

**Dr inż. Romuald Gwiazdowski**

Zakład Badania Środków Ochrony Roślin  
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

# **AUTOREFERAT**

*PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS OSIĄGNIĘĆ I DOROBKU NAUKOWEGO*

POZNAŃ 2016 r.

## 1. IMIĘ I NAZWISKO

Romuald Gwiazdowski

## 2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- mgr inż. rolnictwa w zakresie ochrony roślin, Wydział Rolniczy, Akademia Rolnicza w Poznaniu, praca magisterska 1996: „Ocena przydatności nowej wytwornicy aerozolowej typu Minimatic w ochronie roślin szklarniowych przed chorobami i szkodnikami”.

- dr inż. nauk rolniczych, w zakresie agronomii, Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu, praca doktorska 2005: „Wpływ terminu stosowania wybranych fungicydów na ograniczenie występowania chorób grzybowych rzepaku ozimego”.

## 3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1997 - Zakład Mikologii, Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu, pracownik inżynierjno-techniczny

1997 - Zakład Mikologii, Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu, asystent naukowy, prace badawczo-rozwojowe.

2005 do chwili obecnej - Zakład Badania Środków Ochrony Roślin, Instytut Ochrony Roślin w Poznaniu, adiunkt, prace badawczo-rozwojowe, badanie skuteczności środków ochrony roślin. Od 2007 funkcja kierownika Zespołu Badania Fungicydów.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz.1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Gwiazdowski R. 2016. Ocena możliwości zastosowania bakterii *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 oraz *Lactobacillus plantarum* L2 w ochronie rzepaku ozimego przed chorobami. Rozprawy Naukowe Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego. Wydawnictwo Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Zeszyt 31: 124 ss. [ISSN 1730-038X]

Recenzent wydawniczy: prof. dr hab. Zbigniew Weber

**b) omówienie celu naukowego w/w pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Rzepak (*Brassica napus* L.), należący do rodziny *Brassicaceae*, jest jedną z najpowszechniej uprawianych roślin na świecie, zajmując za soją drugie miejsce, wśród roślin oleistych. Zarówno w Europie jak i w Polsce dominuje uprawa rzepaku ozimego, który należy zarazem do najważniejszych roślin oleisto-białkowych w naszym kraju. Należy podkreślić, że Polska jest jednym z największych w Europie producentów, przetwórców i eksporterów rzepaku. Rzepak jest wykorzystywany w przemyśle w wielu kierunkach. Nasiona rzepaku są wykorzystywane do produkcji oleju rzepakowego, a pozostałe w przerobie nasion makuchy i śruty poekstrakcyjne, stanowią cenną paszę białkową dla zwierząt gospodarskich. W ostatnich latach olej rzepakowy jest również wykorzystywany jako surowiec do produkcji biokomponentu dodawanego do oleju napędowego.

Ważna rola rzepaku w gospodarce, zarówno w Polsce, jak i na świecie, wiąże się z dążeniem hodowców do uzyskania wysokich, odpowiedniej jakości plonów. Duży problem w uprawie tej rośliny stanowią choroby powodowane przez grzyby patogeniczne, które mogą znacząco ten plon obniżyć, niekiedy nawet o kilkanaście do kilkudziesięciu procent. Dlatego bardzo istotna jest ochrona rzepaku przed patogenami. Zgodnie z aktualnymi trendami dąży się do wykorzystania integrowanej ochrony, łączącej monitoring patogenów i elementy agrotechniki z metodami chemicznymi i niechemicznymi. Ponieważ integrowana ochrona roślin przedkłada metody niechemiczne nad chemicznymi, szczególnie istotne wydaje się prowadzenie badań w kierunku poszukiwania i testowania biologicznych środków ochrony. Ochrona biologiczna stanowi jeden z ważniejszych elementów integrowanej ochrony roślin, jako metoda niechemiczna, a wśród biopestycydów znaczące miejsce zajmują środki wykorzystujące mikroorganizmy. Wciąż jednak dla szeroko rozumianego rolnictwa jest to niewystarczająca oferta, dlatego prowadzone są intensywne badania nad poszukiwaniem nowych drobnoustrojów, tworzeniem nowych formułacji i efektywniejszych sposobów aplikacji. Większość badań dotyczy mikroorganizmów pochodzących ze środowiska naturalnego, jak gleba czy materiał roślinny. Wiele bakterii z tej grupy wykazuje silny antagonizm wobec patogenów, a jednocześnie może korzystnie wpływać na wzrost roślin, dlatego określa się je jako PGPB – z ang. Plant Growth Promoting Bacteria, a w odniesieniu do bakterii związanych ze strefą korzeniową - PGPR – z ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Znaczącą rolę przypisuje się również niektórym grzybom, np. z rodzaju *Trichoderma*.

Warto również podkreślić, że w uprawach rzepaku stosowanie biologicznych środków ochrony jest ograniczone. Obecnie od 2015 roku zarejestrowany jest tylko jeden preparat do ochrony rzepaku przed zgnilizną twardzikową, Contans WG, zawierający pasożytniczy grzyb *Coniothyrium minitans*.

