

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego - Państwowy Instytut Badawczy

mgr inż. Marta Modrzewska

**Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju
Trichoderma w procesie degradacji/transformacji
mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie
bezpieczeństwa żywności**

The role of metabolic pathways in *Trichoderma* fungi for the degradation/
transformation of *Fusarium* mycotoxins and their relevance to food safety

Praca doktorska
Doctoral thesis

Promotor:

dr hab. inż. Marcin Bryła, prof. IBPRS-PIB
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Promotor pomocniczy:

dr inż. Dominik Popowski
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Recenzenci:

prof. dr hab. Adam Waśko
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

dr hab. inż. Magdalena Wirkowska-Wojdyła
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Instytut Nauk o Żywności, Katedra Chemii

dr hab. Alicja Sułek
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Uprawy Roślin i Jakości Plonu

Warszawa, 2025

Warszawa, dn. 17.03.2025

Tytuł / stopień naukowy Promotora: dr hab., prof. IBPRS-PIB

Imię i nazwisko Promotora: Marcin Bryła

Dziedzina naukowa: nauki rolnicze

Dyscyplina naukowa: technologia żywności i żywienia

Oświadczenie Promotora o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

mgr inż. Marty Modrzewskiej

pt.: Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji/transformacji mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie bezpieczeństwa żywności

Jako Promotor przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze
- dyscyplinie naukowej: technologia żywności i żywienia

21.03.2025 
(data i podpis Promotora)

Warszawa, dn. 17.03.2025

Tytuł / stopień naukowy Promotora pomocniczego: dr
Imię i nazwisko Promotora pomocniczego: Dominik Popowski
Dziedzina naukowa: nauki rolnicze
Dyscyplina naukowa: technologia żywności i żywienia

Oświadczenie Promotora pomocniczego o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

mgr inż. Marty Modrzewskiej

pt.: Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji/transformacji mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie bezpieczeństwa żywności

Jako Promotor pomocniczy przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze
- dyscyplinie naukowej: technologia żywności i żywienia

17.03.2025 

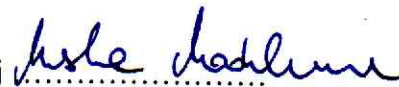
(data i podpis Promotora pomocniczego)

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data...24.04.2025..... Podpis autora rozprawy doktorskiej 

Streszczenie

Rola szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji/transformacji mykotoksyn fuzaryjnych i ich znaczenie w aspekcie bezpieczeństwa żywności

Choroby roślin zbożowych wywołane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* stanowią poważne zagrożenie dla światowego bezpieczeństwa żywnościowego. W odpowiedzi na te wyzwania, badania nad antagonistycznymi właściwościami grzybów z rodzaju *Trichoderma* oferują obiecujące rozwiązania w zakresie biokontroli tych patogenów.

Celem badań było wytypowanie potencjalnych „kandydatów” spośród grzybów *Trichoderma*, izolatów o antagonistycznych właściwościach względem patogenów zbóż należących do rodzaju *Fusarium*. Przeprowadzono ocenę stopnia inhibicji biosyntezy mykotoksyn biosyntetyzowanych przez te patogeny a także oceniono możliwość biotransformacji wybranych mykotoksyn przez grzyby *Trichoderma*. Badania obejmowały ocenę właściwości antagonistycznych wybranych izolatów różnych gatunków *Trichoderma* w testach wspólnej hodowli, analizę stopnia hamowania biosyntezy mykotoksyn przez *Trichoderma*, analizę grzybowego DNA w podłożu hodowlanym oraz analizę metabolomiczną podłoży hodowlanych.

Wszystkie testowane izolaty *Trichoderma* wykazały zdolność do hamowania wzrostu patogenów. Najsilniejsze działanie antagonistyczne wykazały izolaty *T. atroviride*. Izolaty *Trichoderma* skutecznie zmniejszały poziom biosyntezy trichotecenów, fumonizyn, bewerycyny, zearalenonu i ich pochodnych. Analiza metabolomiczna wykazała istotne różnice w liczbie i typie metabolitów wytwarzanych w zależności od specyficznego izolatu *Trichoderma* i izolatu *Fusarium*. Ponadto wykazano zdolność *Trichoderma* do biotransformacji toksyny T-2 oraz zearalenonu.

Badania potwierdziły, że *Trichoderma* posiada znaczący potencjał, jako środek biokontroli przeciwko *Fusarium*, wykazując zdolność do hamowania wzrostu patogenów i redukcji biosyntezy oraz biotransformacji mykotoksyn. Wyniki te sugerują, że zastosowanie *Trichoderma* może stanowić efektywną i ekologiczną strategię zarządzania mykotoksynami w łańcuchu żywnościowym przyczyniającą się do poprawy bezpieczeństwa żywności. Stanowi to wstęp do dalszych badań *in vivo*, które pozwolą na potwierdzenie skuteczności i praktycznego zastosowania *Trichoderma* w rzeczywistych warunkach rolniczych.

Słowa kluczowe: interakcje międzygrzybowe, antagonizm, analiza metabolomiczna, biokontrola

Abstract

The role of metabolic pathways in *Trichoderma* fungi for the degradation/transformation of *Fusarium* mycotoxins and their relevance to food safety

Plant diseases in cereal crops caused by fungi of the genus *Fusarium* pose a significant threat to global food security. In response to these challenges, research into the antagonistic properties of fungi of the genus *Trichoderma* offers promising solutions for the biocontrol of these pathogens.

The objective of the study was to identify potential candidates among *Trichoderma* isolates with antagonistic properties against cereal pathogens belonging to the genus *Fusarium*. The research evaluated the extent of inhibition of mycotoxin biosynthesis by these pathogens and assessed the potential for biotransformation of selected mycotoxins by *Trichoderma* fungi. The study encompassed an evaluation of the antagonistic properties of selected isolates of various *Trichoderma* species in co-culture tests, analysis of the inhibition of mycotoxin biosynthesis by *Trichoderma*, fungal DNA analysis in the culture medium, and metabolomic analysis of the culture media.

All tested *Trichoderma* isolates demonstrated the ability to inhibit the growth of pathogens, with the strongest antagonistic activity observed in *T. atroviride* isolates. The *Trichoderma* isolates effectively reduced the levels of biosynthesized trichothecenes, fumonisins, beauvericin, zearalenone, and their derivatives. Metabolomic analysis revealed significant differences in the number and types of metabolites produced, depending on the specific *Trichoderma* isolate and *Fusarium* isolate, as well as the ability of *Trichoderma* to biotransform T-2 toxin and zearalenone.

The research confirmed that *Trichoderma* possesses significant potential as a biocontrol agent against *Fusarium*, demonstrating the ability to inhibit pathogen growth, reduce biosynthesis, and biotransform mycotoxins. These findings suggest that the application of *Trichoderma* could represent an effective and environmentally friendly strategy for managing mycotoxins in the food chain, thereby contributing to enhanced food safety. This research serves as a precursor to further in vivo studies aimed at confirming the efficacy and practical application of *Trichoderma* under real agricultural conditions.

Keywords: interfungal interactions, antagonism, metabolomic analysis, biocontrol

Spis treści

1. Wykaz skrótów	15
2. Wykaz artykułów naukowych.....	17
2.1. PUBLIKACJA 1 [P1]	17
2.2. PUBLIKACJA 2 [P2]	17
2.3. PUBLIKACJA 3 [P3]	18
2.4. PUBLIKACJA 4 [P4]	18
3. Wsparcie finansowe	18
4. Wprowadzenie	19
5. Przegląd piśmiennictwa	21
5.1. Rola grzybów w ekosystemach.....	21
5.2. Mykotoksyny grzybów <i>Fusarium</i>	21
5.3. Grzyby z rodzaju <i>Trichoderma</i>	26
5.4. Szlaki metaboliczne <i>Trichoderma</i> w degradacji mykotoksyn	28
5.5. Znaczenie <i>Trichoderma</i> w kontekście bezpieczeństwa żywności	29
6. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy	31
7. Materiał i metody badawcze	33
7.1. Materiał badawczy i odczynniki	33
7.2. Metody badań.....	33
8. Omówienie publikacji.....	37
8.1. PUBLIKACJA 1 [P1]	37
8.2. PUBLIKACJA 2 [P2]	55
8.3. PUBLIKACJA 3 [P3]	75
8.4. PUBLIKACJA 4 [P4]	109
9. Materiały uzupełniające	157
9.1. Cel i powiązanie z publikacjami	157
9.2. Omówienie i dyskusja wyników	157
10. Podsumowanie	167
10.1. Wnioski.....	167
10.2. <i>Trichoderma</i> w aspekcie bezpieczeństwa żywności.....	168
10.3. Kierunki przyszłych badań	168
11. Spis piśmiennictwa	171

1. Wykaz skrótów

15-AcDON - 15-acetyloodeoksyনিবালেনল
3-AcDON - 3-acetyloodeoksyনিবালেনল
6PP - 6-pentyl-2H-piran-2-on
AFB1 - Aflatoksyna B1
AN153 - *T. atroviride* AN153
AN215 - *T. atroviride* AN215
AN355 - *T. viride* AN355
AN508 - *T. viridescens* AN508
AN523 - *T. atroviride* AN523
AN609 - *T. viridescens* AN609
AN690 - *T. viride* AN690
AN705 - *T. atroviride* AN705
BEA - Bewerycyna
DAS - Diacetoksyscirpenol
DNA - Kwas deoksyrybonukleinowy
DON - Deoksyনিবালেনল
DON-3G - Deoksyনিবালেনল-3-glukozyd
dPCR - Cyfrowa reakcja łańcuchowa polimerazy (Digital PCR)
ER - Receptory estrogenowe (Estrogen Receptors)
FB1 - Fumonizyna B1
FB2 - Fumonizyna B2
FB3 - Fumonizyna B3
FUSX - Fusarenon X
HFB1 – Hydrolizowana fumonizyna B1
HFB2 - Hydrolizowana fumonizyna B2
HFB3 - Hydrolizowana fumonizyna B3
HT-2 - Toksyna HT-2
HT-2-3 α -G - HT-2 toksyna-3 α -D-glukozyd
HT-2-3 β -G - HT-2 toksyna-3 β -D-glukozyd
ISR - Indukcja odporności roślin (Induced Systemic Resistance)
KF191 - *F. culmorum* KF191
KF2006a - *F. sporotrichioides* KF2006a
KF2563 - *F. poea* KF2563
KF350 - *F. culmorum* KF350
KF583 - *F. cerealis* KF583
KF846 - *F. culmorum* KF846
MAPK - Szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem
NIV - Niwalenol
PEA1 - *F. proliferatum* PEA1
PEA2 - *F. proliferatum* PEA2
PHFB1 – Częściowo hydrolizowana fumonizyna B1
ROS - Reaktywne formy tlenu (Reactive Oxygen Species)
T-2 - Toksyna T-2
T-2-3 α -G - T-2 toksyna-3 α -D-glukozyd
T-2-3 β -G - T-2 toksyna-3 β -D-glukozyd
UHPLC HRMS - Technika ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas
ZEN – Zearalenon

ZEN-14G - 14-*O*-glukozyd zearalenonu

ZEN-14S - 14-*O*-siarczan zearalenonu

α -ZOL - α -zearalenol

β -ZOL - β -zearalenol

2. Wykaz artykułów naukowych

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor: **11,73**

Suma punktów MEiN: **420**

Wskaźnik Impact Factor i liczba punktów MEiN zostały obliczone na podstawie danych z roku publikacji artykułu lub z ostatniego roku, dla którego opublikowano te dane.

2.1. PUBLIKACJA 1 [P1]

Modrzewska, M., Bryła, M., Kanabus, J., Pierzgalski, A. *Trichoderma* as a biostimulator and biocontrol agent against *Fusarium* in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities. *Plant Pathology* 2022, 71(7), 1471-1485. doi: 10.1111/ppa.13578

Impact Factor: **2,59**

Punkty MEiN prezentowanej pracy: **140**

Wyróżnienia: Wiley Top Cited Article 2022-2023, Wiley Top Downloaded Paper 2022

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: analiza literatury, przygotowanie treści manuskryptu, opracowanie rysunków i tabel, odpowiedzi na uwagi recenzentów, korespondencja z redaktorem naczelnym czasopisma, oraz korekta manuskryptu.

2.2. PUBLIKACJA 2 [P2]

Modrzewska, M., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T., Bryła, M. *Trichoderma* versus *Fusarium* - inhibition of pathogen growth and mycotoxin biosynthesis. *Molecules* 2022, 27(23), 8146. doi: 10.3390/molecules27238146

Impact Factor: **4,15**

Punkty MEiN prezentowanej pracy: **140**

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: współudział w koncepcji i metodologii badań, przeprowadzenie walidacji metod, wykonanie eksperymentów, przeprowadzenie analizy danych, przygotowanie rysunków i tabel, opracowanie manuskryptu, korespondencja z redaktorem naczelnym czasopisma, odpowiedzi na uwagi recenzentów, oraz korekta manuskryptu.

2.3. PUBLIKACJA 3 [P3]

Modrzewska, M., Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Bryła, M., Cramer, B., Humpf, U.H., Twarużek, M. Antagonistic properties against *Fusarium sporotrichioides* and glycosylation of HT-2 and T-2 toxins by selected *Trichoderma* strains. *Scientific Reports* 2024, 14(1), 5865. doi: 10.1038/s41598-024-55920-x

Impact Factor: **4,99**

Punkty MEiN prezentowanej pracy: **140**

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: współudział w koncepcji i zaprojektowaniu metodologii badań, walidacja metod analitycznych, wykonanie eksperymentów, analiza uzyskanych danych, przygotowanie wykresów i tabel, napisanie manuskryptu, udział w korespondencji z redaktorem naczelnym czasopisma, odpowiedzi na uwagi recenzentów, oraz korekta i uzupełnienie manuskryptu.

2.4. PUBLIKACJA 4 [P4]

Publikacja w recenzji - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

Modrzewska, M., Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A., Urbaniak, M., Bryła, M. Impact of selected *Trichoderma* isolates on metabolomic profiles of two *Fusarium proliferatum* strains

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, walidacja metod analitycznych, wykonanie eksperymentów, analiza uzyskanych danych, przygotowanie wykresów i tabel, napisanie manuskryptu oraz przygotowanie manuskryptu do publikacji.

3. Wsparcie finansowe

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu OPUS 17, numer grantu 2019/33/B/NZ9/02743.

4. Wprowadzenie

Zboża są podstawą produkcji żywności i pasz (FAO 2022). Do najczęstszych chorób tych roślin powodujących obniżenia ilości i jakości plonu zaliczana jest fuzarioza siewek oraz fuzarioza kłosa (*Fusarium* head blight, FHB). Choroby te wywoływane są przez kompleks gatunków *Fusarium* (Różewicz i wsp. 2021). W wyniku spadku plonu i jakości ziarna straty ekonomiczne z powodu tych infekcji mogą wynosić 15-20%, a w skrajnych przypadkach sięgać nawet 50% (Petronaitis i wsp. 2021). Grzyby *Fusarium* ograniczają masę ziarna, a także biosyntetyzują toksyczne dla ludzi i zwierząt mykotoksyny (Haque i wsp. 2020). Ograniczanie zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami odbywało się dotąd najczęściej przy użyciu chemicznych środków zawierających substancje z grupy triazoli (Gab-Allah i wsp. 2023). W ostatnich latach w krajach UE obserwuje się trend odchodzenia od stosowania chemicznych pestycydów. Ma to związek z Europejskim Zielonym Ładem, który jako element strategii „od pola do stołu”, zakłada ograniczenie o 50% ilości stosowanych w rolnictwie pestycydów do końca 2030 r. (Komisja Europejska 2020). Ma to znaczenie dla zachowania bioróżnorodności, zdrowia konsumentów i gospodarki. Działania Komisji w tym zakresie mają na celu ograniczenie wpływu rolnictwa na środowisko, a jednocześnie zapewnienie ochrony zdrowia obywateli oraz złagodzenie strat wynikających z pogarszającej się jakości gleb, czy spadku liczebności owadów zapylających wskutek stosowania pestycydów.

Minione lata pokazują, że uprawa roślin napotyka na coraz więcej problemów. Mamy do czynienia z ociepleniem klimatu, odpowiedzialnym za zmiany w populacjach mikroorganizmów, a jednocześnie ograniczane jest użycie chemicznych pestycydów (Ukhurebor i wsp. 2021). Naukowcy oszacowali, że grzyby patogeniczne i szkodniki migrują w kierunku biegunów w tempie 3-5 km/rok, a różnorodność populacji szkodników zmienia się znacząco (Bebber i wsp. 2013; Casu i wsp. 2024). W przypadku patogenów toksynotwórczych atakujących rośliny zbożowe, może dochodzić do przejścia z fazy ograniczonej aktywności metabolicznej, określanej jako „stan supresji”, do warunków sprzyjających intensywnej biosyntezie mykotoksyn (Dong i wsp. 2023). Biologiczna ochrona roślin polega na stosowaniu środków, których substancjami czynnymi mogą być mikroorganizmy (Paganizza 2024). Ich stosowanie powinno maksymalnie ograniczać stosowanie fungicydów (Fenta i Mekonnen 2024). Niestety, skuteczność preparatów biologicznych jest niższa m.in. z powodu obecności innych mikroorganizmów w środowisku mogących osłabiać działanie preparatu (Pandit i wsp. 2022). Mimo tego Komisja Europejska stoi na stanowisku, że stosowanie środków biologicznych w rolnictwie jest istotnym elementem walki z dewastacją środowiska naturalnego a także ma istotne znaczenie dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności (ograniczenie obecności pestycydów i mykotoksyn w surowcach roślinnych) (Komisja Europejska 2020).

Grzyby *Trichoderma* to saprotrofy glebowe, zasiedlające oportunistycznie zewnętrzne warstwy korzeni roślin (El Enshasy i wsp. 2020). Ich obecność w ryzosferze oraz tkankach gospodarza poprawia odporność roślin, stymuluje ich wzrost i rozwój (Contreras-Cornejo i wsp. 2024). Dzięki ich właściwościom antagonistycznym względem

różnych patogenów są wykorzystywane jako środek biologiczny przeciwko patogenom w uprawie roślin (Tyśkiewicz i wsp. 2022). Natomiast nie są powszechnie wykorzystywane w uprawie roślin zbożowych (MRiRW b.d.; EPPO b.d.). Pomimo wysokiego potencjału antagonistycznego, mechanizmy leżące u podstaw tych właściwości oraz ich rola w regulowaniu biosyntezy mykotoksyn przez *Fusarium* pozostają nieznane.

W pracy tej podjęto się badań nad rolą szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji i biotransformacji mykotoksyn fuzaryjnych. Badania te mają charakter interdyscyplinarny, przez co umożliwiają holistyczne zrozumienie mechanizmów *Trichoderma* i jej potencjalnego wpływu na bezpieczeństwo żywności oraz opracowanie nowych strategii biokontroli, które mogą stać się istotnym elementem zintegrowanego zarządzania mykotoksynami w łańcuchu żywnościowym.

Niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana w formie mieszanej, tj. zawiera zbiór opublikowanych i tematycznie powiązanych artykułów naukowych oraz dodatkowe wyniki uzupełniające.

5. Przegląd piśmiennictwa

5.1. Rola grzybów w ekosystemach

Grzyby pełnią istotną rolę we właściwym funkcjonowaniu i stabilności ekosystemów. Mogą być saprotrofami, patogenami, jak również wchodzić w relacje symbiotyczne (Bahram, i Netherway 2022). Jako saprotrofy, grzyby uczestniczą w rozkładzie materii organicznej, takiej jak martwe rośliny i drewno (Tunlid i wsp. 2022). Poprzez rozkład złożonych związków organicznych na prostsze substancje, grzyby odgrywają kluczową rolę w cyklach biogeochemicznych, zwłaszcza w obiegu węgla, azotu i fosforu (Tian i wsp. 2021). Mikoryzy, symbiotyczne związki między grzybami a korzeniami roślin, zapewniają zwiększoną dostępność wody i składników odżywczych, tym samym poprawiają zdrowie i wzrost roślin (Khaliq i wsp. 2022). Z kolei, kontrola populacji roślin przez grzyby patogeniczne ma znaczący wpływ na strukturę i funkcjonowanie danego ekosystemu (Zhang, J. i wsp. 2020).

