

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa

Środowisko - Roślina - Zwierzę - Produkt

WUP

Wybrane zagadnienia
z zakresu rolnictwa

Środowisko – Roślina – Zwierzę – Produkt

Wybrane zagadnienia z zakresu rolnictwa

pod redakcją
Marka Babicza
Bożeny Nowakowicz-Dębek

Lublin 2021

Recenzenci

dr hab. Anna Kocira, prof. PWSZ w Chełmie
dr inż. Ewa Stamirowska-Krzaczek

Skład i łamanie
Małgorzata Grzesiak

Opracowanie redakcyjne
Patrycja Liśkiewicz
Magdalena Marcewicz

Projekt okładki
Jacek Pałyszka



Ten utwór jest dostępny na licencji Creative Commons Uznanie autorstwa –
Użycie niekomercyjne – Bez utworów zależnych 4.0 Międzynarodowe.

ISBN 978-83-7259-344-3 on-line

DOI: 10.24326/mon.2021.10

WUP

Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin
<https://up.lublin.pl/nauka/wydawnictwo/>
9 ark. wyd.

Spis treści

Barbara Białczyk	
Folie nowej generacji w produkcji sianokiszzonek	7
New generation foils in the production of haylage	
Olga Bociankiewicz, Filip Żak	
Identyfikacja genów <i>Lr10</i> i <i>Lr19</i> warunkujących odporność pszenicy zwyczajnej (<i>Triticum aestivum</i> L.) na rdzę brunatną w polskich odmianach tego zboża	13
Identification of the <i>Lr10</i> and <i>Lr19</i> genes determining the resistance of common wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) to leaf rust in Polish cultivars of this cereal	
Małgorzata Chęć, Klaudia Nowak, Paulina Nowakowska	
Zmiany w handlu tradycyjnym i elektronicznym w Polsce w latach	20
Analysis of traditional and electronic trade sector in Poland in years 2017–2020	
Wiktoria Chronowska	
Możliwości przewidywania plonu na podstawie waloryzacji przestrzeni produkcyjnej	32
Possibilities of predicting the yield based on the valorization of the production area	
Magdalena Cieplak Sylwia Okoń	
Reakcja obronna roślin w odpowiedzi na atak patogenów	40
Plant defense response to pathogen attack	
Joanna Gmitrowicz-Iwan, Magdalena Myszura, Joanna Trzcńska	
Wpływ powierzchni odbijającej sygnał na dokładność geodezyjnych pomiarów dalmierzem laserowym	47
Influence of the reflecting surface on the accuracy of geodesic reflectorless distance measurements	
Anita Gorczyca, Joanna Toporowska, Antonina Krawczyk, Jan Sadurski, Sylwia Sowa, Edyta Paczos-Grzęda	
Ocena możliwości wykorzystania metody ISSR do analizy zróżnicowania wewnątrzgatunkowego <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Avenae</i>	56
Assessment of the possibility of using ISSR method to analysis the intraspecific diversity of <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>avenae</i>	
Maciej Kołodziejczyk Natalia Korcz	
Ogławianie drzew, niewiedza czy celowe działanie?	65
Tree limbing, ignorance or deliberate action?	
Bożena Kowalczyk, Wojciech Sokołowski Karolina Włodarczyk, Marta Palusińska Szysz	
Lipidy jako cenne markery chemotaksonomiczne fitopatogennych grzybów z rodzaju <i>Puccinia</i>	71
Lipids as valuable chemotaxonomic markers of phytopathogenic fungi of the <i>Puccinia</i> genus	
Gabriela Michta, Anita Gorczyca, Joanna Toporowska, Jakub Chalimoniuk, Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa	
Oceny zróżnicowania genetycznego <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> metodą ISSR	77
Assessment of genetic diversity of <i>Puccinia coronata</i> f. sp. <i>avenae</i> by ISSR method	

Julia Mironenka, Przemysław Bernat	
Wpływ <i>Fusarium culmorum</i> na wytwarzanie wybranych zewnątrzkomórkowych metabolitów przez <i>Trichoderma harzianum</i>	87
Effect of <i>Fusarium culmorum</i> on selected extracellular metabolites production by <i>Trichoderma harzianum</i>	
Michał Możejko, Justyna Bohacz	
Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne	96
Keratinolytic microorganisms and their enzymes	
Dżesika Stankiewicz, Agnieszka Buczaj, Bartłomiej Mistal, Anna Pecyna	
Ocena wydatku energetycznego podczas pracy w rolnictwie indywidualnym	104
Assessment of energy expenditure while working in private farming	
Wojciech Sokółowski, Bożena Kowalczyk, Karolina Włodarczyk, Sylwia Wdowiak-Wróbel, Monika Marek-Kozaczuk	
Możliwości wykorzystania bakterii z rodzaju <i>Methylobacterium</i> w zrównoważonej uprawie roślin	116
The potentiality of utilize bacteria of the <i>Methylobacterium</i> genus in sustainable crop production	
Karolina Włodarczyk, Wojciech Sokółowski, Bożena Kowalczyk	
Rizobiowe czynniki Nod i ich interakcje z roślinnymi mechanizmami obronnymi	122
The rizobium Nod factors and their interactions with plant defense mechanisms	

Folie nowej generacji w produkcji sianokiszzonek

New generation foils in the production of haylage

Pasza objętościowa jest podstawą żywienia bydła, a jej jakość wpływa na jakość produktów zwierzęcych i przyrost masy ciała zwierząt [Bodarski i in. 2005]. Obecnie najpopularniejszą paszą objętościową jest sianokiszzonka, której wartość pokarmowa zależy od jakości materiału zakiszzonego oraz sposobu jej przechowywania. Na długość okresu przechowywania i jakość zakiszzonego materiału przede wszystkim wpływa sposób i rodzaj zastosowanej folii.

Badania nad folią nowej generacji zmierzają w kierunku stworzenia produktu wytrzymałego na uszkodzenia mechaniczne, barierowość, elastyczność i kleistość oraz na jej biodegradowalność.

Znaczący wpływ na procesy starzenia się folii ma rodzaj użytego surowca do jej produkcji. W celu ograniczenia rozwoju mikroorganizmów na powierzchni folii wprowadzono na jej zewnętrzną część nanosrebro.

Aktualnie na rynku są dostępne folie wytworzone z włókien polipropylenowych lub poliesterowych. Problemem z foliami typu strecz obecnie dostępnymi na rynku jest ich utylizacja po wykorzystaniu. Przyklejają się do nich resztki sianokiszzonek, a na powierzchni rozwijają się mikroorganizmy. Zanieczyszczenia utrudniają recykling zużytej folii. Przedsiębiorstwa odpowiedzialne za recykling tworzyw sztucznych bardzo niechętnie przyjmują zużytą folię po okresie przechowywania. Z tego też powodu zalega ona w gospodarstwie i stanowi niebezpieczny odpad. Dlatego podjęto badania na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie nad wyprodukowaniem folii częściowo biodegradowalnej z dodatkiem nanosrebra i mikrocelulozy. Nanosrebro ograniczy rozwój mikroorganizmów oraz ilość zanieczyszczeń resztkami zakiszzonego materiału, a mikroceluloza ułatwi biodegradację.

Mechanizm działania nanosrebra nie jest do końca wyjaśniony. Badania wykazują, że dezaktywuje ono bakterie przez utlenianie krystaliczne, reakcje ze ścianą komórkową bakterii oraz denaturację białka oraz wiązania z DNA [Wzorek i in. 2007]. Jednak na podstawie badań toksykologicznych można stwierdzić, że nanosrebro nie jest obojętne dla organizmu [Świdwińska-Gajewska i in. 2015]. Natomiast celuloza ikrokrystaliczna jest chemicznie obojętna i dlatego umożliwia pewne i bezpieczne tworzenie receptur o zmiennym układzie krystalograficznym (powstawanie struktur amorficznych) [Sherwood i in. 1998].

¹ Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, b.bialczyk@wp.pl

Metodyka

Celem badań była ocena sianokiszonki wytworzonej w balotach potrójnie owijanych folią nowej generacji wytworzonej w ramach projektu PBS3/B9/30/2015 sfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

W badaniach do produkcji kiszonek wykorzystano folię wyprodukowaną w 2015 r. w ramach projektu badawczego PBS3/B9/30/2015 pt. „Wielowarstwowa folia nowej generacji do produkcji kiszonek”. Produkcja tej folii odbywała się w dwóch etapach. Etap pierwszy projektu miał miejsce w Głównym Instytucie Górnictwa (GIG) w Zakładzie Inżynierii Materiałowej i polegał na wprowadzeniu do surowca bazowego wchodzącego w skład poszczególnych warstw folii odpowiednich dodatków. Wprowadzane dodatki to mikroceluloza różnego rodzaju – różniąca się głównie rozmiarem cząstek – oraz nanosrebro. W celu wytworzenia biokompozytów z cząstkami mikrocelulozy, wprowadzano je do metalocenowego liniowego polietylenu niskiej gęstości mLLDPE. Etap drugi wytwarzania badanych folii polegał na tym, że uprzednio wytworzone półprodukty w GIG na bazie polimeru EVA z wprowadzonym nanosrebrem zastosowano jako materiał bazowy na warstwę A badanych folii. z kolei mLLDPE i różne rodzaje mikrocelulozy zastosowano jako materiał bazowy na warstwę B. Natomiast etap trzeci obejmował ocenę przydatności folii i jakości kiszonki wykorzystywanej w żywieniu bydła w Ośrodku Hodowli Zarodowej w Osieku Sp. z o.o.

Badana folia była trójwarstwowa, o grubości 25µm. Warstwy folii oznaczono literami A, B i C. Warstwa A wytworzona na bazie kopolimeru etylenu i octanu winylu EVA (EVA – Etylen / Octan Winylu stanowił około 15% grubości folii – warstwa wewnętrzna). Do warstwy tej był również w niewielkiej ilości (maksymalnie 5%) wprowadzany PIB poliizobutylen, dodatek tego tworzywa nadaje folii cechę kleistości. Warstwa B stanowiła około 70% grubości folii – była to warstwa środkowa odpowiedzialna głównie za wytrzymałość folii oraz jej barierowość. Warstwa ta była wytworzona z mieszaniny mLLDPE (metalocenowy liniowy polietylen niskiej gęstości) o różnej gęstości oraz wprowadzano do niej również niewielką ilość PIB. Warstwa C stanowiła około 15% grubości i wytworzona była na bazie mLLDPE, a wprowadzane do niej były dodatki stabilizujące poprawiające odporność folii na promieniowanie UV.

W prowadzonych badaniach wykorzystano 6 rodzajów folii wytworzonych w ramach projektu różniących się rodzajem zastosowanej mikrocelulozy i nanosrebra oraz jako odniesienie folię handlową:

P1 – z zastosowaniem materiału z naniesionym nanosrebrem,

P2 – z zastosowaniem materiału z naniesionym nanosrebrem oraz z dodatkiem 5% mikrocelulozy F16,

P3 – z zastosowaniem materiału z naniesionym nanosrebrem oraz z dodatkiem 5% mikrocelulozy F17,

P4 – z dodatkiem 5% mikrocelulozy F16,

P5 – z dodatkiem 5% mikrocelulozy F17,

P6 – z dodatkiem 5% mikrocelulozy F18,

P7 – folia handlowa.

W tabelach rodzaje folii są oznaczone symbolami od P1 do P7.

Kiszonkę wytworzono w czerwcu 2016 roku w balotach z podwiedniętej zielonki, które owijano powyższymi rodzajami folii. Dominującymi gatunkami roślin w zakiszczonym materiale były: życica wielokwiatowa (*Lolium multiflorum*) 67%, życica trwała (*Lolium perenne* L.) 13%, kostrzewa czerwona (*Festuca rubra* L.) 4%, wiechlina zwyczajna

(*Poa trivialis* L.) 4%, koniczyna biała (*Trifolium repens* L.) 12%. Uformowano po 10 balotów każdego wariantu zastosowanej folii. Z zakiszonego materiału pobierano próbki do analiz laboratoryjnych w trzech następujących terminach:

- analiza 1 w dniu 16.11.2016,
- analiza 2 w dniu 21.04.2017,
- analiza 3 w dniu 09.10.2017,

co odpowiada 140, 300 i 460 dniom od okresu sporządzenia kiszonki do okresu otwarcia balotu. W pobranych próbkach oznaczono suchą masę metodą suszarkowo-wagową w temperaturze 105°C. Białko ogólne oznaczono metodą pośrednią, polegającą na tym, że mnożono otrzymaną ilość azotu ogólnego przez współczynnik przeliczeniowy – 6,25. Włókno surowe oraz popiół surowy oznaczono wagowo. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z uwzględnieniem jednoczynnikowej analizy wariancji i testu NIR przy poziomie istotności $\alpha < 0,05$, wykorzystując program Statistica 7.

Wyniki i dyskusja

Sucha masa

Zawartość suchej masy w ocenianych kiszoncek przedstawiono w tabeli 1. Zawartość suchej masy w czasie pierwszej oceny wahała się od 41,4% do 51,5%. Najniższą wartością cechowała się kiszoncek w folii handlowej, natomiast najwyższą zawartość suchej masy zawierała kiszoncek owinięta folią P2. W drugim okresie badawczym w większości kiszoncek P2, P3, P4, P5, P6 zawartość suchej masy obniżyła się w odniesieniu do wartości w czasie pierwszej oceny. Natomiast w pozostałych rodzajach kiszoncek zaobserwowano wzrost zawartości suchej masy. Z kolei w trzecim okresie badawczym dla większości kiszoncek zaobserwowano wyraźne zwiększenie się zawartości suchej masy, za wyjątkiem kiszoncek P1, gdzie stwierdzono zależność odwrotną. Średnio za trzy okresy badawcze zawartość suchej masy w większości kiszoncek była podobna, jedynie nieznacznie wyższą zawartością cechowała się kiszoncek wyprodukowana w wariacie P4, a wyraźnie niższą zawartością cechowała się kiszoncek przygotowanych sianokiszoncek zawartość suchej masy powinna zmieścić się w zakresie od 35% do 40% [Purwin 2007].

