

**1. IMIĘ I NAZWISKO: Beata Zimowska****2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE-Z  
PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU  
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**10.06.1996 r.** - ukończenie studiów z wynikiem bardzo dobrym oraz nagrodą J. M. Rektora i odznaką honorową nr 8/97 oraz **uzyskanie tytułu zawodowego magistra inżyniera** w zakresie ogrodnictwa, specjalność – fitopatologia - Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Ogrodniczy, Katedra Kwarantanny i Ochrony Roślin, (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział Ogrrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii).

Temat pracy magisterskiej: „**Podatność odmian i rodów hodowlanych bobiku (*Vicia faba var. minor* Harz.) na grzyby chorobotwórcze**”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Filipowicza.

**25.04.2003 r.** – uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa, specjalność fitopatologia – Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Ogrodniczy, Katedra Fitopatologii (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział Ogrrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii).

Temat rozprawy doktorskiej: „**Grzyby zagrażające uprawie dziurawca zwyczajnego, ze szczególnym uwzględnieniem *Seimatosporium hypericinum* (Ces.) Sutton (*Melanconiales, Deuteromycotina*)**”, promotor – prof. dr hab. Zofia Machowicz-Stefaniak. Rozprawa została wyróżniona przez Recenzentów.

**1995-1996 r.** – **Certificate in Intermediate English**, wydany przez University of Central Landscape.

**1998 r.** – Studia Pedagogiczne – Akademia Rolnicza w Lublinie – **uzyskanie dyplomu nr 39/98.**

### **3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH**

**Od 1.XI.1996 r. do 30.XI. 1997 r.** – zatrudnienie na czas określony na etacie asystenta - Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Ogrodniczy, Katedra Fitopatologii. Obecnie - Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii.

**Od 1.XII.1997 r. do 30.IX.2003 r.-** zatrudnienie na czas nieokreślony na etacie asystenta - Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Ogrodniczy, Katedra Fitopatologii. Obecnie - Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii.

**Od 1.X.2003 r do chwili obecnej-** zatrudnienie na stanowisku adiunkta - Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Ogrodniczy, Katedra Fitopatologii. Obecnie - Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii.

Jestem mężatką, mam 3 dzieci: córkę Olę w wieku 21 lat, córkę Zofię w wieku 17 lat i syna Stanisława w wieku 11 lat.

4. **WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJACEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. 2016 r. POZ.882 ZE ZM. W Dz. U. Z 2016 r. POZ. 1311)**

a) **tytuł osiągnięcia naukowego :**

Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl dziewięciu publikacji powiązanych tematycznie, ujętych pod wspólnym tytułem:

**„Studia morfologiczno-genetyczne oraz biologia *Boeremia strasseri* (Basionym: *Phoma strasseri*, *Didymellaceae*), patogena mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.)”**

b) **publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

Lp. Publikacje naukowe (w kolejności chronologicznej)	Pkt. MNiSW
1. <b>Zimowska B.</b> , Machowicz-Stefaniak Z. 2005. Charakterystyka izolatów <i>Phoma strasseri</i> nie notowanego w Polsce patogenu mięty pieprzowej ( <i>Mentha piperita</i> L.). Acta Agrobot., 59 (2): 151-162. <b>IF= 0</b>	<b>4</b>
<i>(udział własny 60%: współautorstwo koncepcji badań oraz założeń metodycznych, badania terenowe analiza mykologiczna, dokumentacja fotograficzna, opracowanie wyników, współredagowanie tekstu)</i>	
2. <b>Zimowska B.</b> 2007. Fungi colonizing and damaging different parts of peppermint ( <i>Mentha piperita</i> L.) cultivated in South-Eastern Poland. Herba Pol., vol. 53, nr 4: 97-105. <b>IF= 0</b>	<b>6</b>
3. <b>Zimowska B.</b> 2010. Diversity of fungi occurring on herbs from <i>Lamiaceae</i> family. Phytopathol. Pol., 56: 5-15. <b>IF= 0</b>	<b>6</b>
4. <b>Zimowska B.</b> 2011. Conidiogenesis of <i>Phoma strasseri</i> the fungus responsible for black stem and rhizomes rot in peppermint ( <i>Mentha piperita</i> ). Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 10 (4): 171-178. <b>If=0,393</b>	<b>20</b>

5. **Zimowska B.** 2011. Biotic activity of *Phoma strasseri* and the effect of thermal conditions on the growth and formation of the pathogen's infectious material. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 10 (3): 259-271. **If=0,393** **20**
6. **Zimowska B.** 2012. Pathogenicity and ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma strasseri* in peppermint stems and rhizomes. Pol. J Microbiol., 61 (4): 273-279. **IF = 0,768** **15**
7. **Zimowska B.,** Targoński Z. 2015. Pectinolytic activity of *Boeremia strasseri* the causal agent of black stem and rhizomes rot of peppermint. Act Sci. Pol., Hortorum Cultus, 14 (5): 19-28. **IF =0,583** **15**  
(*udział własny 80%: współautorstwo koncepcji badań oraz założeń metodycznych, hodowla kultur jednozarodnikowych, przeprowadzenie analiz biochemicznych, dokumentacja fotograficzna, opracowanie wyników, współredagowanie tekstu*)
8. **Zimowska B,** Król E.D. 2018. Effect of selected preparations on growth and development *Boeremia strasseri*, the causal agent of black stems and rhizomes rot of peppermint (*Mentha piperita*). Act Sci. Pol., Hortorum Cultus, 17 (1): 3-12. **IF =0,523** **20**  
(*udział własny 80%: autor koncepcji badań oraz założeń metodycznych, hodowla kultur jednozarodnikowych, współudział w prowadzeniu badań, opracowanie wyników, współredagowanie tekstu*)
9. **Zimowska B.,** Król E.D., Furmańczyk A., Abramczyk B., Okoń S. 2018. Molecular characterization of *Boeremia strasseri*, the causal agent of black stems and rhizomes rot of peppermint. J. Plant Pathol., <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0003-4> **IF =1,267** **20**  
(*udział własny 60%: koncepcja i projekt badań, hodowla kultur jednozarodnikowych, udział w badaniach molekularnych, współpracowanie wyników i tekstu*)

Łączna wartość publikacji dokumentujących moje osiągnięcie naukowe według punktacji MNiSW z roku wydania wynosi: **126** punktów. Sumaryczny Impact Factor w/w publikacji wg listy Journal Citation Reports (WoS) wynosi: **3,927**, a sumaryczny 5-letni

IF=2,202 Wśród publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe w 5 jestem wyłącznym autorem, a w pozostałych pierwszym z udziałem własnym od 60 do 80%.

Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem ich indywidualnego wkładu w powstanie publikacji znajdują się w załączniku nr 6.

**c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

**Wstęp**

Historia wykorzystywania roślin leczniczych i aromatycznych (MAPs- medicinal and aromatic plants) sięga początków ludzkości. Nasi przodkowie stosowali naturalne substancje do łagodzenia dolegliwości zdrowotnych i leczenia chorób. Obecnie ponad 80% populacji ludzi na świecie korzysta z właściwości leczniczych tej grupy roślin, a zakres wykorzystywania surowców zielarskich zwłaszcza w kosmetologii, aromaterapii czy weterynarii stale się poszerza (Máthé 2015).

Udział Polski w światowej produkcji ziół stanowi 16-20%, z czego ok. 80% to zioła pochodzące z upraw. Nasz kraj znajduje się w czołówce krajów europejskich jeśli chodzi o produkcję roślin leczniczych i aromatycznych. Obecnie powierzchnia upraw ziół w Polsce kształtuje się na poziomie 20.000 tys. ha co stawia nas na drugim miejscu w rankingu producentów ziół w Europie (Olewnicki i in. 2015). Plantacje są zgrupowane w województwach: lubelskim, kujawsko-pomorskim, mazowieckim, świętokrzyskim i wielkopolskim. Tradycja uprawy ziół na Lubelszczyźnie sięga 70 lat. Pierwsze plantacje mięty pieprzowej założono w okolicach Krasnegostawu. Tam też powstała pierwsza w tym rejonie destylarnia olejku miętowego (Seidler-Łożykowska 2009). Kolejne plantacje zakładano na terenie gminy Fajslawice, co było związane z powstaniem Lubelskich Zakładów Zielarskich „Herbapol” i reaktywowaniem Polskiego Związku Zielarskiego. Dzięki sprzyjającym uprawie warunkom klimatycznym i glebowym w rejonie Fajslawic zgrupowane są plantacje: dziurawca zwyczajnego, melisy lekarskiej, serdecznika pospolitego, babki lancetowatej, tymianku właściwego, szałwii lekarskiej, lebidki pospolitej, lubczyku ogrodowego oraz mięty (Seidler-Łożykowska 2009).

Przeszkodą w uzyskiwaniu wysokiej jakości plonów surowców zielarskich są czynniki abiotyczne oraz biotyczne. Do drugiej grupy należą mikroorganizmy

chorobotwórcze, które występują w środowisku uprawnym roślin. Jakość surowca roślin leczniczych i aromatycznych jest w głównej mierze zdeterminowana zawartością olejków eterycznych oraz wtórnych metabolitów produkowanych w tkankach roślin. Czynniki infekcyjne, głównie grzyby oraz organizmy grzybopodobne (Carrubba i in. 2015) porażając organy roślin zaburzają ich metabolizm poprzez zmiany w procesach fizjologicznych co wpływa na zmniejszenie syntezy olejków eterycznych oraz modyfikację składu frakcji lotnych roślin (Lövenstein i in. 1993, Zechini i in. 1995).

Źródłem infekcji dla grzybów i powodowanych przez nie chorób ziół może być materiał siewny, wegetatywne organy rozmnażania, gleba, resztki pozbiorowe oraz wieloletnie części roślin (Machowicz-Stefaniak i Zimowska 2000, Agrios 2005, Carruba i Catalano 2009, Máthé 2015).

Szczególne zastosowanie surowców pozyskiwanych z tej grupy roślin i ograniczenia w stosowaniu pestycydów wskazują na konieczność prowadzenia integrowanych metod ochrony, gdzie priorytetem powinny być metody agrotechniczne, uwzględniające rotację roślin, zdrowy materiał rozmnożeniowy oraz wczesne i skuteczne wykrywanie na plantacjach pierwszych ognisk chorób (WHO 2003).

**Mięta pieprzowa (*Mentha piperita* L.)** jest jednym z najczęściej uprawianych gatunków roślin zielarskich w Polsce. Produkcją mięty zajmują się ponad 100 tys. gospodarstw, których średnia wielkość wynosi od 0,5 ha do 10 ha. Zgrupowane są one w województwach; świętokrzyskim, lubelskim oraz mazowieckim. Tak duże zainteresowanie uprawą mięty wynika z przesłanek ekonomicznych, dochód z 1 ha wynosi ok. 20 tys. zł. Ze względu na zróżnicowany skład chemiczny surowca *Folium Menthae piperitae* oraz *Herba Menthae piperitae*, znajduje on szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym. Stale rosnące wymagania jakościowe stawiane producentom mięty powodują, że dążą oni do otrzymywania surowca o jak najlepszej jakości co wiąże się z utrzymywaniem plantacji w dobrym stanie fitosanitarnym.

Prowadzone od 1998 roku w Katedrze Fitopatologii AR (obecnie Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii) badania nad mykozami roślin leczniczych i przyprawowych wskazały na duże zagrożenie ze strony grzybów *Micromycetes* w obniżaniu jakości oraz ilości plonu surowca zielarskiego (Machowicz-Stefaniak i Zimowska 1998, Machowicz-Stefaniak i in. 2002). Obserwacje własne dotyczące zdrowotności roślin mięty pieprzowej, kontakty z producentami oraz brak pełnych opracowań dotyczących tej

problematyki, wskazały na potrzebę kontynuacji i rozwijania badań, mających na celu poznanie zagrożeń chorobowych *Mentha piperita* (Zimowska i Machowicz-Stefaniak 2005).  
**Byłam autorem koncepcji oraz wyłącznym lub głównym wykonawcą tego nurtu badań.**

**Wyniki moich badań dokumentują prace stanowiące podstawę przedstawionego osiągnięcia naukowego.**

**Głównym celem wykonywanych badań było:**

- \* ocena zdrowotności roślin mięty pieprzowej w warunkach uprawy na plantacjach produkcyjnych oraz identyfikacja symptomów chorób,
- \* określenie zasiedlenia wybranych organów roślin przez grzyby, ich przynależności gatunkowej oraz utworzenie kolekcji izolatów wybranych gatunków,
- \* studia nad *Boeremia strasseri*:
  - biotyczne interakcje grzybów zasiedlających łodygi i rozłogi mięty pieprzowej na *B. strasseri*,
  - morfologia, wzrost i rozwój *B. strasseri* w różnych warunkach hodowli,
  - konidiogeneza *B. strasseri*,
  - testy patogeniczności oraz ultrastrukturalne badania procesu infekcji *B. strasseri*,
  - badania biochemiczne nad aktywnością enzymów pektynolitycznych *B. strasseri*,
  - badania genetyczne *B. strasseri*,
  - możliwości ograniczania wzrostu i rozwoju *B. strasseri*.

**Przeprowadzenie wyżej wymienionych badań było możliwe dzięki uzyskaniu projektów badawczych:**

1. 2000-2002, nr 5 PO6B 052 19, KBN „Grzyby zagrażające uprawie wybranych gatunków roślin zielarskich w województwie lubelskim”- kierownik projektu prof. dr hab. Zofia Machowicz-Stefaniak, w którym byłam wykonawcą.
2. 2015, nr HORre-msz-0780-13/15 (458) Grant finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa nt. „Warzywnictwo, w tym uprawa ziół metodami ekologicznymi: określenie dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami w

ekologicznej produkcji ziół i warzyw”- kierownik projektu dr hab. Piotr Kraska,  
w którym byłam wykonawcą.