Powszechnie spotykanym rodzajem grzybów saprotroficznych są grzyby *Trichoderma*. Rodzaj ten znany jest ze swoich zdolności antagonistycznych i biostymulujących (Tyśkiewicz i wsp. 2022; Modrzewska i wsp. 2022). Konkurując o przestrzeń i składniki odżywcze a także ze względu na mykopasożytnictwo oraz antybiozę grzyby te są skutecznymi biokontrolerami (Ferreira i Musumeci 2021). Mogą indukować systemową odporność roślin, a przez to zwiększać ich zdolność do obrony przed szerokim spektrum stresów biotycznych i abiotycznych (Woo i wsp. 2023).

Grzyby *Trichoderma* biosyntetyzują różnorodne enzymy hydrolityczne, takie jak celulazy, hemicelulazy, chitynazy i proteazy (Ghasemi i wsp. 2020). Dzięki tym enzymom, zdolne są do rozkładu złożonych biopolimerów, takich jak celuloza, chityna i białka. Mogą rozkładać martwą materię organiczną i inne trudne do rozkładu substancje, przyczyniając się do utrzymania równowagi ekologicznej w glebie (Tóthné i wsp. 2021). Ich zdolność do biosyntezy enzymów czyni je obiektem badań w kontekście bioremediacji zanieczyszczeń, w tym rozkładu toksycznych związków chemicznych, takich jak mykotoksyny wytwarzane przez inne grzyby (Kumar i Dwivedi 2021). Zdolność *Trichoderma* do degradacji/biotransformacji mykotoksyn grzybów patogenicznych jest pożądana w kontekście bezpieczeństwa żywności. Z jednej strony *Trichoderma* mogą działać ochronnie dla roślin przed fitopatogenami, z drugiej zaś zdolność tych grzybów w ingerencję w szlaki metaboliczne fitopatogenów może przyczynić się niższej kumulacji toksyn w roślinach a w konsekwencji w surowcach rolnych.

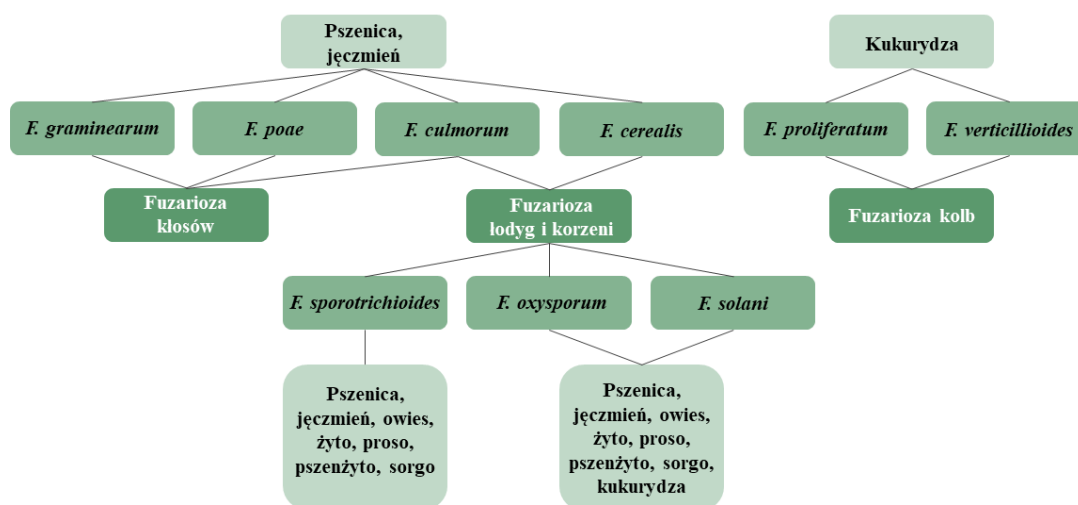
5.2. Mykotoksyny grzybów *Fusarium*

Mykotoksyny to wtórne metabolity biosyntetyzowane przez niektóre gatunki grzybów pleśniowych m. in. *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Bryła i wsp. 2018). Metabolity te mogą zanieczyszczać żywność i paszę, stanowiąc poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt hodowlanych (Polak-Śliwińska i Paszczyk 2021).

Fusarium to rodzaj grzybów, które obejmują wiele gatunków patogennych dla roślin (Perincherry i wsp. 2019). *Fusarium* rozwija się dobrze w glebach, szczególnie

w tych bogatych w materię organiczną (Todorović i wsp. 2023). Optymalna temperatura wzrostu dla większości gatunków *Fusarium* wynosi od 25°C do 30°C (Nazari i wsp. 2014; Lal i wsp. 2024). *Fusarium* może rosnąć w szerokim zakresie temperatury, od około 5°C do 37°C, ale ekstremalne temperatury mogą hamować ich wzrost (Lahouar i wsp. 2017; Peter Mshelia i wsp. 2020). Optymalne pH dla wzrostu *Fusarium* wynosi od 6.0 do 7.0. Grzyby te mogą jednak rosnąć w zakresie pH od 3.0 do 9.0 (Frans i wsp. 2017). *Fusarium* wymaga wysokiej wilgotności do wzrostu, często powyżej 90% względnej wilgotności, a długotrwała wilgotność sprzyja infekcjom i rozwojowi chorób roślin (Manstretta i Rossi 2016, Blandino i wsp. 2017).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są odpowiedzialne za wywoływanie wielu poważnych chorób zbóż. Do najczęściej występujących chorób zbóż wywołanych przez gatunki *Fusarium* zalicza się fuzariozę kłosów (*Fusarium Head Blight*), fuzariozę kolb oraz fuzariozę siewek, łodyg i korzeni (Rys. 1; Miedaner i wsp. 2017; Vanheule i wsp. 2017; Wenda-Piesik i wsp. 2017). Choroby te prowadzą do uszkodzenia roślin, co skutkuje obniżeniem jakości i ilości plonów. Dodatkowo, skażone grzybami *Fusarium* zboża mogą być zanieczyszczone szkodliwymi mykotoksynami, takimi jak trichoteceny, zearalenon (ZEN) czy fumonizyny (Miedaner i wsp. 2017).



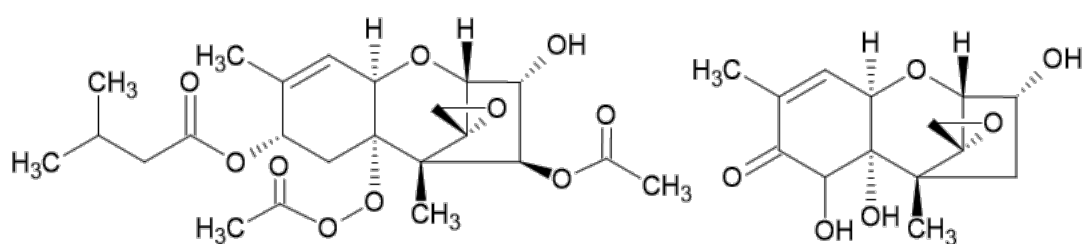
Rys. 1. Choroby roślin zbożowych wywołane przez wybrane gatunki *Fusarium*, opracowanie własne na podstawie Miedaner i wsp. 2017; Vanheule i wsp. 2017; Wenda-Piesik i wsp. 2017.

Biosynteza mykotoksyn przez *Fusarium* zależy od złożonych interakcji między warunkami środowiskowymi, stresem roślin, dostępnością składników odżywczych oraz genotypem patogenu (Perincherry i wsp. 2019). Biosyntezie mykotoksyn przez *Fusarium* sprzyja temperatura od 20°C do 30°C (Nazari i wsp. 2018; Belizán i wsp. 2019; Albuquerque i wsp. 2021). Wilgotność względna powyżej 70% i obfitość dostępnych składników odżywczych, takich jak cukry i aminokwasy sprzyja zarówno wzrostowi

Fusarium i biosyntezie mykotoksyn (Neme i Mohammed 2017). Natomiast czynniki stresowe, takie jak susza, uszkodzenia mechaniczne, oraz niedobory składników odżywczych, mogą zwiększać podatność roślin, szczególnie te o wysokiej zawartości azotu i węglowodanów, na infekcje *Fusarium* (Mielniczuk i Skwaryło-Bednarz 2020). Na biosyntezę mykotoksyn przez *Fusarium* może wpływać również obecność innych mikroorganizmów w środowisku. Niektóre bakterie i grzyby mogą stymulować lub hamować biosyntezę mykotoksyn poprzez konkurencję o zasoby lub produkcję antagonistycznych metabolitów (Medina i wsp. 2017). Jednak kluczową rolę w regulacji syntezy mykotoksyn odgrywa genotyp patogenu (Perincherry i wsp. 2019; Kolawole i wsp. 2021).

Trichoteceny

Trichoteceny to związki o strukturze chemicznej charakteryzującej się czteropierścieniowym szkieletem epoksydowym, który jest odpowiedzialny za ich toksyczność (Rys. 2; McCormick i wsp. 2011). Biorąc pod uwagę ich strukturę, można je podzielić na kilka grup, z których najważniejsze to grupa A: toksyna T-2 (T-2), toksyna HT-2 (HT-2), diacetoksyscirpenol (DAS) biosyntetyzowane przez np. *F. langsethiae* i *F. sporotrichioides* oraz grupa B: deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), biosyntetyzowane głównie przez *F. graminearum* i *F. culmorum* (Nazari i wsp. 2019; Winter i wsp. 2019). T-2 hamuje syntezę białek poprzez wiązanie się z rybosomami, co prowadzi do zatrzymania translacji (Li i wsp. 2022). Może również indukować stres oksydacyjny, co prowadzi do uszkodzeń kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) lipidów i białek (Dai i wsp. 2019). Ekspozycja na T-2 prowadzi do uszkodzeń układu pokarmowego i krwionośnego, immunosupresji oraz genotoksyczności (Guo i wsp. 2018).



Rys 2. Wzory strukturalne wybranych trichotecenów: T-2 oraz DON (od lewej). Opracowanie własne na podstawie Dai i wsp. 2019 i Tian i wsp. 2016.

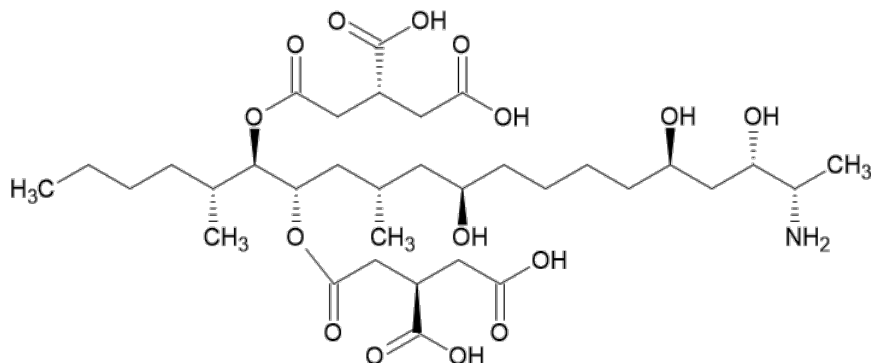
Deoksyniwalenol, znany również jako womiotoksyna, hamuje syntezę białek poprzez interferencję z funkcją rybosomów (Garofalo i wsp. 2023). Indukuje także reakcje zapalne poprzez aktywację szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK) (Lee i wsp. 2019). Obserwowane efekty zdrowotne to wymioty, nudności,

Zearalenon

CC[C@H](OC(=O)c1cc(O)cc(O)c1)/C=C/CCCCC=O

24

Fumonizyny to grupa mykotoksyn biosyntezyzowanych głównie przez *F. verticillioides* i *F. proliferatum* (Cendoya i wsp. 2021). Najważniejszymi związkami z tej grupy są fumonizyna B1 (FB1), fumonizyna B2 (FB2), fumonizyna B3 (FB3), jednak FB1 jest z nich najbardziej powszechna i najbardziej toksyczna (Rys. 4; Gao i wsp. 2023). Fumonizyny posiadają unikatowy mechanizm działania, który różni się od innych mykotoksyn. Hamują enzymy kluczowe w biosyntezie sfingolipidów, zwłaszcza ceramidu, co prowadzi do nagromadzenia prekursorów sfingolipidów takich jak sfinganina i sfingozyna (Chen i wsp. 2020). Sfingolipidy są ważnymi komponentami błon komórkowych i pełnią kluczowe role w sygnalizacji komórkowej, a zaburzenia w ich metabolizmie mogą prowadzić do zwiększonego stresu oksydacyjnego, uszkodzenia komórek i indukcji apoptozy (Iessi i wsp. 2020). U ludzi ekspozycja na wysokie poziomy fumonizyn została powiązana z wyższym ryzykiem wystąpienia nowotworu przełyku, zwłaszcza w regionach o wysokim spożyciu kukurydzy zanieczyszczonej fumonizynami (Wangia-Dixon i Nishimwe 2020). Badania sugerują, że fumonizyny mogą być teratogenne i mogą powodować defekty cewy nerwowej u płodów (Gönenç i wsp. 2020; Qu i wsp. 2022). Spożycie paszy zanieczyszczonej fumonizynami prowadzi do chorób płuc u świń. Ponadto fumonizyny mogą uszkadzać wątrobę i nerki u różnych gatunków zwierząt (Chen i wsp. 2021).



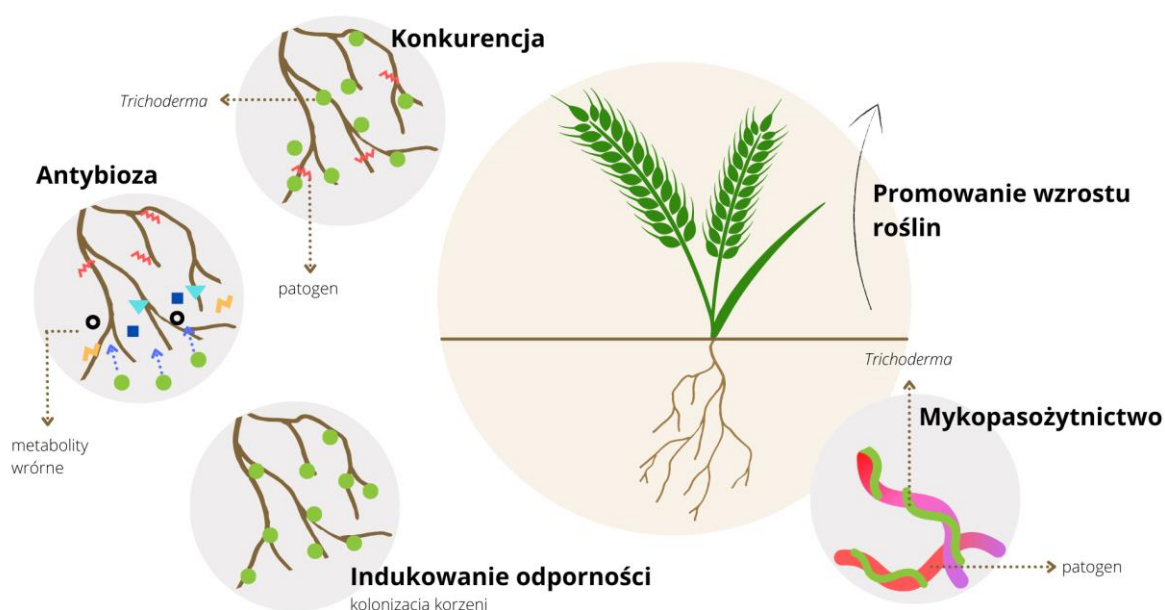
Mykotoksyny stanowią poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Z tego względu w Unii Europejskiej (UE), w Stanach Zjednoczonych i wielu krajach na świecie, obowiązują ścisłe regulacje dotyczące maksymalnych poziomów niektórych mykotoksyn w żywności i paszach. W UE limity te są określone głównie przez rozporządzenie UE 2023/915, UE 2024/1022 i UE 2024/1038, natomiast w USA są ustalane przez FDA (Komisja Europejska 2023; Komisja Europejska 2024a; Komisja Europejska 2024b; FDA 2015/2016). Skuteczne zarządzanie tym zagrożeniem wymaga zaawansowanych

technologii detekcji, ściśle kontrolowanych procesów przetwarzania oraz ciągłego badania nowych metod usuwania tych toksyn z łańcucha żywnościowego.

5.3. Grzyby z rodzaju *Trichoderma*

Trichoderma jest rodzajem grzybów należących do klasy *Sordariomycetes*, rzędu *Hypocreales* i rodziny *Hypocreaceae* (Kubicek i wsp. 2019). Są to grzyby saprofityczne, które powszechnie występują w glebie i na resztkach organicznych (Tyśkiewicz i wsp. 2022). Grzyby z rodzaju *Trichoderma* charakteryzują się szybkim wzrostem i wysoką zdolnością do kolonizacji różnych substratów organicznych. Często występuje w ryzosferze roślin, gdzie wspomaga wzrost roślin i chroni je przed patogenami (Tyśkiewicz i wsp. 2022). Optymalna temperatura wzrostu dla większości gatunków *Trichoderma* wynosi od 25°C do 30°C, jednak mogą one rosnąć w szerokim zakresie temperatury od około 0°C do 50°C (Daryaei i wsp. 2016). Korzystne dla wzrostu *Trichoderma* są wilgotność względna powyżej 70% oraz pH od 5.0 do 6.0, jednakże *Trichoderma* może rosnąć w zakresie pH od 4.0 do 8.0 (Abeyratne i Deshappriy 2018; Andrés i wsp. 2022). Grzyby te nie potrzebują światła do wzrostu, ale wiadomo, że światło może wpływać na sporulację i biosyntezę enzymów (Bala i wsp. 2023).

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są szeroko stosowane w rolnictwie ze względu na ich zdolności biokontrolne i biostymulacyjne. Ze względu na swoje właściwości znajdują zastosowanie w uprawie roślin warzywnych, sadowniczych, zielarskich, strączkowych, a także ozdobnych (Martinez i wsp. 2023; Ptaszek i wsp. 2023). Działają jako biopestycydy, ograniczając wzrost i rozwój patogennych grzybów, takich jak *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* i *Sclerotinia* (Modrzewska i wsp. 2022). Mechanizmy działania *Trichoderma* przedstawiono na Rysunku 5.



Rys. 5. Mechanizmy działania *Trichoderma*; opracowanie własne na podstawie Modrzewska i wsp. 2022.

Mykopasożytnictwo to proces, w którym *Trichoderma* bezpośrednio atakuje patogeny, prowadząc do jego uśmiercenia. Ten mechanizm działania rozpoczyna się od adhezji, gdzie *Trichoderma* przylega do powierzchni strzępek patogenów za pomocą struktur adhezyjnych (Mukherjee i wsp. 2022). Następnie grzyb wnika w struktury komórkowe patogenów, biosyntetyzując enzymy hydrolityczne, takie jak chitynazy i glukanazy, które rozkładają ściany komórkowe patogenów (Modrzewska i wsp. 2022). Hydroliza polisacharydów ściany komórkowej, takich jak chityna i glukan, prowadzi do lizy komórek patogenów (Tyśkiewicz i wsp. 2022). Konkurencja to kolejny ważny mechanizm, dzięki któremu *Trichoderma* ogranicza rozwój patogenów. *Trichoderma* szybko kolonizuje ryzosferę oraz powierzchnię resztek roślinnych, zajmując przestrzeń, która mogłaby być zasiedlona przez patogeny (Woo i wsp. 2023). Efektywne wykorzystanie dostępnych składników odżywczych, takich jak azot, fosfor i węglowodany, ogranicza ich dostępność dla patogenów (Tyśkiewicz i wsp. 2022). Ponadto, *Trichoderma* może biosyntetyzować metabolity, które chelatują składniki odżywcze, czyniąc je niedostępnymi dla patogenów, co dodatkowo hamuje ich rozwój (Kumar i Khurana 2021). Antybioza to proces, w którym *Trichoderma* biosyntetyzuje i wydziela związki antybiotyczne oraz metabolity wtórne, które hamują wzrost i rozwój patogenów (Modrzewska i wsp. 2022). *Trichoderma* syntetyzuje różnorodne związki antybiotyczne, takie jak gliotoksyna, peptaibole i harzianol, które mogą bezpośrednio hamować wzrost patogenów lub je zabijać. Gliotoksyna indukuje apoptozę w komórkach patogenów, peptaibole zaburzają funkcje błon komórkowych, a harzianol wykazuje silne działanie przeciwrzybicze (Gayathri i wsp. 2020; Hou i wsp. 2022; Ji, H. i wsp. 2023). Natomiast, indukcja odporności roślin (ISR) to mechanizm, w którym *Trichoderma* zwiększa zdolność roślin do obrony przed infekcjami. *Trichoderma* wytwarza i wydziela sygnały chemiczne, które są rozpoznawane przez rośliny, prowadząc do aktywacji wewnętrznych szlaków obronnych, takich jak produkcja fitoaleksyn i enzymów obronnych (Sood i wsp. 2020). Systemowa odporność roślin prowadzi do wzmocnienia mechanicznych barier obronnych, takich jak pogrubienie ścian komórkowych oraz produkcji białek obronnych, które mogą degradować komórki patogenów (Sood i wsp. 2021).

