

dr hab. inż. Elżbieta Suchowilska, prof. UWM
Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
pl. Łódzki 3/425
10-727 Olsztyn

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani **mgr inż. Anny Przybylskiej-Balcerek**
pt. **"Właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków fenolowych pozyskanych
z wybranych odmian zbóż uprawianych w Polsce"**.

wykonanej pod kierunkiem **prof. UPP, dr hab. Kingi Stuper-Szablewskiej**
w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

PODSTAWA FORMALNO-PRAWNA OPRACOWANIA RECENZJI

Recenzja została wykonana na podstawie Uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 25 września 2020 oraz pisma Przewodniczącego Rady Naukowej Pana prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka z dnia 28 września 2020 r. (RNDRiO- 40/4000/2020).

WPROWADZENIE

Zboża i przetwory zbożowe od wieków są cennym składnikiem pochodzenia roślinnego w diecie. Pokrywają około 50% zapotrzebowania kalorycznego i około 45% zapotrzebowania na białko. Ich ziarno jest bogate w sacharydy, głównie w skrobię, umiarkowanie zasobne w białko i niewielką ilość lipidów. Stanowi źródło związków bioaktywnych, z których wiele posiada właściwości przeciwutleniające. Najważniejsze spośród tych związków bioaktywnych to związki fenolowe, fitosterole, tokole, β -glukany, alkilorezorcynole, lignany, inozytol i betaina zapewniające pożądane korzyści zdrowotne. Związki fenolowe stanowią ważną i zdecydowanie bardzo różnorodną grupę substancji chemicznych występujących w świecie

roślin. Klasyfikowane są one jako substancje nieodżywcze, jednak niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Skład frakcji fenolowej zależy od wielu czynników, w tym: gatunku rośliny, odmiany uprawnej, warunków klimatycznych, strefy klimatycznej, pory roku, czy też zabiegów agrotechnicznych. Fenole odgrywają ważną rolę w procesach wzrostu i rozwoju roślin, a ponadto kształtują ich cechy sensoryczne. Decydują o barwie, nadają charakterystyczny gorzki i cierpki smak, a także powodują zmętnienia i osady w żywności przetworzonej np. w sokach czy napojach. Dodatkowo polifenole wykazują działanie antybakteryjne.

Zainteresowanie związkami fenolowymi wynika z szerokiego spektrum ich prozdrowotnego działania. Liczne badania przeprowadzone zarówno na modelach *in vitro*, jak i *in vivo* dowodzą wysokiej aktywności biologicznej polifenoli.

Stosowanie biologicznych metod ochrony roślin wiąże się z bezpieczeństwem zabiegów dla środowiska oraz z narastającym problemem odporności patogenów na stosowane fungicydy. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu czynników biologicznych do zwalczania patogenów i może być alternatywą dla metod chemicznych, lecz jej zastosowanie jest ograniczone. Wynika to z szybkiego postępu w produkcji syntetycznych fungicydów, zależności efektywności środków biologicznych od warunków środowiska, gatunku czy odmiany rośliny, niewielkiej póki co liczby zarejestrowanych biopreparatów, wąskiego spektrum działania tych środków oraz ich ograniczonej skuteczności. Jednakże biologiczne metody ochrony roślin budzą coraz większe zainteresowanie społeczeństwa.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest więc nie tylko jak najbardziej aktualna, ale i ważna i uzasadniona, bowiem dotyczy oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych związków fenolowych pozyskanych z wybranych odmian zbóż uprawianych w Polsce. Zakres wykonanych badań oceniam wysoko zarówno z poznawczego jak i użytkowego punktu widzenia.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA I OCENA FORMALNA PRACY

W swojej pracy Autorka podjęła się oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów związków fenolowych pochodzących z ziarna różnych genotypów zbóż uprawianych w Polsce. Cel ten osiągnęła poprzez określenie profilu jakościowego i ilościowego związków fenolowych w ziarnie zbóż naturalnie porażonych i inokulowanych grzybami z rodzaju *Fusarium* a następnie poprzez wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego i

bójczego (odpowiednio: MIC i MBC) dla ekstraktów związków fenolowych pozyskanych z ziarna zbóż wobec wybranych szczepów bakterii i grzybów mikroskopowych z rodzaju *Fusarium*.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Przybylskiej-Balcerek ma charakter zwartej monografii. Liczy ona 188 stron, w tym 33 tabele, 58 rysunków, wykaz stosowanych w pracy skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim (4 strony) oraz rozdziały: Wstęp (2 strony), Część literaturowa, stanowiąca de facto przegląd piśmiennictwa (39 stron), Cel pracy z hipotezą badawczą (1 strona), Część doświadczalna (15 stron), Omówienie i dyskusja wyników (60 stron), Wnioski (1 strona), Podsumowanie (1,5 strony), Bibliografię zawierającą 319 pozycji, spisy rysunków i tabel oraz Suplement.

