

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Anny Przybylskiej – Balcerek pt. „Właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków fenolowych pozyskanych z wybranych odmian zbóż uprawianych w Polsce”

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 5 lipca 2019 roku.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wykonana została w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem naukowym dr hab. Kingi Stuper-Szablewskiej, prof. uczelni.

Porażenie roślin uprawnych przez patogeny, zwłaszcza toksynotwórcze, należy do ważnych czynników ograniczających jakość i wielkość plonu. Stąd niezbędne jest stosowanie różnych metod ochrony roślin przed tymi agrofagami. W ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę na możliwość wykorzystania do tego celu substancji pochodzenia roślinnego, co ma związek z wprowadzeniem z dniem 1 stycznia 2014 roku, obowiązku stosowania zasad integrowanej ochrony roślin przez wszystkich profesjonalnych użytkowników. W myśl tych zasad należy do minimum ograniczyć wykorzystanie środków chemicznych mających negatywny wpływ na środowisko. Preparaty zawierające związki bioaktywne, powstałe na bazie ekstraktów pochodzenia roślinnego posiadają wiele pożądanых właściwości, w tym przeciwgrzybowe i przeciwbakteryjne, a także stymulujące odporność roślin na patogeny. Ponadto są bezpieczne dla środowiska, co sprawia że stanowią dobrą alternatywę dla fungicydów chemicznych.

Wśród substancji bioaktywnych szczególne znaczenie mają związki fenolowe, w tym kwasy fenolowe i flawonoidy, występujące w różnych organach roślin, a także w glebie, w której są uprawiane. W przypadku zbóż znaczne ilości tych metabolitów stwierdzono w zewnętrznej warstwie ziarniaków.

W literaturze znajduje się wiele informacji na temat aktywności biologicznej związków fenolowych, która jest związana z ich właściwościami przeciwutleniającymi. Mniej jest natomiast doniesień literaturowych dotyczących mechanizmów oddziaływania tych związków, zwłaszcza kwasów fenolowych występujących w ziarnie zbóż drobnaziarnistych, wobec szkodliwych mikroorganizmów, w tym grzybów patogenicznych dla roślin.

W wyniku oddziaływania czynników stresowych, w tym porażenia przez patogeny, w komórkach roślinnych następuje znaczny wzrost biosyntezy związków fenolowych. Odporność roślin na zakażenie związana jest między innymi ze zdolnością do syntezy kwasów fenolowych, które pełnią w komórkach roślinnych funkcję obronną przed atakiem patogena oraz obniżają ryzyko rozwoju chorób infekcyjnych.

Kwasy fenolowe i flawonoidy należą do metabolitów wtórnych roślin wykazujących także pozytywny wpływ na ludzkie zdrowie. Jako naturalne przeciwutleniacze chronią organizm przed stresem oksydacyjnym, a co za tym idzie, przed rozwojem wielu chorób, w tym nowotworowych. Znajdują również zastosowanie w przemyśle kosmetycznym.

W badaniach mających na celu określenie zawartości substancji bioaktywnych w różnorodnym materiale roślinnym, a także właściwości przeciwdrobnoustrojowych tych metabolitów wykorzystywane są różne metody badawcze, które często są modyfikowane i udoskonalane.

W związku z powyższym uważam, że wybór tematyki rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Przybylskiej – Balcerek jest trafny i dobrze wpisuje się w aktualne trendy badawcze.

Tytuł przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej odzwierciedla jej treść i analizowane zagadnienia. Opracowanie liczy 188 numerowanych stron, w tym 33 tabele oraz 58 rycin obejmujących autorskie schematy, wykresy przedstawiające wyniki badań własnych i fotografie. Praca zawiera wszystkie, formalnie wymagane dla rozprawy doktorskiej części i obejmuje następujące rozdziały: Streszczenie wraz ze słowami kluczowymi, Abstract, Wstęp, Przegląd literatury, Cel pracy, Część doświadczalna, Omówienie i dyskusja wyników, Wnioski, Podsumowanie, Bibliografia. W większości rozdziałów wydzielono podrozdziały, co sprawia, że przedstawione treści są uporządkowane. Uważam jednak, że lepszym rozwiązaniem w tego typu opracowaniach jest wydzielenie dyskusji jako odrębnego rozdziału, co daje bardziej przejrzysty i całościowy obraz uzyskanych wyników badań własnych w kontekście osiągnięć innych autorów.

Ponadto w opracowaniu, bezpośrednio po spisie treści, zamieszczono wykaz skrótów, zaś po rozdziale Bibliografia spis rysunków i tabel. Uzupełnienie dokumentacji stanowi suplement zawierający szczegółową tabelę przedstawiającą skład ilościowy i jakościowy wybranych związków fenolowych w ziarnie zbóż uwzględnionych we wstępnym etapie badań oraz dane dotyczące oceny elementów struktury plonu w formie wykresów i fotografii.

W różnych miejscach pracy Doktorantka powołuje się na 316 pozycji literatury zestawionych w rozdziale Bibliografia, z czego blisko 45% stanowią publikacje wydane w ostatnim dziesięcioleciu, co potwierdza aktualność prezentowanych badań.

Pod względem językowym praca wymaga częściowej korekty, bowiem w niektórych fragmentach pojawiają się usterki stylistyczne, skróty myślowe oraz nieprecyzyjne sformułowania, które utrudniają analizę i zrozumienie treści.

We **Wstępie** Doktorantka nakreśla podjętą problematykę badawczą oraz uzasadnia celowość podjętych badań.

Obszerny **Przegląd literatury**, liczący 41 stron, do opracowania którego wykorzystane zostały 233 pozycje piśmiennictwa, wprowadza w tematykę realizowanych badań. W pierwszej części tego rozdziału mgr inż. Anna Przybylska – Balcerek opisuje gatunki zbóż drobnoziarnistych, z których pozyskiwano ekstrakty związków fenolowych do przeprowadzenia kolejnych etapów badań. Informacje te uwzględniają pozycję systematyczną oraz wymagania glebowe i klimatyczne analizowanych gatunków i form użytkowych zbóż, a także strukturę zasiewów, wielkość produkcji oraz kierunki użytkowania. Doktorantka podkreśla także znaczenie zbóż w żywieniu człowieka, zwracając szczególną uwagę na składniki bioaktywne ziarna. W kolejnych podrozdziałach Autorka omawia abiotyczne i biotyczne czynniki stresogenne, w tym porażenie przez patogeny, ze szczególnym uwzględnieniem warunków rozwoju fuzariozy kłosów, której towarzyszy zanieczyszczenie ziarna mykotoksynami. Doktorantka przedstawia także typy odporności zbóż na wybrane patogeny oraz mechanizm stresu oksydacyjnego, jak również charakterystykę związków bioaktywnych występujących w ziarnie zbóż oraz ich rozmieszczenie w ziarniaku.

Ostatnią część rozdziału Przegląd literatury Autorka poświęca charakterystyce kwasów fenolowych i flawonoidów z uwzględnieniem struktury chemicznej, szeregów aktywności przeciwutleniającej oraz szlaków biosyntezy tych związków. Podaje także przykłady oddziaływania związków fenolowych na różne grupy mikroorganizmów chorobotwórczych.