Trichoderma wspierają wzrost roślin poprzez szereg mechanizmów biologicznych, które znacząco wpływają na zdrowie i produktywność roślin. Przede wszystkim, *Trichoderma* produkuje fitohormony, takie jak auksyny, gibereliny i cytokininy, które stymulują wzrost i rozwój roślin (Illescas i wsp. 2021; Abdenaceur i wsp. 2022). Te hormony roślinne są kluczowe w regulacji procesów wzrostowych, takich jak elongacja komórek, rozwój korzeni oraz podział komórek, co skutkuje wzmocnieniem struktury roślin i poprawą ich zdrowotności (Devi i wsp. 2020). *Trichoderma* wspomaga także pobieranie składników odżywczych przez rośliny, co jest kluczowe dla ich wzrostu i plonowania. Grzyby te mogą rozpuszczać minerały w glebie, takie jak fosfor i żelazo, które są często niedostępne dla roślin w formie związanej (Basílio i wsp. 2022). Poprzez zwiększanie dostępności i efektywności pobierania tych składników odżywczych, *Trichoderma* przyczynia się do lepszego odżywienia roślin, co przekłada się na ich szybszy wzrost i większe plony (Basílio i wsp. 2022; Tyśkiewicz i wsp. 2022). Poprawa struktury gleby jest kolejnym istotnym aspektem działania

Trichoderma jako biostymulatorów. Grzyby te wpływają na agregację glebową, co poprawia napowietrzenie i zdolność gleby do zatrzymywania wody (Pinto i wsp. 2024). Lepsza struktura gleby umożliwia rozwój silniejszego systemu korzeniowego, co z kolei poprawia stabilność roślin i ich zdolność do przetrwania w warunkach stresowych, takich jak susza (Woo i wsp. 2023; Pinto i wsp. 2024). Ponadto, *Trichoderma* może zwiększać efektywność fotosyntezy w roślinach. Wykazano, że rośliny traktowane *Trichoderma* często wykazują wyższą aktywność fotosyntetyczną, co jest wynikiem lepszego odżywienia i zdrowszego rozwoju liści (Harman i wsp. 2021). Wyższa efektywność fotosyntezy prowadzi do większej produkcji biomasy i wyższych plonów, co jest szczególnie ważne w rolnictwie komercyjnym (Kohli i wsp. 2020). Dzięki tym zróżnicowanym mechanizmom, *Trichoderma* może stanowić potężne narzędzie w poprawie wzrostu roślin i zwiększaniu wydajności upraw.

Trichoderma odgrywa również istotną rolę w bioremediacji, procesie wykorzystywania mikroorganizmów do przekształcania i neutralizowania toksycznych substancji w środowisku (Poveda 2022). Produkując szeroką gamę enzymów hydrolitycznych, takich jak celulazy, chitynazy, glukanazy i proteazy, *Trichoderma* skutecznie degraduje złożone związki organiczne, takie jak pestycydy, herbicydy i inne zanieczyszczenia chemiczne (Saldaña-Mendoza i wsp. 2023). Ponadto, grzyby te wykazują zdolność do biotransformacji metali ciężkich, takich jak kadm, ołów, rtęć i chrom, przekształcając je w mniej toksyczne formy poprzez biosorpcję i bioakumulację (Poveda 2022; Kumar i Dwivedi 2019). *Trichoderma* produkuje także kwasy organiczne i metabolity, które chelatują metale ciężkie, ułatwiając ich usuwanie z gleby i wody (Sood i wsp. 2020).

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są nie tylko kluczowymi mikroorganizmami w ekosystemach glebowych, ale również cennymi narzędziami w rolnictwie i biotechnologii. Ich zdolności do biokontroli patogenów roślinnych, stymulowania wzrostu roślin oraz degradacji zanieczyszczeń chemicznych czynią je niezwykle wszechstronnymi i wartościowymi w praktycznych zastosowaniach.

5.4. Szlaki metaboliczne *Trichoderma* w degradacji mykotoksyn

Jednym z kluczowych aspektów zastosowań grzybów z rodzaju *Trichoderma* jest ich zdolność do wytwarzania różnorodnych enzymów (Tyśkiewicz i wsp. 2022). Biosynteza tych metabolitów pozwala na degradację mykotoksyn w różnych reakcjach wchodzących w skład procesów metabolicznych (Li i wsp. 2020). Zrozumienie tych szlaków jest kluczowe dla opracowania skutecznych metod eliminacji mykotoksyn i poprawy bezpieczeństwa żywności.

Obecnie jest niewiele badań dotyczących biotransformacji toksyn przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*, szczególnie w kontekście mykotoksyn biosyntetyzowanych przez *Fusarium*. Szczepy *Trichoderma* biosyntetyzują peroksydazy, lakkazy, chitynazy i proteazy, które katalizują reakcje hydrolizy i utleniania (Dini i wsp. 2022; Tyśkiewicz i wsp. 2022). Te reakcje prowadzą do modyfikacji struktury chemicznej mykotoksyn, przekształcając je w mniej toksyczne metabolity. Pomimo potencjału, różnorodność szczepów *Trichoderma* badanych w kontekście biotransformacji mykotoksyn jest

stosunkowo mała. Dotychczasowe badania koncentrują się głównie na kilku wybranych szczepach. Badania Dini i wsp. (2022) wykazały, że peroksydazy produkowane przez *T. afroharzianum* są szczególnie skuteczne w degradacji aflatoksyny B1 (AFB1) i ochratoksyny (OTA), przekształcając AFB1 do prostszych związków, takich jak kwas octowy i octan n-propylu, oraz redukując toksyczność OTA poprzez podobne mechanizmy. Wiadomo też, że *T. harzianum* wykazuje zdolność do degradacji AFB1, co jest wspierane przez działanie peroksydaz (Madbouly i wsp. 2023). Peroksydazy pełnią rolę enzymów oksydacyjnych, które wprowadzają cząsteczkę tlenu do struktury chemicznej mykotoksyn (Lyagin i Efremenko 2019). W przypadku aflatoksyn, ten proces oksydacji prowadzi do ich przekształcenia w formy o wyższej polarności i niższej toksyczności, co ułatwia ich neutralizację oraz eliminację z organizmu lub środowiska (De Oliveira i wsp. 2021). Nieliczne prace wskazują, że transferazy z *T. harzianum* przekształcają DON w mniej toksyczny deoksyniwalenol-3-glukozyd (D3G). Natomiast ZEN przekształcany był w formy zredukowane, takie jak α -zearalenol (α -ZOL) i β -zearalenol (β -ZOL) (Tian i wsp. 2016; Tian i wsp. 2018). Tian i wsp. 2020 zaobserwowali, że *Trichoderma atroviride* wykazała zdolność do biotransformacji kwasu fusarynowego do mniej toksycznego metabolitu fusarinolu. Co istotne spośród wielu gatunków *Trichoderma* był to jedyny szczep wykazujący tę zdolność.

Aktualny stan wiedzy wskazuje, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* posiadają zdolność do degradacji różnorodnych mykotoksyn poprzez enzymatyczne procesy metaboliczne. Mechanizmy te prowadzą do detoksykacji i neutralizacji toksycznych związków, co może czynić *Trichoderma* cennym narzędziem w bioremediacji i poprawie bezpieczeństwa żywności. Zrozumienie szlaków metabolicznych *Trichoderma* w degradacji mykotoksyn ma kluczowe znaczenie dla przyszłych zastosowań i opracowań skutecznych metod ich eliminacji.

5.5. Znaczenie *Trichoderma* w kontekście bezpieczeństwa żywności

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* odgrywają kluczową rolę w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności dzięki swoim właściwościom antagonistycznym i potencjałom związanym z degradacją mykotoksyn, prewencji infekcji roślin oraz wspomagania zdrowia ich zdrowia. Zastosowanie tych mikroorganizmów w uprawach przynosi wiele korzyści, które przyczyniają się do zwiększenia jakości i bezpieczeństwa żywności. *Trichoderma* mają zdolność do bezpośredniej degradacji mykotoksyn, co minimalizuje ich toksyczność i ryzyko zdrowotne związane z ich obecnością w żywności (Nešić i wsp. 2021). Enzymy pozyskiwane od *Trichoderma* mogą być wykorzystane w różnych procesach przemysłowych, co poprawia efektywność i bezpieczeństwo produktów spożywczych (Paloheimo i wsp. 2016). Na przykład, zastosowanie lakkaz w przetwarzaniu mąki może pomóc w degradacji DON i ZEN, co prowadzi do otrzymania bezpieczniejszych produktów zbożowych (Ji, J. i wsp. 2023; Liu i wsp. 2024). Ponadto, zdolność *Trichoderma* do wspomagania pobierania składników odżywczych przez rośliny przyczynia się do wyższych plonów i lepszej jakości surowców rolnych (Zin i Badaluddin 2020). Stosowanie *Trichoderma* jako biopestycydów i biostymulatorów mogą wspomóc proces odchodzenia od stosowaniachemicznych środków ochrony roślin,

minimalizując potencjalne pozostałości pestycydów w żywności i zmniejszając negatywny wpływ na środowisko (Saldaña-Mendoza i wsp. 2023). Badania nad *Trichoderma* mogą prowadzić do rozwoju innowacyjnych technologii, które mogą być szeroko stosowane w rolnictwie i przemyśle spożywczym. Przykładem jest rozwój biopreparatów opartych na *Trichoderma*, które mogą być stosowane w ochronie upraw przed patogenami oraz w degradacji mykotoksyn w produktach spożywczych. Takie biopreparaty mogą być wykorzystywane na różnych etapach produkcji żywności, od zaprawiania nasion po przetwarzanie surowców rolnych. Zdolność *Trichoderma* do degradacji mykotoksyn oraz wspomagania zdrowia roślin ma bezpośrednie przełożenie na ochronę zdrowia konsumentów. Redukcja mykotoksyn w żywności zmniejsza ryzyko poważnych chorób u ludzi i zwierząt, w tym nowotworów, zaburzeń hormonalnych i uszkodzeń układu odpornościowego (Omotayo i wsp. 2019). Wspieranie zdrowia roślin poprzez biostymulację i biokontrolę prowadzi do produkcji bezpieczniejszej żywności.

6. Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy

W obliczu globalnych wyzwań, takich jak zmiany klimatyczne bezpośrednio wpływające na produkcję rolniczą i rosnące zapotrzebowanie na żywność, konieczne staje się poszukiwanie nowych metod wspierających zrównoważoną produkcję rolną oraz ochronę zdrowia publicznego. Mykotoksyny, wytwarzane przez patogeniczne grzyby z rodzaju *Fusarium*, stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, a także przyczyniają się do znacznych strat ekonomicznych w rolnictwie.

Celem badań było znalezienie potencjalnych kandydatów spośród gatunków *Trichoderma* do biokontroli fitopatogenicznych gatunków z rodzaju *Fusarium* w uprawie roślin zbożowych. Badania miały na celu również zrozumienie złożonych mechanizmów leżących u podstaw antagonizmu tych mikroorganizmów ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu biotransformacji mykotoksyn i ich roli w procesie ograniczania wzrostu *Fusarium*.

Do celów szczegółowych należało przeprowadzenie:

- oceny właściwości antagonistycznych wybranych grzybów *Trichoderma* względem patogenów z rodzaju *Fusarium*, poprzez ocenę zdolności szczepów *Trichoderma* do hamowania wzrostu patogenu;
- analizy zdolności hamowania i ograniczania biosyntezy toksyn grzybów *Fusarium* przez wybrane gatunki *Trichoderma*;
- analizę metabolomiczną powstałych w wyniku biotransformacji toksyn grzybów *Fusarium* przez gatunki grzybów *Trichoderma*.

Sformułowano i weryfikowano trzy hipotezy badawcze:

HIPOTEZA 1 [H1] Wybrane gatunki grzybów *Trichoderma* wykazują właściwości antagonistyczne wobec patogenów *Fusarium*, skutecznie hamując ich rozwój.

Istnieją publikacje naukowe, w których opisywano wysoką skuteczność grzybów z rodzaju *Trichoderma* w biokontroli różnych fitopatogenów pochodzenia grzybowego. Grzyby te posiadały wysoki potencjał do ograniczania wzrostu fitopatogenów w uprawie roślin warzywnych i owoców jagodowych. Istnieje niewiele dowodów naukowych sugerujących możliwość wykorzystania grzybów z rodzaju *Trichoderma* do ograniczania rozwoju fuzariozy kłosa i siewek zbóż. Przypuszcza się, że gatunki i szczepy przystosowane do polskich warunków klimatycznych, mogą być wykorzystane jako środek biologiczny w uprawie roślin zbożowych.

HIPOTEZA 2 [H2] Grzyby *Trichoderma* mają zdolność do hamowania lub ograniczania biosyntezy toksyn przez *Fusarium*.

Nieliczne prace naukowe sugerują, że poprzez ograniczenie rozwoju wzrostu fitopatogenu, grzyby *Trichoderma* inhibują biosyntezę toksyn wytwarzanych przez

Fusarium. Biorąc pod uwagę, że toksyny grzybów *Fusarium* na ogół są wytwarzane w warunkach stresowych, podejrzewa się że w przypadku niektórych mykotoksyn może zachodzić ich wzmożona biosynteza.

HIPOTEZA 3 [H3] Gatunki grzybów *Trichoderma* są zdolne do degradacji lub biotransformacji toksyn wytwarzanych przez *Fusarium*.

Istnieją pojedyncze doniesienia naukowe sugerujące zdolność grzybów *Trichoderma* do biotransformacji toksyn grzybów *Fusarium* (np. deoksyniwalenolu (DON)) do 3-*O*-glukozydu deoksyniwalenolu (DON-3G). Zakłada się, że grzyby te poprzez bogatą zdolność biosyntezy enzymów, zdolne są do degradacji/biotransformacji innych mykotoksyn (np. toksyn HT-2 i T-2). Potwierdzenie tej hipotezy będzie przyczynkiem do stawiania nowych pytań i hipotez w zakresie roli szlaków metabolicznych *Trichoderma* w możliwym łagodzeniu infekcji roślin zbożowych wywoływanym przez fitopatogeny *Fusarium*.

7. Materiał i metody badawcze

7.1. Materiał badawczy i odczynniki

Eksperymenty zaplanowano z wykorzystaniem ośmiu szczepów *Trichoderma*: *T. atroviride* AN153 (AN153), *T. atroviride* AN215 (AN215), *T. atroviride* AN523 (AN523), *T. atroviride* AN705 (AN705), *T. viride* AN355 (AN355), *T. viride* AN690 (AN690), *T. viridescens* AN508 (AN508) oraz *T. viridescens* AN609 (AN609). Na potrzeby badań opisanych w [P2] i [P3] wykorzystano *F. culmorum* KF191 (KF191), *F. culmorum* KF350 (KF350), *F. culmorum* KF846 (KF846), *F. cerealis* KF583 (KF583) oraz *F. sporotrichioides* KF2006a (KF2006a). Szczepy *F. proliferatum* PEA1 (PEA1) i *F. proliferatum* PEA2 (PEA2) stanowiły materiał badawczy dla pozostałych eksperymentów opisanych w [P4]. Wszystkie szczepy zostały wyizolowane ze środowiska i zdeponowane w Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Stosowane odczynniki opisano w [P2], [P3] oraz [P4].

7.2. Metody badań

Inhibicja wzrostu patogenu przez *Trichoderma*

Inhibicję wzrostu *Fusarium* przez *Trichoderma* metodą wizualną a także poprzez analizę genomowego DNA grzybów w mono- i ko-kulturach na ziarnach ryżu. Po inkubacji kultury wysuszono i zmielono.

Metoda wizualna

Oceny inhibicji wzrostu patogenów przez grzyby *Trichoderma* przeprowadzono na podłożu agarowym (PDA). Grzyby hodowano na szalkach Petriego, gdzie antagonistyczny szczep *Trichoderma* umieszczano naprzeciw patogenemu szczepu grzyba, przy zachowaniu odpowiedniej odległości. Monokultury *Trichoderma* lub *Fusarium* na podłożu PDA służyły jako próbki kontrolne. Kultury inkubowano w warunkach kontrolowanej temperatury i cyklu dnia/nocy [P2, P3, P4]. Wzrost grzybów mierzono co 24 godziny, aż do momentu, w którym doszło do kontaktu między grzybnią patogenu a grzybnią antagonisty. Skuteczność hamowania wzrostu patogenów oceniano na podstawie procentowej redukcji wzrostu patogenu w obecności *Trichoderma*. Wyniki przedstawiono jako procent redukcji wzrostu [P2, P3, P4].

Metoda oparta na ocenie ilościowej grzybowego DNA

Procentowy poziom zahamowania wzrostu *Fusarium* przez szczepy *Trichoderma* oceniono za pomocą cyfrowej PCR (dPCR) przy użyciu zestawu QIAcuity EG PCR Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) oraz barwnika wiążącego dsDNA EvaGreen® w reakcji jednoparametrowej na urządzeniu do cyfrowej PCR (dPCR) QIAGEN QIAcuity-02411 (Qiagen, Hilden, Niemcy). W badaniu analizowano próbki DNA wyizolowane z hodowli

na stałym podłożu ryżowym, które następnie oceniono ilościowo i jakościowo przy użyciu urządzenia Nanodrop. Zastosowano startery specyficzne dla danego gatunku *Fusarium*. Skład mieszaniny reakcyjnej, warunków dPCR oraz analizy danych przedstawiono w [P3] i [P4].

Hamowanie biosyntezy mykotoksyn *Fusarium* przez *Trichoderma*

Przygotowanie prób do analizy opierało się na podejściu „*dilute and shoot*”. Próbkę ekstrahowano, ekstrakt rozcieńczano i analizowano przy zastosowaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas przy użyciu ultraszybkiego chromatografu cieczowego sprzężonego z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizatorem typu Orbitrap (UHPLC HRMS Q Exactive Orbitrap Focus MS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Analizowano następujące mykotoksyny: DON, DON-3G, 3-acetyloksyniwalenol (3-AcDON), 15-acetyloksyniwalenol (15-AcDON), NIV, fusarenon X (FUSX), ZEN, α -ZOL, β -ZOL, 14-*O*-glukozyd zearalenonu (ZEN-14G) oraz 14-*O*-siarczan zearalenonu (ZEN-14S), zearalenon-14-glukozyd, HT-2, T-2, T-2 toksyna-3 α -D-glukozyd (T-2-3 α -G), T-2 toksyna-3 β -D-glukozyd (T-2-3 β -G), HT-2 toksyna-3 α -D-glukozyd (HT-2-3 α -G), HT-2 toksyna-3 β -D-glukozyd (HT-2-3 β -G), FB1, FB2, FB3 oraz beauwerycyna (BEA). Metodę poddano walidacji [P2, P3, P4]. Zakres analityczny, współczynnik determinacji (R^2) dla krzywej kalibracyjnej, granica wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), odzysk (R) i względne odchylenie standardowe dla odzysku (RSD) zostały określone dla każdego analitu [P2, P3, P4].