Układ pracy jest logiczny i właściwy dla tego typu dysertacji doktorskich. Proporcje wielkości poszczególnych rozdziałów są moim zdaniem prawidłowe. Występują jednak pewne błędy, na które chciałabym zwrócić uwagę:

- ✓ podrozdział **5.5.2** Fuzarioza - powinno być Fuzariozy, gdyż grzyby z rodzaju *Fusarium* powodują szereg chorób różnych organów roślin, z których każdą można określić mianem fuzariozy.
- ✓ podrozdział **5.6** Odporność ziarna zbóż na choroby grzybicze. Czy ziarno może być odporne na choroby? Rozumiem, że Doktorantka miała na myśli odporność roślin zbożowych (zbóż) na choroby grzybicze.
- ✓ podrozdział **7.4.1; 8.2.5** błędna nazwa angielska jest: *Total Phenoloc Compounds* powinno być Total Phenolic Content (TPC). Podobne przekłamania tej nazwy występują w zamieszczonych skrótach oraz w całej rozprawie doktorskiej - zaznaczyłam je w pracy.
- ✓ **Strona 7** Skrót Mb- jęczmień browarniany. Wg nomenklatury stosowanej przez COBORU powinno się używać określenia jęczmień browarny. Skrót MBC- ang. *Minimum Bactericidal Concentration*, „Minimalne stężenie bójcze” powinno być zastąpione „Minimalnym stężeniem bakteriobójczym”.
- ✓ **Strona 9** jest: „ssp. ang. species pluralis, podgatunki”. Skrót ten oznacza jednak „*subspecies*”, czyli podgatunek. Species oznacza gatunek
- ✓ **Strona 9** skrót: „tj. jak jak”, powinno być to jest, „Wit-witaksyna”, powinno być witekksyna. Błędy te występują w całej pracy, zaznaczyłam je w tekście.

Praca została napisana zasadniczo poprawnym językiem. Właściwie dobrane piśmiennictwo świadczy o tym, że Autorka starannie zapoznała się z literaturą źródłową

opublikowaną w różnych czasopismach krajowych i zagranicznych na przestrzeni ostatnich lat. Warto podkreślić, że ponad 50% cytowanej literatury stanowią publikacje autorów zagranicznych. Po zapoznaniu się z pracą mogę stwierdzić, że Autorka opanowała technikę pisania rozpraw naukowych zaś przedłożona do oceny dysertacja spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim przez osoby ubiegające się o nadanie stopnia naukowego doktora Nauk rolniczych w dyscyplinie Rolnictwo i Ogrodnictwo.

OCENA MERYTORYCZNA

Tytuł rozprawy „**Właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków fenolowych pozyskanych z wybranych odmian zbóż uprawianych w Polsce**” poprawnie odzwierciedla jej treść, zakres przeprowadzonych badań i uzyskane wyniki. Na podstawie zacytowanego piśmiennictwa, w rozprawie Autorka opracowała rozdziały „Wstęp” i „Część literaturowa”, czyli przegląd piśmiennictwa którego celem było przede wszystkim przedstawienie czytelnikowi faktycznego stanu badań (krajowych i zagranicznych) w zakresie interesującej Doktorantkę problematyki. Wśród cytowanych prac większość stanowią prace bezpośrednio lub pośrednio związane z tematem pracy.

W „Części literaturowej” Autorka dokonuje kompleksowego przeglądu piśmiennictwa, w którym opisuje ogólną charakterystykę zbóż uprawianych w Polsce, kierunki ich użytkowania, czynniki stresogenne na jakie są narażone rośliny w trakcie wegetacji (czynniki abiotyczne i biotyczne) po czym przechodzi do opisu odporności zbóż na choroby grzybowe. W dalszej części możemy zapoznać się z dość obszernym opisem budowy i charakterystyką związków bioaktywnych występujących w ziarnie pszenicy (w szczególności dotyczy to związków fenolowych, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów). Doktorantka przeanalizowała dotychczasowy dorobek różnych ośrodków naukowych, szczególną uwagę zwracając na prace poświęcone antyoksydantom, zwłaszcza związkom fenolowym. Przedstawiony przegląd stanu wiedzy, poparty adekwatnymi cytowaniami literatury dobrze wprowadza czytelnika w eksperymentalną część pracy oraz uzasadnia cel i zakres prac podjętych w dysertacji. W mojej opinii tak gruntowna analiza wybranego przez Doktorantkę piśmiennictwa daje podstawy do stwierdzenia, że posiada Ona dobrą wiedzę i dobrą znajomość współczesnej literatury związanej z tematyką rozprawy.

W rozdziale **Wstęp i Przegląd literatury** zauważyłam jednak pewne błędy i nieścisłości, na niektóre pragnę zwrócić Doktorantce uwagę:

- niepoprawne cytowania:

„**Wstęp**” str. 15, siódmy wiersz: cytowanie (Cacak-Pietrzak i inni, 2013) przyjęło się, że przy cytowaniach autorów podajemy nazwisko autora i skrót i in. np. Cacak-Pietrzak i in., 2013. Podobna sytuacja występuje również w innych miejscach tekstu.

✓ w wielu wyrazach brakuje spacji (np. „**Wstęp**” 4 wiersz, jest „uważanejest”, „złożniejsza” itd.). Wszystkie te błędy zaznaczyłam w pracy.

