

Dr hab. Marcin Bryła, prof. IBPRS-PIB

Warszawa, 22.10.2024

Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

im. prof. W. Dąbrowskiego

– Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mg inż. Edyty Aleksandrowicz pt.: „Ocena kumulacji mykotoksyn i składników bioaktywnych w ziarnie odmian pszenicy ozimej jako reakcji na stres wywołany zakażeniem grzybami rodzaju *Fusarium*” wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Grażyny Podolskiej (promotor) oraz Pani dr hab. Iwony Kowalskiej (promotor pomocniczy), w Zakładzie Uprawy Roślin Zbożowych Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.

Zboża są podstawą produkcji żywności i pasz. Do najczęstszych chorób roślin zbożowych 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 graminearum*. Skutkiem infekcji roślin tymi fitopatogenami jest spadek plonowania i jakości ziarna. Straty ekonomiczne mogą wynosić 15-20%, a w skrajnych przypadkach sięgać nawet 50%. Grzyby te ograniczają masę ziarna, a także biosyntetyzują toksyczne dla ludzi i zwierząt mykotoksyny. W ostatnich latach uprawa roślin napotyka na coraz więcej problemów. Mamy do czynienia ze zmianami klimatycznymi, które generują szereg problemów w rolnictwie. Zmiany te powodują zmienność w strukturze populacji mikroorganizmów. Naukowcy oszacowali, że grzyby i inne mikroorganizmy migrują w kierunku biegunów w tempie 3-5 km/rok. W przypadku toksynotwórczych patogenów roślin zbożowych oznacza to, że grzyby te mogą doświadczyć przejścia z tzw. „stanu supresji” do warunków sprzyjających biosyntezie mykotoksyn, przez co problem zanieczyszczenia ziarna zbóż mykotoksynami może przybierać na

sile. Z tego względu uważam podjęcie się przedstawionego w ramach pracy doktorskiej tematu jako zasadne. Tematyka roli składników bioaktywnych w procesie przebiegu patogenezы u roślin zbożowych jest w ostatnich latach mocna eksplorowana.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma tradycyjną formę i strukturę odpowiednią dla tej formy. Praca składa się ze 140 stron i została podzielona na część teoretyczną oraz eksperymentalną. W pierwszej z nich przedstawiono dwudziestostronicowy przegląd literatury z zakresu omawianego tematu. Część eksperymentalna dysertacji obejmuje przedstawienie założeń pracy, celu badań, charakterystyki metod badawczych, opisu doświadczeń, oraz omówienia wyników. Wyniki skomentowane zostały w odrębnym rozdziale „Dyskusja”. Zrealizowane badania podsumowane zostały wnioskami z badań. Praca doktorska zawiera spis bibliograficzny liczący 196 pozycji literaturowych, z czego 151 to pozycje angielskojęzyczne. Na końcu zamieszczono streszczenie pracy zarówno w języku polskim, jak i angielskim oraz oświadczenia Doktorantki, a także jej Pań promotor. W pracy zaprezentowano 111 rysunków, a także 21 tabel, które znajdują się w tekście pracy.

Całość części teoretycznej uważam za zasadną. Wprowadza ona czytelnika do tematu rozprawy, pozwalając mu na zaznajomienie się z istniejącym stanem wiedzy. W tej części scharakteryzowano głównie dwa gatunki *Fusarium* pod względem ich agresywności wobec roślin zbożowych, omówiono znaczenie najważniejszych toksyn *F. culmorum* i *F. graminearum* z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności wraz oceną toksycznego działania. Scharakteryzowano grzyby *Fusarium*, toksyny tych grzybów, scharakteryzowano czynniki wpływające na biosyntezę mykotoksyn przez grzyby *Fusarium*, a następnie Doktorantka przeszła do charakterystyki reakcji roślin na stres wywołany infekcjami grzybowymi. W przeglądzie literatury Doktorantka uwzględniła także charakterystykę związków bioaktywnych wpływających na odporność roślin zbożowych na choroby grzybowe. W końcowych rozważaniach dotyczących tej części rozprawy doktorskiej Autorka przedstawiła charakterystykę „wpływu zawartości mykotoksyn na wartość technologiczną mąki”. Tytuł tego rozdziału w mojej opinii nie do końca został trafnie dobrany, ponieważ na wartość technologiczną mąki nie wpływają toksyny, ale porażone grzybem ziarniaki. Toksyny mogą być w tym przypadku markerem jakości ziarna wykorzystywanego do przemiału. Taki sens zresztą został przedstawiony w tych rozważaniach. Reasumując, część teoretyczna napisana jest w sposób zwięzły, jasny i stanowi dobrą bazę do zagłębienia się w problematykę pracy doktorskiej.