Biotransformacja mykotoksyn *Fusarium* przez *Trichoderma*

Zdolność *Trichoderma* do biotransformacji T-2 [P3], DON, NIV, ZEN, FB1 oceniono poprzez hodowlę wybranych szczepów *Trichoderma* (AN153, AN609, AN690) na podłożu płynnym, do którego dodano mykotoksynę w stężeniu 5 mg/L. Eksperyment polegał na monitorowaniu stężenia dodanej mykotoksyny oraz identyfikacji i półilościowym oznaczeniu metabolitów powstałych w procesie biotransformacji. Ilościowe oznaczenie wykonano jedynie dla wybranych metabolitów, w przypadku których zastosowano odpowiednie metody analityczne. Przebieg badań obejmował systematyczne pobieranie próbek płynu hodowlanego w określonych odstępach czasowych, zgodnie z metodologią opisaną w [P3]. Próbkę analizowano przy zastosowaniu techniki UPLC-HRMS/MS. Zastosowanie analizy metabolomicznej umożliwiło precyzyjne określenie stężenia wyjściowej toksyny, jak i jej przekształconych metabolitów. Pozyskane dane pozwoliły ocenić efektywność biotransformacji i dostarczyły szczegółowych informacji o ilościowych zmianach metabolitów w czasie, umożliwiając obserwację dynamiki procesów metabolicznych w hodowlach z *Trichoderma* oraz w próbach kontrolnych.

Analiza metabolomiczna

Analizie poddano hodowle płynne oraz mono- i ko-kultury na ziarnie ryżu. Profile metabolomiczne analizowano przy użyciu programu Compound Discoverer™ (wersja 3.3; Thermo Scientific), w tym celu wykorzystano chromatogramy i wysokorozdzielcze widma mas [P3]. Obróbka danych obejmowała: importowanie i wybór widm, identyfikację oczekiwanych związków na podstawie literatury naukowej i wcześniejszych eksperymentów, generowanie listy oczekiwanych związków, grupowanie wykrytych związków, przeszukiwanie baz danych (Search mzCloud, Search ChemSpider, Search mzVault), zastosowanie algorytmu mzLogic, detekcję i grupowanie związków oraz analizę klasy związków.

Analiza statystyczna

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej, którą przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica 13.1 (StatSoft, Poland). Do oceny istotności hamowania wzrostu patogenów przez *Trichoderma* oraz stopnia inhibicji biosyntezy toksyn zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA). Homogeniczność grup badano za pomocą testu Tukey HSD. Przy filtrowaniu cech molekularnych wzięto pod uwagę stosunek średnich powierzchni pików (ratio) i istotności różnicy średnich pól powierzchni (*p*-value) między danymi grupami eksperymentalnymi. W przypadku, eksperymentów opisanych w [P4] oraz rozdziale „Materiały uzupełniające” przeprowadzono normalizację danych intensywności sygnałów dla identyfikowanych związków chemicznych w odniesieniu do stężenia DNA patogenu wyizolowanego z próbek. Dzięki temu uzyskano wartości względne, które eliminowały wpływ różnic w ilości DNA patogenu w poszczególnych próbkach.

8. Omówienie publikacji

8.1. PUBLIKACJA 1 [P1]

***Trichoderma* as a biostimulator and biocontrol agent against *Fusarium* in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities**

Modrzewska, M., Bryła, M., Kanabus, J., Pierzgalski, A.

Plant Pathology 2022, 71(7), 1471-1485. doi: 10.1111/ppa.13578

Artykuł [P1] szczegółowo omawia potencjał grzybów z rodzaju *Trichoderma* jako biostymulatorów i środków biokontroli w ochronie zbóż przed patogenami z rodzaju *Fusarium*, które powodują istotne choroby, takie jak *Fusarium* head blight (FHB) i *Fusarium* ear rot (FER) [H1]. Opisano w nim mechanizmy antagonistyczne *Trichoderma*, w tym mykopasożytnictwo, antybiozę oraz konkurencję o przestrzeń i składniki odżywcze, a także właściwości biostymulujące, takie jak poprawa absorpcji składników odżywczych i zwiększenie odporności roślin na stresy abiotyczne i biotyczne. W artykule przedstawiono przegląd badań *in vitro* i *in vivo* dotyczących skuteczności *Trichoderma* w ochronie zbóż oraz omówiono dostępne na rynku komercyjne produkty biofungicydowe oparte na tych grzybach.

Stwierdzono, że *Trichoderma* może stanowić skuteczną alternatywę dla chemicznych środków ochrony roślin, jednak wskazują na potrzebę dalszych badań nad mechanizmami biokontroli i biostymulacji oraz nad ich praktycznym zastosowaniem w warunkach polowych. Skoncentrowano się również na zdolności *Trichoderma* do hamowania biosyntezy mykotoksyn fuzaryjnych oraz ich biotransformacji. Przedstawiono wnioski perspektywy przyszłych badań, podkreślając znaczenie grzybów *Trichoderma* w kontekście zrównoważonego rolnictwa i poprawy bezpieczeństwa żywności.

Przegląd literatury [P1] dostarczył solidnych podstaw teoretycznych i praktycznych wskazówek dotyczących metodologii badań, odegrał kluczową rolę w kształtowaniu eksperymentów przeprowadzonych w artykułach badawczych [P2], [P3] i [P4]. Szczepy *Trichoderma* zostały zebrane z różnych biotopów w Polsce, w tym z gnijącego drewna, ryzosfery, ziaren zbóż oraz kompostu używanego do uprawy grzybów. Wybór szczepów *T. atroviride* (cztery izolaty), *T. viride* (dwa izolaty) oraz *T. viridescens* (dwa izolaty) został podyktowany ich udokumentowaną skutecznością w biokontroli różnych gatunków *Fusarium*. Należy podkreślić, że stosowane w badaniach izolaty nie były wcześniej badane [P1].

W przypadku *Fusarium* wybrano szczepy *F. culmorum* (trzy izolaty), *F. proliferatum* (dwa izolaty), *F. sporotrichioides*, *F. cerealis* oraz *F. poea*, ze względu na ich częste występowanie jako patogenów roślinnych oraz potencjał do biosyntezy mykotoksyn (Gorczyca i wsp. 2018). Badania *in vitro* były kluczowym etapem weryfikacji skuteczności szczepów *Trichoderma* w interakcji z patogenami *Fusarium*, co było uzasadnione na podstawie [P1]. Zrealizowane badania właściwości antagonistycznych w warunkach *in vitro* umożliwiły szybkie przesiewanie wielu szczepów pod względem właściwości antagonistycznych, co było kluczowe dla

identyfikacji najbardziej obiecujących kandydatów do dalszych badań. Takie podejście pozwoliło na szybkie uzyskanie wstępnych wyników dotyczących potencjału antagonistycznego lub kandydatów do biokontroli fitopatogenów oraz optymalizację warunków eksperymentalnych. Testy *in vitro* umożliwiły precyzyjne monitorowanie interakcji między *Trichoderma* a *Fusarium*, dokładną ocenę stref zahamowania wzrostu oraz zmian w biosyntezie mykotoksyn.

PUBLIKACJA 1 [P1]

***Trichoderma* as a biostimulator and biocontrol agent against *Fusarium* in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities**

Modrzewska, M., Bryła, M., Kanabus, J., Pierzgalski, A.

Plant Pathology 2022, 71(7), 1471-1485. doi: 10.1111/ppa.13578

Str. 39 – 53

**Oświadczenie o procentowym udziale autorów
w opracowaniu publikacji ^{1/}**

Marta Modrzewska

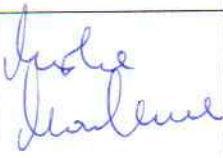
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

*Trichoderma as a biostimulator and biocontrol agent against Fusarium in the production of cereal
crops: Opportunities and possibilities*

Plant Pathology, 2022, 1-15, 10.1111/ppa.13578

Marta Modrzewska*, Marcin Bryła, Joanna Kanabus, Adam Pierzgalski

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Udział procentowy	Rodzaj aktywności	Afiliacja	Podpis Autora
1	Modrzewska Marta	80%	opracowanie koncepcji, przygotowanie manuskryptu, redagowanie	IBPRS PIB Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności	
2	Bryła Marcin	10%	poprawki merytoryczne, redagowanie	IBPRS PIB Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności	
3	Kanabus Joanna	5%	przygotowanie manuskryptu	IBPRS PIB Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności	
4	Pierzgalski Adam	5%	przygotowanie manuskryptu	IBPRS PIB Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności	

¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

8.2. PUBLIKACJA 2 [P2]

Trichoderma versus *Fusarium*—inhibition of pathogen growth and mycotoxin biosynthesis

Modrzewska, M., Błaszczyk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T., Bryła, M. *Molecules* 2022, 27(23), 8146. doi: 10.3390/molecules27238146

Przegląd literatury ujawnił istotne luki badawcze dotyczące specyficznych szczepów *Trichoderma* oraz ich efektywności w konfrontacji z różnymi gatunkami *Fusarium*, co wskazuje na potrzebę pogłębionych badań nad mechanizmami działania i praktycznymi zastosowaniami tych grzybów. Chociaż dotychczasowe publikacje sugerowały wysoką skuteczność *Trichoderma*, brakowało empirycznych dowodów potwierdzających te wyniki.

Celem badań przedstawionych w publikacji [P2] było zbadanie zdolności wybranych szczepów grzybów *Trichoderma* (*T. viride*, *T. viridescens*, *T. atroviride*) do hamowania wzrostu grzybów patogennych *Fusarium* (*F. culmorum* i *F. cerealis*) oraz ich zdolności do ograniczania biosyntezy wytwarzanych przez nie mykotoksyn, takich jak DON, NIV, ZEN oraz ich pochodnych. Szczegółowe badania interakcji między wybranymi szczepami *Trichoderma* a różnymi gatunkami *Fusarium* pozwoliły na identyfikację najbardziej efektywnych kombinacji antagonistów i patogenów. Przeprowadzono hodowle na podłożach agarowych, gdzie szczepy *Trichoderma* umieszczano naprzeciw patogenów *Fusarium*, a następnie mierzono strefy inhibicji wzrostu oraz hodowle ko-kultur na ziarnach ryżu, gdzie oceniano zawartość mykotoksyn w mono- i ko-kulturach przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UHPLC HRMS).

Wszystkie badane szczepy *Trichoderma* wykazały zdolność do hamowania wzrostu grzybni *Fusarium*. Stopień inhibicji wzrostu patogenów wahał się od 24% do 66%, w zależności od szczepu *Trichoderma* i *Fusarium*. Najwyższy stopień inhibicji zaobserwowano dla szczepu AN705, który wykazał największą efektywność w hamowaniu wzrostu dla KF350 i KF846, natomiast dla KF191 najbardziej skuteczny okazał się szczep AN355. Szczep AN523 najskuteczniej hamował wzrost grzybni KF523. Wyniki badań wykazały, że *Trichoderma* znacząco hamowały zdolność biosyntezy mykotoksyn przez *Fusarium* w ko-kulturach na ziarnach ryżu. Stopień inhibicji biosyntezy DON wyniósł od 12% do 100%, w zależności od kombinacji szczepu *Trichoderma* i *Fusarium*. Najbardziej efektywny w redukcji DON okazał się szczep AN705. Biosynteza NIV również uległa zahamowaniu, choć w mniejszym stopniu, tj. od 15% do 80%. Redukcja biosyntezy ZEN była znacząca, tj. od 20% do 85%. Zaobserwowano także, że *Trichoderma* mają zdolność do biotransformacji mykotoksyn *Fusarium*. DON był przekształcany do jego glukozydowanej (DON-3G) pochodnej. ZEN był przekształcany do hydroksylowanej pochodnej β -ZOL. Potwierdzono, że *Trichoderma* posiada zdolność do modyfikacji mykotoksyn *Fusarium*. Wykazują

potencjał jako naturalne środki biokontroli patogenów *Fusarium*, poprzez skuteczne hamowanie wzrostu *Fusarium* oraz inhibicję biosyntezy mykotoksyn. Wyniki badań potwierdzają hipotezy dotyczące antagonistycznych właściwości *Trichoderma* oraz ich zdolności do hamowania biosyntezy i biotransformacji mykotoksyn [H2, H3].

PUBLIKACJA 2 [P2]

***Trichoderma* versus *Fusarium*—inhibition of pathogen growth
and mycotoxin biosynthesis**

Modrzewska, M., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., Yoshinari, T., Bryła, M. *Molecules* 2022, 27(23), 8146. doi: 10.3390/molecules27238146

Str. 57 – 72

**Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów
w opracowaniu publikacji**

Marta Modrzewska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno- Spożywczego w Warszawie im. prof. Wacława Dąbrowskiego
Państwowy Instytut Badawczy

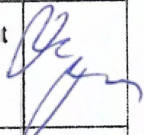
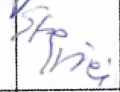
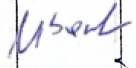
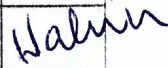
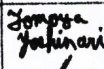
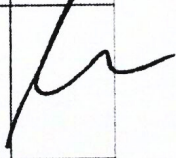
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Trichoderma versus *Fusarium*—Inhibition of Pathogen Growth and Mycotoxin Biosynthesis

Molecules **2022**, 27(23), 8146, DOI: 10.3390/molecules27238146

Marta Modrzewska*, Lidia Błaszczuk, Łukasz Stępień, Monika Urbaniak, Agnieszka Waśkiewicz,
Tomoya Yoshinari, Marcin Bryła

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Modrzewska Marta	Koncepcja, metodologia, walidacja, analiza formalna, badania, analiza danych, opracowanie i przygotowanie manuskryptu, edycja	80	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, IBPRS-PIB, Warszawa, Polska	
2	Błaszczuk Lidia	Metodologia, analiza formalna, badania, zasoby, analiza danych	2	Zakład Mikrobiomiki Roślin, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Polska	
3	Stępień Łukasz	Metodologia, analiza formalna, zasoby, korekta	2	Zakład Interakcji Roślina-Patogen, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Polska	
4	Urbaniak Monika	Badania	2	Zakład Interakcji Roślina-Patogen, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Polska	
5	Waśkiewicz Agnieszka	Korekta	2	Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, Polska	
6	Yoshinari Tomoya	Zasoby	2	Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences, Japan	
7	Bryła Marcin	Koncepcja, metodologia, analiza formalna, zasoby, korekta, nadzór merytoryczny	10	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, IBPRS-PIB, Warszawa, Polska	

8.3. PUBLIKACJA 3 [P3]

Antagonistic properties against *Fusarium sporotrichioides* and glycosylation of HT-2 and T-2 toxins by selected *Trichoderma* strains

Modrzewska, M., Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Bryła, M., Cramer, B., Humpf, U.H., Twarużek, M.

Scientific Reports 2024, 14(1), 5865. doi: 10.1038/s41598-024-55920-x

Wyniki uzyskane we wcześniejszych publikacjach [P1] i [P2] stanowiły podstawę do kontynuacji badań, w tym testowania skuteczności *Trichoderma* przeciwko innym gatunkom *Fusarium* oraz zdolności tych grzybów do biotransformacji innych mykotoksyn. *F. sporotrichioides* jest częstym patogenem roślin uprawnych, zwłaszcza zbóż, takich jak pszenica, kukurydza i jęczmień, które mogą zawierać wysokie stężenia mykotoksyn, przenikających do łańcucha pokarmowego i stanowiących zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Trichoteceny, takie jak T-2 i HT-2, wytwarzane przez *F. sporotrichioides*, są jednymi z najbardziej toksycznych mykotoksyn. Wykazują silne działanie cytotoksyczne, immunosupresyjne i kancerogenne. W przeciwieństwie do innych gatunków *Fusarium*, takich jak *F. culmorum* i *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* był relatywnie mniej poznany pod względem interakcji z antagonistycznymi grzybami, takimi jak *Trichoderma*, co wskazuje na potrzebę lepszego zrozumienia w jaki sposób *Trichoderma* może hamować wzrost *F. sporotrichioides* i jego zdolność do biosyntezy toksyn. Ponadto, badania nad biotransformacją T-2 i HT-2 przez *Trichoderma* są istotne, ponieważ te toksyny są trudne do usunięcia za pomocą konwencjonalnych metod przetwarzania żywności, a zdolność *Trichoderma* do przekształcania tych toksyn w mniej toksyczne formy, takie jak glukozidy, może otworzyć nowe możliwości dla praktyk biokontroli i detoksykacji w rolnictwie.

Kolejny artykuł badawczy [P3] koncentruje się na badaniu antagonistycznych właściwości wybranych szczepów *Trichoderma* wobec *F. sporotrichioides* oraz na zdolności tych szczepów do glukozylacji toksyn T-2 i HT-2. Celem badań było zrozumienie interakcji między *Trichoderma* a *F. sporotrichioides* oraz ocena zdolności *Trichoderma* do hamowania wzrostu patogenu, ograniczania biosyntezy mykotoksyn i biotransformacji tych toksyn. Badania obejmowały hodowle na podłożu agarowym oraz ko-kultury na ziarnach ryżu, gdzie analizowano wpływ *Trichoderma* na wzrost grzybni *F. sporotrichioides* i zawartość mykotoksyn. Do analizy metabolitów wykorzystano technikę UHPLC-HRMS.

Wszystkie badane szczepy *Trichoderma* wykazały zdolność do hamowania wzrostu *F. sporotrichioides*. Najwyższy stopień inhibicji (32-49%) zaobserwowano dla szczepów *T. atroviride* (AN153, AN215, AN523, AN705). W ko-kulturach na ziarnach ryżu, *Trichoderma* niemal całkowicie zredukowały biosyntezę toksyn T-2 i HT-2 przez *F. sporotrichioides*. W medium hodowlanym wykryto glukozidy toksyn T-2 i HT-2 (T-2-3 α -G, HT-2-3 α -G i HT-2-3 β -G), które nie były obecne w kontrolnych próbkach.

Zdolność do biotransformacji T-2 potwierdzono w hodowlach płynnych zawierających tę toksynę. Zawartość HT-2 i T-2 w ko-kulturach była znacznie niższa w porównaniu do kontroli. W przeprowadzonym eksperymencie zidentyfikowano łącznie 276 metabolitów obecnych w hodowlach kontrolnych oraz ko-kulturach. Spośród nich 160 metabolitów przypisano *Trichoderma*, a 115 *Fusarium*. Analizy wykazały, że 49 metabolitów przypisanych do *Trichoderma* wykazywało większą obfitość w ko-kulturach niż w kontrolach. Badania potwierdziły, że *Trichoderma* ma zdolność do hamowania wzrostu *F. sporotrichioides* i ograniczania biosyntezy toksyn. Wyniki badań przedstawione w publikacji [P3] potwierdzają wszystkie trzy hipotezy badawcze. *Trichoderma* wykazały zdolność do hamowania wzrostu *Fusarium*, ograniczania biosyntezy mykotoksyn oraz biotransformacji toksycznych związków do mniej szkodliwych form [H1, H2, H3].

PUBLIKACJA 3 [P3]

Antagonistic properties against *Fusarium sporotrichioides* and glycosylation of HT-2 and T-2 toxins by selected *Trichoderma* strains

Modrzewska, M., Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Urbaniak, M., Bryła, M., Cramer, B., Humpf, U.H., Twarużek, M.