Należy podkreślić, że część informacji Doktorantka przedstawia w formie ciekawych schematów graficznych oraz w tabelach opracowanych według własnej koncepcji, co pozwala na syntetyczną i obrazową prezentację aktualnego stanu wiedzy w zakresie podjętej tematyki badawczej.

Opracowując rozdziały Streszczenie, Wstęp i Przegląd literatury Autorka nie ustrzegła się pewnych uchybień i nieścisłości. Już w Streszczeniu pojawia się stwierdzenie, że określano zawartość związków fenolowych w ziarnie zbóż naturalnie porażonych i inokulowanych grzybami z rodzaju *Fusarium*. Sformułowanie zboża naturalnie porażone, w odniesieniu do roślin z kombinacji kontrolnej jest nieprecyzyjne, bowiem nie określano czy ziarno z tej kombinacji doświadczenia było porażone, czy też nie. Doktorantka wykorzystuje więc skrót myślowy, który sugeruje, że ziarno było porażone, choć nie w wyniku inokulacji kłosów i wiech. Dlatego też właściwym jest jednoznaczne wskazanie, że zawartość związków fenolowych była określana w ziarnie pochodzącym z kombinacji kontrolnej lub z kłosów nieinokulowanych.

Uwaga ta dotyczy także innych części dysertacji, w tym opisu metod badawczych, podpisów do rysunków i tabel, a także wniosków.

W różnych rozdziałach pracy rodzaje *Aspergillus* i *Penicillium* wymieniane są jako przykłady patogenów zbóż, co prawda grzyby te są uznawane za mikroorganizmy szkodliwe ze względu na to, iż wytwarzają szereg mykotoksyn, jednak nie są to grzyby patogeniczne dla roślin zbożowych. Ponadto Autorka wskazuje, że groźnymi patogenami zbóż są bakterie, nie wymienia jednak jakie ma na myśli gatunki, czy chociażby rodzaje tych mikroorganizmów, należy to wyjaśnić.

W Przeglądzie literatury Doktorantka podaje pozycję systematyczną analizowanych gatunków zbóż w oparciu o nieaktualne już informacje, w rozprawie doktorskiej zaleca się wykorzystanie współczesnego systemu klasyfikacji - APG IV (Angiosperm Phylogeny Group 2016). Ponadto Autorka nie wskazuje źródła literaturowego, na podstawie, którego przytoczona została systematyka owsa. Brak także odniesień literaturowych do informacji dotyczących charakterystyki jęczmienia (str. 24) i owsa (str. 25) oraz kierunków użytkowania żyta (str. 28). Autorka nie wyjaśnia również na jakiej podstawie przedstawione zostały wybrane odmiany zbóż w tabelach 2, 4, 5 i 7, jeżeli wybór był losowy, tabele te można pominąć.

W dalszej części Przeglądu literatury, Doktorantka wśród stresów biotycznych wymienia aktywność zwierząt i ludzi, nie podając żadnych szczegółów, sugeruję aby w tym miejscu zwrócić uwagę na żerowanie szkodników roślin. Komentarza i bardziej precyzyjnego sformułowania wymaga także ostatnie zdanie podrozdziału 5.5 (str. 30).

Podrozdział 5.5.1 został zatytułowany „Patogeny zbóż”, jednak Autorka przedstawia w nim informacje dotyczące tylko patogenów należących do rodzaju *Fusarium*, wspominając jedynie ogólnikowo o bakteriach oraz o toksynotwórczych rodzajach *Aspergillus* i *Penicillium* zaliczanych do grzybów saprotroficznych. Mając na uwadze, że przedmiotem badań była ocena wpływu związków fenolowych na rozwój *Fusarium* spp., jest to koncepcja słuszna. W związku z tym proponuję zmianę tytułu podrozdziału 5.5.1 na: Grzyby rodzaju *Fusarium* i ich szkodliwość dla zbóż, oraz połączenie z następnym podrozdziałem 5.5.2, zatytułowanym „Fuzarioza”. Takie scalenie treści pozwoliłoby także na wyeliminowanie powtarzania zamieszczanych informacji. Ponadto w tej części pracy, zbyt dużym uogólnieniem wydaje się być stwierdzenie, że grzyby rodzaju *Fusarium* potrzebują do swojego rozwoju umiarkowanych temperatur i wilgotności, ponieważ wymagania poszczególnych gatunków względem tych parametrów są zróżnicowane, na co wskazuje Autorka w dalszej części rozdziału, w tabeli 9. Ponadto tytuł tabeli nr 9 jest niefortunny, bowiem zamieszczone dane wskazują, że chodzi o warunki sprzyjające rozwojowi wybranych gatunków grzybów powodujących fuzariozę kłosów, a nie ogólnie o warunki meteorologiczne mające wpływ na rozwój fuzariozy. Natomiast na stronie 33

Doktorantka pisze: „Grzyby z rodzaju *Fusarium* najintensywniej porażają zboża w fazie kłoszenia gdyż ilość światła najczęściej jest bardzo duża co ułatwia porażenie i namnażanie się grzybów”, mając na uwadze zacytowaną literaturę wydaje się, że chodzi o fazę kwitnienia, a nie kłoszenia, ponadto informacje dotyczące wpływu ilości światła na rozwój i zdolności infekcyjne grzybów, wymagają doprecyzowania. Proponuję także powołać się na dodatkowe publikacje z ostatnich lat, dotyczące szkodliwości *Fusarium* spp. i ich toksycznych metabolitów.

Wykorzystując po raz pierwszy w tekście pracy lub w tabeli nazwy łacińskie gatunków grzybów, należy przedstawić ich pełne i obowiązujące brzmienie, łącznie z autorami opracowania, wg Index Fungorum, np. *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., natomiast dopiero przy kolejnym wykorzystaniu należy je zapisywać skrótowo - *F. avenaceum*. W przypadku gatunku *Fusarium moniliforme* obecna nazwa to *Fusarium fujikuroi* Nirenberg, zaś *Fusarium nivale* - *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett., w nawiasie można ewentualnie podać synonim nazwy wcześniej używanej. Podobnie należy używać także pełnych nazw rodzajowych bakterii.

W tabeli 10, w obrębie gatunków *F. culmorum* i *F. graminearum*, Autorka wymienia chemotyp II obejmujący szczepy produkujące między innymi związki trichotecenowe z grupy A (T-2 toksyna, DAS), które nie są typowymi metabolitami dla tych grzybów, co prezentuje także Doktorantka na rysunku nr 6. Dlatego też należy wyjaśnić i wyraźnie określić na podstawie jakich źródeł literatury wymienione zostały mykotoksyny charakterystyczne dla chemotypu II w obrębie *F. culmorum* i *F. graminearum*, bowiem w tabeli nr 10 poszczególne pozycje literatury nie zostały dokładnie przypisane do omawianych gatunków i chemotypów grzybów. Wskazana jest zatem korekta ostatniej kolumny tabeli.

