

Gdańsk, dnia 26 sierpnia 2025 r.

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku

Abrahama 58 80-307 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Wiktorii Maj
z tytułu „ROLA WŁAŚCIWOŚCI METABOLICZNYCH,
MORFOLOGICZNYCH I GENETYCZNYCH GRZYBÓW *NEOSARTORYA* SPP.
(*ASPERGILLUS* SPP.) W KSZTAŁTOWANIU ICH ODPORNOŚCI NA ZWIĄZKI
KONSERWUJĄCE, CHEMICZNE ORAZ NATURALNE EKSTRAKTY ROŚLINNE”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Wiktorii Maj, została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Frąc w Zakładzie Badań Systemu Gleba-Roślina Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie. Promotorką pomocniczą była dr Giorgii Pertile zatrudniona w Zakładzie Badań Systemu Gleba-Roślina Instytutu Agrofizyki PAN. Badania były finansowane przez NCN w ramach projektu z programu PRELUDIUM BIS 2. Staż naukowy doktorantki został sfinansowany przez NAWA w ramach programu NAWA PRELUDIUM BIS 2.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań nad zróżnicowaniem morfologicznym, metabolicznym, fizjologicznym i genetycznym grzybów z rodzaju *Neosartorya*, powodujących istotne straty ekonomiczne w produkcji owoców, w szczególności truskawki oraz określenie zróżnicowania wrażliwości wybranych izolatów *Neosartorya* na naturalne i syntetyczne związki przeciwdrobnoustrojowe. Doktorantka nie tylko zbadała wymienione powyżej cechy, ale także podjęła badania w kierunku zidentyfikowania determinant genetycznych wysokiej odporności grzybów z rodzaju *Neosartorya* na czynniki stresowe. Równie istotne i wskazujące na znajomość szeregu aspektów warunkujących odporność grzybów na czynniki abiotyczne były

badania obejmujące charakterystykę mikrobiomu roślin gospodarza i to zarówno tych zainfekowanych przez grzyba jak i takich, które były traktowane substancjami antydrobnoustrojowymi: ekstraktami roślinnymi i chemicznymi konserwantami żywności. Doktorantka łącząc różne podejścia do prowadzonych kompleksowo badań zweryfikowała postawione hipotezy i odpowiedziała na pytanie, jakie czynniki warunkują wysoką odporność grzybów z rodzaju *Neosartorya* na abiotyczne czynniki stresowe oraz naturalne ekstrakty roślinne.

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje: streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, hipotezy badawcze i cel rozprawy, opis materiałów i metod oraz omówienie wyników zawartych w 3 opublikowanych pracach oryginalnych i dwóch przygotowanych do druku manuskryptach, podsumowanie badań, wnioski, oświadczenia współautorów publikacji oraz życiorys naukowy kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk rolniczych. Do rozprawy włączono 3 opublikowane parce i dwa przygotowane do druku manuskrypty. Recenzowana rozprawa napisana jest dobrym i klarownym językiem.

Pani Wiktoria Maj postanowiła w swoich badaniach odpowiedzieć na następujące pytania, które były celami Jej rozprawy doktorskiej:

1. Czy szczepy z rodzaju *Neosartorya* różnią się istotnie pod względem właściwości metabolicznych, morfologicznych i genetycznych?
2. Czy opisane zróżnicowanie wpływa na wrażliwość badanych izolatów na naturalne ekstrakty roślinne, konserwanty żywności i związki chemiczne będące fungicydami?
3. Jak ekspozycja szeregu izolatów grzybów z rodzaju *Neosartorya* na związki antydrobnoustrojowe różnego pochodzenia, wpływa na morfologię i fizjologię tych grzybów (wzrost, aktywność oddechową i przeżywalność)?
4. Czy ekspozycja szczepów *Neosartorya* na naturalne ekstrakty roślinne i konserwanty żywności wpływa na zmiany w ich profilu proteomicznym i metabolomicznym?
5. Czy analiza w pełni zsekwencjonowanych genomów szczepów *Neosartorya*, o różnej wrażliwości na naturalne ekstrakty roślinne i konserwanty żywności, pozwoli na

identyfikację genetycznych determinant warunkujących odporność na czynniki antydrobnoustrojowe?

