

Warszawa, 29.05.2025

dr hab. Magdalena Wirkowska-Wojdyła, prof. SGGW
Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej 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”, wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Marcina Bryły, prof. IBPRS-PIB oraz Pana dr inż. Dominika Popowskiego z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego.

Znaczenie podjętego problemu badawczego

Zboża stanowią podstawę światowej produkcji żywności i pasz dla zwierząt, dlatego ich zdrowotność i jakość mają kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa żywnościowego. Grzyby z rodzaju *Fusarium* są odpowiedzialne za wywoływanie wielu poważnych chorób zbóż. Do najczęściej występujących chorób wywołanych przez gatunki *Fusarium* zalicza się fuzariozę kłosów, fuzariozę kolb oraz fuzariozę siewek, łodyg i korzeni. Choroby te prowadzą do uszkodzenia roślin, co skutkuje obniżeniem jakości i ilości plonów. W wyniku obniżenia plonu i jakości ziarna straty ekonomiczne z powodu tych infekcji mogą wynosić w skrajnych przypadkach nawet 50%. Dodatkowo, zboża skażone grzybami *Fusarium* mogą być zanieczyszczone szkodliwymi mykotoksynami, takimi jak trichoteceny, zearalenon czy fumonizyny. Ograniczanie zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami odbywało się

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk o Żywności

ul. Nowoursynowska 159 C
02-776 Warszawa
+48 22 593 75 10
inoz@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl

dotąd najczęściej przy użyciu chemicznych środków zawierających substancje z grupy triazoli. W ostatnich latach w krajach UE obserwuje się trend odchodzenia od stosowania chemicznych pestycydów. Ma to związek z Europejskim Zielonym Ładem, który zakłada ograniczenie o 50% ilości stosowanych w rolnictwie pestycydów do końca 2030 r. Biologiczna ochrona roślin polega na stosowaniu środków, których substancjami czynnymi mogą być mikroorganizmy. 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.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska doskonale wpisuje się w ten trend, ponieważ autorka podjęła się badań nad rolą szlaków metabolicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma* w procesie degradacji i biotransformacji mykotoksyn fuzaryjnych. Grzyby *Trichoderma* to saprotrofy glebowe, których obecność w ryzosferze oraz tkankach gospodarza poprawia odporność roślin, stymuluje ich wzrost i rozwój. Dzięki właściwościom antagonistycznym grzybów z rodzaju *Trichoderma* względem różnych patogenów są one wykorzystywane jako środek biologiczny przeciwko patogenom w uprawie roślin, natomiast nie są wykorzystywane w uprawie roślin zbożowych. Prawdopodobnie wynika to z tego, że mechanizmy leżące u podstaw tych właściwości oraz ich rola w regulowaniu biosyntezy mykotoksyn przez *Fusarium* wciąż wymagają poznania. To właśnie Doktorantka w swoich badaniach przedstawionych w niniejszej dysertacji starała się poznać złożone mechanizmy antagonizmu *Trichoderma* vs *Fusarium* ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu biotransformacji mykotoksyn i ich roli w procesie ograniczania wzrostu *Fusarium*.

Ocena formalna pracy

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań zostały zaprezentowane w opublikowanym zbiorze tematycznie powiązanych artykułów naukowych oraz w nieopublikowanym artykule, który jest obecnie recenzowany. Dodatkowo dane zaprezentowane w publikacji P2 zostały uzupełnione obszernymi wynikami zamieszczonymi w podrozdziale 9.2.

Dysertacja mgr inż. Marty Modrzewskiej obejmuje 185 stron maszynopisu (włączając w to dołączone publikacje). Dysertacja składa się z 11 rozdziałów, w tym typowych dla układu prac doktorskich (Wprowadzenie, Przegląd piśmiennictwa, Hipotezy badawcze, Cel i zakres pracy, Materiał i metody badawcze, Omówienie publikacji, Podsumowanie, Spis piśmiennictwa) oraz rozdziałów uzupełniających i ułatwiających zrozumienie pracy (Wykaz skrótów, Wykaz artykułów