Tabela 1. Zawartość suchej masy [%]

Rodzaj użytej folii	Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Średnia
P1	42,7	52,5	44,0	46,4
P2	51,5	42,8	44,8	46,4
P3	45,6	43,6	50,0	46,4
P4	49,5	42,7	52,1	48,1
P5	42,5	34,7	45,5	40,9
P6	45,5	44,6	47,0	45,7
P7	41,4	46,0	50,0	45,8
NIR, $\alpha < 0,05$	3,10	4,20	2,60	–

Białko ogólne

Zawartość białka ogólnego w pobranych próbkach średnio z trzech okresów badawczych kształtowała się w przedziale od 12,9% do 13,9% (tab. 2). Najniższa zawartość białka ogólnego była w wariancie P2 w drugim okresie badawczym i wynosiła 11,9%. Najwyższa zawartość białka ogólnego była w wariancie P1 i P4 w drugim okresie badawczym i była wyższa o 20%. Podobną zawartość białka w materiale zakiszonym przy użyciu folii nowej generacji uzyskano w balotach owiniętych folią handlową. Zawartość białka ogólnego w kiszonce jest zależna między innymi od gatunku roślin, odmiany, terminu zbioru, sposobu zakiszenia. Dobrej jakości kiszonka lub sianokiszonka powinna stanowić źródło białka i pokrywać zapotrzebowanie w żywieniu zimowym zwierząt. Przyjmuje się, iż w kiszonkach dobrej jakości zawartość białka ogólnego powinna stanowić około 14–17% w suchej masie [Falkowski i in. 2000].

Tabela 2. Zawartość białka ogólnego [%]

Rodzaj użytej folii	Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Średnia
P1	13,5	14,3	14,0	13,9
P2	13,1	11,9	13,8	12,9
P3	12,6	12,8	13,6	13,0
P4	12,5	14,3	12,1	13,0
P5	13,8	13,8	13,3	13,6
P6	14,1	13,6	12,7	13,5
P7	12,6	13,3	13,5	13,1
NIR, $\alpha < 0,05$	1,10	1,10	1,20	–

Włókno surowe

Zawartość włókna surowego w badanych próbkach przedstawiono w tabeli 3. Średnią najniższą zawartością włókna surowego cechowała się kiszonka wariantu P2 i P7. Najwięcej włókna surowego zawierała kiszonka wariantu P6. Różnice w zawartości włókna surowego wahały się od 28,1% do 30,0%. W analizowanych okresach przechowywania zawartość włókna surowego była zbliżona. W badanym materiale zawartość tego składnika znacznie przewyższała wartość optymalną 23–26% w suchej masie [Podkówka i in. 1993].

Tabela 3. Zawartość włókna surowego [%]

Rodzaj użytej folii	Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Średnia
P1	29,6	28,7	29,5	29,3
P2	27,3	28,6	28,4	28,1
P3	28,7	31,4	25,5	28,5
P4	30,8	28,7	28,3	29,3
P5	28,7	29,8	29,8	29,4
P6	27,2	32,3	30,4	30,0
P7	29,5	28,5	28,4	28,8
NIR, $\alpha < 0,05$	1,90	1,70	2,00	–

Popiół surowy

Zawartość popiołu surowego wahała się średnio w czasie przechowywania w trzech okresach od 8,17% w kiszonce wariantu P3 i P1 do 10,0% i 10,8% w kiszonce wariantu P7 i P5 (tab. 4). Najwyższą zawartość popiołu surowego stwierdzono w większości kiszzonek w drugim okresie przechowywania. Zawartość popiołu surowego we wszystkich analizowanych próbach w przedziale od 7,5% do 12,9%, co świadczy o starannie wykonanych pracach związanych ze zbiorem materiału przeznaczonego do zakiszania. Według Kasperczyka [1987] w miarę starzenia się roślin następuje wzrost zawartości suchej masy, włókna surowego, popiołu surowego a spadek zawartości białka ogólnego.

Tabela 4. Zawartość popiołu surowego [%]

Rodzaj użytej folii	Analiza 1	Analiza 2	Analiza 3	Średnia
P1	9,10	7,70	7,80	8,20
P2	8,50	9,70	9,90	9,37
P3	7,50	7,90	9,10	8,17
P4	8,50	9,70	11,30	9,83
P5	10,60	12,90	8,90	10,80
P6	10,20	7,90	7,70	8,60
P7	9,90	10,80	9,40	10,03
NIR, $\alpha < 0,05$	0,80	1,00	0,70	–

Wnioski

1. Wyprodukowana kiszonce przy użyciu folii nowej generacji może być przechowywana nawet przez kilkanaście miesięcy bez ryzyka straty składników pokarmowych w paszy.
2. Zawartość białka ogólnego, suchej masy, włókna surowego była stosunkowo niska w odniesieniu do wymagań pokarmowych zwierząt. Było to wynikiem późnego zbioru materiału.
3. Stwierdza się, że kierunek badań nad zmodyfikowanymi foliami jest słuszny, ponieważ folie nie wpłynęły negatywnie na jakość kiszonce.

Bibliografia

- Bodarski R., Wertelecki T., Kowalik T. 2005. Wpływ chemicznych dodatków na skład chemiczny, jakość i tlenową trwałość kiszonce z całych roślin kukurydzy. Pam. Puł. 140, 7–14.
- Falkowski M., Kukułka I., Kozłowski S., 2000. Właściwości chemiczne roślin łąkowych. Wydaw. AR, Poznań, 132.
- Kasperczyk M., 1987. Ważniejsze problemy gospodarki pastwiskowej w rejonie podgórskim i górskim. Cz. IV. Zawartość składników mineralnych. Zesz. Nauk. AR w Krakowie, Rol. 27, 153–189.
- Podkówka W., Potkański A., 1993. Wpływ czynników chemicznych i fizycznych na przydatność pasz do zakiszania. Post. Nauk Rol. 40, 29–42.

- Purwin C., 2007. Jakość kiszonek z traw i mieszanek traw z roślinami motylkowatymi produkowanymi prasami, Wyd. UWM w Olsztynie.
- Sherwood B.E., Becker J. W., 1998. A new class of high – functionality excipients: Silicified microcrystalline cellulose. Pharm. Tech. 22, 10, 79–88.
- Świdwińska-Gajewska A., Czerczak S., 2015. Nanosrebro – dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego. Med. Pr. 66 (3), 429–442.
- Wzorek, Z., Konopka, M., 2007. Nanosrebro – nowy środek bakteriobójczy. Czas. Tech. Chemia, Wyd. Politechniki Krakowskiej 1, 175–181.

Identyfikacja genów *Lr10* i *Lr19* warunkujących odporność pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) na rdzę brunatną w polskich odmianach tego zboża

Identification of the *Lr10* and *Lr19* genes determining the resistance of common wheat (*Triticum aestivum* L.) to leaf rust in Polish cultivars of this cereal

Rdze są chorobami liści i źdźbeł traw wywoływanych przez grzyby z rodziny rdzowatych (*Pucciniaceae*). Grzyby należące do rodzaju *Puccinia* atakowały pszenicę od tysięcy lat – wzmianki o chorobie powodowanej przez te patogeny można znaleźć w literaturze klasycznej Grecji i Rzymu oraz w Biblii [Chester 1946, Zadoks 2008]. W naszym kraju największym bodźcem do rozpoczęcia badań nad rozwojem rdzy stała się klęska rdzy z 1932 roku, która doprowadziła do zniszczenia dużej części uprawy pszenicy [Zamorski i in. 2001]. Rdze stały się głównymi chorobami, które mają bardzo istotne znaczenie gospodarcze [Dubin i Brennan 2009]. Istnieją trzy różne choroby powodowane przez różne gatunki rdzy, które atakują pszenicę – rdza brunatna (wywołana przez *P. triticensis*), rdza żółta (wywołana przez *P. striiformis*) oraz rdza źdźbłowa (wywołana przez *P. graminis*). Wśród nich najbardziej rozpowszechnioną jest rdza brunatna, która stanowi największe zagrożenie dla polskich zbóż. Choroba występuje corocznie w mniejszym lub większym stopniu na pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) w zależności od warunków pogodowych [Woźniak-Strzembicka i Czajowski 2009, Czajowski i in. 2011, 2016]. Przewiduje się, że globalne średnie roczne straty wynoszą 8,6 miliona ton metrycznych ziarna, co odpowiada stratom ekonomicznym około 1,5 miliarda dolarów rocznie [Chai i in. 2020]. Ogólnoswiatowe inwestycje w badania nad rdzą brunatną są więc ekonomicznie uzasadnione.

Najlepszym sposobem na ograniczenie strat plonu zbóż jest wykorzystywanie genetycznej odporności. Według Czembora i in. [2019] tylko poznanie czynników chorobotwórczych może się przyczynić do prawidłowego wykorzystania genów odporności w efektywny sposób. Patogeny wymagają stałego obserwowania ze względu na zmienności, które mogą zachodzić w wyniku migracji, mutacji i rekombinacji oraz ze względu na czynniki wpływające na frekwencję występowania patogenu, takie jak temperatura czy wilgotność.

Geny R należą do grupy genów odpowiedzialnych za przekazywanie dziedzicznej odporności na patogeny. Ich działanie opiera się na mechanizmie obronnym polegającym na reakcji produktu genu R z produktem genu awirulencji. Efektem odporności typu „gen na gen” jest reakcja nadwrażliwości, która powoduje degradację zainfekowanej tkanki i zahamowanie dalszego rozprzestrzeniania się patogenu. W genetyce odpornościowej wyróżnia się dwa rodzaje odporności: monogeniczną warunkowaną przez pojedyncze geny R, zwykle specyficzną wobec danej rasy patogenu, oraz poligeniczną warunkowaną wieloma genami, niespecyficzną w stosunku do rasy patogena [Pietrusińska i Czembor

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, SKN Biotechnologów, Sekcja Biotechnologii Roślin, o.bociankiewicz1@gmail.com

2015, Tomczyńska i Śliwka 2011]. W pszenicy geny odporności na rdzę brunatną nazywane są genami „Lr” od angielskiego „Leaf rust”. Do tej pory udało się oznaczyć około 80 genów odporności na rdzę brunatną [McIntosh i in. 2017]. Liczba efektywnych genów odporności na patogen rdzy brunatnej z roku na rok maleje w wyniku wysokiej zmienności genetycznej patogenu, który może tę odporność przełamać [Huseynova i in. 2013]. Rdza brunatna odznacza się wysokim poziomem zmienności genetycznej i szeroką adaptacją do warunków klimatycznych [Strzembicka i Czajowski 2013, Woźniak-Strzembicka i Czajowski 2009]. Optymalnymi warunkami rozwoju rdzy brunatnej jest temperatura powietrza w zakresie 12,5–25°C, przy czym maksimum jest osiąganę w zakresie 15–18°C. Wpływ ma również wysoka wilgotność powietrza, zbyt płytka orka, niedobór składników pokarmowych, takich jak potas oraz zbyt częste stosowanie nawozów azotowych [Fiedorow i Weber 1998, Hołubowicz-Kliza i Korbas 2012].

Gen *Lr19* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7D wprowadza się do pszenicy zwyczajnej na drodze translokacji z *Agropyron elongatum* [Prins 1997]. Translokowany segment zawierający gen *Lr19* nie może połączyć się z homologicznym ramieniem chromosomu 7DL podczas mejozy, co prowadzi do introdukcji genu jako pojedynczego bloku [Prins 1997]. Jest to jeden z niewielu szeroko efektywnych genów nadających odporność na rdzę brunatną liści pszenicy [Huseynova i in. 2013]. W celu nadania długotrwałej odporności na rdzę brunatną najlepiej stosować gen *Lr19* w kombinacji z innymi genami odporności na ten patogen [Pink 2002].

Gen odporności *Lr10* zlokalizowany jest na chromosomie 1AS. Gen koduje białko CC-NBS-LRR posiadające N-końcową domenę podlegającą silnej selekcji różnicującej [Feuillet i in. 2003, Loutre i in. 2009]. Gen *Lr10* został pierwotnie zgłoszony w australijskich odmianach pszenicy Lee i Timstein. Gen *Lr10* nie jest szeroko skuteczny sam w sobie, ale może odgrywać pozytywną rolę w kombinacjach z innymi genami odporności na rdzę brunatną [McIntosh 1995].

Najskuteczniejszym sposobem identyfikacji obecności określonych genów w materiale roślinnym jest wykorzystywanie markerów molekularnych opartych na DNA. Markery molekularne to łatwo rozpoznawalne znaczniki sprzężonych z nimi cech fenotypowych często o znaczeniu użytkowym [Bednarek i Chwedorzewska 2001]. Są doskonałymi narzędziami do identyfikacji cech ilościowych i podziału tych złożonych cech na geny w postaci loci cech ilościowych (QTL), jak również do ustalania genomowych lokalizacji takich loci genetycznych. Markery można podzielić na grupy. Pierwsza z nich opiera się na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), natomiast druga opiera się o hybrydyzację [Jones i in. 2009]. Oprócz tego występują również markery bazujące na DNA jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym, które dzielą się na dominujące i kodo-minujące. System SCAR (ang. *Sequence Characterized Amplified Regions*) oparty jest na analizie polimorfizmu sekwencyjnie charakteryzowanych regionów DNA. Jest to technika polegająca na sekwencjonowaniu końcowych odcinków produktu RAPD, na podstawie których projektowane są startery o długości 22–30 pz. Ich zastosowanie dotyczy amplifikacji specyficznego locus. Użyty w badaniu system markerowy SCAR identyfikuje różnice sekwencyjne, które dziedziczą się dominacyjnie. Dzięki kontynuowaniu analizy systemem markerowym SCAR, przydatność markerów RAPD wzrasta. System może również służyć do określania homo- i heterozygotyczności analizowanego osobnika [Sztuba-Solińska 2005].