Tytuł kolejnego podrozdziału 5.6 „Odporność ziarna zbóż na choroby grzybicze” jest zbyt ogólny i nieprecyzyjnie sformułowany ponieważ przedstawione w nim treści obejmują informacje dotyczące odporności zbóż tylko na porażenie kłosów przez *Fusarium* spp. Ponadto odporność jest na porażenie przez patogeny, a nie na choroby, stąd sugeruję, że tytuł powinien brzmieć: Odporność zbóż na porażenie kłosów przez *Fusarium* spp. Należy także poprawić pierwsze zdanie tego podrozdziału, zamieniając określenie „rozwój fuzariozy w ziarnie zbóż”, na rozwój fuzariozy kłosów i wiech zbóż. Doktorantka zaznacza także, że dotychczas w literaturze opisano cztery typy odporności zbóż na fuzariozę, zaś w piśmiennictwie wymieniana jest różna liczba typów odporności i różne ich przedstawienie, dlatego też bezpieczniejszym rozwiązaniem wydaje się być wykorzystanie stwierdzenia, że w literaturze najczęściej opisywane są następujące typy odporności.

Opisując mechanizm stresu oksydacyjnego (str. 37), Doktorantka w jednym z akapitów używa określenia „stres oksydacyjny występuje wtedy gdy w roślinach w krótkim czasie następuje nadprodukcja wolnych rodników tlenowych”, zamiast wolnych rodników tlenowych należy konsekwentnie używać określenia - reaktywnych form tlenu (RFT).

Na str. 39 Doktorantka zamieszcza informację: „Podczas gdy porażenie komórki patogenem następuje w niewielkim stopniu może dojść do trwałych zmian, a następnie do śmierci tej komórki, gdyż nie było impulsu do uruchomienia naturalnych mechanizmów odpornościowych. Z kolei gdy liczba grzybów mikroskopowych jest istotnie wyższa nasilają się skutki stresu oksydacyjnego, czego konsekwencją jest powstawanie nadmiaru RFT. Wówczas w odpowiedzi na stres komórki roślinne aktywizują antyoksydacyjny mechanizm obronny: enzymatyczny i nieenzymatyczny”, stwierdzenia te stanowią zbyt daleko idące uproszczenie i wymagają komentarza oraz korekty.

Tytuł podrozdziału 5.8.2 „Szlak metaboliczny kwasów fenolowych”, nie jest adekwatny do treści ponieważ Autorka przedstawia tylko biosyntezę kwasów fenolowych bez kolejnych etapów przemian metabolicznych w komórkach roślinnych, bądź zwierzęcych. Sugeruję więc zmianę tytułu tego podrozdziału na: Biosynteza kwasów fenolowych. Podobna uwaga dotyczy podrozdziału 5.8.6 „Szlak metaboliczny flawonoidów”.

Opis przeciwdrobnoustrojowego działania kwasów fenolowych rozpoczyna się od zdania, w którym Autorka wskazuje, że nie ma informacji lub są one szczątkowe na temat właściwości przeciwdrobnoustrojowych kwasów fenolowych, jest to zbyt radykalne spostrzeżenie. Proponuję zmienić ten fragment pod kątem braku danych na temat mechanizmów działania przeciwdrobnoustrojowego, bo takie informacje są bardziej deficytowe. Mechanizm działania kwasów fenolowych nie został dobrze poznany w przeciwieństwie do działania flawonoidów, co Autorka szczegółowo opisuje w stosownym rozdziale cytując najnowszą literaturę.

Ostatni akapit podrozdziału 5.8.4, dotyczący allelopatii, zwłaszcza dwa ostatnie zdania wymagają korekty ponieważ są niejasno sformułowane.

W tekście pracy pojawiają się także niepoprawne określenia jak: „saprophyty” zamiast saprotrofy, „mikoflora” zamiast mykobiota lub ogół grzybów, bowiem grzyby nie są zaliczane do roślin oraz „okrytonasienna forma owsa” zamiast oplewiona. Ponadto powinna być stosowana pisownia mykotoksyny, a nie mikotoksyny. Niewłaściwe jest także użycie w pracy doktorskiej określenia „pleśnie toksynotwórcze”, czy też „pleśnie z rodzaju *Fusarium*” zamiast grzyby toksynotwórcze lub grzyby rodzaju *Fusarium*. W przeglądzie literatury nie wskazane jest również odwoływanie się do wyników badań własnych, jak to ma miejsce na przykład na stronie 53, stwierdzenia te można natomiast wykorzystać w dyskusji wyników.

Po przedstawieniu aktualnego stanu wiedzy w zakresie podjętej tematyki badawczej w rozdziale Przegląd literatury, Autorka przedstawia cel główny oraz cele szczegółowe wyznaczające poszczególne zadania badawcze, a także cztery hipotezy badawcze, które zostały zweryfikowane na podstawie przeprowadzonych doświadczeń polowych i laboratoryjnych. Jednak hipoteza trzecia: „Ekstrakty związków fenolowych pozyskane z naturalnie porażonego ziarna zbóż

nie wykazują działania przeciwdrobnoustrojowego” wymaga wyjaśnienia i ewentualnej korekty. Jak już wspomniałam, nieprecyzyjne jest wykorzystanie określenia „ekstrakty z ziarna naturalnie porażonego”. Ponadto należy przypuszczać, że gdyby ziarno było silnie porażone przez patogeny w warunkach naturalnych, np. w wyniku epidemicznego występowania patogena/patogenów, ekstrakty związków fenolowych z niego uzyskane wykazywałyby podobne działanie, jak ekstrakty z ziarna, z kłosów inokulowanych. Stąd też, nie do końca zrozumiałe jest, co było przesłanką do postawienia hipotezy badawczej w podanej formie. Natomiast w hipotezie czwartej niewłaściwie zapisano: „Ekstrakty związków fenolowych pozyskane z inokulowanego grzybami z rodzaju *Fusarium* ziarna zbóż...”, powinno być ekstrakty pozyskane z ziarna pochodzącego z kłosów inokulowanych, ponieważ to kłosa były sztucznie zakażane w fazie kwitnienia, a więc jeszcze przed wykształceniem ziarna. Doktorantka używa tego określenia również w innych częściach pracy doktorskiej.

Zweryfikowanie postawionych hipotez oraz osiągnięcie założonego celu wymagało zgromadzenia i przygotowania obszernego materiału badawczego oraz przeprowadzenia wielu szczegółowych analiz, z wykorzystaniem różnych metod. Materiał i metody badań opisano w rozdziale zatytułowanym **Część doświadczalna**. Poszczególne etapy badań zostały właściwie zaplanowane, a wykorzystane metody dobrze dobrane, choć przy analizowaniu tego rozdziału nasuwają się pewne uwagi mające na celu uściślenie opisów metod badawczych oraz kwestie wymagające wyjaśnienia, które przedstawiam przy omawianiu kolejnych podrozdziałów.

W pierwszym etapie badań, określonym przez Autorkę opracowania jako badania wstępne, materiał badawczy stanowiły aż 223 próbki ziarna różnych gatunków zbóż, obejmujących formy jare i ozime, pochodzące ze zbiorów w latach 2016 i 2017. Doktorantka podaje, że dokładne informacje na temat prób ziarna zamieszczono w tabeli 1 suplementu, podczas gdy jest to tabela 33 suplementu.