Uwagi szczegółowe:

- strona 6: pomimo, że w 2023 r. wprowadzono rozporządzenie unijne pod numerem 2023/915 (wcześniej obowiązywało rozporządzenie UE nr 1881/2006), to już 8 kwietnia 2024 r. zostały wprowadzone nowe zapisy zmieniające to rozporządzenie w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów deoksyniwalenolu w żywności (Rozp. UE 2024/1022). Tak więc obowiązująca dopuszczalna zawartość deoksyniwalenolu w nieprzetworzonym ziarnie zbóż wynosi 1000 µg/kg, a nie 1250 µg/kg,
- strona 19: Doktorantka wskazuje, że odmiany pszenicy o zwiększonej zawartości karotenoidów, w tym luteiny są w pewnym stopniu bardziej podatne na kumulację mykotoksyn, a w domyśle mogą być bardziej podatne na infekcje patogenami *Fusarium*. Czy dostępna literatura naukowa opisuje mechanizmy, które tłumaczyłyby tę obserwację?

Niektóre przykładowe (mało istotne) uwagi:

- strona 6: zamiast stosowania terminologii bezpiecznego dopuszczalnego poziomu zaleca się stosowanie maksymalna dopuszczalna zawartość,
- strona 8: *F. moniliforme* to nazwa gatunku, która obecnie figuruje jako *F. verticillioides*. Zaleca się stosowanie aktualnego nazewnictwa,
- strona 11: Doktorantka posługuje się terminologią „aktywność wodna”. Poprawne określenie tego parametru to aktywność wody,
- strona 19: błąd składniowy: „Zmniejszenie mykotoksyn produkowanych przez ...”. Powinno być: „Obniżenie zawartości mykotoksyn...”,
- strona 19: Niezrozumiałe stwierdzenie: „Zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy zawartością luteiny i mykotoksyn fuzaryjnych (DON i jego pochodna DON-3-glukozyd) w porównaniu z niską zawartością karotenoidów w ziarnie pszenicy zwyczajnej *Triticum aestivum*”,
- strona 23: jest: „Kłosa zakażone fuzariozą...”. Powinno być: „Kłosa zainfekowane *Fusarium*...” albo „Kłosa porażone zarodnikami *Fusarium*...”.

Hipoteza badawcza i cel pracy zostały poprawnie zdefiniowane.

Próbki do badań (rośliny pszenicy, ziarno) zostały pozyskane w dwóch etapach badawczych (tj. doświadczenia poletkowego i polowego). W doświadczeniu poletkowym (2016-2018) do inokulacji roślin pszenicy Doktorantka wybrała dwa szczepy z gatunków *F. culmorum* i *F. graminearum*. Należy podkreślić, że do badań wybrano aż 13 odmian pszenicy charakteryzującej się różną podatnością na fuzariozę kłosa. Do realizacji celu zostały zaplanowane odpowiednie narzędzia analityczne takie jak oznaczenia zawartości kwasów fenolowych przy

zastosowaniu techniki UHPLC-MS/MS połączonej z detektorem diodowym (DAD), oznaczenie zawartości mykotoksyn w ziarnie zbóż przy zastosowaniu testów ELISA, a także została przeprowadzona wizualna ocena stopnia porażenia kłosów *Fusarium* oraz określono wskaźnik masy tysiąca ziaren. Nie do końca przekonuje mnie dobór nieinwazyjnej metody oceny zawartości chlorofilu, flawonoidów i antocyjanów za pomocą aparatu DUALLEX ScientificTM na podstawie punktowych pomiarów na liściach pszenicy. W związku z tym chciałbym zapytać Doktorantkę, czy ta metoda w jakiś sposób została zwalidowana w celu upewnienia się co do wiarygodności wyników? Czy zdaniem Doktorantki punktowy pomiar liści jest słusznym i miarodajnym podejściem w ocenie zawartości ww. związków? Ile punktowych pomiarów w przeliczeniu na jedną próbkę zrealizowano?