Celem pracy była identyfikacja genów *Lr10* i *Lr19*, warunkujących odporność na rdzę brunatną w wybranych polskich odmianach *Triticum aestivum* L. z wykorzystaniem sekwencyjnie specyficznych markerów molekularnych.

Material i metody

Przedmiotem badań było 18 polskich odmian pszenicy zwyczajnej oraz 3 próby kontrolne pochodzące z odmiany Thatcher: forma niezawierająca genów *Lr* (T1) oraz dwie linie izogeniczne z wprowadzonymi genami *Lr10* i *Lr19* (T9 i T19).

Przygotowanie ziarniaków polegało na poddaniu ich sterylizacji przez pozostawienie w 70% roztworze etanolu przez minutę, 25% roztworze podchlorynu sodu przez 15 min oraz poprzez trzykrotne przemywanie po 5 min w wodzie destylowanej. Wysterylizowane ziarniaki przeniesiono na szalki Petriego wyłożone wilgotną bibułą w ilości 30 sztuk (kontrolne po 5 sztuk). Ziarniaki inkubowano w kiełkowniku w temperaturze 25°C przez 7 dni bez dostępu do światła.

Izolacja DNA została przeprowadzona z siedmiodniowych siewek za pomocą zestawu GeneMATRIX Plant&Fungi DNA Purification Kit (EurX), zgodnie z procedurą dołączoną do zestawu. Stężenie wyizolowanych preparatów DNA oraz ich czystość oznaczono na spektrofotometrze NanoDrop 2000 firmy Thermo Scientific, a ocenę jakości DNA za pomocą elektroforezy agarozowej. Elektroforeza została przeprowadzona na elektroforezrze Agagel Maxi Biometra na 2% żelu agarozowym z zawartością 15 µl bromku etydyny przez godzinę przy napięciu 120 V.

Następnie wszystkie próbki doprowadzono do jednakowego stężenia DNA 20 ng/µl przez rozcieńczenie sterylną wodą dejonizowaną. PCR przeprowadzono na termocyklerze T Professional firmy Biometra.

Identyfikację genu *Lr10* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów Lrk10D1/Lrk10D2 o sekwencjach:

F: 5'-GAA GCC CTT CGT CTC ATC TC-3'

R: 5'-TTG ATT CAT TGC AGA TGA GAT CA-3'

Mieszanina reakcyjna składała się z: 12,5 µl buforu do PCR ColorTaq PCR Mastermix (EurX), 0,5 µl każdego ze starterów, 8,5 µl wody destylowanej oraz 60 ng wyizolowanego DNA przy następującym profilu termicznym: wstępna denaturacja przez 5 min w 94°C, 35 cykli: 94°C – 1 min, 52°C – 1 min, 72°C – 1 min, końcowa inkubacja 7 min w 72°C.

Identyfikację genu *Lr19* przeprowadzono z wykorzystaniem starterów GbF i GbR o sekwencjach:

F: 5'-CAT CCT TGG GGA CCT C-3'

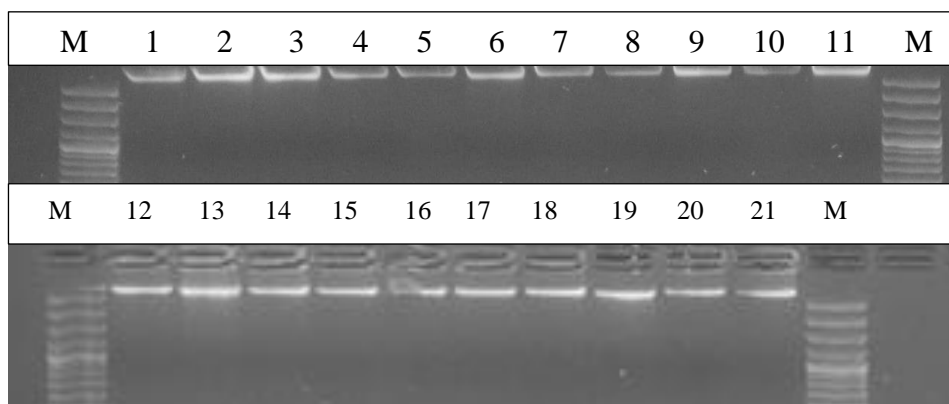
R: 5'-CCA GCT CGC ATA CAT CCA -3'

Mieszanina reakcyjna składała się z: 12,5 µl buforu do PCR ColorTaq PCR Mastermix EurX, 0,5 µl każdego ze starterów, 8,5 µl wody destylowanej oraz 60 ng wyizolowanego DNA przy następującym profilu termicznym: wstępna denaturacja przez 5 min w 94°C, 35 cykli: 94°C – 1 min, 52°C – 1 min, 72°C – 1 min, końcowa inkubacja 7 min w 72°C.

W celu wizualizacji wyników otrzymanych w reakcji PCR ampliconów przeprowadzono elektroforezę na żelu agarozowym o stężeniu 2% zawierającym 15 µl bromku etydyny w buforze 1×TBE przez godzinę w napięciu 120 V. Otrzymane wzory rozdziałów wizualizowano na transiluminatorze UVP Transilluminator PLUS firmy AnalytikJena.

Wyniki i dyskusja

Po wykonaniu pomiaru spektrofotometrycznego próbek izolowanego DNA i elektroforezy na żelu agarozowym określono, że materiał genetyczny charakteryzuje się dobrą czystością i jakością (tab. 1, ryc. 1).



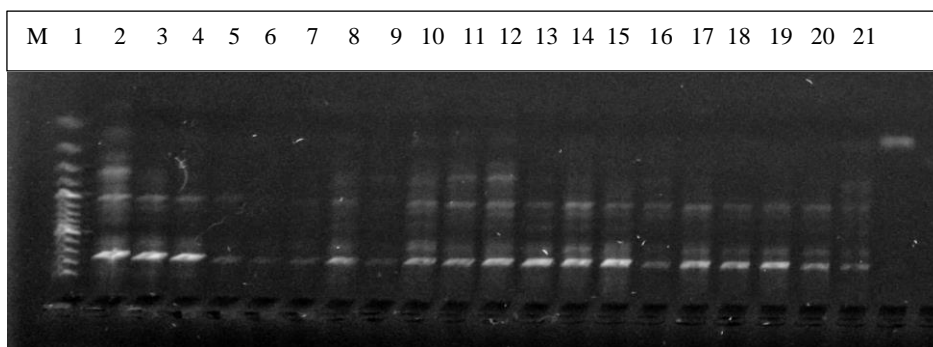
Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów PCR w 2% żelu agarozowym przed włączeniem do reakcji starterów: 1) Begra 2) Fregata 3) Dana 4) Turnia 5) Rubens 6) Bogatka 7) Aria 8) Holme 9) Naridana 10) Sukces 11) Beta 12) Asta 13) Grana 14) Panda 15) Trend 16) Boomer 17) Alcazar 18) Anthus 19) T1 20) T9 21) T19

Po włączeniu do PCR starterów Lrk10D1 i Lrk10D2 o obecności w badanym materiale genu *Lr10* świadczy produkt amplifikacji o długości 286 pz. Dostrzegalny produkt tej wielkości można było zaobserwować w pięciu odmianach (Begra, Aria, Naridana, Sukces i Beta) oraz w formie kontrolnej Thatcher T9. W pozostałych badanych genotypach nie zaobserwowano obecności produktów o oczekiwanej wielkości (ryc. 2).

Po włączeniu do PCR starterów GbF i GbR dla wszystkich badanych form otrzymano produkty o wielkości ok. 200 pz. Oczekiwany produkt świadczący o obecności genu *Lr19* ma długość 300 pz. Analiza uzyskanych danych wskazuje, że uzyskany produkt jest niespecyficzny i nie można na jego podstawie wnioskować o obecności genu odporności *Lr19* w badanym materiale. Ponadto produkt ten uzyskano w obu formach kontrolnych, zarówno zawierającej, jak i niezawierającej genu odporności (odpowiednio T19 i T1) (ryc. 3). Uzyskany wynik sugeruje konieczność wykonywania walidacji i optymalizacji markera dla genu *Lr19* w oparciu o parę starterów GbF i GbR przed ich dalszym wykorzystaniem.

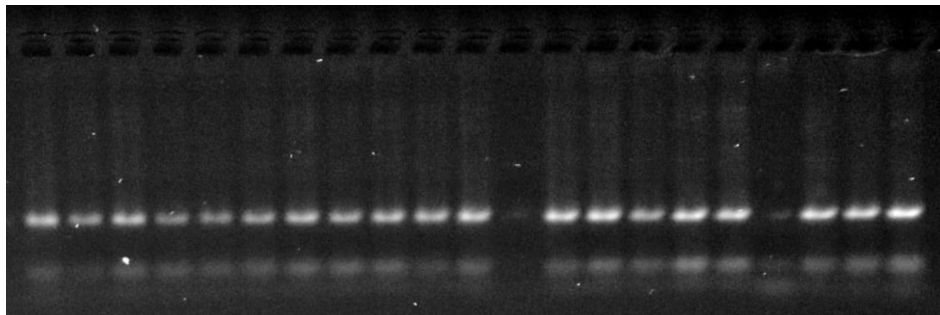
Tabela 1. Wyniki przeprowadzone na NanoDropie pod względem stężenia DNA w próbkach

Odmiana pszenicy zwyczajnej	Stężenie DNA [ng/μl]	A260	A280	260/280	260/230
Begra	61,4	1,228	0,645	1,9	1,92
Fregata	60	1,201	0,627	1,91	1,99
Dana	56,9	1,139	0,635	1,79	1,76
Turnia	21,9	0,437	0,236	1,85	1,53
Rubens	20,8	0,416	0,219	1,9	1,51
Bogatka	28	0,559	0,298	1,88	1,73
Aria	37,5	0,75	0,391	1,92	1,84
Holme	19,9	0,398	0,215	1,85	1,65
Naridana	34,2	0,683	0,36	1,9	1,62
Sukces	36	0,72	0,37	1,94	2,02
Beta	44,3	0,887	0,469	1,89	1,81
Asta	43,4	0,868	0,451	1,93	1,83
Grana	89,8	1,796	0,946	1,9	2,14
Panda	47,2	0,943	0,497	1,9	1,76
Trend	36,1	0,721	0,378	1,91	1,98
Boomer	38,3	0,767	0,404	1,9	1,82
Alcazar	33,4	0,668	0,339	1,97	1,89
Antchus	35,1	0,701	0,37	1,9	1,83
T1	41,8	0,836	0,438	1,91	1,94
T9	25,3	0,506	0,269	1,88	1,82
T19	36	0,721	0,372	1,94	1,89



Ryc. 2. Obraz elektroforetyczny produktów PCR w 2% żelu agarozowym po włączeniu do reakcji starterów Lrk10D1 i Lrk10D2: 1) Begra 2) Fregata 3) Dana 4) Turnia 5) Rubens 6) Bogatka 7) Aria 8) Holme 9) Naridana 10) Sukces 11) Beta 12) Asta 13) Grana 14) Panda 15) Trend 16) Boomer 17) Alcazar 18) Anthus 19) T1 20) T9 21) T19

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21



Ryc. 3. Obraz elektroforetyczny produktów PCR w 2% żelu agarozowym po włączeniu do reakcji starterów GbF i GbR: 1) Begra 2) Fregata 3) Dana 4) Turnia 5) Rubens 6) Bogatka 7) Aria 8) Holme 9) Naridana 10) Sukces 11) Beta 12) Asta 13) Grana 14) Panda 15) Trend 16) Boomer 17) Alcazar 18) Anthus 19) T1 20) T9 21) T19

Wnioski

1. W pięciu polskich odmianach pszenicy zwyczajnej – Begra, Aria, Naridana, Sukces oraz Beta stwierdzono obecność produktu amplifikacji o wielkości 282 pz świadczącego o występowaniu genu odporności na rdzę brunatną *Lr10*.
2. Na podstawie uzyskanych wyników badań niemożliwe było stwierdzenie obecności genu *Lr19* w testowanych odmianach pszenicy zwyczajnej.
3. Wykorzystany marker dla genu *Lr19*, oparty na parze starterów GbF i GbR. wymaga wykonania walidacji i optymalizacji przed jego aplikacją.

