

Jolanta Jaroszuk-Ścisień

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii

**Czynniki wpływające na typ oddziaływania roślina-grzybowy endofit
pomiędzy żytem (*Secale cereale*) i grzybami z gatunku
*Fusarium culmorum***

Autoreferat

Lublin 2013

AUTOREFERAT

1. IMIĘ I NAZWISKO

Jolanta Jaroszuk-Ścisiel

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

1983-1988	Studia magisterskie na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (przekształconym w Wydział Biologii i Biotechnologii w 2011 r.), Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie ukończone z wynikiem bardzo dobrym
1988 r.	Magister biologii ze specjalnością mikrobiologia Praca magisterska pt. "Wytwarzanie interferonu w leukocytach izolowanych ze śledziony bydła po indukcji wirusami, szczepionkami weterynaryjnymi i komórkami allogenicznymi" wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (obecnie Zakład Wirusologii i Immunologii) na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Promotor – prof. dr hab. Zbigniew Kawecki
1997 r.	Doktor nauk przyrodniczych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 17 września 1997 roku Rozprawa doktorska pt. "Mikroflora ryzosferowa aktywna w ochronie żyta przed fuzariozą". Promotor – prof. dr hab. Ewa Kurek

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

1988-1989	Asystent stażysta w Pracowni Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
1989-1997	Asystent w Pracowni Mikrobiologii Środowiskowej podniesionej w 1992 roku do rangi Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
od 01.01.1998 r. - obecnie	Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
1.10.2012-30.03.2013	p.o. Kierownika Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ:**Łączny dorobek naukowy** obejmuje:

26 oryginalnych prac naukowych, w tym **12** w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

4 prace przeglądowe, w tym **1** w czasopiśmie z listy JCR;

7 referatów wygłoszonych na konferencjach, w tym **2** na konferencjach międzynarodowych;

43 komunikaty zjazdowe, w tym **13** prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.

Sumaryczny *impact factor* publikacji składających się na dorobek naukowy zgodnie z rokiem ich opublikowania wynosi – **17,224**;

Suma punktów za publikacje składające się na dorobek naukowy zgodnie z wykazem MNiSW – **365** pkt.

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) – **50**;

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) bez autocytowań – **41**;

Indeks Hirscha (*h*) - **5**

Dorobek naukowy po doktoracie obejmuje:

20 oryginalnych prac naukowych, w tym **9** w czasopismach z listy JCR

2 prace przeglądowe, w tym **1** w czasopismach z listy JCR;

7 referatów wygłoszonych na konferencjach, w tym **2** na konferencjach międzynarodowych;

35 komunikatów zjazdowych, w tym **12** prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.

Sumaryczny *impact factor* prac opublikowanych po doktoracie zgodnie z rokiem ich opublikowania wynosi – **17,224**;

Suma punktów za prace opublikowane po doktoracie zgodnie z wykazem MNiSW – **308** pkt.

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) – **50**;

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) bez autocytowań – **41**;

Indeks Hirscha (*h*) – **5**

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ:

Studia rozpoczęłam w 1983 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W roku 1988 ukończyłam studia z wynikiem bardzo dobrym uzyskując tytuł magistra biologii ze specjalnością mikrobiologia. Pracę magisterską pt. "Wytwarzanie interferonu w leukocytach izolowanych ze śledziony bydła po indukcji wirusami, szczepionkami weterynaryjnymi i komórkami allogenicznymi" wykonałam w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Kaweckiego. Opiekę naukową nad pracą magisterską sprawowała prof. dr hab. Martyna Kandefer-Szerszeń, która obecnie kieruje Zakładem Wirusologii i Immunologii powstałym po przekształceniu Zakładu Mikrobiologii Stosowanej na dwa odrębne Zakłady. Pracując w trakcie przygotowywania pracy magisterskiej nad indukcją interferonu (białka wykazującego nieswoiste działanie przeciwwirusowe) zdobyłam wiedzę i umiejętności w zakresie otrzymywania hodowli tkankowych, namnażania wirusów oraz indukowania produkcji interferonu zjadliwymi i atenuowanymi wirusami. W pracy magisterskiej porównałam efektywność poszczególnych induktorów oznaczając miano interferonu oraz jego stabilność.

W październiku 1988 roku zostałam zatrudniona w Pracowni Mikrobiologii Środowiskowej (obecnie Zakład Mikrobiologii Środowiskowej) na stanowisku asystenta stażysty a od października 1989 roku na stanowisku asystenta. Podjęcie pracy w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej kierowanym przez prof. dr hab. Ewę Kurek wiązało się z całkowitą zmianą problematyki badawczej.

Wiodące tematy badawcze Zakładu Mikrobiologii Środowiskowej skupiają się bowiem na zagadnieniach związanych ze zróżnicowaniem mikroorganizmów glebowych i ryzosferowych oraz badaniem ich udziału w krążeniu pierwiastków oraz procesów biochemicznych zachodzących w środowisku glebowym. Mikroorganizmy glebowe i ryzosferowe badane są w aspekcie ich roli w biologicznej ochronie roślin przed patogenami odglebowymi, w bionawożeniu oraz bioremediacji skażonego (np. metalami ciężkimi i produktami ropopochodnymi) oraz zdegradowanego środowiska glebowego. Naczelnym celem tych badań jest poznanie procesów biochemicznych i mechanizmów oddziaływania mikroorganizmów oraz opracowanie komercyjnych preparatów złożonych z wyizolowanych mikroorganizmów efektywnych w biologicznej ochronie i bionawożeniu roślin oraz w bioremediacji gleb.

PRACA DOKTORSKA

Dane literaturowe na temat fitosanitarnych właściwościach żyta skłoniły mnie do podjęcia badań pt. „Mikroflora ryzosferowa aktywna w ochronie żyta przed fuzariozą”, których wyniki zostały przedstawione w rozprawie doktorskiej. Wiele wskazywało, że mikroorganizmy zasiedlające ryzosferę żyta charakteryzują się właściwościami, pozwalającymi na ograniczanie rozwoju wielu patogenów w strefie korzeniowej, w tym patogenów z rodzaju *Fusarium*. W badaniach opisanych w rozprawie doktorskiej przedstawiono dane dotyczące charakterystyki zespołu mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę żyta. Badania te oparto na analizie 316 szczepów bakteryjnych i 159 szczepów grzybowych wyizolowanych z gleby luźno związanej z korzeniami tej rośliny oraz z ekto- i endoryzofery w trzech stadiach rozwojowych (krzewienia, kwitnienia i pełnej dojrzałości) żyta uprawianego w warunkach polowych oraz patogenicznych szczepów *F. culmorum* i *F. graminearum*.

Badania te wykazały, że szczepy z rodzaju *Fusarium* współdominują ze szczepami z rodzajów *Trichoderma* i *Penicillium* w strefie korzeniowej żyta bez objawów fuzariozy rosnącego w warunkach polowych. Stwierdzono, że skład gatunkowy szczepów *Fusarium* wyizolowanych z ryzosfery był zróżnicowany i obejmował gatunki: *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. xylaroides*. Wykazano, że patogeniczne szczepy *F. culmorum* i *F. graminearum* oraz większość izolatów *Fusarium* (83%) to szczepy hamujące wzrost roślin (ang. *Deleterious Rhizosphere Microorganisms—DRMO*) podczas hodowli w sterylizowanej glebie [Kurek i Jaroszuk 1994]. Pozostałe szczepy w takich warunkach hodowli nie wpływały na wzrost roślin lub stymulowały

wzrost roślin (ang. *Plant Growth Promoting Fungi*—PGPF). Te typy oddziaływań pomiędzy rośliną a grzybem przebadano w interakcji żyta z izolatami *F. culmorum*.

Podjęto badania nad identyfikacją mechanizmów wykorzystywanych przez mikroorganizmy ryzosferowe w ograniczaniu rozwoju patogenicznych i niekorzystnie oddziałujących na roślinę szczepów z rodzaju *Fusarium*.

Wykazano, że zdolność do syntezy związków kompleksujących Fe^{3+} oraz specyficznych związków chelatujących: sideroforów hydroksamowych lub sideroforów katecholowych jest cechą szczepową. Szczepy aktywne w syntezie tych związków identyfikowano zarówno w grupie promujących jak i hamujących wzrost roślin. Wykazano, że zdolność do syntezy związków kompleksujących Fe^{3+} była równie powszechna wśród ryzosferowych szczepów bakteryjnych jak i grzybowych. Strefą ryzosfery najbogatszą w szczepy syntetyzujące tego typu związki była ektoryzosfera. Stwierdzono zróżnicowanie poziomu syntezy związków kompleksujących Fe^{3+} w tej strefie ryzosfery w zależności od stadium rozwoju roślin. Siderofory hydroksamowe i inne związki kompleksujące Fe^{3+} były najintensywniej syntetyzowane przez szczepy bakteryjne i grzybowe wyizolowane w stadiach krzewienia i pełnej dojrzałości, zaś siderofory katecholowe przez szczepy bakteryjne w stadiach krzewienia i kwitnienia. Uzyskane wyniki sugerowały, że najistotniejszy wpływ na dostępność Fe^{3+} dla mikroorganizmów i być może dla roślin, mogły mieć bakterie z rodzajów: *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Corynebacterium* i *Nocardia* oraz grzyby z rodzajów: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Aspergillus*. Stwierdzono, że zdolność szczepu ryzosferowego do syntezy związków kompleksujących żelazo nie jest jednoznaczna z jego zdolnością do hamowania wzrostu patogenicznych szczepów *Fusarium* na drodze konkurencji o Fe^{3+} . Około 50% szczepów bakteryjnych syntetyzujących tego typu związki hamowało wzrost patogena przez ten mechanizm, ale tylko ok. 5% wyróżniało się wysoką efektywnością. Około 20% szczepów grzybowych syntetyzujących związki chelatujące żelazo hamowało wzrost patogena na drodze konkurencji o Fe^{3+} i były one 10-krotnie efektywniejszymi inhibitorami niż szczepy bakteryjne. Wszystkie szczepy o wysokiej zdolności ograniczania wzrostu patogena wyizolowano z ektoryzosfery: szczepy bakteryjne w okresie pełnej dojrzałości, zaś grzybowe ze stadium krzewienia.

Mechanizmem hamowania wzrostu patogenów przez drobnoustroje ryzosferowe znacznie efektywniejszym niż konkurencja o Fe^{3+} okazała się synteza związków przeciwgrzybowych. Wśród szczepów zarówno bakteryjnych jak też i grzybowych zidentyfikowano syntetyzujące związki, na które były wrażliwe testowane szczepy patogeniczne, jakkolwiek wrażliwość patogenicznych szczepów *Fusarium* na te związki była różna. Najbogatsza w szczepy syntetyzujące związki przeciwgrzybowe była ektoryzosfera w stadium krzewienia. Bakteryjne szczepy najefektywniejsze w ograniczaniu wzrostu patogenów należały do rodzajów: *Pseudomonas*, *Streptomyces* i *Arthrobacter* zaś grzybowe do gatunków *Penicillium janthinellum* i *Trichoderma koningii*.

Kolejny zidentyfikowany mechanizm hamowania *in vitro* wzrostu patogenicznych i DRMO szczepów *Fusarium* był związany z syntezą enzymów hydrolizujących składniki ścian komórkowych—chitynaz i proteaz. Szczepy syntetyzujące tylko proteazy nie były zdolne do hamowania wzrostu *Fusarium*. Najefektywniejsze w tym procesie były szczepy zdolne do syntezy kompleksu chitynaz i proteaz. Szczepy z aktywnością chitynolityczną stanowiły jednak tylko niewiele ponad 10% wyizolowanych z ryzosfery szczepów bakteryjnych i izolowano je głównie z ektoryzosfery w stadium pełnej dojrzałości.

Ograniczenie wzrostu patogenicznych szczepów *Fusarium* przez szczepy ryzosferowe zachodziło także na drodze konkurencji o węgiel i obejmowało dwa procesy: zahamowanie kiełkowania spor oraz zahamowanie wegetatywnego wzrostu strzępek grzybowych.

Te różnorodne mechanizmy hamowania wzrostu *Fusarium* zidentyfikowano u 50% izolatów bakterii jak i grzybów zasiedlających ryzosferę, przy czym wiele szczepów dysponowało kilkoma mechanizmami. Uzyskane wyniki wykazały też, że mikroorganizmy ryzosferowe wzajemnie współdziałają w hamowaniu wzrostu *Fusarium* w różnych strefach ryzosfery i w całym cyklu rozwojowym żyta.