Uwagi szczegółowe:

- brakuje informacji jakie jony prekursorzy i fragmentacyjne zostały wybrane do identyfikacji badanych kwasów fenolowych,
- dlaczego konieczne było zastosowanie detektora diodowego (DAD) do oznaczeń kwasów fenolowych?
- w jaki sposób zapewniono wiarygodność uzyskanych wyników zawartości kwasów fenolowych?

W doświadczeniu polowym (realizowanym w latach 2018-2020) Doktorantka oceniła plon, poziom akumulacji mykotoksyn w ziarniakach, a także przeprowadziła ocenę wartości technologicznej ziarna (plon, masa tysiąca ziaren (MTZ), gluten mokry, wskaźnik sedymentacji Zeleny'ego, zawartość popiołu, zawartość białka, właściwości reologiczne ciasta) pozyskanego z roślin pszenicy inokulowanych wcześniej zarodnikami *F. culmorum*. W badaniach tych testowano 6 odmian pszenicy o różnej podatności na fuzariozę kłosa. Uzyskane wyniki badań były poddawane ocenie statystycznej, a dobór metod w tej ocenie uważam za słuszny i zasadny.

Część dotycząca wyników pracy składa się z trzech zasadniczych rozdziałów, z czego pierwsze dwa obejmują doświadczenia poletkowe z wykorzystaniem inokulatu odpowiednio *F. culmorum* i *F. graminearum*. Oba preparaty aplikowano na rośliny pszenic 13 odmian i oceniano je wobec roślin kontrolnych. W wyniku przeprowadzonych prac stwierdzono zróżnicowanie odmianowe pod względem odporności roślin na przebieg infekcji wywołanej przez *Fusarium*, przy czym szczep *F. culmorum* wykazał się bardziej agresywny względem roślin niż *F.*

graminearum. Efektem ekspozycji roślin na stres było obniżenie plonowania, na ogół zwiększona zawartość flawonoli w liściach pszenicy i obniżona zawartość antocyjanów. Niewielkie zróżnicowanie stwierdzono u odmian pod względem zawartości chlorofilu. Uzyskane wyniki mają cenny charakter praktyczny, ponieważ umożliwiły wytypowanie grup odmian pszenic, które w różny sposób reagowały na przebieg infekcji. Ponadto było możliwe wytypowanie odmian charakteryzujących zdolnością kumulacji deoksyniwalenolu i zearalenonu na relatywnie niskim poziomie. Podsumowując dwa pierwsze rozdziały uważam, że uzyskane i omówione wyniki są ciekawe i stanowią punkt odniesienia do kontynuacji badań w tym zakresie.

Niektóre przykładowe (mało istotne) uwagi:

- strona 40: w rozdziale 5.1.1. podano, że doświadczenie realizowano w latach 2016-2017, natomiast na stronie 26 podano, że doświadczenie zaplanowano w 2016, 2017 i 2018 r.,
- strona 43: co to znaczy, że zawartość flawonoli podano w jednostkach względnych?
- strona 93: zamiast *F. culmorum* powinno być *F. graminearum*,
- strony 93-94: pomyłono w tekście zawartości, które dla zearalenonu zostały przypisane takie jak dla deoksyniwalenolu.

