

prof. dr hab. Maria Dynowska

Katedra Mikrobiologii i Mykologii

Wydział Biologii i Biotechnologii

UWM w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. **” Ocena wrażliwości polifagicznych grzybów rodzaju *Fusarium* na olejki eteryczne”** Pani mgr Weroniki Walkowiak z Samodzielnej Katedry Biotechnologii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Opolskiego w Opolu.

Grzyby z rodzaju *Fusarium* to takson o dobrze zdefiniowanej pozycji formalnej oraz biologicznej w mykologii i fitopatologii, budzący coraz większe zainteresowanie także w mykologii lekarskiej. Najczęściej są one traktowane jako fakultatywne patogeny wielu roślin ważnych gospodarczo, głównie zbóż lub jako glebowe saprotrofy. Są to grzyby niezwykle plastyczne i ekspansywne dzięki tworzeniu licznych form specjalnych i ras fizjologicznych, które determinują szybkie procesy adaptacyjne, w tym nabywanie oporności na środki ochrony roślin. U roślin wywołują fuzariozy, u człowieka i zwierząt hialohyfonykozy różnych tkanek i narządów. Gatunkami najczęściej wymienianymi w mykologii medycznej są *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. culmorum* i *F. moniliformae* wszystkie wykazują tendencję do zajmowania naczyń krwionośnych, co jest przyczyną zakrzepów i martwicy tkanek. Największe zagrożenie stanowią mykotoksyny fuzaryjne, znajdujące się w paszy zwierząt lub w żywności pochodzenia roślinnego. Ich działanie jest wielorakie: powodują nekrozy skóry, hamują syntezę białek i DNA, wywołują „syndrom krwotoczny” z objawami wewnętrznymi w postaci wybroczyn, „syndrom wymiotny” i zanik łaknienia, stymulują „syndrom estrogenny” objawiający się bezpłodnością. Większość mykotoksyn *Fusarium* spp. odznacza się powinowactwem do szpiku kostnego, wywołując u zwierząt aleukie pokarmową, a ludzi aplazję szpiku z zespołem objawów przypominających początkową fazę białaczki. W związku z powyższym badania podjęte przez Doktorantkę uważam za niezwykle istotne, zwłaszcza w kontekście poszukiwania bezpiecznych środków ochrony roślin przed trudnymi do zwalczania grzybami z rodzaju *Fusarium*.

Temat jest ważny i aktualny, a konstrukcja pracy odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Dziekanat WP-T

15. 05. 2018

L. dz.DPA-

63 1067

Pracę rozpoczyna zwięzły i rzeczowy „Wstęp” uwypuklający potencjalną aktywność grzybobójczą olejków eterycznych w stosunku do szerokiego spektrum fitopatogenów, w tym grzybów z rodzaju *Fusarium*. Stanowi ono tło podjętej problematyki badawczej i merytorycznie uzasadnia wybór tematu.

Rozdział 1. „Przegląd literatury”, bardzo bogaty w treści, składa się z czterech tematycznych podrozdziałów zredagowanych wyjątkowo przejrzysto. Już w tym momencie daje się zauważyć dojrzałość naukową Doktorantki i jej wszechstronne przygotowanie do realizowanego tematu.

Na początku rozdziału Doktorantka zamieszcza ekofizjologiczną i biologiczną charakterystykę grzybów z rodzaju *Fusarium* uwypuklając ich dynamikę mataboliczną, która pozwala tym grzybom zasiedlać różne środowiska oraz wykorzystywać różne źródła pokarmu i energii. Autorka zwraca uwagę na ich potencjał biochemiczny w kontekście produkcji niebezpiecznych dla zdrowia i życia mykotoksyn oraz potencjał patogeniczności, którego konsekwencją są choroby roślin uprawnych, a zwłaszcza zbóż. Podaje aktualne stanowisko systematyczne rodzaju *Fusarium* i wyjaśnia z czego wynikały problemy taksonomiczne związane z grzybami o dwóch stadiach rozwojowych, a do takich należą badane przez Doktorantkę grzyby. Następnie, wskazuje metody stosowane aktualnie przy klasyfikacji rodzaju *Fusarium* ustosunkowując się do zalet i wad metod molekularnych. Moim zdaniem to bardzo ważny fragment dla taksonomów oraz diagnostów, którzy czasami bezkrytycznie podchodzą do metod molekularnych zaniedbując metody klasyczne.