✓ **Str. 15** jest, cytuję: „*Uważane są one za jedne z najbardziej patogennych i fitotoksycznych mikroorganizmów*”. Sformułowanie jest niefortunne, bowiem mikroorganizmy w odróżnieniu od np. metabolitów nie mogą być fitotoksyczne, mogą być patogeniczne.

✓ **Str. 15**, jest, cytuję: „*Stwierdzono, że w ziarnie zbóż podczas zmasowanego ataku patogenów dochodzi do wzmożonej biosyntezy związków fenolowych, które stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami. Związki te wykazują działanie przeciwutleniające, i są to m.in.: witaminy, makro- i mikroelementy oraz substancje roślinne takie jak polifenole (Przybylska, 2018; Przybylska-Balcerek i inni, 2019(a))*”. Proszę o wyjaśnienie co Doktorantka tutaj miała na myśli, drugie zdanie jest niefortunne. Rozumiem, że związki fenolowe wykazują działanie przeciwutleniające, ale w jakim kontekście pojawiają się tutaj witaminy, mikro i makroelementy?

✓ **Str. 16**, cytuję zdanie: „*W niniejszej pracy po raz pierwszy podjęto badania mające na celu wykazać działanie przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów związków fenolowych pozyskanych z ziarna zbóż w stosunku do wybranych patogenów*”, czy zdanie to nie jest troszkę na wyrost, według mojej wiedzy są takie prace, chociażby praca mojego współautorstwa opublikowana w czasopiśmie „Biologia” w roku 2008.

✓ **Podrozdział 5.1, str. 17** cytuję: „*Zboża drobnoziarniste należą do rodziny wiechlinowatych (Poaceae= Gramineae), rzędu wiechlinowców (Pooidae). Na podrodzinę traw (Pooidae) składają się liczne rodzaje, gatunki, podgatunki oraz odmiany botaniczne*”. Powinno być: rzędu wiechlinowców (Poales), a trawy nie są podrodziną.

✓ **Str. 17**, cytuję: „*Obserwuje się istotne różnice między odmianami zbóż jarych i ozimych. Stwierdzono u różnych gatunków i odmian zbóż ozimych istotnie wyższą zawartość popiołu, błonnika pokarmowego oraz jego składników tj.: włókna surowego i pentozanów w porównaniu z odmianami jarymi. Zatem ziarno zbóż ozimych może stanowić cenniejszy surowiec dla przemysłu przetwórczego i tym samym być wykorzystywane na większą skalę do*

produkcji żywności o podwyższonej zawartości białka pokarmowego (Gąsiorowski, 1997; Kawka i inni, 1999)”. Czy Doktorantka nie zapomniała tutaj o białku? Czy formy jare od ozimych nie różnią się zawartością tego podstawowego składnika pokarmowego? Bardzo proszę o wyjaśnienie.

✓ **podrozdział 5.1** Doktoranta pisze, cytuję „W Polsce uprawia się następujące zboża drobnoziarniste: pszenicę (*Triticum* L.), żyto (*Secale* L.), pszenżyto (*Triticosecale* L.), jęczmień (*Hordeum* L.) oraz owies (*Avena* L.) (Ruebenbauer, 1976; Dubas i Gładysiak, 1997; Szweykowska i Szweykowski, 2001; Gąsiorowski, 2004)”. Uważam, że sformułowanie „*Triticum*” jest zbyt ogólne, warto wskazać gatunki o różnym stopniu ploidalności uprawiane w naszym kraju.

✓ w całej pracy Doktorantka używa słowa mikotoksyny (-a) miko toksyna; Choć forma z przedrostkiem „miko” jest dopuszczalna, to jednak zgodnie z zaleceniem Rady Języka Polskiego właściwe jest stosowanie przedrostka „myko” – najpoprawniej więc będzie „mykotoksyna” pisane łącznie.

✓ błędy literowe (np. **str. 19** jest: *Triticum pelta* powinno być *Triticum spelta* itp.)

✓ **Podrozdział 5.2.1** cytuję: „klasy jednoliściennych (*Liliopsida* brongn.)” nazwę łacińską i skrót autora nazwy należy pisać się wielką literą (*Liliopsida* Brongn.)

✓ **Str. 20**, cytuję: „Ustalono również podstawowy skład chemiczny ziarniaków pszenicy zwyczajnej: woda– 13,2%, białko– 11,7%, węglowodany – 69,3%, białko– 2%, tłuszcze – 2%, substancje mineralne – 1,8%.” Brakuje powołania się na źródło. Czy może są to wyniki własne?

✓ **Str. 20, tabela 2**, w przypadku pszenic jakościowych, dwukrotnie występuje odmiana Nawra.

✓ **Str. 20**, niefortunne stwierdzenie „*Żyto obejmuje kilkanaście gatunków, podgatunków oraz odmian botanicznych, z czego wyróżnia się cztery (Tabela 3).*” Nie ma kilkunastu gatunków-wyróżniamy tylko cztery gatunki żyta (*Secale montanum*, *S. fragile*, *S. africanum* i *S. cereale*) pięć podgatunków i sześć odmian botanicznych.