W niniejszej pracy przedstawiono możliwość wykorzystania bakterii fermentacji mlekowej i propionowej jako elementu ochrony rzepaku ozimego przed patogenicznymi grzybami. Pomimo, iż bakterie te są znane z ich potencjału przeciwdrobnoustrojowego, w tym skierowanego wobec

patogenicznych grzybów, niewiele jest danych literaturowych wskazujących na ich wykorzystanie jako czynników biologicznej ochrony roślin. Podkreśla się przede wszystkim ich rolę w przemyśle spożywczym. Niewątpliwą zaletą badanych bakterii jest ich bezpieczeństwo dla ludzi i zwierząt. Zarówno bakterie fermentacji mlekowej, w skrócie LAB (z ang. - lactic acid bacteria), jak i fermentacji propionowej – PAB (z ang. - propionic acid bacteria) są uważane za bezpieczne i posiadają status GRAS (z ang. Generally Recognized as Safe – uznany za bezpieczny) ustanowiony przez amerykańską Komisję ds. Żywności i Leków (FDA). Ponadto większość gatunków bakterii fermentacji mlekowej oraz dwa gatunki należące do *Propionibacterium*, tj. *P. freudenreichii* oraz *P. acidipropionici* posiadają status QPS (z ang. Qualified Presumption of Safety – zakwalifikowany jako bezpieczny) ustalony przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA (FDA 2010; EFSA 2013).

Biorąc pod uwagę powyższą argumentację, głównym celem prezentowanej pracy było określenie możliwości wykorzystania wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Lactobacillus* [*L. plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al.] i *Propionibacterium* [*P. freudenreichii* ssp. *shermanii* (van Niel) Holdeman & Moore] jako czynników wspomagających ochronę rzepaku ozimego przed ważniejszymi chorobami. Realizacja założonego celu opierała się na przeprowadzeniu doświadczeń obejmujących:

- Ocenę fungistatycznego oddziaływania *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 i *Lactobacillus plantarum* L2 wobec najważniejszych patogenów rzepaku w warunkach laboratoryjnych.
- Ocenę skuteczności bakterii *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 i *L. plantarum* L2 w hamowaniu rozwoju ważniejszych chorób rzepaku w warunkach szklarniowych.
- Ocenę skuteczności bakterii *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 i *L. plantarum* L2 w hamowaniu rozwoju ważniejszych chorób rzepaku w warunkach polowych.
- Określenie wpływu zastosowanych bakterii na procesy biochemiczno-fizjologiczne w roślinach na podstawie wybranych parametrów.

Podsumowując, zakres badań podjętych w prezentowanej pracy miał na celu weryfikację następujących hipotez badawczych:

1. Wybrane bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Propionibacterium* mogą efektywnie hamować rozwój grzybów patogenicznych dla rzepaku.
2. Hodowle i supernatanty z hodowli wybranych bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Propionibacterium* mogą skutecznie hamować rozwój chorób rzepaku powodowanych przez patogeniczne grzyby w warunkach szklarniowych i polowych.
3. Hodowle i supernatanty z hodowli wybranych bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Propionibacterium* mogą wpływać pozytywnie na rośliny poprzez uruchomienie procesów obronnych rzepaku.

W doświadczeniach wykorzystano szczep kolekcyjny *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 oraz szczep *L. plantarum* L2, wyizolowany z fermentowanego materiału roślinnego i zidentyfikowany na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu 16sRNA oraz przyrównania do sekwencji dostępnych w bazie NCBI. W pierwszym etapie doświadczeń potwierdzono szeroki zakres ich aktywności fungistatycznej wobec grzybów patogenicznych dla rzepaku, należących do rodzajów *Alternaria*, *Botrytis*, *Plenodomus*, *Sclerotinia* i *Verticillium*. Na stopień zahamowania wzrostu poszczególnych izolatów grzybów wpływały: gatunek i szczep bakterii oraz forma ich stosowania. Zwykle silniejsze oddziaływanie wykazywały bakterie fermentacji propionowej niż mlekowej. Silniejsze oddziaływanie wykazały hodowle z żywymi komórkami bakterii niż supernatanty, co może być związane z faktem, że w przypadku hodowli w trakcie doświadczenia komórki dalej mogły wytwarzać metabolity, podczas gdy w przypadku supernatantów nie było takiej możliwości.

Badania, określające skuteczność hamowania rozwoju ważniejszych chorób rzepaku przez hodowle i supernatanty z hodowli bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w różnych kombinacjach, obejmowały doświadczenia szklarniowe i trzy sezony doświadczeń polowych. Jako środki porównawcze (standardowe), wykorzystano biofungicyd Polyversum WP oraz fungicyd Horizon 250 EW.

W doświadczeniach szklarniowych, prowadzonych w latach 2010-2011, oceniano wpływ bakterii *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 oraz *L. plantarum* L2 na ograniczanie występowania: suchej zgnilizny kapustnych (*P. lingam*), czerni krzyżowych (*A. brassicae*) i szarej pleśni (*B. cinerea*) na rzepaku ozimym (w eksperymentach wykonano sztuczną inokulację roślin poprzez nanoszenie grzybów na liście). Określano także kondycję roślin, mierzono wskaźnik zieloności liści i oceniano fitotoksyczność badanych bakterii, supernatantów i środków porównawczych. Wykazano, że w warunkach szklarniowych hodowle i supernatanty nie zawierające bakterii *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 oraz *L. plantarum* L2 ograniczały rozwój suchej zgnilizny kapustnych, szarej pleśni i czerni krzyżowych, co wyrażało się głównie obniżeniem procentu porażonej powierzchni liści. Obserwowano także niewielką poprawę kondycji roślin, szczególnie w obiektach, w których widoczna była również najwyższa skuteczność ograniczenia chorób. W przypadku zieloności roślin, zauważalna była tylko pewna tendencja do poprawy tego parametru.