Szczepy bakteryjne i grzybowe efektywnie hamujące *in vitro* wzrost patogenicznych szczepów *Fusarium* na drodze konkurencji o Fe^{3+} , syntezy związków przeciwgrzybowych i enzymów litycznych

okazały się efektywne w ochronie żyta przed fuzariozą, po wprowadzeniu ich do strefy korzeniowej żyta rosnącego w różnych typach gleb, powodując drastyczny spadek liczebności jednostek tworzących kolonie patogena w strefie korzeniowej. Wskazuje to, że mikroorganizmy zasiedlające strefę korzeniową mogą mieć istotny udział o ochronie rośliny przed fuzariozą w warunkach naturalnych.

Uzyskane rezultaty wskazują, że ryzosfera żyta może być źródłem izolatów wykorzystywanych do produkcji wieloskładnikowych preparatów biologicznych stosowanych w ochronie roślin, natomiast żyto obiecującą rośliną stosowaną w zmianowaniu nie tylko z roślinami jedno- ale też dwuliściennymi.

Pracę doktorską, której promotorem była Prof. dr hab. Ewa Kurek obroniłam 3 lipca 1997 roku, a stopień doktora nauk przyrodniczych w zakresie biologii został mi nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 17 września 1997 roku. Obaj recenzenci mojej pracy doktorskiej: Prof. dr hab. Józef Kobus z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej, Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach oraz Prof. dr hab. Leszek Orlikowski z Zakładu Ochrony Roślin Ozdobnych Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach, doceniając wartość zawartych w niej wyników, wnioskowali o jej nagrodzenie do Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS.

Przeprowadzone badania opisano w 5 publikacjach oryginalnych w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym, których byłam współautorem:

1. Kurek E., **Jaroszuk J.**, Puacz E., Boczula K. **1993**. Biologiczna ochrona żyta przez ryzosferowe szczepy bakteryjne produkujące substancje antygrzybowe przed szkodliwie oddziałującymi grzybami z rodzaju *Fusarium* (DRMO). *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Szczecinie* 161, Rolnictwo LVII: 89-100.
2. Kurek E., **Jaroszuk J.** **1994**. Occurrence of beneficial and deleterious for plant growth *Fusarium* strains in rye (*Secale cereale* L) rhizosphere. *Acta Microbiologica Polonica* 43: 181-187.
3. Kurek E., **Jaroszuk J.** **1994**. Treatment of rye (*Secale cereale* L) seedlings with a growth promoting *Pseudomonas* strains: Plant growth responses and survival of bacteria in the rhizosphere. *Acta Microbiologica Polonica* 43: 189-198.
4. **Jaroszuk J.**, Kurek E. **1995**. Influence of soil environment on survival and plant growth effect (*Secale cereale* L.) of pathogenic and DRMO *Fusarium* strains. „Biological control of soil-borne and post-harvest pathogens”, (L.B. Orlikowski, Cz. Skrzypczak red.), ISK Skierniewice, April 20-21, The Polish Phytopathology Society, pp 65-69.
5. Kurek E., **Jaroszuk J.** **1996**. Influence of soil factors on *Pseudomonas* (PGPR isolates) effect on plant growth. VII Conference of the Polish Phytopathological Society „Effectiveness of some microorganisms and plant extracts in the control of plant diseases” (L.B. Orlikowski, Cz. Skrzypczak red.), ISK Skierniewice, The Polish Phytopathology Society, pp. 85-93, ISBN 83-902901-2-X.
6. Kurek E., **Jaroszuk J.** **1997**. The *in vitro* antagonism between rhizobacterial and *Fusarium* strains. *Acta Microbiologica Polonica* 46(1): 65-73.

oraz 8 krajowych i międzynarodowych doniesieniach konferencyjnych.

W trakcie prowadzenia tych badań powstały także 2 prace przeglądowe:

- 1 Kurek E., **Jaroszuk J.** **1993**. Siderofory i ich rola w środowisku glebowym. *Postępy Mikrobiologii* XXXII: 71-81.
- 2 Kurek E., **Jaroszuk J.** **1993**. Żelazo w glebie jako czynnik biokontrolujący rozwój patogenów korzeniowych. *Postępy Nauk Rolniczych* 40(66): 69-80.

W 1994 roku uzyskałam nagrodę zespołową II stopnia Rektora UMCS.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych zostałam zatrudniona od 1 stycznia 1998 roku na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Środowiskowej UMCS, w którym pracuję do dnia dzisiejszego.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

(wynikające 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 [Dzienniku Ustaw nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami jak w Dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455]),
stanowiące przedmiot postępowania habilitacyjnego

4a. TYTUŁ

Osiągnięciem naukowym jest monotematyczny cykl publikacji naukowych przedstawiony pod tytułem:

„Czynniki wpływające na typ oddziaływania roślin-grzybowy endofit pomiędzy żytem (*Secale cereale*) i grzybami z gatunku *Fusarium culmorum*”

4b. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

(5 oryginalnych prac eksperymentalnych oraz 2 prace przeglądowe)

Oryginalne prace eksperymentalne:

H1. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Boguta M., Kurek E. **2003**. Induction of rye (*Secale cereale* L.) resistance to *Fusarium culmorum*. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological Sciences* 51(3): 175-182.

IF₂₀₀₃ – 0, Pkt MNiSW – **9****, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 80%*.

H2. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Kurek E., Winiarczyk K., Baturo A., Łukanowski A. **2008**. Colonization of root tissues and protection against fusarium wilt of rye (*Secale cereale*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control* 45: 297-307.

IF₂₀₀₈ – **1.805**; Pkt MNiSW – **35**, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 80%*.

H3. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Kurek E., Rodzik B., Winiarczyk K. **2009**. Interactions between rye (*Secale cereale*) root border cells (RBCs) and pathogenic and nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Mycological Research* 113: 1053-1061.

IF₂₀₀₉ – **2.921**; Pkt MNiSW – **35**, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 80%*.

H4. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Kurek E., Słomka A., Janczarek M., Rodzik B. **2011**. Activities of cell wall degrading enzymes in autolyzing cultures of three *Fusarium culmorum* isolates: growth promoting, deleterious and pathogenic to rye (*Secale cereale*). *Mycologia* 103(5): 929-945.

IF₂₀₁₁ – **2.031**; Pkt MNiSW – **30**, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 80%*.

H5. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Kurek E. **2012**. Hydrolysis of fungal and plant cell walls by enzymatic complexes from cultures of *Fusarium* isolates with different aggressiveness to rye (*Secale cereale*). *Archives of Microbiology* 194: 653-665.

IF₂₀₁₂ – **1.431**; Pkt MNiSW – **20**, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 85%*.

Prace przeglądowe:

H6. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Kurek E. 2007. Komórki graniczne – strukturalny i funkcjonalny składnik systemu korzeniowego. *Postępy Biologii Komórki* 34(4): 623-634.

IF₂₀₀₇ – 0, Pkt MNiSW – **15**, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 85%*.

H7. Jaroszuk-Ścisiel J.*, Kurek E. 2008. Komórki graniczne korzenia i ich rola w interakcjach roślina – mikroorganizmy glebowe. *Postępy Nauk Rolniczych* 1: 54-67.

IF₂₀₀₈ – 0, Pkt MNiSW₂₀₀₈ – **6*****, *Oceniam swój wkład w powstanie tej publikacji na 85%*.

***autor korespondencyjny**

**** - ostatnia zarejestrowana punktacja czasopisma**

***** czasopismo nie odnotowane w ostatnim wykazie czasopism MNiSW-punkty nie wliczone**

Sumaryczny *impact factor* - IF ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **8,188**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW **144 pkt**

4c. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WPROWADZENIE – przedmiot badań – stan wiedzy

Szczególnie duże znaczenie poznawcze i ekonomiczne ma opracowanie skutecznych i niezawodnych (w różnych warunkach glebowych i klimatycznych) preparatów biologicznej ochrony roślin przed kosmopolitycznymi patogenami odglebowymi z rodzaju *Fusarium* atakującymi ważne rośliny uprawne i leśne, w tym rośliny zbożowe [Nicholson i in. 1997, Champeil i in. 2004]. *F. culmorum* występuje w ryzosferze i tkankach roślin zbożowych wraz z innymi gatunkami z tego rodzaju: *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. nivale* i *F. poae*, wywołując fuzaryjne więdnienie, zgniliznę korzenia i bielienie kłosów [Bottalico i Perrone 2002, Jansen i in. 2005, Beccari i in. 2011].

Nadzieję na uzyskanie kompleksowej ochrony roślin przed patogenicznymi *Fusarium* spp. można wiązać z bezpośrednim i pośrednim (indukcją odporności roślin) oddziaływaniem nie-patogenicznych szczepów *Fusarium* spp. zasiedlających strefę korzeniową. Skuteczność takiej ochrony wykazano w badaniach nad nie-patogenicznymi szczepami *F. oxysporum* chroniącymi przed patogenicznym *F. oxysporum* [Larkin i Fravel 1999, Benhamou i in. 2002, Fravel i in. 2003, Olivain i in. 2003]. Dotychczas nie zwracano uwagi na ochronne działanie innych nie-patogenicznych szczepów z rodzaju *Fusarium* zasiedlających ryzosferę wielu roślin, w tym ryzosferę żyta [Kurek i in. 1994, Kurek i Jaroszuk 1994a, 1994b].

Efekt interakcji grzyb—roślinny gospodarz wynika z ustalenia stanu równowagi pomiędzy wirulencją grzyba a obronnością rośliny [Knogge 1998, Heath 2000, Bonsall 2002, Partida-Martinez i Heil 2011]. Zakłócenie tej równowagi w wyniku obniżenia zdolności obronnych rośliny lub wzrostu wirulencji grzyba powoduje rozwój choroby [Schulz i in. 1999, Parniske 2000; Schulz i Lefert 2004, Schulz i Boyle 2005].

Grzyb w interakcji z rośliną tworzy dynamiczny układ, w którym można wyróżnić wiele procesów bezpośredniego ograniczania wzrostu patogena i tych pośrednio wpływających na wzrost obu organizmów (indukcja odporności) oraz wzajemną regulację tworzenia metabolitów [Grant i Jones 2009].

Typ oddziaływania pomiędzy rośliną a szczepem grzybowym najprawdopodobniej zależy od poziomu ekspresji jednego lub kilku genów spośród 96 zaliczanych do 6 klas „genów patogeniczności”, które definiowane są jako geny konieczne dla rozwoju choroby, ale nie istotne dla fitopatogena i jego cyklu życiowego *in vitro*, a warunkujące funkcjonowanie patogena *in vivo* w roślinie. Geny odpowiedzialne za bezpośrednie ograniczenie rozwoju patogena kodują: (1). Tworzenie struktur infekcyjnych; (2). Degradację kutykuli i roślinnej ściany roślinnej (syntezę CWDE - *Cell Wall Degrading Enzymes* i kutynaz); (3). Reagowanie fitopatogenów na środowisko gospodarza: (np. enzymy degradujące toksyny gospodarza, trehalaza); (4). Syntezę gospodarzo-specyficznych i gospodarzo-niespecyficznych toksyn; (5). Istotną natomiast rolę w pośrednim oddziaływaniu pomiędzy partnerami pełnią produkty genów odpowiedzialnych za powstanie kaskad sygnałowych (białka G, kinaz MAP- i cAMP-zależnej); (6). Przetłączanie (*switch*) patogena w endofita, biotrofa w nekrotrofa kodowane przez tzw. „nowe geny patogeniczności” [Idnurm i Howlett 2001]. Postulowane jest, że typ oddziaływania pomiędzy rośliną a grzybem zależy od poziomu ekspresji jednego z tych genów lub ich zespołu. Przypuszcza się, że różnice morfologiczne czy fizjologiczne decydujące o pozycji grzybowego partnera rośliny w kontinuum patogen - saprotrof są w wielu wypadkach ilościowe a nie jakościowe [Schulz i Boyle 2005].

Istotnym procesem bezpośredniego oddziaływania pomiędzy rośliną i grzybem jest kolonizacja korzenia. Efektywność zasiedlania ryzosfery przez szczep grzybowy zależy od typu wytwarzanych struktur infekcyjnych, zdolności przełamывania bariery ściany komórkowej roślin (przez enzymy hydrolityczne), sposobu i stopnia rozprzestrzenienia endofita w roślinie.