✓ **Str. 21** zdanie: „Wszystkie gatunki żyta mają garnitur chromosomowy $2n=14$ (diploidalne), a wyhodowane w ostatnich latach mają garnitur chromosomowy $2n=28$ (tetraploidalne).” Powinno być: wyhodowane w ostatnich latach odmiany mogą mieć garnitur chromosomowy $2n=28$ (tetraploidalne).

✓ **Podrozdział 5.2.3, str. 22, rysunek 2.** Doktorantka w zapisie krzyżowania podaje „pszenica + żyto, pszenżyto oktoploidalne + pszenżyto heksaploidalne itp.” Otóż zapis

krzyżowania oznacza się łącząc nazwy obu gatunków znakiem mnożenia (x), wymieniając najpierw roślinę mateczną(♀), a potem ojcowską (♂), więc zapis powinien być pszenica x żyto. Dodatkowo w zapisie Doktorantka podaje *pszenżyto oktoploidalne n=56* – powinno być $2n=56$, *pszenica heksaploidalna n=42* - powinno być $2n=42$. Liczbę chromosomów w komórkach haploidalnych (np. w gametach) oznacza się jako n, a w komórkach diploidalnych (somatycznych) jako 2n.

✓ **Podrozdział 5.2.4**, zdanie: „*Spośród wymienionych w tabeli 9 odmian botanicznych znaczenie gospodarcze...*”. Pragnę zwrócić uwagę, że w tabeli jest 5 odmian a nie 9.

✓ **Rozdział 5.4** cytuję: „*Zboże jest uprawiane na całym świecie i wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu*” powinno być zboża są uprawiane...

✓ **Podrozdział 5.4.2** cytuję: „*Ziarno żyta wykorzystuje się również do produkcji paszy dla zwierząt (ziarno, zielonka czy torby żytnie)*”. Proszę o wyjaśnienie co to takiego są torby żytnie?

✓ **Rozdział 5.5.** cytuję: „*Stresory abiotyczne są często wywołane działaniem czynników fizycznych, a także chemicznych*”. Stresory (czynniki stresowe, stesy) nie są wywoływane, one po prostu są.

✓ **Str.30** proponuje zastąpić stwierdzenie „*parametry biometryczne ziarna zbóż*” na elementy struktury plonu, wyrażenie „*saprofity*” proszę zamienić na saprotrofy.

✓ **Str. 31. Rys. 6.** *Scirpentriolu* proponuję zastąpić *scirpentiol*

✓ **Str. 32, rys. 7.** Podpis rysunku - jest: „*Wybrane grzyby z rodzaju Fusarium ssp. (Wiewióra, 2010)*” powinno być „*Zarodniki konidialne wybranych grzybów z rodzaju Fusarium spp.*”, stwierdzenie „*osłabienia siły kiełkowania*” proponuje zastąpić osłabieniem zdolności kiełkowania.

✓ **Str. 33, podpis pod rysunkiem 8** „*Kłosa pszenicy ozimej porażone fuzariozą kłosów*” proszę zastąpić na: *Kłosa pszenicy ozimej porażone grzybami z rodzaju Fusarium*. Fuzarioza kłosa to nie patogen, jest to nazwa choroby jaką wywołuje patogen. Zdanie „*Na rozwój fuzariozy mają czynniki zewnętrzne*”. Jeśli Doktorantka miała na myśli rozwój fuzariozy kłosa, to zdanie powinno brzmieć: *Na rozwój fuzariozy kłosa mają wpływ czynniki zewnętrzne*.

✓ **Str. 34 podpis tabeli 10.** powinien brzmieć *Przeгляд grzybów z rodzaju Fusarium z uwzględnieniem zasiedlenia zbóż i produkcji mykotoksyn*.

✓ **Str. 36** słowo „*pierwszorzędnym*” proszę zastąpić *pierwszorzędowym*.

✓ **Str. 42, podpis rys.12** jest niekompletny, gdyż nie przedstawia on tylko budowy anatomicznej ziarniaków, ale w dolnej części przedstawia również morfologię kłosów i ziarna.

- ✓ **Str. 43, tabela 11,** określenie „*okrywa nasienna*” jest błędne, gdyż w ziarniakach występuje okrywa owocowo-nasienna i okrywa owocowa jest ściśle zrośnięta z okrywą nasienną. Ziarniak jest owocem a nie nasieniem.
- ✓ **Str. 45 nazwa kwasu:** „synapinowy” czy synapowy? Obie nazwy są poprawne, ale proszę ujednoczyć nazewnictwo w całej pracy.
- ✓ **Str. 48,** cytuję: „*...obronnych komórek roślinnych takich jak ligniny*” Ligniny nie są komórkami a polimerami, których monomerami są związki organiczne będące pochodnymi alkoholi fenolowych.
- ✓ **Str. 49** cytuję; „*Ok. 75% kwasu ferulowego znajduje się w łusce ziarniaka, ok. 15% w endospermie ziarna, a pozostała część w warstwie aleuronowej*”. Potoczne i merytorycznie niepoprawne określenie „łuska” proszę zastąpić określeniem „okrywa owocowo-nasienna”, podobnie jak na stronie 53.
- ✓ **Str. 51. Dwukrotnie w pracy (również na str. 127) występuje dokładnie ten sam fragment tekstu:** „*Kwasy te naturalnie występują przede wszystkim w owocach jagodowych i ziarnie zbóż, stąd ich wysoka jakość przechowalnicza. Kwas benzoesowy ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie został wyparty przez jego sole, o wysokiej rozpuszczalności. Ich dodanie do żywności w stężeniu 0,02-0,08% stanowi barierę rozwojową drobnoustrojów (głównie grzybów mikroskopowych) (Stachowicz, 2015; Dec, 2016)*”.