Scientific Reports 2024, 14(1), 5865. doi: 10.1038/s41598-024-55920-x

Str. 77 – 106

Oświadczenie o wkładzie merytorycznym autorów w opracowaniu publikacji

Marta Modrzewska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno- Spożywczego w Warszawie im. prof. Wacława Dąbrowskiego Państwowy Instytut Badawczy

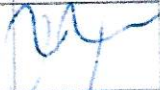
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Antagonistic properties against *Fusarium sporotrichioides* and glycosylation of HT-2 and T-2 toxins by selected *Trichoderma* strains

Scientific Reports 2024, 14(1), 5865, DOI: 10.1038/s41598-024-55920-x

Marta Modrzewska, Dominik Popowski, Lidia Błaszczyk, Łukasz Stępień, Monika Urbaniak, Marcin Bryła, Benedikt Cramer, Hans-Ulrich Humpf, Magdalena Twarużek

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Afilacja	Podpis Autora
1	Modrzewska Marta	Koncepcja, metodologia, walidacja, analiza formalna, badania, analiza danych, opracowanie i przygotowanie manuskryptu, edycja	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, IBPRS-PIB, Warszawa, Polska	
2	Dominik Popowski	metodologia, analiza formalna, analiza danych, korekta, nadzór merytoryczny	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, IBPRS-PIB, Warszawa, Polska	
3	Błaszczyk Lidia	Metodologia, analiza formalna, badania, zasoby, analiza danych	Zakład Mikrobiomiki Roślin, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Polska	
4	Stępień Łukasz	Metodologia, analiza formalna, zasoby, korekta	Zakład Interakcji Roślina-Patogen, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Polska	
5	Urbaniak Monika	Badania	Zakład Interakcji Roślina-Patogen, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, Polska	
6	Bryła Marcin	Koncepcja, metodologia, analiza formalna, zasoby, korekta, nadzór merytoryczny	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, IBPRS-PIB, Warszawa, Polska	
7	Benedikt Cramer	Zasoby, korekta, nadzór merytoryczny	Instytut Chemii Żywności, Westfalski Uniwersytet Wilhelma w Münsterze, Münster, Niemcy	
8	Hans-Ulrich Humpf	Zasoby, korekta, nadzór merytoryczny	Instytut Chemii Żywności, Westfalski Uniwersytet Wilhelma w Münsterze, Münster, Niemcy	
9	Magdalena Twarużek	korekta, nadzór merytoryczny	Katedra Fizjologii i Toksykologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz, Polska	

8.4. PUBLIKACJA 4 [P4]

Impact of selected *Trichoderma* isolates on metabolomic profiles of two *Fusarium proliferatum* strains

Modrzewska, M., Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A., Urbaniak, M., Bryła, M.

(publikacja w recenzji/ nieopublikowana)

Rozszerzenie badań opisanych w [P2] i [P3] o interakcje *Trichoderma* z *F. proliferatum* ma istotne znaczenie. Patogen ten infekując rośliny kukurydzy przyczynia się do istotnych strat w plonowaniu ziarna a także ma wpływ na bezpieczeństwo żywności i pasz. Gatunek ten wraz z *F. verticilloides* biosyntetyzuje mykotoksyny m.in. fumonizyny, które zostały sklasyfikowane przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) jako potencjalne czynniki rakotwórcze (grupa 2B). Zrozumienie wpływu *Trichoderma* na rozwój tego patogenu oraz jego zdolność do biosyntezy mykotoksyn może przyczynić się do optymalizacji strategii biokontroli, co w konsekwencji pozwoli na zminimalizowanie ryzyka skażenia produktów rolnych mykotoksynami.

Celem badań opisanych w [P4] była ocena właściwości antagonistycznych wybranych szczepów *Trichoderma*, ich zdolności do hamowania biosyntezy mykotoksyn oraz wpływu na profil metabolomiczny *F. proliferatum* (PEA1 i PEA2). Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów regulujących oraz procesów degradacji mykotoksyn, co ma kluczowe znaczenie dla opracowania skutecznych strategii monitorowania i kontroli bezpieczeństwa żywności. W konsekwencji, badania te mogą stanowić podstawę do wdrażania innowacyjnych metod ochrony upraw oraz przyczynić się do zwiększenia globalnego bezpieczeństwa żywnościowego. W badaniu wykorzystano UHPLC-HRMS do analizy mykotoksyn oraz cyfrową PCR (dPCR) do oceny inhibicji wzrostu *F. proliferatum* w obecności szczepów *Trichoderma*. Dodatkowo przeprowadzono analizę profili metabolomicznych, aby określić zmiany w metabolizmie grzybów pod wpływem wzajemnych interakcji. Uzyskane wyniki pozwoliły na kompleksową ocenę wpływu *Trichoderma* na wzrost, biosyntezę mykotoksyn i procesy biotransformacyjne *F. proliferatum*.

Przeprowadzone badania umożliwiły identyfikację potencjalnych szczepów *Trichoderma* (AN609, AN153, AN215, AN523), które mogą pełnić rolę czynników biokontroli wobec patogenicznych szczepów *F. proliferatum*. Wyniki uzyskane w ramach wszystkich przeprowadzonych eksperymentów, obejmujących wizualną ocenę antagonizmu, analizę zdolności do redukcji biosyntezy mykotoksyn oraz ilościową ocenę DNA komórek *Fusarium* w podłożach hodowlanych, wskazują na wysoką efektywność konkurencyjną wytypowanych szczepów *Trichoderma* w stosunku do patogenu, co wspiera hipotezę [H1] dotyczącą ich właściwości antagonistycznych.

Zaobserwowano jednak obniżoną skuteczność badanych antagonistów w przypadku szczepów *Fusarium* charakteryzujących się wyższym potencjałem

toksynotwórczym. Ponadto, w ko-kulturach stwierdzono wzrost zawartości zhydrolizowanych i częściowo zhydrolizowanych fumonizyn w porównaniu do próbek kontrolnych zawierających jedynie *Fusarium*, co może sugerować zdolność szczepów *Trichoderma* do degradacji fumonizyn, zgodnie z hipotezą [H3]. Jednakże wyniki niezależnego eksperymentu, w którym *Trichoderma* hodowano na płynnym podłożu z dodatkiem FB1, nie potwierdziły tej zależności, co wskazuje na potrzebę dalszych badań w tym zakresie.

Dodatkowo, w ko-kulturach wykryto obecność koprogeneru B, związków fenolowych oraz 6-pentyl-2H-piran-2-on (6PP), co sugeruje udział tych substancji w mechanizmach antagonizmu *Trichoderma* wobec *F. proliferatum*. Analiza ekstraktów pochodzących wykazała obecność związków o silnym działaniu przeciwgrzybiczym, takich jak 6PP i związki fenolowe, które mogą destabilizować ścianę komórkową *Fusarium*. Częściowo potwierdzono również hipotezę [H2], ponieważ *Trichoderma* może wpływać na biosyntezę mykotoksyn, jednak w przypadku szczepów o wysokim potencjale toksynotwórczym zaobserwowano wzrost zawartości zhydrolizowanych fumonizyn. Konieczne są dodatkowe analizy w celu identyfikacji kluczowych enzymów oraz określenia warunków sprzyjających skutecznej biotransformacji mykotoksyn przez *Trichoderma*.

PUBLIKACJA 4 [P4]

Impact of selected Trichoderma isolates on metabolomic profiles of two Fusarium proliferatum strains

Modrzewska, M., Popowski, D., Błaszczuk, L., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A., Urbaniak, M., Bryła, M.

(publikacja w recenzji/ nieopublikowana)

Str. 112 – 154

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Interference with mycotoxin biosynthesis and metabolomic profiles of pathogenic *Fusarium proliferatum* as a manifestation of antagonistic abilities of *Trichoderma* spp.

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID	jf-2025-04275s
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	06-Apr-2025
Complete List of Authors:	Modrzewska, Marta; Prof Wacław Dąbrowski Institute of Agriculture and Food Biotechnology - State Research Institute, Department of Food Safety and Chemical Analysis Popowski, Dominik ; Prof Wacław Dąbrowski Institute of Agriculture and Food Biotechnology - State Research Institute, Department of Food Safety and Chemical Analysis Błaszczak, Lidia ; Institute of Plant Genetics Polish Academy of Sciences Stepień, Łukasz; Institute of Plant Genetics Polish Academy of Sciences Waśkiewicz, Agnieszka; Poznań University of Life Sciences, 3Department of Chemistry Urbaniak, Monika; Institute of Plant Genetics Polish Academy of Sciences Bryła, Marcin; Prof Wacław Dąbrowski Institute of Agriculture and Food Biotechnology - State Research Institute, Department of Food Safety and Chemical Analysis

SCHOLARONE™
Manuscripts

Oświadczenie o procentowym udziale autorów w opracowaniu publikacji

Marta Modrzewska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Wacława Dąbrowskiego– Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

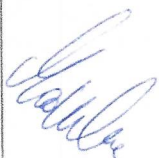
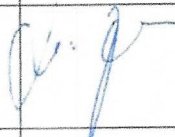
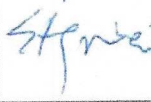
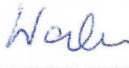
Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

“Interference with mycotoxin biosynthesis and metabolomic profiles of pathogenic *Fusarium proliferatum* as a manifestation of antagonistic abilities of *Trichoderma* spp.”

Modrzewska Marta, Popowski Dominik, Błaszczyk Lidia, Stępień Łukasz, Waśkiewicz Agnieszka,

Urbaniak Moniak, Bryła Marcin

Publikacja w recenzji, wysłana 6 kwietnia 2025 r. do *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Lp.	Nazwisko i imię	Udział procentowy	Rodzaj aktywności	Afiliacja	Podpis Autora
1.	Modrzewska Marta	60 %	Zaprojektowanie eksperymentów, prowadzenie eksperymentów, zbieranie danych, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, opracowanie grafik i tabel, przygotowanie abstraktu graficznego	IBPRS-PIB	
2.	Popowski Dominik	10 %	Zaprojektowanie eksperymentów, prowadzenie eksperymentów, zbieranie danych, analizy statystyczne, korekta manuskryptu, opieka merytoryczna	IBPRS-PIB	
3.	Błaszczyk Lidia	10 %	Zaprojektowanie eksperymentów, prowadzenie eksperymentów, zbieranie danych, przygotowanie i korekta manuskryptu	Instytut Genetyki Roślin PAN	
4.	Stępień Łukasz	6 %	Zaprojektowanie eksperymentów, prowadzenie eksperymentów, zbieranie danych, przygotowanie i korekta manuskryptu	Instytut Genetyki Roślin PAN	
5.	Waśkiewicz Agnieszka	1 %	Korekta manuskryptu	Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu	
6.	Urbaniak Moniak	1 %	Prowadzenie eksperymentów i zbieranie danych	Instytut Genetyki Roślin PAN	
7.	Bryła Marcin	12 %	Pozyskanie funduszy, zarządzanie projektem, zaprojektowanie eksperymentów, przygotowanie manuskryptu, opieka merytoryczna	IBPRS-PIB	

9. Materiały uzupełniające

9.1. Cel i powiązanie z publikacjami

Przeprowadzone badania stanowią kontynuację i uzupełnienie eksperymentów przeprowadzonych w [P2], [P3] i [P4], w których zbadano antagonistyczne właściwości wybranych szczepów *Trichoderma* wobec patogenów z rodzaju *Fusarium*, takich jak *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. sporotrichioides* i *F. proliferatum*. Badania z wykorzystaniem analizy ilościowej DNA patogenu umożliwiły precyzyjne określenie wpływu *Trichoderma* na dynamikę populacji patogenów, co stanowi istotne uzupełnienie wcześniejszych obserwacji, koncentrujących się głównie na ocenie makroskopowej stref inhibicji wzrostu. Ponadto, analiza metaboliczna przeprowadzona w tych badaniach dostarczyła nowych danych na temat szlaków biochemicznych zaangażowanych w hamowanie wzrostu patogenu oraz biotransformację mykotoksyn.

9.2. Omówienie i dyskusja wyników

Wpływ *Trichoderma* na proliferację *Fusarium* w ko-kulturach

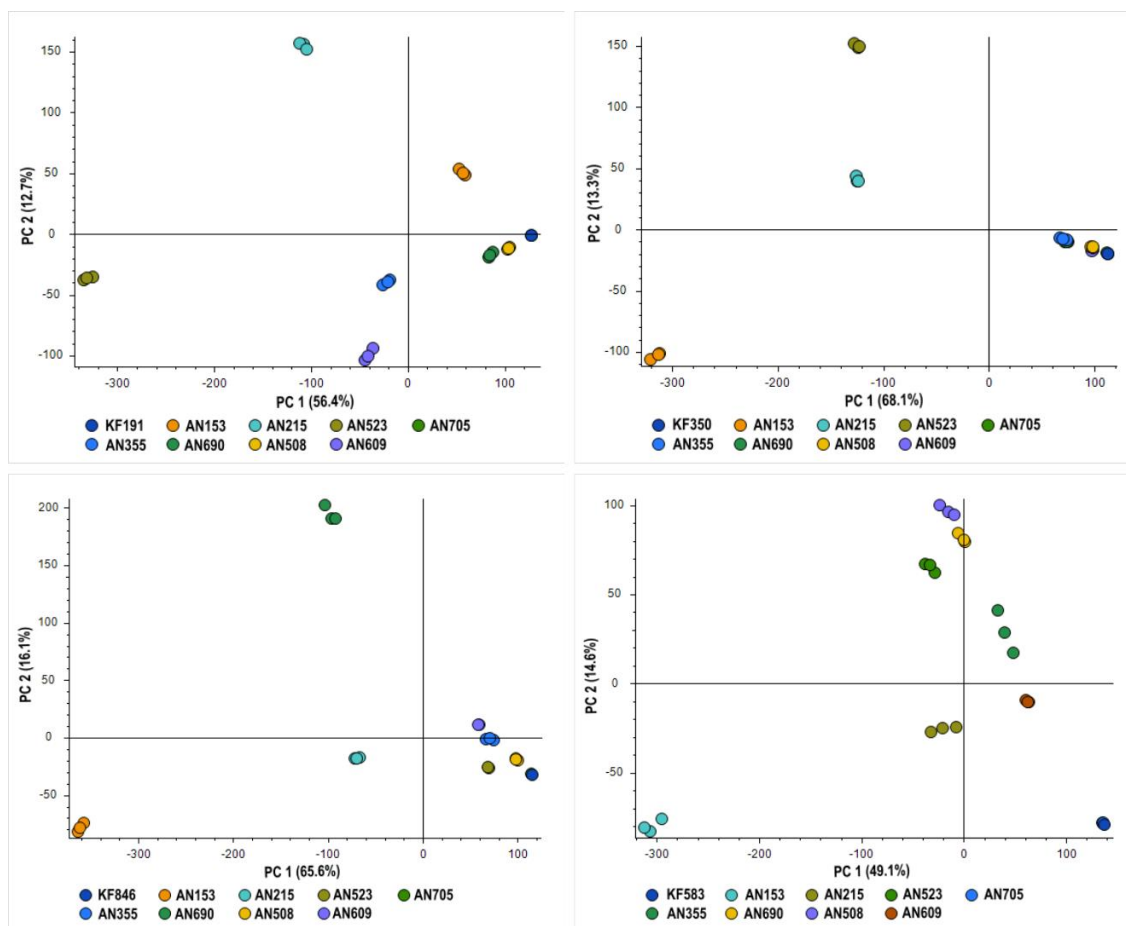
Badania przeprowadzone dla szczepów *Fusarium* KF191, KF350, KF846 i KF583, stanowiące uzupełnienie wcześniejszych eksperymentów opisanych w [P2], potwierdzają istotny wpływ *Trichoderma* na ograniczenie proliferacji patogenu na ziarnach ryżu (Tab.1).

Tab. 1. Stężenia DNA patogenu [kopie/ μ L] w mono- i ko-kulturach na ziarnach ryżu oraz procent redukcji zawartości DNA patogenu [%] oszacowane na podstawie dPCR.

	KF191		KF350		KF846		KF583	
Próbka	C [kopie DNA/ μ L]	R [%]	C [kopie DNA/ μ L]	R [%]	C [kopie DNA/ μ L]	R [%]	C [kopie DNA/ μ L]	R [%]
Kontrola	547,5	-	2764,5	-	4587,3	-	2622,3	-
AN355	0	100	4,934	99,8	2,312	99,9	0,752	100
AN690	3,83	99,1	5,224	99,8	0,38	100	0,384	100
AN508	6,035	99	16,5	99,4	6,474	99,8	0,38	100
AN609	0	100	15,29	99,4	1,898	99,9	1,139	99,9
AN153	5,904	98,9	0,706	100	0,359	100	0,371	100
AN215	0	100	1,01	99,9	0,693	100	0,716	100
AN523	0,347	99,8	0,707	100	2,536	99,9	0,372	100
AN705	2301,8	(-) 312	3350,4	(-) 21,2	3949,7	13,9	799,3	69,5

Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje przedstawione w [P2], wskazujące, że redukcja stężenia toksyn biosyntetyzowanych przez *Fusarium* w ko-kulturach z *Trichoderma* wynika przede wszystkim z zahamowania wzrostu i proliferacji patogenu. Mechanizm działania szczepów *Trichoderma* może opierać się na konkurencji o składniki odżywcze, syntezie związków przeciwdrobnoustrojowych, takich jak metabolity wtórne, oraz modyfikacji warunków mikrośrodowiskowych, które skutecznie ograniczają rozwój *Fusarium* i jego aktywność metaboliczną.

W przypadku wszystkich analizowanych szczepów *Fusarium*, szczepy *Trichoderma* AN153 i AN215 wykazały zbliżony i silny wpływ na profil metaboliczny w układach patogen-antagonista, co znajduje odzwierciedlenie w ich pozycjonowaniu na wykresach PCA w oddaleniu od kontroli *Fusarium* (Rys. 6). Wyniki te znajdują odzwierciedlenie z wynikami analizy dPCR (Tab. 1), które potwierdzają ich wysoką skuteczność w redukcji proliferacji patogenów, sugerując ich wysoce efektywną rolę w kontrolowaniu wzrostu *Fusarium*. Hewedy i wsp. (2020) wykazali, że różnorodność genetyczna izolatów *Trichoderma* miała kluczowe znaczenie dla ich skuteczności przeciwko *F. oxysporum*. Podobnie jak w tych badaniach, uzyskane wyniki potwierdziły, że wybór odpowiedniego szczepu *Trichoderma* miał fundamentalne znaczenie dla efektywnego zarządzania chorobami roślin spowodowanymi przez *Fusarium*. Szczepy AN705 w przeprowadzonych badaniach okazały się mniej skuteczne lub wręcz sprzyjały wzrostowi patogenów. Podkreśla to jak ważne jest dokładne zrozumienie specyficznych mechanizmów działania każdego szczepu. Porównując uzyskane wyniki z badaniami przeprowadzonymi przez Mironenka i wsp. (2021), można zauważyć analogię w mechanizmach działania metabolitów *Trichoderma*. Autorzy wykazali, że metabolity wytwarzane przez *T. harzianum* mogą prowadzić do zakłóceń w szlakach metabolicznych *F. culmorum*, skutkując zahamowaniem wzrostu, sporulacji oraz syntezy kluczowych mykotoksyn, takich jak ZEN. Podobne mechanizmy zaobserwowano w przeprowadzonych badaniach, co sugeruje, że wybrane szczepy *Trichoderma* mają zdolność do modulowania metabolizmu patogenów w sposób skutecznie ograniczający biosyntezę toksyn. Z kolei, Braun i wsp. (2018) wykazali, że biosynteza mykotoksyn przez patogeny w warunkach konkurencji z *Trichoderma* była hamowana na poziomie transkrypcji. Oznacza to, że *Trichoderma* może oddziaływać na szlaki regulacyjne kontrolujące klastry genów odpowiedzialnych za biosyntezę mykotoksyn, co prowadzi do zmniejszenia lub całkowitego zahamowania wytwarzania tych związków w trakcie interakcji między mikroorganizmami.



Rys. 6. Analiza składowych głównych pokazująca grupowanie i separację profili metabolicznych *Fusarium* i *Trichoderma* w ko-kulturach na ziarnach ryżu. Kolejno od góry KF 191, KF 350, KF 846, KF 583; patogen (monokultura) oraz ko-kultury patogen-antagonista: AN153, AN215, AN523, AN705, AN355, AN690, AN508, AN609.

Wyniki doświadczenia wskazujące na wzrost proliferacji DNA patogenu w obecności szczepu AN705 mogą być efektem złożonych interakcji między mikroorganizmami. Jednym z możliwych wyjaśnień wzrostu ilości DNA patogenu w obecności AN705 jest produkcja metabolitów wtórnych lub bioaktywnych związków przez AN705, które niezamierzenie wspierały rozwój patogenu. Jak wskazują badania Serrano i wsp. (2017), interakcje mikroorganizmów w ko-kulturach mogą aktywować ukryte szlaki biosyntetyczne, prowadząc do produkcji metabolitów modulujących warunki środowiskowe w podłożu. Zmiany te, takie jak modyfikacja pH czy dostarczanie dodatkowych składników odżywczych, mogły sprzyjać namnażaniu patogenu. Dalsze badania są konieczne do zidentyfikowania tych mechanizmów. Jednak w warunkach polowych skuteczność AN705 może być jednak inna ze względu na większą złożoność ekosystemu (Zhang, Y. i wsp. 2020). Pola uprawne stanowią dynamiczne środowisko zasiedlane przez liczne mikroorganizmy, które mogą konkurować z patogenem o przestrzeń i składniki odżywcze (Coban i wsp. 2022). Dlatego przyszłe badania w rzeczywistych warunkach środowiskowych są niezbędne, aby ocenić potencjał

szczepów w praktyce rolniczej oraz rzeczywisty wpływ na mikrobiom gleby i zdrowotność roślin.