W ekstraktach uzyskanych ze wszystkich próbek ziarna określono zawartość związków fenolowych ogółem (TPC) oraz zawartość 10 kwasów fenolowych i 7 flawonoidów, a także aktywność przeciwutleniającą.

Ten cykl analiz był podstawą do wytypowania 24 genotypów zbóż wykorzystanych w kolejnych etapach badań. Na stronie 59, Autorka wskazuje, że wybrane do badań odmiany różniły się pod względem cech morfologicznych, powołując się na dane zamieszczone w tabeli 15, która nie obejmuje takich informacji, należy to wyjaśnić.

Prezentowane badania obejmują także ściśle doświadczenia polowe z inokulacją kłosów/wiech wybranych genotypów zbóż, mieszaniną infekcyjną pięciu szczepów grzybów, należących do trzech gatunków rodzaju *Fusarium*: *F. culmorum* i *F. graminearum*

(chemotypy NIV i 3AcDON) oraz *F. langsethiae*. Wytypowane do tego cyklu badań genotypy zbóż charakteryzowały się największą zawartością związków fenolowych w ziarnie, określoną w badaniach wstępnych. W ramach badań polowych, każdy z 24 genotypów zbóż, w obu kombinacjach doświadczenia (kontrolna oraz z inokulacją kłosów), wysiewano w trzech powtórzeniach, stąd w każdym roku badań, doświadczenie polowe obejmowało 144 poletka i analogicznie analizowano po 144 próbki ziarna pod kątem oceny cech struktury plonu oraz stężenia związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej. Wskazuje to jak obszerny materiał był przedmiotem szczegółowych badań polowych i laboratoryjnych.

Doktorantka na str. 62 podaje, że badania polowe zostały wykonane w latach 2016-2017. Natomiast z kolejnego rozdziału wynika, że badania te przeprowadzono w latach 2018-2019, co biorąc pod uwagę termin wykonania badań wstępnych, jest informacją właściwą. Należy zatem dokonać korekty w rozdziale Część doświadczalna.

Ponadto w metodzie dotyczącej tej części badań zamieszczona została charakterystyka i pochodzenie szczepów *Fusarium* spp., brakuje jednak wyjaśnienia co zadecydowało o wyborze poszczególnych gatunków i szczepów grzybów do badań polowych i laboratoryjnych.

W opisie materiału infekcyjnego, nazywanego inokulantem, należy użyć określenia szczepy grzybów rodzaju *Fusarium*, a nie izolaty ponieważ zostały one już wcześniej scharakteryzowane. Należy także wskazać, które zarodniki (makro, czy mikrokonidia) stanowiły zawiesinę infekcyjną analizowanych szczepów grzybów. Ponadto w opisie materiału infekcyjnego Doktorantka nie wyjaśnia w jakim celu zastosowano napromieniowanie zainokulowanego ziarna światłem UV (350 nm). Wyjaśnienia wymaga także informacja zamieszczona na str. 64: „Genotypy zaszczepiano na etapie antytezy przez opryskanie kłosów zawiesiną zarodników, przeprowadzoną dla każdego gatunku osobno, w zależności od daty kwitnienia”. Poza tym zamiast „zaszczepiano” wskazane jest używanie określenia inokulowano lub sztucznie zakażano.

W dalszej części tego podrozdziału Doktorantka podaje, że po zbiorze kłosów zarówno z kombinacji kontrolnej, jak i z kombinacji z inokulacją, określono wybrane elementy struktury plonu w celu dokonania pełnej charakterystyki badanych genotypów zbóż. Jednak niezrozumiałe jest porównanie niektórych cech, jak chociażby liczba źdźbeł i kłosów, pomiędzy kombinacjami doświadczenia, bowiem sztuczne zakażanie kłosów w fazie kwitnienia nie mogło wpływać na te parametry. Natomiast słusznie w analizie porównawczej Autorka uwzględniła liczbę ziarniaków w kłosie oraz masę tysiąca ziaren, które są powszechnie wykorzystywane jako elementy oceny wpływu infekcji kłosów zbóż przez patogeny na plon ziarna.

W związku z tym, że w doświadczeniu polowym wykorzystano odmiany owsa, należy zaznaczyć, że inokulowano kłosy i wiechy zbóż, a nie tylko kłosy.

W rozdziale Omówienie i dyskusja wyników znajduje się informacja, że poletka, na których wykonano inokulację kłosów były zraszane, stąd obserwowano większą wysokość roślin w tej kombinacji doświadczenia, aniżeli w kombinacji kontrolnej. Czy to oznacza, że na poletkach kontrolnych roślin nie zraszano? jeżeli tak, to dlaczego nie zapewniono jednakowych warunków wzrostu roślin w obu kombinacjach doświadczenia oraz dlaczego takie informacje nie znalazły się w części dotyczącej metod badawczych.

W rozprawie doktorskiej Doktorantka przedstawia także charakterystykę warunków meteorologicznych w sezonach wegetacji, w których przeprowadzono doświadczenie polowe z inokulacją kłosów i wiech. Charakterystyka ta została uzupełniona dwiema tabelami dotyczącymi średniej dobowej temperatury powietrza i sumy opadów w ujęciu dekadowym oraz w odniesieniu do średnich wieloletnich.

W kolejnym etapie badań, w ekstraktach uzyskanych z ziarna pochodzącego z kłosów kontrolnych (bez inokulacji) i z kłosów inokulowanych, oznaczono zawartość związków fenolowych ogółem (TPC), stężenie 10 kwasów fenolowych oraz 7 flawonoidów, a także określono aktywność przeciwutleniającą.

Proces przygotowania ekstraktów do analizy chromatograficznej UPLC Autorka przedstawia na czytelnym, autorskim schemacie, pozwalającym na prześledzenie poszczególnych etapów postępowania. Zastosowana metoda pozyskiwania ekstraktów jest nowatorska, na uwagę zasługuje połączenie dwóch rodzajów hydrolizy (kwasowej i zasadowej), co pozwala na kompleksowe uwolnienie badanych związków z połączeń wewnątrzkomórkowych.

Na stronie 74 rozdziału Omówienie i dyskusja wyników Doktorantka zaznacza, że: „metodyka ekstrakcji została opracowana w celu pozyskania tylko związków fenolowych z ziarna zbóż, aby na podstawie dalszych badań móc wnioskować o wpływie związków fenolowych na drobnoustroje”, należało taką informację zamieścić w metodyce, podkreślając na czym polegała modyfikacja pozwalająca na ekstrakcję tylko związków fenolowych, gdyż jest to ważny aspekt pracy. Niemniej jednak cennym uzupełnieniem badań byłoby kontrolne oznaczenie zawartości mykotoksyn, zwłaszcza w ekstraktach pozyskanych z ziarna pochodzącego z kłosów inokulowanych *Fusarium* spp.