Bibliografia

- Bednarek P.T., Chwedorzewska K., 2001. Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej. *Biotechnologia* 1, 52, 3–34.
- Chester, K. S., 1946. *The Nature and Prevention of the Cereal Rusts as Exemplified in the Leaf Rust of Wheat*. Chronica Botanica, Waltham (Massachusetts).
- Czajowski G., Czembor P., Radecka-Janusik M., 2016. Wirulencja *Puccinia triticina* sprawcy rdzy brunatnej pszenicy w Polsce w latach 2013-2015. *Biul. IHAR* 280, 13–21.
- Czajowski G., Strzembicka A., Karska K., 2011. Wirulencja populacji *Puccinia triticina* sprawcy rdzy brunatnej pszenicy i pszenżyta w Polsce w latach 2008–2010. *Biul. IHAR* 260/261, 145–153.
- Czembor P.C., Czajowski G., Słowacki P., 2019. Nowe wyzwania dla hodowli odpornościowej na przykładzie rdzy zbóż. *Biul. IHAR* 285, 101–102.
- Dubin H., Brennan J., 2009. Combating stem and leaf rust of wheat: Historical perspective, impacts, and lessons learned. D.C. International Food Policy Research Institute (IFPRI), Washington.
- Feuillet C., Travella S., Stein N., Albar L., Nublát A., Kellet B., 2003. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *PNAS* 100, 15253–15258, <https://doi.org/10.1073/pnas.2435133100>

- Fiedorow Z., Weber Z., 1998. Choroby roślin uprawnych. Medix Plus, Poznań.
- Hołubowicz-Kliza G., Korbas M., 2012. Rolniczy atlas chorób. IUNG-PIB, Puławy.
- Huseynova I.M., Guliyeva F.B., Rustamova S.M., Aliyev J.A., 2013. PCR – based molecular markers linked to the leaf rust resistance gene Lr19 in different bread wheat cultivars. *Advances in Biological Chemistry* 3, 153-158. <https://doi.org/10.4236/abc.2013.31019>
- Jones N., Ougham H., Thomas H., Pašakinskienė I., 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol.* 183, 935–966. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02933.x>
- Loutre C., Wicker T., Travella S., Galli P., Scofield S., Fahima T., Feuillet C., Keller B., 2009. Two different CC-NBS-LRR genes are required for Lr10-mediated leaf rust resistance in tetraploid and hexaploid wheat. *Plant J.* 60, 1043–1054. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.04024.x>
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F., 1995. *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. CSIRO, Melbourne.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W. J., Morris C., Xia X., 2017. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2017 supplement, <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf> [dostęp: 20.09.2017].
- Pietrusińska A., Czembor J. H., 2015. Piramidyżacja genów – powszechne narzędzie używane w programach hodowlanych. *Biuletyn IHAR* 278, 3–15.
- Pink D.A., 2002. Strategies using gene for non durable disease resistance. *Euphytica*. 124, 227–236, <https://doi.org/10.1023/A:1015638718242>
- Prins R., Marais G., Pretorius Z., Janse B., Marais A., 1997. A study of modified forms of the Lr19 translocation of common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 95, 424–430, <https://doi.org/10.1007/s001220050579>
- Sztuba-Solińska J., 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych* 54, 2–3.
- Strzembicka A., Czajowski G., Karska K., 2013. Charakterystyka materiałów hodowlanych pszenicy ozimej pod względem odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*). *Biul. IHAR* 268, 7–14.
- Tomczyńska I., Śliwka J., 2011. Piramidyżacja genów odporności w roślinach uprawnych. *Biul. IHAR* 262, 77–88.
- Woźniak-Strzembicka A., Czajowski G., 2009. Wirulencja populacji *Puccinia triticina* w Polsce w latach 2002–2007. *Biul. IHAR* 253, 175–183.
- Chai Y., Philip G., Terrance M., Senait D., Jason M., 2020. A Probabilistic Bio-Economic Assessment of the Global Consequences of Wheat Leaf Rust. *Phytopathology* 110(12), 1886–1896, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0032-R>
- Zadoks, J. C., 2008. *On the political economy of plant disease epidemics: Capita selecta in historic epidemiology*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Zamorski C., Nowicki B., Wakuliński W., Schollenberger M., 2001. Źródła odporności na rdzę żółtą, rdzę brunatną i rdzę źdźbłową w polskich materiałach hodowlanych pszenicy. *Biul. IHAR* 218/219, 137–145.

Zmiany w handlu tradycyjnym i elektronicznym w Polsce w latach 2017–2020

Analysis of traditional and electronic trade sector in Poland in years 2017–2020

Handel jako proces gospodarczy, który polega na sprzedaży, wymianie dóbr i usług na pieniądze, jest stale rewolucjonizowany. Ma on wiele definicji, jednak każda z nich skupia się na transakcjach obrotu. Jest uznawany nie tylko za przyczynę, ale również za wynik wymiany produktowo-pieniężnej [Szumilak 2004]. Wpływ na zmiany zachodzące w tym sektorze ma wiele zróżnicowanych czynników. Wszechobecny postęp technologiczny, społeczny czy ekonomiczny zostawia po sobie ślad w każdym z sektorów gospodarki.

Handel zarówno w Polsce, jak i na świecie jest szeroko rozbudowaną branżą. Aktualnie sprzedaje się wiele różnych produktów i usług, których z roku na rok ciągle przybywa. Kanały dystrybucji również ulegają przekształceniom. Jeszcze kilka lat temu możliwa była wyłącznie sprzedaż tradycyjna, czyli taka, która skupiała się na transakcjach za pośrednictwem sklepów lub sprzedaży katalogowej. Aktualnie coraz większą popularność zyskuje sprzedaż internetowa, która dzięki nowoczesnym rozwiązaniom technologicznym pozwala odpowiedzieć na te potrzeby konsumentów, które jeszcze kilka lat temu były bardzo trudne lub niemożliwe do zaspokojenia. Wyróżnić można cztery podstawowe kanały sprzedaży – pierwszy z nich dotyczy transakcji zachodzących bezpośrednio pomiędzy producentem a nabywcą produktu. Pozostałe kanały wyróżniają się formą pośrednią, kiedy to w transakcjach uczestniczą jeszcze inne ogniwa handlowe [Pabian 2017].

Artykuł ma na celu przedstawienie w sposób teoretyczno-empiryczny procesu zmian jakie następowały w handlu elektronicznym oraz tradycyjnym w latach 2017–2020 z uwzględnieniem analizy danych statystycznych.

Ogólne dane gospodarki handlowej Polski w latach 2017–2020

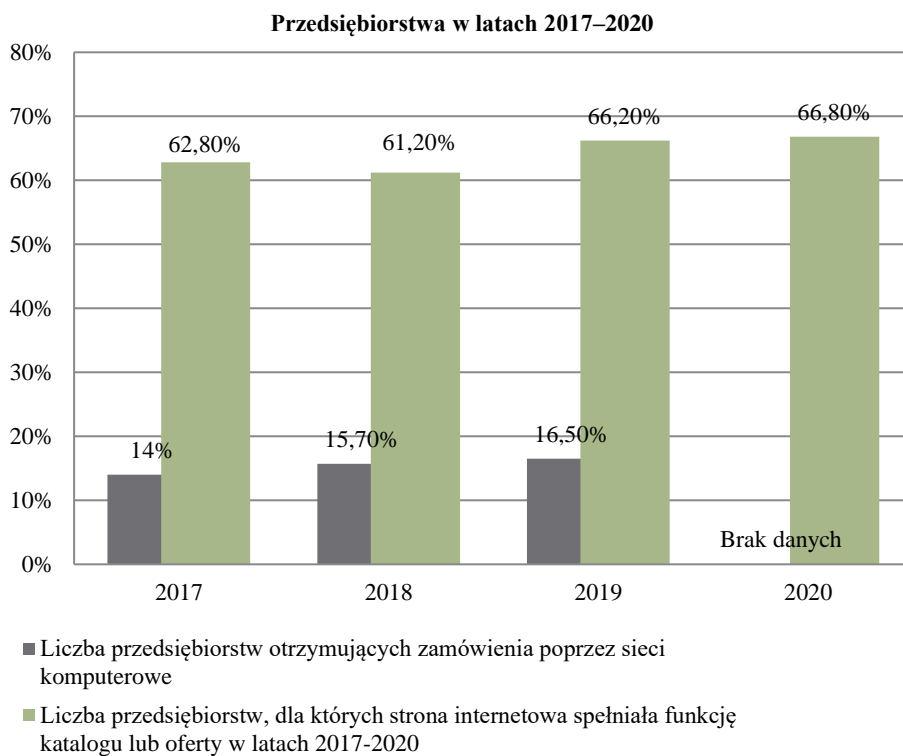
Na przestrzeni lat polska gospodarka handlowa przeszła wiele zmian, jedną z nich jest wykorzystanie sieci komputerowej. Jak wynika z danych Głównego Urzędu Statystycznego, w 2019 roku w Polsce dostęp do Internetu miało 86,7% gospodarstw domowych, a w 2020 roku liczba ta wzrosła do 90,4%. Tak rosnąca liczba użytkowników Internetu wywołuje niezbędne zmiany, jakie przedsiębiorstwa muszą wprowadzać. Stąd też, aby przyjrzeć się zmianom polskiej gospodarki handlowej w latach 2017–2020, wykorzystano dane dostępne na stronie internetowej Głównego Urzędu Statystycznego [GUS 2020].

Analizując dane gospodarki handlowej warto zauważyć, iż wiele przedsiębiorstw korzysta ze stron internetowych w celu prezentacji swoich produktów. Dane dotyczące

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Inżynierii Produkcji, Studenckie Koło Naukowe Zarządzania i Ekonomii, klaudia.nowakk.98@gmail.com

przedsiębiorstw w wybranym okresie nieznacznie się zmieniały. Liczba firm, dla których strona internetowa spełniała funkcję katalogu lub oferty, kolejno wynosiła dla roku: 2017 – 62,80%, 2018 – 61,20%, 2019 – 66,20%, a dla roku 2020 – 66,80%.

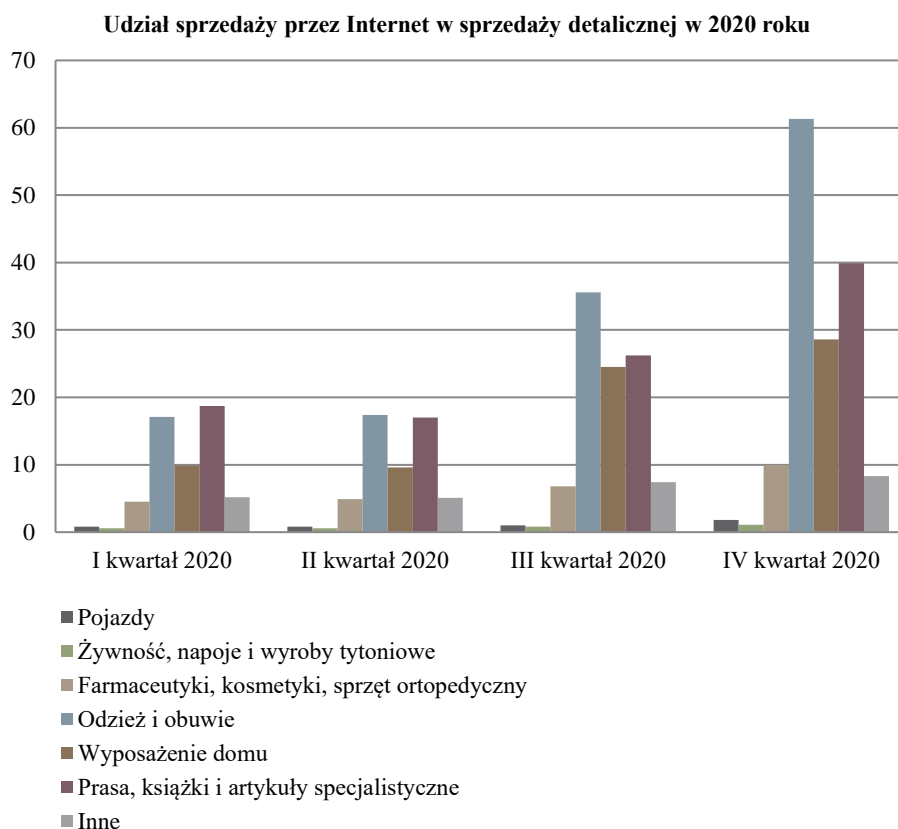
Następnie należy zwrócić uwagę na liczbę przedsiębiorstw, które otrzymywały zamówienia poprzez sieci komputerowe, czyli strony internetowe, oraz systemy typu EDI. Z powodu braku danych z 2020 roku nie jest możliwe określenie, czy tendencja wzrostowa, wykazywana w latach 2017–2019 utrzymuje się nadal, co można dostrzec na rycinie 1.



Ryc. 1. Liczba przedsiębiorstw otrzymujących zamówienia poprzez sieci komputerowe oraz liczba przedsiębiorstw, dla których strona internetowa spełniała funkcję katalogu lub oferty w latach 2017–2020. Opracowanie własne na podstawie danych GUS

Rozważając wykorzystywanie e-commerce w handlu detalicznym, warto skupić się na 2020 roku. Ze względu na pandemię COVID-19 handel internetowy zyskał szansę na szybszy rozwój. Jak wynika z danych Głównego Urzędu Statystycznego, ogólny udział sprzedaży przez Internet w sprzedaży detalicznej wzrósł dwukrotnie z 5,6% w pierwszym kwartale na 11,9% w ostatnim kwartale. Największy wzrost tego udziału został odnotowany w branży sprzedającej odzież i obuwie, gdzie wskaźnik ten z 17,1% w pierwszym

kwartale wzrósł do 61,3%, co stanowi ponad trzykrotny wzrost. Tak więc wzrost w ostatnim miesiącu w porównaniu do początku roku kolejno odnotowały przedsiębiorstwa sprzedające prasę, książki oraz artykuły sprzedawane w sklepach specjalistycznych o 21,2 punktów procentowych więcej; wyposażenie domu – meble, RTV i AGD o 18,7 p.p. więcej; farmaceutyki kosmetyki oraz sprzęt ortopedyczny o 5,5 p.p. więcej; artykuły pozostałe o 3,1 p.p. więcej; a także pojazdy oraz części o 1 p.p. więcej oraz żywność, napoje i wyroby tytoniowe o 0,5 p.p. więcej. Jak można zauważyć na rycinie 2, sprzedaż przez Internet znacznie wzrosła, jednak tylko w trzecim i czwartym kwartale 2020 roku, na co zapewne wpływ miała pandemia.