W badaniach metabolomicznych, analiza jakościowa ko-kultur *Trichoderma* i *Fusarium* ujawniła obecność kwasów fenolowych, kwasów karboksylowych, pochodnej laktonu oraz sideroforów (Tab. 2; Rys. 7). Zawartość niektórych z tych związków w ko-kulturach była wyższa niż w przypadku próbek kontrolnych (monokultura *Fusarium*), co może świadczyć o ich szczególnej roli w procesie ograniczania wzrostu patogenu.

Tab. 2. Wykaz metabolitów obecnych w ko-kulturach patogen-antagonista na stałym podłożu ryżowym. m/z – stosunek masy do ładunku

Analit	Jon prekursorowy [m/z]	Jony fragmentacyjne [m/z]	Literatura
Kwas izoferulowy	193.0498 [M-H] ⁻	149.0592; 134.0359	Shu i wsp. 2025
Kwas kawowy	179.0692 [M-H] ⁻	135.0801; 78.8546	Zhang i wsp. 2018
Kwas jasmonowy	209.1165 [M-H] ⁻	165.1272	Enomoto 2022
Kwas cytrynowy	191.0181 [M-H] ⁻	111.0079; 85.0288; 87.0084	Bylund i wsp. 2007
Koprogen B	727.3871 [M-H] ⁺	243.1338; 355.1808; 615.3328	Antelo i wsp. 2006
6PP	167.1060 [M-H] ⁺	121.101; 149.096; 131.0855 95.085	Torres-Ortega i wsp. 2022

Wiele z tych metabolitów może pełnić funkcje regulacyjne i komunikacyjne, co czyni je kluczowymi elementami w interakcjach antagonistycznych między tymi mikroorganizmami. Metabolity sygnałowe mogą odgrywać istotną rolę zarówno w modulowaniu wzrostu *Fusarium*, jak i we wspieraniu mechanizmów obronnych *Trichoderma* (Alfíky i Weisskopf 2021). Ich obecność może wskazywać na zdolność *Trichoderma* do adaptacji w warunkach konkurencyjnych poprzez indukcję odpowiedzi stresowych oraz komunikację antagonistyczną (Pandey i wsp. 2016).

Wyniki badań wykazujące obecność kwasów fenolowych, w tym kwasu izoferulowego i kwasu kawowego, są zgodne z obserwacjami innych autorów. Tchameni i wsp. (2020) wykazali, że fenole oraz flawonoidy obecne w ko-kulturach *Trichoderma* i *Pythium myriotylum* odgrywają kluczową rolę w zahamowaniu wzrostu grzybni patogenu. Natomiast badania Garcia i wsp. (2024) potwierdziły, że kwas izoferulowy posiada silne właściwości przeciwgrzybicze i skutecznie hamuje rozwój patogenów takich jak *F. oxysporum* oraz *F. graminearum* (Yan i wsp. 2023; García i wsp. 2024). Yan i wsp. (2023) zaobserwowali, że kwas ferulowy prowadzi do zaburzeń w morfologii powierzchni komórkowej oraz struktur wewnątrzkomórkowych grzybów, co skutkuje uszkodzeniem integralności błony komórkowej i wyciekaniem jej zawartości, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki patogenu.

Kwas izoferulowy				
	KF191	KF350	KF846	KF583
AN153	—	—	n.w.	—
AN215	↑	↑	n.w.	↑
AN523	↑	↑	n.w.	↑
AN705	↑	↑	n.w.	↓
AN355	↑	↑	n.w.	↑
AN690	—	—	n.w.	↑
AN508	—	↑	n.w.	—
AN609	—	—	n.w.	—

Kwas kawowy				
	KF191	KF350	KF846	KF583
AN153	—	—	n.w.	—
AN215	↑	—	n.w.	—
AN523	—	—	n.w.	↑
AN705	—	—	n.w.	—
AN355	—	—	n.w.	↑
AN690	—	—	n.w.	—
AN508	—	—	n.w.	—
AN609	—	—	n.w.	—

Kwas jasmonowy				
	KF191	KF350	KF846	KF583
AN153	—	—	—	—
AN215	↑	↑	↑	↑
AN523	↑	↑	↑	↑
AN705	↑	↑	↑	—
AN355	↑	↑	↑	↑
AN690	—	—	—	—
AN508	—	—	—	↑
AN609	↑	—	—	—

Kwas cytrynowy				
	KF191	KF350	KF846	KF583
AN153	—	↓	—	—
AN215	↑	↑	↑	↑
AN523	↑	—	—	—
AN705	—	↓	—	↑
AN355	↑	↓	↑	↑
AN690	—	—	—	↓
AN508	↑	↑	↑	↑
AN609	↑	↑	↑	↑

Koprogen B				
	KF191	KF350	KF846	KF583
AN153	—	—	—	↑
AN215	↑	↑	↑	↑
AN523	↑	—	↑	↑
AN705	—	↓	—	—
AN355	↑	—	↓	↑
AN690	—	—	↑	↓
AN508	↑	↑	↑	↑
AN609	↑	↑	↑	↑

6PP				
	KF191	KF350	KF846	KF583
AN153	—	—	—	↓
AN215	↑	↑	↑	↑
AN523	↑	↑	↑	↓
AN705	↑	↑	↑	—
AN355	↑	↑	↑	—
AN690	↑	—	—	↑
AN508	↑	↑	↑	↑
AN609	↑	—	—	↑

Rys. 7. Metabolity obecne w ko-kulturach patogen-antagonista. (↑) - wzrost odpowiedzi (mierzonej intensywności jonu) metabolitu w ko-kulturze w stosunku do kontroli; (↓) - spadek odpowiedzi (mierzonej intensywności jonu) metabolitu w ko-kulturze w stosunku do kontroli; (—) - brak zmiany odpowiedzi metabolitu w ko-kulturze w stosunku do kontroli; (n.w.) – metabolit nie wykryty.

W ko-kulturach *Trichoderma* i *Fusarium* wykazano obecność kwasu cytrynowego, co stanowiło istotny element związany z rozwojem *Trichoderma*. Jak wskazują badania Aishwarya i wsp. (2020), produkcja tego kwasu prowadzi do zakwaszenia środowiska, co z kolei zwiększa biodostępność dla *Trichoderma* kluczowych minerałów, takich jak fosfor, żelazo, cynk, mangan oraz miedź, tworząc zarazem niekorzystne warunki dla wzrostu patogenu. Podobne spostrzeżenia odnotowali Waghunde i wsp. (2016) oraz Kumar i Ashraf (2017), którzy podkreślili znaczenie konkurencji o składniki odżywcze jako mechanizmu antagonistycznego *Trichoderma*. Takie działanie *Trichoderma* mogło tworzyć warunki niekorzystne dla wzrostu *Fusarium*, ograniczając rozwój grzybni patogenu oraz jego zdolność do biosyntezy mykotoksyn, co istotnie wpływało na efektywność biokontroli tego patogenu.

Biorąc pod uwagę obecność kwasu jasmonowego w ko-kulturach *Trichoderma* i *Fusarium*, można postawić hipotezę, że *Trichoderma* może biosyntetyzować kwas jasmonowy jako część swojej reakcji obronnej, podobnie jak w przypadku produkcji dihydrojasmonianu metylu obserwowanego w badaniach Verma i wsp. (2024). Autorzy wykazali, że w ko-kulturze *F. chlamydosporum* z *T. harzianum*, doszło do biosyntezy nowych związków bioaktywnych. Wzmacnia to hipotezę, że obecność *Fusarium* może indukować *Trichoderma* do produkcji kwasu jasmonowego lub pokrewnych metabolitów, które mogą odgrywać kluczową rolę w aktywności antagonistycznej.

Z kolei, obecność koprogeneru B w ko-kulturach wskazuje na aktywne mechanizmy adaptacyjne *Trichoderma*, które odgrywają kluczową rolę w hamowaniu rozwoju *Fusarium* poprzez skuteczną konkurencję o żelazo. Jak wykazali Sood i wsp. (2020), w warunkach deficytu żelaza *Trichoderma* syntetyzuje siderofory, takie jak koprogen B, które chelatują żelazo z otoczenia, tworząc stabilne kompleksy zdolne do efektywnego transportu do wnętrza komórek grzyba. Biosynteza koprogeneru B nie tylko wspiera wzrost i rozwój *Trichoderma*, ale także znacząco ogranicza dostępność żelaza dla *Fusarium*, co może prowadzić do zahamowania wzrostu tego patogenu oraz redukcji zdolności do infekcji. Ponadto, Palmieri i wsp. (2023) potwierdzają, że niska dostępność żelaza, zwłaszcza w połączeniu z innymi stresującymi warunkami środowiskowymi, może znacząco ograniczać wzrost *Fusarium* oraz zmniejszać jego zdolność do biosyntezy mykotoksyn. Te obserwacje podkreślają kluczową rolę sideroforów u *Trichoderma* w biokontroli, które chelatując żelazo z podłoża, efektywnie ograniczają rozwój patogenów.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że ko-kultury *Fusarium* i *Trichoderma* prowadzą do zwiększonej biosyntezy 6PP, co mogło skutkować zahamowaniem proliferacji DNA patogenu oraz obniżeniem jego zdolności do biosyntezy mykotoksyn. Wyniki te sugerują, że 6PP odgrywa kluczową rolę w interakcjach antagonistycznych między tymi grzybami. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami Jin i wsp. (2020), 6PP wykazuje silne działanie przeciwgrzybicze wobec *Cylindrocarpon destructans*, zaburzając jego metabolizm, zwłaszcza metabolizm aminokwasów. Ponadto autorzy wykazali, że 6PP wpływa na ekspresję genu *ECHS1*, który pełni istotną funkcję w odpowiedzi komórkowej na stres, a jego inhibicja prowadzi do autofagii i śmierci komórek patogenu (Jin i wsp. 2020). Podobny mechanizm może zachodzić w przypadku *Fusarium*, co wskazuje na potencjalną funkcję 6PP jako naturalnego czynnika biokontroli, ograniczającego wzrost tego patogenu i redukującego biosyntezę mykotoksyn. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu są również zgodne z obserwacjami Liu i wsp. 2023, którzy wykazali, że 6PP skutecznie hamuje rozwój *Claviceps* spp. Liu i wsp. (2023) zaobserwowali, że 6PP nie tylko ogranicza wzrost grzybní, ale także wpływa na strukturę strzępek, zwiększa przepuszczalność błon komórkowych oraz moduluje aktywność enzymów odpornościowych patogenu. Podobny efekt może mieć miejsce w przypadku *Fusarium*, co sugeruje, że stres oksydacyjny oraz zaburzenia metaboliczne indukowane przez 6PP mogą stanowić mechanizm jego działania przeciwgrzybiczego. Zdolność *Trichoderma* do syntezy wymienionych związków stanowi ważny element ich mechanizmu antagonistycznego.

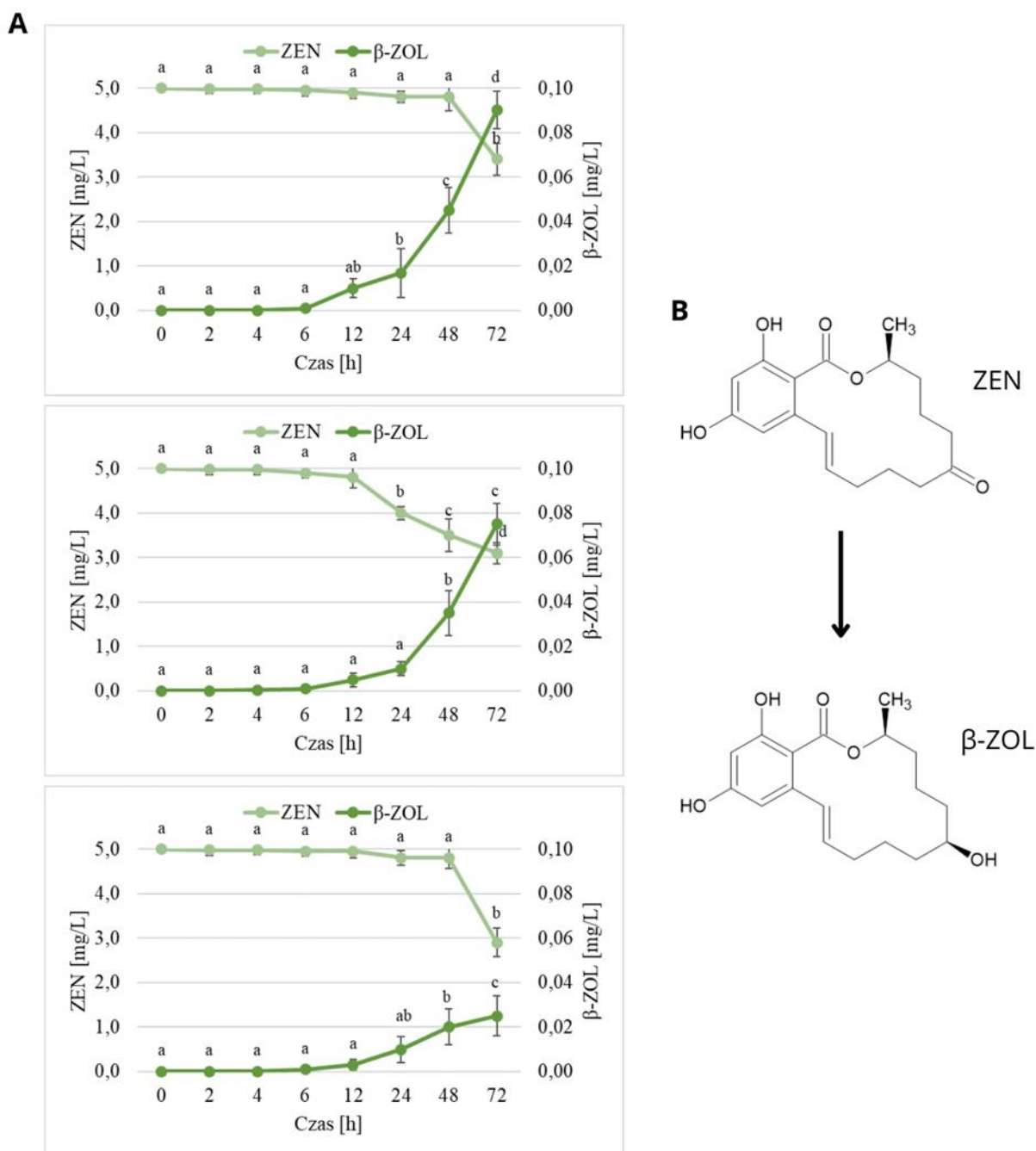
Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że hamowanie proliferacji *Fusarium* przez *Trichoderma* wynika z wieloaspektowych mechanizmów antagonistycznych. Zidentyfikowane metabolity wykazują zdolność do modulowania warunków środowiskowych, ograniczania dostępności kluczowych składników odżywczych oraz destabilizacji struktur komórkowych patogenu. Produkcja tych metabolitów przez *Trichoderma* wspiera adaptację tego organizmu do konkurencyjnych warunków oraz umożliwia skuteczną biokontrolę *Fusarium*.

Biotransformacja mykotoksyn *Fusarium* przez *Trichoderma*

W celu uzupełnienia badań metabolomicznych prowadzonych w warunkach ko-kultur oraz identyfikacji możliwych kierunków biotransformacji toksyn *Fusarium* przez grzyby *Trichoderma* przeprowadzono płynną hodowlę wybranych szczepów *Trichoderma* zawierającą w podłożu badane toksyny. W przeprowadzonych badaniach oceniono zdolność wybranych szczepów *Trichoderma* do biotransformacji mykotoksyn syntetyzowanych przez *Fusarium*, w tym ZEN, DON, NIV oraz FB1. Szczególnie interesująca była zdolność tych szczepów do przekształcania ZEN w jego mniej toksyczny metabolit, β -ZOL (Rys. 8). Nie zaobserwowano obecności α -ZOL, 14-*O*-glukozydu zearalenonu oraz 14-*O*-siarczanu zearalenonu w próbkach, co może sugerować, że te metabolity nie są istotnymi produktami biotransformacji w analizowanych warunkach. Natomiast degradacja ZEN może polegać na bardziej skomplikowanych reakcjach, takich jak rozerwanie wiązania laktonowego w cząsteczce kwasu rezorcyklicznego, co może prowadzić do powstania różnorodnych prostszych związków.

W przypadku szczepu AN609, stężenie ZEN w płynie pohodowlanym spadło z początkowego poziomu 5 $\mu\text{g/mL}$ do 3,4 $\mu\text{g/mL}$ po 72 godzinach, co odpowiada 32% redukcji. Jednocześnie zaobserwowano wzrost stężenia β -ZOL do 0,09 $\mu\text{g/mL}$, co wskazuje na aktywną biotransformację ZEN do β -ZOL przez ten szczep. Szczep AN690 wykazał nieco niższą skuteczność, obniżając stężenie ZEN do 3 $\mu\text{g/mL}$ (30% redukcji) oraz zwiększając stężenie β -ZOL w podłożu do 0,08 $\mu\text{g/mL}$. Największą skuteczność w redukcji ZEN wykazał szczep AN153, redukując stężenie toksyny do 2,9 $\mu\text{g/mL}$ (42% redukcji), choć stężenie β -ZOL wzrosło jedynie do 0,03 $\mu\text{g/mL}$. Obserwacja ta może wynikać z różnic w ekspresji enzymów między szczepami lub szybkości przekształcania ZEN do β -ZOL. W kontekście wcześniejszych badań przedstawionych w publikacji [P2] które pokazały, że *Trichoderma* może ograniczać biosyntezę mykotoksyn *Fusarium*, wyniki te są zgodne z hipotezą, że *Trichoderma* nie tylko hamuje wzrost patogenu, ale także aktywnie przekształca mykotoksyny [H3]. Wyniki badań Tian i wsp. (2018), będące jednymi z niewielu dostępnych doniesień wskazują, że niektóre szczepy *Trichoderma*, takie jak *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum* i *T. virens*, mogą przekształcać ZEN do jego zredukowanych form α -ZOL i β -ZOL. Analogicznie, badane szczepy w realizowanym eksperymencie przekształcały ZEN do β -ZOL. Taki mechanizm degradacji może wpływać na stabilność i toksyczność ZEN dla mikroorganizmu w środowisku hodowlanym. Enzymy wytwarzane przez *Trichoderma*, mogą wykazywać selektywną aktywność katalityczną wobec grup funkcyjnych w pozycji β , co sugeruje, że

proces biotransformacji może być wynikiem selektywnej aktywności tych enzymów. Dodatkowo, β -ZOL może być bardziej stabilnym produktem w warunkach hodowlanych, co ogranicza jego dalszą konwersję do α -ZOL. Z uwagi na ograniczoną liczbę badań w tym zakresie, należy podkreślić potrzebę kontynuacji podjętych prac.



Rys. 8. A - Zmiany stężeń ZEN i β -ZOL w hodowlach płynnych, kolejno od góry AN609, AN690, AN153. Punkty oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,01$. B - Biotransformacja ZEN do β -ZOL. Opracowanie własne na podstawie Tian i wsp. 2018.

Równolegle przeprowadzono ocenę zdolności szczepów *Trichoderma* do biotransformacji mykotoksyn, takich jak DON, NIV oraz FB1. Analiza wyników wykazała, że w hodowlach *Trichoderma* z dodatkiem tych mykotoksyn o stężeniu 5 mg/L nie obserwowano ani obecności produktów biotransformacji, ani istotnej redukcji stężeń toksyn w ocenianych warunkach doświadczenia. Sugeruje to, że badane szczepy *Trichoderma* nie wykazywały zdolności do przekształcania i detoksykacji tych związków lub warunki hodowli nie były wystarczająco sprzyjające reakcji biotransformacji (np. czas hodowli, temperatura hodowli, brak obecności konkurenta w podłożu).