Doświadczenia polowe prowadzono w trzech sezonach, w latach 2011 – 2014 w Winnej Górze. W każdym sezonie opryskiwanie roślin rzepaku wykonywano w dwóch terminach: T1 - wiosną po ruszeniu wegetacji w fazie wzrostu pędu głównego BBCH 32-34 oraz T2 - wiosną w fazie kwitnienia BBCH 65. W doświadczeniach zastosowano kilka wariantów opryskiwania, w tym hodowle bakterii *L. plantarum* L2 i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4, supernatanty z hodowli tych bakterii, mieszaniny supernatantów ze środkiem chemicznym oraz biologiczny preparat Polyversum WP. Hodowle i supernatanty z hodowli bakterii zastosowano dwukrotnie, ponieważ wcześniejsze doświadczenia

(dane nie publikowane) wykazały, że jednokrotne stosowanie daje niepowtarzalne wyniki, przez co trudno było wyciągnąć jednoznaczne wnioski na temat ich skuteczności, szczególnie w odniesieniu do niektórych chorób jak zgnilizna twardzikowa czy wpływu na plon nasion. Dodatkowo, w obu terminach zastosowano 5 - krotnie większą dawkę mieszaniny supernatantów (30 l/ha) przede wszystkim w celu sprawdzenia czy metabolity bakterii mogą spowodować działanie fitotoksyczne, a także, czy kilkakrotnie wyższa dawka może wykazać wyższą skuteczność ochrony roślin przed chorobami. Środki porównawcze, Horizon 250 EW i Polyversum WP zastosowano w postaci jednorazowych opryskiwań. W pracach różnych autorów stosuje się nieco odmienne podejście do środków biologicznych i chemicznych w badaniach porównawczych, co wynika z faktu, że czynniki biologiczne często działają wolniej i mniej skutecznie. Zastosowane środki ochrony, zarówno pochodzenia biologicznego, jak i fungicyd, w większości przypadków, hamowały rozwój chorób. W poszczególnych sezonach obserwowano zróżnicowane nasilenie występowania chorób na rzepaku ozimym, co było związane z panującymi warunkami atmosferycznymi. Najczęściej występowały: czerń krzyżowych, zgnilizna twardzikowa i szara pleśń. W niektórych sezonach występowały również: biała plamistość liści i mączniak prawdziwy. Stosowane środki w największym stopniu ograniczały występowanie czerni krzyżowych i zgnilizny twardzikowej. Z reguły najsilniejsze hamowanie rozwoju chorób występowało w obiektach traktowanych fungicydem Horizon 250 EW, aczkolwiek dobre rezultaty odnotowano także w przypadku połączenia mieszaniny supernatantów z hodowli obydwu gatunków bakterii z fungicydem Horizon 250 EW przy jednoczesnym zmniejszeniu ilości środka chemicznego. Natomiast stosowanie najwyższej dawki mieszaniny supernatantów (30 l/ha), tylko sporadycznie wpływało lepiej na hamowanie rozwoju chorób niż stosowanie niższych dawek hodowli i supernatantów badanych bakterii. Nie stwierdzono jednocześnie fitotoksycznego oddziaływania stosowanych środków ani większego wpływu na MTN, a także na zawartość białka i oleju w nasionach rzepaku. Odnotowano natomiast różnice w wysokości plonu pomiędzy poszczególnymi latami badań oraz obiektami badawczymi.

Ze względu na niewielką liczbę publikacji dotyczących zastosowania bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w ochronie roślin, w pracy podjęto również próbę określenia wpływu tych mikroorganizmów i ich supernatantów na poziom wybranych metabolitów wtórnych w liściach rzepaku. Oznaczenia obejmowały określenie ogólnej zawartości związków fenolowych, zawartości flawonoidów: naringeniny i genisteiny oraz aktywności  $\beta$ -glukozydazy.

Związki fenolowe stanowią zróżnicowaną grupę metabolitów wtórnych roślin, występujących we wszystkich częściach roślin i uznanych za najbardziej rozpowszechnioną grupę metabolitów roślinnych. Są niezbędne dla wzrostu i rozmnażania roślin. Niektóre z nich są wytwarzane konstytutywnie, podczas gdy inne są indukowane w odpowiedzi obronnej roślin na czynniki stresowe jak obecność patogenów. Związki polifenolowe nie są konieczne do funkcjonowania metabolizmu

podstawowego roślin, ale uważa się, że są istotne dla przetrwania roślin w środowisku i mogą pełnić funkcje związków ochronnych (przed roślinożercami, patogenami, bakteriami, wirusami), wykazywać działanie sygnalizacyjne (przywabianie owadów), a także chronić roślinę przed promieniowaniem ultrafioletowym. W prezentowanej pracy zawartość wybranych metabolitów wtórnych oznaczano w określonych odstępach czasowych po wykonaniu na roślinach opryskiwania z wykorzystaniem środków pochodzenia biologicznego i chemicznego. Zawartość związków fenolowych zmieniała się w zależności od czasu obserwacji i obiektu. Po 24 h od zabiegu opryskiwania w większości prób zawartość związków fenolowych była niższa niż w obiekcie kontrolnym, jednak ulegała zmianom w kolejnych dniach. Od 72 h największe zmiany w zawartości związków fenolowych obserwowano w obiektach traktowanych środkami pochodzenia biologicznego. Najwyższą zawartość związków fenolowych odnotowano po dwóch tygodniach od wykonania zabiegów opryskiwania w porównaniu do obserwacji prowadzonych po 24, 72 i 96 h, przy czym najwyższe stężenia stwierdzono w obiektach, w których zastosowano mieszaniny supernatantów *L. plantarum* L2 i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* P4 oraz preparat Polyversum WG.