6. Jak zmienia się mikrobiom truskawki w wyniku kontaminacji owoców grzybami z rodzaju *Neosartorya* oraz w wyniku traktowania owoców truskawki naturalnymi ekstraktami roślinnymi i konserwantami żywności.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania pozwoliły na uzyskanie odpowiedzi na wszystkie postawione pytania. W badaniach opisanych w rozprawie wykorzystano całe spektrum metod pozwalających na charakterystykę fenotypową i genotypową badanych drobnoustrojów. Do szczegółowej charakterystyki reakcji badanych grzybów na stres wykorzystano metody mikrobiologiczne, biochemiczne, genetyczne, proteomikę, metabolomikę oraz badania mikrobiomu owoców truskawki metodami metagenomicznymi. Wszystkie wykorzystane w pracy metody są bardzo dobrze opisane i scharakteryzowane, a uzyskane wyniki badań wyczerpująco opisane i udokumentowane. Na podkreślenie zasługuje umiejętność posługiwania się przez doktorantkę nie tylko metodami eksperymentalnymi, ale także opanowanie przez nią metod analizy bioinformatycznej i umiejętności graficznego przedstawiania wyników. Rozprawa reprezentuje nowoczesny kierunek badawczy polegający na wykorzystaniu i integracji tradycyjnych i najnowocześniejszych metod analitycznych i bioinformatycznych.

Uzyskane wyniki nie tylko poszerzają naszą wiedzę na temat fizjologii i genetyki ważnych gospodarczo saprofitów, powodujących degradację tkanek roślinnych, ale także wskazują podstawy naukowe umożliwiające efektywną ochronę produkowanych w Polsce truskawek przed powodującymi istotne straty gospodarcze grzybami z rodzaju *Neosartorya*. Oceniana rozprawa ma zatem ważne znaczenie naukowe i praktyczne.

Wybór tematyki badawczej jest bardzo interesujący i jak już podkreśliłam badania zostały zakrojone bardzo szeroko; można w tym kontekście powiedzieć o badaniach holistycznych obejmujących różne aspekty interakcji między tkankami roślinnymi, grzybami saprofitycznymi i środowiskiem.

W pierwszej części rozprawy (w pracy opublikowanej 2023 r. w *International Journal of Molecular Sciences* Doktorantka zebrała i usystematyzowała wiedzę na temat mechanizmów biochemicznych,

fizjologicznych i molekularnych warunkujących wysoką odporność grzybów z rodzaju *Neosartorya* (wcześniej klasyfikowanych do rodzaju *Aspergillus*) na niekorzystne warunki środowiskowe, takie jak na przykład:: wysokie temperatury czy substancje antydrobnoustrojowe. Szczegółowo scharakteryzowano morfologię, cykl życiowy i bioróżnorodność szczepów z rodzaju *Neosartorya* na należących do różnych gatunków, w szczególności: *N. spinosa*, *N. laciniosa* czy *N. hiratsukae* izolowanych z gleby i owoców truskawki w Polsce: Kolejna część publikacji zawiera opis zagrożeń związanych z występowaniem grzybów z rodzaju *Neosartorya* na owocach, w szczególności wysokiej odporności ich askospor na obróbkę cieplną. Szczegółowo opisano produkowane przez tego grzyba mykotoksyny, takie jak alfatoksyny, fumitremorginy, gliotoksyny i werrukulogen. Doktorantka scharakteryzowała także mechanizmy molekularne wskazywane jako odpowiedzialne za wysoką odporność *Neosartorya* na wysokie temperatury czy też wysoką zawartość cukrów w przetwarzanej żywności. Publikację tę można potraktować jak wstęp i przegląd literatury przedmiotu, dokonano w niej nie tylko kompleksowego przeglądu mechanizmów adaptacyjnych grzybów *Neosartorya* spp. do warunków stresowych, przedstawiono analizę potencjalnych zagrożeń związanych z obecnością tych grzybów i ich toksyn w produktach owocowych ale także wskazano jakie badania naukowe powinny być prowadzone aby w większym stopniu zabezpieczyć owoce przed gniciem wywołanym przez termostabilne grzyby z rodzaju *Neosartorya*.