W dalszej części Doktorantka przedstawia dokładny opis grzybni wegetatywnej i jej struktury, charakteryzuje enzymy hydrolityczne *Fusarium*, niezbędne w procesie infekcji i patogenezы oraz fuzariotoksyny, produkowane przez wybrane gatunki. Bardzo wiele miejsca poświęca mykotoksynom i ich oddziaływaniu na organizm człowieka oraz zwierząt.

Doktorantka bardzo umiejętnie przechodzi do tych cech grzybów z rodzaju *Fusarium*, które będą dotyczyły realizowanego przez nią tematu i wrażliwości badanych grzybów na różnego typu fungicydy stosowane w ochronie zbóż, głównie: związki chemiczne z grupy azoli, biofungicydy oraz olejki eteryczne, zawierające allelopatyny. Allelopatyny, biorące udział w szeregu interakcjach biochemicznych zachodzących w środowisku, działają zależnie od układu ekofizjologicznego i obecności mikroorganizmów. Działanie to może być szkodliwe (statyczne, bójcze) lub korzystne (stymulacja wzrostu i rozwoju, regulacja procesów biochemicznych itp.). Bardzo dobrze przedstawiła to autorka przy opisie zjawiska allelopatii.

Oczywistym jest fakt, że najwięcej miejsca w przeglądzie literatury, Doktorantka poświęciła charakterystyce olejków eterycznych: od ich występowania i powstawania poprzez skład chemiczny, podział, cechy organoleptyczne do właściwości, a zwłaszcza tych, które mogą być wykorzystywane w biologicznej ochronie roślin. Analizując wpływ różnych olejków eterycznych na grzyby, głównie z rodzaju *Fusarium*, przytoczyła przykłady ich destrukcyjnego działania na róże struktury komórkowe. Rozdział 1. kończą przykłady fungicydów na bazie olejków eterycznych (drzewa herbacianego, grejpfruta, czosnku), które są już w handlu.

W przeglądzie literatury Doktorantka, w kilku miejscach, podkreśla zdolności przystosowawcze grzybów z rodzaju *Fusarium*, które sprawiają, że grzyby te szybko uodparniają się na zmiany środowiskowe, w tym wszelkiego rodzaju środki przeciwgrzybicze. Dlatego bardzo ważny jest nie tylko trafiony dobór tych środków, ale także ich stężenie.

Przed sformułowaniem celu pracy Doktorantka założyła (Rozdział 2. „Hipoteza”), że grzybobójcze działanie olejków eterycznych o stężeniu do 2% na grzyby z rodzaju *Fusarium* może zależeć od składu chemicznego tych olejków.

Cel pracy (Rozdział 3. „Cel pracy”) został sformułowany w formie dwóch zadań badawczych. Pierwszym była ocena wrażliwości grzybów z rodzaju *Fusarium*, dokonana na podstawie zmian morfologicznych i fizjologicznych na olejki eteryczne o różnym składzie chemicznym i stężeniu. Drugim, ocena wpływu potencjału allelopatycznego niskich stężeń olejków eterycznych, hamujących rozwój grzybów z rodzaju *Fusarium* na zdolność kiełkowania zainfekowanych ziarniaków pszenicy.

Proponuję aby cel był jeden, np. „Celem pracy była ocena wrażliwości grzybów z rodzaju *Fusarium* na wybrane olejki eteryczne oraz wpływ potencjału allelopatycznego niskich stężeń tych olejków na zdolność kiełkowania zainfekowanych ziarniaków pszenicy”.

Materiał badawczy (Rozdział 4. „Materiał badań”) stanowiło 5 gatunków z rodzaju *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* i *F. poe*) wyizolowanych z porażonych ziarniaków pszenicy jarej (*Triticum aestivum*), odmiana Katoda, z terenu Niemiec (5 izolatów) oraz terenu Polski (4 izolaty). Testowane olejki eteryczne (0,025-0,05-0,125-0,50-1,0 i 2%) pochodziły z handlu: olejek tymiankowy, z trawy cytrynowej, *Litsea cubeba*, werbenowy, z drzewa herbacianego, kajeputowy, czosnkowy i grejpfrutowy. Skuteczność fungistatyczną tych olejków porównano z zaprawą Funaben T, zastosowaną w niższym, wyższym i zalecanym przez producenta stężeniu (0,125-0,25-0,5%).