Ryc. 2. Udział sprzedaży przez Internet w ogólnym udziale handlu detalicznego w 2020 r. Opracowanie własne na podstawie danych GUS

W latach 2017–2019 zarówno import, jak też eksport produktów rolno-spożywczych sukcesywnie wzrastały. W 2017 roku import tych produktów wynosił 880 078,4 miliona złotych, a eksport – 882 619,5 miliona złotych. Z kolei w 2019 roku było to już dla importu – 1 018 479,0 miliona złotych, a dla eksportu – 1 023 591,4 miliona złotych. Spośród ogółu tych produktów importowane przetwory spożywcze stanowiły średnio 3,67%,

zwierzęta żywe oraz produkty pochodzenia zwierzęcego – 2,57%, a produkty pochodzenia roślinnego – 2,33%. W eksporcie było to odpowiednio 6,8%, 4,27% i 2,03%. W roku 2019 Polska najczęściej eksportowała: z produktów pochodzenia roślinnego – warzywa, z kategorii zwierząt żywych i produktów pochodzenia zwierzęcego – mięso i podroby jadalne, a z przetworów spożywczych – tytoń i przetworzone namiastki tytoniu [Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2020].

Pomimo wzrostu rolniczego handlu zagranicznego w Polsce, certyfikowane, ekologiczne gospodarstwa rolne stanowią niewielką część polskiego rolnictwa. Dla Polski ogółem w latach 2017–2019, spośród gospodarstw rolnych, liczba ekologicznych gospodarstw rolnych z certyfikatem wynosiła ok. 2,5%. Z czego najwyższy odsetek ponad 8% jednostek ekologicznych, względem ogółu, był w województwach: zachodniopomorskim oraz warmińsko-mazurskim. Z kolei najniższy był w województwach: opolskim oraz kujawsko-pomorskim, gdzie wartość ta wynosiła ok. 0,5% [GUS 2020].

Innowacyjne zmiany, rozwiązania, narzędzia, trendy sprzedaż w ostatnich latach

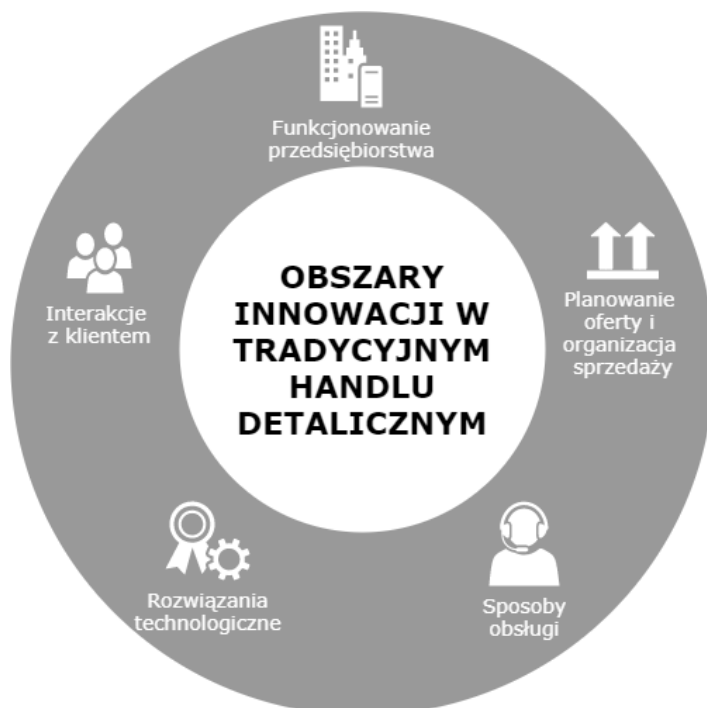
Polska gospodarka wyróżnia się imponującą dynamicznością oraz zmianami postępującymi w dużym tempie. Handel natomiast jest sektorem o dużym znaczeniu, przy czym wiele pozytywnych stron rozwoju gospodarki dotyczy właśnie tej branży. Zarówno handel lokalny, jak i zagraniczny podlegają ciągłej analizie w celu wprowadzania nowych rozwiązań i udogodnień, które pozwolą osiągnąć jak największe zadowolenie ze strony konsumentów oraz przyczynić się do wzrostu zysków, które usatysfakcjonują przedsiębiorców.

Transformacje w handlu tradycyjnym

Na przestrzeni lat świat uległ wielu zmianom. Aby za nimi nadążyć sektor handlu musiał stale dostosowywać oferowane rozwiązania do rozwijającego się otoczenia. Taka zależność jest motorem napędowym dla tej branży, która wprowadza coraz to nowsze rozwiązania i kreuje niekonwencjonalne trendy. Handel tradycyjny, jako prekursor transakcji sprzedażowych, wyróżnia się szeroką gamą kierunków rozwoju. Wprowadzane innowacje mogą zostać podzielone na kilka grup, co zaprezentowano na rycinie 1.

Jednym z najważniejszych trendów handlu detalicznego jest planowanie i dostosowanie oferty sprzedażowej do konsumentów. Klienci oczekują, że wchodząc do sklepu zawsze znajdą to, czego potrzebują, a wśród proponowanych artykułów będą również te spełniające ich wymagania. Z tego powodu sklepy starają się poszerzać ofertę o produkty zróżnicowane pod względem stylistyki czy wykorzystanych do produkcji surowców. Rynek odpowiada na potrzeby konsumentów, a tę zależność kształtuje popyt na dany produkt. Gdy produkt lub usługa staje się rozpoznawalna, to rośnie zainteresowanie kupujących, a w związku z tym pojawia się coraz większa liczba miejsc, która zaczyna je oferować. Dodatkowo każde kolejne miejsce stara się udoskonalić ofertę, biorąc pod uwagę opinię oraz sugestie osób testujących lub bezpośrednio zdanie klientów. Spersonalizowa-

nie oferty jako cel do zrealizowania jest dużo łatwiejsze do wykonania przy użyciu narzędzi handlu elektronicznego. Jednak w sprzedaży stacjonarnej również mamy do czynienia z dopasowaniem asortymentu do potrzeb nabywców.



Ryc. 3. Obszary innowacji w tradycyjnym handlu detalicznym. Opracowanie własne na podstawie: Ciechomski i Romanowski 2016

Przystosowanie handlu do wymagań klientów nie dotyczy jednak wyłącznie kwestii związanych z wyborem towarów czy usług. Poza tymi aspektami ważne jest również ulokowanie sklepów – przy wyborze miejsca przedsiębiorcy często kierują się potrzebami konsumentów. Decydują się więc na takie lokalizacje, w których nie ma sklepów czy salonów usługowych o podobnym profilu biznesowym. Niesie to za sobą korzyści związane również z mniejszą konkurencją. Konsumenty mogą wyrażać swoją opinię oraz kierować prośby o powstanie sklepów w konkretnych lokalizacjach – takie możliwości oferuje jeden ze sklepów dyskontowych szukających terenów pod inwestycje.

Kolejne zmiany dotyczą obszaru interakcji z klientem. Pierwsze skojarzenia z tym terminem mogą przywoływać myśl o relacji między obsługą a konsumentem, jednak nie o tym poziomie oddziaływań mówi ta zależność. Skupia się ona bowiem na oddziaływaniu na klienta za pomocą narzędzi marketingowych, mających stworzyć takie warunki otoczenia, które przyciągną uwagę ludzi i spowodują, że zainteresują się danym produktem czy sklepem i w efekcie zdecydują się na zakup. Grupa metod, które dążą do nakłonienia

konsumenta do wizyty w danym sklepie oraz do zakupu, nosi nazwę merchandisingu [Jachowska 2014]. Klient przechodzący korytarzami centrów handlowych zdecyduje się na wejście do tych sklepów, które przyciągną jego uwagę i wzbudzą w nim zainteresowanie. Wpływanie na klienta przy użyciu narzędzi wizualnych nazywane jest visual merchandisingiem. Przejawia się on dostosowaniem ułożenia produktów, aranżacją wnętrza i odpowiednią reklamą, która pozwoli wyróżnić się na tle stale rywalizującej o uwagę konsumentów konkurencji [Diamond i Diamond 2007]. Wystrój sklepów powinien być spójny i aby to uzyskać, jego elementy musi łączyć motyw przewodni. Oświetlenie sklepu oraz kolorystyka powinny być przemyślane, aby mogły uzupełniać i podkreślać asortyment sklepu. Dużą rolę w przyciąganiu uwagi klienta ma również odpowiednia wystawa towaru na sklepowych półkach, ubiór manekinów oraz projekty witryn, które są szczególnie ważnym elementem, nie tylko w sklepach odzieżowych.

Innowacje w handlu dotyczą również działu obsługi klienta. Ten obszar jest stale ulepszany i skupia się na ciągłym poszerzaniu wiedzy pracowników o marce i oferowanym asortymencie, o relacji obsługi z konsumentem, ale również rozbudowanych możliwości dostaw i reklamacji [Kucharska 2014]. Coraz większa ilość sklepów decyduje się na projektowanie własnego sposobu obsługi, w którym klient jest przeprowadzony przez pracowników od wejścia do sklepu, aż do momentu dokonania zakupu. Personel, towaryzując klientowi, zwiększa szanse na dokonanie zakupu, a klient w takiej sytuacji czuje się wyjątkowy, ponieważ jego potrzeby zostają wysłuchane.

Ostatnie lata w znacznym stopniu wpłynęły na rozwój aspektów ekologicznych w sektorze handlu. Zarówno odgórnie narzucone na przedsiębiorstwa wymagania, jak i wzrost świadomości ekologicznej konsumentów przyczyniły się do wielu zmian na korzyść środowiska. Jedną ze zmian w tej gałęzi gospodarki, która generuje wiele pozytywnych pod względem ekologicznym skutków, jest zastąpienie toreb i opakowań plastikowych np. papierowymi. Ta aktywność była bodźcem do zmiany nawyków klientów coraz częściej decydujących się na torby materiałowe wielokrotnego użytku, które mają ze sobą przy każdym zakupach.

Kolejne z ekologicznych rozwiązań zaproponowane przez szwedzką sieć odzieżową H&M ma za zadanie zmniejszenie ilości wyrzucanych ubrań, które generują zbyt dużą liczbę odpadów. Pierwsza wprowadzona przez przedsiębiorstwo inicjatywa polegała na powstaniu punktów odbioru używanej odzieży, którą można było wymienić na punkty oraz rabaty w sklepie. Następnie poszli o krok dalej i opracowali nowoczesną metodę na dawanie ubraniom drugiego życia. Stworzyli maszynę, która pozwoliła na przerobienie starych ubrań, które klient przyniósł do wyznaczonego punktu, na nową rzecz wykonaną z tego samego materiału, który został poddany procesowi szatkowania. Obecnie usługa jest dostępna tylko w Sztokholmie, ale pomysłodawcy deklarują, że zamierzają udoskonalić oraz rozszerzyć na inne obszary to innowacyjne rozwiązanie.

Rozwój w sektorze e-commerce

Jak już wcześniej wspomniano, w ostatnich latach handel elektroniczny rozwija się w zaskakująco szybkim tempie. Polska czerpie inspiracje z krajów bardziej rozwiniętych, które przodują w nowościach związanych z rynkiem e-commerce. Sektor ten dzięki licznym zaletom stale zyskuje na popularności. Konsumentom coraz częściej decydują się bowiem na zakupy w sieci ze względu na możliwość nabycia produktów o wybranej przez

siebie porze. Zakupy w sieci pozwalają ponadto zaoszczędzić czas oraz pieniądze, a klienci jako kolejne z zalet tej formy handlu wskazują także szerszy wybór produktów oraz możliwość zakupu w sklepach, które nie są dostępne stacjonarnie w miejscu ich zamieszkania [Bartczak, 2016].

Szczególnie ważnym kierunkiem rozwoju rynku handlu elektronicznego jest skupienie się na sprzedaży mobilnej, która dokonywana jest przy użyciu smartfonów i tabletów. Coraz większa liczba konsumentów korzysta z Internetu w telefonach i to właśnie przy użyciu przeglądarek internetowych lub dostępnych aplikacji mobilnych dokonuje zakupów. Dlatego też ten kanał sprzedaży jest ciągle udoskonalany.

Trendem, który pozwala sklepom funkcjonującym w Internecie stale poszerzać i udoskonalać swoją działalność, jest promocja w mediach społecznościowych. Ta przestrzeń daje możliwość realizacji działań marketingowych na szeroką skalę. Użytkownicy Internetu spędzają średnio kilka godzin dziennie korzystając z mediów społecznościowych, a więc reklamy wyświetlające się właśnie w tych kanałach są skuteczne i generują dużą ilość wyświetleń, które przekładają się na ilość zamówień oraz zysk danego przedsiębiorstwa. Dodatkową zaletą tego trendu jest dopasowanie wyświetlanych reklam do profilu potencjalnego klienta poprzez zapamiętywanie i wykorzystanie historii wyszukiwania. Pozwala to zwiększyć szansę na odniesienie sukcesu danej kampanii marketingu internetowego.

Kolejnym innowacyjnym rozwiązaniem, które dopiero zyskuje na popularności w Polsce, są narzędzia wirtualnej rzeczywistości wykorzystywane w sprzedaży internetowej. Ta technologia jest przyszłością rynku e-commerce i znajduje swoje zastosowanie w wielu aktywnościach. Jedną z najczęściej wymienianych przez konsumentów wad sprzedaży w sieci jest możliwość otrzymania produktu niezgodnego z opisem i oczekiwaniami [Barska 2015]. Jest to jeden z powodów, dla którego wiele osób wciąż nie może się przekonać do zakupów online. Wirtualna rzeczywistość jest rozwiązaniem będącym odpowiedzią na wspomnianą wadę rynku e-commerce. Rozwój tego segmentu przyczynił się do powstania innowacyjnego rozwiązania, jakim jest wirtualna przymierzalnia ubrań WearFits. Pozwala ona przymierzyć cyfrowe ubrania przy użyciu narzędzi animacji video oraz wizualizacji. Podstawa działania skupia się na wprowadzeniu danych o wszystkich wymiarach i budowie sylwetki, dzięki czemu można w realny sposób odwzorować wygląd produktu, dopasowanie czy ułożenie materiału. Pozwala nawet sprawdzić, jak dana rzecz będzie się prezentowała podczas ruchu. To innowacyjne rozwiązanie jest aktualnie w fazie testów, ale w niedalekiej przyszłości zostanie ono wykorzystane przy tworzeniu pierwszego sklepu umożliwiającego przymierzenie swoich produktów w sposób wirtualny przy użyciu omówionego rozwiązania. Pozwoli to w przyszłości zmniejszyć liczbę zwrotów spowodowanych nietrafionym zakupem, zredukować kolejki i z pewnością przyczyni się do jeszcze większego rozkwitu branży e-commerce [Redakcja portalu Burda.pl 2020].