Należy jednak nadmienić, że w ko-kulturach *Trichoderma* z KF846, zaobserwowano powstawanie produktów biotransformacji DON, takich jak 3-*O*-glukozyd deoksyniwalenolu (DON-3G) [P2], podczas gdy tej substancji nie identyfikowano w próbkach kontrolnych. Obserwacja ta może być uwarunkowana złożonymi interakcjami pomiędzy konkurentami. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi przez Tian i wsp. (2016), które sugerują, że *Trichoderma* może inicjować glukozylację mykotoksyn, jak w przypadku DON, w odpowiedzi na obecność *Fusarium*. W badaniach tych DON-3G był wykrywany jedynie w ko-kulturach *Trichoderma* z *Fusarium*. Może to świadczyć o tym, że interakcje między tymi mikroorganizmami mogą indukować lub wspomagać procesy biotransformacji niektórych mykotoksyn (Tian i wsp. 2016). Nie należy również wykluczać hipotezy, że w warunkach stresowych (np. obecność konkurenta), *Fusarium* może inicjować biosyntezę DON-3G. Świadczyć może o tym brak metabolitów DON w podłożu hodowlanym z *Trichoderma* zawierającym DON. Co więcej, warto zauważyć, że Ni i wsp. 2019 wykazali, że profile metabolomiczne *T. asperellum* zmieniają się istotnie w zależności od czasu inkubacji, co świadczy o złożoności procesów życiowych. W zacytowanych badaniach 72-godzinna hodowla, w porównaniu do 24-godzinnej, charakteryzowała się spadkiem metabolizmu aminokwasów oraz wzrostem metabolizmu cukrów i lipidów, a także zmianami w produkcji flawanoli, alkaloidów i innych związków polifenolowych (Ni i wsp. 2019). Te obserwacje podkreślają, że warunki hodowli i stadium rozwoju *Trichoderma* determinowany czasem hodowli mogą mieć istotny wpływ na zdolność *Trichoderma* do skutecznej detoksykacji mykotoksyn.

Obserwacje dotyczące interakcji między *Fusarium* a *Trichoderma* wskazują na złożone i wieloaspektowe mechanizmy, które mogą prowadzić do biotransformacji mykotoksyn w ko-kulturach tych grzybów. Knowles i wsp. (2022) potwierdzą, że ko-kultura grzybów może indukować powstawanie nowych szlaków metabolicznych i biosyntezę nieznanych wcześniej metabolitów. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, interakcje między różnymi gatunkami grzybów mogą aktywować ukryte szlaki metaboliczne, które pozostają nieaktywne w warunkach monokultury (Wang, G. i wsp. 2022; Selegato i Casto-Gamboa 2023). Produkty biotransformacji (DON-3G) w ko-kulturach sugerują, że obecność *Fusarium* może stymulować *Trichoderma* do aktywacji specyficznych szlaków metabolicznych, które umożliwiają biotransformację mykotoksyn. Jest to zgodne z teorią Wu i wsp. (2019), że fizyczne i chemiczne interakcje między grzybami mogą odgrywać kluczową rolę w aktywacji mechanizmów, które w warunkach monokultury nie byłyby obserwowane. Możliwe, że sygnały chemiczne indukowane przez *Fusarium*, takie jak metabolity wtórne lub

produkty rozkładu komórkowego, indukują w *Trichoderma* syntezę enzymów odpowiedzialnych za detoksykację toksyn. Ponadto, *Trichoderma* jest znana ze swoich zdolności mykopasożytniczych, co umożliwia jej atakowanie *Fusarium* i degradację jego ścian komórkowych. Proces ten może uwalniać molekuły sygnałowe, które inicjują odpowiedzi metaboliczne w *Trichoderma*. Swain i Mukherjee (2020) opisali, że fizyczne interakcje między grzybami, takie jak konkurencja o zasoby, mogą prowadzić do zwiększonej produkcji metabolitów wtórnych. Natomiast Sharma i Sharma (2020) wskazali, że *Trichoderma* biosyntetyzuje metabolity wtórne, takie jak 6PP, co wspiera uzyskane przez nas obserwacje dotyczące biosyntezy związków przez *Trichoderma*, które mogą odgrywać istotną rolę w ograniczaniu aktywności patogenu i detoksykacji mykotoksyn.

10. Podsumowanie

10.1. Wnioski

Na podstawie zrealizowanych badań i uzyskanych wyników, sformułowano następujące wnioski:

- 1) Badane grzyby *Trichoderma* wyizolowane ze środowiska w polskich warunkach klimatycznych: *T. viride*, *T. viridescens*, *T. atroviride* mogą być potencjalnymi kandydatami w biokontroli roślin zbożowych przeciwko patogenom z rodzaju *Fusarium*. W badaniach *in vitro* okazały się skuteczne w hamowaniu wzrostu *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. sporotrichioides*, *F. proliferatum* i *F. poae*.
- 2) Skuteczność *Trichoderma* w inhibicji wzrostu patogenu była nie tylko wysoka, ale również zróżnicowana. Zależała ona również od szczepów *Trichoderma* oraz *Fusarium*. Skuteczność preparatów *Trichoderma* przeciwko *Fusarium* uzależniona była również od potencjału toksynotwórczego patogenu.
- 3) Analiza genomowego DNA patogenu w ko-kulturach wykazała, że zdolność *Trichoderma* do hamowania biosyntezy mykotoksyn przez *Fusarium* wynikała z potencjału *Trichoderma* do ograniczenia namnażania się grzybni patogenu.
- 4) Wspólne hodowle prowadzą do biosyntezy specyficznych wtórnych metabolitów, nieobecnych w monokulturach, unikatowych dla danej kombinacji szczepów *Trichoderma* i *Fusarium*. Interakcja *Trichoderma* i *F. culmorum* prowadziła do biotransformacji DON poprzez glukozylację (DON-3G). Natomiast interakcja *Trichoderma* i *F. proliferatum* prowadziła do hydrolizy bądź częściowej hydrolizy FB₁, FB₂ oraz FB₃.
- 5) *Trichoderma* wykazuje silne właściwości antagonistyczne wobec patogenów z rodzaju *Fusarium*, zarówno poprzez bezpośrednie działanie grzybobójcze, takie jak biosynteza 6PP, jak i pośrednie mechanizmy, w tym konkurencję o zasoby, zakwaszanie środowiska oraz produkcję sideroforów, które ograniczają dostępność żelaza dla *Fusarium*.
- 6) Po raz pierwszy zaobserwowano w hodowli *Trichoderma* z *F. sporotrichioides* obecność produktów biotransformacji toksyn HT-2 i T-2 (pochodne glukozydowe jako anomery α i/lub β , tj. T-2-3 α -G, HT-2-3 α -G i HT-2-3 β -G). Obserwacje te potwierdziły się podczas hodowli płynnej *Trichoderma* zawierającej w podłożu toksynę T-2, w czasie której toksyna T-2 była wydajnie przekształcana do T-2-3 α -G. Natomiast *Trichoderma* nie miała potencjału biotransformacji toksyny T-2 do T-2-3 β -G co związane było z brakiem zdolności tych grzybów do glukozylacji toksyny T-2 w pozycji 3 β .

- 7) Analogiczne badania przeprowadzone dla ZEN wykazały, że *Trichoderma* biotransformuje w niewielkim stopniu ZEN do β -ZOL, natomiast odpowiedzialna była za częściowy rozkład ZEN do bliżej nieokreślonych metabolitów.

10.2. *Trichoderma* w aspekcie bezpieczeństwa żywności

Uzyskane wyniki badań mają istotne znaczenie dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności z dwóch powodów. Po pierwsze, jako środek biokontroli *Fusarium*, *Trichoderma* w uprawach roślin zbożowych może ułatwiać wdrażanie zrównoważonych praktyki rolniczych, zmniejszając zależność od chemicznych środków ochrony roślin oraz poprawiając strukturę gleby oraz zapewniając jej bioróżnorodność. Po drugie, infekcjom grzybowym roślin zbożowych, bardzo często towarzyszy biosynteza toksycznych mykotoksyn. Ich rola w patogenezie roślin związana jest z wirulencją do rośliny w celu łatwiejszego skolonizowania jej przez patogen. Zrealizowane badania w warunkach *in vitro* mogą sugerować, że mechanizm biotransformacji mykotoksyn (widoczny szczególnie

w przypadku toksyn HT-2 i T-2) może pełnić istotną rolę w łagodzeniu przebiegu infekcji w warunkach *in vivo* (procesy biotransformacji przyczyniają się do powstania metabolitów II fazy, których toksyczność zarówno dla ludzi i roślin jest na ogół niższa). Stosowanie zatem *Trichoderma* jako środka biokontroli może również znacząco zmniejszyć poziom toksyn *Fusarium* w ziarnie zbóż. Perspektywiczne wydaje się również wykorzystanie *Trichoderma* w procesach biotechnologicznych, takich jak fermentacja tlenowa. Fermentacja z wykorzystaniem tych mikroorganizmów może być pomocna w detoksykacji surowców paszowych, w czasie której może zachodzić biokonwersja mykotoksyn do mniej toksycznych form. Preparaty oparte na grzybach *Trichoderma* z jednej strony wykazują zdolność do biosyntezy enzymów, które mogą poprawiać strawność paszy, z drugiej zaś mogą pomóc zmniejszać ryzyko akumulacji mykotoksyn, a przez to ograniczyć ich obecność w łańcuchu żywnościowym.

10.3. Kierunki przyszłych badań

Dalsze badania nad szlakami metabolicznymi grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji i transformacji mykotoksyn fuzaryjnych powinny koncentrować się na kilku kluczowych obszarach, aby w pełni wykorzystać potencjał tych mikroorganizmów w biokontroli mykotoksyn i poprawie bezpieczeństwa żywności. Przede wszystkim, niezbędne jest przeprowadzenie badań mających na celu izolację i szczegółową charakterystykę enzymów *Trichoderma* odpowiedzialnych za biotransformację mykotoksyn, ze szczególnym naciskiem na enzymy takie jak glukozylotransferazy, oksydoreduktazy i hydrolazy. Równocześnie, analiza ekspresji genów kodujących te enzymy w różnych warunkach środowiskowych, przy użyciu technik transkryptomicznych i proteomicznych, umożliwi zidentyfikowanie kluczowych czynników transkrypcyjnych i regulatorowych. Przeprowadzenie kontrolowanych eksperymentów polowych w różnych warunkach klimatycznych i glebowych jest kluczowe dla oceny skuteczności szczepów *Trichoderma* w biokontroli *Fusarium* w warunkach *in vivo* i stopnia zanieczyszczenia ziarna zbóż mykotoksynami zaraz po

zbiorach. Ponadto ważne jest zrozumienie długoterminowego wpływu stosowania tych preparatów na zdrowie roślin i dynamikę populacji patogenów w glebie. Badania powinny również uwzględniać wpływ *Trichoderma* na mikrobiom glebowy i jego interakcje z innymi mikroorganizmami, co może dostarczyć ważnych informacji na temat ekologicznych konsekwencji tego działania.

Podsumowując, wdrożenie *Trichoderma* w systemy produkcji żywności oraz rozwój nowych strategii biokontroli fitopatogenicznych gatunków *Fusarium* mogą znacząco przyczynić się do poprawy jakości i bezpieczeństwa żywności, co ma kluczowe znaczenie dla zdrowia publicznego i zrównoważonego rolnictwa.

11. Spis piśmiennictwa

Książki

El Enshasy, H.A. et al. (2020). *Trichoderma*: Biocontrol Agents for Promoting Plant Growth and Soil Health. In: Yadav, A., Mishra, S., Kour, D., Yadav, N., Kumar, A. (eds) *Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48474-3_8

Kumar, M., Ashraf, S. Role of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of Fungal Plant Pathogens. In: Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (eds) *Probiotics and Plant Health*. Springer, Singapore 2017, 497-506. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_23

Paloheimo, M., Haarmann, T., Mäkinen, S., Vehmaanperä, J. Production of industrial enzymes in *Trichoderma reesei*. Schmoll, M., Dattenböck, C. *Gene expression systems in fungi: advancements and applications*, Springer, Cham, 2016, 23-57. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27951-0_2

Pandey, V., Shukla, A., Kumar, J. (2016). Physiological and Molecular Signalling Involved in Disease Management Through *Trichoderma*: An Effective Biocontrol Paradigm. In: Kumar, P., Gupta, V., Tiwari, A., Kamle, M. (eds) *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_14

Petronaitis, T., Simpfendorfer, S., Hüberli, D. (2021). Importance of *Fusarium* spp. in Wheat to Food Security: A Global Perspective. In: Scott, P., Strange, R., Korsten, L., Gullino, M.L. (eds) *Plant Diseases and Food Security in the 21st Century*. Plant Pathology in the 21st Century, vol 10. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57899-2_7

Poveda, J. *Trichoderma* role in anthropogenic pollutions mycoremediation: pesticides and heavy metals. Amaresan, N., Sankaranarayanan, A., Dwivedi, M. K., Druzhinina, I. S. *Advances in Trichoderma Biology for Agricultural Applications*, Springer, Cham, 2022, 465-497. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3_18

Sharma, I. P., Sharma, A. K. *Trichoderma–Fusarium* interactions: a biocontrol strategy to manage wilt. Sharma, I. P., Sharma, A. K. *Trichoderma*. *Rhizosphere Biology*. Springer, Singapore, 2020, 167-185. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_9

Swain, H., Mukherjee, A. K. Host–pathogen–trichoderma interaction. Sharma, I. P., Sharma, A. K. *Trichoderma*. *Rhizosphere Biology*. Springer, Singapore, 2020, 149-165. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_8

Ukhurebor, K.E., Aigbe, U.O., Onyancha, R.B., Adetunji, C.O. (2021). Climate Change and Pesticides: Their Consequence on Microorganisms. In: Adetunji, C.O., Panpatte, D.G., Jhala, Y.K. (eds) Microbial Rejuvenation of Polluted Environment. Microorganisms for Sustainability, vol 27. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7459-7_5

Artykuly

Abdenaceur, R. et al. (2022). Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. International Microbiology, 25(4), 817-829. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00263-8>

Abeyratne, G. D. D., Deshappriya, N. (2018). The effect of pH on the biological control activities of a *Trichoderma* sp. against *Fusarium* sp. isolated from the commercial onion fields in Sri Lanka. Tropical Plant Research, 5(2), 121-128. <https://doi.org/10.22271/tpr.2018.v5.i2.017>

Aishwarya, S., Viswanath, H. S., Singh, A., Singh, R. (2020). Biosolubilization of different nutrients by *Trichoderma* spp. and their mechanisms involved: a review. International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology, 7(6), 34-39.

Albuquerque, D. R., Patriarca, A., Pinto, V. F. (2021). Can discrepancies between *Fusarium graminearum* trichothecene genotype and chemotype be explained by the influence of temperature in the relative production of 3-ADON and 15-ADON?. Fungal Biology, 125(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.004>

Alfiky, A., Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. Journal of Fungi, 7(1), 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>

Andrés, P. A., Alejandra, P. M., Benedicto, M. C., Nahuel, R. I., Clara, B. M. (2022). A Comparative Study of Different Strains of *Trichoderma* under Different Conditions of Temperature and pH for the Control of *Rhizoctonia solani*. Agricultural Sciences, 13(6), 702-714. <https://doi.org/10.4236/as.2022.136046>

Antelo, L. et al. (2006). Siderophores produced by *Magnaporthe grisea* in the presence and absence of iron. Zeitschrift für Naturforschung C, 61(5-6), 461-464. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-5-626>

Bahram, M., Netherway, T. (2022). Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, 46(2), fuab058. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058>

Bala, I. A. et al. (2023). Effects of Blue-Light Laser Irradiation on the Enzymatic Activities and Sporulation of *Trichoderma atroviride* Grown on Rice Husks. Applied Sciences, 13(16), 9191. <https://doi.org/10.3390/app13169191>

- Basílio, F. et al. (2022). Multiple modes of action are needed to unlock soil phosphorus fractions unavailable for plants: The example of bacteria-and fungi-based biofertilizers. *Applied Soil Ecology*, 178, 104550. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104550>
- Bebber, D. P., Ramotowski, M. A. T., Gurr, S. J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, 3(11), 985–988. <https://doi.org/10.1038/nclimate1990>
- Belizán, M. M. et al. (2019). Influence of water activity and temperature on growth and production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* sensu stricto and related species in maize grains. *International journal of food microbiology*, 305, 108242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108242>
- Blandino, M. et al. (2017). Impact of sowing time, hybrid and environmental conditions on the contamination of maize by emerging mycotoxins and fungal metabolites. *Italian Journal of Agronomy*, 12(3). <https://doi.org/10.4081/ija.2017.928>
- Braun, H., et al. (2018). *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *International journal of food microbiology*, 280, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.021>
- Bryła, M., Waśkiewicz, A., Ksieniewicz-Woźniak, E., Szymczyk, K., Jędrzejczak, R. (2018). Modified *Fusarium* mycotoxins in cereals and their products—Metabolism, occurrence, and toxicity: An updated review. *Molecules*, 23(4), 963. <https://doi.org/10.3390/molecules23040963>
- Bylund, D., Norström, S. H., Essén, S. A., Lundström, U. S. (2007). Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1176(1-2), 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.064>
- Casu, A., Camardo Leggieri, M., Toscano, P., Battilani, P. (2024). Changing climate, shifting mycotoxins: A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(2), e13323. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13323>
- Cendoya, E. et al. (2021). Effect of fungicides commonly used for *Fusarium* head blight management on growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(1), 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.005>
- Chen, J. et al. (2020). Sphinganine-analog mycotoxins (SAMs): chemical structures, bioactivities, and genetic controls. *Journal of Fungi*, 6(4), 312. <https://doi.org/10.3390/jof6040312>
- Chen, J. et al. (2021). Research progress on fumonisin B1 contamination and toxicity: A review. *Molecules*, 26(17), 5238. <https://doi.org/10.3390/molecules26175238>

Coban, O., De Deyn, G. B., van der Ploeg, M. (2022). Soil microbiota as game-changers in restoration of degraded lands. *Science*, 375(6584), abe0725. <https://doi.org/10.1126/science.abe0725>

Contreras-Cornejo, H. A. et al. (2024). Mechanisms for plant growth promotion activated by *Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystem. *Microbiological Research*, 127621. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127621>

Dai, C. et al. (2019). T-2 toxin neurotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Archives of Toxicology*, 93, 3041-3056. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02577-5>

Daryaei, A., Jones, E. E., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R., Falloon, R. E. (2016). Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 999-1009. <https://doi.org/10.1111/jam.13076>

De Oliveira, F. K., Santos, L. O., Buffon, J. G. (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Research International*, 143, 110266. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>

Devi, R. et al. (2020). Beneficial fungal communities from different habitats and their roles in plant growth promotion and soil health. *Microbial Biosystems*, 5(1), 21-47. <https://doi.org/10.21608/MB.2020.32802.1016>

Dini, I. et al. (2022). *Trichoderma* enzymes for degradation of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Molecules*, 27(12), 3959. <https://doi.org/10.3390/molecules27123959>

Dong, T. et al. (2023). Effect of abiotic conditions on growth, mycotoxin production, and gene expression by *Fusarium fujikuroi* species complex strains from maize. *Toxins*, 15(4), 260. <https://doi.org/10.3390/toxins15040260>

Enomoto, H. (2022). Distribution analysis of jasmonic acid-related compounds in developing *Glycine max* L.(soybean) seeds using mass spectrometry imaging and liquid chromatography–mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 33(2), 194-203. <https://doi.org/10.1002/pca.3079>

Fenta, L., Mekonnen, H. (2024). Microbial biofungicides as a substitute for chemical fungicides in the control of phytopathogens: current perspectives and research directions. *Scientifica*, 2024(1), 5322696. <https://doi.org/10.1155/2024/5322696>

Ferreira, F. V., Musumeci, M. A. (2021). *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 90. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7>

Frans, M., Aerts, R., Van Laethem, S., Ceusters, J. (2017). Environmental effects on growth and sporulation of *Fusarium* spp. causing internal fruit rot in bell pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 149, 875-883. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1235-4>

