosowanie ekstraktów z różnych części roślin, w tym korzeni, kory, nasion, pędów, liści, owoców, kwiatów, goździków, kłaczy lub łądyg, które mają tę zaletę, że zawierają mieszaninę różnych związków, w tym kwasów fenolowych, flawonoidów, garbników, terpenów oraz alkaloidów. Mogą one działać pojedynczo lub współdziałać

dając finalny wzmożony efekt, w tym hamowanie wzrostu fitopatogennych grzybów w trakcie uprawy i po zbiorach.

Obecnie liczne badania podkreślają przeciwgrzybicze działanie różnych ekstraktów roślinnych jednak większość z nich została przeprowadzona *in vitro* i często pomija ich wpływ na biosyntezę mikotoksyn. Ponadto, literatura podaje, iż ilość przebadanych biopestycydów bazujących na ekstraktach roślinnych pozostaje nadal ograniczona, a zapotrzebowanie na produkty ekologiczne ciągle wzrasta. Jedną z roślin, o niezbadanym potencjale przeciwdrobnoustrojowym, posiadającą szereg właściwości zdrowotnych jest *Lamium album*, powszechnie znana jako jasnota biała lub biała pokrzywa. Jak słusznie zauważyła Autorka chociaż przeprowadzono liczne badania jej właściwościami farmakologicznymi niewiele uwagi poświęcono badaniu ekstraktów z kwiatów jako potencjalnych naturalnych środków przeciwgrzybiczych w rolnictwie. Ponadto, w dostępnej literaturze brak jest badań nad skutecznością ekstraktów z kwiatów *L. album* przeciwko patogenom *Fusarium in vivo*. Z racji, że metoda ekstrakcji ma ogromny wpływ na wydajność procesu a konwencjonalne techniki zwykle są czasochłonne i kosztowne, mogą powodować utratę związków lotnych, degradację nietrwałych termicznie i charakteryzują się słabą selektywnością Doktorantka, aby zaradzić tym ograniczeniom związanym z konwencjonalnymi metodami, zastosowała ekstrakcję płynem w stanie nadkrytycznym (SFE). Tematyka badań podjęta przez Autorkę ma szczególne znaczenie badawcze oraz aplikacyjne i stanowi cenne źródło danych, które mogą służyć poszerzeniu wiedzy w tym zakresie. Doktorantka znalazła istotne pole badawcze, które skrupulatnie wypełniła przeprowadzonymi badaniami, co świadczy o Jej bardzo dobrej orientacji w tematyce przedmiotu i przygotowaniu merytorycznym. Zastosowała również szereg komplementarnych metod analitycznych do charakterystyki ekstraktów. Podjęte przez Autorkę badania wypełniły lukę w aktualnej wiedzy, a opisane po raz pierwszy w literaturze, przyczyniają się do rozwoju badań nad alternatywnymi, biologicznymi rozwiązaniami dla syntetycznych fungicydów i podkreślają ważność przeprowadzenia kompleksowych badań przed praktycznym zastosowaniem w środowisku rolniczym.

Podsumowując: podjęcie próby zbadania skuteczności naturalnych ekstraktów roślinnych pochodzących z rodzimych roślin zielarskich (*Lamium album*) w biologicznej ochronie zbóż przed ważnymi rolniczo patogenami *Fusarium* – *F. culmorum* i *proliferatum* w pracy doktorskiej mgr Pascaline Aimee Uwineza uważam za ważne, trafne i aktualne oraz uzasadnione ze względów poznawczych i aplikacyjnych. Przedstawiona do recenzji rozprawa plasuje się w nurcie bieżących zagadnień badawczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora?