Do przeprowadzenia analizy ekstraktów z ziarna pod kątem zawartości związków fenolowych ogółem wykorzystano zmodyfikowaną, metodę spektrofotometryczną zaadoptowaną do warunków chromatografii cieczowej UPLC. Doktorantka w opisie metody podaje: „Całkowitą zawartość polifenoli w ekstraktach (trzy powtórzenia na obróbkę) wyrażono jako mg równoważników kwasu galusowego na kilogram (mg GAE/kg)...” i w takich jednostkach zamieszcza dane na rysunkach 42 i 43, natomiast na rysunku nr 21 oraz w tabelach 23 i 24 podaje TPC w mg/kg, opis metody jednak nie wyjaśnia tej kwestii.

Zaprezentowane w pracy badania obejmowały także oznaczanie aktywności przeciwutleniającej ekstraktów pozyskanych z ziarna zbóż metodą z kationorodnikami ABTS⁺⁺, przy czym drugie zdanie opisu tej metody wymaga korekty stylistycznej.

W podrozdziale 7.4.3 „Oznaczanie zawartości związanych kwasów fenolowych i flawonoidów” Doktorantka pisze: „Analizę zawartości kwasów fenolowych...”, „pomiar stężenia kwasów fenolowych...”, pomijając flawonoidy, przy czym tabela 18, dotycząca czasów retencji oraz wskaźników odzysku obejmuje zarówno kwasy fenolowe, jak i flawonoidy, choć tytuł tej tabeli wskazuje inaczej. Powstaje zatem pytanie, czy tylko omyłkowo zapisano kwasy fenolowe zamiast związki fenolowe, czy też metoda jest niedostatecznie precyzyjnie opisana.

Należy uszczegółowić również opis tabeli 17, bowiem brakuje rozwinięcia składu faz i jednostki.

Ekstrakty związków fenolowych uzyskane z ziarna analizowanych genotypów zbóż pochodzącego zarówno z kłosów kontrolnych, jak i inokulowanych zostały wykorzystane w następnym etapie do przeprowadzenia badań mikrobiologicznych. Skuteczność przeciwdrobnoustrojową analizowanych ekstraktów ustalano poprzez określenie działania hamującego (MIC - Minimum Inhibitory Concentration) oraz bójczego (MBT – Minimum Bactericidal Concentration) metodą zawiesinową. Przy określaniu właściwości przeciwgrzybowych proponuję wykorzystać określenie MFC - Minimum Fungicidal Concentration. Warto także rozważyć, czy zamiast określenia bójcze, nie wykorzystać grzybobójcze i bakteriobójcze.

W badaniach mikrobiologicznych wykorzystano szczepy czterech gatunków bakterii: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis* oraz pięć szczepów grzybów należących do trzech gatunków rodzaju *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. graminearum* oraz *F. langsethiae*, reprezentujących różne chemotypy, przy czym nie podano co było kryterium doboru mikroorganizmów do tej części badań. Ponadto należy zapisać, że w analizach mikrobiologicznych wykorzystano wybrane gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, a także wybrane bakterie..., a nie jak podaje Autorka na str. 72, „analizy mikrobiologiczne przeprowadzono na wybranych toksynotwórczych gatunkach pleśni z rodzaju *Fusarium* ssp., a także na wybranych bakteriach patogennych i psujących żywność”.

W metodzie dobrze byłoby zamieścić dodatkowe informacje dotyczące przygotowania ekstraktów do analiz mikrobiologicznych, w tym wyjaśnienie czy w badaniach wykorzystano ekstrakty uzyskane z prób mieszanych ziarna, czyli pochodzących z obu lat badań, czy też z jednego roku oraz w jakim zakresie stężeń ekstraktów były prowadzone badania mikrobiologiczne.

Ponadto na str. 72 Autorka wskazuje: „W tym celu przygotowano serię rozcieńczeń dla analizowanych ekstraktów w sterylnej wodzie dejonizowanej i wprowadzono po 5 cm³ do probówek zawierających 4 cm³ odpowiedniej pożywki i 1 cm³ zawiesiny badanego

mikroorganizmu, aby końcowa gęstość komórek wynosiła $10^7/\text{cm}^3$, a stężenie preparatu mniejsze o połowę”, należy wyjaśnić jaka pożywka była odpowiednia dla analizowanych bakterii i grzybów (należy podać skład pożywki/pożywek). Natomiast w dalszej części Doktorantka pisze: „Próbki inkubowano przez 72 godziny w 37 °C”, nasuwa się więc pytanie czy dla wszystkich badanych mikroorganizmów była to temperatura odpowiednia, zwłaszcza dla grzybów rodzaju *Fusarium*. Autorka podaje także: „Po inkubacji w odpowiednich dla danych gatunków warunkach, obserwowano wzrost drobnoustrojów”, należy wskazać jakie były warunki odpowiednie dla analizowanych mikroorganizmów, chociażby w zakresie temperatury i dostępu światła. Ponadto opis metody nie wyjaśnia jednoznacznie, czy doświadczenia dotyczące oddziaływania ekstraktów na wybrane mikroorganizmy obejmowały wariant kontrolny. Zabrakło także odwołania do literatury, w której znajduje się opis wykorzystanej metody zawiesinowej, dane te należy uzupełnić.

Uzyskane wyniki badań w większości zostały opracowane statystycznie, choć w niektórych przypadkach dokumentacja dotycząca obliczeń statystycznych jest niekompletna.

Kończąc analizę tej części pracy chcę podkreślić, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej były wielokierunkowe i niezwykle pracochłonne, wykorzystano w nich nowatorskie i zmodyfikowane metody chemiczne, co niewątpliwie wiązało się z koniecznością poszerzania wiedzy w tym zakresie oraz przeprowadzenia dodatkowych analiz.

Kolejny rozdział **Omówienie i dyskusja wyników** obejmuje 59 stron, łącznie z 26 rysunkami i 12 tabelami, dodatkowo 1 tabelę i 12 rysunków zamieszczono w suplemencie.

Wyniki badań oparte o bogaty materiał dowodowy wskazują, że Doktorantka osiągnęła założony cel badań. Za najważniejsze rezultaty należy uznać:

- określenie zawartości związków fenolowych ogółem oraz stężenia wybranych kwasów fenolowych i flawonoidów w ekstraktach z ziarna głównych gatunków zbóż uprawianych w Polsce, a tym samym wskazanie ziarna jako bogatego źródła polifenoli,
- wykazanie różnic pomiędzy analizowanymi gatunkami i genotypami zbóż pod względem zawartości związków fenolowych w ziarnie,
- udowodnienie, że porażenie kłosów i wiech zbóż przez grzyby rodzaju *Fusarium* w fazie kwitnienia indukuje biosyntezę związków fenolowych w ziarnie,
- wykazanie, że układ ilościowy i jakościowy związków fenolowych, syntetyzowanych przez roślinę w wyniku infekcji kłosów i wiech przez *Fusarium* spp., jest charakterystyczną dla gatunku zboża odpowiedzią rośliny na działanie patogenów,
- ustalenie, że ekstrakty związków fenolowych uzyskane z ziarna zbóż pochodzącego z kłosów nieinokulowanych *Fusarium* spp., wzrastających w analizowanych warunkach uprawy,

w badanym przedziale stężeń nie wykazywały działania ograniczającego rozwój analizowanych szczepów bakterii i grzybów,

- wykazanie, że aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybowa ekstraktów związków fenolowych, uzależniona jest nie tylko od ogólnej zawartości tych metabolitów, ale także od składu jakościowego i ilościowego wybranych kwasów fenolowych i flawonoidów.