Fruhauf, S. et al. (2019). Biotransformation of the mycotoxin zearalenone to its metabolites hydrolyzed zearalenone (HZEN) and decarboxylated hydrolyzed zearalenone (DHZEN) diminishes its estrogenicity in vitro and in vivo. *Toxins*, 11(8), 481. <https://doi.org/10.3390/toxins11080481>

Gab-Allah, M. A., Choi, K., Kim, B. (2023). Type B Trichothecenes in cereal grains and their products: Recent advances on occurrence, toxicology, analysis and post-harvest decontamination strategies. *Toxins*, 15(2), 85. <https://doi.org/10.3390/toxins15020085>

Gajęcka, M. et al. (2023). Immunohistochemical expression (IE) of oestrogen receptors in the intestines of prepubertal gilts exposed to zearalenone. *Toxins*, 15(2), 122. <https://doi.org/10.3390/toxins15020122>

Gao, Z. et al. (2023). The natural occurrence, toxicity mechanisms and management strategies of Fumonisin B1: A review. *Environmental Pollution*, 320, 121065. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121065>

García, E. D., et al. (2024). Phenolic Compounds Synthesized by *Trichoderma longibrachiatum* Native to Semi-Arid Areas Show Antifungal Activity against Phytopathogenic Fungi of Horticultural Interest. *Microbiology Research*, 15(3), 1425-1440. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15030096>

Garofalo, M. et al. (2023). From ribosome to ribotoxins: Understanding the toxicity of deoxynivalenol and Shiga toxin, two food borne toxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2271101>

Gayathri, L., Akbarsha, M. A., Ruckmani, K. (2020). In vitro study on aspects of molecular mechanisms underlying invasive aspergillosis caused by gliotoxin and fumagillin, alone and in combination. *Scientific Reports*, 10(1), 14473. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71367-2>

Ghasemi, S., Safaie, N., Shahbazi, S., Shams-Bakhsh, M., Askari, H. (2020). The role of cell wall degrading enzymes in antagonistic traits of *Trichoderma virens* against *Rhizoctonia solani*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 18(4), e2333. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.2333>

Gönenç, İ. M., Yilmaz Sezer, N., Yilmaz, S. (2020). Mycotoxin exposure and pregnancy. *Critical Reviews in Toxicology*, 50(7), 594-604. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1803791>

- Gorczyca, A. et al. (2018). Fusarium head blight incidence and mycotoxin accumulation in three durum wheat cultivars in relation to sowing date and density. *The Science of Nature*, 105, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1528-7>
- Guo, P. et al. (2018). Brain damage and neurological symptoms induced by T-2 toxin in rat brain. *Toxicology letters*, 286, 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.012>
- Han, X. et al. (2022). Research progress of safety of zearalenone: A review. *Toxins*, 14(6), 386. <https://doi.org/10.3390/toxins14060386>
- Haque, M. A. et al. (2020). Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microbial pathogenesis*, 142, 104095. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104095>
- Harman, G. E., Doni, F., Khadka, R. B., Uphoff, N. (2021). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of applied microbiology*, 130(2), 529-546. <https://doi.org/10.1111/jam.14368>
- Hewedy, O. A., Abdel-Lateif, K. S., Bakr, R. A. (2020). Genetic diversity and biocontrol efficacy of indigenous *Trichoderma* isolates against *Fusarium wilt* of pepper. *Journal of basic microbiology*, 60(2), 126-135. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900493>
- Hou, X. et al. (2022). Peptaibols: Diversity, bioactivity, and biosynthesis. *Engineering Microbiology*, 2(3), 100026. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100026>
- Iessi, E. et al. (2020). On the role of sphingolipids in cell survival and death. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 351, 149-195. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.02.004>
- Illescas, M., Pedrero-Méndez, A., Pitorini-Bovolini, M., Hermosa, R., Monte, E. (2021). Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. *Pathogens*, 10(8), 991. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080991>
- Ji, H. et al. (2023). Metabolic Features of a Novel *Trichoderma asperellum* YNQJ1002 with Potent Antagonistic Activity against *Fusarium graminearum*. *Metabolites*, 13(11), 1144. <https://doi.org/10.3390/metabo13111144>
- Ji, J. et al. (2023). Biodegradation methods and product analysis of zearalenone and its future development trend: A review. *Food Control*, 145, 109469. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109469>
- Jin, X., et al. (2020). Inhibitory mechanism of 6-Pentyl-2H-pyran-2-one secreted by *Trichoderma atroviride* T2 against *Cylindrocarpum destructans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104683. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104683>

Khaliq, A. et al. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis to enhance plant–soil interaction. *Sustainability*, 14(13), 7840. <https://doi.org/10.3390/su14137840>

Knowles, S. L., Raja, H. A., Roberts, C. D., Oberlies, N. H. (2022). Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. *Natural Product Reports*, 39(8), 1557-1573. <https://doi.org/10.1039/D1NP00070E>

Kohli, A., Miro, B., Balié, J., d'A Hughes, J. (2020). Photosynthesis research: a model to bridge fundamental science, translational products, and socio-economic considerations in agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 71(7), 2281-2298. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa087>

Kolawole, O., Meneely, J., Petchkongkaew, A., Elliott, C. (2021). A review of mycotoxin biosynthetic pathways: Associated genes and their expressions under the influence of climatic factors. *Fungal Biology Reviews*, 37, 8-26. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.04.003>

Kubicek, C. P. et al. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*, 20, 1-24. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>

Kumar, N., Khurana, S. P. (2021). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for benefit of agriculture and environment. In *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites* (pp. 41-63). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00003-X>

Kumar, P. et al. (2022). Nivalenol mycotoxin concerns in foods: an overview on occurrence, impact on human and animal health and its detection and management strategies. *Toxins*, 14(8), 527. <https://doi.org/10.3390/toxins14080527>

Kumar, V., Dwivedi, S. K. (2019). Hexavalent chromium stress response, reduction capability and bioremediation potential of *Trichoderma* sp. isolated from electroplating wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185, 109734. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109734>

Kumar, V., Dwivedi, S. K. (2021). Bioremediation mechanism and potential of copper by actively growing fungus *Trichoderma lixii* CR700 isolated from electroplating wastewater. *Journal of Environmental Management*, 277, 111370. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111370>

Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S., Sanchis, V. (2017). Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. *International journal of food microbiology*, 242, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.015>

- Lal, D. et al. (2024). *Fusarium wilt* pandemic: current understanding and molecular perspectives. *Functional & Integrative Genomics*, 24(2), 41. <https://doi.org/10.1007/s10142-024-01319-w>
- Lee, J. Y. et al. (2019). Deoxynivalenol induces apoptosis and disrupts cellular homeostasis through MAPK signaling pathways in bovine mammary epithelial cells. *Environmental pollution*, 252, 879-887. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.001>
- Li, J. et al. (2022). Toxic mechanisms of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol on protein synthesis. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 113044. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113044>
- Li, P. et al. (2020). Detoxification of mycotoxins through biotransformation. *Toxins*, 12(2), 121. <https://doi.org/10.3390/toxins12020121>
- Liu, J., Applegate, T. (2020). Zearalenone (ZEN) in livestock and poultry: dose, toxicokinetics, toxicity and estrogenicity. *Toxins*, 12(6), 377. <https://doi.org/10.3390/toxins12060377>
- Liu, M. et al. (2024). Bioenzymatic detoxification of mycotoxins. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1434987. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1434987>
- Liu, M., Niu, Q., Yin, S., Wang, Z. (2023). Inhibitory activity of 6-pentyl-2H-pyran-2-one against the pathogenesis fungi of dollar spot and its control efficacy. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 25(1), 104-116. <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2022.0122>
- Lo, E. K. K., Lee, J. C. Y., Turner, P. C., El-Nezami, H. (2021). Low dose of zearalenone elevated colon cancer cell growth through G protein-coupled estrogenic receptor. *Scientific Reports*, 11(1), 7403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86788-w>
- Lyagin, I., Efremenko, E. (2019). Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action. *Molecules*, 24(13), 2362. <https://doi.org/10.3390/molecules24132362>
- Madbouly, A. K., Rashad, Y. M., Ibrahim, M. I., Elazab, N. T. (2023). Biodegradation of aflatoxin B1 in maize grains and suppression of its biosynthesis-related genes using endophytic *Trichoderma harzianum* AYM3. *Journal of Fungi*, 9(2), 209. <https://doi.org/10.3390/jof9020209>
- Mahato, D. K. et al. (2021). Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review. *Toxins*, 13(2), 92. <https://doi.org/10.3390/toxins13020092>

- Manstretta, V., Rossi, V. (2016). Effects of temperature and moisture on development of *Fusarium graminearum* perithecia in maize stalk residues. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 184-191. <https://doi.org/10.1128/AEM.02436-15>
- Martinez, Y., Ribera, J., Schwarze, F. W., De France, K. (2023). Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(18), 5595-5612. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12687-x>
- McCormick, S. P., Stanley, A. M., Stover, N. A., Alexander, N. J. (2011). Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802-814. <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>
- Medina, A. et al. (2017). Biocontrol of mycotoxins: Dynamics and mechanisms of action. *Current Opinion in Food Science*, 17, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.008>
- Miedaner, T., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A. (2017). Management of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal food and feed. *Frontiers in microbiology*, 8, 1543. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01543>
- Mielniczuk, E., Skwaryło-Bednarz, B. (2020). *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy*, 10(4), 509. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>
- Mironenka, J., Różalska, S., Soboń, A., Bernat, P. (2021). *Trichoderma harzianum* metabolites disturb *Fusarium culmorum* metabolism: Metabolomic and proteomic studies. *Microbiological Research*, 249, 126770. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126770>
- Modrzewska, M., Bryła, M., Kanabus, J., Pierzgalski, A. (2022). *Trichoderma* as a biostimulator and biocontrol agent against *Fusarium* in the production of cereal crops: Opportunities and possibilities. *Plant Pathology*, 71(7), 1471-1485. <https://doi.org/10.1111/ppa.13578>
- Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., Horwitz, B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, 39, 15-33. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004>
- Nazari, L. et al. (2018). Effect of temperature on growth, wheat head infection, and nivalenol production by *Fusarium poae*. *Food microbiology*, 76, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.015>
- Nazari, L. et al. (2019). Infection incidence, kernel colonisation, and mycotoxin accumulation in durum wheat inoculated with *Fusarium sporotrichioides*, *F. langsethiae* or *F. poae* at different growth stages. *European journal of plant pathology*, 153, 715-729. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1558-9>

- Nazari, L., Patteri, E., Terzi, V., Morcia, C., Rossi, V. (2014). Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology*, 39, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.009>
- Neme, K., Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78, 412-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
- Nešić, K., Habschied, K., Mastanjević, K. (2021). Possibilities for the biological control of mycotoxins in food and feed. *Toxins*, 13(3), 198. <https://doi.org/10.3390/toxins13030198>
- Ni, M., et al. (2019). Analysis of metabolic changes in *Trichoderma asperellum* TJ01 at different fermentation time-points by LC-QQQ-MS. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(1), 20-26. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1507227>
- Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M., Babalola, O. O. (2019). Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological research*, 35, 1-7. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001>
- Paganizza, V. (2024). Biocontrol Agents: Risks and Opportunities from Farm to Fork. *European Journal of Risk Regulation*, 15(2), 280-291. <https://doi.org/10.1017/err.2024.58>
- Palmieri, D., et al. (2023). Alkaline pH, low iron availability, poor nitrogen sources and CWI MAPK signaling are associated with increased fusaric acid production in *Fusarium oxysporum*. *Toxins*, 15(1), 50. <https://doi.org/10.3390/toxins15010050>
- Pandit, M. A. et al. (2022). Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens*, 11(2), 273. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020273>
- Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., Stępień, Ł. (2019). *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*, 11(11), 664. <https://doi.org/10.3390/toxins11110664>
- Peter Mshelia, L. et al. (2020). Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of *Fusarium verticillioides* and *F. graminearum*. *Toxins*, 12(8), 478. <https://doi.org/10.3390/toxins12080478>
- Pinto, A. G. et al. (2024). Soil Ecosystem Functioning through Interactions of Nematodes and Fungi *Trichoderma* sp. *Sustainability*, 16(7), 2885. <https://doi.org/10.3390/su16072885>

Polak-Śliwińska, M., Paszczyk, B. (2021). Trichothecenes in food and feed, relevance to human and animal health and methods of detection: A systematic review. *Molecules*, 26(2), 454. <https://doi.org/10.3390/molecules26020454>

Ptaszek, M. et al. (2023). Microbial-based products to control soil-borne pathogens: methods to improve efficacy and to assess impacts on microbiome. *Microorganisms*, 11(1), 224. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010224>

Qu, L. et al. (2022). Toxic mechanism and biological detoxification of fumonisins. *Toxins*, 14(3), 182. <https://doi.org/10.3390/toxins14030182>

Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., Buszewski, B. (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicon*, 162, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>

Rózewicz, M., Wyzińska, M., Grabiński, J. (2021). The most important fungal diseases of cereals - Problems and possible solutions. *Agronomy*, 11(4), 714. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040714>

Saldaña-Mendoza, S. A., Pacios-Michelena, S., Palacios-Ponce, A. S., Chávez-González, M. L., Aguilar, C. N. (2023). *Trichoderma* as a biological control agent: mechanisms of action, benefits for crops and development of formulations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(10), 269. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03695-0>

Selegato, D. M., Castro-Gamboa, I. (2023). Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. *Frontiers in microbiology*, 14, 1117559. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117559>

Serrano, R. et al. (2017). Co-culturing of fungal strains against *Botrytis cinerea* as a model for the induction of chemical diversity and therapeutic agents. *Frontiers in Microbiology*, 8, 649. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00649>

Shu, L., et al. (2025). Systematic identification of the chemical components of leaves and roots of *Didymocarpus heucherifolius* Hand.-Mazz. based on UHPLC Q-Exactive Orbitrap MS technology coupled with molecular networking strategy. *Scientific Reports*, 15(1), 2617. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86802-5>

Sood, M. et al. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasking biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>

Sood, M. et al. (2021). Mechanisms of plant defense under pathogen stress: A review. *Current Protein and Peptide Science*, 22(5), 376-395. <https://doi.org/10.2174/1389203722666210125122827>

- Tatay, E., Espin, S., Garcia-Fernandez, A. J., Ruiz, M. J. (2017). Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells. *Toxicology in Vitro*, 45, 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.026>
- Tchameni, S. N. et al. (2020). Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology*, 23, 179-188. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00089-x>
- Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, 10(2), 158. <https://doi.org/10.3390/biology10020158>
- Tian, Y. et al. (2016). Detoxification of deoxynivalenol via glycosylation represents novel insights on antagonistic activities of *Trichoderma* when confronted with *Fusarium graminearum*. *Toxins*, 8(11), 335. <https://doi.org/10.3390/toxins8110335>
- Tian, Y. et al. (2018). Antagonistic and detoxification potentials of *Trichoderma* isolates for control of zearalenone (ZEN) producing *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02710>
- Tian, Y. et al. (2020). Confrontation assays and mycotoxin treatment reveal antagonistic activities of *Trichoderma* and the fate of *Fusarium* mycotoxins in microbial interaction. *Environmental Pollution*, 267, 115559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115559>
- Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., Muller, D. (2023). Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1228749. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1228749>
- Torres-Ortega, R., et al. (2022). In vivo low-temperature plasma ionization mass spectrometry (ltip-ms) reveals regulation of 6-pentyl-2h-pyran-2-one (6-pp) as a physiological variable during plant-fungal interaction. *Metabolites*, 12(12), 1231. <https://doi.org/10.3390/metabo12121231>
- Tóthné, B. et al. (2021). Composted Municipal Green Waste Infused with Biocontrol Agents to Control Plant Parasitic Nematodes—A Review. *Microorganisms*, 9, 2130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102130>
- Tunlid, A., Floudas, D., Op De Beeck, M., Wang, T., Persson, P. (2022). Decomposition of soil organic matter by ectomycorrhizal fungi: mechanisms and consequences for organic nitrogen uptake and soil carbon stabilization. *Frontiers in Forests and Global Change*, 5, 934409. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.934409>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Jaroszuć-Ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Vanheule, A. et al. (2017). Genetic divergence and chemotype diversity in the *Fusarium* head blight pathogen *Fusarium poae*. *Toxins*, 9(9), 255. <https://doi.org/10.3390/toxins9090255>

Verma, I., Soni, S. K., Singh, P. C. (2024). *Trichoderma* produces methyl jasmonate-rich metabolites in the presence of *Fusarium*, showing biostimulant activity and wilt resistance in tomatoes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 215, 108953. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108953>

Waghunde, R. R., Shelake, R. M., Sabalpara, A. N. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22), 1952-1965. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10584>

Wang, G. et al. (2022). Fungal-fungal cocultivation leads to widespread secondary metabolite alteration requiring the partial loss-of-function VeA1 protein. *Science Advances*, 8(17), eabo6094. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abo6094>

Wangia-Dixon, R. N., Nishimwe, K. (2020). Molecular toxicology and carcinogenesis of fumonisins: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 39(1), 44-67. <https://doi.org/10.1080/26896583.2020.1867449>

Wenda-Piesik, A. et al. (2017). *Fusarium* head blight incidence and detection of *Fusarium* toxins in wheat in relation to agronomic factors. *European Journal of Plant Pathology*, 149, 515-531. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1200-2>

Winter, M., Samuels, P. L., Dong, Y., Dill-Macky, R. (2019). Trichothecene production is detrimental to early root colonization by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in fusarium crown and root rot of wheat. *Plant pathology*, 68(1), 185-195. <https://doi.org/10.1111/ppa.12929>

Woo, S. L., Hermosa, R., Lorito, M., Monte, E. (2023). *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 312-326. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5>

Wu, H. et al. (2019). Rhizosphere responses to environmental conditions in *Radix pseudostellariae* under continuous monoculture regimes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 270, 19-31. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.10.014>

Yan, H., et al. (2023). Antifungal activity and inhibitory mechanisms of ferulic acid against the growth of *Fusarium graminearum*. *Food Bioscience*, 52, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102414>

Yang, D. et al. (2018). Toxic effects of zearalenone on gametogenesis and embryonic development: A molecular point of review. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.003>

Zhang, J. et al. (2020). The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): Current status and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111676. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111676>

Zhang, Y. et al. (2018). Compounds identification in semen cuscatae by ultra-high-performance liquid chromatography (UPLCs) coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 23(5), 1199. <https://doi.org/10.3390/molecules23051199>

Zhang, Y. et al. (2020). Fungi–nematode interactions: Diversity, ecology, and biocontrol prospects in agriculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 206. <https://doi.org/10.3390/jof6040206>

Zin, N. A., Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.09.003>

Akty prawne i dokumenty urzędowe

Komisja Europejska (2020). Strategia „Od pola do stołu” na rzecz sprawiedliwego, zdrowego i przyjaznego środowisku systemu żywnościowego. COM/2020/381 final.

Komisja Europejska (2023) Rozporządzenie Komisji (UE) nr 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L153, 1-15.

Komisja Europejska (2024a) Rozporządzenie Komisji (UE) nr 2024/1022 z dnia 15 czerwca 2024 r. zmieniające rozporządzenie (UE) 2023/915 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów deoksynivalenolu w żywności. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L167, 10-20.

Komisja Europejska (2024b) Rozporządzenie Komisji (UE) 2024/1038 z dnia 9 kwietnia 2024 r. zmieniające rozporządzenie (UE) 2023/915 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów toksyn T-2 i HT-2 w żywności. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 1038, 10 kwietnia 2024, s. 1–5.

Raporty

FAO (2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022) Agricultural production statistics 2000–2020. FAOSTAT analytical brief series no. 41. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3751en>

Internet

EPPO (b.d.). European and Mediterranean Plant Protection Organization. (b.d.). Databases of registered plant protection products. [dostęp dnia 10.12.2024; https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_protection_products/registered_products]

FDA (2015/2016). U.S. Food and Drug Administration. (2015/2016). *Compliance program guidance manual: Mycotoxins in domestic and imported foods*. [dostęp dnia 22.07.2024; <https://www.fda.gov>]

MRiRW (b.d.). Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. (b.d.). Wyszukiwarka środków ochrony roślin. [dostęp dnia 10.12.2024; <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/wyszukiwarka-srodkow-ochrony-roslin---zastosowanie>]