Podobną zależność obserwowano w przypadku flawonoidów. Flawonoidy są jedną z ważniejszych grup polifenoli, które biorą udział w tworzeniu koloru, zapachu i smaku owoców, kwiatów i nasion roślin, ale też uczestniczą w ochronie rośliny przed czynnikami biotycznymi jak patogeny i abiotycznymi jak promieniowanie UV czy temperatura. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy poziom flawonoidów: naringeniny i genisteiny, zmienił się w czasie trwania doświadczenia, przy czym tendencje dla obu badanych związków w poszczególnych wariantach doświadczeń były podobne. Pomędzy badanymi obiektami widoczne są duże różnice w zawartości flawonoidów. Po 24 h od wykonania zabiegu opryskiwania podwyższony poziom flawonoidów obserwowano tylko w nielicznych obiektach, natomiast w kolejnych godzinach i dniach obserwacji poziom naringeniny i genisteiny ulegał zmianom. Po 2 tygodniach od zabiegu opryskiwania w większości prób poziom flawonoidów był wyższy niż w próbie kontrolnej za wyjątkiem liści rzepaku potraktowanych środkiem Horizon 250 EW w dawce 0,375 l/ha, w których poziom obu flawonoidów był niższy.

W niniejszej pracy badano także aktywność  $\beta$ -glukozydazy, enzymu uwalniającego związki fenolowe z ich glikozydowych połączeń. Oznaczenie wykonano w liściach rzepaku po 2 tygodniach od zabiegu opryskiwania, kiedy ogólny poziom związków fenolowych oraz zawartość flawonoidów były najwyższe. Rezultaty badań wykazały, że aktywność enzymu była najwyższa w próbkach liści potraktowanych hodowlami bakterii *L. plantarum* L2 w dawce 6,0 l/ha. W większości prób aktywność  $\beta$ -glukozydazy była porównywalna z obiektem kontrolnym.

Uzyskane wyniki mogą wskazywać na uruchomienie procesów obronnych rzepaku po zastosowaniu bakterii fermentacji mlekowej i propionowej, co może wpływać pozytywnie na

zdrowotność uprawy rzepaku. Dane literaturowe dotyczące wpływu bakterii fermentacji mlekowej są bardzo ograniczone, a w odniesieniu do bakterii fermentacji propionowej nie ma takich informacji.

Badania przeprowadzone w prezentowanej pracy mogą stanowić wstęp do podjęcia kolejnych prac nad opracowaniem odpowiednio trwałej formułacji uwzględniając również ekonomiczne aspekty przy doborze składu pożywki. Na pewno należy wziąć pod uwagę, że biologiczne czynniki w większym stopniu niż czynniki chemiczne są narażone na interakcje ze środowiskiem, do którego są wprowadzane, stąd zmienność ich działania może być większa. Rezultaty badań wskazują również na konieczność doboru odpowiednich dawek preparatów biologicznych, tym bardziej, że zwiększanie ilości hodowli bakterii wytwarzających kwasy, jak bakterie wykorzystywane w niniejszej pracy, może zbyt mocno obniżyć pH cieczy roboczej, co mogłoby wpłynąć niekorzystnie na rośliny. Ponadto, stosowanie hodowli i supernatantów w dużych ilościach może wpłynąć na obniżenie opłacalności zabiegów.

Rezultaty przeprowadzonych badań, jak również najnowsze dane literaturowe dają podstawę do kontynuacji badań nad wykorzystaniem bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w ochronie rzepaku ozimego. Ze względu na dużą zmienność czynników środowiskowych wpływających na skuteczność tych bakterii można je rozpatrywać jako czynnik wspomagający działanie fungicydów przy jednoczesnym ograniczeniu dawek środków chemicznych wykorzystywanych podczas zabiegów.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

### **5A. Omówienie osiągnięć naukowo-badawczych przed uzyskaniem stopnia doktora**

W roku 1996 ukończyłem studia magisterskie na kierunku rolnictwo w zakresie ochrony roślin na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej w Poznaniu, a od 1997 roku rozpocząłem pracę w Zakładzie Mikologii w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu, najpierw jako pracownik inżynierjno-techniczny, a potem asystent. W 2005 roku obroniłem pracę doktorską na temat „Wpływ terminu stosowania wybranych fungicydów na ograniczenie występowania chorób grzybowych rzepaku ozimego”, wykonywaną pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Webera. Tematyka pracy związana była z ochroną rzepaku przed chorobami powodowanymi przez patogeniczne grzyby. Tendencje obserwowane przez ostatnie dekady wskazują na dążenie do ograniczania ochrony chemicznej do niezbędnych zabiegów i zoptymalizowania terminu ich stosowania. Stąd też głównym celem niniejszej pracy było określenie wpływu wybranych fungicydów, zastosowanych w różnych terminach, na ograniczenie występowania chorób rzepaku powodowanych przez grzyby. W ramach przeprowadzonych doświadczeń oceniano także wpływ chemicznej ochrony na przetrwanie roślin, ich wzrost oraz plon i masę tysiąca nasion. Podjęto również próbę oceny opłacalności stosowania fungicydów w różnych terminach. Ponadto, w pracy określono skład populacji jednego z głównych



patogenów, grzyba *Phoma lingam*, na obszarze prowadzonych doświadczeń. Wykazano zróżnicowanie działanie zastosowanych w pracy fungicydów na ograniczenie występowania chorób powodowanych przez grzyby oraz ich wpływ na plon. Określenie jednego terminu okazało się niemożliwe dla optymalnego ograniczenia wszystkich chorób jednocześnie, co wynika przede wszystkim z epidemiologii poszczególnych chorób. Przeprowadzone badania miały duże znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. Optymalizacja terminu stosowania fungicydów wobec określonych chorób może ograniczyć ich aplikowanie, co jest korzystne zarówno pod względem ekonomicznym, jak i środowiskowym. Zastosowanie fungicydu w optymalnym terminie może nie tylko poprawić zdrowotność rzepaku, ale także wpłynąć na zwiększenie plonu i ekonomię uprawy.