Recenzowaną rozprawę doktorską Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza pt. „Use of natural extracts from *Lamium album* in the biological protection of cereals against *Fusarium* pathogens” (Zastosowanie naturalnych ekstraktów pozyskanych z *Lamium album* w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*”) stanowi cykl pięciu spójnych tematycznie, oryginalnych prac naukowych wykonanych w ramach realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w konkursie OPUS 16 nr UMO-2018/31/B/NZ9/03485 opublikowanych w latach 2020-2024 w czasopiśmie indeksowanych w Journal Citation Reports (Molecules, Applied Science, Toxins, Frontiers in Microbiology oraz Agriculture). Ich sumaryczny Impact Factor wynosi 17,9 a łączna liczba punktów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) 540. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem i Jej udział wynosi od 60

do 80%. Należy również wspomnieć, że mimo, iż prace zostały opublikowane stosunkowo niedawno już zyskały uznanie o czym świadczy liczba cytowań w bazach Scopus i Web of Science. Dołączone oświadczenia współautorów publikacji potwierdzają znaczący wkład Autorki w opracowanie koncepcji badań, metodologii, przeprowadzenie doświadczeń i analiz, opracowanie wyników badań, przygotowanie manuskryptów, ich poprawę i edycję oraz walidację zastosowanych metod analitycznych.

Cykl publikacji opatrzony jest 46-stronicowym opracowaniem w języku angielskim, na które składają się: wstęp teoretyczny, cele i hipotezy badawcze, metody, najważniejsze wyniki i ich dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo. Są one poprzedzone wykazem publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wykazem skrótów oraz streszczeniem (w języku angielskim oraz polskim). Integralną część pracy stanowią oświadczenia współautorów publikacji oraz publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada przedstawionym w pracy результатам badań. Wstęp ma na celu zapoznanie czytelnika z zagadnieniami dotyczącymi wykorzystania naturalnych ekstraktów roślinnych do ochrony zbóż przed patogenami *Fusarium*. Doktorantka postawiła cztery hipotezy badawcze i zaproponowała pięć celów szczegółowych, sformułowanych prawidłowo i logicznie wynikających ze studiów aktualnej literatury tematu. Rozdział „Metody” zawiera syntetycznie przedstawione w punktach informacje na temat materiału badawczego oraz zastosowanych metod. Zagadnienia te zostały szczegółowo scharakteryzowane w publikacjach, które stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej. W rozdziale „Najważniejsze wyniki i ich dyskusja” Doktorantka przedstawiła zwięzły opis wyników przeprowadzonych badań wraz z krytyczną i naukową dyskusją. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem powszechnie używanych testów. Całość dysertacji podsumowano pięcioma wnioskami i co jest warte podkreślenia, bo nie zdarza się często, podano które konkretnie hipotezy zostały zweryfikowane. Piśmiennictwo zamieszczone przez Doktorantkę w pracy obejmuje 108 anglojęzycznych pozycji przedstawiających zagadnienia związane z tematyką prowadzonych badań, z czego prawie 65% zostało opublikowane w ostatniej dekadzie.

Praca została napisana zrozumiałym językiem umożliwiającym śledzenie i analizę przedstawionych w publikacjach wyników.

Podsumowując: stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr Pascaline Aimee Uwineza i spełnia wymagania formalne stawiane pracom dysertacyjnym na stopień doktora.

Czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej?

Celem podjętych przez Doktorantkę badań była ocena skuteczności zastosowania naturalnych ekstraktów z rodzimych roślin zielarskich, w szczególności kwiatów *Lamium album*, w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*. W tym celu Autorka przeprowadziła wielokierunkowe badania, poczynwszy od opracowania warunków ekstrakcji przy użyciu nowoczesnej techniki bazującej na wykorzystaniu dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym (SC-CO₂) i wytypowaniu na podstawie uzyskanych wyników (wpływu parametrów ekstrakcji na skład ekstraktów i ich aktywność przeciwutleniającą, wydajność ekstrakcji, skład i stężenie związków bioaktywnych) spośród 4 rodzin (*Lamiaceae*, *Rosaceae*, *Ranunculaceae* i *Elagnaceae*) jednej rośliny o obiecującym potencjale przeciwrzybiczym – *Lamium album*. Następnie oceniła właściwości

przeciwgrzybicze ekstraktów z kwiatów *L. album* względem *Fusarium* w doświadczeniach *in vitro* (pożywka PDA) oraz *in vivo* (uprawa pszenicy w donicach i na polatkach).