Te w gruncie rzeczy drobne choć liczne błędy nie rzutują na moją ogólnie pozytywną ocenę tej części pracy.

W dalszej kolejności Doktorantka sformułowała „Cel pracy”, którym była ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów związków fenolowych pochodzących z ziarna różnych genotypów zbóż uprawianych w Polsce o różnym stopniu zanieczyszczenia grzybami z rodzaju *Fusarium*. Cel ten osiągnięto poprzez wybranie 24 odmian należących do 5 gatunków zbóż uprawianych w Polsce, których ziarno cechowało się najwyższą zawartością polifenoli ogółem na podstawie dwuletnich badań, określenie wpływu inokulacji grzybami z rodzaju *Fusarium* na zawartość związków fenolowych, wyznaczenie dla ekstraktów związków fenolowych pozyskanych z ziarna zbóż, o zróżnicowanym stopniu porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium*, minimalnego stężenia hamującego i minimalnego stężenia bójczego dla wybranych szczepów bakterii i grzybów mikroskopowych z rodzaju *Fusarium*.

Mam jedynie wątpliwości, co do określenia, cytuję, „stężenie bójcze”. Może lepiej napisać stężenie biobójcze. Doktorantka w swojej rozprawie stawia także cztery hipotezy badawcze.

Opis materiału badawczego oraz przeprowadzonych analiz chemicznych i laboratoryjnych Autorka przedstawiła w rozdziale „Część doświadczalna”. Rozdział ten został przedstawiony czytelnie. Zawiera on wszystkie informacje niezbędne do ewentualnego powtórzenia przedstawionych w pracy analiz. Dobór jasno opisanych metod badawczych jest odpowiedni i poprawny. Wszystkie analizy zostały właściwie zaplanowane i wykonane. Mam jednak kilka uwag, które nasunęły mi się po zapoznaniu z tą częścią pracy:

✓ **Str. 59 tabela 14**, pszenica Durum L występuje tu jako forma, a jest to przecież gatunek, nagłówek „*ilość prób*” proponuję zastąpić liczbą prób (jest to rzeczownik policzalny).

✓ **Str. 60, tabela 16**, w przypadku odmiany zboża jest „Durum SMH 87” wystarczy SMH 87

✓ **Str. 64** zdanie: „Stężenie wynosiło ok. 5×10^5 zarodników/ml dla *F. culmorum* i *F. graminearum*, podczas, gdy było to 10^6 zarodników/ml dla *F. langsethiae*. Bardzo proszę o wyjaśnienie z czego wynikała różnica w stosowanych stężeniach zawiesin.

Zdanie: „*Genotypy zaszczepiano na etapie antytezy przez opryskanie kłosów zawiesiną zarodników*” nie ukrywam, że pierwszy raz spotkałam się z takim stwierdzeniem. Proponuję następującą zmianę: wszystkie badane genotypy inokulowano w fazie kwitnienia (BBCH 61-65) poprzez oprysk kłosów zawiesiną zarodników. Bardzo proszę o zmianę słowa „*Zaszczepienie przeprowadzono*” na inokulację przeprowadzono.

✓ **Rozdz. 7.3** zdanie: „*W celu charakterystyki poszczególnych gatunków i odmian dojrzałych zbóż wyróżnia się cechy morfologiczne na podstawie umownych kryteriów dla odpowiednich roślin*”. Co Autorka miała tutaj na myśli? Stwierdzenie jest nie jasne, proszę o wyjaśnienie.

✓ **Str. 64 tabela 16**, pierwsza kolumna jest- Cecha, powinno być Gatunek, kolumna druga jest- Cecha, powinno być Forma

✓ **Str. 65** zdanie: „*Po zbiorze dokonano pomiarów biometrycznych 30 roślin z poletka obejmujących: wysokość rośliny, liczba źdźbeł, liczba kłosów, długość kłosa, liczba ziaren w kłosie oraz masa tysiąca ziaren w próbach inokulowanych i kontrolnych (PN, 2007)*”. Proszę o wyjaśnienie czy liczba kłosów była liczona z jednej rośliny czy z 1 m^2 ? Jeśli z rośliny to nie ma to najmniejszego sensu. Jeśli zaś Doktorantka liczyła zagęszczenie kłosów na powierzchni 1 m^2

to ma to sens, gdyż zagęszczenie łanu wpływa na jego wilgotność i rozwój chorób grzybowych, w tym fuzariozy kłosa.