W kolejnej części rozprawy, przedstawionej w pracy opublikowanej w 2024 r. w czasopiśmie *Scientific Reports*, doktorantka opisała badania dotyczące porównania wrażliwości 20 wybranych izolatów grzybów z rodzaju *Neosartorya* spp. na temperaturę oraz ekstrakty wodne z tkanek takich roślin jak: lawenda i nagietek oraz olejki eteryczne izolowane z lawendy, herbaty, goździka i rozmarynu. W pierwszym etapie zidentyfikowano badane szczepy poprzez sekwencjonowanie markera ITS1 i fragment genu β -tubuliny. Następnie, do oceny wpływu ekstraktów roślinnych na wzrost izolatów *Neosartorya* spp. zastosowano test dyfuzyjno-krażkowy oraz testy z wykorzystaniem MicroPlates Biolog™ MT2 i FF MicroPlates. W testach wykorzystano różne stężenia suszonych ekstraktów z lawendy i nagietka oraz olejków eterycznych ekstrahowanych z lawendy, herbaty, goździka i rozmarynu. Zbadano wpływ wymienionych czynników na wzrost, aktywność metaboliczną i intensywność oddychania izolatów z rodzaju *Neosartorya*.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono dużo zróżnicowanie badanych izolatów pod kątem zdolności do wykorzystywania różnych źródeł węgla i azotu oraz zmian w morfologii grzybni wynikających z traktowania testowanymi preparatami. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, iż najsilniejszą aktywność antydrobnoustrojową posiadają: suszony ekstrakt z lawendy i nagietka oraz olejki lawendowy i rozmarynowy. Wykonane analizy pozwoliły na podział izolatów na trzy różne grupy pod względem wrażliwości na ekstrakty naturalne. Ta część badań jest bardzo wartościowa, ponieważ pozwoliła na dokładną charakterystykę badanych izolatów i wybór materiału biologicznego do dalszych badań. W posumowaniu wyników zabrakło mi zestawienia (np. w postaci tabeli) podsumowującego właściwości badanych izolatów i uzasadniającego wybór izolatów do dalszych badań. **Chciałabym zapytać doktorantkę, czy zaobserwowała istotne, pod względem badanych cech (wrażliwości na ekstrakty, zdolności do wykorzystywania różnych źródeł węgla i azotu, morfologii grzybni) różnice między izolatami uzyskanymi z gleby i zainfekowanych owoców truskawki.**

Na kolejnym etapie badań, opisanych w pracy opublikowanej w 2024 r. w *Food Chemistry*, Doktorantka określiła wykorzystując płytki MicroPlates Biolog™ MT2 wpływ wybranych konserwantów żywności i związków chemicznych na wzrost i intensywność oddychania badanych wcześniej 20 izolatów *Neosartorya spp.* i stwierdziła iż związkiem o najwyższej efektywności jest pirosiarczyn sodu. Związek ten zastosowano w badaniach wrażliwości chemicznej 10 wybranych izolatów *Neosartorya* hodowanych na MicroPlates Biolog™ PM21-PM25 zawierających 120 różnych substancji (np. antybiotyków, związków cyklicznych czy chelatorów). Zbadano także przeżywalność i aktywność metaboliczną, traktowanych pirosiarczynem izolatów z zastosowaniem barwnika przyżyciowego - dioctanu fluoresceiny. Przeprowadzone badania potwierdziły zróżnicowaną odpowiedź badanych izolatów na pirosiarczyn sodu.