W publikacji pierwszej (aut. Uwineza, P.A.; and Waśkiewicz, A. 2020. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules* 25, 3847) przedstawiono przegląd literatury, w którym zebrano informacje na temat bardziej ekologicznej technologii ekstrakcji naturalnych składników bioaktywnych z materiału pochodzenia roślinnego. Bioaktywne związki pochodzenia roślinnego, obecne w nich w niewielkich ilościach, wzbudzają duże zainteresowanie ze względu na ich korzystny wpływ na ludzkie zdrowie oraz wpasowanie się w trend bycia przyjaznymi dla środowiska. Jak do tej pory opracowano wiele metod ekstrakcji, konwencjonalnych i nowoczesnych, jednak ciągle nie zaproponowano żadnego unikalnego podejścia jako punktu odniesienia do ekstrakcji naturalnych związków bioaktywnych z materiału pochodzenia roślinnego. Jak powszechnie wiadomo selektywność i wydajność technik ekstrakcji zależy od wyboru krytycznych parametrów wyjściowych, charakteru próbek roślinnych, struktury związków bioaktywnych i dobrych umiejętności analityka. Niniejsza praca ma na celu omówienie ostatnich postępów w technikach ekstrakcji płynem nadkrytycznym, zwłaszcza dwutlenkiem węgla, wraz z podstawowymi zasadami ekstrakcji związków bioaktywnych z naturalnych materiałów roślinnych, takich jak zioła, przyprawy, rośliny aromatyczne oraz lecznicze.

W publikacji drugiej (aut. 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) Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące zastosowania techniki ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym do ekstrakcji związków bioaktywnych z kwiatów *L. album*. Ekstrakcję przeprowadzono w różnych temperaturach (40, 50 i 60°C) przy użyciu metanolu jako dodatkowego rozpuszczalnika (ponieważ, jak słusznie zauważyła Autorka, sam CO₂ ze względu na swój niepolarny charakter nie ekstrahował skutecznie związków polarnych) przy stałej prędkości jego przepływu, metanolu i ciśnieniu. Oznaczono aktywność przeciwutleniającą otrzymanych ekstraktów z zastosowaniem trzech niezależnych metod DPPH, ABTS i FRAP, a także całkowitą zawartość polifenoli (TPC) metodą Folin-Ciocalteu. Ponadto związki polifenolowe w ekstraktach z kwiatów *L. album* oznaczono ilościowo za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem fotodiodowym (UPLC-PDA) i potwierdzono ich obecność za pomocą potrójnego kwadrupolowego detektora masowego (TQD). Otrzymane wyniki wykazały, że optymalna temperatura ekstrakcji dla kwiatów *L. album* wynosiła 50°C, ponieważ ekstrakty wykazywały największą zdolność „zmiatania” wolnych rodników, zdolność redukującą oraz całkowitą zawartość polifenoli, potwierdzając hipotezę, iż aktywność przeciwutleniająca oraz zawartość polifenoli w ekstraktach roślinnych są ściśle uzależnione od zastosowanych warunków ekstrakcji. Identyfikacja związków polifenolowych w otrzymanym ekstrakcie z kwiatów *L. album*, przy użyciu UPLC-PDA, wykazała, że chryzyna, pinostrobin, mirycetyna oraz kwas trans-3-hydroksycynamonowy występowały w najwyższych stężeniach i to one mogą być odpowiedzialne za wysoką zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniającą. Trzy główne grupy związków polifenolowych zostały skategoryzowane w oparciu o ich strukturę: flawonoidy, kwasy fenolowe oraz estry fenolowe, co podkreśla różnorodność związków bioaktywnych w ekstraktach z kwiatów *L. album* i ich potencjalną rolę w działaniu przeciwutleniającym i przeciwgrzybiczym. Jak słusznie zauważyła Doktorantka uzyskane wyniki wskazują, że SC-CO₂ można uznać za alternatywną metodę ekstrakcji związków bioaktywnych z *L. album*. Wysoka aktywność przeciwutleniająca i obecność różnych związków

bioaktywnych wskazują na potencjał tej rośliny i możliwość jej zastosowania w różnych gałęziach przemysłu, w tym w rolnictwie, technologii żywności czy farmacji.