Korzeń nie jest jednakowo podatny na kolonizację czy infekcję przez mikroorganizmy glebowe. Najbardziej narażone na infekcje są strefy elongacji i różnicowania, natomiast najmniej podatny jest wierzchołek i czapeczka. Odłączone komórki czapeczki korzenia mogą pozostać przy życiu w ryzosferze, w warunkach polowych, przez co najmniej kilka dni. Badania nad tymi komórkami uważanych długo za martwe i określanych mianem „komórek złuszczonej się” (ang. *sloughed*) a obecnie zwanych komórkami granicznymi korzenia (ang. *Root Border Cells*—RBC), sugerują, że ich

uwalnianie w wyniku aktywności mitotycznej merystemu czapeczki korzenia jest dokładnie kontrolowane przez egzogenne i endogenne sygnały. Liczba produkowanych RBC jest cechą gatunkową roślin, waha się od setek do tysięcy komórek. Średnio 90% lub więcej uwolnionych komórek jest aktywna metabolicznie. RBC pełnią liczne funkcje: wytwarzają sygnały kontrolujące mitozę, uwalniają sygnały kontrolujące ekspresję genów w roślinie i mikroorganizmach, wydzielają metabolity stymulujące lub hamujące wzrost mikroorganizmów, uwalniają chemoatraktanty lub repelenty dla mikroorganizmów, chronią wierzchołek korzenia przed infekcją, ułatwiają penetrację gleby przez wierzchołek korzenia, uwalniają śluz i niskocząsteczkowe białka. Te właściwości RBC decydują o ich zaangażowaniu w wielorakie interakcje roślina—mikroorganizm. Struktury mufkopodobne (ang. *mantle-like*) tworzone pomiędzy komórkami RBC i strzępkami patogenicznych grzybów pełnią niezwykle ważną, a mało dotąd docenianą, funkcję w ochronie wierzchołka korzenia [Hawes i in. 2000, 2003, 2012, Zhao i in. 2000]. Prawdopodobnie mogą one odgrywać znaczącą rolę w ustaleniu charakteru interakcji grzyb—roślina.

Zdolność grzybów do wykorzystywania cukrowych składników ryzodepozytów uwarunkowana między innymi ich zdolnością do syntezy enzymów hydrolitycznych takich jak: invertaza czy trehalaza (THA) ma istotne znaczenie dla przeżywania grzybów w ryzosferze roślin. Gen kodujący trehalazę – *pth9*, uważany jest obecnie za jeden z podstawowych „genów patogeniczności”, gdyż może on warunkować wirulencję grzyba poprzez regulację poziomu śródkomórkowej trehalozy („cukru grzybowego”) a jednocześnie ważnego „cukru antystresowego” w strzępkach grzyba [Idnurm i Howlett 2001, Idnurm i in. 2003].

Zdolność grzybów do produkcji CWDE (β -1,3-glukanazy; kompleks egzo- i endoglukanaz oraz β -glukozydaz; ksylanazy i pektynazy) hydrolizujących składniki ścian komórkowych korzeni roślin daje przewagę konkurencyjną, gdyż umożliwia wykorzystanie fragmentów polimerów ścianowych będących ważnym składnikiem ryzodepozytów i jest jednym z najważniejszych warunków pomyślnej kolonizacji korzenia przez grzyby odglebowe, wniknięcie do tkanek gospodarza oraz penetrację do i wzdłuż naczyń [Mendgen i in. 1996, Mendgen i Hahn 2002]. Produkty działania tych enzymów (cukry rozpuszczalne) są jednocześnie źródłem C i energii umożliwiającymi patogenicznemu grzybowi dalszy wzrost i rozwój. Penetracja łodygi i korzeni roślin przez patogeniczny grzyb zależy ponadto od jego zdolności do tworzenia określonych struktur morfologicznych takich jak: haustoria, strzępki infekcyjne, apresoria oraz od tempa apikalnego (wierzchołkowego) wzrostu strzępek grzybowych [Gooday 1995]. Apikalny wzrost strzępek grzyba polegający na interkalarnym dobudowywaniu polimerów własnej ściany komórkowej wymaga wytwarzania przez niego chitynaz i β -1,3-glukanaz degradujących główne polisacharydy ścianowe – chitynę i glukany. Grzybowe chitynazy mogą działać jako endo- i/lub egzo-enzymy [Di Pietro i in. 1993, Harman i in. 1993, Hodge i in. 1995], a wykrywane w roślinach endochitynazy najprawdopodobniej są syntetyzowane przez rośliny zaś egzochitynazy przez patogena [Wurms i in. 1997]. U grzybów strzępkowych sklonowano liczne geny kodujące syntezę poligalaktouronazy, liazy pektynowej i liazy pektynianowej i pojedyncze geny dla ramnogalaktouronazy i metyloesterazy pektynowej [Annis i Goodwin 1997].

Uwolnienie enzymów grzybowych w tkankach roślinnych może być związane z autolizą rozwijającej się w nich grzybni. Alfonso i in. [1992] badając *in vitro* długotrwałe hodowle szczepu *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* 2 wykazał, że pierwsze objawy autolizy wystąpiły już po 7 dniach, a po 60 dniach zautolizowana grzybnia stanowiła 72%.

Podczas wzrostu roślin w niesterylnej glebie (w warunkach polowych) ochrona roślin przed infekcją (inwazją) patogenów zapewniana przez bezpośrednie oddziaływanie mikroorganizmów ryzosferowych jest wzmocniana przez ich pośrednie oddziaływanie polegające na indukowaniu odporności roślin przez produkty (elicytory) powstające podczas ograniczania wzrostu patogena przez mikroorganizmy ryzosferowe wykorzystujące mechanizmy bezpośredniego oddziaływania [Hahn 1996, Ebel i Mithöfer 1998, Montesano i in. 2003].

Elicytory (ang. *elicit* – wyzwać, wywoływać) to czynniki indukujące odporność roślin uwalniane ze ścian komórkowych roślinnego gospodarza (endoelicytory) oraz infekującego mikroorganizmu (egzoelicytory). Poznane dotychczas elicytory można zaliczyć do grupy rasowo-specyficznych warunkujących zajście odporności typu gen-na-gen oraz szczególnie interesującej grupy elicytorów

powszechnych wyzwalających tzw. odporność rasowo-niespecyficzną, które oddziałują ze wszystkimi odmianami porażanego gatunku rośliny-gospodarza i pochodzą z wielu patotypów czynnika chorobotwórczego i/lub ze szczepów nie-patogenicznych [Józefowski 2000, Heath 2000, Klarzyński 2000, Shibuya i Minami 2001, Ascensao i Dubery 2003]. Bezpośrednim następstwem rozpoznania elicytora przez komórkę roślinną są gwałtowne reakcje zachodzące głównie na peryferiach komórki i niewymagające ekspresji genów tj: depolaryzacja błon, przepływ jonów w poprzek błony oraz wybuch tlenowy [Józefowski 2000]. Roślina uruchamia reakcje natychmiastowe zlokalizowane bezpośrednio w ścianie komórkowej i plazmolemie oraz opóźnione (pojawiające się po kilku godzinach lub dniach) typu reakcji nadwrażliwości (ang. *Hypersensitivity Reaction*—HR) lub lokalnej (ang. *local acquired resistance*—LAR) albo systemicznej odporności (ang. *Systemic Acquired Resistance*—SAR). W indukowaniu odporności elicytorem zasadniczą rolę spełniają komórkowe sygnały chemiczne, tj. kwas salicylowy (SA), kwas jasmonowy (JA), tlenek azotu (NO), reaktywne formy tlenu (ROS) oraz etylen. Nabyta odporność systemiczna - SAR indukowana jest w roślinie głównie infekcją patogena i charakteryzuje się powstawaniem nekroz a indukowana odporność systemiczna (ang. *Induced Systemic Resistance*—ISR) wywołwana jest głównie przez ryzobakterie [Józefowski 2000, Kuć 2000, Kozłowska i Konieczny 2003] i w odróżnieniu od SAR, może być wzbudzana bez udziału SA jako substancji sygnałowej a jej głównymi mediatorami jest etylen i JA [Glazebrook 2005, Gimenez-Ibanez i Solano 2013]. Oprócz tych dwóch (SAR i ISR) typów odporności wyróżnia się też odporność, w której substancją sygnałową jest kwas β -masłowy (BABA) (ang. *BABA Induced Resistance*—IR) [van Hulten i in. 2006]. Szlaki tych trzech typów odporności są ze sobą wzajemnie powiązane. Markerami indukcji odporności roślin są produkty powstające w łańcuchu sygnałowym [Józefowski 2000, Kozłowska i Konieczny 2003] takie jak: liaza fenyloalaninowa (PAL - pierwszy enzym szlaku fenylopropanoidowego), etylen, SA, JA (substancje sygnałowe) oraz białka odpornościowe tzw. białka związane z patogenezą (ang. *Pathogenesis Related*—PR) [Caruso i in. 1999, Selintrennikoff 2001]. Wyróżnia się 17 klas białek PR głównie o aktywności antygrzybowej powodujących hydrolizę składników ścian komórkowych tj: chitynazy i β -1,3-glukanazy czy oddziałujących na błony komórkowe poprzez zmianę ich przepuszczalności: peroksydazy, RIPs – białka inaktywujące rybosomy [Mauch i in. 1988, van Loon i in. 2006]. W HR dochodzi do wytworzenia barier strukturalnych w wyniku nagromadzenia związków fenolowych spolimeryzowanych ze ścianą komórkową oraz polimerów β -glukanowych. Bariery te prowadzą do fizycznego unieruchomienia patogena [Nicholson i Hammerschmidt 1992, Kang i Buchenauer 2000, Benhamou i Garand 2001]. W szlakach odporności tworzone są też fitoaleksyny - niskocząsteczkowe antymikrobiologiczne związki o różnorodnej budowie (flawonoidów, terpenoidów, stilbenów) i o małej specyficzności oddziaływania [Kozłowska i Konieczny 2003, Balmer i in. 2013].

Szczególnie obiecujące dla efektywności stosowania metody indukcji odporności przed patogenami jest zjawisko „primingu”, polegające na gotowości roślin preinkulowanych elicytorem do natychmiastowego uruchomienia jednego lub kilku szlaków obronnych (SAR, ISR czy IR) przy zetknięciu z patogenem [Conrath i in. 2002, Vallad i Goodman 2003, Beckers i Conrath 2007, Walters 2009, 2010].

CWDE roślinne i grzybowe uwalniają elicytory egzogenne ze ścian komórkowych grzybowego patogena (np. chitynazy, β -1,3-glukanazy) i/lub elicytory endogenne ze ścian roślinnych (np. pektynazy, ksylanazy, celulazy) oraz uczestniczą w indukowaniu odporności bezpośrednio jako białka PR [Vorwerk i in. 2004].

Nie wszystkie polimery uwalniane ze ściany komórkowej wykazują aktywność elicytorową, gdyż właściwość ta uzależniona jest przede wszystkim od stopnia polimeryzacji i typu wiązań pomiędzy monomerami oraz stopnia i sposobu rozgałęzienia jak również rozpuszczalności w wodzie, wielkości i ciężaru cząsteczkowego. Doniesienia literaturowe wskazują, że właściwości egzoelicytorowe posiadają przede wszystkim oligomery o niskim stopniu polimeryzacji (ok. 7) [Montesano i in. 2003] a dotąd poznane elicytory o charakterze oligosacharydów glukozyowych charakteryzowała obecność β -konfiguracji [Ebel i Mithöfer 1998, Klarzyński i in. 2000].

Brak w literaturze danych na temat budowy ściany komórkowej *Fusarium culmorum*. Wcześniejsze dane literaturowe wskazywały, że ściany komórkowe grzybów z rodzaju *Fusarium* spp. są stosunkowo odporne na degradację enzymami hydrolitycznymi. Badania nad *Fusarium oxysporum* wykazały, że jest to spowodowane ich specyficzną budową: wysoką (7-28%) zawartością białek [Barran i in. 1975,

Lamborda i in. 1974, Schneider i in. 1977] i polisacharydów ścianowych a także wysokim stosunkiem w ścianie zawartości chityny do glukanów [Sivan i Chet 1989, Alfonso i in. 1995]. Te właściwości ścian komórkowych odpowiadają za trudności w uzyskaniu satysfakcjonujących metod biologicznej ochrony roślin przed patogenami z rodzaju *Fusarium*.

Grzyby z rodzaju *Fusarium* syntetyzują toksyny o ogólnej nazwie trichotecenów szkodliwych nie tylko dla rośliny-gospodarza ale także dla zwierząt i człowieka [Bottalico i Perlone 2002, Champeil i in. 2004]. Trichoteceny z grupy B są syntetyzowane głównie przez gatunki *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*, dominują w tkankach roślin zbożowych i są odpowiedzialne za agresywność (czyli nasilenie choroby) ale nie warunkują patogeniczności (czyli zdolności do wywoływania choroby) [Proctor i in. 1995].