## **5B. Omówienie osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia doktora**

Po obronie doktoratu, w roku 2005, zostałem zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Badania Środków Ochrony Roślin w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu, gdzie od 2007 roku pełnię funkcję kierownika Zespołu Badania Fungicydów. Działalność naukowa, prowadzona przez mnie w tym okresie dotyczyła kilku obszarów, omówionych poniżej, związanych głównie z ochroną rzepaku przed chorobami, poszukiwaniem i rozwojem nowych sposobów ochrony roślin, w tym metod biologicznych. Badania obejmowały również możliwość wykorzystania cieczy jonowych w ograniczaniu rozwoju patogenicznych grzybów.

### **Integrowana ochrona rzepaku ozimego przed chorobami powodowanymi przez patogeniczne grzyby**

Po obronie doktoratu moje zainteresowania naukowe koncentrowały się nadal wokół ochrony rzepaku ozimego przed chorobami powodowanymi przez patogeniczne grzyby, a w szczególności nad możliwościami zastosowania zasad integrowanej ochrony roślin w uprawie tej rośliny. Koncepcja Integrowanej Ochrony Roślin (z ang. Integrated Pest Management - IPM) to ekosystemowe podejście do produkcji roślinnej i ochrony roślin, które łączy w sobie różne strategie i praktyki w celu uzyskania zdrowych plonów i zminimalizowania stosowania pestycydów. Przyjmuje się, że podstawą integrowanej ochrony roślin jest monitorowanie występowania chorób i szkodników w uprawach oraz systemy prognozowania, ostrzegania i wczesnego diagnozowania. Wymaga to właściwej identyfikacji organizmu szkodliwego, znajomości cyklu życia, jego żywicieli i możliwości oraz sposobów rozprzestrzeniania się, interakcji pomiędzy organizmem szkodliwym a uprawianymi roślinami, a także etiologii choroby i wpływu czynników środowiskowych.

Zgodnie z przedstawionymi założeniami, opracowano metodyki integrowanej ochrony rzepaku, uwzględniającej wszystkie elementy uprawy i ochrony przed chorobami. Zasadniczą częścią, opracowaną przeze mnie w ramach omawianej tematyki, były wytyczne w zakresie ochrony rzepaku przed chorobami powodowanymi przez patogeniczne grzyby. Szczególną uwagę zwrócono na

stosowanie środków ochrony chemicznej, która powinna być ograniczona do niezbędnego minimum. Podkreślono również konieczność znajomości biologii patogenu, objawów chorobowych oraz progów szkodliwości, aby prawidłowo wyznaczać termin zwalczania, dobór środków i wymagane dawki. Opracowane metodyki stanowiły część opracowań zbiorowych Instytutu Ochrony Roślin (zał. 4 E 1-4), publikacji (zał. 4 II D 1; II D 16; II D 23) i prezentacji na konferencji (zał. 4 III B 34). Badania będące podstawą wymienionych prac realizowano w ramach projektów statutowych IOR-PIB i programu wieloletniego (zał. 4 II I 3, II I 4, II I 7).

### **Fungistatyczne właściwości cieczy jonowych i surfaktantów**

Pomimo rozwoju metod niechemicznych, m.in. biologicznych, na chwilę obecną nie jest możliwe uzyskanie wystarczającego poziomu ochrony roślin przed patogenami z ich wykorzystaniem, dlatego rozwiązaniem może być stosowanie substancji o możliwie niskiej toksyczności. Do takich substancji należą ciecze jonowe, określane jako „rozpuszczalniki projektowalne”, ze względu na możliwość modyfikowania ich właściwości, lub „zielone rozpuszczalniki” ze względu na ich niską toksyczność. Pod względem chemicznym są to sole zawierające organiczny kation i organiczny bądź nieorganiczny anion, których wspólną cechą jest temperatura topnienia nie przekraczająca 100°C. Możliwość sterowania niektórymi parametrami cieczy pozwala na zaprojektowanie związków o pożądanym cechach. Ciecze jonowe uważane są za przyjazne dla środowiska, dlatego rozważa się ich zastosowanie m.in. w ochronie roślin jako herbicydy czy fungicydy.