Do realizacji przyjętych zadań badawczych zastosowano bogate metody laboratoryjne (Rozdział 5. „Metody badań”): 1. Klasyczne- do izolacji grzybów, makrohodowli wyjściowych, czystych kultur, identyfikacji oraz klasyfikacji, 2. Metody molekularne- do potwierdzenia identyfikacji i klasyfikacji izolatów najbardziej wrażliwych na olejki eteryczne, 3. Metody bioinformatyczne- do porównawczych analiz molekularnych, 4. Metody biochemiczne- do oznaczania składu chemicznego olejków eterycznych (chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas GC/MS), 5. Metody mikrobiologiczne- do analizy mikrobiologicznej gleby użytej w doświadczeniach wazonowych oraz 6. Metody fizjologiczne- do oceny wpływu olejków eterycznych na wzrost grzybni, kiełkowanie zarodników, do wyznaczenia minimalnego stężenia grzybobójczego najskuteczniej działającego olejku, do oceny energii i zdolności kiełkowania ziarniaków zaprawionych przyjętymi stężeniami olejków, niezaprawionych nimi i zaprawionych Funabenem T.

Uwzględniając wyniki skuteczności grzybobójczej testowanych olejków, w doświadczeniach wazonowych zbadano wpływ olejku tymiankowego na wzrost siewek pszenicy sztucznie inokulowanych izolatami grzybów. Należy podkreślić, że doświadczenia wazonowe zostały przeprowadzone w 11 wariantach. Końcowe badania skupiły się wokół wyboru najlepszego nośnika (spośród sześciu) dla olejku tymiankowego- był nim alginian sodu o stężeniu 1,5%. Wpływ olejku tymiankowego i wybranego nośnika na ziarniaki pszenicy sztucznie inokulowane zbadano przy użyciu mikrobiotestu Phytotoxkit firmy MicroBioTests Inc.

Metody zostały dobrane bardzo starannie, tak aby badania były prowadzone w logicznej kolejności. Każdy następny etap badań wynika z poprzedniego, a ich opis jest dokładny i przejrzysty. Bardzo dobrze zostały dobrane wszelkie kryteria porównawcze i kontrolne. Wszystko to świadczy o dużych zdolnościach warsztatowych Doktorantki, które zasługują na specjalne podkreślenie.

Najobszerniejszą część pracy stanowi Rozdział 6. „Wyniki i ich omówienie” zredagowany bardzo starannie. Doktorantka krok po kroku realizuje założenia pracy zgodnie z przyjętym tokiem metodycznym, a wyniki dokumentuje tabelami i rysunkami w sposób czytelny (rys. 9-17 to zdjęcia: makroskopowe grzybni i mikroskopowe- zarodników poszczególnych gatunków). Uzyskane wyniki są oryginalne i interesujące: w wieloaspektowy sposób potwierdzają informacje już znane na temat wykorzystania olejków eterycznych w ochronie roślin, ale też wnoszą szereg nowych danych, prezentujących bardziej szczegółowe podejście do tego zagadnienia. Wyniki uwypuklają znaczenie stężenia i składu chemicznego tych olejków przy ewentualnym ich zastosowaniu i zwracają uwagę, że wrażliwość grzybów

to nie tylko cecha gatunkowa, ale przede wszystkim cecha konkretnego szczepu, uwarunkowana jego pochodzeniem.