Zmiany strategii przedsiębiorstw handlowych wywołane pandemią COVID-19

Sektor handlu zmienia się dynamicznie, a sytuacja w kraju i na świecie wpływa na tempo oraz kierunek tych zmian. Nieuniknione więc były transformacje w omawianym sektorze, które nastąpiły w wyniku wybuchu pandemii COVID-19. Dla większości

branż ten czas był wyjątkowo trudny – zmiany nawyków konsumentów, ostrożność w dokonywaniu zakupów spowodowana niepewną sytuacją finansową oraz tymczasowe lub długoterminowe zamknięcie sklepów i lokali usługowych to jedne z wielu problemów z jakimi musiały się zmierzyć przedsiębiorstwa. Podczas gdy gospodarka odnotowywała ogólne straty, a poszczególne gałęzie przemysłu, w tym również sektor handlu stacjonarnego, doświadczały skutków rozprzestrzeniającego się w dynamicznie kryzysu, branża e-commerce rejestrowała wzrost sprzedaży [IAB Polska 2020]. Z raportu przeprowadzonego przez Izbę Gospodarki Elektronicznej wynika, że konsumenci obawiają się możliwości zarażenia i aby zminimalizować ryzyko, coraz częściej wybierają bezpieczniejszą opcję zakupów na odległość przy pomocy Internetu. Koronawirus stał się więc dla rynku e-commerce dużą szansą na rozwój. Jednak by mógł się realizować bez przeszkód, musiał spełniać wiele warunków związanych z dostępnością towarów, czasem dostawy oraz dostosowaniem zasad płatności i odbioru przesyłek.

Jednym z rozwiązań wdrożonych w funkcjonowaniu zakupów internetowych była możliwość dostawy bezkontaktowej. Ta opcja pozwala zmniejszyć obawy związane z możliwością zarażenia się podczas kontaktu z dostawcą.

Handel stacjonarny w dobie pandemii również zetknął się z dużą przeszkodą i musiał dostosować swoją działalność do zmieniających się obostrzeń. Nowa organizacja działalności, ograniczenie ilości osób przebywających w sklepach i lokalach usługowych oraz ciągle zmieniające się restrykcje były impulsem do stworzenia nowych rozwiązań. Sklepy, które wcześniej nie oferowały tej opcji, wprowadziły formę zakupów internetowych lub telefonicznych z odbiorem w sklepie bez kolejki, tak aby zminimalizować liczbę osób w pomieszczeniu. Wiele sklepów instalowało nowe kasy samoobsługowe oraz wprowadziło dłuższe godziny działania sklepów, aby zmniejszyć kolejki i zapanować nad rozmieszczeniem klientów. Producenci oferują również wydłużone czasy zwrotów, darmowe dostawy oraz zaskakujące promocje. Te wszystkie działania stały się odpowiedzią na rosnące obawy konsumentów, ale również na ograniczenia nakładane na przedsiębiorców przez państwo [Podskoczy 2020].

Przyszłość handlu

Rynek handlu jest stale poddawany innowacjom oraz szeregom zmian, na które wpływa postępujący rozwój. Wszystko to, co jest nowe w danej dziedzinie, nazywane jest innowacją [Rogers 2003]. Dawniej takie zmiany następowały powoli, nie zaskakiwały przedsiębiorców, jednak w dzisiejszych czasach firmy muszą opracowywać i aktualizować coraz to nowsze strategie działania. Przykładem jest wspomniana wcześniej epidemia COVID-19, która ukształtowała całkowicie nowy rynek nastawiony na szybkie oraz bezobsługowe zakupy za pomocą nowych technologii. Był to nagły czynnik, który zadziałał na przedsiębiorców. W szybkim czasie musieli oni naprowadzić swoje firmy na nowy tok działania. Sukces firm zależy w głównej mierze od tego, czy będą one w stanie wprowadzać nowe innowacje, które są szczególnym narzędziem przedsiębiorców [Drucker 1992], oraz czy będą potrafiły doganiać lub tworzyć nowe trendy.

Według raportu firmy 4CF [https://4cf.pl/wp-content/uploads/pdf/4CF_Whitepaper_RETAIL.pdf] w wizjach handlu przyszłości przedstawionych na rycinie 2 znajdują się m.in.: inteligentne rozwiązania sklepów, dostawy za pośrednictwem dronów, sklepy samoobsługowe, wirtualni asystenci czy płatności dokonywane za pomocą chipów. DHL

Express, dzięki współpracy z firmą Ehang, produkującą inteligentne pojazdy powietrzne, stał się pierwszą firmą międzynarodową, która umożliwiła usługę dostawy za pomocą dronów – jak na razie jedynie w Chinach. Pierwszy lot inauguracyjny tego przedsięwzięcia odbył się na trasie ośmiu kilometrów z wykorzystaniem pojazdu UAV (ryc. 5). Taka autonomiczna oraz inteligentna logistyka zwiększa efektywność całego procesu dostaw i pozwala na skrócenie czasu oraz kosztów dostawy.



Ryc. 4. Wizje handlu przyszłości. Opracowanie własne na podstawie: Raport 4CF Nieoczekiwana przyszłość...

Microsoft w kwietniu 2019 roku wraz z partnerskimi firmami przedstawił społeczności własne wizje inteligentnego sklepu. Jedną z ich koncepcji jest zastosowanie w sklepach półek z czujnikami oraz systemem, który zadziałałby wtedy, gdy klient sięgnie po produkt. Ekran umieszczony w półce lub obok niej przedstawiłby inne podobne produkty lub rabaty, z jakich może skorzystać osoba kupująca. Wkraczałaby więc tu kwestia marketingu połączona z technologią. W centrach handlowych zastosowane mogłyby być również ekrany dotykowe, dzięki którym klienci mogliby wybrać szybko produkt, który chcą zakupić i po finalizacji płatności od razu zostaliby przekierowani do danego sklepu po odbiór, bez zbędnego chodzenia po kilku sklepach, poszukiwania konkretnego produktu i oczekiwania w kolejkach. To również jeden z pomysłów Microsoftu [Wardziak 2019].

Najbardziej popularnym rozwiązaniem ostatnich miesięcy jest zamienienie gotówki oraz kart płatniczych na chipy umieszczone pod skórą w dłoni. Ta nowa metoda płatności bezgotówkowej jest kontrowersyjna, ale jest również coraz chętniej praktykowana.

Wiążą się z nią jednak nadal pewne niebezpieczeństwa, takie jak na przykład sczytanie danych z chipa przez ukryte terminale. Firmy produkujące chipy do płatności starają się opracowywać dobre zabezpieczenia mając nadzieję, że ta technologia rozszerzy się na większą skalę [Rudnicki 2019].



Ryc. 5. Pojazd powietrzny bezzałogowy UAV Ehang
Źródło: <http://www.ehang.cz/article.html>

Na przyszłościowe rozwiązania i wytwór nowoczesnych technologii mocno wpływa aspekt ochrony środowiska. Sieć sklepów Żabka bardzo szybko ustosunkowała się do nowego trendu Smart City, jakim jest ekologia na każdej płaszczyźnie, i otworzy już pierwszy sklep działający wyłącznie poprzez zieloną energię. Cztery filary, jakimi opierała się firma podczas prac przy nowym sklepie, to: zielona energia, drugie życie, czyste powietrze oraz zielony transport. Nowy ekologiczny sklep Żabki zastosował na dachu system paneli fotowoltaicznych, dodatkowo w szybach sklepu znajduje się technologia kwantowa, która pozyskując energię ze słońca, oświetla naturalnie sklep. Kolejne rozwiązanie, jakie zastosowane zostało w punkcie sklepu, to podłoga kinetyczna wyposażona w płyty naciskowe, która otrzymuje energię z wykonywanych na niej kroków. Całe działanie inteligentnych lodówek oraz etykiet znajdujących się w sklepie Żabki pozwala na oszczędność energii oraz papieru. W budynku powstała również ekologiczna ściana zbudowana z 1000 butelek PET po napojach, a przed sklepem ułożona została antysmogowa kostka brukowa, która zmniejsza stężenie tlenków azotów w powietrzu. Żabka postawiła również w okolicy sklepu stację do ładowania pojazdów elektrycznych, promując przy tym samochody zasilane zieloną energią [Wprost Eko 2020].

Podsumowanie

Konkurencyjność przedsiębiorstw sektora handlu oraz zmiany na rynku wspomagają tworzenie innowacji. Bardzo obiecujące są przyszłościowe rozwiązania oraz wizje tworzone przez czołowe firmy, takie jak Microsoft, Amazon czy Google. Dzięki nim mniejsze przedsiębiorstwa mogą korzystać z pomysłów oraz nowych technologii i wdrażać je, plasując tym wyżej swoją pozycję na rynku. Mimo wszystko również i takie niewielkie firmy czy start-upy, wymyślające nowe koncepcje, współtworzą rozwój innowacyjności w branży handlu.

Ogromne zmiany w handlu mogą obejmować nawet krótki okres czasu, ponieważ otoczenie oddziałujące na rynek może się zmieniać z minuty na minutę. Aktualnie dużym problemem dla przedsiębiorców jest brak pełnej możliwości prowadzenia handlu stacjonarnego związanego z epidemią COVID-19. Jednak wiele firm stara się sprostać wyzwaniom i rozpocząć działalność internetową. Co więcej, ten sposób usług oraz handlu online podoba się zarówno coraz szerszemu gronu klientów, jak i firmom. Niezbędne jest stałe opracowywanie strategii firm na każdej płaszczyźnie działalności, aby mogły one utrzymać się na rynku. Ważne jest również dla przedsiębiorców posiadanie bezpiecznego zaplecza biznesowego, które skupia się na sprawnej organizacji oraz rozwijaniu technologii, aby móc sprostać wymaganiom narzucanym przez zmiany związane ze składnikami środowiska rynkowego.

Bibliografia

- Barska A., 2015. Kryteria wyboru e-dostawcy z perspektywy konsumenta generacji Y. Zeszyty Naukowe Polskiego Tow. Ekonomicznego w Zielonej Górze, 3, 59–70.
- Bartczak K., 2016. Bariery rozwojowe handlu elektronicznego, https://depot.ceon.pl/bitstream/handle/123456789/9964/wersja_elektroniczna_issuu.pdf?sequence=1 [dostęp: 14.03.2021].
- Ciechomski W., Romanowski R., 2016. Innowacje technologiczne w sektorze handlu detalicznego, W: Handel we współczesnej gospodarce. Nowe wyzwania, M. Sławińska (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego, Poznań, 9–20.
- Diamond J., Diamond E., 2007. Merchandising. Magnetyzm przestrzeni handlowej. Wyd. III, Gliwice.
- Drucker P., 1992. Innowacja i przedsiębiorczość: Praktyka i zasady, Warszawa. https://4cf.pl/wp-content/uploads/pdf/4CF_Whitepaper_RETAIL.pdf
<https://www.ehang.cz/article.html>
- IAB Polska, 2020. Raport Strategiczny 2019/2020, <https://www.iab.org.pl/wp-content/uploads/2020/06/Raport-Strategiczny-Internet-2019-2020.pdf> [dostęp: 11.04.2021].
- Jachowska E., 2014. Visual merchandising. W: Merchandising, A. Grzegorzczak, A. Wiśniewska (red.). Warszawa, 20–37.
- Kucharska B., 2014. Innowacje w handlu detalicznym w kreowaniu wartości dla klienta, Katowice.
- Pabian A., 2017. Kanały dystrybucji. W: Logistyka dystrybucji, J. Nowakowska-Grunt, M. Starostka-Patyk (red.). Warszawa.
- Podskoczy A., 2020. H&M: Przynieś stare ubrania, w 5 godzin przerobimy je na nowe, <https://www.rp.pl/biznes/art482581-h-m-przynies-stare-ubrania-w-5-godzin-przerobimy-je-na-nowe>

- Raport 4CF, Nieoczekiwana przyszłość: Handel detaliczny, https://4cf.pl/wp-content/uploads/pdf/4CF_Whitepaper_RETAIL.pdf [dostęp: 23.03.2021].
- Redakcja portalu Burda.pl, 2020. Wearfits – wirtualna przymierzalnia ubrań, <https://www.burda.pl/artykul/wearfits-wirtualna-przymierzalnia-ubran-teraz-przymierzysz-takze-wybrane-wykroje> [dostęp: 20.03.2021].
- Rocznik statystyczny rolnictwa, 2020. Główny Urząd Statystyczny, Warszawa 2020, <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-statystyczny-rolnictwa-2020,6,14.html> [dostęp: 18.04.2021].
- Rogers M., 2003. Diffusion of innovations, Free Press; 5th edition.
- Rudnicki R., 2019. Chip pod skórą zamiast karty płatniczej. Kontrowersyjne rozwiązanie jest coraz popularniejsze, ale czy to bezpieczne?, <https://www.komputerwiat.pl/artykuly/redakcyjne/chip-pod-skora-zamiast-karty-platniczej-kontrowersyjne-rozwiazanie-jest-coraz/62h9gby> [dostęp: 23.03.2021].
- Szumilak J. (red.), 2004, Handel detaliczny. Funkcjonowanie i kierunki rozwoju. Oficyna Ekonomiczna Grupa Wolters Kluwer, Kraków.
- Wprost Eko, 2020. <https://eko.wprost.pl/srodowisko/10391744/siec-testuje-przyszlosciowe-rozwiazania-przyjazne-klientom-i-srodowisku.html> [dostęp: 18.04.2021].
- Wardziak P., 2019. <https://www.cashless.pl/5703-Microsoft-Sklep-Przyszlosci-handel-e-commerce> [dostęp: 23.03.2021].