Uzyskane wyniki badań można uznać za interesujące, zwłaszcza że za główne źródło związków fenolowych uznaje się zwykle inne surowce roślinne, zwłaszcza czerwone i fioletowe formy użytkowe warzyw i owoców.

Jednak analiza tej części rozprawy doktorskiej skłania do wskazania uwag i sugestii, które zamieszczono poniżej.

W rozdziale Omówienie i dyskusja wyników, na początku każdego podrozdziału niepotrzebnie przytaczane są informacje dotyczące materiału i metod badawczych.

W pierwszej części tego rozdziału, Doktorantka dokładnie opisuje profil jakościowy i ilościowy związków fenolowych w ekstraktach z ziarna poszczególnych gatunków zbóż odnotowując różnice pomiędzy formami jarymi i ozimymi. Jednak kolejność omawiania wyników badań dotyczących poszczególnych zbóż powinna być zgodna z kolejnością zamieszczania danych na rysunkach i w tabelach.

Na stronie 76, Doktorantka wskazując na istotne różnice pomiędzy badanymi formami użytkowymi zbóż pod względem zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów, między innymi pomiędzy formą jarą, a ozimą pszenżyta i żyta oraz pomiędzy formą nagoziarnistą i oplewioną owsa, nie powołuje się na dokumentację w zakresie danych statystycznych, upoważniającą do stwierdzenia istotności różnic, tak jak jest to przyjęte w pracach naukowych. Jeżeli analiza statystyczna w tym zakresie nie została przeprowadzona, można jedynie wskazać na większą lub mniejszą zawartość wspomnianych związków w ekstraktach z ziarna poszczególnych genotypów lub form użytkowych zbóż. Podobna uwaga dotyczy opisu zawartości niektórych związków fenolowych w ziarnie poszczególnych gatunków zbóż (str. 78-81 i 88) oraz różnic pomiędzy latami badań w zakresie aktywności przeciwutleniającej analizowanych genotypów zbóż (str. 98).

Bezpośrednio pod rysunkami 24-27 warto zamieścić objaśnienia skrótów kwasów fenolowych i flawonoidów, co ułatwiłoby analizę danych. Natomiast rysunki 24 i 25, opatrzone zostały podpisem „(kwas ferulowy x10)”, w kontekście tego, że na wykresach zamieszczono procentowy udział poszczególnych kwasów fenolowych, zapis ten wymaga wyjaśnienia.

Wyniki pierwszego etapu badań wskazują, że ziarno zbóż jest bogatym źródłem kwasów fenolowych i flawonoidów. Na podstawie uzyskanych wyników analiz chemicznych i analizy statystycznej stwierdzono, że zawartość związków fenolowych jest czynnikiem różnicującym poszczególne zboża zarówno na poziomie międzygatunkowym, jak i pomiędzy formami

użytkowymi. Uzyskane w tym etapie badań wyniki zostały przedstawione dla poszczególnych gatunków zbóż oraz skonfrontowane z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów.

Jednak dokumentacja analizy dyskryminacyjnej, na którą Autorka powołuje się w tekście pracy jest niekompletna ponieważ brakuje informacji dotyczących siły dyskryminacyjnej dla poszczególnych gatunków zbóż. Rysunki, na które powołuje się Autorka, przedstawiają siłę dyskryminacyjną łącznie dla wszystkich składowych populacji (wszystkich zbóż), więc zaprezentowane wnioskowanie nie może zostać dokonane tylko na podstawie przytoczonych rysunków 30 - 31. Należy to uzupełnić i wyjaśnić.

Kończąc opis analizy dyskryminacyjnej, na str. 88 Doktorantka pisze, że „wybrane do dalszych etapów badań odmiany cechowały się wysoką zawartością związków fenolowych i stosunkowo wysoką odpornością na choroby grzybowe”, powstaje zatem pytanie na jakiej podstawie stwierdzono, że odmiany cechowały się stosunkowo wysoką odpornością roślin na porażenie przez patogeny.

W podrozdziale 8.2.2 Autorka pisze: „Warunki pogodowe opisane w podrozdziale Ocena cech struktury plonu, przyczyniły się do niskiego stopnia porażenia roślin, a co za tym idzie występowanie chorób o etiologii grzybowej obserwowano na niskim poziomie w przypadku roślin inokulowanych, natomiast w przypadku większości prób kontrolnych nie stwierdzono objawów chorobowych (Tabela 22)”, należy odnieść się do braku objawów porażenia roślin przez różne patogeny tylko w kombinacji kontrolnej. Wyjaśnienia wymaga także na jakiej podstawie dobrano terminy przeprowadzenia oceny zdrowotności oraz na jakich organach roślin obserwowano występowanie objawów i oznak etiologicznych chorób uwzględnionych w tabeli 22. Wskazane jest również podanie źródła literaturowego, w którym została scharakteryzowana wykorzystana skala porażenia, zwłaszcza że opis wspomnianej skali jest nieprecyzyjny. Ponadto zastanawiające jest dlaczego w tabeli tej przedstawiono wyniki tylko z 2018 roku, jeżeli w 2019 roku nie notowano występowania chorób powodowanych przez grzyby, należało to wyraźnie zaznaczyć w tekście.

Na podstawie badań polowych z inokulacją kłosów i wiech wykazano zróżnicowaną reakcję analizowanych genotypów zbóż na porażenie przez badane szczepy grzybów rodzaju *Fusarium*. U badanych genotypów zanotowano obniżkę masy 1000 ziaren w porównaniu do kontroli, choć nie we wszystkich przypadkach różnica ta była statystycznie istotna. Nie wykazano natomiast redukcji liczby ziarniaków w kłosach/wiechach w wyniku inokulacji przez *Fusarium* spp., a w niektórych przypadkach była ona wyższa w porównaniu z kontrolą. W komentarzu do tych wyników badań Autorka pisze: „Oprócz tego, że stres oksydacyjny wywołany czynnikiem biotycznym wpłynął na większą liczebność ziaren to dodatkowo miał również istotny wpływ na masę tysiąca ziaren”, stwierdzenie to wymaga dodatkowych wyjaśnień.

Badania polowe połączone z analizą chemiczną ekstraktów z ziarna pozyskanego z kłosów/wiech wzrastających w kombinacji kontrolnej oraz w kombinacji z inokulacją *Fusarium* spp. wykazały także wpływ sztucznego zakażenia na skład wybranych związków fenolowych.

Interpretując uzyskane wyniki badań (na str. 97), Autorka stwierdza: „W literaturze przedmiotu znajdują się liczne doniesienia na temat niekorzystnego wpływu czynników stresogennych biotycznych i abiotycznych (Jaczeńska-Kalicka, 2008; Kryczyński i Weber, 2011; Pietrusińska i inni, 2019)”, jednak nie określa na co wpływają wymienione czynniki stresogenne, należy to uzupełnić. Nieuzasadnione jest także powołanie się w tym miejscu na pozycję podręcznikową. Ponadto Doktorantka słusznie zwraca uwagę na wpływ temperatury i opadów na rozwój chorób powodowanych przez grzyby rodzaju *Fusarium*, a także na zawartość mykotoksyn w ziarnie, jednak uzupełnienia wymaga literatura w tym zakresie.