Ciekawym rozwinięciem opisanych w poprzedniej części rozprawy badań były prace nad analizą całych genomów oraz profilowaniem metabolomicznym pięciu wybranych szczepów *Neosartorya spp.* pod kątem zróżnicowania ich zdolności adaptacyjnych do obecności w podłożach ekstraktu z nagietka lekarskiego lub pirosiarczyny sodu o wykazanej wcześniej aktywności antydrobnoustrojowej. Warto podkreślić, iż w badaniach zastosowano najnowocześniejsze techniki: sekwencjonowanie całogenomowe następnej generacji (WGS) z zastosowaniem platformy Illumina MiSeq oraz chromatografie cieczową

sprzężona ze spektrometrią mas z analizatorem kwadrułowym zastosowano czasu przelotu ((LC-QTOF MS). Przeprowadzone badania pozwoliły na zidentyfikowanie genów kodujących białka związane z mechanizmami adaptacyjnymi do stresu abiotycznego: wysokiej/niskiej temperatury, pH, promieniowania UV czy niskiego stężenia glukozy. Studia nad reakcją badanych szczepów na działanie pirośniarczyny sodu i ekstraktu z nagietka lekarskiego przeprowadzono na podstawie analizy LC-QTOF MS oraz określenia zmian morfologicznych. Te ostatnie badania przeprowadzono za pomocą obrazowania skaningowym mikroskopem elektronowym i oraz mikroskopem fluorescencyjnym. Wykazano, że ekstrakty roślinne i konserwanty w różny sposób wpływają na szlaki metaboliczne i strukturę grzybni badanych izolatów. Istotne było wykazanie, iż pirośniarczyn sodu przy dłuższej ekspozycji wywołuje stres metaboliczny w komórkach wszystkich badanych izolatów *Neosartorya* spp., natomiast ekstrakt z nagietka lekarskiego działał krótkotrwale, tylko w pierwszym okresie ekspozycji obniżając żywotność izolatów *Neosartorya* spp. Uzyskane wyniki wskazują, iż badane grzyby posiadają złożone mechanizmy adaptacyjne tak na poziomie genetycznym jak i metabolicznym i morfologicznym. Przeprowadzone badania pozwoliły na scharakteryzowanie odporności i zdolności adaptacyjnej izolatów *Neosartorya* spp., i stanowią dobrą podstawę do badań nad rozwojem skuteczniejszych strategii ochrony żywności przed grzybami z rodzaju *Neosartorya* powodującymi gnicie owoców miękkich. **W tym kontekście chciałabym zadać pytanie, które ze zidentyfikowanych genów *Neosartorya* uważa Pani za najważniejsze dla ich wysokich zdolności adaptacyjnych?**

W kolejnym wchodzącym w skład rozprawy manuskrypcie Doktorantka zbadała i opisała kolejny bardzo interesujący aspekt interakcji między grzybami z rodzaju *Neosartorya* spp. a grzybami i bakteriami tworzącymi naturalny mikrobiom truskawki. Dodatkowo określiła jak ekstrakt z nagietka lekarskiego i pirośniarczyny sodu wpływają na mikrobiom truskawek zdrowych i zanieczyszczonych trzema różnymi izolatami *Neosartorya* spp. Wyniki tych badań są niezwykle interesujące i wskazują, że ekstrakt z nagietka lekarskiego oraz pirośniarczyny sodu wpływały istotnie na zmiany w mikrobiomie owoców truskawki, przy czym zbiorowiska grzybów wykazywały większą wrażliwość na badane czynniki niż zbiorowiska bakteryjne. Przeprowadzone badania i analizy wykazały, że zmiany mikrobiomu zależały nie tylko od zastosowanego środka (ekstrakt roślinny, konserwant żywności), ale także od zaaplikowanego izolatu *Neosartorya* spp.; w szczególności od jego wrażliwości na ekstrakt nagietka lekarskiego i pirośniarczyny