CELEM BADAŃ składających się na osiągnięcie naukowe były próby uzyskania odpowiedzi na pytanie czy różne oddziaływanie na wzrost żyta patogenicznego i wyizolowanych z ryzosfery tej samej rośliny bez objawów fuzariozy nie-patogenicznych szczepów *F. culmorum*: promującego wzrost - PGPF (ang. *Plant Growth Promoting Fungi*) i hamującego wzrost - DRMO (ang. *Deleterious Rhizosphere Microorganisms*) jest spowodowane różnicami genetycznymi, efektywnością kolonizacji korzenia i zasięgiem ich rozprzestrzenienia w tkankach korzenia, różnicami w składzie jakościowym i ilościowym kompleksów litycznych syntetyzowanych przez te szczepy wpływających na rozwój patogena bezpośrednio oraz pośrednio poprzez uwalnianie elicytorów odporności rośliny oraz umożliwiających penetrację roślinnej ściany komórkowej.

OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ I UZYSKANYCH REZULTATÓW

W badaniach wykorzystano trzy szczepy *F. culmorum*: dwa niepatogeniczne o różnym typie oddziaływania na wzrost żyta wyizolowane z ryzosfery rośliny bez objawów fuzariozy [Kurek i in. 1994]: szczep DEMFc2 (CBS N° 120098, NCBI N° DQ 453700) oraz szczep DEMFc5 (CBS N° 120101, NCBI N° DQ450880), jak również patogeniczny szczep *F. culmorum* DEMFc37 (CBS N° 120103, NCBI N° DQ450878) wyizolowany z pszenicy z objawami fuzariozy i wywołujący także fuzariozę żyta [Jaroszuk-Ścisiel i in. 2008, *Biol. Control*, H2].

Szczepy te sklasyfikowano na podstawie badań morfologicznych oraz genetycznych i zdeponowano w banku kultur grzybowych CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures Collections, The Netherlands).

W warunkach hodowli sterylnej szczep DEMFc2 wprowadzony do strefy korzeniowej powoduje 30% przyrost świeżej masy łodygi żyta - jest więc reprezentantem PGPF (ang. *plant growth promoting fungi*), DEMFc5 powodujący 65% jej redukcję reprezentuje DRMO (ang. *deleterious rhizosphere microorganisms*). Patogeniczny szczep *F. culmorum* DEMFc37 w tych warunkach hodowli powoduje 80% redukcję świeżej masy tej rośliny oraz wyraźne objawy fuzaryjnego więdnienia (wartość indeksu chorobowego 86%, przynależność do 4 klasy w pięciostopniowej skali) [Jaroszuk-Ścisiel i in. 2008,

Biol. Control, H2]. Efekt promującego i hamującego oddziaływania wprowadzonych do ryzosfery szczepów *F. culmorum* zwiększał się wraz z wiekiem rośliny.

Analiza filogenetyczna przeprowadzona w oparciu o sekwencję obejmującą 2 regiony międzygenowe oraz gen 5.8S rRNA (ITS1, 5.8S rRNA i ITS2) wykazała, że wykorzystane w badaniach szczepy *F. culmorum* są spokrewnione genetycznie i zgrupowane w tym samym klastrze drzewa filogenetycznego, jednak szczep patogeniczny zajmuje miejsce na odrębnej, bardziej oddalonej gałęzi tego klastra niż szczepy ryzosferowe [**Jaroszuk-Ścisień i in. 2011, Mycologia, H4**].

Genomy trzech badanych szczepów *F. culmorum* zawierają sekwencje genów warunkujących zdolność do tworzenia mykotoksyn z grupy trichotecenów [**Jaroszuk-Ścisień i in. 2008, Biol. Control, H2**]. Wykazano, że posiadają one *gen Tri5* kodujący syntazę trichodieniu (enzym katalizujący izomeryzację i cyklizację pirofosforanu farnezyli do trichodieniu, czyli pierwszy etap szlaku biosyntezy trichotecenów), ale nie mają genu *Tri7*, co wskazuje na to, że reprezentują chemotyp DON tzn. są zdolne do produkcji deoksyniwalenolu [**Jaroszuk-Ścisień i in. 2008, Biol. Control, H2**]. Obecność toksyny DON stwierdzono jednak tylko w tkankach korzeni i łodyg oraz ziarnie żyta skolonizowanych przez szczep patogeniczny a nie w próbach skolonizowanych przez niepatogeniczne szczepy ryzosferowe.

Na podstawie chemicznego frakcjonowania ścian komórkowych szczepów *Fusarium culmorum* stwierdzono podobieństwo budowy ścian poszczególnych szczepów [**Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, Arch. Microbiol., H5**]. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zawartości frakcji: β -(1,3)-gluko-chitynowej (GCH), frakcji α,β -(1,3)-glukanowej luźno związanej z chityną (F1I), frakcji α,β -(1,3)-glukanowej silnie związanej z chityną (F3) oraz frakcji β -(1,5)-galakto-manno-glukanowej (F1S) w ścianach komórkowych pomiędzy poszczególnymi szczepami [**Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, Arch. Microbiol., H5**]. Ściany komórkowe tych szczepów charakteryzuje następująca zawartość frakcji: ok. 40% β -(1,3)-gluko-chitynowej (GCH), ok. 12% β -(1,5)-galakto-manno-glukanowej (F1S), ok. 43% frakcji glukanowych - ok. 28% α,β -(1,3)-glukanowej luźno związanej z chityną (F1I) i ok. 15% α,β -(1,3)-glukanowej silnie związanej z chityną (F3).

Szczepy *F. culmorum* - zarówno patogeniczny jak i ryzosferowe zasiedlały tkanki roślinne [**Jaroszuk-Ścisień i in. 2008, Biol. Control, H2**], jednak obserwowano różnice w intensywności kolonizacji korzenia przez te szczepy i w zasięgu ich rozprzestrzenienia w tkankach. Liczba jednostek tworzących kolonie (JTK) patogena w 1 g świeżej masy korzenia była o 1 jednostkę logarytmiczną wyższa niż liczba JTK szczepu PGPR. Patogeniczny szczep *F. culmorum* DEMFc37, w odróżnieniu od ryzosferowych niepatogenicznych szczepów PGPF i DRMO, kolonizował system naczyniowy korzenia żyta, epidermę, warstwę korową i przestrzenie międzykomórkowe (ang. *intercellular spacer* – IS) natomiast szczepy niepatogeniczne tylko epidermę, warstwę korową i IS w strefie elongacji i korzeni bocznych [**Jaroszuk-Ścisień i in. 2008, Biol. Control, H2**]. Zaobserwowano tworzenie

charakterystycznych dla reakcji indukcji odporności barier ścianowych - apozytów ścianowych (ang. *Wall Appositions-WA*) w komórkach korzeni skolonizowanych przez niepatogeniczne szczepy *F. culmorum* [Jaroszuk-Ścisła i in. 2008, *Biol. Control*, H2].

Przeprowadzone badania [Jaroszuk-Ścisła i in. 2008, *Biol. Control*, H2] wykazały po raz pierwszy, że ryzosferowe (niepatogeniczne) szczepy *F. culmorum* mogą chronić żyto przed fuzariozą, podobnie jak opisane wcześniej niepatogeniczne szczepy *F. oxysporum* chroniące przed patogenicznymi szczepami z tego gatunku [Larkin i Ravel 1999, Benhamou i in. 2002; Fravel i in. 2003; Olivain i in. 2003]. Preinokulacja siewek żyta makrokonidiami zarówno szczepu PGPR jak i DRMO 24-godziny przed wprowadzeniem makrokonidii patogena chroniła żyto przed fuzariozą, chociaż w badaniach *in vitro* wykazano, że wzrost szczepu patogenicznego nie był hamowany przez szczepy ryzosferowe *F. culmorum* z wykorzystaniem mechanizmów antybiozy czy konkurencji o Fe³⁺ [Jaroszuk-Ścisła i in. 2008, *Biol. Control*, H2].

Stwierdzono, że tylko patogeniczny szczep *F. culmorum* tworzy z komórkami granicznymi korzenia (ang. *Root Border Cells-RBC*) w strefie wierzchołkowej korzenia żyta unikatową strukturę mufko-podobną (ang. *mantle-like*) [Jaroszuk-Ścisła i 2009, *Mycol. Res.*, H3]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że w obecności RBC żyta tempo kiełkowania makrokonidii patogena było większe niż tempo kiełkowania w tych warunkach szczepów niepatogenicznych [Jaroszuk-Ścisła i in. 2009, *Mycol. Res.*, H3]. *In vitro* strzępki patogena wykazywały silniejszą chemotaksję do komórek granicznych niż strzępki szczepów niepatogenicznych [Jaroszuk-Ścisła i in. 2009, *Mycol. Res.*, H3]. Obszerny przegląd badań wskazujący na rolę RBC jako ważnego składnika strukturalnego i funkcjonalnego przedstawiono w publikacji przeglądowej z 2007 roku [Jaroszuk-Ścisła i Kurek 2007, *Post. Biol. Kom.*, H6]. W przeglądowej publikacji z 2008 roku [Jaroszuk-Ścisła i Kurek 2008, *Post. Nauk Roln.*, H7] o roli RBC w interakcjach z mikroorganizmami zamieściłam też wyniki swoich badań nad interakcją RBC żyta z patogenicznym szczepem *F. graminearum* DEMFc36 wskazujące, że patogen z tego gatunku tworzy struktury *mantle-like* podobnie jak patogen z gatunku *F. culmorum* DEMFc37. Wyniki badań wskazujące na specyficzność tworzenia struktury *mantle-like* z patogenem zyskały, wyrażone osobiście, uznanie Profesora Marty Hawes z Arizona University – pioniera i najwybitniejszego badacza tych unikatowych struktur. Znalazło to odzwierciedlenie potwierdzone w cytowaniu moich badań w przełomowej pracy Hawes i in. 2012 *Plant Soil*, w której rola RBC w obronności roślin została porównana do roli białych krwinek w systemie obronnym zwierząt. Badania nad interakcjami RBC ze szczepami *Fusarium* spotkały się z wielkim zainteresowaniem w gronie naukowców reprezentujących Sekcję Ochrony Roślin Towarzystwa Fitopatologicznego. Wyniki tych badań prezentowałam podczas wykładów wygłoszonych w Zarządzie Głównym tego Towarzystwa w Warszawie jak i w Oddziale Lubelskim PTFit.

Fracja gluko-chitynowa ze ściany komórkowej patogenicznego szczepu *F. culmorum* zastosowana w postaci zawiesiny, w której kiełkowało ziarno żyta, chroniła tę roślinę przed fuzariozą w aseptycznej hodowli wazonowej, gdy makrokonidia szczepu patogenicznego wprowadzono na korzenie 3-dniowych siewek [Jaroszuk-Ścisień i in. 2003, *Bull. Pol. Acad. Sci.*, H1]. Pomiary aktywności markerów odporności takich jak: liaza fenyloalaninowa (PAL) oraz białka patogenezozależne (PR): peroksydaza; chitynaza i glukanaza (izoformy kwaśne i zasadowe) w tkankach korzeni i łodyg żyta wskazywały, że frakcja ściany komórkowej była efektywna w indukowaniu odporności żyta. Frakcja ta okazała się tak samo efektywna w hamowaniu wzrostu patogena i indukowaniu markerów odporności jak komercyjnie wykorzystywany preparat – chitozan.

W długotrwałych 42-dniowych hodowlach (autolizujących) szczepów *F. culmorum* wykorzystujących różne źródła węgla: roślinną ścianę komórkową (ang. *Plant Cell Wall-PCW*) otrzymaną z korzeni żyta, grzybową ścianę komórkową (ang. *Fungal Cell Wall-FCW*) otrzymaną z 5-dniowych hodowli *F. culmorum*, glukozę, chitynę stwierdzono różnice pomiędzy szczepami w wartościach pH, liczbie jednostek tworzących kolonie (JTK ml⁻¹) i suchej masie grzybni [Jaroszuk-Ścisień i in. 2011, *Mycologia*, H4]. Największe różnice zanotowano pomiędzy szczepem patogenicznym i szczepami ryzosferowymi w hodowlach z tym samym źródłem C. W hodowlach szczepu patogenicznego z PCW jako źródłem węgla wartości pH były wyższe o ponad 2 jednostki niż w hodowlach szczepów ryzosferowych z tym źródłem C. Natomiast w hodowlach z FCW jako źródłem C wartości liczby JTK ml⁻¹ patogena były wyższe o 1 jednostkę logarytmiczną od wartości liczby JTK ml⁻¹ szczepów niepatogenicznych.

Zmiany wartości parametrów wzrostu w trakcie inkubacji wskazywały, że autoliza grzybni we wszystkich hodowlach rozpoczynała się już w trzecim dniu, lecz jej stopień był różny. Najwyższy stopień autolizy po 42 dniach inkubacji stwierdzono w hodowli patogena (20%) zaś w hodowlach obu szczepów ryzosferowych wynosił 15%.