Nieuzasadnione jest także wydzielenie podrozdziału 8.2.3. Ponadto w podrozdziale tym, na str. 97 Autorka stwierdza, że ilość i rodzaj przeciwutleniaczy w roślinach zależy między innymi od miejsca wzrostu, nasłonecznienia i okresu, w którym zebrano plony. W związku z tym, że Doktorantka nie informuje o prowadzeniu obserwacji w zakresie nasłonecznienia oraz nie podaje terminów zbioru kłosów, ani też nie przedstawia odwołania do piśmiennictwa, nasuwa się pytanie czy są to stwierdzenia oparte o wyniki badań własnych, czy też zostały zaczerpnięte z analizowanej literatury.

Omówienie wyników zaprezentowanych na rysunkach 40 i 41, w zakresie porównania danych w latach 2018 i 2019, wymaga weryfikacji, bowiem niektóre dane przedstawione na wykresach odbiegają od informacji zawartych w opisie. Ponadto podpisy do tych rysunków nie zawierają jednostek, w których określono aktywność przeciwutleniającą ekstraktów, a zastosowanie różnych podziałek na osi X w poszczególnych latach utrudnia analizę wyników. Brakuje także jednostek, w jakich podano stężenie ekstraktów w tabelach 25 i 26.

Należy także zwrócić uwagę na kolejność zamieszczania danych na rysunkach (40 – 43) i w tabelach (23-28), powinny one być pogrupowane gatunkami i formami użytkowymi, a odmiany poszczególnych gatunków zbóż powinny zostać zamieszczone alfabetycznie. W porządku alfabetycznym należało także wymieniać analizowane gatunki zbóż i w takiej kolejności je omawiać, bowiem właściwe uporządkowanie danych w tabelach znacznie ułatwia analizę wyników badań. Wymieniona część dokumentacji wymaga więc korekty.

Na stronie 102, Autorka zwraca uwagę: ”W zależności od rodzaju rośliny odporność jest różna, ponieważ profil jakościowy i ilościowy związków bioaktywnych jest cechą odmianową. Fakt ten jest istotną składową odporności zbóż na choroby grzybowe, gdyż związana jest z zawartością związków fenolowych, które wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe” -

zarówno styl, jak i treść wymagają korekty, bowiem z zamieszczonego zapisu ostatecznie nie wiadomo, czy odporność zależy od rodzaju rośliny, czy też od odmiany.

Występują również rozbieżności pomiędzy opisem uzyskanych wyników badań własnych (str. 114), a danymi zawartymi w tabeli, i tak w tekście podano, że MBC dla ekstraktu z ziarna jęczmienia odmiany Argento wynosi 1,0%, natomiast z ziarna pszenżyta odmiany Palermo 0,74%, zaś z tabeli 27 wynika, że MBC wynosiło odpowiednio 0,74% i 0,1%. Na tej samej stronie błędnie zapisano także owsa browarnego zamiast jęczmienia browarnego.

Na stronach 114, 115, 120, 121 Doktorantka omawia wpływ fenolokwasów na wzrost wybranych mikroorganizmów, z wcześniejszych rozdziałów wynika jednak, że ekstrakty zawierały także flawonoidy, jak zatem należy interpretować przedstawione wyniki badań? Weryfikacji wymagają również stwierdzenia podsumowujące zamieszczone na stronach 115 (ostatnie zdanie), 121 (ostatnie zdanie drugiego akapitu, wiersze 18-20), a także 122 (ostatnie zdanie) ponieważ niejasne jest na jakiej podstawie zostały sformułowane.

W dyskusji wyników, na str. 125 Doktorantka pisze: „W przypadku porażenia ziarna zbóż patogenicznymi grzybami mikroskopowym *Sclerotinia sclerotiorum*, który powoduje zgniliznę, skuteczne działanie wykazały preparaty zawierające kwasy chlorogenowy i ferulowy”- styl tego zdania wymaga korekty, należy także zamieścić odwołanie do literatury, z której zaczerpnięto podane informacje, zwłaszcza, że *S. sclerotiorum* nie jest typowym patogenem identyfikowanym w ziarnie zbóż. Ponadto na kolejnej stronie Autorka niewłaściwie podaje „rodzina Candida” zamiast rodzaj *Candida* oraz „rodzaj zboża” zamiast gatunek (str.127).

W przypadku oceny właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybowych analizowanych ekstraktów proponuję sformułowanie pewnych uogólnień, na przykład wytypowanie ekstraktu, który okazał się najbardziej efektywny w ograniczaniu rozwoju wszystkich bakterii, a który wszystkich szczepów grzybów lub też ogólnie wszystkich badanych mikroorganizmów oraz wskazanie jakie były charakterystyczne, dominujące związki fenolowe dla tych preparatów. Takie stwierdzenia ułatwiłyby interpretację wyników badań własnych na tle osiągnięć innych autorów.

Korekty językowej wymaga fragment zamieszczony przez Autorkę na stronie 128: „Analizę statystyczną wykonano tylko dla analiz chemicznych prób ekstraktów ziarna inokulowanego. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę dyskryminacyjną (SLDA) mającą na celu wykazanie między profilem związków fenolowych ekstraktów pochodzących z inokulowanego ziarna 5 gatunków zbóż. Niniejsza analiza wykazała, że na podstawie badanych związków poszczególne ekstrakty różnicują się w sposób istotny w zależności od gatunku zboża”, ponadto to nie ziarno było inokulowane, a kłosa.

W opisie analizy dyskryminacyjnej dla kwasów fenolowych (str. 130) pojawia się nieścisłość, bowiem wg rysunku 45, czwartą grupę stanowią ekstrakty z ziarna pszenżyta i owsa, a nie jak wskazuje Autorka, pszenżyta i jęczmienia.

Doktorantka zdecydowała się na połączenie wyników badań z dyskusją, do opracowania której wykorzystala 97 pozycji literatury. Większość uzyskanych wyników badań własnych została skonfrontowana z osiągnięciami innych autorów. Jednak dyskusja w niektórych miejscach wymaga zmian redakcyjnych, ze względu pojawiające się powtórzenia, których można byłoby uniknąć wydzielając tę część pracy jako odrębny rozdział.

Ponadto ciekawym uzupełnieniem dyskusji, dotyczącym zawartości kwasów fenolowych i flawonoidów w ziarniakach zbóż, byłoby zinterpretowanie uzyskanych wyników w kontekście zawartości badanych związków w różnych organach, innych gatunków roślin, np. porównanie z owocami, warzywami, czy roślinami zielarskimi. Należy także zamieścić komentarz wyjaśniający dlaczego ekstrakty pozyskane z ziarna pochodzącego z kombinacji kontrolnej (bez inokulacji kłosów) nie wykazywały działania przeciwdrobnoustrojowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka formułuje 7 **wniosków**, które nawiązują do postawionego celu, przy czym wniosek drugi jest mało czytelny i wymaga wyjaśnienia w zakresie istotności różnic pomiędzy genotypami w obrębie gatunku. Natomiast wniosek piąty wymaga korekty stylistycznej, bowiem ekstrakty nie wykazują działania przeciwdrobnoustrojowego na badanych szczepach grzybów i bakterii, tylko wobec lub w stosunku do szczepów grzybów i bakterii. Wniosek siódmy jest dyskusyjny i powinien zawierać rozwinięcie w postaci uwagi, że ewentualne wykorzystanie ekstraktów z ziarna porażonego przez patogeny w ochronie roślin wymaga dodatkowych badań, między innymi w zakresie doboru stężenia związków fenolowych w preparatach przeznaczonych do stosowania na roślinach, jak również pod kątem obecności innych metabolitów, które mogą wykazywać działanie fitotoksyczne.