We współpracy z Politechniką Poznańską prowadziłem badania nad możliwościami wykorzystania cieczy jonowych w ochronie roślin przed patogenicznymi grzybami. Badane były różne ciecze jonowe, syntetyzowane w Zakładzie Technologii Chemicznej przy Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, w tym: protonowe ciecze jonowe tebukonazolu i propikonazolu, czwartorzędowe alkoksynetylowe chlorki tebukonazolu, protonowe sole difenkonazolu z anionem organicznym, sole tritikonazolu, dwufunkcyjne ciecze jonowe z kationem cyprokonazolu i anionem pochodzącym od fenoksykwasu, protonowe ciecze jonowe zawierające cyprokonazol i anion salicylanowy, diwodorocytrynianowy, dichlorooctanowy lub wodoroszczawianowy oraz protonowe ciecze jonowe z kationem 1-(N-propylo-N-(2(2,4,6-trichlorofenoksy)etylo)karbamoylo)imidazoliowym i anionem organicznym. W badaniach laboratoryjnych wykazano zróżnicowane oddziaływanie różnych cieczy jonowych na wzrost wybranych grzybów patogenicznych dla roślin. Aktywność biologiczna badanych związków była związana z rodzajem cieczy jonowej, jak również zależała od rodzaju i gatunku grzyba. Prowadzone doświadczenia dają podstawę do rozwoju badań nad wykorzystaniem cieczy jonowych jako fungicydów. Efektem współpracy są publikacje (zał. 4: II A 1-4), patenty (zał. 4: II B 1-5), zgłoszenia patentowe (zał. 4: B II 6-14), prezentacje na konferencjach (zał. 4: II K 1-3, III B 3-8).

W ramach współpracy z Katedrą Technologii i Analizy Instrumentalnej Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu podjęto z kolei badania nad możliwością wykorzystania surfaktantów sulfobetainowych w ochronie roślin. Surfaktanty to związki powierzchniowo czynne zawierające w swojej budowie dwie części: hydrofilową i hydrofobową. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania tymi substancjami ze względu na ich właściwości użytkowe, dzięki którym znajdują zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. W Katedrze Technologii i Analizy Instrumentalnej syntetyzowane są surfaktanty o różnorodnej strukturze chemicznej, w tym wymienione już związki sulfobetainowe. Kilka surfaktantów z tej grupy przebadano w zakresie ich aktywności wobec różnych grzybów, wykazując, że zakres i stopień aktywności jest związany z budową cząsteczki. Pomimo, iż surfaktanty sulfobetainowe wykazywały niższą aktywność fungistatyczną w porównaniu z fungicydami, ich dodatek do fungicydu jako adiuwanta zwiększał aktywność preparatów. Wyniki doświadczeń prezentowano na konferencji (zał.4: III B 16). Przeprowadzone badania wskazują na nowe możliwości wykorzystania tych związków, stad też badania są kontynuowane.

#### **Występowanie mikotoksyn w uprawach i podczas przechowywania nasion**

Istotnym problemem, jaki występuje w uprawach roślin, jest wytwarzanie szkodliwych metabolitów - mikotoksyn przez grzyby strzępkowe. Związki te mogą przedostawać się do nasion, a wraz z nimi, jako surowiec, do kolejnych etapów produkcji żywności czy pasz. Jest to problem globalny, na który w ostatnich latach coraz bardziej zwraca się uwagę, monitorując występowanie mikotoksyn zarówno w warunkach polowych jak i podczas przechowywania plonów.

Podjęto zatem badania dotyczące występowania mikotoksyn wytwarzanych przez grzyby stanowiące największe zagrożenie w uprawach rzepaku i zbóż, jak również zasiedlające plony w trakcie przechowywania, w tym *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. i *Aspergillus* sp. We współpracy z Katedrą Chemii na Wydziale Technologii Drewna na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu określono stężenie zearalenonu w różnych odmianach pszenicy ozimej, stwierdzając zróżnicowaną ilość tego metabolitu w zależności od odmiany. Określono także wpływ warunków przechowywania nasion rzepaku ozimego na kontaminację nasion ochratoksyną A. Analiza mikologiczna nasion wykazała obecność grzybów, m.in. z rodzajów: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. Na podstawie analizy chromatograficznej stwierdzono bardzo niski poziom ochratoksyny A w próbkach nasion rzepaku badanych bezpośrednio po zbiorze, jak również w próbkach nasion przechowywanych w warunkach symulujących magazynowanie (poniżej granicy oznaczalności). Niski poziom ochratoksyny A stwierdzono także w próbkach przechowywanych w warunkach stymulujących wydzielanie toksyny. Okazało się również, że skażenie toksynami może być zróżnicowane w zależności od odmiany. Efektem badań były publikacje (zał. 4: II D 4, II D 9) i prezentacja na konferencji (zał. 4: III B 28). Część badań była wykonana w ramach grantu MNiSW (zał. 4: I 1).

Ważnym wątkiem badawczym były doświadczenia dotyczące występowania toksyn wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Alternaria* ze względu na ograniczoną wiedzę w zakresie występowania tych metabolitów w uprawach, w szczególności na terenie naszego kraju. W nasionach rzepaku ozimego i jarego, zebranych z poletek doświadczalnych w Winnej Górze w sezonie 2008, przeprowadzono analizę mikologiczną oraz chromatograficzną celem określenia występowania grzybów *Alternaria* spp. i ich metabolitów. Na nasionach stwierdzono występowanie różnych gatunków z tego rodzaju: *A. brassicae*, *A. brassicicola* i *A. alternata*, a przeprowadzona analiza chromatograficzna wykazała obecność mikotoksyn alternaryjnych, przy czym wyższy poziom toksyn obserwowano w nasionach rzepaku jarego. Kontynuacja badań pozwoliła w sezonie 2010 zaobserwować wpływ fungicydów na rozwój grzybów *Alternaria* spp. w uprawach rzepaku ozimego i poziom wybranych toksyn w nasionach. Stwierdzono niskie albo bardzo niskie stężenia alternariolu i eteru metylowego alternariolu w nasionach pochodzących z poletek chronionych fungicydem jak i kontrolnych. Aplikacja fungicydu redukowała zarówno stopień porażenia roślin grzybami jak i zawartość mikotoksyn w większości badanych odmian. Podjęto również próbę oceny wpływu warunków przechowywania na zawartość wybranych mikotoksyn alternaryjnych w nasionach rzepaku. Analiza mikologiczna po zbiorze wykazała obecność grzybów z rodzaju *Alternaria* w nasionach rzepaku zarówno w odmianach jarych, jak i ozimych. Mikotoksyny AOH i AME występowały w niskich ilościach lub były niewykrywalne, jednak podczas przechowywania ilość obu toksyn znacznie wzrastała. W warunkach podwyższonej aktywności wodnej obserwowano duży przyrost AOH, z kolei ilość AME była porównywalna niezależnie od warunków przechowywania. Badania te mają duże znaczenie poznawcze jak i praktyczne. Rezultatem prowadzonych prac były publikacje (zał. 4: II D 10, II D 12, II D 14, II D 17) oraz prezentacje na konferencjach (zał. 4: III B 18, III B 22, III B 23, III B 27).