Testowane szczepy *F. culmorum* były zdolne do syntezy kompleksów enzymów degradujących ściany komórkowe (ang. *Cell Wall Degrading Enzymes—CWDE*), złożonych z glukanaz, chitynaz, ksylanaz, endocellulaz, egzocellulaz, pektynaz i poligalaktouronaz, ale aktywność poszczególnych enzymów w tych kompleksach była różna [Jaroszuk-Ścisień i in. 2011, *Mycologia*, H4; Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, *Arch. Microbiol.*, H5]. Polimery ścianowe oraz chityna i glukoza obecne w hodowlach jako źródło węgla wpływały odmiennie na syntezę poszczególnych enzymów. Aktywność ksylanaz i endocellulaz syntetyzowanych w hodowli szczepu PGPR z roślinną CW była znacznie niższa niż aktywność tych enzymów syntetyzowanych w takich hodowlach przez DRMO i patogena. Tylko aktywność pektynazy była hamowana przez glukozę. Aktywność izoform kwaśnych była wyższa niż aktywność hydrolaz alkalicznych. Analiza statystyczna głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis—PCA*) wykazała, że enzymy CWDE obecne w supernatantach autolizujących

hodowli szczepów *F. culmorum* tworzą dwie odrębne grupy. Jedna grupa zawiera pektynazę, egzocelulazę i poligalaktouronazę zaś druga pozostałe enzymy hydrolityczne. Sugeruje to, że te dwie grupy enzymów działają synergistycznie w degradacji ścian komórkowych.

Porównano efektywność hydrolizy (uwalniania cukrów redukujących) CW korzeni żyta oraz FCW (uwalniania cukrów redukujących i N-acetyloglukozaminy - GlcNAc) przez surowe preparaty enzymatyczne otrzymane z 42-dniowych autolizujących hodowli szczepów *F. culmorum* jak również z hodowli patogenicznych grzybów z innych gatunków *Fusarium*: *F. graminearum* DEMFc36 (CBS 120102, DQ453701) *F. oxysporum* DEMFc38 (CBS 120104, DQ450879) [Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, *Arch. Microbiol.*, H5]. Hydrolizę ścian grzybowych stwierdzono zarówno w układzie homologicznym tzn., gdy FCW i preparat enzymatyczny pochodziły z tego samego gatunku jak i w układzie heterologicznym, w którym FCW i preparat enzymatyczny pochodziły z różnych gatunków. Wykazano różnice w stopniu hydrolizy PCW i FCW przez surowe preparaty enzymatyczne pochodzące z hodowli poszczególnych szczepów [Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, *Arch. Microbiol.*, H5]. Preparat enzymatyczny otrzymany z hodowli szczepu PGPF był najmniej efektywny w hydrolizie roślinnej CW, natomiast preparaty otrzymane z hodowli szczepów hamujących wzrost roślin nie różniły się istotnie efektywnością degradacji CW korzenia żyta.

Najbardziej wydajny w uwalnianiu cukrów redukujących i N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) z grzybowej ściany komórkowej był preparat otrzymany z hodowli szczepu PGPR, co było związane z wysoką aktywnością w tym preparacie glukanazy i chitynazy [Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, *Arch. Microbiol.*, H5]

Porównanie stopnia degradacji PCW i FCW przez preparaty enzymatyczne otrzymane zarówno ze szczepów *F. culmorum* jak i szczepów należących do innych gatunków tego rodzaju - *F. oxysporum* i *F. graminearum* pozwoliło stwierdzić wysoką pozytywną korelację ($R > 0.9$) pomiędzy aktywnością ksylanazy w preparacie enzymatycznym a stopniem hydrolizy CW korzenia żyta oraz aktywnością chitynazy i efektywnością degradacji FCW zarówno w układzie homologicznym jak i heterologicznym [Jaroszuk-Ścisień i Kurek 2012, *Arch. Microbiol.*, H5].

Uzyskane wyniki badań wskazują, że o typie oddziaływania szczepów *F. culmorum* na roślinę może decydować aktywność enzymów degradujących ściany komórkowe (CWDE) syntetyzowanych przez te szczepy. Aktywność CWDE może wpływać na roślinę bezpośrednio poprzez ułatwienie kolonizacji ryzosfery i korzenia oraz pośrednio poprzez uwalnianie endoelicytorów odporności ze ściany roślinnej oraz egzoeelicytorów ze ścian grzybowych.

Najprawdopodobniej nie ma istotnych różnic w genomie szczepów różnie oddziałujących na wzrost roślin, a różnice w typie oddziaływania wynikają z poziomu ekspresji genów zaangażowanych w syntezę metabolitów mających istotną rolę dla kolonizacji oraz indukcji odporności. Badania te

w dużym stopniu potwierdzają hipotezę, że różnice w cechach fizjologicznych pomiędzy szczepami decydujące o miejscu grzybowego partnera rośliny w endofitycznym kontinuum saprotrof—patogen są ilościowe a nie jakościowe [Schulz i in. 1999, Schulz i Lefert 2004, Schulz i Boyle 2005].

Podsumowanie najważniejszych wyników, które stanowią osiągnięcie naukowe zawarte w monotematycznym cyklu publikacji pt. „Czynniki istotnie wpływające na typ oddziaływania roślina-grzybowy endofit pomiędzy *Secale cereale* i grzybami z gatunku *Fusarium culmorum*”

Wykazano, że różnie oddziałujące na wzrost żyta szczepy *F. culmorum*:

- (1) są spokrewnione genetycznie, co zostało ustalone na podstawie sekwencji 2 regionów międzygenowych ITS oraz genu 5.8S rRNA (ITS1, 5.8S rRNA i ITS2) ITS;
- (2) mają zbliżoną zawartość frakcji w ścianie komórkowej,
- (3) posiadają determinanty genetyczne warunkujące syntezę toksyny z grupy trichotecenów B – deoksyniwalenol (DON);
- (4) różnią się intensywnością kolonizacji korzenia i „modelem” (zasięgiem rozprzestrzenienia w korzeniu) tej kolonizacji;
- (5) charakteryzują się różną intensywnością oddziaływania z komórkami granicznymi korzenia (RBC) *in vitro*;
- (6) w ich oddziaływaniu *in vivo* z komórkami granicznymi korzenia zaznacza się specyficzność tworzenia struktur mufko-podobnych z RBC jedynie przez grzyb patogeniczny;
- (6) różnią się efektywnością wykorzystywania *in vitro* różnych źródeł węgla, co objawia się różną intensywnością wzrostu oraz różnym stopniem autolizy grzybni w długotrwałych hodowlach;
- (7) w autolizujących hodowlach *in vitro* syntetyzują kompleksy lityczne różniące się aktywnością poszczególnych enzymów degradujących ściany komórkowe (CWDE);
- (8) w kompleksach CWDE syntetyzowanych przez szczepy *F. culmorum* wyodrębniają się dwie grupy enzymów najprawdopodobniej współdziałających synergistycznie w degradacji roślinnych (PCW) i grzybowych (FCW) ścian komórkowych;
- (9) syntetyzowane przez te szczepy kompleksy lityczne odznaczają się różną efektywnością degradacji ścian komórkowych roślinnych i grzybowych (homologicznych i heterologicznych);
- (10) istnieje dodatnia korelacja pomiędzy efektywnością rozkładu ścian komórkowych a aktywnością jednego ze składników kompleksu litycznego - degradacja PCW jest skorelowana z aktywnością ksylanazy a degradacja FCW z aktywnością chitynazy;
- (11) inokulacja roślin niepatogenicznymi szczepami *F. culmorum* chroni przed fuzariozą wywołaną szczepem patogenicznym;

(12) w tkankach żyta skolonizowanych przez szczepy *F. culmorum* czy zaindukowanych frakcją ścianową *F. culmorum* stwierdzono pojawianie się markerów odporności: apozytów ścianowych, aktywności liazy fenyloalaninowej i białek patogenezozależnych.

Wyniki opisanych powyżej badań zostały opublikowane w 5 oryginalnych pracach naukowych.

We wszystkich tych pracach byłem autorem koncepcji badań i głównym wykonawcą doświadczeń. Byłem odpowiedzialna za opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptów oraz pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

Część wyników uzyskanych w badaniach dotyczących komórek granicznych korzeni dyskutowano z wynikami opublikowanymi przez badaczy z wiodących ośrodków w 2 artykułach przeglądowych, w których byłem głównym i korespondencyjnym autorem.

Mój udział w powstaniu oryginalnych i przeglądowych publikacji oceniam na 80-85%.

Wyniki opisane w powyższych publikacjach składających się na monotematyczny cykl badań "Czynniki wpływające na typ oddziaływania roślina-grzybowy endofit pomiędzy żytem (*Secale cereale*) i grzybami z gatunku *Fusarium culmorum*" zostały uzyskane w ramach kierowanych przeze mnie projektów badawczych:

1. Projekt badawczy własny Komitet Badań Naukowych (KBN)
Nr 3PO6R 01025 (20.11.2003 – 19.11.2006)
pt. „Rola ryzosferowych szczepów *Fusarium culmorum* w indukowaniu odporności żyta (*Secale cereale* L.) na fuzariozy”
2. Projekt badawczy własny Narodowe Centrum Nauki (NCN)
Nr N N310 441338 (25.06.2010-24.06.2013)
pt. „Różnice w metabolizmie pierwotnym i wtórnym szczepów *Fusarium culmorum* różnie oddziałujących (promujący, hamujący, patogeniczny) na wzrost roślin zbożowych”
3. Grant Zespołowy Prorektora Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (UMCS) ds. Nauki (2007)
pt. „Zróżnicowanie fizjologiczne szczepów *Fusarium culmorum* różnie oddziałujących na wzrost żyta (*Secale cereale* L.) (promujących /PGPF/, hamujących /DRMO/ i wywołujących fuzaryjne wędnięcie)”

Publikacja tych wyników wymagała także zdeponowania szczepów *Fusarium* spp. – *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* w międzynarodowej kolekcji mikroorganizmów *Centraalbureau voor Schimmelcultures Collections* (CBS) P.O.Box 85167; NL-3508 AD Utrecht; The Netherlands oraz zgłoszenia voucherów dla sekwencji ITS1 i ITS2 tych szczepów *Fusarium* spp. do bazy danych (NCBI *National Center for Biotechnology*).