naukowych, Wsparcie finansowe, Materiały uzupełniające). Do dysertacji dołączono także opublikowane artykuły naukowe będące podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora wraz z oświadczeniami współautorów publikacji. Łączna liczba cytowanych opracowań w dysertacji wynosi 150, w tym 9 podręczników i 133 oryginalne publikacje (100 % pozycje anglojęzyczne), 5 aktów prawnych, dokumentów rządowych, raportów oraz 3 źródła internetowe.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2022-2024 oraz jedna jest obecnie w recenzji. Prace zostały opublikowane na łamach czasopism wymienionych na liście *Journal Citation Reports: Plant Pathology, Molecules, Scientific Reports*. Łączna wartość współczynnika oddziaływania Impact Factor dla tych prac wg roku opublikowania wynosi 11,73. Suma punktów wg wykazu MEiN / MNiSW czasopism z roku opublikowania wynosi 420 (sugeruję stosowanie odpowiednich skrótów MEiN lub MNiSW w zgodzie z obowiązującym nazewnictwem z lat publikacji). We wszystkich artykułach stanowiących rozprawę doktorską Doktorantka jest pierwszym autorem, w publikacjach P1 oraz P2 pełniła również funkcję autora korespondencyjnego. Wszystkie artykuły są pracami wieloautorskimi. Wkład Doktorantki w powstanie omawianych prac jest znaczący: w publikacjach P1 i P2 wynosił 80%, w pracy nieopublikowanej będącej w recenzji – 60 %, w publikacji P3 Doktorantka nie podała procentowego wkładu w powstanie pracy. Doktorantka w pracach tych brała udział m.in. w opracowaniu koncepcji doświadczeń, w analizie danych, opracowaniu, przygotowaniu i edycji manuskryptu.

Ogólnie praca jest napisana poprawnie językowo, w sposób jasny i zrozumiały, (poza mało znaczącymi, drobnymi niedociągnięciami, np. „spadek plonu”, „spadek liczebności” – proponuję stosować „obniżenie”; „wspomagania zdrowia ich zdrowia” – str. 29, „*F. poea*” zamiast *F. poae* – str. 15, 37).

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania formalne niezbędne do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ocena merytoryczna pracy

W część teoretycznej przedstawionej do oceny pracy doktorskiej została przedstawiona rola grzybów w ekosystemach, charakterystyka wtórnych metabolitów grzybów *Fusarium*, która została dodatkowo wzbogacona wzorami strukturalnymi wybranych trichotecenów, zearalenonu oraz wybranych fumonizyn (FB1). W dalszej części przeglądu piśmiennictwa, Doktorantka przedstawiła charakterystykę grzybów z rodzaju *Trichoderma*, rolę szlaków metabolicznych dotyczących

biotransformacji toksyn przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*, szczególnie w kontekście mykotoksyn biosyntetyzowanych przez *Fusarium*. Na koniec tego rozdziału Doktorantka przedstawiła rolę grzybów z rodzaju *Trichoderma* w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności. Zagadnienia te zostały doskonale opisane w publikacji przeglądowej P1 otwierającej zbiór monotematycznych artykułów. Pragnę podkreślić, że publikacja P1 stanowi doskonałe wprowadzenie dla czytelnika w tematykę interakcji między *Trichoderma* a *Fusarium*, zarówno w kontekście mechanizmów biologicznych, jak i możliwości praktycznego zastosowania antagonistycznych mikroorganizmów w ochronie upraw zbożowych. Przejrzysta struktura artykułu, oraz wszechstronne omówienie zagadnienia czynią tę pracę wartościowym punktem wyjścia dla studentów, doktorantów i badaczy rozpoczynających działalność naukową w tej dziedzinie. W podsumowaniu publikacji P1 Doktorantka wyjaśniła również dlaczego w badaniach wykorzystwała szczepy *T. atroviride*, *T. viride*, *T. viridescens* oraz *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*, *F. cerealis* oraz *F. poae*.

Część eksperymentalna dysertacji rozpoczyna się rozdziałem zatytułowanym „Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy”. Doktorantka sformułowała jeden cel główny oraz trzy cele szczegółowe, z których następnie logicznie wynikają trzy postawione hipotezy badawcze. Każda z hipotez została dodatkowo krótko scharakteryzowana. W rozdziale tym zabrakło jednak rzeczywistego opisu zakresu pracy oraz schematu doświadczenia, który umożliwiłby czytelnikowi lepsze zrozumienie struktury i układu przeprowadzonych eksperymentów. Taki schemat – opisowy lub graficzny – byłby cennym elementem porządkującym oraz ułatwiającym odbiór części metodologicznej rozprawy. W rozdziale 7 – „Materiał i metody badawcze” – Doktorantka wymieniła szczepy *Trichoderma* i *Fusarium*, które zostały uwzględnione w planowanych eksperymentach. Wśród wymienionych szczepów nie znalazł się *F. poae*, mimo że Pani Marta Modrzewska w podsumowaniu publikacji P1 uzasadniła wybór tego właśnie szczepu. W rozdziale „Podsumowanie”, w pierwszym wniosku, również pojawiło się bezpośrednie odniesienie do tego szczepu: „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*”. W żadnej z publikacji przedstawionych w zbiorze nie odnotowano jednak wyników badań dotyczących szczepu *F. poae*. **Nasuwa się zatem pytanie: czy szczep *F. poae* był**

faktycznie wykorzystany na jakimkolwiek etapie eksperymentu? Jeśli tak – co było powodem jego wykluczenia z dalszych badań?