- ✓ **Str. 65 zdanie:** „Ziarno zbóż zebrane w latach” powinno być Ziarno zbóż zebrane
- ✓ **Str. 69:** niefortunne sformułowane zdanie „Pozyskane z ziarna zbóż ekstrakty związków fenolowych analizowano pod kątem zawartości związków fenolowych ogółem stosując zmodyfikowaną metodę spektrofotometryczną, którą zaadoptowano na warunki chromatografii cieczowej”. Powinno być: Pozyskane z ziarna zbóż ekstrakty analizowano pod kątem zawartości związków fenolowych ogółem stosując zmodyfikowaną metodę spektrofotometryczną, którą zaadoptowano na warunki chromatografii cieczowej”. **Kolejne zdanie:** „Całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach (trzy powtórzenia na obróbkę)” - zamiast **trzy powtórzenia na obróbkę** proszę napisać oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Zdanie: „Roztwór podstawowy 2 mm ABTS^{•+} zawierający 3,5 mm siarczanu (VI) potasu...”, proszę podać poprawnie jednostkę, bowiem w tym zapisie mamy do czynienia z milimetrami. Czy Doktorantka miała na myśli ml czy µl czy mmol?

- ✓ **Str. 70 zdanie:** „Przygotowania ekstraktów z ziarna zbóż przeprowadzono zgodnie z protokołem analitycznym opisanym w publikacji na rysunku 18 (Ostrowska Kołodziejczak i inni, 2016). Stwierdzenie i cytowanie są niepoprawne, powinno być: Przygotowanie ekstraktów z ziarna zbóż przeprowadzono zgodnie z protokołem analitycznym opisanym przez Ostrowską-Kołodziejczak i in. (2016).
- ✓ **Str. 71, tabela 18,** Doktorantka błędnie zalicza do kwasów fenolowych wanilinę, nie jest to kwas a aldehyd, nazwa kwasu p-kumarowy powinno być pisana małą literą p-kumarowy podobnie jak T-cynamonowy. Kwercytyna powinna być zastąpiona kwercetyną.
- ✓ **Str. 72 tabela 19,** kolumna pierwsza- *Patogeny chorobotwórcze*, wystarczy Patogeny, gdyż wg. definicji patogen to mikroorganizm chorobotwórczy.
- ✓ **Str. 72 Akapit 4-** cytuję: „...wprowadzono po 5 cm³ do probówek zawierających 4 cm³ odpowiedniej pożywki i 1 cm³ zawiesiny badanego mikroorganizmu...”. Proszę wyjaśnić jaka była to pożywka, jaki był jej skład i jakie było stężenie zawiesiny badanego mikroorganizmu.
- ✓ **Str. 73** błąd literowy- „test Tuckey’a” powinno być test Tukey’a

Rozdział „**Omówienie i dyskusja wyników**” Autorka przedstawiła na 60 stronach pracy. Zapoznając się z tym rozdziałem pracy doktorskiej dostrzegłam kilka nieścisłości lub błędów, na które z ciężącego na recenzencie obowiązku pragnę zwrócić Autorce uwagę.

✓ **Str. 74 zdanie** „Ziarno kontrolne (naturalnie porażone) oraz ziarno inokulowane zawieszają grzybów z rodzaju *Fusarium*”. Inokulacji poddawano kłosa w fazie kwitnienia a nie ziarno.

✓ **Zdanie:** „Były to 4 szczepy bakterii oraz 5 szczepów grzybów mikroskopowych.” Szkoda, że Doktorantka nie podaje nazw grzybów i bakterii.

✓ **Str. 76 zdanie:** „W przypadku owsa stwierdzono istotne różnice między formą nagoziarnistą i okrytonasienną”. Nie ma owsa okrytonasiennego - jest forma nagoziarnista (albo nieoplewiona) i oplewiona.

Kolejne **Zdanie:** „Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że średnie stężenie związków fenolowych w ziarnie badanych zbóż jest cechą gatunkową, natomiast różnice na poziomie odmianowym mogły być wynikiem zróżnicowanej odporności odmianowej na działanie czynników stresogennych”. Czy zróżnicowana odporność odmian wynika ze zróżnicowanej koncentracji związków fenolowych czy koncentracja ta jest następstwem zróżnicowanych mechanizmów odpornościowych? Innymi słowy, czy Autorka odnosi się tu do odporności przedinfekcyjnej czy poinfekcyjnej?

✓ **Str. 76, rysunek 20** proszę wyjaśnić co oznaczają słupki na seriach danych? Czy to jest odchylenie standardowe czy błąd średniej a może inna miara zmienności? Doktorantka podaje również, że wykres przedstawia aktywność przeciwutleniającą 10 form - doliczyłam się 11. W kolejnych wykresach występuje ten sam błąd. W mojej opinii wykres byłby bardziej czytelny jeśli byłyby zaznaczone literami słupki na których wystąpiły tylko istotne różnice a nie wszystkie, Dotyczy to pozostałych wykresów również.

✓ **Str. 82 rysunek 24, 25, 26, 27** Rysunki przedstawiają procentowy udział kwasów fenolowych w ziarnie zbóż a nie jak podaje Doktorantka „Profil ilościowy kwasów fenolowych...”

✓ **Str. 84** Naringenina i kwercetyna nie są kwasami fenolowymi a flawonoidami.