Natomiast w opracowaniu do cyklu publikacji na str. 12 pojawia się informacja, że ekstrakcja prowadzona była nie tylko w zmiennych parametrach temperatury ale i ciśnienia o czym nie wspomniano ani w publikacji ani w dalszej części rozdziału. Proszę o wyjaśnienie, czy ciśnienie było zmiennym parametrem w doświadczeniach? Podobnie na str.16 pojawia się informacja o analizie związków lotnych z zastosowaniem techniki GC-MS, o czym również nie ma żadnej wzmianki w publikacji. Dodatkowo pojawia się informacja o zawartości tych związków w ekstraktach, które otrzymywane były pod zwiększonym ciśnieniem (300 barów) a w obniżonej temperaturze (40 °C). Jak się później dowiadujemy ten wariant jest niekorzystny w porównaniu z wcześniej ustalonymi parametrami ekstrakcji, czyli temperaturą 50°C i ciśnieniem 250 barów, a dodatkowo nie była sprawdzana aktywność przeciwutleniająca otrzymanych w nim ekstraktów. Tu również chciałam prosić Autorkę o wyjaśnienie.

W publikacji trzeciej (aut. 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) ocenie poddano skuteczność ekstraktów z kwiatów *L. album* w hamowaniu wzrostu *in vitro* i biosyntezy mikotoksyn przez szczepy *Fusarium culmorum* i *proliferatum*. Ekstrakty otrzymano wcześniej zoptymalizowaną metodą ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym. Oceniono *in vitro* działanie przeciwwgrzybicze różnych stężeń (2,5; 5; 7,5 oraz 10%) wykorzystując podłoże agarowe z dekstrozą ziemniaczaną (PDA) przy użyciu techniki nazwanej przez autorkę „poisoning” – „zatrutego podłoża”. Ekstrakty z kwiatów *L. album* redukowały wzrost grzybnii od 0 do 31% i od 28 do 43% odpowiednio w przypadku *F. culmorum* i *proliferatum*. Wyższe stężenia ekstraktu *L. album* skutkowały bardziej znaczącym hamowaniem wzrostu *F. culmorum*. W przypadku *F. proliferatum*, wyniki wskazywały na znaczące działanie hamujące ekstraktu *L. album* we wszystkich badanych stężeniach. Nawet przy najniższym stężeniu (2,5%) zaobserwowano zauważalne zmniejszenie wzrostu grzybów w porównaniu do kontroli, z dalszym zahamowaniem obserwowanym przy wyższych stężeniach. Jak słusznie zauważyła Autorka sugeruje to, że ekstrakt z *L. album* ma silne właściwości przeciwwgrzybicze przeciwko *F. proliferatum*, przy czym efekt hamujący jest bardziej wyraźny przy wyższych stężeniach. Różne reakcje *F. culmorum* i *proliferatum* na zastosowanie *L. album* wynikały z podstawowych różnic w składzie genetycznym, szlakach metabolicznych i mechanizmach fizjologicznych tych gatunków, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi. Wskazuje to, że skuteczność ekstraktów roślinnych w zwalczaniu patogenów *Fusarium* zależy od cech każdego materiału roślinnego, zastosowanego stężenia oraz jego interakcji z patogenem. Zawartość ergosterolu (ERG) została zredukowana o ok. 89 i 93% odpowiednio dla *F. culmorum* i *proliferatum*. Spadek ten był najprawdopodobniej spowodowany rosnącą aktywnością przeciwwgrzybiczą ekstraktu *L. album* przy wyższych stężeniach. Jak słusznie zauważyła Doktorantka wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu, skuteczniej przerywa on produkcję ERG lub niszczy błonę komórkową grzyba, prowadząc do obniżenia jego poziomu. Podobnie, ilości syntezowanych mikotoksyn wytwarzanych przez oba szczepy były niższe w porównaniu do kontroli (PDA bez ekstraktów), przy czym zakres różnił się w zależności od stężenia ekstraktu, rodzaju *Fusarium spp.* i rodzaju mikotoksyny. W obu przypadkach stężenie 10% było najbardziej skuteczne w redukcji biosyntezy mikotoksyn. Podsumowując, badania wykazały, że ekstrakty z kwiatów *L. album* mogą hamować biosyntezę dobrze znanych mikotoksyn oraz ich zmodyfikowanych form i pochodnych, co pozostaje w zgodności z doniesieniami literaturowymi.