W rozdziale 7.2 przedstawiono szczegółowy opis metod badawczych zastosowanych w rozprawie. Ocenę zdolności szczepów *Trichoderma* do hamowania wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* przeprowadzono dwiema metodami: wizualną (na podłożu PDA) oraz molekularną (analiza DNA przy użyciu cyfrowej PCR) w mono- i ko-kulturach na ziarnach ryżu. Dokonano także oceny wpływu *Trichoderma* na biosyntezę mykotoksyn wytwarzanych przez *Fusarium*. W tym celu zastosowano technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, analizując szeroki zakres mykotoksyn (m.in. DON, ZEN, T-2, HT-2, FB1–3, BEA). Odrębny blok badawczy dotyczył biotransformacji wybranych mykotoksyn (T-2, DON, ZEN, NIV, FB1) przez wybrane szczepy *Trichoderma*. Monitorowano stężenie dodanej mykotoksyny i identyfikowano metabolity powstałe w procesie biotransformacji.

Dane zostały poddane analizie statystycznej (jednoczynnikowa ANOVA, test Tukeya), a także odpowiedniej normalizacji względem stężenia DNA patogenu, co pozwoliło na uzyskanie wartości względnych eliminujących wpływ zmienności biologicznej próbek.

Rezultatem przeprowadzonych badań było otrzymanie ogromnej ilości wyników, które mają charakter poznawczy i faktycznie umożliwiają zrozumienie złożonego antagonizmu *Trichoderma* względem *Fusarium*. Pod względem metodycznym, przedstawione w pracy doktorskiej badania poparte były różnymi technikami analitycznymi, w tym mikrobiologicznymi, instrumentalnymi i statystycznymi.

W kontekście przedstawionych badań nasuwa się pytanie, **dlaczego jako podłoże hodowlane zastosowano ziarna ryżu? Czy zastosowanie innego medium hodowlanego mogłoby wpłynąć na kierunek lub intensywność procesów biotransformacyjnych, zwłaszcza w odniesieniu do glukozytacji mykotoksyn lub powstawania związków lotnych?**

Artykuły badawcze wchodzące w zbiór monotematycznych publikacji są spójne i koncentrują się głównie wokół badania antagonizmu *Trichoderma* w stosunku do patogenów *Fusarium* (badanie skuteczności *Trichoderma* w inhibicji wzrostu *Fusarium*, badanie zdolności *Trichoderma* do hamowania biosyntezy mykotoksyn przez *Fusarium*, analiza metabolitów obecnych w ko-kulturach patogen-antagonista). W każdej publikacji badano zdolności 8 szczepów grzybów *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. viride*, *T. viridescens*) do hamowania wzrostu grzybów patogennych *Fusarium*. W publikacji P2 zaprezentowano wyniki dotyczące tych badań w stosunku

do *Fusarium culmorum* i *Fusarium cerealis*, w publikacji P3 w stosunku do *Fusarium sporotrichioides*, natomiast w publikacji P4 w stosunku do *Fusarium proliferatum*.

Pierwsza z wymienionych publikacji skupia się na ocenie potencjału *Trichoderma* do ograniczania wzrostu patogenu oraz jego zdolności do biosyntezy mykotoksyn. Badania prowadzone były w modelowych układach koinkubacji, a uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na możliwość hamowania syntezy toksycznych metabolitów, głównie poprzez glikozylację deoksyniwalenolu oraz biotransformację zearalenonu do jego hydroksylowanej pochodnej β – zearalenolu. Szczególną uwagę zwrócono na mechanizmy działania *Trichoderma*, w tym konkurencję o przestrzeń i składniki odżywcze, a także produkcję metabolitów wtórnych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Wyniki wykazały istotne różnice pomiędzy szczepami pod względem skuteczności, a także potwierdziły, że niektóre z nich mogą znacząco redukować poziom mykotoksyn, nawet jeśli nie całkowicie hamują wzrost patogenu. Rezultaty opisane w P2 zostały dodatkowo wzbogacone obszernymi wynikami umieszczonymi i opisanymi w rozdziale 9 (Materiały uzupełniające). Badania z wykorzystaniem analizy ilościowej DNA patogenu umożliwiły precyzyjne określenie wpływu *Trichoderma* na proliferację *Fusarium*. Analiza metaboliczna dostarczyła natomiast danych na temat możliwych szlaków biochemicznych w hamowaniu wzrostu patogenu oraz biotransformacji mykotoksyn.