Po przeanalizowaniu wyników chciałabym zwrócić uwagę na te, które uważam za najistotniejsze:

1. Udowodnienie, że olejki eteryczne, bogate w terpenoidy (tymol, α i β cytral) wykazują wysoką aktywność fungistatyczną, a najwyższą, spośród testowanych, olejek tymiankowy (46% tymolu) oraz olejki z trawy cytrynowej i *Litsea cubeba* (do 62% cytralu)
2. Stwierdzenie wysokiej aktywności fungistatycznej olejku tymiankowego w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium*, niezależnie od stosowanego stężenia;
3. Wykazanie, że olejek tymiankowy o stężeniu 0,05% i 0,125% działa podobnie jak zaprawa Funaben T, skutecznie zabezpieczając siewki pszenicy przed grzybami z rodzaju *Fusarium*;
4. Zaproponowanie wykorzystania olejku tymiankowego do konstruowania zapraw nasiennych i wskazanie najefektywniejszych jego stężeń (0,025-0,05-0,125%) oraz najlepszego, dla tego olejku, nośnika (1,5% alginianu sodu z chlorkiem wapnia);
5. Stwierdzenie, że związki siarkoorganiczne, zawarte w oleju czosnkowym i limonen, dominujący w oleju grejpfrutowym skutecznie działają dopiero od stężenia 2%- to ważna informacja, gdyż biopreparaty na bazie tych związków już są stosowane.

W kontekście bardzo bogatych danych mam pewien niedosyt związany z dyskusją (Rozdział 7. „Dyskusja”)- jest dobrze napisana, ale zbyt skromna i nie powinna zawierać powtórzeń wyników. Sądzę, że wzbogaciłby ją liczne informacje zamieszczone w przeglądzie piśmiennictwa. Mam nadzieję, że przygotowując pracę do druku tak właśnie będzie.

Pracę kończą poprawnie sformułowane wnioski (Rozdział 8. „Wnioski”), spis literatury (Rozdział 9. „Spis literatury”- 170 pozycji, głównie anglojęzycznych, dobranych bez zastrzeżeń) oraz zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim.

Tekst napisany jest bardzo dobrym językiem, a styl i układ treści oraz jej zawartość sprawiają, że pracę czyta się z dużym zainteresowaniem. Jednak wkradły się pewne niefortunne sformułowania, stąd kilka uwag:

1. str.5- cyt... „zdolność do przeżywania na resztkach poźniwnych w postaci saprotroficznej grzybami”... W tym przypadku nie jest to wprawdzie błędne określenie, ale należy pamiętać, że grzyby z rodzaju *Fusarium* (jak większość grzybów) to saprotrofy, gdyż mogą rozwijać się na szczątkach organicznych różnego pochodzenia, także zwierzęcych, a wtedy nie możemy użyć terminu „saprofit”.

2. str. 6- cyt. „Znaczne ograniczenie rozwoju Fusarium zapobiegłoby tworzeniu toksynotwórczych dla ludzi i zwierząt mykotoksyn- to grzyby są toksynotwórcze a nie mykotoksyny.
3. str. 10- cyt. „Grzyby rodzaju Fusarium jako anamorficzne są nazywane grzybami pleśniowymi”- one należą do grzybów pleśniowych jak wiele innych rodzajów tworzących obfitą grzybnię powietrzną; „grzyby pleśniowe” to określenie związane z morfologią grzybni, a anamorfizm- związany jest ze stadium rozwojowym.
4. str 11- cyt. „Fitopatogeniczność tych grzybów polega na nawiązaniu pasożytnictwa antagonistycznego między grzybami i rośliną”- a kiedy pasożytnictwo jest nieantagonistyczne?
5. str. 32. pkt. 1. Wzrost i kiełkowanie zaliczono do cech morfologicznych, a to cechy fizjologiczne.

Wszystkie zamieszczone w recenzji uwagi i sugestie nie wpływają na ostateczną, wysoką ocenę pracy. Uważam ją za bardzo wartościową, bogatą metodycznie, z nowym podejściem do podjętej problematyki; ważną ze względów merytorycznych i aplikacyjnych, do wykorzystania nie tylko w ochronie roślin, ale także w profilaktyce i terapii grzybic o etiologii fuzaryjnej.

W związku z tym, że temat został zaprojektowany i przeprowadzony wzorcowo, a wyniki mogą posłużyć, jako tło i punkt wyjścia, do projektowania dalszych badań specjalistycznych i interdyscyplinarnych **proponuję pracę wyróżnić stosowną nagrodą.**

W podsumowaniu, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Przyrodniczo-Technicznego Uniwersytetu Opolskiego o dopuszczenie pani mgr Weroniki Walkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mania Dymarska —