### Obserwacje stanu zdrowotności roślin mięty pieprzowej w warunkach uprawy (publikacje 1, 2)

W latach **2005-2006** obserwacje zdrowotności mięty pieprzowej prowadzono na trzech dwuletnich plantacjach w **Kolkowie, woj. świętokrzyskie** 50°45'00''N 20°43'33''E, o powierzchni od 0,5 do 3,0 ha, zaś w latach **2004-2006** na plantacjach produkcyjnych w drugim roku uprawy, zgrupowanych w **Fajslawicach, woj. lubelskie** 51°09'57''N, 22°96'34''E. Powierzchnia upraw wynosiła zależnie od plantacji od 0,5 do 1,5 ha. Ocenę zdrowotności roślin wykonywano na początku okresu wegetacji, co przypadało na trzecią dekadę maja oraz w pełni wegetacji, co miało miejsce w pierwszej dekadzie lipca. Ustalano procent roślin z objawami nekrozy na nadziemnych częściach roślin.

W **2012** wykonano ocenę zdrowotności roślin mięty pieprzowej na trzech plantacjach zlokalizowanych w **Płońsku, woj. mazowieckie** 52°37'24''N 20°22'31''E

Na **plantacjach produkcyjnych w Fajslawicach** procent roślin z objawami chorobowymi na nadziemnych organach wahał się od 15 do 35, a w **Kolkowie** od 30-60. Na początku okresu wegetacji, na łodygach, tuż u podstawy oraz rozłogach obserwowano nekrotyczne, wrzecionowate plamy. Na porażonych łodygach powierzchnia liści była silnie zredukowana i zabarwiona na kolor czerwony. Objawy te nasilały się w miarę upływu czasu i w pełni wegetacji nekroza obejmowała często całą powierzchnię rozłogów, w przypadku łodyg występowała do wysokości 7-10 cm od podstawy, a na granicy zdrowej i chorej tkanki widoczne było przewężenie. W tym czasie obserwowano także dezintegrację i rozmiękczenie tkanek wymienionych organów. Na porażonych łodygach i rozłogach występowały liczne piknidia, a w nich zarodniki konidialne o cechach typowych dla *Phoma. sensu lato (Didymellaceae)*. Nasilone objawy **czarnej zgnilizny łodyg i rozłogów, zwanej również fomozą mięty**, obserwowano na roślinach uprawianych w woj. świętokrzyskim, pochodzących z plantacji położonych w otulinie mieszanego lasu liściastego, gdzie panowała wyższa wilgotność powietrza. Oprócz opisanych symptomów chorobowych, na liściach mięty widoczne były również objawy w formie, nieregularnych, nekrotycznych plam. Na początku wegetacji były to pojedyncze zmiany, które nasilały się



w miarę upływu czasu i w pełni wegetacji zlewały się ze sobą tworząc większe nekrotyczne powierzchnie. Liście takie przedwcześnie opadały.

Nasilone pojawienie się czarnej zgnilizny łodyg i rozłogów odnotowano podczas wyjątkowo gorącego okresu wegetacji **2012 roku** na plantacjach w **woj. mazowieckim**. Młode porażone pędy zamierały, nie tworząc liści, a rozłogi na skutek dezintegracji tkanek rozpadały się. Wskutek szybko postępującej zgnilizny organów, na plantacji obserwowano miejsca pozbawione roślin. Objawy chorobowe występowały na 40-60 % roślin. Na porażonych tkankach tworzyły się liczne piknidia z kroplą wydzieliny konidiów (doniesienie własne).

W czasie prowadzenia badań nie stwierdzono występowania na roślinach mięty pieprzowej pasożytów ścisłych.

### **Określenie zasiedlenia wybranych organów roślin przez grzyby, ich przynależności gatunkowej oraz utworzenie kolekcji izolatów wybranych gatunków (publikacje 1, 2)**

Do **analizy mykologicznej** z poszczególnych plantacji przeznaczano w każdym roku i terminie badań po 20 roślin z objawami chorobowymi. Grzyby izolowano z korzeni, rozłogów, łodyg oraz liści stosując metodę sztucznych kultur i pożywkę mineralną (Zimowska i Machowicz-Stefaniak 2004).

Nazwę gatunkową i epitet autorski skorygowano z aktualnym statusem taksonomicznym gatunków w bazie Index Fungorum 2017.

Analiza mykologiczna potwierdziła powszechne zasiedlanie łodyg i rozłogów mięty przez ***Boeremia strasseri* (Moesz) Aveskamp, Gruyter & Verkley (Basionym *Phoma strasseri* Moesz)**. Izolaty grzyba uzyskane z roślin pobranych z plantacji zlokalizowanych w **woj. lubelskim** stanowiły 7,47 % wszystkich uzyskanych gatunków grzybów. Udział kultur ***B. strasseri*** otrzymanych z łodyg i rozłogów stanowił odpowiednio 9,50% i 15,15%. Pojedyncze izolaty grzyba uzyskano także z korzeni. Z analizowanych organów mięty izolowano inne gatunki należące do *Didymellaceae*: ***Boremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter & Verkley (Basionym *Phoma exigua* var. *exigua* Desm.)**, ***Didymella glomerata* (Corda) Q. Chen & L. Cai (Basionym *Phoma glomerata* Cda.) Wollenw. et Hochapf.)**, ***Allophoma labilis* (Sacc.) Q. Chen & L. Cai (Basionym *Phoma labilis* Sacc.)**, ***Westerdykella capitulum* (Panwar, P.N. Mathur & Thirum.) Gruyter, Aveskamp &**

Verkley (**Basionym *Phoma capitulum*** Panwar, P.N. Mathur & Thirum.) oraz ***Phoma pereupyrena*** Gruyter, Noordel. & Boerema. Ze wszystkich organów mięty izolowano ***Alternaria alternata*** (Fr.) Keissl., oraz ***Botrytis cinerea*** Pers. a ich udział stanowił odpowiednio 23,92% i 3,51% uzyskanych gatunków grzybów. Do innych grzybów izolowanych z niektórych organów należały: ***Fusarium*** spp., ***Cylindrocarpon*** spp. ***Rhizoctonia solani*** J.G. Kühn (tel. ***Thanatephorus cucumeris*** (A.B. Frank) Donk), ***Colletotrichum gloeosporioides*** (Penz.) Penz. & Sacc., oraz szybko rosnące gatunki z rodzajów ***Trichoderma*** i ***Epicoccum*** (publikacja 2).

W wyniku analizy mykologicznej chorych części roślin z plantacji produkcyjnych w woj. świętokrzyskim uzyskano liczne izolaty ***B. strasseri*** stanowiące 19,02% wszystkich uzyskanych gatunków grzybów. Udział kultur otrzymanych z łodyg i rozłogów stanowił odpowiednio 29,13% i 35,59% wszystkich gatunków grzybów otrzymanych z tych organów. Ze wszystkich części roślin oprócz liści wyhodowano kultury innych gatunków należących do *Didymellaceae*: ***B. exigua***, ***D. glomerata***, ***Phoma herbarum*** Westend oraz ***Didymella heteroderae*** (Sen Y. Chen, D.W. Dicks. & Kimbr.) Q. Chen & L. Cai, (**Basionym *Phoma heteroderae*** Sen Y. Chen, D.W. Dicks. & Kimbr.), a także pojedyncze izolaty ***W. capitulum*** i ***Phoma eupyrena*** Sacc. Dominującym gatunkiem izolowanym z liści mięty z objawami nieregularnych, nekrotycznych plam był ***A. alternata***, uznawany w wielu rejonach uprawy mięty na świecie za jednego z groźniejszych patogenów powodujących przedwczesną defoliację liści. Szkodliwość tego grzyba związana jest ponadto z tworzeniem toksycznych metabolitów w tkankach roślin, co ma negatywny wpływ na jakość surowca *Folium Menthae piperitae* oraz *Herba Menthae piperitae* (Kalra i in. 2004, Takashi i in. 2013). Z analizowanych części roślin izolowano także grzyby należące do rodzajów: ***Botrytis***, ***Cladosporium***, ***Cylindrocarpon***, ***Fusarium***, ***Clonostachys***, ***Rhizoctonia*** oraz ***Trichoderma*** (publikacja 2).

W wyniku analizy mykologicznej porażonych łodyg i rozłogów mięty pochodzących z plantacji w woj. mazowieckim, dominującym gatunkiem był ***B. strasseri***. Ponadto wyhodowano także grzyby należące do rodzajów: ***Alternaria***, ***Botrytis***, ***Cladosporium***, ***Fusarium***, ***Rhizoctonia*** oraz ***Trichoderma***.

Uzyskane izolaty grzybów włączono do kolekcji kultur Katedry Fitopatologii i Mykologii (obecnie Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii). Przechowywane na odpowiednich, w zależności od gatunku, podłożach standardowych oraz warunkach termicznych, stanowią materiał naukowy oraz dydaktyczny jednostki.

**Ze względu na powszechne występowanie *Boeremia strasseri* na roślinach mięty pieprzowej oraz negatywną rolę grzyba polegającą na degeneracji tkanek łodyg i rozłogów dalsze badania poświęcono temu patogenowi.**

#### **Studia nad *B. strasseri*:**

#### **Biotyczne interakcje *B. strasseri* i innych grzybów zasiedlających rozłogi i łodygi mięty pieprzowej (publikacja 5)**

Mimo powszechnego izolowania kultur *B. strasseri* z porażonych łodyg i rozłogów, stwierdzono występowanie na tych częściach roślin innych grzybów, w tym gatunków znanych z uzdolnień antagonistycznych należących do rodzajów: *Trichoderma*, *Clonostachys* czy *Epicoccum*. Wobec braku w dostępnej literaturze informacji na temat oddziaływania grzybów fylosferowych na *B. strasseri* podjęto badania mające na celu określenie wzajemnych interakcji jakie zachodzą pomiędzy grzybami towarzyszącymi w naturalnym środowisku uprawy oraz wskazanie najefektywniejszych gatunków ograniczających wzrost i rozwój patogena. W badaniach uwzględniono izolat M 435 *B. strasseri* oraz 16 gatunków grzybów wybranych z własnej kolekcji kultur zgromadzonej w latach 2004-2006. Zastosowano metodę szeregów biotycznych (Mańka 1974, Mańka i Mańka 1992, Mańka 1995), którą zaadaptowano do badań grzybów kolonizujących fylosferę roślin (Zimowska 2004, Machowicz-Stefaniak i in. 2008).

Spośród testowanych grzybów 11 z nich ograniczało wzrost *B. strasseri*. Wśród nich najsilniejsze ograniczające działanie objawiające się całkowitym zrośnięciem grzybni oraz degeneracją strzępek i piknidiów patogena obserwowano w przypadku *Trichoderma* spp. Silne uzdolnienia konkurencyjne tych mikroorganizmów wynikające z wytwarzania endo i egzoenzymów, toksycznych metabolitów oraz nadpasożytnictwa są wykorzystywane do ochrony roślin, w tym także roślin zielarskich (Fokkema 1995, Chang i in 2006, Sandoval i in. 2006, Singh i in 2007). Wykazano, że *B. strasseri* wpływał hamująco na wzrost szybko rosnących gatunków z rodzaju *Fusarium*. Może to wskazywać na uzdolnienia konkurencyjne *B. strasseri* w stosunku do *Fusarium* spp., co ma uzasadnienie w intensywnym zarodnikowaniu patogena oraz zdolności do dynamicznego wzrostu. Jest wysoce prawdopodobne, że jeśli zatem dojdzie w warunkach naturalnych do sytuacji, w

której *B. strasseri* dokona pierwotnej infekcji łodyg i rozłogów mięty, fakultatywne patogeny z rodzaju *Fusarium* mogą mieć utrudnioną możliwość nawiązania pasożytniczego kontaktu z tkankami roślin.

**Morfologia, wzrost i rozwój *B. strasseri*, w różnych warunkach hodowli**  
(publikacje 1, 3, 5)

Po raz pierwszy czarną zgniliznę łodyg i rozłogów mięty pieprzowej opisano w 1963 roku w Japonii. Z chorych organów wyizolowano kultury, które wówczas oznaczono jako *Phoma* spp. (Melouk i Horner 1967). Kilka lat później w Stanach Zjednoczonych z roślin mięty wykazujących podobne symptomy chorobowe uzyskano izolaty, które oznaczono jako *Phoma menthae* Strasser (Horner 1971). Najistotniejszy wkład w rozwój badań nad taksonomią rodzaju *Phoma* Sacc. emend. Boerema & G.J. Bollen wnieśli mykolodzy holenderscy. Założeniem ich systemu było określenie taksonu na podstawie stałych cech morfologicznych obserwowanych zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*, w kulturach rozwijających się na trzech standardowych podłożach agarowych, i przyporządkowanie go do jednej z dziewięciu sekcji. Na podstawie przeprowadzonych przez Holendrów badań dotyczących morfologii izolatów otrzymanych od amerykańskich badaczy nadali oni gatunkowi nazwę *Phoma strasseri*, w obrębie sekcji *Phyllostictioides*, z teleomorfa należącą do rodzaju *Didymella* (De Gruyter i in 2002, Boerema i in. 2004). Kontynuowane przez mykologów holenderskich w kolejnych latach badania, wskazały na niejednorodność filogenetyczną gatunków w sekcjach i spowodowały konieczność reklasyfikacji rodzaju *Phoma* (De Gruyter i in. 2009, 2010, 2012, Aveskamp i in. 2010). Wynikiem tych badań było ustanowienie w 2009 roku rodziny *Didymeliaceae*, która skupia większość gatunków *Phoma sensu lato* o podobnym stopniu pokrewieństwa, i obejmuje 17 kładów, których większość obecnie podniesiona jest do rangi rodzaju (Chen i in. 2015). Jednym z nich jest kład *Boeremia* Aveskamp, Gruyter & Verkley, gen. nov., do którego należy *B. strasseri*.

Pomimo reklasyfikacji *Phoma*, sposób ich identyfikacji oparty o badania stałych cech makro i mikroskopowych w stałych warunkach hodowli jest nadal aktualny (Aveskamp i in. 2010, Marcinkowska 2012, Chen i in. 2015).