W pracy P3 opublikowanej w Scientific Reports, Doktorantka skoncentrowała się na konkretnym mechanizmie detoksykacji – powstawaniu glikozydów toksyn HT-2 i T-2. Doktorantka wskazała na aktywną rolę *Trichoderma* nie tylko jako antagonisty wzrostu *Fusarium sporotrichioides*, ale również jako organizmu zdolnego do biotransformacji toksycznych metabolitów w mniej szkodliwe formy. *Trichoderma* niemal całkowicie zredukowały biosyntezę toksyn T-2 i HT-2 przez *F. sporotrichioides*. W medium hodowlanym wykryto glikozydy 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. Istotnym elementem badań była analiza metaboliczna, która umożliwiła szczegółową ocenę interakcji między szczepami *Trichoderma* a toksynami HT-2 i T-2. Autorzy zastosowali technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, aby zidentyfikować i scharakteryzować produkty przemian metabolicznych toksyn. Szczególny nacisk położono na wykrycie związków powstających w wyniku glikozylacji HT-2 i T-2 — przede wszystkim glikozydów, które są mniej toksyczne niż wolne formy toksyn. Analiza metaboliczna pozwoliła

zidentyfikować różne metabolity wtórne produkowane przez *Trichoderma*, a także określić ich potencjalną rolę w detoksykacji i mechanizmach obronnych przeciwko *Fusarium*.

Wyniki badań przedstawione w publikacji P4 umożliwiły identyfikację 4 potencjalnych szczepów *Trichoderma* (AN609, AN153, AN215, AN523), które mogą pełnić rolę czynników biokontroli wobec patogenicznych szczepów *F. proliferatum*. W tym przypadku zaobserwowano jednak obniżoną skuteczność szczepów *Trichoderma* w stosunku do szczepów *Fusarium* charakteryzujących się wyższym potencjałem toksynotwórczym. Analiza metabolomiczna kultur antagonista-patogen potwierdziła obecność związków o silnym działaniu przeciwgrzybiczym, takich jak związki fenolowe, 6PP, kaprogen B które mogą destabilizować ścianę komórkową *Fusarium*. Jednak, jak sama Doktorantka podaje, w przypadku szczepów patogenicznych o wyższym potencjale toksynotwórczym konieczne są dalsze badania w celu identyfikacji kluczowych enzymów oraz określenia warunków sprzyjających skutecznej biotransformacji mykotoksyn przez *Trichoderma*.

Podsumowując tę część dysertacji chciałam postawić pytanie, **czy znane są grzyby lub inne mikroorganizmy, które wykazują przeciwne działanie jak grzyby *Trichoderma*, to znaczy mogą przyspieszać wzrost *Fusarium* oraz przyspieszać biosyntezę mykotoksyn?**

Na zakończenie pracy Doktorantka przedstawiła dość szczegółowo najważniejsze wnioski dotyczące efektów zrealizowanych badań. Pewien niedosyt budzi brak bezpośredniego odniesienia w tej części do postawionych hipotez badawczych.

Ocena końcowa

Przedstawiona do recenzji praca doktorska cechuje się wysokim poziomem merytorycznym i nowoczesnym podejściem badawczym. Kandydatka wykazała się szeroką znajomością zagadnień z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii środowiskowej oraz nowoczesnych metod analitycznych. Prace stanowiące zbiór monotematycznych publikacji są spójne tematycznie i wskazują na możliwość potencjalnego zastosowania grzybów *Trichoderma*, która w uprawach mogłoby przyczynić się do ograniczenia stosowania fungicydów chemicznych oraz zmniejszenia ryzyka skażenia płodów rolnych mykotoksynami, co ma istotne implikacje dla bezpieczeństwa żywności i zdrowia publicznego. Zaprezentowana praca posiada istotną wartość naukową.

W świetle przedstawionej pozytywnej oceny recenzowanej pracy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018

r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 1571, z późn. zm.) i przedkładam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Profesora Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego o **dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Modrzewskiej do dalszych etapów postępowania do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.**

Jednocześnie mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną zaprezentowanych badań, ukierunkowanych na jeden z kluczowych problemów współczesnego rolnictwa i bezpieczeństwa żywności wnioskuję o wyróżnienie niniejszej pracy.

Magdalena Winkowska-Wojdyła