Możliwości przewidywania plonu na podstawie waloryzacji przestrzeni produkcyjnej

Possibilities of predicting the yield based on the valorization of the production area

Możliwości przewidywania plonu są przedmiotem zainteresowań wielu osób, doradców rolniczych, czy placówek naukowych. Uzyskany plon jest odzwierciedleniem posiadanej wiedzy oraz zastosowania jej w praktyce. Znajomość waloryzacji rolniczej przestrzeni produkcyjnej często decyduje o faktycznym sposobie użytkowania gleby.

Celem pracy jest przedstawienie ważniejszych aspektów i możliwości przewidywania plonu na podstawie waloryzacji przestrzeni produkcyjnej.

Przewidywanie plonu na podstawie waloryzacji przestrzeni produkcyjnej

Za teren dogodny do osiedlenia uznawano taki, gdzie możliwe jest prowadzenie efektywnej uprawy. W przeszłości nie stosowano kryteriów do określania jakości gruntów. Ludzie osiedlali się, a dopiero po jakimś czasie oceniali przydatność danego terenu. Aby ustalić stan optymalny, stosowano metodę prób i błędów. Waloryzacja w znaczeniu dzisiejszym jest postępowaniem świadomym, celowym i zazwyczaj wyprzedzającym zamierzone działanie [Apanowicz 2003]. Stosuje się wskaźniki, które odzwierciedlają wpływ poszczególnych czynników na możliwości uprawy [Fotyma i Krasowicz 2001]. Do tego celu można użyć różnych kryteriów. Najczęściej rolniczą przestrzeń produkcyjną ocenia się pod kątem czynników naturalnych lub antropogenicznych. Czynniki naturalne decydują o przydatności terenu do określonego sposobu użytkowania. Natomiast czynniki antropogeniczne decydują o ekonomicznych aspektach przy ściśle określonych warunkach naturalnych [Górski i in. 1999].

Spośród metod oceny przydatności terenów rolniczych do produkcji w Polsce, pierwszoplanowe znaczenie ma opracowany w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa wskaźnik waloryzacji rolniczej przestrzeni produkcyjnej (WWRPP). Odzwierciedla on potencjał rolniczej przestrzeni produkcyjnej, który wynika z warunków naturalnych. WWRPP jest wskaźnikiem zintegrowanym bazującym na ocenie wskaźników poszczególnych elementów siedliska, tj. stosunki wodne gleb, jakość i przydatność gleb, rzeźba terenu oraz agroklimat [IUNG, 2021]. Zastosowana przez IUNG wycena znaczenia poszczególnych czynników polega na analizie statystycznej na poziomie obrębów ewidencyjnych i gmin.

¹ Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Rolnictwa i Leśnictwa, Koło Naukowe Zarządzania Środowiskowego „PROSPERO”, w.chronowska@gmail.com

W ocenie WWRPP duże znacznie mają warunki glebowe, gdyż z funkcji samego wskaźnika jakości i przydatności gleb można wyjaśnić ok. 80% obserwowanej zmienności plonów (tab. 1). Udział wskaźnika cząstkowego agroklimatu zawiera się w przedziale 1–15 pkt., wskaźnika warunków wodnych w przedziale 0,5–5 pkt., a rzeźby terenu od 0 do 5 pkt.

Tabela 1. Wycena warunków glebowo-przyrodniczych

Wskaźnik cząstkowy	Zakres punktów
Rzeźba terenu	0–5
Jakość i przydatność rolnicza gleb	18–95
Agroklimat	1–15
Stosunki wodne gleb	0,5–5
Razem WWRPP	19,5–120

Źródło: ONW, IUNG Puławy

Możliwość kształtowania poszczególnych czynników jest różna. Warunki środowiska naturalnego nie zmieniają się szybko, a zamiana jest trudno zauważalna nawet w perspektywie kilku pokoleń. Czynniki naturalne sprawiają, że dany teren jest przydatny do określonego sposobu użytkowania w sposób stabilny. Czynniki antropogeniczne decydują o faktycznym sposobie wykorzystania ziemi. Są wynikiem rozwoju poziomu życia i zapotrzebowania na różnorodne produkty, usługi czy urządzenia, dlatego często powodują zmiany w użytkowaniu ziemi [Koreleski 1983].

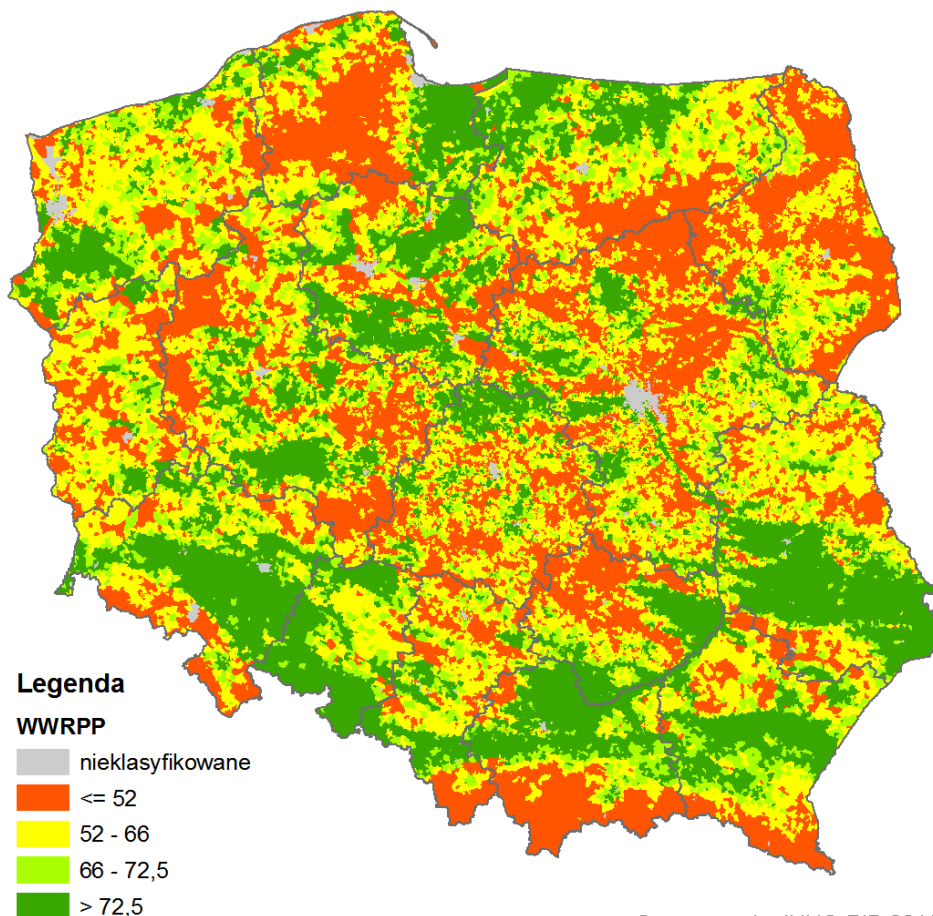
Jakość i przydatność gleb w tej metodzie określona została na podstawie kompleksów przydatności rolniczej i klas bonitacyjnych gruntów. Powierzchnia klas określona została na podstawie ewidencji gruntów, natomiast powierzchnia kompleksów przydatności rolniczej na podstawie wcześniej stworzonej mapy glebowo-rolniczej [Hopfer i in. 1982].

Waloryzacja klimatu przeprowadzana została na podstawie danych meteorologicznych z wielolecia. Obszary o klimacie najmniej korzystnym uzyskują 1 pkt, a obszary znajdujące się w najlepszych warunkach – do 15 pkt. Wyliczenie wskaźnika agroklimatu sprowadzono do wyrażenia plonów na danym obszarze – oznaczają one obserwowaną zmienność plonów [Górski i Zaliwski 2002].

Stosunki wodne i ich jakość wyznaczono na podstawie ilości wody, jaką może retencjonować profil glebowy, mając na uwadze skład granulometryczny poziomów gleby i położenie w rzeźbie terenu. Źródłem danych charakteryzujących budowę profilu glebowego i układ poziomów glebowych była, wcześniej stworzona, mapa glebowo-rolnicza [Ślusarczyk 1979].

Dzięki przeprowadzeniu oceny opracowano mapę wpływu czynników naturalnych na potencjalną wydajność plonów (ryc. 1). Mapa ukazuje rozmieszczenie regionalne gleb w naszym kraju. Można zauważyć, że najlepsze glebowo tereny znajdują się na Żuławach, w północnej części Pojezierza Mazurskiego, na Nizinie Śląskiej, w Kotlinie Sandomierskiej, w okolicach Stargardu oraz w południowo-zachodniej części Polesia.

Na tych terenach wskaźnik Waloryzacji Rolniczej Przestrzeni Produkcyjnej wynosi $> 72,5$ pkt. Natomiast najgorsze tereny, ocenione poniżej 52 punktów w skali, znajdują się pomiędzy Pojezierzem Koszalińskim a Pojezierzem Pomorskim, na Pojezierzu Mazurskim oraz Litewskim, na Nizinie Mazowieckiej (okolice Wyszkowa, Sokołowa Podlaskiego i Ostrowa Mazowieckiego), a także na Wyżynie Małopolskiej oraz w całych pasmach górskich naszego kraju. Między regionami charakteryzującymi się najlepszymi i najgorszymi terenami znajdują się obszary pośrednie, zarówno te słabsze, obejmujące 52–66 pkt., jak i te lepsze, żyzniejsze, punktowane w skali od 66 do 72,5 pkt.



Opracowanie: IUNG-PIB 2018

Ryc. 1. Wskaźnik waloryzacji rolniczej przestrzeni produkcyjnej w Polsce
 Źródło: ONW, IUNG Puławy

Poziom i struktura produkcji roślinnej są odzwierciedleniem zarówno warunków klimatyczno-glebowych, jak i ekonomiczno-organizacyjnych. Cechą charakterystyczną jest regionalne zróżnicowanie struktury zasiewów, intensywności produkcji i organizacji, plonów oraz towarowości produkcji [Krasowicz 2009].

O zróżnicowaniu zbiorów, obok warunków przyrodniczych, decydują także czynniki organizacyjno-ekonomiczne. Siła oddziaływania tych uwarunkowań w ostatnim okresie wzrosła, co wiąże się z przeobrażeniami w polskim rolnictwie po przejściu na system gospodarki rynkowej [Jaśkiewicz 2004]. Istotne znaczenie miały także procesy, które były dostosowywane do standardów Unii Europejskiej. Są one zróżnicowane regionalnie, co jest konsekwencją szerokiej gamy uwarunkowań, współczesnych i historycznych. Produkcja roślinna ma charakter surowcowy. Jest to surowiec przemysłowy, a w postaci pasz także surowiec dla produkcji zwierzęcej [Terelak i in. 2000].

Do najważniejszych funkcji rolnictwa należy zaliczyć funkcję produkcyjną (żywielską). Ma ona zasadnicze znaczenie w kwestii zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego kraju. Rolnik nie ma wpływu na pogodę, która często nie sprzyja roślinom uprawnym. Ma jednak wpływ na inne czynniki gwarantujące dobre zbiory. Są to przede wszystkim: dobór odmian i jakość materiału siewnego, zasobność gleb w składniki pokarmowe, czy odpowiednia agrotechnika. Jeżeli rolnik nie dołoży starań i nie wykorzysta wszystkich dostępnych środków w tym zakresie, nie osiągnie zadowalających efektów. Nawet najlepsze odmiany roślin i wzorowa agrotechnika nie są wystarczające do prawidłowego wzrostu rośliny i wydania plonu [Witek 1981].

Niezależnie od tego, czy gospodarowanie odbywa się na glebach dobrych czy słabych, konieczne jest prowadzenie badań gleby [Kuś i in. 2006]. Niski odczyn pH można skorygować wysiewając wapno, a składniki pokarmowe uzupełnić odpowiednimi dawkami nawozów. Próchnicę natomiast można odbudować resztkami poźniwnymi, poplonami czy obornikiem. Należy pamiętać, że każde niedociągnięcie w nawożeniu spowoduje obniżenie plonów. Dlatego też kluczową kwestią jest działanie w kwestii utrzymania prawidłowej, a zarazem jak najlepszej kultury gleby [Kozyra i Górski 2004]. W przypadku gdy wysokość plonów nadal jest na niezadawalającym poziomie, dobrym rozwiązaniem jest wykonanie dodatkowych prób glebowych. Problem może też dotyczyć złego stanu podglebia [Krasowicz 2007].