Trzeci rozdział opisany w części eksperymentalnej rozprawy dotyczy doświadczeń polowych realizowanych w trzech sezonach wegetacyjnych (2018-2020). Rośliny pszenic sześciu genotypów różniących się odpornością na fuzariozę kłosa inokulowano szczepem *F. culmorum* i wobec kontroli określono plonowanie, wartość technologiczną ziarna oraz właściwości reologiczne ciasta uzyskanego z mąki pochodzącej z ziaren pszenicy uprawianej na polach doświadczalnych. W wyniku tych prac, stwierdzono, że porażenie ziarna pszenicy *Fusarium* (u odmian podatnych na przebieg infekcji) wpływa w sposób istotny na pogorszenie się parametrów technologicznych ziarna. Co ciekawe, wykazano że wśród scharakteryzowanych odmian pszenicy były genotypy mniej podatne na infekcje *Fusarium*. Wśród tych odmian wyróżniki jakościowe mąk i właściwości reologiczne ciast uzyskanych z tych mąk nie wskazywały zmian w porównaniu z kontrolą.

Osobiście uważam, że cennym uzupełnieniem powyższych badań, ułatwiającym wnioskowanie, byłaby analiza ilościowa genomowego DNA patogenu na roślinach i/lub w ziarnie, która pozwoliłaby w sposób ilościowy oszacowanie stopnia zainfekowania materiału *Fusarium*. Markerem obecności *Fusarium* w badanych próbkach mogłaby być również zawartość

ergosterolu. Tego typu badania byłyby bardzo pomocne w ocenie zainfekowania roślin i ziarna grzybami.

Analizując wyniki zaprezentowane przez Doktorantkę należy stwierdzić, że infekcje roślin zbożowych fitopatogenami z rodzaju *Fusarium* powodują u roślin uruchomienie złożonych mechanizmów obronnych efektem których jest zmienność w zawartości związków fenolowych w roślinie, w tym kwasu salicylowego i jasmonowego i innych. Mając na uwadze opisaną szeroko w literaturze zróżnicowaną zdolność roślin zbożowych do obrony przed fitotoksycznym działaniem mykotoksyn nasuwa się więc pytanie: Czy istnieje jakaś wspólna zależność pomiędzy tymi mechanizmami? To znaczy, czy na podstawie obecnego stanu wiedzy można powiązać biosyntezę związków fenolowych przez zainfekowane rośliny pszenicy z biosyntezą zmodyfikowanych mykotoksyn, np. deoksyniwalenol-3- β -D-glukozydem przez te rośliny?

Odrębny rozdział w dysertacji stanowi Dyskusja. Doktorantka na podstawie dostępnej literatury krok po kroku przedstawiła omówienie najważniejszych swoich wyników uzyskanych w efekcie realizacji prac eksperymentalnych. Dyskusję wyników przeprowadzono zwięźle, ale w mojej opinii poprawnie i wystarczająco.

Całość pracy została podsumowana w 11 wnioskach końcowych, które stanowią najważniejsze efekty pracy. Wnioski zaprezentowano w sposób zrozumiały. Na końcu pracy zamieszczono spis bibliograficzny, przy czym uważam że Doktorantka w wielu miejscach nie do końca zachowała należytą staranność podczas formatowania pozycji literaturowych.

Podsumowanie

Uwagi i komentarze do części z wynikami mają charakter polemiczny i w dużym stopniu edytorski. Nie mają wpływu na końcowy charakter naukowy pracy i liczę na ich wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony. Doktorantka włożyła ogrom pracy w planowanie wieloletnich doświadczeń polowych, eksperymentalnych i analitycznych. Doskonale opanowała narzędzia statystyczne oceny wyników. Na uznanie zasługuje wykorzystanie w eksperymentach dużej liczby odmian pszenicy, przez co wyniki nabrały charakteru praktycznego i stanowią punkt odniesienia do kontynuacji badań w omawianym temacie. Doktorantka udowodniła, że u roślin, infekcja *Fusarium* powoduje zmiany w zawartościach związków bioaktywnych. Na ogół im większa relatywnie zawartość związków polifenolowych w roślinach, tym niższa zdolność do kumulowania mykotoksyn w ziarniakach.

Rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Naukowej IUNG-PIB w Puławach o dopuszczenie Pani mgr inż. Edyty Aleksandrowicz do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.