Niejednoznaczne kryteria morfologiczne oraz pokrewieństwo filogenetyczne sprawiają, że klasyczne metody identyfikacji gatunków należących do rodziny

*Didymellaceae* uwzględniają wiele cech morfologicznych, fizjologicznych, jak również biochemicznych.

W pracy przeprowadzono charakterystykę makroskopową *B. straserii in vivo*, na podstawie oznak etiologicznych obserwowanych na łodygach i rozłogach mięty z symptomami czarnej zgnilizny. W badaniach morfologicznych *in vitro* uwzględniono 6 izolatów grzyba. Każdy z nich hodowano na pożywce maltozowej (MA), owsianej (OA) oraz wiśniowej (CA). Aby uzyskać cechy charakterystyczne, konieczne do prawidłowej identyfikacji, kultury inkubowano przez pierwszy tydzień w ciemności w temp 22°C, następnie 13 godz. w świetle UV oraz 11 godz. w ciemności. Po tym czasie określano cechy makroskopowe kolonii. Po kolejnych 7 dniach inkubacji kultur w ciemności w temp 22°C, na pożywce owsianej określano najważniejsze cechy związane z morfologią piknidiów. Określano ich ułożenie, kształt oraz charakter ujścia, barwę piknidiów oraz kropli wypływu konidiów, a także budowę powierzchni ściany piknidium. zwracano uwagę na obecność chlamydospor. Pomocniczą wartością była też budowa oraz wymiary konidiów. Na pożywce maltozowej i owsianej badano cechy biochemiczne izolatów *B. straserii*, w reakcji z 1N NaOH (publikacja 1).

Obecność piknidiów na porażonych organach mięty, uwalniających krople wydzieliny konidiów w kolorze łososiowo-kremowym uznano za ważną cechę diagnostyczną, świadczącą o obecności patogena w tkankach roślin. W piknidiach *in vivo* oraz *in vitro* tworzyły się głównie konidia 1- komórkowe, ale obserwowano także konidia posiadające wtórną przegrodę. Obserwacje te były zgodne z opisem De Gruytera i in. (2002) oraz Boerema i in. (2004). Cechą charakterystyczną *Phoma sensu lato* jest powstawanie wtórnych sept w konidiach, niezależnie od procesu konidiogenezy, co odróżnia te grzyby od rodzaju *Ascochyta*, u których septa powstaje podczas procesu morfogenezy konidium. Stąd też, pomimo że morfologia zarodników jest ważną cechą taksonomiczną u większości grzybów, w przypadku *Phoma sensu lato* uważana jest za mało informatywną, i stanowi jedynie cechę pomocniczą. Dlatego identyfikacja tych grzybów powinna opierać się zarówno na cechach morfologicznych obserwowanych *in vivo* oraz dokładnej analizie makroskopowej, fizjologicznej i biochemicznej kolonii inkubowanych na podłożach standardowych *in vitro*. Wiadomo bowiem, że grzyby *Phoma sensu lato* mogą wytwarzać barwniki antrachinonowe lub metabolity, które w reakcji z wodorotlenkiem sodu w zależności od podłoża hodowlanego barwią kulturę na różne kolory (Monte i in. 1990; Marcinkowska 1995). W przypadku badanych izolatów *B.*

*strasseri* obserwowano zróżnicowaną reakcję z 1N NaOH. U czterech izolatów kultury zmieniły kolor na zielony, a następnie czerwony, w przypadku pozostałych izolatów reakcja była negatywna. Obserwacje te były zgodne z informacjami podanymi przez De Gruytera i in. (2002), które mówią, że niektóre izolaty *B. strasseri* mogą wytwarzać bezbarwny metabolit „E”, który dyfundując do podłoża w czasie wzrostu kolonii zmienia jej barwę w reakcji z wodorotlenkiem sodu.

Tworzące się licznie na pożywce OA piknidia były nieregularnie rozrzucone na całej powierzchni kolonii, a z brodawkowatych ujść wypływały kremowo-łososiowe krople konidiów. Kształt piknidiów, budowa ściany oraz ich wielkość były zbliżone do piknidiów obserwowanych na łądogach i rozłogach mięty i odpowiadały opisom De Gruytera i in. (2002). Żaden z badanych izolatów grzyba nie tworzył chlamydospor (publikacja 1, 3).

W obecnych badaniach (publikacja 5) ustalono, że wzrost kolonii *B. strasseri* jest możliwy w temperaturze od 5 do 28°C, przy optimum od 16 do 28°C, co dało podstawę do uznania *B. strasseri* za gatunek eurytermiczny (Roustaee i in. 2000), bowiem w przeciwieństwie do organizmów stenotermicznych zakres temperatury w jakim może się rozwijać jest dosyć szeroki. Izolaty grzyba tworzyły materiał infekcyjny w zakresie temperatury od 5 do 28°C, niemniej jednak w temperaturze od 24 do 28°C piknidia tworzyły się już po 4 dniach hodowli, a na 1cm<sup>3</sup> obserwowano od 35 do 50 struktur patogenu, uwalniających krople wydzieliny konidiów. Dlatego też ten zakres temperatury uznano za optimum dla zarodnikowania grzyba. Wykazano ponadto, że temperatura poniżej -5°C nie była zabójcza dla *B. strasseri*, co sugeruje zdolność przeżywania grzybni patogena na porażonych rozłogach i łądogach mięty, na których wczesną wiosną, gdy temperatura osiąga dodatnie wartości tworzą się piknidia, a w nich konidia, które dokonują pierwotnej infekcji zdrowych organów roślin (publikacja 5). Z przeprowadzonych badań wynika, warunki panujące w Polsce podczas wegetacji mięty sprzyjają rozwojowi grzyba i wytwarzaniu przez niego dużej ilości materiału infekcyjnego, co może skutkować dynamicznym rozwojem objawów czarnej zgnilizny łądyg i rozłogów.

#### **Kondiogeneza *B. strasseri* (publikacja 4)**

Zastosowanie nowych technik w badaniach taksonomicznych, a zwłaszcza wykorzystanie mikroskopii elektronowej pozwoliło na przebadanie **procesu kondiogenezy**



*B. strasseri*, jako ważnego kryterium rozwojowego grzyba. Badania te umożliwiły dokładne poznanie budowy oraz typu komórki konidiotwórczej, co jest istotną cechą taksonomiczną w grupie *.Phoma sensu lato* (Brewer i Boerema 1965, Boerema i Bollen 1975).

Kluczowym osiągnięciem tego etapu badań było wykazanie, że konidia *B. strasseri* powstają w procesie enteroblastycznej ontogonii fialidowej. Charakterystycznymi cechami tego procesu, które udokumentowano w przeprowadzonych badaniach, jest tworzenie konidiów na komórkach konidiotwórczych typu fialidy. Rozwój pierwszego konidium jest zapoczątkowany pogrubieniem szczytowej części fialidy, gdzie po oderwaniu pierwszego konidium tworzy się charakterystyczny kołnierzyk, co odróżnia fialidę od annelidy, komórki konidiotwórczej, którą tworzą grzyby z rodzaju *Ascochyta*. Kołnierzyk otaczał punkt konidiotwórczy fialidy, z którego powstawały kolejne konidia. Przeprowadzone badania wskazały na tworzenie podczas enteroblastycznej ontogonii fialidowej substancji śluzowej, która powstawała w końcowym etapie dyferencjacji ściany konidium do jej finalnej struktury. Obecność tej substancji na powierzchni konidiów potwierdziły również późniejsze badania patogeniczności *B. strasseri* oraz ultrastruktury inokulowanych organów mięty.

#### **Testy patogeniczności *B. strasseri* dla łodyg i rozłogów mięty pieprzowej** (publikacja 6)

Wobec powtarzającego się występowania *B. strasseri* na mięcie pieprzowej przebadano uzdolnienia wybranych losowo izolatów grzyba do zakażenia łodyg i rozłogów mięty. W tym celu przeprowadzono testy patogeniczności zgodnie z postulatami Kocha (Agrios 2005) oraz udokumentowano histopatologiczny i ultrastrukturalny aspekt procesu infekcji przy użyciu skaningowego oraz transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

W badaniach wykorzystano **jednozarodnikowe kultury trzech izolatów *B. strasseri* M 126, M 289 i M 743** uzyskane z naturalnie zainfekowanych roślin mięty pieprzowej z objawami czarnej zgnilizny łodyg i rozłogów, pochodzących z plantacji produkcyjnych położonych w Północno-Wschodniej Polsce (Zimowska 2007), oraz **izolat referencyjny CBS. 126.93 otrzymany z Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht Netherlands**. Dla zbadania chorobotwórczych właściwości izolatów wykorzystano trzy metody inokulacji, a efektywność infekcji określano na podstawie opracowanej przez mnie skali porażenia oraz indeksu porażenia.

Najważniejszymi osiągnięciami tego etapu badań było wykazanie dużej zdolności badanych izolatów *B. strasseri* do porażania łądyg i rozłogów mięty pieprzowej, za czym przemawiały wysokie wartości indeksu porażenia oraz spełnienie postulatów Kocha, w tym reizolacji *B. strasseri*. Spośród badanych izolatów najwyższe wartości indeksu porażenia we wszystkich metodach inokulacji uzyskał izolat M 743. Już po 3 dniach od inokulacji, w kombinacji doświadczenia uwzględniającej zranienia tkanki okrywającej, obserwowano symptomy nekrozy i zgnilizny tkanek inokulowanych organów, podobne do objawów tworzących się w warunkach naturalnych (Melouk i Horner 1972ab, Zimowska i Machowicz-Stefaniak 2005, Zimowska 2007). Reizolacja testowanego izolatu wynosiła 100%.

Badania ultrastruktury inokulowanych łądyg i rozłogów mięty zawiesiną infekcyjną zawierającą konidia wykazały, że zarodniki *B. strasseri* kiełkują po 16 godzinach od inokulacji. Po 24 godzinach na końcu strzępki kiełkowej obserwowano struktury adhezyjne w postaci appresorium. Kiełkujące konidia posiadały duże wakuole, co potwierdza ich szczególną rolę w procesie morfogenezy strzępki kiełkowej oraz appresorium. Po 36 godzinach obserwowano bezpośrednią penetrację strzępki infekcyjnej patogena przez epidermę. Wiadomo, że u większości grzybów tworzenie na końcu strzępki kiełkowej appresorium odbywa się w wyniku mechanicznego kontaktu grzyba z podłożem oraz obecnością wosku w kutikuli (Büsgen 1893, Kerchung i Hoch 1995). Tworzenie appresorium stwierdzono u innych gatunków należących do *Didymellaceae* tj.: *P. exigua* var. *linicola* (Roustaee, 2000), *Ascochyta pisi* (Heath i Wood 1969), *A. fabae* (Maurin i in. 1993) i *A. rabiei* (Pandey i in. 1987). W przeprowadzonych badaniach kiełkujące konidia *B. strasseri* były także przytwierdzone do powierzchni łądyg i rozłogów przez substancję śluzową, która pokrywała ścianę konidiów oraz strzępkę kiełkową. Obecność substancji śluzowej obserwowano wcześniej podczas badań nad konidiogenezą *B. strasseri* (publikacja 4). Wiele gatunków grzybów, które dokonują infekcji bezpośrednio przez epidermę tworzą tego typu substancję śluzową. Zaobserwowano ją wcześniej między innymi u *Phyllosticta amplicida* (Kerchung i Hoch 1995), *Phomopsis phaseoli* (Kulik 1988) oraz *Phoma macdonaldii* (Roustaee i in. 2000). Ma ona za zadanie wzmocnienie kontaktu z rośliną żywicielską. Ponadto uszczelnia miejsce wnikania strzępki infekcyjnej oraz ochrania appresorium przed wysychaniem i niekorzystnymi warunkami atmosferycznymi (Roustaee i in. 2000). Przeprowadzone badania wskazały na bezpośrednią penetrację *B. strasseri* przez epidermę łądyg i rozłogów mięty z pominięciem aparatów szparkowych. Większość grzybów wnika do tkanek swoich żywicieli w taki sposób. Takiemu modelowi infekcji najczęściej towarzyszy



tworzenie appresorium (Kulik 1988). Bezpośrednią penetrację tkanek zaobserwowano między innymi u *Phomopsis scabra* (Ammon i Vann 1994), *Colletotrichum lagenarium* (Bonnen i Hammerschmidt 1989) oraz u *C. gloeosporioides* (Dickman i in. 1982). Wiadomo, że bezpośrednie wnikanie grzybów patogenicznych następuje w wyniku współdziałania dwóch czynników, nacisku szybko rosnącej strzępki infekcyjnej oraz enzymów rozkładających kutynę a następnie związki pektynowe i celulozę wchodzące w skład ściany komórkowej (Isaac 1992). W przypadku *B. strasseri* w procesie czynnego wnikania z pewnością udział biorą enzymy pektolityczne wytwarzane przez patogena. Udział enzymów pektolitycznych i hemicelulolitycznych w procesie penetracji tkanek zaobserwowano m.in. u *P. lingam* (Hammond i in. 1985).

Przeprowadzone badania histopatologiczne wykazały, że po 48 godzinach podzielone przegrodami poprzecznymi strzępki *B. strasseri* widoczne były w komórkach epidermy, co może wskazywać na krótki okres inkubacji patogena. Przemawia za tym również fakt obserwowania już po 3 dniach pierwszych objawów chorobowych na inokulowanych organach mięty.

#### **Badania biochemiczne nad aktywnością enzymów pektynolitycznych *B. strasseri*** (publikacja 7).

Spośród wielu związków wytwarzanych przez patogeniczne gatunki należące do grupy *Phoma sensu lato*, enzymy odgrywają zasadniczą rolę w procesie patogenezы (Okafar i in. 2010). Działają jak katalizatory reakcji rozkładu struktur roślinnych, a tym samym ułatwiają proces infekcji oraz kolonizacji tkanek gospodarza. W obydwu tych procesach najistotniejszymi barierami do pokonania są związki pektynowe budujące ściany komórek oraz blaszkę środkową (Gummadi i Panda 2003).