W publikacji czwartej (aut. 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) oceniono wpływ ekstraktów z kwiatów *L. album* na kiełkowanie nasion i wzrost siewek pszenicy porażonej *F. culmorum* w uprawie doniczkowej. Wyniki wykazały, że fitotoksyczny wpływ ekstraktów w obu przypadkach był zależny od stężenia. Długość korzeni była zmniejszona w porównaniu do kontroli, jednak zastosowanie ekstraktu nie wpłynęło znacząco na ich suchą masę. Zaobserwowano niewielki fitotoksyczny wpływ na kiełkowanie nasion, ale działanie przeciwgrzybicze na sztucznie zakażone siewki pszenicy zostało również potwierdzone poprzez obniżenie poziomu ergosterolu i akumulacji mikotoksyn w korzeniach i liściach po 21 dniach inokulacji. Natomiast DNA *F. culmorum* zidentyfikowano tylko w próbkach kontrolnych. Podsumowując, badania wykazały, że ekstrakt z kwiatów *L. album* chroni pszenicę przed patogenem odpowiedzialnym za zgniliznę korony i korzeni *Fusarium* ale jak słusznie zauważyła Autorka niezbędne są dalsze badania w celu zbadania wpływu ekstraktów z *L. album* na kluczowe geny regulatorowe dla szlaków biosyntezy mikotoksyn.

W publikacji piątej (aut. 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) opisano doświadczenie polowe przeprowadzone w Polowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Winnej Górze w sezonie 2022/2023 w celu oceny potencjału zastosowania ekstraktu z kwiatów *L. album* jako oprysku dolistnego przeciwko grzybom mikotoksycznym w dwóch odmianach pszenicy ozimej: Arkadia i Julius. W celu uzyskania ekstraktu z kwiatów *L. album* zastosowano wcześniej zoptymalizowaną metodę ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym. Zawartość ERG oraz mikotoksyn w zebranych ziarnach pszenicy analizowano dedykowanymi w tym celu metodami chromatograficznymi. Otrzymane wyniki wykazały znaczną redukcję zawartości ERG na poletkach nawożonych ekstraktem z kwiatów *L. album*, prawie 3-krotną dla odmiany Arkadia i prawie 2,5-krotną dla odmiany Julius. Oprysk ekstraktem z *L. album* znacząco zmniejszył biosyntezę mikotoksyn (deoksyniwalenolu (DON) i zearalenonu (ZEN)) w obu odmianach. Ponadto odmiana Arkadia wykazywała większą odporność na infekcje *Fusarium*, a działanie przeciwgrzybicze *L. album* było bardziej wyraźne niż w przypadku odmiany Julius, która okazała się bardziej wrażliwa. Podsumowując, warto podkreślić, że ekstrakt z kwiatów *L. album* wykazał obiecujące działanie przeciwgrzybicze w doświadczeniach polowych w walce z *F. culmorum* w odmianach pszenicy ozimej, sugerując potencjalną alternatywę dla syntetycznych fungicydów. Ponieważ jednak nie osiągnięto całkowitego zapobiegania zanieczyszczeniu mikotoksynami, uzasadnione są dalsze badania w celu optymalizacji stężeń ekstraktu i przeprowadzenia długoterminowych analiz w celu uznania tego ekstraktu roślinnego za zrównoważony środek kontroli.