✓ **Str. 85, rysunek 28, 29, 30, 31 podpis.** To nie są „Wykresy rozkładu obszaru...” ale, jak można się domyśleć, biploty prezentujące wyniki PCA. Podpisy wymagają sprecyzowania i poprawy.

✓ **Pod rys. 31, 32 (str. 86, 87)** nie potrzebne są skróty, zostały one umieszczone na początku pracy

✓ **Str. 88** nigdy nie odnosimy temperatur ani opadów do wartości z wielolecia w procentach, zawsze w jednostkach naturalnych ($^{\circ}\text{C}$ lub K i mm).

- ✓ **Rozdz. 8.2.2.** Tytuł powinien brzmieć „Ocena elementów struktury plonu”.
- ✓ **Str. 91** wysokość rośliny nie jest cechą plonotwórczą. Zdanie: *”Zauważono, że zboża które poddano inokulacji były często wyższe niż kontrolne”* O ile i dlaczego? Dlaczego nie ma tabeli/rysunku z wartościami tej cechy i wynikami analizy statystycznej. Wysokość roślin i zbitość kłosa odgrywają przecież istotną rolę w przypadku nasilenia objawów FHB.
- ✓ **Str. 92 tabela 22.** Żyto populacyjne i żyto hybrydowe (w języku polskim poprawna nazwa mieszańcowe lub heterozyjne) należą do tego samego gatunku *Secale cereale*. Podobnie poniżej: jęczmień browarny i pastewny to jeden gatunek *Hordeum vulgare* a owies nagoziarnisty i oplewiony należą do gatunku *Avena sativa*. Ponadto drugi człon nazwy choroby piszemy małą literą, np. Mączniak prawdziwy, Rdza brunatna itp. Czy minusy w tabeli oznaczają brak obserwacji czy brak objawów? Jeśli to drugie, to albo powinno podać się 0 albo 1, jeśli 1 oznacza roślinę zdrową.
- ✓ **Rys. 33** błąd literowy w nazwie, jest Haris, powinno być Harris
- ✓ **Rys. 38** żyto *Agrikol* powinno być *Agrikolo*
- ✓ **Str. 97** „parametry były zależne” powinno być wartości parametrów; *„Wielu autorów zauważyło bardzo silny wpływ...”* brak odnośników do literatury.
- ✓ **Str. 98, wiersze 10 i 12 od dołu strony:** oba zdania się wykluczają. Trzeba się zdecydować, czy aktywność antyoksydacyjna była wyższa w roku 2018 czy w roku 2019.
- ✓ **Str. 102** zdanie: *„W zależności od rodzaju rośliny odporność jest różna, ponieważ profil jakościowy i ilościowy związków bioaktywnych jest cechą odmianową”*. Co Autorka rozumie pod pojęciem „rodzaj rośliny”? Czy rodzaj w sensie botanicznym (np. pszenica czy żyto) czy użytkowym czy jakimś innym? A czy odporność nie jest także cechą gatunkową?
- ✓ **Str. 104.** kilkakrotnie powtarzające się zdanie „Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono...”. Styl.
- ✓ **Str. 109** zdanie :” ... mające na celu określić...” powinno brzmieć: mające na celu określenie
- ✓ **Str. 110 w tytule tabeli 25, 26:** „Stężenie poszczególnych związków fenolowych...” brakuje jednostek, nie potrzebne są także skróty pod tabelą.
- ✓ **Str.114. rozdz.8.4.1** W nawiązaniu do stwierdzenia, że: *„...ekstrakty fenolokwasów uzyskane na drodze hydrolizy z ziarna zbóż inokulowanych działały przeciwbakteryjnie wobec wybranych bakterii.”* chciałabym postawić pytanie, czy badano profil metabolitów fuzaryjnych w ziarnie po inokulacji? Fuzaria produkują wiele związków o silnym działaniu

antybiotycznym. Różnice jakościowe i ilościowe koncentracji fenoli między kontrolą a inokulacją faktycznie są, ale nie są jednak aż tak duże. Trudno więc wykluczyć, że mógł tu wystąpić jeszcze jakiś metabolit (metabolity) produkowany przez patogen.

✓ **Str. 116, tabela 27**, MIC (Minimalne stężenie hamujące). Brak aktywności lepiej chyba było oznaczyć (–) a nie (+).

✓ **Str. 123, tabela 28**, odwrotne oznaczenie w porównaniu z tabelą 27: tu (+) oznacza wzrost grzybów mikroskopowych.

✓ **Str. 125 zdanie:** „W przypadku porażenia ziarna zbóż patogenicznymi grzybami mikroskopowym *Sclerotinia sclerotiorum*, który powoduje zgniliznę..”. Proszę podać jaką zgniliznę i czego? Dalej, nie można w odniesieniu do *F. culmorum* i *F. graminearum* używać nazwy rodzaj, bowiem są to dwa odrębne gatunki.

✓ **Str. 126** Określenie „kamperol” proszę zastąpić przez kemferol. Zdanie: „Ponadto apigenina, kemferol charakteryzowały się aktywnością przeciwgrzybiczą, a wrażliwe na jej działanie były chorobotwórcze grzyby tj.: *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae* oraz *T. veigelii* (Zhang i inni, 2002; Saleem i inni, 2010)” jest dość niefortunnie sformułowane. Ponadto dlaczego drożdże piwne (piekarskie) *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) klasyfikowane są do patogenów?