Dotychczasowa wiedza dotycząca charakterystyki enzymów produkowanych przez *B. strasseri*, które są odpowiedzialne za macerację tkanek łądyg i rozłógów mięty dotyczyła głównie  $\beta$ -glukozydazy, enzymu, który katalizuje reakcje rozkładu celobiozy do glukozy. Melouk i Horner (1973) wskazali na udział  $\beta$ -glukozydazy oraz enzymów pektynolitycznych w procesie patogenezы *B. strasseri*, oraz wykazali, że optymalne pH dla aktywności  $\beta$ -glukozydazy mieści się w zakresie od 4,5 do 5,5. Nie znaleziono natomiast w dostępnej literaturze informacji na temat charakterystyki enzymów pektynolitycznych.

Celem niniejszych badań było określenie aktywności pektynolitycznej trzech izolatów *B. strasseri*, które wcześniej uwzględniono w testach patogeniczności (publikacja 6) oraz wskazanie optymalnego pH dla maksymalnej aktywności enzymów oraz określenie ich termostabilności. Badania te prowadziłam w ramach stażu naukowego, w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii UP w Lublinie, pod naukowym kierunkiem **Prof. dr hab. Zdzisława Targońskiego**.

W celu wyekstrahowania enzymów pektynolitycznych, jednozarodnikowe kultury izolatów M 126, M 289 i M 743 *B. strasseri*, hodowano na pożywce Mendels Weber (1969), zawierającej 1% pektyny cytrynowej jako źródło węgla. W filtratach pochodowlanych mierzono aktywność enzymatyczną. W tym celu wykonano 1% roztwór pektyny w buforze octanowym 0,1 M o pH 5, do którego dodawano 1 ml filtratu pochodowlanego. Po 1 godzinnej inkubacji w temp 40°C i dodaniu kwasu 3,5 dinitrosalicylowego, oznaczano ekstynkcję roztworów przy długości fali 550 nm wobec próby odczynnikowej w spektrofotometrze, po czym wykresłano krzywą wzorcową obrazującą zależność ekstynkcji od stężenia glukozy w mg/ml. Ilość uwalnianego cukru redukującego określono przy użyciu kwasu galakturonowego. Aktywność enzymatyczną obliczono jako ilość enzymów potrzebnych do uwolnienia jednego mikromola odpowiednika kwasu galakturonowego na minutę w specyficznych warunkach reakcji (Miller 1959). Optymalne pH dla maksymalnej aktywności enzymów określano mierząc aktywność w obecności 0,1 M buforu octanowego o wartościach pH od 2 do 7,5. Termostabilność pektynaz badano przez ogrzewanie enzymów w temperaturze: 30, 40, 50, 60 i 70°C przez 40, 50, 60, 70 i 80 min.

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowaną aktywność enzymatyczną badanych izolatów *B. strasseri*, przy czym najwyższą aktywność pektynolityczną wykazał izolat M 743, który w testach patogeniczności uzyskał najwyższe wartości indeksu porażenia (publikacja 6). Wysoki poziom patogeniczności tego izolatu, który determinuje szybsze opanowanie tkanek łądyg i rozłógów mięty ma niewątpliwie związek z jego zdolnością do wytwarzania enzymów zewnątrzkomórkowych, których wysoka aktywność powoduje szybszą hydrolizę pektyn co prowadzi do maceracji tkanek żywiciela.

Uzyskane wyniki wskazały, że aktywność pektynolityczna enzymów wzrastała wraz ze wzrostem pH do momentu osiągnięcia wartości optymalnej na poziomie pH 4,7, natomiast ich termostabilność utrzymywała się w szerokim zakresie temperatury od 30 do 70°C, przy czym najwyższą aktywność enzymów zaobserwowano w temperaturze 40°C.

**Badania genetyczne *B. strasseri* (publikacja 9)**

Rodzina *Didymellaceae* została utworzona w 2009 roku, aby skupić większość gatunków *Phoma sensu lato* oraz innych pokrewnych rodzajów (De Gruyter i in. 2009, Aveskamp i in. 2010). Mykolodzy holenderscy w swoich badaniach nie pominęli kryterium cech morfologicznych, jednak okazały się one nie wystarczające do wykazania różnic pomiędzy gatunkami. Do określenia filogenetycznych relacji pomiędzy gatunkami zastosowali oni analizę sekwencji rybosomalnych i białkowych ponad 300 szczepów zdeponowanych w bazie genów GenBank. Celem ich badań było również opracowanie uniwersalnego barkodu, który pozwoliłby na szybką identyfikację gatunków, szczególnie gatunków patogenicznych, w tym organizmów kwarantannowych (Armstrong i Ball 2005).

Celem niniejszych badań była charakterystyka genetyczna jednodrobnikowych kultur 22 izolatów *B. strasseri* uzyskanych z mięty pieprzowej z różnych rejonów uprawy tej rośliny oraz 2 izolatów *Boeremia* spp. uzyskanych z innych roślin z rodziny *Lamiaceae*. W badaniach wykorzystano technikę RAPD-PCR. Porównano otrzymane sekwencje nukleotydów rDNA do sekwencji innych 20 szczepów *Boeremia* spp. dostępnych w bazie danych oraz wskazano najbardziej efektywny barkod do różnicowania *B. strasseri*.

Izolację DNA przeprowadzono przy użyciu gotowego zestawu do izolacji i oczyszczania DNA Invisorb Spin Plant Midi Kit (Strattec Molecular), zgodnie z powszechnie stosowaną procedurą. Analizę filogenetyczną badanych izolatów przeprowadzono metodą UPGMA oraz PCA (Hammer i in. 2001). Pozwoliły one na wydzielenie dwu grup podobieństwa. W pierwszej grupie znalazły się wszystkie izolaty *B. strasseri*, natomiast w drugiej 2 izolaty *Boeremia* spp. wyizolowane z melisy lekarskiej i serdecznika pospolitego.

Uzyskane sekwencje nukleotydowe własnych izolatów porównywano do sekwencji wybranych szczepów referencyjnych innych gatunków *Boeremia* spp., w tym dwóch szczepów referencyjnych *B. strasseri*, dostępnych w NCBI GenBank. Badania te przeprowadzono przy zastosowaniu algorytmu BLAST dostępnego w serwisie <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Altschul i in. 1997).

Przeprowadzona analiza sekwencji nukleotydów regionów rDNA ITS1 i ITS2 okazała się nie wystarczająca, bowiem wskazała na podobieństwo sekwencji regionów rodzimych izolatów z sekwencjami gatunków *Boeremia diversispora* i *Boeremia crinicola* występujących na odległych botanicznie od *Lamiaceae* gatunkach roślin. Podobnie

MacDonald i in (2000) oraz Cullen i in (2007) wskazali na nieprzydatność regionów ITS do różnicowania taksonów w obrębie gatunków kompleksu *Boeremia exigua*.

Najbardziej efektywnym w odróżnieniu rodzimych sekwencji izolatów od sekwencji szczepów referencyjnych okazał się barkod aktyny, bowiem w wyniku analizy filogenetycznej, tylko w przypadku tego regionu, sekwencje rodzimych izolatów *B. strasseri* znajdowały się w jednej grupie ze szczepami referencyjnymi *B. strasseri* i były oddzielone od szczepów referencyjnych innych gatunków *Boeremia* spp. Sekwencje dwóch rodzimych izolatów otrzymanych z melisy lekarskiej i serdecznika pospolitego znalazły się w grupie ze szczepami referencyjnymi *B. exigua* var. *exigua*. Fakt ten pozwolił na uznanie tych izolatów jako gatunek *B. exigua* var. *exigua*. Takie same wnioski wyciągnęli Aveskamp i in. (2009), którzy uznali barkod aktyny, za jedyny, który jest w stanie zróżnicować taksony w obrębie kompleksu gatunków *Boeremia exigua*

Otrzymane 88 sekwencje nukleotydowe badanych 22 izolatów *B. strasseri* oraz 8 sekwencji 2 izolatów *B. exigua* var. *exigua* zamieszczono w bazie danych GenBank

#### **Możliwości ograniczania wzrostu i rozwoju *B. strasseri* (publikacja 8)**

Wobec dużej szkodliwości oraz stwierdzonej powszechnej obecności *B. strasseri* na plantacjach mięty pieprzowej w Polsce podjęto badania nad możliwością ograniczania wzrostu i rozwoju patogena.

Celem badań było poznanie *in vitro* oddziaływania trzech preparatów pochodzenia naturalnego tj. Biosept Active, Beta-chikol i Bioczos, uważane za substancje podstawowe przydatne w integrowanej ochronie roślin (Dz. Urz. UE L309 z 24.11.2009) oraz 8 fungicydów, reprezentujących różne mechanizmy działania na *B. strasseri* M 365. Zastosowano metodę zatruwania podłoża, opisaną wcześniej w pracy Zimowskiej (2006).

Za kryterium oceny przyjęto procent zahamowania wzrostu kolonii *B. strasseri* oraz zmiany w budowie struktur morfologicznych grzyba oraz wyglądzie makroskopowym kolonii.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że spośród preparatów naturalnego pochodzenia najsilniejsze właściwości inhibicyjne wykazywał Beta-chikol. W najwyższym stężeniu powodował całkowite zahamowanie wzrostu kolonii patogena. Biorąc pod uwagę, że zawarty w preparacie chitozan oprócz bezpośredniego oddziaływania na patogeny jest także zdolny do indukowania szeregu reakcji obronnych w roślinie (Pięta i in. 2001, Maćkowiak i

Pospieszny 2002), Beta-chikol może być pożądanym preparatem do ochrony mięty pieprzowej przed *B. strasseri*. Skuteczność Biosept Active wzrastała nieznacznie wraz ze wzrostem zawartości s.a w podłożu. Ponadto zaobserwowano zmiany w budowie makro-mikroskopowej patogena w obecności s.a. wyżej wymienionych preparatów, które przejawiały się bardziej zbitą grzybnią powietrzną oraz brakiem piknidiów grzyba. Najmniej skutecznym preparatem okazał się Bioczos.

Wykazano, że wzrost i rozwój patogena hamowały najsilniej fungicydy. Spośród ośmiu związków należących do odrębnych grup chemicznych, trifloksystrobina, tiofanat metylu i mankozeb wykazywały właściwości fungicydalne, wyrażające się degeneracją piknidiów, utratą żywotności zarodników i grzybni *B. strasseri*. Trifloksystrobina należąca do grupy fungicydów strobilurynowych charakteryzuje się zdolnością do ograniczania wzrostu szerokiego spektrum patogenów, w tym patogenów porażających rośliny zielarskie (Machowicz-Stefaniak i Zalewska 2011; Zalewska 2016). Wykazana w przeprowadzonych badaniach wysoka aktywność grzybobójcza tiofanatu metylu i mankozebu dla *B. strasseri* była również wcześniej obserwowana w przypadku innych grzybów patogenicznych dla ziół, tj. *Alternaria alternata*, *Phoma anethi* czy *Seimatosporium hypericinum* (Zimowska 2006, Mačkinaitė 2012).

### Podsumowanie wyników dokumentujących osiągnięcie naukowe

- Przeprowadzone badania wykazały występowanie symptomów chorobowych na roślinach mięty pieprzowej w badanych warunkach uprawy roślin. Powodowały je grzyby *Micromycetes*, o zróżnicowanym składzie gatunkowym i fakultatywnym charakterze pasożytnictwa.
- Zdiagnozowano liczne gatunki patogenicznych grzybów, w tym nowy, nie opisywany dotychczas w Polsce gatunek *Boeremia strasseri*.
- Za najgroźniejszą i najpowszechniej występującą chorobę uznano czarną zgniliznę łodyg i rozłogów mięty, zwaną powszechnie fomozą mięty, powodowaną przez *B. strasseri* (Basionym: *Phoma strasseri*).
- W warunkach Polski występowanie choroby związane jest z rozprzestrzenianiem patogena przez porażone rozłogi, które pełnią rolę materiału rozmnożeniowego i stanowią najpoważniejsze źródło infekcji pierwotnej dla nowych roślin na

- plantacjach mięty pieprzowej. Źródłem infekcji może być również grzybnia przeżywająca na dolnych częściach roślin dwuletnich.
- Symptomami rozpoznawczymi choroby jest początkowo nekroza, a następnie zgnilizna rozłogów i podstawy łodyg oraz redukcja i czerwienienie liści mięty. Na porażonych organach występują oznaki etiologiczne w postaci piknidiów z wydzieloną zarodników konidialnych.
  - Testy patogeniczności potwierdziły chorobotwórcze uzdolnienia *B. strasseri*, a badania ultrastrukturalne wskazały na infekcję czynną, tworzenie appresorium na końcu strzępki kiełkowej i krótki okres inkubacji patogena.
  - We wstępnym etapie infekcji *B. strasseri* istotną rolę odgrywa śluzowa substancja, która tworzy się podczas procesu konidiogenezy w końcowym etapie dyferencjacji ściany konidium do jej finalnej struktury. Dzięki niej zarodnik zostaje przytwierdzony do powierzchni tkanki łodyg i rozłogów mięty, dzięki czemu może dojść do udanej infekcji.
  - W procesie patogenezы udział biorą enzymy pektynolityczne, które rozkładają pektynę, prowadząc do dezintegracji i maceracji komórek tkanki mięksiszowej łodyg i rozłogów mięty.
  - Uzyskane wyniki wykazały, że enzymy pektynolityczne *B. strasseri* wykazują największą aktywność w temperaturze powyżej 30°C, co w połączeniu z eurytermicznym charakterem grzyba sugeruje, że z nasilonym występowaniem czarnej zgnilizny łodyg i rozłogów należy się liczyć podczas gorących okresów wegetacji.
  - Wykazano, że identyfikację *B. strasseri* w sytuacji istnienia licznych niewyspecjalizowanych taksonów *Phoma sensu lato*, które mogą zasiedlać rośliny mięty, jest możliwe jedynie przy uwzględnieniu zarówno metod klasycznych, obejmujących morfologię *in vivo* oraz *in vitro*, cechy fizjologiczne i biochemiczne oraz typ konidiogenezy, jak również metod molekularnych.
  - Przeprowadzone badania wskazały, że *B. strasseri* jest grzybem szybko rosnącym, o dość dużych uzdolnieniach konkurencyjnych, które mogą mu ułatwiać szybkie kolonizowanie tkanek rośliny gospodarza.
  - Stwierdzono, że w populacji mikroorganizmów fylosferowych oraz ryzosferowych mięty znajdują się inne gatunki *Phoma sensu lato* (*Didymellaceae*).