Ponadto Doktorantka wydzieliła rozdział **Podsumowanie**, który można pominąć, zwłaszcza, że przedstawione zostały wnioski wypływające z przeprowadzonych badań, a na początku rozprawy zamieszczono streszczenie obejmujące najważniejsze aspekty pracy. Decydując się na pozostawienie tego rozdziału należy zweryfikować kolejność zamieszczania informacji.

W rozdziale **Bibliografia** Autorka zamieszcza wykaz publikacji obejmujący 319 pozycji literatury, przy czym przedstawione zostały publikacje Miller i in. 1999 oraz Tajrin 2013, na które Doktorantka nie powołuje się w tekście pracy. Natomiast w tekście rozprawy znajduje się odwołanie do publikacji Millard i in. 1996, której nie zamieszczono w Bibliografii, zaś publikacja Zieliński i Michalska 2007 została wykazana dwukrotnie. Weryfikacji wymaga również kolejność zamieszczania w spisie literatury prac tego samego pierwszego autora.

W Bibliografii Doktorantka posługuje się zarówno pełnymi, jak i skróconymi nazwami czasopism, właściwym byłoby zachowanie jednolitego sposobu zamieszczania danych bibliograficznych. Należy także zwrócić uwagę na poprawność skrótów nazw czasopism. Ponadto w niektórych przypadkach Autorka nie wymienia czasopisma, w którym ukazał się artykuł lub też nazwy wydawnictwa, w przypadku pozycji książkowych (Chelkowski 2013, Kryczyński i Weber 2011, Kurt i Rosentrater 2018, Przybylska-Balcerek i in. 2019b, Tratwal i in. 2017, Wiewióra 2010). Natomiast przy pozycji Iwagawa i in. 1990 brakuje nazwisk pozostałych autorów publikacji. Uzupełnienia i korekty wymagają także dane bibliograficzne dotyczące pracy Kiecana i in. 2005 oraz Kiecana, Mielniczuk 2010.

Występują także rozbieżności pomiędzy cytowaniem autorów w tekście pracy, a informacjami w zamieszczonych w Bibliografii, nie jest więc jasne czy na pewno chodzi o te same pozycje literatury, i tak w tekście podano: Kraujutiene i Soroka, 2010 (str. 20), zaś w spisie jest Kraujutiene i in., 2010; Łysoń i inni, 2016 (str. 21) – w spisie Łysoń i Biel 2016; Piotrowska(a) i inni, 2007; Piotrowska(b) i inni, 2008 (str. 31) – w spisie są pozycje Piotrowska i Żakowska 2007 i 2008, bez oznaczeń a i b; Pavlova i inni, 1997 (str. 32) - w spisie Pavlova i Srobarova 1997; Dubas i in. 1997 (str. 64) – w spisie Dubas i Gładysiak 1997; Wijngaard i in. 2010 (str. 69) - w spisie Wijngaard i Brunton 2010; Shahidi i in. 2016 (str. 79) – w spisie Shahidi i Yeo 2016; Szajdek i in. 2004 (str. 81) – w spisie Szajdek i Borowska 2004; Wiśniewska i in. 2005 (str. 101) - w spisie Wiśniewska i Kowalczyk 2005; Bremmer i in. 1998 (str. 120) – w spisie Bremmer i Meyer 1998; Rahman i in. 2002 (str. 120) – w spisie Rahman i Gray 2002.

Ponadto w różnych częściach pracy doktorskiej Autorka niepotrzebnie stosuje podwójne odwołania do cytowanej literatury wymieniając autorów na początku i na końcu zdania, np. „Atanasova-Pénichon i in. (2016) zauważyli, że ... (Atanasova-Pénichon i inni, 2016)”.

W podsumowaniu stwierdzam, że Pani mgr inż. Anna Przybylska-Balcerek wykazała się wiedzą w zakresie podjętej tematyki badawczej oraz znajomością piśmiennictwa i metod badawczych, co świadczy o Jej przygotowaniu do pracy naukowej.

Należy podkreślić, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej obejmowały obszerny materiał badawczy, który był analizowany w kolejnych etapach doświadczeń. Wykonane zostały zarówno badania polowe, jak i laboratoryjne, które były niezwykle pracochłonne i wymagały od Doktorantki opanowania różnych technik badawczych. Realizacja tak szerokich i wieloetapowych badań, w ciągu tylko czteroletniego okresu, nie byłaby możliwa bez dużego zaangażowania, a także determinacji i systematyczności działania, co jest niezbędne w rozwiązywaniu problemów naukowych.

Rozprawa ma charakter pełnego opracowania, zawiera wartościowe dla nauki wyniki oraz prezentuje nowatorskie rozwiązania w zakresie metod badawczych.

Zaprezentowane w pracy doktorskiej wyniki badań stanowią źródło informacji dotyczących zawartości związków fenolowych w ziarnie poszczególnych genotypów zbóż oraz ich aktywności przeciwutleniającej, jak również na temat reakcji badanych odmian na porażenie kłosów przez *Fusarium* spp., określonej na podstawie analizy elementów struktury plonu oraz stężenia związków fenolowych w ziarnie. Wiedza ta może być wykorzystana w praktyce, zarówno przez specjalistów z zakresu hodowli zbóż w celu poprawy cech jakościowych ziarna oraz odporności roślin na patogeny i inne czynniki stresowe, jak również przez producentów zbóż podczas doboru genotypów do uprawy, w zależności od kierunku użytkowania ziarna. Natomiast ewentualne wykorzystanie ekstraktów z porażonego przez patogeny ziarna zbóż w ochronie roślin jest kwestią dyskusyjną i z pewnością wymaga dodatkowych badań. Przy czym należy zaznaczyć, że można jedynie rozważać możliwość wykorzystania do tego celu, ziarna silnie porażonego w warunkach naturalnej infekcji, a nie w wyniku celowej inokulacji kłosów zbóż.

Wykazane w recenzji uchybienia i sugestie nie obniżają istotnie merytorycznej wartości pracy, w wielu miejscach mają charakter redakcyjny bądź uściślający, a niekiedy dyskusyjny i mogą zostać wyjaśnione podczas publicznej obrony, a także zweryfikowane przy przygotowaniu pracy do druku w czasopiśmie naukowym.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca pt. „Właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków fenolowych pozyskanych z wybranych odmian zbóż uprawianych w Polsce” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami, a także w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz. 261). Składam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Przybylskiej - Balcerek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Mielniczak