✓ **Str. 128** „wzrost sadzonki” proponuje zastąpić wzrostem rośliny. Ponadto (4 wiersz od dołu strony) w analizie dyskryminacyjnej nie testuje się istotności RÓŻNIC MIĘDZY OBIEKTAMI a istotność SIŁY DYSKRYMINACJI zmiennej. **Na stronie 132** Doktorantka pisze o *wysoce istotnych korelacjach*. Korelacje mogą być tylko silne lub słabe lub może być ich brak. Istotność natomiast testuje się dla współczynnika korelacji. Dla $n=24$ odmian liczba stopni swobody wynosi $n-2$, czyli 22. Dla 22 wartość krytyczna dla prawdopodobieństwa $p<0.01$, uprawniająca do użycia sformułowania "wysoce istotny", jest równa 0.515 a nie 0.80. Ponadto tytuł tabeli 32 (str. 133) jest niepoprawny, bowiem wartości macierzy korelacji nie zależą od poziomu istotności α .

Powyższe uwagi, z których część ma charakter dyskusyjny, nie wpływają na ogólną wartość rozprawy doktorskiej. Gorąco zachęcam do ich uwzględnienia przy przygotowywaniu pracy do druku.

W końcowej części pracy Doktorantka przedstawiła 7 krótko sformułowanych wniosków i podsumowanie wyników badań. Do tej części pracy mam również kilka uwag:

- w mojej opinii wniosek nr 1 jest nieuprawniony - można go postawić jedynie na podstawie wyników oceny istotności interakcji w trzyczynnikowej analizie wariancji. Z tekstu pracy nie wynika, by analiza taka była wykonana.
- We wniosku nr 3 stwierdzenie " w postaci zmasowanej infekcji" proponuje zastąpić sztuczną inokulacją.
- Wniosek nr 4: „Profil jakościowy związków fenolowych dominujących pod względem zawartości w ekstraktach pozyskanych z ziarna inokulowanego jest zróżnicowany w zależności od gatunku i formy użytkowej zboża”. Wyniki przedstawione w tabeli 26 wskazują, że w tym przypadku różnic JAKOŚCIOWYCH nie ma, bowiem u wszystkich 24 form zidentyfikowano wszystkie te same metabolity w liczbie 18.
- Wniosek 7 „Ziarno zbóż zanieczyszczone patogenami jest bogate w związki fenolowe, a ekstrakty z niego pozyskane mogą stać się elementem biologicznych preparatów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym stosowanych w rolnictwie ekologicznym lub integrowanym (nie zintegrowanym, jak napisano!)”. Wniosek jest dość ryzykowny, bowiem warto postawić sobie pytanie, czy inokulujemy zboże patogenem w celu pozyskania z ziarna naturalnych fungicydów? Byłaby to strategia dość kontrowersyjna zarówno z punktu widzenia produkcji roślinnej jako takiej jak i równowagi ekologicznej w agrofitycenozie. Potencjalnie mogło by to być rozwiązanie dla ziarna naturalnie porażonego, które nie nadaje się do spożycia. Wówczas można pokusić się o ewentualne wykorzystanie go do produkcji biopreparatów.

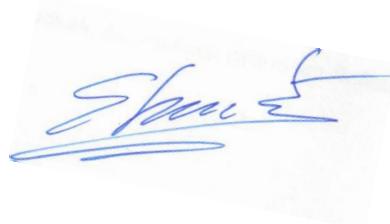
Jako najważniejsze uważam wnioski nr 3 i 5.

PODSUMOWANIE

W mojej opinii przedłożona do recenzji dysertacja, pomimo licznych niestety usterek, jest opracowaniem wartościowym. Doktorantka bezsprzecznie włożyła ogrom pracy w przygotowanie dysertacji i pełne zrealizowanie zamierzonych celów. Rozprawa została przygotowana starannie i napisana językiem niebudzącym większych zastrzeżeń. Wyniki są poprawnie opracowane i czytelnie zaprezentowane. Wyniki Autorka zaprezentowała w estetycznie i przejrzyste wykonane tabelach i rysunkach. Forma opracowania dysertacji świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego.

WNIOSEK KOŃCOWY

Mimo wyrażonych uwag krytycznych i dyskusyjnych, z przekonaniem stwierdzam, iż dysertacja Pani mgr inż. **Anna Przybylskiej-Balcerek** pt. " Właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków fenolowych pozyskanych z wybranych odmian zbóż uprawianych w Polsce" **spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim.** Całość pracy oceniam pozytywnie, albowiem w moim przekonaniu spełnia ona wymóg oryginalnego rozwiązania problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w danej dyscyplinie naukowej. Wnoszę, więc do Komisji Doktorskiej wyznaczonej decyzją Rady Dyscypliny Rolnictwa i Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, o dopuszczenie **mgr inż. Anny Przybylskiej-Balcerek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. inż. Elżbieta Suchowilska, prof. UWM