- Do grzybów obniżających jakość surowca należały również: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cylindrocarpon* spp. *Fusarium* spp. i *Rhizoctonia solani*.
- Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność metody molekularnej, która potwierdziła przeprowadzoną identyfikację *B. strasseri* metodami klasycznymi, i podobieństwo rodzimych izolatów do dwóch szczepów referencyjnych *B. strasseri* z bazy danych CBS.
- Najbardziej efektywnym barkodem w odróżnianiu sekwencji nukleotydowych rodzimych izolatów *B. strasseri* oraz dwóch izolatów *Boeremia exigua* var. *exigua* od sekwencji 20 szczepów referencyjnych innych gatunków *Boeremia* spp., zdeponowanych w bazie danych GenBank, okazała się aktyna (*act*).
- Spośród badanych preparatów naturalnego pochodzenia Beta-chikol, w warunkach *in vitro* wykazywał największą efektywność w ograniczaniu wzrostu i rozwoju *B. strasseri*, natomiast z fungicydów Zato 500 WG, Topsin M 500 S.C. oraz Dithane NeoTec 75 WG.

### Najważniejsze osiągnięcia

#### a) Dla nauki światowej

- Wzbogacenie bazy danych GenBank o 88 sekwencji nukleotydowych *B. strasseri* oraz 8 sekwencji *B. exigua* var. *exigua* z nowych gatunków roślin z rodziny *Lamiaceae*.
- Udokumentowanie, że najbardziej efektywnym barkodem w różnicowaniu gatunków *B. strasseri* i *B. exigua* var. *exigua* jest aktyna (*act*).

#### b) Nowatorskie dla nauki w Polsce

- Opisanie nowego, nie notowanego dotychczas w Polsce gatunku *Boeremia strasseri*, patogenicznego dla mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.).
- Udokumentowanie powszechnego porażania rozłogów przez *B. strasseri*, i wskazanie na istotną rolę tych części roślin jako najgroźniejszego źródła infekcji pierwotnej roślin mięty pieprzowej.

- Wykazanie po raz pierwszy bardzo silnej aktywności antagonistycznej **B. strasseri**, dzięki czemu grzyb skutecznie opanowuje nisze ekologiczne i staje się dominującym składnikiem grzybów fyloferowych w uprawie mięty pieprzowej.
- Udokumentowanie pod mikroskopem elektronowym możliwości **B. strasseri** do czynnej infekcji łodyg i rozłogów mięty pieprzowej bezpośrednio przez epidermę, tworzenia struktury adhezyjnej na końcu strzępki kiełkowej oraz krótkiego okresu inkubacji patogena.
- Wykazanie, że patogeniczność **B. strasseri** jest właściwością szczepu, która jest skorelowana z aktywnością enzymów pektynolitycznych grzyba.
- Wykazanie, że wobec dużego podobieństwa cech morfologicznych taksonów należących do *Phoma sensu lato (Didymellaceae)*, do poprawnej identyfikacji tych grzybów konieczne jest uzupełnienie metod klasycznych o badania biochemiczne, fizjologiczne oraz badania procesu konidiogenezy.

### c) Nowatorskie dla praktyki

- Wykrycie oraz kompleksowe opracowanie symptomatologii i etiologii czarnej zgnilizny łodyg i rozłogów mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.), umożliwiające wstępne diagnozowanie choroby na plantacjach.
- Ustalenie, że czarna zgnilizna łodyg i rozłogów mięty pieprzowej zagraża roślinom podczas gorących okresów wegetacji.
- Wobec ustalenia, że najgroźniejszym źródłem infekcji pierwotnej **B. strasseri** są rozłogi mięty pieprzowej, stosowanie zdrowych sadzonek należy uznać za podstawowy wymóg ograniczający rozprzestrzenianie czarnej zgnilizny łodyg i rozłogów.
- W aspekcie ograniczania wzrostu i rozwoju **B. strasseri** najbardziej przydatny może być Beta-chikol.

### Literatura

1. Ammon, V., Vann S.R. (1994). Scanning electron microscopy of sycamore pathogens on inoculated leaves. Tech. Bull. Miss. Agric. For. Exp. Station 196: 6.
2. Altschul, S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389–3402.



- 3 Armstrong, K.F., Ball, S.L. (2005). DNA Barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360: 1813–1823.
- 4 Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H.C., de Gruyter, J., Turco, E., Groenewald, J.Z., Crous, P. W., (2009). Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): a case study in the *Phoma exigua* species complex. *Molecular Plant Pathology* 10: 403–414.
- 5 Aveskamp, M.M., de Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Varkley, G.J.M., Crous, P.W., (2010). Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65: 1–60.
- 6 Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology Fifth Edition*. Elsevier Academic Press. 922 pp.
- 7 Boerema, G.H., Bollen, G.J. (1975). Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. *Persoonia* 8: 111-144.
- 8 Boerema, G.H, de Gruyter, J., Noordeloos, M.E., Hamers, M.E.C. (2004). *Phoma* identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- 9 Bonnen A.M. and Hammerschmidt R. (1989). Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 463-474.
- 10 Brewer, J.G., Boerema, G.H. (1965). Electron microscope observations on the development of pycnidiospores in *Phoma* and *Ascochyta* spp. *Proc. K. Ned. Akad. Wet., Sect. C* 68: 86-97.
- 11 Büsgen, M. (1893). On some properties of the sporelings of parasitic fungi. *Bot. Z.* 51: 53-72.
- 12 Carrubba, A., Lo Verde, G., Salamone A. (2015). Sustainable weed, disease and pest management in medicinal and aromatic plants. Chapter 11. A. Máthé (ed.), *Medicinal and Aromatic Plants of the World*, DOI 10.1007/978-94-017-9810-5\_11
- 13 Carruba, A., Catalano, C. (2009) Essential oil crops for sustainable agriculture – a review. In: Lichtfouse E (ed) *Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms*. Springer, Dijon., pp 137-188.
- 14 Chang, K., Hwang, S., Wang, H., Turnbull, G., Howard, R. (2006). Etiology and biological control of sclerotinia blight of coneflower using *Trichoderma* species. *Plant Pathology Journal.* 5 (1), 15-19.
- 15 Chen, Q., Zhang, K., Zhang, G.Z., Cai, L., (2015). A polyphasic approach to characterize two novel species of *Phoma* (*Didymellaceae*) from China. *Phytotaxa* 197: 267–281.
- 16 Cullen, D.W., Toth, I.K., Boonham, N., Walsh, K., Barker, I., Lees, A.K. (2007). Development and validation of conventional and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of storage rot potato pathogens, *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum*, *Phoma foveata*. *Journal of Phytopathology* 155: 309–315
- 17 Dickman, M.B., Patil, S.S., Kolattukudy, P.B. (1982). Purification and characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* on *Carica papaya*. *Physiol. Plant Pathol.*, 20: 333-347.
- 18 De Gruyter, J., Boerema, G.H., van der Aa, H.A. (2002). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) VI – 2. Section *Phyllostictoides*: outline of its taxa. *Persoonia* 18: 1–53.
- 19 De Gruyter, J., Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2009). Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research* 113:508–519
- 20 De Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2010). Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia* 102: 1066–1081.

- 21 De Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2012). Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales*. *Studies in Mycology* 75: 1–36.
- 22 Dz. Urz. UE L309 z 24.11.2009- Substancje podstawowe to substancje czynne, które zgodnie z art. 23 ust. 1 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady Nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r., dotyczącego wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylającego dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG.
- 23 Fokkema, N.J. (1995). Strategies for biocontrol of foliar fungus diseases. [In:] M. Mańka (ed.), *Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Conference of European Foundation for Plant Pathology*. Poznań, Poland, September 5-9, 1994. Polish Phytopathology Society, 69-79, Poznań.
- 24 Gummadi, S.N., Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. *Process Biochem*; 38: 987-996.
- 25 Hammond, K.E., Lewis B.J., Musa T.M. (1985). A systemic pathway in the infection of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.*, 34: 557-565.
- 26 Hammer, Q., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9.
- 27 Heath, M.C., Wood, R.K.S., (1969). Leaf spots induced by *Ascochyta pisi* and *Mycosphaerella pinnodes*. *Ann. Bot.*, 33: 657-670.
- 28 Horner, C.E. (1971). Rhizome and stem rot of peppermint caused by *Phoma strasserii*. *Plant Disease Reporter*, 55: 814-816.
- 29 Isaac, S. (1992). *Fungal-Plant Interactions*. Chapman and Hall, London.
- 30 Kalra, A., Singh, H.B., Pandey, R., Samad, A., Patra, N.K., Kumar, S. (2004). Diseases in mint: causa organisms, distribution and control measures. *J. Herbs Spices Med. Plants*. 11, 71-91.
- 31 Kerchung, K., Hoch, H.C. (1995). Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings and appressoria of *Phylosticta amplicida*. *Mycologia* 87: 759-771.
- 32 Kulik, M.M. (1988). Observation by scanning electron and bright-field microscopy on the mode of penetration of soybean seedlings by *Phomopsis phaseoli*. *Plant Dis.* 72: 115-118.
- 33 Lövenstein H., Lantinga E.A., Rabbinge R., Van Keulen H. (1993). Principles of production ecology. TPE-WAU, Wageningen, p 118.
- 34 Mačkinaitė, R. (2012). Potential pathogens of common caraway (*Carum carvi* L.) seeds and search for measures suppressing their spread. *Žemdirbystė=Agriculture*, 9, 179-188.
- 35 Maćkowiak, A., Pospieszny, H. (2002). Dependence of antibacterial activity of chitosan on plant species. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. Polish Chitin Society, Łódź, Monograph vol. VIII: 155-160.
- 36 Mańka, K. (1974). Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska glebowego na choroby roślin. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 160, 9-23.
- 37 Mańka, M. (1995). Non-pathogenic soil fungi reflecting soil environment. In: Mańka M. (ed.) *Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Conference of European Foundation for Plant Pathology*. Poznań, Poland, 5-9 September, 1994, 27-36.
- 38 Mańka, K., Mańka, M. (1992). A new method for evaluating interaction between soil inhabiting fungi and plant pathogens. *IOBC/WPRS Bull.*, 16, 45-52.
- 39 Marcinkowska, J. (1995). Nowoczesne spojrzenie na systematykę rodzaju *Phoma*. *Wiadomości Botaniczne* 39 : 47-52.
- 40 Marcinkowska, J. (2012). Oznaczanie rodzajów grzybów *sensu lato* ważnych w fitopatologii. *PWRiL*, 508 pp.

- 41 Máthé, A. (2015). Medicinal and Aromatic Plants of the World. Scientific, Production, Commercial and Utilization Aspects. Springer, 460 pp.
- 42 Machowicz-Stefaniak, Z., Zimowska, B. (1998). Grzyby zasiedlające nasiona niektórych roślin zielarskich. Zeszyty Naukowe AR w Krakowie, 57 (1): 187-190.
- 43 Machowicz-Stefaniak, Z., Zimowska, B. (2000). Grzyby przenoszone przez materiał siewny roślin zielarskich. Acta Agrobot., 53 (2): 25-38.
- 44 Machowicz-Stefaniak, Z., Zimowska, B., Zalewska, E. (2002). Grzyby zasiedlające różne organy tymianku właściwego *Thymus vulgaris* L. uprawianego na Lubelszczyźnie. Acta Agrobot., 55 (1): 185-197.
- 45 Machowicz-Stefaniak, Z., Zalewska, E., Król, E. (2008). Biotic effect of caraway phyllosphere fungi on the pathogenic fungus *Septoria carvi* Syd. Herba Pol., 54, 3, 70-80.
- 46 Machowicz-Stefaniak, Z., Zalewska, E. (2011). Occurrence of *Colletotrichum dematium* on selected herbs species and preparations inhabiting pathogen's growth and development in vitro. Ecol. Chem. Eng. S., 18, 465-478.
- 47 Maurin, N., Gouuret, J.P., Tivoli, B. (1993). Histopatology of the interaction between *Ascochyta fabae* and *Vicia fabae*: Comparison of susceptible and resistant reactions. Agronomie 13: 921-927.
44. Macdonald, J.E., White, G.P., Côté, M.J. (2000). Differentiation of *Phoma foveata* from *Ph. exigua* using a RAPD generated PCR-RFLP marker. European Journal of Plant Pathology 106: 67-75.
- 45 Melouk, H.A., Horner, C.E. (1967). A disease of peppermint caused by *Phoma menthae*. Phytopathology, 57: 1007.
- 46 Melouk, H.A., Horner, C.E. (1972a). Production of pectolytic and macerating enzyme by *Phoma strasseri*. Can. J. Microbiol. 18: 1065-1072.
- 47 Melouk, H.A., Horner, C.E. (1972b). Growth in culture and pathogenicity of *Phoma strasseri* to peppermint. Phytopathology, 62: 575-576.
- 48 Melouk, H.A., Horner, C.E. (1973).  $\beta$ -glucosidase from *Phoma strasseri* and its possible role in a disease of peppermint. Phytopathology; 63: 973-975.
- 49 Mendels, M., Weber, J. (1969). The production of cellulose [in:] Cellulase and their application. Adv. Chem. Ser.; 95: 391-413.
- 50 Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem.; 31: 426-428.
- 51 Monte, E., Bridge, P.D., Sutton, B.C. (1990). Physiological and biochemical studies in *Coelomycetes. Phoma*. Studies in Mycology 32: 21-28.
- 52 Okafar, U.A., Okachi, V.I., Chinedu, S.N., Ebuehi, O.A.T., Onyegeme-Okerenta, B.M. (2010). Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungi fermented on agro-wastes. Afr. J. Microbiol. Res.; 24: 2729-2734.
- 53 Olewnicki, D., Jabłońska, L., Orliński, P., Gontar, Ł. (2015). Zmiany w krajowej produkcji zielarskiej I wybranych rodzajach przetwórstwa roślin zielarskich w kontekście globalnego wzrostu popytu na te produkty. Zasz Nauk SGGW w Warszawie Problemy Rolnictwa Światowego 15 (XXX), 1:68-76.
- 54 Pięta, D., Pastucha, A., Struszczyk H. (2001). Efficiency of chitosan in limiting fungi pathogenic for runner bean. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. Polish Chitin Society, Łódź, Monograph vol. VII: 73-78.
- 55 Pandey, B.K., Singh, U.S. Chaube, S.H. (1987). Mode of infection of *Ascochyta* blight of chickpea caused by *Ascochyta rabiei*. J. Phytopathol., 119: 88-93.
- 56 Roustae, A., Dechamp-Guillaume, G., Gelie, B., Savy, C., Dargent, R. and Barrault, G. (2000). Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. Phytopathology 90: 915-920.