### **Biologiczna kontrola patogenów roślin**

W ostatnich latach obserwowany jest rozwój badań nad metodami niechemicznymi w ochronie roślin przed patogenami. We współpracy z Katedrą Przyrodniczych Podstaw Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu podjęto badania dotyczące poszukiwania i możliwości wykorzystania różnych mikroorganizmów jako elementu biologicznej kontroli patogenów roślin. Jednym z kierunków było wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej i propionowej. W tym celu izolowano bakterie ze środowiska, m.in. z kiszonek i określono ich właściwości fungistatyczne wobec grzybów będących patogenami rzepaku oraz zbóż. Pod uwagę brano grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Verticillium*, *Phoma* (obecnie *Plenodomus*). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że oddziaływanie zależy od izolatu bakterii i od badanego grzyba. Ponadto, w toku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowanie bakterii fermentacji propionowej i mlekowej może ograniczać rozwój patogennych grzybów w warunkach polowych, a także wpływać

na zwiększenie plonu nasion i większą zieloność roślin. Oceniano również możliwość wykorzystania tych bakterii do ograniczania wybranych chorób zbóż poprzez zaprawianie materiału siewnego. Efektem prowadzonej współpracy są publikacje (zał. 4: II A 5; II D 3, II D 5; II D 11, II D 18, II D 20-22) oraz kilka doniesień konferencyjnych (zał. 4: III B 13; III B 19; III B 26; III B 29-31; III B 33). Prace te są nadal kontynuowane.

Poza ww. grupą bakterii, podjęto również badania nad możliwością wykorzystania innych mikroorganizmów jako potencjalnych czynników biokontroli. W tym celu, we współpracy z KPPJ UEP przeprowadzono ocenę fungistatycznych właściwości bakterii glebowych z rodzajów *Paenibacillus* i *Brevibacillus* oraz bakterii wyizolowanych z kompostu. Bakterie *Paenibacillus* charakteryzowały się wyższą aktywnością fungistatyczną, stąd też wybrano je do dalszych badań, w których podjęto próbę scharakteryzowania metabolitów wytwarzanych przez te mikroorganizmy. Wątek badawczy rozwijano następnie we współpracy z Katedrą Chemii na Wydziale Technologii Drewna na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, określając wpływ bakterii *Paenibacillus* na wytwarzanie mikotoksyn przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

Doświadczenia prowadzone z udziałem bakterii z rodzajów *Paenibacillus* i *Brevibacillus* pochodzących z kolekcji PCM (Polish Collection of Microorganisms) stanowiły inspirację do poszukiwań innych bakterii środowiskowych wykazujących właściwości antygrzybowe. Z przydomowego kompostu wyizolowano kilkadziesiąt izolatów bakterii, które przebadano w kierunku hamowania wzrostu ważniejszych grzybów patogenicznych występujących w uprawach rzepaku i zbóż. W rezultacie wyselekcjonowano bakterie o największej aktywności fungistatycznej, które obecnie są identyfikowane metodą sekwencjonowania. Planowane są dalsze badania z wybranymi izolatami.

Wyniki badań dotyczących fungistatycznych właściwości bakterii *Brevibacillus* i *Paenibacillus* oraz bakterii wyizolowanych z kompostu były przedmiotem publikacji (zał. 4: II D 6; II D 13), a także kilku doniesień konferencyjnych na konferencjach krajowych i zagranicznych (zał. 4: III B 9-10; III B 13; III B 20-21; III B 24-25). Część badań dotyczących biologicznych czynników kontroli roślin prowadzono w ramach projektów statutowych IOR-PIB (zał. 4 II I 2, II I 5-6).

### **Biologiczna degradacja mikotoksyn**

Mikotoksyny będące drugorzędowymi metabolitami grzybów strzępkowych, są wytwarzane przez te mikroorganizmy m.in. już na polu, podczas wzrostu roślin i mogą przedostawać się do łańcucha pokarmowego ludzi i zwierząt, stwarzając zagrożenie dla ich zdrowotnego bezpieczeństwa. Obecnie, podejmowane są liczne badania nad możliwościami detoksyfikacji tych metabolitów obejmujące degradację, transformację lub adsorpcję mikotoksyn. We współpracy z Katedrą Przyrodniczych Podstaw Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego podjęto badania w zakresie detoksykacji mikotoksyn fuzaryjnych z wykorzystaniem bakterii glebowych z rodzaju *Rhodococcus* sp. Doświadczenia wykazały

możliwość degradowania toksyn fuzaryjnych przez te mikroorganizmy, przy czym nie stwierdzono wytwarzania produktów metabolitów charakteryzujących się wyższą toksycznością niż macierzyste związki. Jest to niezmiernie istotne z punktu widzenia możliwości praktycznego wykorzystania takich drobnoustrojów. Efektem przeprowadzonych dotychczas badań są prezentacje na konferencjach międzynarodowych i krajowych (zał. 4; III B 14; III B 32).