Cytowana literatura

- Alfonso C, del Amo F, Nuero OM, Reyes F. 1992. Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 for its biocontrol by nonpathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 99: 169–174.
- Alfonso C., Santamaria F., Nuero O.M., Prleto A., Leal J.A., Reyes F. 1995. Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 by its own lytic enzymes for its biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* 20: 105-109.
- Annis S.L., Goodwin P.H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell-wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 103: 1-14.
- Ascensao A. R., Dubery I. A. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63: 679-686.
- Balmer D., Flors V., Glauser G., Mauch-Mani B. 2013. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques. *Frontiers in Plant Science* 4(82): 1-12, doi: 10.3389/fpls.2013.00082.
- Barran L.R., Schneider E.F., Wood P.J. Madhosingh C., Miller W.R. 1975. Cell wall of *Fusarium sulphureum*. I. Chemical composition of hyphal wall. *Biochimica et Biophysica Acta* 392: 146-156.
- Beccari G., Covarelli L., Nicholson P. 2011. Infection process and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology* 60: 671-684.
- Beckers G.J.M., Conrath U. 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 425-431.
- Benhamou N., Garand C. 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by the non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, strain Fo47. *Phytopathology* 91: 730-740.
- Benhamou N., Garand C., Goulet A. 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 4044-4060.
- Bonsall M. 2002. Evolutionary and ecological aspects of disease and parasitism. *Trends in Ecology Evolution* 17: 401-403.
- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small cereals in Europe. *European journal of Plant Pathology* 108: 611-624.
- Caruso C., Chilosi G., Caporale C., Leonardi L., Bertini L., Magro P., Buonocore V. 1999. Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *F. culmorum*. *Plant Science* 140: 87-97.
- Champeil A., Dore T., Fourbet J.F. 2004. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. Review. *Plant Science* 166: 1389-1415.
- Conrath U., Pieterse C.M.J., Mauch-Mani B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7(5):210-216
- Di Pietro A., Lorito M., Hayes C.K., Broadway R.M., Harman G.E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization, and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83: 308-313.
- Ebel J., Mithöfer A. 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206: 335–348.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. 2003. Research review *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157(3): 493-502.
- Gimenez-Ibanez S., Solano R. 2013. Nuclear jasmonate and salicylate signalling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in Plant Science* 4(72): 1-11, doi: 10.3389/fpls.2013.00072
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43(1): 205-227.
- Gooday G.W. 1995. The dynamics of hyphal growth. *Mycological Research* 99(4): 385-394.
- Hahn MG, 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. Annual Review of Phytopathology 34: 387–412.
- Grant M.R., Jones J.D. G. 2009. Perspective hormone (Dis) harmony moulds plant health and disease. *Science* 324: 750 – 752.
- Harman G.E., Hayes C.K., Lorito M., Broadway R.M., Di Pietro A., Peterbauer C., Tronsmo A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.
- Hawes M. C., Gunawardena U., Miyasaka S., Zhao X., 2000. The role of root border cells in plant defense. *Trends Plant Science*. 5: 128-133.
- Hawes M.C., Bengough G., Cassab G., Ponce G. 2003. Root caps and rhizosphere. *Plant Growth Regulation* 21: 352-367.
- Hawes M.C., Curlango-Rivera G., Xiong Z., Kessler J.O. 2012. Roles of root border cells in plant defense and regulation of rhizosphere microbial populations by extracellular DNA 'trapping'. *Plant Soil* 355: 1-16.
- Heath MC. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 315-319.
- Hodge A., Alexander I.J., Gooday G.W. 1995. Chitinolytic enzymes of pathogenic and ectomycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 99: 935-941
- Idnurm A., Howlett B.J. 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2: 241–255.
- Idnurm A., Warnecke DC., Heinz E., Howlett B.J. 2003. Characterisation of neutral trehalase and UDP-glucose: sterol glucosyltransferase genes from the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 305-313.
- Jansen C., von Wettstein D., Schäfer W., Kogel K-H., Felk A., Maier F.J. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings National Academy of Sciences* 102(46): 16892–16897.
- Józefowski S. 2000. Detekcja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin. I. Rozpoznanie i wczesne etapy transdukcji sygnału. *Postępy Biologii Komórki* 4: 609-621.
- Kang Z and Buchenauer H (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 255-268.
- Klarzyński O., Plesse B., Joubert J-M., Yin J-C, Kopp M., Kloareg B., Frotig B. 2000. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* 124: 1027-1037.
- Knogge W. 1998. Plant-fungal interactions and plant disease. (w:) Biswas B.B., Das H.K. (red.) Subcellular Biochemistry. Plant-Microbe Interactions. New York and London, Plenum Press, 29: 215-251.
- Kozłowska M., Konieczny G. 2003. Biologia odporności roślin na patogeny i szkodniki. Wydawnictwo AR w Poznaniu.
- Kuć J. 2000. Development and future direction of induced systemic acquired resistance in plants. *Crop Protection* 19: 859-861.
- Kurek E., Machowicz Z., Kulpa D., Słomka A. 1994. The microorganisms of rye (*Secale cereale* L.) rhizosphere. *Acta Microb. Polon.*, 2, 251-257.
- Kurek E., Jaroszuk J. 1994a. Occurrence of beneficial and deleterious for plant growth *Fusarium* strains in rye (*Secale cereale* L.) rhizosphere. *Acta Microbiologica Polonica* 43: 181-187.
- Kurek E., Jaroszuk J. 1994b. Treatment of rye (*Secale cereale* L.) seedlings with a growth promoting *Pseudomonas* strains: Plant growth responses and survival of bacteria in the rhizosphere. *Acta Microbiologica Polonica* 43: 189-198.
- Lamborda F., Garcia-Acha I., Uruburu F., Villanueva J.R. 1974. Structure of the conidial wall of *Fusarium culmorum*. *Transactions of the British Mycological Society* 62: 557-566.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R. 1999. Mechanisms of action and dose–response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89: 1151–1161.
- Mauch F., Mauch-Mani B., Boller T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and β -(1,3)-glucanase. *Plant Physiology* 88: 936-942.

- Mendgen K., Hahn M., Deising N. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology* 34: 367-386.
- Mendgen K., Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 8: 352-356.
- Montesano M., Brader G., Palva E. T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* 1: 73-79.
- Nicholson P., Doohan F., Rezanoor H. N., Simpson D., Smith P. H., Turner A., Weston G. 1997. Detection and quantification of individual fungal species in Fusarium disease complexes of cereals by polymerase chain reaction (PCR).
- Nicholson RL and Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Olivain C., Trouvelot S., Binet M-N., Cordier C., Pugin A., Alabouvette C. 2003. Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied Environmental Microbiology* 69(9): 5453-5462.
- Parniske M. 2000. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology* 3: 320-328.
- Partida-Martinez L.P., Heil M. 2011. The microbe-free plant: fact or artifact?. *Frontiers in Plant Science* 2: 1-16.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P., 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 593-601.
- Schneider E.F., Barran L.R., Wood P.J., Siddiqui I.R. 1977. Cell wall of *Fusarium sulphureum* II. Chemical composition of the conidial and chlamydospore walls. *Can. J. Microb.* 23: 763-769.
- Schulz B., Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Schulz B., Lefert P. 2004. Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 377-383.
- Schulz B., Römmer U., Dammann U., Aust H., Strack D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*. 103: 1275 -1283.
- Selitrnikoff CP (2001) Antifungal proteins. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2883-2894.
- Shibuya N., Minami E. 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 59: 223-233.
- Sivan A., Chet I. 1989. Cell wall composition of *Fusarium oxysporum*. *Soil Biol. Biochem.* 21(6): 869-871.
- Vallad G.M., Goodman R.M. 2003. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44(6): 1920-1934.
- van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Van Hulten M., Pelsler M., van Loon L.C., Pieterse C., Ton J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings National Academy of Sciences* 103(14): 5602-5607.
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. 2004 The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* 9, 203-209.
- Walters R.D. 2009. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. *Crop Protection* 28: 459-465.
- Walters R.D. 2010. Induced resistance: destined to remain on the sidelines of crop protection. *Phytoparasitica* 38: 1-4.
- Wurms K., Long P., Greenwood D., Sharrock K., Ganesh S. 1997. Endo- and exochitinase activity in kiwifruit infected with *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathology* 145: 145-151.
- Zhao X.W., Misaghi I.J., Hawes M.C. 2000. Stimulation of border cell production in response to increased carbon dioxide levels. *Plant Physiology* 122: 181-188.

5. INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

OMÓWIENIE INNYCH PRAC NAUKOWO-BADAWCZYCH NIEWLICZANYCH

DO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

Mój dorobek naukowy nie wliczany do osiągnięcia obejmuje 23 publikacje, w tym 15 prac opublikowanych po doktoracie, w większości których jestem pierwszym lub drugim autorem.

Jeden z nurtów moich badań realizowanych w pierwszych latach po doktoracie był związany z problematyką bioremediacji gleb zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi. Realizacja tego tematu wynikała z zaangażowania, jako główny wykonawca, w projekty realizowane przez Zakład Mikrobiologii Środowiskowej UMCS na zamówione jednostek pozabudżetowych zajmujących się dystrybucją paliw płynnych - Zakładów Centrali Produktów Naftowych S.A. w Lublinie koordynowane przez Lubelską Fundację Ochrony Środowiska Naturalnego. Przeprowadzono badania pozwalające na charakterystykę gleb skażonych związkami ropopochodnymi pod względem możliwości ich oczyszczania metodami biologicznymi, opracowanie protokołu takiego procesu i kontroli jego przebiegu. Ze skażonych gleb wyizolowane zostały szczepy bakteryjne intensywnie degradujące pojedyncze węglowodory alifatyczne i aromatyczne w podłożu płynnym oraz olej napędowy w glebie. Badania realizowane w ramach tej współpracy zaowocowały opracowaniem efektywnej metody oczyszczenia gleb ze skażeń ropopochodnych. Metoda bioaugmentacji okazała się dwukrotnie efektywniejsza niż metoda fitoremediacji a metoda agrotechniczna dawała kilkakrotnie słabsze parametry [Kurek i Jaroszuk 1998a]. Efektywne okazały się zastosowane metody wspomaganie bioremediacji *ex situ* gleby skażonej olejem napędowym nawożeniem mineralnym (azofoska) i poprzez poprawę warunków powietrzno-wodnych (dodatek 3 %v/v wiórów drzewnych) [Kurek i Jaroszuk 1998b].

Kurek E., Jaroszuk J. **1998a**. Porównanie efektywności różnych technik bioremediacyjnych w czyszczeniu *ex situ* gleby skażonej olejem napędowym [w:] Ekologia w dystrybucji paliw płynnych-2000, Express Press, Lublin, ISBN 83-87484-12-1, pp. 91-106.

Kurek E., Jaroszuk J. **1998b**. Stymulacja biodegradacji ropopochodnych poprzez modyfikację warunków glebowych. (A. Sawicka red.) [w:] Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby, Prodruck Poznań, ISBN: 83-86707-74-7, pp. 179-184.

Uczestniczyłam także w badaniach realizowanych we współpracy z Miejskim Przedsiębiorstwem Wodociągów i Kanalizacji w Lublinie dotyczących biodostępności metali ciężkich (Cd i Zn) w osadach ściekowych [Kurek i in. **1998**]. Wyniki 64-tygodniowych doświadczeń z użyciem sałaty wykazały, że masa roślin była ujemnie a stężenie metali dodatnio skorelowane z wiekiem osadu ściekowego. Zawartość frakcji rozpuszczalnej w wodzie i jonowymiennej kadmu ulegała obniżeniu a zawartość frakcji cynku nie ulegała istotnej zmianie.

Kurek E., Suchanek W., Słomka A., Jaroszuk J. **1998**. Bioavailability of Cd and Zn contained in sewage sludge, [in:] Trace Elements-Effects on Organisms and Environment (P. Migula, B. Dolezych red.), Eco Edycja, Katowice. Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, ISBN 83904174-6-4, pp. 47-51.

Główny nurtem moich badań była tematyka związana z drobnoustrojami ryzosferowymi, ich aktywnością w środowisku glebowym a w szczególności ich właściwościami istotnymi dla biologicznej ochrony roślin przed fuzariozą. W badaniach tych skupiałam się przede wszystkim na mechanizmach bezpośredniego oddziaływania drobnoustrojów ryzosferowych na patogeny oraz na wpływie warunków glebowych na właściwości biokontrolne szczepów ryzosferowych oraz na patogeniczność szczepów *Fusarium*. Na badania te złożyły się doświadczenia *in vitro*, doświadczenia wazonowe oraz polowe. Nawiązując współpracę z innymi ośrodkami naukowymi rozszerzyłam też zakres swoich badań o inny gatunek roślin zbożowych (pszenicę), jak też gatunki roślin reprezentujące inne rodzaje (koniczynę i czosnek). [

Wykazano, w trakcie 24-tygodniowej inkubacji, że typ gleby (less, rędzina, piasek gliniasty) i temperatura (-2, +4, +20°C) oraz interakcja pomiędzy tymi czynnikami ma istotny statystycznie wpływ na namnażanie szczepów *Fusarium* spp. (*F. culmorum*, *F. graminearum* i *F. avenaceum*) [Kurek i Jaroszuk **1997**, *Polish J. Soil Sci.*]. Liczba CFU szczepów *Fusarium* spp. wzrastała nawet kilkakrotnie po 4 tygodniach inkubacji w testowanych temperaturach i tylko w przypadku *F. avenaceum* zaobserwowano spadek liczby CFU po 24 tygodniowej inkubacji.

Kurek E., Jaroszuk J. **1997**. Changes in the number of *Fusarium* propagules introduced to soil. *Polish Journal of Soil Science* 30: 63-69.

Z kolei wprowadzenie szczepów *Fusarium* spp. (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* i *F. avenaceum*) do 3 różnych typów gleb w nieobecności rośliny (brunatna, rędzina, bielica) wpływało na liczebność drobnoustrojów glebowych (grzybów i bakterii, w tym fluoryzujących *Pseudomonas*), co wykazano po 12-sto tygodniowej inkubacji tych szczepów w dwóch temperaturach (+4, +20°C) [Kurek i Jaroszuk **1997**, *Intern. Conference, Wilno*].

Kurek E., Jaroszuk J. **1997**. Effect of pathogenic *Fusarium* strains on multiplication of microorganism in soils. [in:] International Conference Ecological Effects of Microorganisms Action, Wilno, October 1-4, *Lithuanian Society of Microbiologist*, ISBN 9986-662-07-9, pp 251-254.

Szczególnie dużo uwagi poświęcałam badaniom nad mechanizmem konkurencji o żelazo pomiędzy bakteryjnymi szczepami z gatunku *Pseudomonas fluorescens* oraz patogenami z rodzaju *Fusarium* spp. Wykazano, że wiele spośród izolatów bakteryjnych i grzybowych pochodzących z ryzosfery żyta syntetyzujących związki kompleksujące Fe³⁺ jest zdolnych do hamowania wzrostu patogenicznego szczepu *F. culmorum in vitro* [Jaroszuk i Kurek **1999**, *Bull. Pol. Acad. Sci.*]. Biologiczna ochrona wykorzystująca mikroorganizmy do zwalczania chorób roślin, oferuje silną alternatywę w stosunku do stosowania środków chemicznych. Szczepy z rodzaju *Pseudomonas* testowane są z powodu ich szerokiego zasięgu występowania w glebach, zdolności do kolonizacji ryzosfery roślin gospodarza oraz zdolności do produkcji szerokiego zakresu związków hamujących liczne patogeny roślin.