- 57 Seidler-Łożykowska, K. (2009): Hodowla i odmiany roślin zielarskich. Hodowla Roślin i Nasiennictwo, 3:16-20.
- 58 Sandoval, M.C., Falico, L.M., Noeling, M.C., Corcuera, V.R., Cid, P., Raggio, G. (2006). Control strategy of *Alternaria alternata* Keissler pathogen of *Coriandrum sativum* L. with *Trichoderma harzianum* Rifai. Revista de Proteccion Vegetal 21(1), 31-36.
- 59 Singh, H.B., Srivastava, S., Singh, A., Katiyar, R.S. (2007). Field efficacy of *Trichoderma harzianum* application on wilt disease of cumin caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini*. J. Biol. Control. 21 (2), 317-319.
- 60 Takashi, T., Yoshiaki, H., Kazuya, A., Kouhei, O., Motoichiro, K., Yasunori, A., Mayumi, E., Mikihiro Y., Hiroshi, O. (2013) Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. FEMS Microbiol Rev 37 44–66.
- 61 WHO. (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plant. World Health Organization, Geneva.
- 62 Zalewska, E. (2016). Harmfulness of *Septoria carvi* Syd. Towards caraway and preparations limiting occurrence of fungus. Ecol. Chem. Eng. S.,2, 333-346.
- 63 Zechini, A., D'auerio, Zambonelli, A., Bianchi, A., Albasini, A. (1995). Micro morphological and chemical investigation into the effects of fungal diseases on *Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita* L., *Salvia officinalis* L. Phytopathology 143, 179-183.
- 64 Zimowska, B. (2004). Studies on the pathogenicity of *Seimatosporium hypericinum* (Ces.) Sutton for the leaves, stems and seeds of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). Herba Pol., 50: 145-151.
- 65 Zimowska, B. (2006). Impact of some fungicides on growth and development of morphological structures of *Seimatosporium hypericinum* (Ces.) Sutton *in vitro*. Herba Pol., 52 (1/2): 31-37.
- 66 Zimowska, B. (2007). New *Phoma* species on *Leonurus cardiaca*. Acta Mycol., 42 (1): 119-123.
- 67 Zimowska, B., Machowicz-Stefaniak, Z. (2005). Charakterystyka izolatów nie notowanego dotychczas patogena mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.). Acta Agrobot., 58 (2): 151-162.
- 68 Zimowska, B., Machowicz-Stefaniak, Z. (2004). Grzyby zagrażające uprawie dziurawca zwyczajnego *Hypericum perforatum* L. w województwie lubelskim. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 3 (1): 61-74.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH

Studia wyższe ukończyłam w 1996 roku. Pracę magisterską wykonywałam w Katedrze Kwarantanny i Ochrony Roślin, pod kierunkiem **Prof. dr hab. Antoniego Filipowicza**. Praca dotyczyła podatności odmian i rodów hodowlanych bobiku na grzyby chorobotwórcze.

Działalność naukową rozpoczęłam w 1996 roku wraz z podjęciem zatrudnienia na stanowisku **asystenta na czas określony**, od 1997 roku na stanowisku **asystenta na czas nieokreślony**, a od 1.X.2003 roku **adiunkta** w Katedrze Fitopatologii i Mykologii UP w Lublinie (obecnie Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii).

Od początku mojej pracy zawodowej uczestniczyłam w wykonywaniu tematów badawczych kierowanych przez **Prof. dr hab. Zofię Machowicz-Stefaniak**, co umożliwiło mi zapoznanie się metodami stosowanymi a laboratoryjnych, fitotronowych i polowych badaniach z zakresu fitopatologii.

Pierwsze badania, w których brałam udział dotyczyły oddziaływania fungicydów na grzyby patogeniczne dla leszczyny. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w publikacji której jestem współautorem (załącznik nr 3, publikacja 2.1.1). oraz na Sympozjum naukowym w Poznaniu w 1998 roku (załącznik nr 3, publikacja 4.1.1).

**W latach 1997-1999 uczestniczyłam** w badaniach, których celem było określenie zróżnicowania gatunkowego **grzybów zasiedlających materiał siewny 33 gatunków roślin zielarskich**. Wykazano powszechną kontaminację powierzchni nasion oraz zasiedlanie ich wewnętrznych tkanek przez kompleks grzybów *Phoma sensu lato*, *Fusarium* spp. *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. oraz *Penicillium* spp. W ramach tych badań po raz pierwszy miałam kontakt z identyfikacją grzybów *Phoma sensu lato*, co wpłynęło na moje duże zainteresowanie tymi mikroorganizmami i miało wyraz w szkoleniu jakie odbyłam w 2000 roku na SGGW w Warszawie, pod kierunkiem **Prof. dr hab. Joanny Marcinkowskiej** nt. „Zasady oznaczania gatunków grzybów z rodzaju *Phoma*” (załącznik nr. 4).

Istotnym osiągnięciem było wyizolowanie z wewnętrznych tkanek nasion gatunków obniżających zdolność kiełkowania nasion oraz powodujących objawy zgorzeli przedwzrostowej i powzrostowej siewek tj.: *B. cinerea*, *Boeremia exigua* var. *exigua* (Basionym *Phoma exigua* var. *exigua*), *Phoma eupatorii* Died. czy *Fusarium* spp. Zwrócono uwagę na istotną rolę materiału siewnego ziół jako źródła infekcji pierwotnej dla następnego pokolenia roślin. Wyniki powyższego cyklu badań posłużyły do opracowania dwóch oryginalnych publikacji naukowych, w których jestem współautorem (załącznik nr 3, publikacje 2.1.2, 2.1.3) oraz były prezentowane na Międzynarodowym Sympozjum w Lednicach w 1998 roku, oraz Międzynarodowej Konferencji w Radzikowie w 2000 roku (załącznik nr 3, publikacja 4.1.2, 4.1.4).

**Począwszy od 1998 roku uczestniczyłam** w kompleksowych i szeroko zakrojonych **badaniach nad zdrowotnością różnych gatunków roślin zielarskich** uprawianych w woj. lubelskim, którymi kierowała **Prof. dr hab. Zofia Machowicz-Stefaniak**. W literaturze polskiej brak było w tym czasie opracowań naukowych dotyczących tego zagadnienia, z wyjątkiem badań nad patogenami ziół prowadzonych w latach siedemdziesiątych w Instytucie



Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu. **W latach 2000-2002, badania te wykonywano w ramach grantu KBN nr 5 PO6B 052 19, KBN (załącznik 4).**

Celem badań było prowadzenie obserwacji nad występowaniem chorób na nadziemnych i podziemnych organach **tymianku właściwego** (*Thymus vulgaris* L.), **melisy lekarskiej** (*Melissa officinalis* L.) oraz **dziurawca zwyczajnego** (*Hypericum perforatum* L.). W każdym roku badań na plantacjach jednorocznych i dwuletnich określano procent roślin z objawami chorobowymi oraz obliczano wskaźnik porażenia na podstawie opracowanej skali porażenia. Grzyby izolowano z powierzchniowo odkażonych korzeni, podstawy łodyg oraz liści. Przeprowadzone badania wskazały na występowanie nasilonych symptomów chorobowych na badanych organach roślin zielarskich zwłaszcza w drugim roku uprawy, co przejawiało się wyższymi wskaźnikami porażenia. Z korzeni i podstawy łodyg melisy i tymianku izolowano głównie grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Rhizoctonia solani* (tel. *Thanatephorus cucumeris*) *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris, oraz grzyby należące do kompleksu *Phoma sensu lato*. Z liści tymianku i melisy izolowano głównie *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* oraz *Fusarium* spp. (załącznik nr 3, publikacje 2.1.4, 2.1.5., 2.2.1., 2.2.2., 2.2.3., 2.2.4., 2.2.5., 2.2.6., 2.2.7., 2.2.8., 2.2.10., 2.2.11.). Uzyskane wyniki były prezentowane na Konferencji w Poznaniu w 1999 r., w Erfurcie w 2000 r. i w Pradze w 2002r. (załącznik nr 3, publikacja 4.1.3., 4.1.5., 4.1.6).

Prowadzone przez nas badania pozwoliły na **wyizolowanie po raz pierwszy w Polsce *Seimatosporium hypericinum*** (Ces.) B. Sutton (Basionym *Diploceras hypericinum* (Ces.) Died). Wobec dużej szkodliwości tego patogena dla roślin dziurawca zwyczajnego, rozpoczęłam dokładne badania nad symptomatologią, wymaganiami życiowymi oraz biologią tego grzyba. Powszechne występowanie i potwierdzona eksperymentalnie możliwość porażania liści i łodyg dziurawca przez *S. hypericinum* upoważniły do uznania go za niebezpiecznego patogena tej rośliny oraz nadania dla choroby nazwy „czerwona plamistość liści i łodyg”. Wykazałam, że rozłupki dziurawca nie stanowią źródła infekcji dla patogena, natomiast może on zimować w postaci grzybni i chlamydospor w spękaniach kory wieloletnich pędów dziurawca oraz dziko rosnących roślinach. W celu poznania wymagań życiowych przeprowadziłam badania nad wpływem szerokiego zakresu temperatury i rodzaju podłoża hodowlanego na wzrost i zarodnikowanie grzyba. Wykazano, że możliwość intensywnego wzrostu i zarodnikowania *S. hypericinum* w temperaturze od 20 do 28°C sprzyjają epidemicznemu występowaniu czerwonej plamistości liści i łodyg dziurawca zwyczajnego. Do innych osiągnięć należało ustalenie, że najodpowiedniejszym podłożem do

izolacji *S. hypericinum* jest pożywka glukozowa z wywarem z liści dziurawca. Zaobserwowano zdolność *S. hypericinum* do wytwarzania w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* czerwono-bursztynowego barwnika, co wskazało na konieczność wykonania badań biochemicznych w celu określenia struktury tych związków. **Takie badania wykonano w roku 2016 z zespołem naukowców Uniwersytetu w Neapolu, a uzyskane wyniki były prezentowane na Międzynarodowym Kongresie Włoskiego Towarzystwa Fitopatologicznego w Rzymie w 2016 roku (załącznik nr 3, publikacja 4.2.18).**

Mając na uwadze praktyczny aspekt pracy przeprowadziłam również badania nad właściwościami biotycznego oddziaływania grzybów fylosferowych na *S. hypericinum*, wskazując na jego niewielkie uzdolnienia konkurencyjne, oraz nad wpływem różnych preparatów pochodzenia naturalnego i fungicydów na ograniczanie wzrostu i rozwoju patogenu w warunkach *in vitro*. Wyniki tych badań dały podstawę do przeprowadzenia doświadczenia nad efektywnością wybranych preparatów naturalnego pochodzenia oraz fungicydów w doświadczeniu fitotronowym.

Uzyskane kompleksowe wyniki posłużyły do napisania, w 2003 roku, rozprawy doktorskiej nt: „Grzyby zagrażające uprawie dziurawca zwyczajnego ze szczególnym uwzględnieniem *Seimatosporium hypericinum* (Ces.) Sutton (*Melanconiales, Deuteromycotina*)”, która została wyróżniona.

Całość wyników opublikowano w 9 oryginalnych pracach twórczych, z których 7 jest wyłącznie mojego autorstwa (załącznik nr 3, publikacje 2.1.5, 2.2.1., 2.2.3, 2.2.4., 2.2.6., 2.2.7, 2.2.8, 2.2.10., 2.2.11.), oraz przedstawiane w postaci posterów i referatów na konferencjach i sympozjach naukowych: Deutschen Phytomedicinischen Gesellschaft, Erfurt 2000; Nitra, Słowacja-2003 i Poznań-2003 (załącznik nr 3, publikacja 4.1.5., 4.2.1., 4.2.2).