sodu). Doktorantka wykazała, iż ekstrakt roślinny sprzyjał wzrostowi i rozwojowi potencjalnie korzystnych mikroorganizmów. Z kolei pirosiarczyn sodu sprzyjał rozwojowi grzybów strzępkowych i powodował intensywny wzrost ich aktywności metabolicznej. Uzyskane wyniki poza niezaprzeczną wartością naukową mają istotną wartość aplikacyjną i mogą posłużyć do efektywniejszego projektowania zrównoważonych strategii ochrony żywności, które ograniczają rozwój saprofitów powodujących gnicie owoców, a jednocześnie wspierają mikrobiom owoców, który może pełnić funkcje czynnika biokontroli. W omawianym manuskrypcie Doktorantka zamiennie używa określenia „zakażenie owoców truskawki grzybami” (str. 95, 96) i „zanieczyszczenie owoców truskawki grzybami.....”(str. 117,118); czy można używać tych dwóch sformułowań zamiennie.

Podsumowując przeprowadzone przez Doktorantkę badania i analizy chciałabym podkreślić ogrom wykonanych analiz oraz wykorzystanie dużej liczby najnowocześniejszych metod i technik. Doktorantka przeprowadziła liczne badania, analizując odporność, zdolności adaptacyjne, właściwości metaboliczne, biochemiczne i cechy genomowe 20 izolatów *Neosartorya* spp. W kolejnych etapach badań koncentrowała się na badaniach mniejszej liczby izolatów, ale poszerzała zakres wykonywanych badań, między innymi o szeroką analizę wpływu zastosowanego badania izolatu i stosowanego czynnika antygrzybowego na strukturę mikrobiomu truskawki. Wszystkie otrzymane wyniki zostały dokładnie opisane i wnikliwie przeanalizowane. Na podkreślenie zasługuje szerokie wykorzystanie metod bioinformatycznych do analizy i interpretacji uzyskanych wyników. W efekcie stanowiące rozprawę badania są podstawą 3 bardzo dobrze opublikowanych prac naukowych i dwóch przygotowywanych do druku manuskryptów.

Wyrażam wysokie uznanie dla Pani Wiktorii Maj oraz Pani prof. dr hab. Magdaleny Frąc, promotorki rozprawy i Pani dr Giorgii Pertile, promotorki pomocniczej w przewodzie doktorskim. Oceniana rozprawa znakomicie dokumentuje opanowany przez Panią Wiktorię Maj warsztat naukowy, który umożliwia jej prowadzenie w przyszłości ważnych naukowo i aplikacyjnie badań związanych z wykorzystaniem technik mikrobiologicznych, biochemicznych, genomowych i metagenomicznych, pozwalających na identyfikację mechanizmów warunkujących wirulencję i zdolność do adaptacji do niekorzystnych warunków grzybów z rodzaju *Neosartorya*, oraz zbadanie podstaw molekularnych interakcji między tkankami roślinnymi a komórkami grzybów powodujących ich degradację.

Wnioski końcowe

W świetle przedstawionej powyżej, bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej magister Wiktorii Maj wnoszę do Rady Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzyńskiego PAN w Lublinie o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzowana praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2024 r. , poz. 1571).

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 poz.1789) w związku z art. 179 ust. 1, z dnia 3 lipca 2018 r. Ustawy Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz.1669).

Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Agrofizyki o dopuszczenie Pani mgr Wiktorii Maj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o wyróżnienie bardzo wartościowej rozprawy doktorskiej Pani mgr Wiktorii Maj. Mój wniosek uzasadniam bardzo wysoką wartością naukową recenzowanej rozprawy oraz wykorzystaniem w badaniach niezwykle szerokiej gamy metod analitycznych i bioinformatycznych.



Ewa Łojkowska