Podjęto także badania nad możliwością wykorzystania olejków eterycznych jako czynników zarówno hamujących wzrost grzybów jak i degradujących mikotoksyny. Wstępne badania wykazały znaczący potencjał antygrzybowy i detoksyfikujący różnych olejków, dlatego też badania te są obecnie kontynuowane we współpracy z UEP i UP. Dotychczasowe wyniki prezentowano na konferencji (zał. 4: III B 1-2).

### **Wpływ warunków środowiskowych na kiełkowanie zarodników grzybów**

Wpływ warunków środowiskowych na rozwój grzybów, występujących w uprawach roślin, jest kolejnym ważnym wątkiem badawczym, który ma znaczenie w sygnalizacji pojawu i rozwoju chorób. W ramach współpracy z Zakładem Metod Prognozowania Agrofagów i Ekonomiki Ochrony Roślin IOR – PIB uczestniczyłem w badaniach, mających na celu opracowanie modeli matematycznych opisujących wpływ temperatury na kiełkowanie urediniospor *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, patogena powodującego rdzę brunatną pszenicy, a także teliospor *Tilletia laevis* powodującej śnieć gładką pszenicy oraz *Tilletia caries*, wywołującej śnieć cuchnącą pszenicy. Zastosowanie modelu matematycznego do szacowania wpływu temperatury na kiełkowanie zarodników stanowi odbicie, licznie reprezentowanych w nauce, poglądów na prowadzenie badań nad rolą czynników środowiskowych w rozwoju patogenów. Mój udział polegał na przygotowaniu i prowadzeniu doświadczeń laboratoryjnych oraz opracowaniu uzyskanych wyników. Efektem prowadzonych badań były publikacje (zał. 4: II D 2, 7) oraz doniesienia konferencyjne (zał. 4: III 12, 17).

### **Podsumowanie**

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 126 pozycji (wyłączając ekspertyzy, recenzje i udział w projektach badawczych), w tym publikacje w czasopiśmie z listy JCR, monografię i rozdział w monografii oraz patenty i zgłoszenia patentowe a także doniesienia konferencyjne na konferencjach międzynarodowych i krajowych, oraz publikacje popularno-naukowe. W ciągu ostatnich kilku lat wykonałem 6 recenzji artykułów naukowych oraz byłem autorem 147 ekspertyz i analiz zleconych przez różne podmioty gospodarcze. W 2006 roku otrzymałem honorową odznakę „Zasłużony dla rolnictwa” a w 2011 zostałem odznaczony Brązowym Krzyżem Zasługi za działalność naukową w dziedzinie ochrony roślin. Od 2014 roku pełnię funkcję redaktora działowego (dział Mikologia) w znajdującym się na liście B MRiRW czasopiśmie Progress in Plant Protection.

Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR): 10,127

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): 35; 33 (bez autocytoowań)

Liczba cytowań publikacji według bazy Scholar Google: 113; 108 (bez autocytoowań)

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 4

Indeks Hirscha według bazy Scholar Google: 6

Poniżej, w tabeli, przedstawione zostało zbiorcze zestawienie mojego dorobku naukowego przed i po uzyskaniu stopnia doktora z podziałem na poszczególne formy aktywności.

Tabela 1.

Zestawienie dorobku przed i po doktoracie.

| Rodzaj publikacji/aktywności                                   | PRZED DOKTORATEM |              | PO DOKTORACIE |               |              |
|--|------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
|  | Ilość            | Punkty MNiSW | Ilość         | IF            | Punkty MNiSW |
| Artykuły w czasopismach indeksowanych w bazie JRC              | -                | -            | 5             | 10,127        | 123          |
| Uzyskane patenty   | -                | -            | 5             | -             | 125          |
| Zgłoszenia patentowe   | -                | -            | 9             | -             | 18           |
| Monografie   | -                | -            | 1             | -             | 20           |
| Rozdziały w monografiach i podręcznikach                       | 1                | 4            | 1             | -             | 4            |
| Artykuły w czasopismach nie indeksowanych w bazie JRC          | 9                | 20           | 22            | -             | 127          |
| Opracowania zbiorowe i inne                                    | 1                | -            | 4             | -             | -            |
| Granty/konsorcja/projekty badawcze                             | 1                | -            | 10            | -             | -            |
| Referaty/postery prezentowane na konferencjach                 | 9                | -            | 40            | -             | -            |
| Recenzje   | -                | -            | 6             | -             | -            |
| Ekspertyzy/analizy zamówione przez podmioty gospodarcze        | 76               |              | 147           |               |              |
| Publikacje popularno-naukowe                                   | 11               | -            | 39            | -             | -            |
| <b>RAZEM</b>   | <b>108</b>       | <b>24</b>    | <b>289</b>    | <b>10,127</b> | <b>417</b>   |
| <b>z wyłączeniem monografii prezentowanej jako osiągnięcie</b> | -                | -            | <b>288</b>    | <b>10,127</b> | <b>397</b>   |

Romuald Gwizdowski