Po uzyskaniu 1.X.2003 roku stanowiska adiunkta w Katedrze Fitopatologii, moje naukowe zainteresowania nadal dotyczyły chorób roślin zielarskich, głównie należących do rodziny *Lamiaceae*. Rozszerzyłam zakres badań o nowe gatunki ziół, w związku z wprowadzeniem przez producentów do uprawy szerszego asortymentu roślin i sygnalizowaną przez plantatorów potrzebą poznania zagrożeń chorobowych tej grupy roślin. **W latach 2004-2006 przeprowadziłam badania dotyczące występowania i etiologii chorób szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.) oraz serdecznika pospolitego (*Leonurus cardiaca* L.), a w latach 2007-2009 cząbrzu ogrodowego (*Satureja hortensis* L.) uprawianych w południowo-wschodniej Polsce (załącznik nr 3, publikacje 2.2.12., 2.2.13., 2.2.14., 2.2.15., 2.2.16., 2.2.17.).**

Nową, nie opisywaną wcześniej w Polsce chorobą szalwii lekarskiej była nekroza oraz pęknięcie kory pędów. Chorobę powodował zdiagnozowany przeze mnie *Phomopsis sclarea* Sarwar. Wobec nielicznych doniesień z literatury światowej dotyczących głównie występowania *P. sclarea* na roślinach szalwii (Subbiah i in. 1996, Voltolino 2001), podjęto badania nad morfologią grzyba oraz określeniem optymalnych warunków termicznych dla wzrostu i tworzenia materiału infekcyjnego *P. sclarea*. Przeprowadzone badania przy zastosowaniu elektronowego mikroskopu skaningowego pozwoliły na dokładne poznanie struktur morfologicznych grzyba, co wypełniło lukę w dotychczasowej literaturze. Za istotną bowiem cechę taksonomiczną uznano tworzenie okrągłych konidiom, z licznymi utworami strzępkowymi, których ściana pęka, uwalniając krople wydzieliny konidiów. Za optimum termiczne dla wzrostu grzyba uznano temperaturę od 20 do 28°C, zaś dla tworzenia materiału infekcyjnego temp. od 24 do 28°C (załącznik nr 3, publikacje 2.2.13, 2.2.16.).

Przeprowadzone badania wskazały na dużą różnorodność grzybów występujących w środowisku uprawnym serdecznika pospolitego. **Do ważnych osiągnięć zaliczam zidentyfikowanie oraz oznaczenie kilku gatunków *Phoma sensu lato*, nie notowanych wcześniej na *Leonurus cardiaca*. Należały do nich: *Westerdykella capitulum* Panwar, P.N. Mathur & Thirum (Basionym: *Phoma capitulum* Panwar, P.N. Mathur & Thirum Gruyter, Aveskamp & Verkley), *Phoma septicialis* Boerema., *Allophoma labilis* (Sacc.) Qian Chen & L. Cai (Basionym *Phoma labilis* Sacc) oraz *Phoma nepeticola* (Melnik) Dorenb. & Gruyter (Basionym *Ascochyta nepeticola* Melnik).** Za szczególnie niebezpieczne uznano występowanie ostatniego z wymienionych gatunków. Powodował on bowiem objawy drobnych, regularnych, nekrotycznych plam na liściach i łodygach serdecznika, przyczyniając się tym samym do pogorszenia jakości surowca *Herba Leonuri Cardiaceae* (załącznik nr 3, publikacje 2.2.12, 2.2.14).

Moja działalność badawcza w tym czasie koncentrowała się na zagadnieniach związanych z morfologią oraz biologią grzybów *Phoma sensu lato*. Bazując na zdobytych doświadczeniach oraz wiedzy z zakresu taksonomii tej grupy grzybów, które nabyłam podczas stażu na SGGW w Warszawie (załącznik nr 4), uczestniczyłam w badaniach kierowanych przez **Prof. dr hab. Zofię Machowicz-Stefaniak** dotyczących patogeniczności izolatów *B. exigua var exigua* (*P. exigua* var. *exigua*) dla tymianku właściwego i melisy lekarskiej. Spełniając wszystkie postulaty Kocha, potwierdzono polifagiczny charakter grzyba i wykazano, że może on powodować hamowanie kiełkowania rozłupków oraz wschodów,



wywoływać nekrozę kielków, siewek oraz łodyg melisy i tymianku (załącznik nr 3, publikacje 2.2.15).

Do innych osiągnięć naukowych związanych z grupą grzybów *Phoma sensu lato*, uważam udział w badaniach dotyczących morfologicznej i molekularnej charakterystyki nie opisywanego wcześniej w Polsce gatunku *Calophoma complanata* (Tode) Q. Chen & L. Cai (**Basionym *Phoma complanata*** (Tode) Desm). W badaniach tych byłam odpowiedzialna za obserwacje makroskopowe i mikroskopowe rodzimych izolatów na trzech standardowych podłożach hodowlanych. Brałam również udział w genetycznej identyfikacji opartej na analizie sekwencji nukleotydowych rDNA ITS1 I ITS2 własnych izolatów oraz szczepu referencyjnego. Uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie GanBank. Ponadto, na podstawie testów patogeniczności przeprowadzonych zgodnie z postulatami Kocha, gatunek ten uznano za fakultatywnego patogena arcydzięgla litwora (*Archangelica officinalis* Hoffm.) (załącznik nr 3, publikacje 2.2.21., 2.2.26.).

Do ważnych osiągnięć zaliczam wykazanie dużej bioróżnorodności grzybów zasiedlających i uszkadzających podziemne i nadziemne organy babki lancetowatej (*Plantago lanceolata* L.). uprawianej na plantacjach produkcyjnych zgrupowanych w południowo-wschodniej Polsce. **Po raz pierwszy w Polsce, wykryto i opisano plamistości liści babki lancetowatej.** Procent porażonych roślin wynosił, w zależności od lat badań, od 10 do 40 %. Charakterystycznymi objawami na liściach były drobne, regularne, nekrotyczne plamy, na których obserwowano oznaki etiologiczne w postaci piknidiów. Z chorych tkanek wyizolowano gatunek *Phyllosticta plantaginis* Sacc. Uzyskane w toku badań izolaty *P. plantaginis* posłużyły do cyklu badań nad wzrostem i rozwojem w różnych warunkach hodowli, morfologią, patogenicznością i zbadaniem wstępnego etapu infekcji grzyba przy użyciu mikroskopu elektronowego (załącznik nr 3, publikacje 2.2.18, 2.2.19., 2.2.20.).

**Do najważniejszych osiągnięć należało:**

- wykazanie, że *P. plantaginis* należy do organizmów eurytermicznych. Optymalna temperatura dla wzrostu badanych izolatów patogenu wynosi od 16 do 28°C, natomiast dla zarodnikowania od 22 do 28°C.
- ustalenie, że temperatura – 6°C nie była zabójcza dla patogena co wskazuje na możliwość zimowania grzyba na w warunkach Polski.
- wykazanie, że podłożem optymalnym do wzrostu i tworzenia charakterystycznych cech morfologicznych, niezbędnych do prawidłowej identyfikacji grzyba jest pożywka maltozowa i maltozowa z wywarem z liści babki.

- opracowanie szczegółowej charakterystyki struktur morfologicznych. Ustalenie, porowatej budowy ujść piknidiów oraz obecność „czapeczki”, otwierającej ujścia przez, które wydobywają się krople wydzieliny konidiów. Informacje te wypełniły lukę w ówczesnej literaturze dotyczącej cech taksonomicznych *P. plantaginis*.
- spełnienie wszystkich postulatów Kocha dla wybranych izolatów *P. plantaginis* oraz przeprowadzenie badań nad ultrastrukturą inokulowanych liści babki lancetowatej w celu określenia modelu wstępnego etapu infekcji patogena.
- ustalenie, że *P. plantaginis* wnika do tkanek rośliny żywicielskiej przez aparaty szparkowe, oraz, że tworzy struktury adhezyjne w postaci appresorium.

Wyniki posłużyły do napisania 3 oryginalnych prac twórczych w których jestem wyłącznym autorem (załącznik nr 3, publikacje 3.2.3., 2.2.19., 2.2.20.), 4 prac wydrukowanych w materiałach konferencyjnych (załącznik nr 3, publikacje 4.2.11., 4.2.12., 4.2.13., 4.2.14.). Były 3 krotnie referowane i 3 krotnie prezentowane na 6 konferencjach i sympozjach naukowych, w tym międzynarodowych (załącznik nr 3, 4).

**Wobec sygnalizowanego przez plantatorów lebiodki pospolitej (*Origanum vulgare* L.)** pojawienia się niespotykanych wcześniej symptomów chorobowych na liściach, podjęto obserwacje mykologiczne, w wyniku których stwierdzono obecność antraknozy liści lebiodki. Charakterystyczne, koncentrycznie strefowane plamy, w miejscu których obserwowano acerwulusy. Tworzyły się one obficie szczególnie podczas okresów wegetacji 2013 i 2014 roku, o średniej temperaturze przekraczającej średnią wieloletnią. Procent roślin z objawami chorobowymi wahał się w zależności od lat badań od 20 do 47%. **Ustalono, że przyczyną antraknozy lebiodki pospolitej jest nie notowany dotychczas w Polsce oraz na świecie gatunek *Colletotrichum fuscum* Laub.** (załącznik nr 3, publikacje 2.2.22, 2.2.24.).

Ze względu na znaną szkodliwość dla roślin zielarskich grzybów z rodzaju *Colletotrichum* (Machowicz-Stefaniak 2010), podjęto badania nad budową struktur morfologicznych tego grzyba niezbędnych do poprawnej identyfikacji, oraz biotycznymi interakcjami grzybów fylosferowych na *C. fuscum*, wskazując na jego niewielkie uzdolnienia konkurencyjne. (załącznik nr 3, publikacja 2.2.24.).

Za szczególnie istotny aspekt tych badań uważam:

- **potwierdzenie prawidłowej identyfikacji rodzimych izolatów na podstawie przeprowadzonej analizy sekwencji regionów rDNA ITS1 i ITS2.**
- **uznanie *C. fuscum*, na podstawie testów patogeniczności, za nowego w warunkach Polski oraz świata patogena lebiodki pospolitej.**

Wyniki tych badań były prezentowane w formie referatu na konferencji naukowej w Skierniewicach (2014 rok) oraz w tym samym roku, w formie posteru, na konferencji w Krakowie (załącznik nr 3, publikacje 4.2.15., 4.2.16.).

Poza wymienionymi tematami badawczymi związanymi z problemem zdrowotności ziół, **brałam udział w badaniach, kierowanych przez dr hab. Ewę Król dotyczących zdrowotności drzew leśnych oraz grzybów zasiedlających ich nasiona.**

Wykazano, że zasiedlanie nasion przez liczne gatunki grzybów przyczynia się do ich rozprzestrzeniania, i że oprócz gleby, mogą one stanowić bardzo ważne źródło infekcji młodych roślin. Za szczególnie niekorzystne uznano częste kolonizowanie nasion przez grzyby z rodzajów: *Fusarium*, *Botrytis* oraz *Cylindrocarpon*, które mogą powodować objawy zgorzeli i zgnilizny siewek. Za negatywne uznano również izolowanie licznych gatunków mogących powodować pleśnienie materiału siewnego oraz plamistości liści i igieł, gdyż mogą one stanowić zagrożenie w czasie przechowywania nasion oraz dla roślin w początkowym okresie wzrostu (załącznik nr 3, publikacja 2.2.23). Wyniki tych badań były prezentowane na konferencji w Puławach 2017 (załącznik nr 3, publikacja 4.2.19.).

Włączyłam się ponadto w nurt badań **kierowanych przez dr hab. Ewę Król dotyczących grzybów zasiedlających pędy drzew owocowych, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków należących do rodzaju *Diaporthe* (*Phomopsis*).**

Prowadzone obserwacje na terenie sadów zgrupowanych w województwach lubelskim oraz świętokrzyskim wskazały na zasiedlanie pędów różnych gatunków drzew owocowych zarówno przez grzyby saprotroficzne jak również patogeniczne. Do drugiej grupy należały grzyby z rodzaju *Diaporthe*, które izolowano najczęściej z pędów jabłoni, gruszy, śliw, brzoskwiń wykazujących typowe symptomy wywoływane przez te patogeny (Król i Kowalik 2011). Stwierdzone częstsze zasiedlanie przez *Diaporthe* spp. pędów pochodzących z sadów nie chronionych wskazało na szczególne zagrożenie ze strony tych patogenów w sadach nie objętych ochroną (załącznik nr 3, publikacje 2.2.27).

**Ważne i interesujące są dla mnie badania prowadzone od 2015 roku, we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu w Neapolu Dr Rosario Nicoletti i Dr Francesco Vinale** (Council for Agricultural Research and Agricultural Economy Analysis, University of Naples Federico II, Neapol, Italy) **oraz Dr Umberto Bernardo** z Instytutu Zrównoważonej Ochrony Roślin, dotyczące mutualistycznych interakcji pomiędzy galasotwórczymi gatunkami muchówek z rodzaju *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae) oraz grzybami rozwijającymi się na wewnętrznej ścianie galasów. Ustalono, że są one zasiedlane

przez kompleks grzybów, głównie *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp oraz *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.. Za szczególnie interesujące uznano wyizolowanie z galasów tymianku właściwego ostatniego gatunku grzyba. W populacji *B. dothidea* znajdują się bowiem szczepy endofityczne oraz patogeniczne. *B. dothidea* jest groźnym patogenem wielu roślin drzewiastych. Dlatego istotne będzie ocenienie potencjalnej roli roślin zielnych z rodziny *Lamiaceae* jako źródła inokulum tego patogena i rolę *Asphondylia* spp. jako wektora tego grzyba. Identyfikację uzyskanych izolatów *B. dothidea* przeprowadzono metodami klasycznymi oraz molekularnymi. Sekwencje nukleotydowe regionów ITS1 i ITS2 zdeponowano w bazie GenBank. Wynikiem współpracy jest publikacja, w której jestem pierwszym autorem. Została opublikowana w wysoko punktowanym czasopiśmie *Annals of Applied Biology* (załącznik nr 3, publikacja 2.2.25.).

Wyniki tych badań dostarczyły nowych informacji o wykryciu **po raz pierwszy na świecie gatunku *Asphondylia serpylli* Kieffer. na *Thymus vulgaris***. Pojawienie się tego owada spotkało się z ożywioną reakcją badaczy na świecie, o czym mogą świadczyć liczne meile, które otrzymuję, potwierdzające celowość przeprowadzonych badań oraz ich nowatorski charakter.