Jaroszuk J., Kurek E. **1999**. Synthesis of Fe³⁺ - chelating compounds and *in vitro* inhibition of *Fusarium culmorum* growth by rye rhizosphere microbes by siderophore mediated competition for iron mechanism. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 2-4: 69-75.

Wyodrębnione zostały cztery izolaty *Pseudomonas fluorescens* (szczyepy 23, 26, 44 i 45) efektywnie hamujące *in vitro* wzrost *F. culmorum* na drodze konkurencji o Fe^{3+} . Izolaty te syntetyzowały związki kompleksujące Fe^{3+} oraz specyficzne związki chelatujące (siderofory hydroksamowe i/lub siderofory katecholowe [Jaroszuk i Kurek 1997, 1998, Jaroszuk-Ściśeł i Kurek 2001, 2004, Kurek i Jaroszuk-Ściśeł 2003]).

W doświadczeniach wazonowych określono optymalne warunki temperatury, względnej wilgotności, typu gleby i jej składu granulometrycznego oraz formy nawożenia azotowego dla ochrony żyta przez szczepy *Pseudomonas* przed oddziaływaniem szczepów *Fusarium*.

Wyniki krótkoterminowych (10-dniowe) doświadczeń wazonowych wskazują, że na efekt biologicznej ochrony żyta przed *Fusarium avenaceum* [Jaroszuk and Kurek 1997, *Polish Phytopathol. Society*] oraz przed *F. graminearum* i *F. culmorum* [Jaroszuk and Kurek 1998, *Polish Phytopathol. Society*] przez syntetyzujący siderofory szczep *P. fluorescens* 26 istotnie wpływały czynniki środowiskowe: typ gleby (bielica, gleba brunatna wytworzona z lessu), temperatura (10, 15, 20°C), wilgotność względna (30, 60%). Te eksperymenty przeprowadzane w warunkach stałej temperatury i wilgotności względnej wskazują, że wysoka temperatura i wysoka wilgotność względna były najlepsze dla namnażania *Fusarium* spp. Wysoka wilgotność była najważniejszym spośród testowanych czynników środowiskowym dla namnażania patogena w ryzosferze żyta. Natomiast największą efektywność szczepu *P. fluorescens* 26 w stymulacji wzrostu roślin i ochronie przed *Fusarium* spp. stwierdzono w najniższej testowanej temperaturze (10°C). Te obserwacje wskazują, że temperatura wzrostu roślin może wpływać na intensywność syntezy sideroforów przez szczepy *P. fluorescens* i skład ligandów Fe^{3+} w ryzosferze.

Jaroszuk J., Kurek E. 1997. Effect of soil type, incubation temperature and relative humidity on *Fusarium* strains biocontrol by *Pseudomonas* 26 strain. [in:] *Trichoderma* spp., other microorganisms and plant extracts in plant diseases control (L.B. Orlikowski, Cz. Skrzypczak red.), ISK Skierniewice, **The Polish Phytopathology Society**, ISBN 83-772-94-8, pp 132-137.

Jaroszuk J., Kurek E. 1998. Siderophore mediated fusariosis biocontrol by *Pseudomonas* strain 26 under different environmental conditions. [in:] *Biological agents and their effectiveness in the control of plant pathogens* (L.B. Orlikowski, Cz. Skrzypczak red.), ISK Skierniewice, **The Polish Phytopathology Society**, ISBN 83-902901-6-2, pp. 25-33.

Wykazano, że promocja wzrostu roślin i hamowanie wzrostu patogena nie zależą bezpośrednio od stosunku liczebności *P. fluorescens* do liczebności patogena, ale od warunków środowiskowych, chociaż rola czynników abiotycznych w supresywności gleb dla fuzariozy jest bardzo skomplikowana. W doświadczeniu wazonowym stwierdzono istotny wpływ zawartości minerałów ilastych (0,5; 2,0 i 5,0% wprowadzonego bentonitu) oraz formy nawożenia azotowego (NO_3^- , mocznik, mieszanina NO_3^- i NH_4^+ [1:1]) na skuteczność biologicznej ochrony żyta przed fuzariozą (*F. culmorum*) przez szczepy *Pseudomonas fluorescens* 23 i 45 [Kurek i Jaroszuk-Ściśeł 2003, *Biol. Control*] oraz przez szczepy *Pseudomonas fluorescens* 26 i 44 [Jaroszuk-Ściśeł i Kurek 2004, *Acta Agr. Silv.*]. Mieszanina NO_3^- i NH_4^+ [1:1] okazała się najlepszą formą nawożenia dla wzmocnienia zdolności szczepów *P. fluorescens* do promowania wzrostu żyta i hamowania wzrostu *F. culmorum*. Wykazano, że wprowadzenie do gleby bentonitu w ilości 2% (w/w) było optymalne dla wzmocnienia tych właściwości szczepów *Pseudomonas*. Wzrost zawartości bentonitu powodował obniżenie liczebności *Fusarium*. Najwyższą masę roślin nieinokulowanych uzyskiwano po wzbogaceniu gleby 0,5% bentonitu, natomiast 5,0% dodatek tego minerału powodował obniżenie biomasy roślin. Prawdopodobnie wyższe pH gleby wzbogaconej w materiał ilasty może tworzyć warunki sprzyjające zwiększonej konkurencji o Fe^{3+} pomiędzy *P. fluorescens* i patogenem.

Badania te znalazły uznanie w literaturze światowej, czego potwierdzeniem jest oprócz cytowania ich nie tylko w pracach oryginalnych czy przeglądowych, ale także w podręczniku dotyczącym stosowania PGPR jako BCA - Plant Growth and Health Promoting Bacteria, 2010 (D.K. Maheshwari ed.), Springer-Verlag.

Kurek E., Jaroszuk-Ściśeł J. 2003. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control* 26: 48-56.

Jaroszuk-Ścisieł J., Kurek E. 2004. Wpływ czynników glebowych na skuteczność *Pseudomonas fluorescens* w ochronie żyta przed fuzariozą (*Fusarium culmorum*). *Acta Agraria et Silvestria ser. Agraria*. 42: 195-210, ISSN 0065-0919.

Wykazano potencjał syntetyzujących siderofory szczepów *P. fluorescens* jako czynników biologicznej ochrony - BCA (ang. *Biological Control Agents*) w biologicznej ochronie żyta przed fuzariozą (*Fusarium culmorum*) w warunkach polowych [Jaroszuk-Ścisieł i Kurek 2001, *Bull. Pol. Acad. Sci.*], ale rezultaty eksperymentów polowych wskazują, że rezultaty doświadczeń wazonowych nie zawsze są miarodajne dla przewidywania działania patogena i efektywności mikrobiologicznych czynników w badaniach polowych. Wyniki doświadczeń polowych z dwóch sezonów wegetacyjnych wykazały istotne znaczenie temperatury i wilgotności zarówno na oddziaływanie patogena (*F. culmorum*), jak również promujące wzrost i ochronne oddziaływanie szczepów *P. fluorescens*. Efekt inokulacji nasion szczepami *P. fluorescens* (26, 44, 45) indywidualnie lub w mieszaninie na plon żyta i infekcję ziarna przez *F. culmorum* różnił się istotnie w dwóch sezonach wzrostu. Stymulujący efekt inokulacji ziarna szczepami *P. fluorescens* na wzrost roślin był obserwowany także, gdy nasiona były ko-inokulowane tymi szczepami i *F. culmorum*. Takie traktowanie skutkowało istotnym wzrostem liczby kłosów (do 23%); plonu słomy (do 60%) i plonu ziarna (do 27%) w porównaniu do kontroli. Rezultaty badań polowych wskazywały również, że brak bezpośredniej zależności pomiędzy liczbą jednostek patogena i szczepów biokontrolnych w ryzosferze a ochronnym efektem. Liczebność mikroorganizmów wprowadzonych na nasionach do ryzosfery żyta - określana metodą płytkową podczas dwóch sezonów wegetacyjnych liczba CFU szczepów *P. fluorescens* oraz *F. culmorum* sugeruje, że mikroorganizmy nie tylko namnażały się w czasie sezonu, ale ich liczba zmieniała się wraz z rozwojem rośliny. Największą liczbę CFU szczepów *P. fluorescens* i *F. culmorum* w obu sezonach wegetacyjnych była izolowana w stadium krzewienia. Badania polowe wykazały, że warunki klimatyczne oraz interakcja pomiędzy temperaturą i ilością opadów, może znacząco wpływać na efekt działania patogena i/lub szczepów *P. fluorescens* na wzrost roślin i ich aktywność jako czynnika biologicznej ochrony.

Jaroszuk-Ścisieł J., Kurek E. 2001. Biocontrol of rye fusariosis by *Pseudomonas fluorescens* under field conditions. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 49(4): 275-285.

W badaniach polowych realizowanych we współpracy z Uniwersytetem Technologiczno-Przyrodniczym w Bydgoszczy analizowano właściwości ziarniaków pszenicy o różnym stopniu porażenia przez *Fusarium culmorum* [Grabowski i in. 2012, *Intern. J. Food Sci. Technol.*]. Porównano wyniki trzyletnich doświadczeń z użyciem sześciu odmian pszenicy inokulowanych *F. culmorum*. Analiza tak obszernego materiału pozwoliła zauważyć zaskakujące zjawisko, że ziarno o niskim stopniu porażenia odznacza się wyższym o kilka %, ale statystycznie istotnym, wzrostem takich parametrów jak masa, czy objętość pojedynczych ziarniaków w stosunku do ziarniaków inokulowanych, ale nie wykazujących symptomów porażenia roślin. Stwierdzono, że ziarno silnie porażone przez *Fusarium* miało wyraźnie obniżone w stosunku do kontroli parametry fizyczne. Prawdopodobnie przyczyną wzrostu masy ziarniaków o lekkim porażeniu może być zajęcie reakcji obronnych zaindukowanych obecnością patogena, których skutkiem jest zwykle wytworzenie w ziarniakach związków antygrzybowych oraz fenoli powiązanych ze ścianą komórkową, lignifikacja ścian i gromadzenie apozytów ścianowych zbudowanych z polimerów β -glukanowych (kalozy). Wytworzone metabolity mogą ograniczać wzrost patogena i tworzyć barierę fizyczną powstrzymującą jego rozprzestrzenianie a jednocześnie mogą przyczyniać się do wzrostu masy i objętości ziarniaków.

Grabowski A., Siuda R., Lenc L., Jaroszuk-Ścisieł J. 2012. Effect of the degree of fusariosis on the physical characteristics of individual wheat kernels. *International Journal of Food Science and Technology* 47: 1122-1129.

We współpracy z Zakładem Biologii Molekularnej UMCS badałam zdolność patogenicznego szczepu *Fusarium oxysporum* DEMFc38 (wywołującego fuzariozę żyta) do syntezy enzymów trehalazy (THA) i inwertazy (INV) uczestniczących w metabolizmie węglowodanów i istotnych dla patogeniczności [Wolska-Mitaszko i in. 2007, *Mycol. Res.*]. Wykazano, że szczep ten syntetyzuje liczne wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe izoformy tych enzymów. Aktywność enzymów zależała od wieku hodowli i źródła węgla (cukru) obecnego w podłożu. W logarytmicznej fazie wzrostu aktywność INV przewyższała aktywność THA, natomiast w stacjonarnej fazie wzrostu wyższa była aktywność

THA. Aktywność wewnątrzkomórkowej THA w stacjonarnej fazie wzrostu była hamowana przez monosacharydy. Dwucukry zaś, głównie laktoza i skrobia, zwiększały aktywność wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej THA. Wewnątrzkomórkowa THA była syntetyzowana w pojedynczej formie o wysokiej masie cząsteczkowej 120 kDa a zewnątrzkomórkowa THA jako pojedyncza forma o masie 60 kDa. Stwierdzono pojawianie się trzech izoform wewnątrzkomórkowej INV i dwóch izoform zewnątrzkomórkowej INV. Tak duże zróżnicowanie izoform może wskazywać na duże znaczenie tych enzymów w regulacji metabolizmu węglowodanów oraz podczas kolonizacji rośliny.

Wolska-Mitaszko B., Jaroszuk-Ścisiel J., Pszeniczna K. 2007. Isoforms of trehalase and invertase of *Fusarium oxysporum*. *Mycological Research* 111: 456-465.