Omawiając wyniki przedstawione w pracach stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza wykazała, że przeprowadzenie przez Nią eksperymenty dostarczają nowej, istotnej wiedzy wskazującej, że ekstrakty z kwiatów *L. album* są obiecującym naturalnym środkiem przeciwgrzybiczym zmniejszającym infekcję *Fusarium* w pszenicy. W badaniach *in vitro*, ekstrakty z kwiatów *L. album* wykazywały znaczące działanie hamujące wobec *F. culmorum* i *proliferatum* hodowanych na pożywce PDA. W badaniach *in vivo*, potencjał przeciwgrzybiczy ekstraktów został dodatkowo potwierdzony przez zmniejszenie poziomu ERG i mikotoksyn w siewkach i ziarnach pszenicy oraz próbach polowych zakażonych *F. culmorum*. Ponadto, Doktorantka podkreśla

znaczenie zrównoważenia skuteczności przeciwwgrzybiczej z potencjalnym fitotoksycznym wpływem na wzrost upraw. Stanowi to ważny krok w kierunku opracowania przyjaznych dla środowiska i naturalnych alternatyw dla syntetycznych fungicydów do zwalczania infekcji *Fusarium* w pszenicy. Można powiedzieć, że toruje drogę do dalszych poszukiwań naturalnych ekstraktów roślinnych w celu promowania zrównoważonej produkcji pszenicy i waloryzacji lokalnie dostępnych, niedostatecznie wykorzystywanych roślin, przyczyniając się do trwającej na całym świecie dyskusji na temat przyjaznych dla środowiska metod zwalczania chorób. W tym miejscu chciałabym jeszcze zapytać Autorkę o ekologiczne konsekwencje stosowania ekstraktu z kwiatów *L. album*.

Doktorantka wyciągnęła właściwe wnioski. Przeprowadzone badania i sformułowane na ich podstawie wnioski kładą odpowiednie akcenty na znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz są adekwatne do celów określonych w pracy. Zabrało mi jedynie informacji o dalszych perspektywach badawczych, o które chciałabym zapytać Doktorantkę. Czy Doktorantka planuje kontynuację badań nad optymalizacją formulacji ekstraktu do zastosowań rolniczych?

Uwagi zawarte w niniejszej recenzji w żaden sposób nie wpływają na obniżenie wartości naukowej recenzowanej pracy, stanowiącej wartościowe opracowanie naukowe, świadczące o dobrym przygotowaniu merytorycznym i analitycznym Autorki.

Podsumowując: publikacje stanowiące rozprawę doktorską Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza wnoszą oryginalny wkład w rozwój wiedzy w dyscyplinie technologia żywności i żywienia oraz wpisują się doskonale w obecny trend badań interdyscyplinarnych.

Ocena końcowa

Podsumowując cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską oraz dołączone do niego opracowanie stwierdzam, że Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza wykazała się dobrą znajomością tematyki badań. Poprawnie zaplanowała i wykonała doświadczenia oraz analizy wykazując się umiejętnością obsługi nowoczesnej aparatury analitycznej i uzyskując dużą liczbę wartościowych wyników.

Dorobek naukowy Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza obejmuje 12 publikacji z czego 11 opublikowano w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports. Indeks h Doktorantki według bazy Scopus wynosi 7. Uczestniczyła jako wykonawca w 1 projekcie badawczym NCN i w 1 projekcie dydaktycznym NCBiR. Wygłosiła 2 referaty i zaprezentowała 5 plakatów na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych będąc jednokrotnie wyróżniona. Odbyla trzy staże naukowe w kraju i zagranicą oraz brała udział w programie Erasmus+.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza pt. „Use of natural extracts from *Lamium album* in the biological protection of cereals against *Fusarium* pathogens” (Zastosowanie naturalnych ekstraktów pozyskanych z *Lamium album* w biologicznej ochronie zbóż przed patogenami *Fusarium*”) jest oryginalnym osiągnięciem naukowym i spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu pracom określone w art. 187 Ustawy z 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Pascaline Aimee Uwineza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Magdalena Surma