Podczas prowadzenia badań zwrócono uwagę, że biocenoza grzybów zasiedlających galasy wytwarzane przez muchówki z rodzaju *Asphondylia* na kwiatach tymianku właściwego, ale także innych roślin leczniczych należących do rodziny *Lamiaceae* jest zdominowana przez *B. dothidea* i przez gatunki *Cladosporium* spp i *Alternaria alternata* (Zimowska i in. 2017). Zaobserwowano także, że kwiaty, które nie zostały przekształcone w galasy, zwykle są zasiedlane przez różne inne gatunki grzybów, w tym gatunki znane ze swoich antagonistycznych uzdolnień, które mogą odgrywać rolę ekologiczną w ograniczaniu tworzenia się galasów poprzez hamowanie symbiontu grzyba niezbędnego do rozwoju oraz życia poszczególnych stadiów rozwojowych *Asphondylia* spp. Obserwacje te były impulsem do przeprowadzenia badań nad antagonistycznymi uzdolnieniami dwóch gatunków grzybów *Aspergillus cristatus* Raper & Fennell oraz *Talaromyces pinophilus* (Hedgc.) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert, wyizolowanych wcześniej z kwiatów *Micromeria graeca* oraz *Ballota nigra* (*Lamiaceae*). Identyfikację tych gatunków przeprowadzono za pomocą metod klasycznych oraz sekwencjonowania rDNA-ITS., a otrzymane sekwencje zdeponowano w bazie GenBank. Ponadto zbadano uzdolnienia tych grzybów do tworzenia metabolitów. **Uzyskane z badań wyniki były prezentowane na Międzynarodowym Kongresie**

Włoskiego Towarzystwa Fitopatologicznego w Piacenza w 2017 roku (załącznik nr 3, publikacje 4.2.18., 4.2.21.).

Z zespołem Włoskich badaczy prowadziłam także badania nad metabolitami *S. hypericinum* (*D. hypericinum*). Ustalono w wyniku analizy chromatograficznej, zdolność do syntezy przez *S. hypericinum* brevioximu, heterocyklicznego związku izolowanego wcześniej z innych grzybów, który hamuje aktywność hormonów juvenilnych i jest wykorzystywany jako naturalny insektycyd (Moya i in. 1998). Drugim metabolitem była cis-fusarina, często spotykany związek produkowany przez grzyby z grupy sideroforów (Holinsworth i Martin 2009). Wyniki tych badań były prezentowane na Międzynarodowym Kongresie Włoskiego Towarzystwa Fitopatologicznego w Rzymie w 2016 roku (załącznik nr 3, publikacja 4.2.18.).

Ponadto w trakcie realizacji są szeroko zakrojone badania nad zróżnicowaniem morfologicznym i genetycznym polskich oraz włoskich izolatów *Cladosporium* spp. otrzymanych z galasów oraz zdrowych kwiatów gatunków roślin zielnych z rodziny *Lamiaceae*. Wyniki tych badań ukażą się w jednym z prestiżowych czasopism naukowych, oraz będą prezentowane na Międzynarodowym Kongresie Entomologicznym w Neapolu w lipcu 2018 roku.

Istotnym elementem wymienionej współpracy było wzięcie przeze mnie udziału, jako lidera zespołu polskich naukowców, w konkursie dotyczącym Włosko-Polskich projektów badawczych koordynowanych przez Polską Akademię Nauk oraz National Research Council (Italy). Temat projektu: „Characterization of symbiotic relationship among *Asphondylia* spp. and several fungal species”. Pomimo tego, iż projekt nie został zakwalifikowany do finansowania, z powodu redukcji budżetu ze strony Włoskiej, otrzymał wysokie noty tj. 19 pkt. na 20 możliwych.

Oprócz badań z Włoskimi naukowcami, nawiązałam również współpracę z Prof. Ahmet Asan z Uniwersytetu w Edirne w Turcji (Trakya University, Department of Biology, Edirne, Turkey). Badania, które są w toku, dotyczą identyfikacji i filogenetycznego zróżnicowania grzybów wyizolowanych z roślin zielarskich z *Lamiaceae* w Turcji i w Polsce. Wyniki tych badań będą opublikowane w Turkish Journal of Botany. Owocem tej kooperacji był współudział w Komitecie naukowym i organizacyjnym dwóch Międzynarodowych Kongresów: 1st Eurasian Mycological Congress 3-5.07.2016, Manisa, Turkey oraz XIII Congress of Ecology and Environment with International Participation 12-15.09.2017, Edirne, Turkey.

Za perspektywiczne, w kontekście rozwoju naukowego uważam również **nawiązanie w ostatnim czasie kontaktu z wybitnym zespołem hinduskich badaczy oraz z Prof Mahendra Rai z Uniwersytetu w Amravati, których działalność badawcza związana jest grzybami *Phoma sensu lato*. W trakcie opracowania jest nasz wspólny artykuł przeglądowy nt. "Phoma: The gold mine of bioactive compounds".**

**W wyniku przeprowadzonych badań molekularnych w bazie GenBank zdeponowano :**

- 3 sekwencje *Calophoma complanata* (Basionym *Phoma complanata*)
- 2 sekwencje *Botryosphaeria dothidea*
- 1 sekwencję *Talaromyces pinophilus*
- 1 sekwencję *Aspergillus cristatus*

## Literatura

1. Moya, P., Cantín, A., Castillo, M.A., Primo, J., Miguel, A. Miranda, Yúfera, E.P. (1998). Isolation, structural, assignment and synthesis of N-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline, a new natural product from *Penicillium brevicompactum* with in vivo anti-juvenile hormone activity. J. Org. Chem., 63 (23): 8530-8535.
2. Holinsworth, B., Martin, J.(2009). Siderophore production by marine-derived fungi. Biometals; 22(4): 625–632.
3. Król, E., Kowalik, B. (2011). Grzyby z rodzaju *Phomopsis* występujące na pędach roślin sadowniczych. Post. Nauk Rol., 2:31-42.
4. Machowicz-Stefaniak, Z. (2010). Occurrence and characterization of *Colletotrichum dematium* (Fr.) Grove. Pol. J. Microbiol., 59, 191-200.
5. Subbiah, V.P., Riddick, M., Peele, D. (1996). First report of *Fusarium oxysporum* on clary sage in north America. Plant Dis. 80: 1080.
6. Voltolina G., 2001. *Salvia sclarea* L. Plante Officinali 2:1-12.
7. Zimowska, B., Viggiani, G., Nicoletti, R., Furmańczyk, A., Becchimanzi, A. and Kot, I. (2017). First report of the gall midge *Asphondylia serpylli* on thyme (*Thymus vulgaris*), and identification of the associated fungal symbiont. Ann Appl Biol. doi:10.1111/aab.12360.



**Mój dorobek publikacyjny obejmuje, łącznie z pracami dokumentującymi osiągnięcie naukowe, 75 pozycji. W tej liczbie znajduje się 41 oryginalnych prac twórczych, 6 innych prac naukowych w materiałach konferencyjnych oraz 28 streszczeń i abstraktów.**

Wśród wszystkich **41** oryginalnych prac twórczych, **9** prac to cykl publikacji powiązanych tematycznie, dokumentujących moje osiągnięcie naukowe, a pozostałe **32** prace stanowią mój pozostały dorobek naukowy.

Spośród wszystkich oryginalnych prac twórczych **15** opublikowałam w recenzowanych **czasopismach naukowych z listy JCR** (w tym 4 prace w czasopismach zagranicznych, a 11 w czasopismach krajowych). Pozostałe prace, w liczbie 26 pozycji, opublikowano poza listą JCR, tj. w czasopismach recenzowanych z listy B wykazu czasopism punktowanych MNiSW.

Według ujednoliconego wykazu czasopism punktowanych MNiSW uzyskałam **411** punktów. Z tego **126** to punkty za publikacje dokumentujące osiągnięcie naukowe, a **285** to mój pozostały dorobek naukowy.

Na podstawie danych z JCR współczynnik wpływu wszystkich prac wynosi **IF=10,983** oraz **IF=9,322** w okresie 5-letnim. Sumaryczna liczba cytowań wg Web of Science wynosi **23**, suma cytowań bez autocytowań 7, suma cytowanych artykułów **16**, suma cytowanych artykułów bez autocytowań 7, średnia liczba cytowań 1,47, średnia liczba cytowań w roku 1,57 a index Hirscha **3**.

Wśród wszystkich oryginalnych publikacji **32** opublikowano w j. angielskim, a **9** w języku w polskim.

W **23** oryginalnych publikacjach jestem jedynym, natomiast w **9** pracach pierwszym autorem, a w pozostałych kolejnym autorem.

Jestem autorem **88** sekwencji nukleotydowych 22 izolatów *B. strasseri*, **8** sekwencji 2 izolatów *B. exigua var. exigua*, **3** sekwencji *Phoma complanata*, **2** sekwencji *Botryosphaeria dothidea*, **1** sekwencji *Talaromyces pinophilus* oraz **1** sekwencji *Aspergillus cristatus* zgłoszonych i opublikowanych w bazie danych GenBank.

Wyniki badań prezentowałam na **30** Konferencjach i Sympozjach Naukowych w tym na **14** konferencjach międzynarodowych (**10** za granicą) oraz na **16** konferencjach krajowych. Na konferencjach tych osobiście wygłosiłam **12** referatów oraz zaprezentowałam **18** posterów. Sumaryczne zestawienie informacji na temat dorobku naukowo-badawczego oraz wskaźników dokonań naukowych ujęto w formie tabelarycznej (Tab. 1 i 2).

Tab. 1. Sumaryczne zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe wraz z IF oraz liczbą punktów przysługującą za publikacje w tych czasopismach (z uwzględnieniem prac dokumentujących osiągnięcie naukowe)

Lp.	Nazwa czasopisma	Liczba publikacji	IF ( w roku opublikowania)	5 letni IF	Punkty wg MNiSW <sup>b</sup>	Liczba punktów	Numer publikacji
<b>Publikacje punktowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)</b>							
1.	Acta Scientiarum	2	0,393 (x2)	-	20	40	<b>4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup></b>
	Polonorum,	2	0,583 (x2)	0,422 (x2)	15	30	<b>7<sup>a</sup></b> , 2.2.22
	Hortorum Cultus	3	0,522 (x3)	0,501 (x3)	20	60	2.2.19., 2.2.20., 2.2.21.
		3	0,523 (x3)	0,550 (x3)	20	60	<b>8<sup>a</sup></b> , 2.2.24., 2.2.27.
2.	Annals of Applied Biology	1	2,103	2,115	35	35	2.2.25.
3.	Biologia	1	0,605	0,628	13	13	2.2.16.
4.	Journal of Plant Pathology	1	1,267	1,257	20	20	<b>9<sup>a</sup></b>
5.	Polish Journal of Microbiology	1	0,768	-	15	15	<b>6<sup>a</sup></b>
		1	0,746	0,938	15	15	2.2.26.
6.	Sylvan	1	0,41	0,387	15	15	2.2.23.
<b>Publikacje naukowe w czasopismach wymienionych w części B wykazu czasopism punktowanych MNiSW</b>							
7.	Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus	1			4	4	2.2.3.
8.	Acta Agrobotanica	2			4	8	<b>1<sup>a</sup></b> , 2.2.15.
		3			3	9	2.1.3., 2.1.4., 2.1.5.
9.	Acta Mycologica	1			4	4	2.2.12.
10.	EJPAU Horticulture	1			5	5	2.2.6.
11.	Folia Univ. Agric. Stetin. Agric.	1			3	3	2.2.5.
12.	Phytopathologia Polonica	1			6	6	<b>3<sup>a</sup></b>
		2			5	10	2.2.4., 2.2.7.
13.	Prog. Plant Prot./ Post. Ochr. Roślin	1			2	2	2.1.1.
14.	Herba Pol.	3			4	12	2.2.1., 2.2.2., 2.2.9.
		1			5	5	2.2.8.
		5			6	30	<b>2<sup>a</sup></b> , 2.2.10., 2.2.11., 2.2.13., 2.2.14.
		1			9	9	2.2.17.
15.	Zesz. Nauk Akad Rol im H. Kołłątaja Krak., Ogrod.	1			1	1	2.1.2.
<b>Publikacje nie ujęte w aktualnym wykazie czasopism punktowanych MNiSW</b>							
16.	Journal of Plant Physiology and Pathology	1					2.2.18.
	<b>Łącznie (w tym dla osiągnięcia)</b>	<b>41 (9)</b>	<b>10,983 (3,927)</b>	<b>9,322 (2,202)</b>	-	<b>411 (126)</b>	-

a- prace dokumentujące doniesienie naukowe

b- liczba punktów MNiSW według załączników do Komunikatu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego za odpowiedni rok (według roku opublikowania)



Tab. 2. Wskaźniki dokonań naukowych wg najważniejszych baz danych (stan na dzień 21 listopada 2017)

<b>Baza danych</b>	<b>Liczba dokumentów w bazie</b>	<b>Liczba cytowań</b>	<b>Index Hirsha</b>
<b>Scopus</b>	14	19	3
<b>Web of Science</b>	15	22 9)*	3

) \* liczba cytowani bez autocytowań

### **Za całokształt działalności zawodowej otrzymałam wyróżnienia:**

- Stypendium doktorskie – Wydział Ogrodniczy Akademia Rolnicza w Lublinie – 2000r.-2002 r.;
- Wyróżnienie rozprawy doktorskiej, AR Lublin – 2003 r.;

### **Nagrody Jego Magnificencji Rektora AR w Lublinie za działalność naukową:**

- **Nagroda zespołowa I stopnia** J.M. Rektora AR w Lublinie –2000 r.;
- **Nagroda zespołowa II stopnia** J.M. Rektora UP w Lublinie –2009 r.;
- **Nagroda indywidualna I stopnia** J.M. Rektora UP w Lublinie za działalność naukową w latach 2010-2012 –2014 r.;
- **Nagroda indywidualna II stopnia** J.M. Rektora UP w Lublinie za działalność naukową w latach 2014-2016 –2017 r.;
- **Nagroda Jubileuszowa** JMR UP Lublin w związku z upływem 20-letniego okresu pracy zawodowej – 2017 r.