Uczestniczyłam także w badaniach nad rolą genu *rosR* i *pssA* oraz egzopolisacharydu (EPS) w symbiozie *R. leguminosarum* z koniczyną analizując wpływ dodatkowych kopii tych genów na własności symbiotyczne bakterii [Janczarek i in. 2009, **Antonie van Leeuwenhoek**]. Obecność dodatkowych kopii genów *rosR* i *pssA* u wszystkich testowanych szczepów *R. leguminosarum* wpływała na zwiększenie ilości syntetyzowanego przez te szczepy EPS oraz liczby indukowanych przez nie brodawek na korzeniach koniczyny. Skutkiem efektywnej symbiozy był wzrost masy części nadziemnej roślin infekowanych przez szczepy zawierające dodatkowe kopie tych genów w stosunku do mas roślin infekowanych przez bakterie niezmodyfikowane. Stwierdzono, że szczepy zawierające dodatkowe kopie *rosR* i *pssA* zasiedlały do ok. 50% więcej brodawek w porównaniu ze szczepami typu dzikiego. Brodawki te były zasiedlone przez 10-krotnie większą liczbę bakterii niż brodawki indukowane przez szczepy niezmodyfikowane.

Janczarek M., Jaroszuk-Ścisiel J., Skorupska A. 2009. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Antonie van Leeuwenhoek** *International Journal of General and Molecular Microbiology* 96: 471-486.

Ponadto, we współpracy z Zakładem Anatomii i Cytologii Roślin UMCS prowadziłam badania dotyczące roli kalazy (β -1,3 glukanazy) w mikrosporogenezie roślin kwiatowych [Winiarczyk i in. 2012, **Sex. Plant Reprod.**]. Enzym ten rozkłada polimer glukanowy - kalozę, obecną w ścianie otaczającej tetradę mikrospor pyłku. Degradacja kalozy przez kalazę decyduje o procesie wytwarzania mikrospor (stadium niezbędnego do rozwoju żywotnego pyłku). W badaniach porównywano izoformy kalazy syntetyzowane przez sterylny (nie wytwarzającym pyłku) czosnek z gatunku *Allium sativum* oraz tych syntetyzowanych przez gatunek czosnku zdolny do rozmnażania generatywnego (*Allium atropurpureum*). Wykazano, że sterylny czosnek wytwarza izoformę o optimum pH 4,8, podczas gdy *Allium atropurpureum* izoformy aktywne w zakresie pH 4,8-5,2; 6,1 oraz 7,3. Wyniki te wskazały, że czynniki wpływające na zmianę pH w mikrosporangium mogą pośrednio wpływać na rozwój męskiego gametofitu modulując aktywność kalazy. Optymalna aktywność kalazy dla stadium tetrad miała miejsce przy pH=4,8 i malała wraz ze wzrostem pH. Tak więc, kiedy tworzyła się ściana kalozowa wokół mikrosporocytów, aktywność kalazy była ograniczona, gdyż pH w lokulus wynosiło > 5,0. W procesie mikrosporogenezy u *A. sativum* stadium dominującym, utrzymującym się przez długi okres była tetrad mikrospor otoczona wspólną otoczką kalozową. Ta specyficzna ściana występuje u wielu gatunków roślin kwiatowych, ale okres jej trwania jest bardzo krótki (nawet kilka minut), natomiast u *A. sativum* ściana ta utrzymywała się ponad 2 tygodnie. Dopiero w czasie pęknięcia podsadki, w mikrosporangiach dochodziło do rozpadu kalozowej ściany i uwolnienia haploidalnych mikrospor. Długotrwałe utrzymywanie się kalozowej ściany wokół tetrady mikrospor i ich izolacja jest prawdopodobnie przyczyną degeneracji ich protoplastów.

Winiarczyk K, Jaroszuk-Ścisiel J., Kupisz K. 2012. Characterization of callase (β -1,3-D glucanase) activity during microsporogenesis in the sterile anthers of *Allium sativum* L. and the fertile anthers of *A. atropurpureum*. **Sexual Plant Reproduction** 25: 123-131.

Sumaryczny *impact factor* - IF ww. publikacji nie wliczanych do osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **9,036**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW

164 pkt

PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

W ramach kierowanego przeze mnie grantu NCN pt. "Różnice w metabolizmie pierwotnym i wtórnym szczepów *Fusarium culmorum* różnie oddziałujących (promujący, hamujący, patogeniczny) na wzrost roślin zbożowych" (nr N N310 441338), realizowanego we współpracy z Zakładem Fitopatologii Molekularnej Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy, prowadzone są 3-letnie badania polowe nad efektywnością ochrony przed fuzariozą roślin zbożowych (żyta i pszenicy) przez makrokonidia szczepów niepatogenicznych *F. culmorum* oraz preparatów otrzymywanych po chemicznym i enzymatycznym frakcjonowaniu ścian roślinnych i grzybowych. Badania te zostaną zakończone jesienią 2013 roku. Uzyskane już wyniki wskazują, że zastosowane preparaty jak również metody ich aplikacji mają szansę na komercyjne zastosowanie. Wkrótce po zakończeniu doświadczeń będzie złożony wniosek patentowy a następnie zostaną opublikowane wyniki tych badań.

Badania nad interakcjami roślin zbożowych (żyto, pszenica i jęczmień) ze szczepami grzybowymi są i będą kontynuowane z wykorzystaniem szczepów z różnych gatunków *Fusarium* - patogenicznych (*F. graminearum* DEMFc36, *F. culmorum* DEMFc37, *F. oxysporum* DEMFc38) i niepatogenicznych (*F. culmorum* DEMFc1, DEMFc2, DEMFc3, DEMFc5, *F. avenaceum* DEMFc4), które zostały sklasyfikowane i zdeponowane w CBS.

Kontynuowane będą badania nad interakcjami pomiędzy komórkami granicznymi korzeni (RBC) tych trzech roślin zbożowych i różnymi szczepami *Fusarium* oraz szczepami z innych rodzajów (*Trichoderma* i *Penicillium*) zmierzające do sprawdzenia specyficzności interakcji z RBC oraz czynników ją warunkujących.

Realizowane będą badania nad bezpośrednimi i pośrednimi mechanizmami ochrony przed fuzariozą wywoływaną przez patogeniczne szczepy z gatunków *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* z wykorzystaniem niepatogenicznych szczepów *Fusarium* oraz szczepów z rodzajów *Trichoderma* i *Penicillium*, które pozwolą na wyodrębnienie aktywnych szczepów hamujących wzrost patogenów *in vitro* z wykorzystaniem bezpośrednich mechanizmów.

Prowadzone są i nadal będą kontynuowane badania metabolizmu pierwotnego i wtórnego szczepów patogenicznych i niepatogenicznych z różnych gatunków *Fusarium*. Zaawansowane są badania nad syntezą metabolitów wtórnych. Badana jest synteza toksyn: DON i jej acetylowanych form, ZEA, NIV przez szczepy *F. culmorum* oraz patogeniczne szczepy *F. oxysporum* i *F. graminearum* ze zwróceniem uwagi na wpływ czynników abiotycznych i biotycznych. Szczególnie interesujące wydają się wyniki uzyskane w dotychczas prowadzonych badaniach *in vitro* dotyczące syntezy przez różnie oddziałujące szczepy *F. culmorum* fitohormonów: etylenu, kwasu indoliloctowego (auksyny) i kwasu giberelinowego (gibereliny). Synteza tych metabolitów badana będzie zarówno w hodowlach *in vitro* jak i *in vivo* w glebach ryzosferowych oraz w tkankach skolonizowanych roślin. W dotychczas prowadzonych badaniach *in vitro* zaznaczyła się wyraźna zależność ich syntezy od obecności i stężenia aminokwasowych prekursorów oraz okresu hodowli. Stwierdzono, że szczepy o różnym typie oddziaływania na rośliny charakteryzują się odmiennym profilem syntetyzowanych fitohormonów—patogen syntetyzuje etylen w najwyższych stężeniach. Przygotowano do publikacji opracowanie wyników tych badań w pracy pt. "Efficiency of indoleacetic acid (IAA), gibberellic acid (GA), and ethylene synthesized *in vitro* by *Fusarium culmorum* strains with different effects on cereal growth" przesłanej do redakcji *Biologia*. Wykazano też, że szczep PGPF odznacza się zdolnością do syntezy w najwyższych stężeniach deaminazy ACC – enzymu odpowiedzialnego za rozkład bezpośredniego prekursora etylenu.

Kontynuowane będą badania nad syntezą przez szczepy *Fusarium* kwasów organicznych ze szczególnym uwzględnieniem syntezy kwasu szczawiowego, który jest uważany za jeden z czynników patogeniczności - zdolność do jego syntezy wykazano już w hodowlach szczepu patogenicznego.

Realizowane będą badania nad wykorzystywaniem przez szczepy *Fusarium* o różnym typie oddziaływania różnorodnych substratów zawartych w testach Biolog (FF MicroPlate™ oraz EcoPlate™), które będą podstawą do wyznaczenia takich parametrów ekologicznych jak: intensywność zasiedlania niszy (NOI – *niche overlap index*) oraz ekologicznego podobieństwa (*ecological similarity*) czy zróżnicowania (*ecological variability/niche differentiation*).

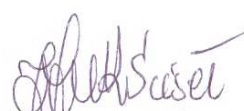
Dokończone zostaną badania realizowane we współpracy z Zakładem Biochemii UMCS mające na celu scharakteryzowanie enzymów odgrywających zasadniczą rolę w degradacji ściany roślinnej (ksylanaz) oraz ścian grzybowych (glukanaz i chitynaz) syntetyzowanych przez szczepy *F. culmorum*. Ich oczyszczenie techniką niskociśnieniowej chromatografii jonowymiennej pozwoliło na określenie ich mas cząsteczkowych. Dla badanych enzymów wyznaczona zostanie również zawartość składnika węglowodanowego oraz parametry kinetyczne: stała Michaelisa-Menten (K_m) i prędkość maksymalna (V_{max}). Zidentyfikowane zostaną kopie genowe kodujące te enzymy w genomach patogenicznych i ryzosferowych szczepów *F. culmorum*.

Prowadzone będą także badania, we współpracy z Zakładem Mikrobiologii Przemysłowej UMCS i Zakładem Anatomii i Cytologii Roślin UMCS, nad analizą ścian komórkowych *Fusarium*. Wstępne analizy wykazały obecność w strukturze tych ścian obok frakcji β -(1,3)-glukanów mniejsze ilości frakcji α -(1,3)-glukanów. Przygotowany został pod moim kierownictwem projekt pt. „Różnice w składzie glukanów ścianowych pomiędzy patogenicznym a niepatogenicznymi (ryzosferowymi) różnie oddziałującymi na wzrost roślin szczepami *Fusarium culmorum*”, który zostanie przesłany na najbliższy konkurs w celu możliwości jego finansowania przez NCN. Skład glukanów ścianowych ma być określony w różnych stadiach rozwoju grzyba (okresu hodowli) i tworzenia struktur infekcyjnych z wykorzystaniem analiz immunologiczno-cytologicznych, technik frakcjonowania i analizy spektroskopii w podczerwieni FT-IR oraz analizy magnetycznego rezonansu jądrowego H^1 -NMR. Oczekujemy, że uzyskane wyniki pozwolą wyjaśnić czy grzybowe α -(1,3)-glukany wpływają na efekt oddziaływania grzyb-roślina oraz czy oddziaływanie to polega na: (1) bezpośredniej indukcji reakcji odporności roślin czy odwrotnie (2) utrudnianiu indukcji odporności roślin poprzez maskowanie dostępu enzymów degradujących ściany komórkowe do β -(1,3)-glukanów i chityny—polimerów ścianowych, z których uwalniane są egzolicytyny indukujące odporność roślin?

Planujemy jednocześnie sprawdzić czy oddziaływanie to jest specyficzne i ograniczone tylko do α -(1,3)-glukanów wyizolowanych ze ścian komórkowych szczepów *Fusarium* kolonizujących tkanki roślin zbożowych czy może być wywołane α -(1,3)-glukanami wyizolowanymi ze ścian komórkowych nie kolonizujących tych roślin grzybów z innych rodzajów należących do *Ascomycetes* (np. *Aspergillus wentii*) i *Basidiomycetes* (np. *Laetiporus sulphureus*) zawierających duże ilości α -(1,3)-glukanów w ścianach komórkowych. W dalszych zamierzeniach jest sprawdzenie czy glukany efektywne w indukcji odporności roślin wykazują też zdolność do immunizacji zwierząt.

W dalszej przyszłości zamierzam także podjąć badania dotyczące charakterystyki molekularnej testowanych szczepów, co pozwoliłoby na potwierdzenie znaczenia produktów ekspresji określonych determinantów genetycznych w kształtowaniu interakcji roślina –grzyb.

Lublin, 5.05.2013 r.



Jolanta Jaroszuk-Ścisiet