Azot, fosfor i potas są niezbędnymi składnikami w produkcji rolniczej, zarówno jako składniki pokarmowe dla roślin, jak i wpływające na żyzność gleby. Jeżeli nie zostaną pobrane przez rośliny, może dojść do ich utraty na wiele sposobów, m.in. wymywanie, spływ. Jest to nieefektywnie poniesiony koszt w działalności rolniczej. Ustalenie zapotrzebowania roślin na makroelementy, jak również optymalizacja sposobu ich dawkowania wpływa na poprawę opłacalności uprawy oraz stan środowiska naturalnego. Na terenie prawie całego kraju występuje nadwyżka składników pokarmowych, wywołana głównie produkcją rolniczą, ale i odpadami przemysłowymi i komunalnymi. Restrukturyzacja gospodarstw, intensyfikacja produkcji, skoncentrowana produkcja zwierzęca, niski poziom dokładności planów gospodarki nawozowej oraz gęsta sieć melioracyjna mogą przyczyniać się do strat składników pokarmowych w regionie [Witek 1994]. Proces ten wzmaga się poprzez lekkie, kwaśne i bardzo podatne na erozję gleby występujące m.in. w Wielkopolsce, co wywołuje skutki o zasięgu regionalnym. Eutrofizacja jezior i innych zbiorników wodnych jest częściowo wynikiem nadwyżek nawozowych pochodzących z rolnictwa. Skutkiem może być zakwitanie sinic, a w ponad 80% wód powierzchniowych często przekraczane są ustawowe normy dla wody pitnej [Szczech 2019].

Bioróżnorodność oznacza różnorodność biologiczną wszelkich form życia. W ekosystemie gleb bioróżnorodność dotyczy różnorodności gatunkowej, genetycznej roślin, które zasiedlają glebę, jak i zwierząt oraz mikroorganizmów [Gałązka 2019]. Wraz ze zwiększaniem się bioróżnorodności mamy stabilniejsze środowisko. Znaczenie różnorodności mikrobiologicznej w glebowym środowisku jest niezwykle ważne ze względu

na ich funkcję [Frąc 2019]. Odgrywają one kluczową rolę w procesie rozkładu biomasy i obiegu składników pokarmowych, tworzeniu próchnicy i oporności gleby na działanie szkodliwych czynników. Korzyści z poprawy struktury gleby w uprawach są związane z lepszą retencją wody, mniejszym ryzykiem erozji lub zaskorupiania gleby, lepszym kiełkowaniem nasion i rozwojem systemu korzeniowego roślin. Mikroorganizmy mają również ogromny wpływ na wzrost i zdrowotność roślin [Maron i in. 2018]. Właściwe interakcje pomiędzy rośliną a mikroorganizmami, szczególnie w strefie korzeniowej, wpływają na prawidłowy rozwój korzeni i części nadziemnych roślin oraz ich plonowanie. Różnorodność aktywności metabolicznych mikroorganizmów sprawia, że uczestniczą one praktycznie we wszystkich procesach i przemianach składników pokarmowych w glebie. Zmiany, które prowadzą do zubożenia aktywności mikroorganizmów, powodują spadek produktywności gleby, a w efekcie poważne problemy w uprawach i straty. Producenci, aby uzyskać zadowalające plony, muszą stosować większe ilości nawozów i środków ochrony, co pogłębia niekorzystne procesy zachodzące w glebie [Van der Putten i in. 2016].

Od kondycji gleby zależy opłacalność upraw. Wysoki i dobrej jakości plon gwarantują tylko gleby cechujące się dużą aktywnością mikrobiologiczną oraz prawidłowymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi. To rolnicy mają wpływ na żyzność użytkowanych przez siebie gruntów. Do degradacji gruntów oprócz często prowadzi intensywne, zaburzające funkcjonowanie uprawa i słabsza zasobność gleb, m.in. poprzez chemiczne środki ochrony roślin czy intensywne nawożenie. Dlatego rolnicy powinni dbać o jakość swoich gleb i odbudowywać ich pogarszający się stan [Gonet 2007].

W celu utrzymania gleby w odpowiedniej kondycji winniśmy prowadzić działania poprawiające retencyjność wody w glebie, zwiększania bioróżnorodności w glebie, zatrzymywania składników pokarmowych w warstwie ornej oraz odbudowywanie próchnicy. Większe zróżnicowanie okrywy roślinnej przyczynia się do wzrostu produktywności gleby oraz lepszego wykorzystania substancji. Zmianowanie jest kolejnym działaniem mającym na celu poprawę produktywności gleb i późniejszej oceny plonotwórczej [Tie-man i in. 2015]. Pozwala m.in. na redukcję organizmów chorobotwórczych w glebie oraz powstrzymuje utratę składników pokarmowych. Wydzieliny korzeniowe pobudzają grupy mikroorganizmów do działania, a przede wszystkim ograniczają populację szkodników i dodatkowo wpływają na wielkość uzyskanego plonu. Uproszczone zmianowanie, tj. pszenica i rzepak, niestety nie mają tak pozytywnego działania jak wcześniej wymienione czynniki. Tutaj ważną kwestią jest zwiększenie różnorodności uprawianych gatunków roślin, gdyż tylko wtedy mamy do czynienia z dywersyfikacją dostępnych źródeł pokarmowych. W tej kwestii zawsze podkreślana jest ważna i niezastąpiona rola roślin bobowatych, których obecność w każdym płodozmianie wpływa znacząco na pozytywne oddziaływanie na jakość parametrów fizykochemicznych gleby, jak i rozwój roślin oraz wielkość i jakość uzyskanego plonu [Goździewicz-Biechońska 2018].

Kolejną kwestią jest sposób uprawy – tradycyjny i uproszczony. Konsekwencją tradycyjnej uprawy, opartej na orce i intensywnie wykonywanych zabiegach uprawowych, jest poprawa aeracji gleby, ale także zaburzenie jej struktury poprzez mieszanie warstwy próchnicznej w obrębie warstwy ornej. Prowadzi to do nadmiernej mineralizacji glebowej materii organicznej, utraty azotu i obniżenia zdolności gleby do utrzymywania wilgoci [Stuczyński 2006], jak również do niszczenia struktury gruzełkowej materii oraz erozji wietrznej. Ostatnio promowanym trendem jest uprawa pasowa (*strip till*) oraz uprawa zerowa (*no-till*). W obu metodach na polu pozostawiamy resztki poźniwne, wprowadzamy rośliny

okrywowe do płodozmianu oraz stosujemy nawozy organiczne i chemiczne [Silva i in. 2013]. Poprzez częściową rezygnację z zabiegów agrotechnicznych zmniejszamy zużycie energii, ale przede wszystkim ograniczamy mechaniczne zaburzenia gleby, zwiększamy aktywność mikrobiologiczną, zapobiegamy erozji oraz ze względów ekonomicznych zmniejszamy koszty produkcji poprzez ograniczenie zabiegów polowych. Mechaniczne zaburzanie struktury gleby powoduje zmniejszanie zasobów węgla organicznego, a związki węgla są odpowiedzialne za wzrost i aktywność mikroorganizmów i roślin, stanowiąc dla nich źródło energii i składników odżywczych [Stuczyński 2007]. Akumulacja węgla organicznego w glebie sprzyja agregacji gleby. Sugeruje się, że agregaty glebowe mają większy wpływ na różnorodność mikrobiologiczną i strukturę zbiorowisk mikroorganizmów niż inne czynniki, takie jak pH i inne rodzaje związków organicznych [Guo i in. 2016]. Dlatego niszczenie struktury gruzełkowej poprzez rozpylenie gleby może eliminować niektóre grupy mikroorganizmów – ważne dla funkcjonowania gleby. Jednak, jeśli chodzi o wpływ systemu uprawy gleby (klasyczny, orkowy lub zerowy) na bioróżnorodność mikroorganizmów w glebie, to zdania są podzielone. Generalnie, im bardziej uproszczony system uprawy, w którym rezygnuje się z części zabiegów mechanicznych, tym większe możliwości gromadzenia materii organicznej w glebie, co prowadzi do zwiększenia aktywności mikrobiologicznej oraz poprawy struktury i funkcjonowania gleby [Terelak i in. 2000].

Tabela 2. Przyczyny i skutki degradacji gleb użytkowanych rolniczo

Główne praktyki rolnicze przyczyniające się do obniżenia jakości gleby	Postępujące skutki niekorzystnych praktyk rolniczych
<p>Brak równowagi pomiędzy wprowadzaną a wprowadzoną ilością materii organicznej z/do gleby</p> <p>Negatywna równowaga składników odżywczych</p> <p>Intensywne zabiegi uprawowe.</p> <p>Nadmierne stosowanie nawozów mineralnych i chemicznych środków ochrony roślin</p> <p>Uprawy w monokulturach lub w uproszczonym zmianowaniu</p>	<p>Niszczenie struktury gleby</p> <p>Wzrastające zakwaszenie, zanieczyszczenie i zasolenie gleby</p> <p>Wzrost ilości patogenów w glebie</p> <p>Wypłukiwanie składników pokarmowych i utrata wody</p> <p>Obniżanie zawartości materii organicznej i niszczenie warstwy próchnicznej</p> <p>Zaskorupianie się gleby</p> <p>Wzrastające zjawisko erozji</p> <p>Obniżenie produktywności gleby</p> <p>Zaburzenia funkcjonowania ekosystemu</p> <p>Wzrost kosztów produkcji</p> <p>Pogorszenie jakości produkcji</p>

Źródło: opracowanie własne

Racjonalne gospodarowanie środowiskiem glebowym obejmuje wszystkie funkcje gleby, jak i wskazuje na zagrożenia oraz wyznacza obszary najbardziej narażone na procesy degradacji [Smolińska 2019]. Celem jest możliwie jak największe zminimalizowanie lub wyeliminowanie zagrożeń. Istotnym problemem jest spadek żyzności gleb, stąd

też poszukiwane są sposoby jej poprawy. Przede wszystkim do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślina potrzebuje energii słonecznej, wody i substancji pokarmowych. Jako że większość substancji pokarmowych roślina pobiera z gleby za pomocą korzeni, to właśnie gleba jest jednym z najważniejszych środowisk. Niestety jest często zaniedbana, a przecież stanowi główny element produkcji rolnej. Jej jakość decyduje o plonowaniu i zdrowotności roślin (tab. 2).

Głównym celem uprawy gleby winno być dążenie do utrzymania jej w jak najlepszej kondycji. Stanowisko glebowe zawsze ma swoje odzwierciedlenie w plonie. Utrzymując higienę gleby, dbając o jej odżywianie i całe środowisko glebowe, mamy pewność co do jakości i ilości zbiorów. Tak utrzymane plantacje, bez względu na czynniki, na które nie możemy wpływać, tj. pogodę, zawsze będą charakteryzować się wyższymi parametrami oraz lepszym wyglądem niż te, które są pozbawione właściwej pielęgnacji i zainteresowania rolnika

Podsumowanie

Szybki rozwój rolnictwa sprawia, że przed jakąkolwiek działalnością wykonywaną na polu, niezbędna jest ocena terenu. Wszystko po to, aby nie naruszyć w niewłaściwy sposób panującego tam ładu. Zaprezentowane czynniki wpływające na plon i możliwości jego oceny pozwalają na zaplanowanie i przewidywanie plonu upraw.

Bibliografia

- Apanowicz J., 2003. Metodologia nauk. Wyd. TNOiK i SWU, Toruń.
- Fotyma M., Krasowicz S., 2001. Potencjalna produktywność gleb gruntów ornych Polski w ujęciu regionalnym. Pam. Puł. 124, 99–108.
- Frać M., 2019. Bioróżnorodność mikrobiologiczna – znaczenie i zagrożenia. W: Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń. IUNG-PIB Puławy, 65–84.
- Gałązka A., 2019. Praktyczne wykorzystanie mikroorganizmów w rolnictwie. W: Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń. IUNG-PIB Puławy, 125–135.
- Gonet S.S., 2007. Ochrona zasobów materii organicznej. W: Rola materii organicznej w środowisku, S.S. Gonet, M. Markiewicz (red.). PTSH, 7–29.
- Goździewicz-Biechońska J., 2018. Przeciwdziałanie degradacji ziemi i gleby jako globalne wyzwanie dla prawa. Prz. Prawa Rol. 1(22), 41–57, 2018. doi: 10.14746/ppr.2018.22.1.3
- Górski T., Krasowicz S., Kuś J., 1999. Glebowo-klimatyczny potencjał Polski w produkcji zbóż. Pam. Puł. 114, 127–142.
- Górski T., Zaliwski A., 2002. Model agroklimatu Polski. Pam. Puł. 130(1), 251–260.
- Guo L.J., Lin S., Liu T.Q., Cao C.G., Li C.F., 2016. Effects of conservation tillage on topsoil microbial metabolic characteristics and organic carbon within aggregates under a rice (*Oryza sativa* L.) – wheat (*Triticum aestivum* L.) cropping system in central China. PLoS ONE 11 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146145>.
- Hopfer A., Cymerman., Nowak A., 1982. Ocena i waloryzacja gruntów wiejskich. PWRiL, Warszawa.
- Jaśkiewicz B., 2004. Organizacyjno-ekonomiczne uwarunkowania produkcji zbóż jakościowych w różnych regionach Polski. Pam. Puł. 137, 59–70.

- Koreleski K., 1983. Przyrodnicze podstawy użytkowania rolniczej przestrzeni produkcyjnej. Skrypty dla szkół wyższych. Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie.
- Kozyra J., Górski T., 2004. Wpływ zmian klimatu na uprawę roślin w Polsce. W: *Klimat – Środowisko – Człowiek*. Polski Klub Ekologiczny, Okręg Dolnośląski, Wrocław.
- Krasowicz S., 2007. Możliwości zwiększenia produkcji zbóż w Polsce. W: *Czy grozi Polsce kryzys zbożowy w świetle pozarolniczego wykorzystania ziarna*. Wyd. Wieś Jutra, Warszawa, 6687.
- Krasowicz S., 2009. Produkcja roślinna w Polsce na tle warunków przyrodniczych i ekonomiczno-organizacyjnych. *Studia i raporty. IUNG-PIB Puławy* 14, 27–54.
- Kuś J., Faber A., Madej A., 2006. Przewidywane kierunki zmian w produkcji roślinnej w ujęciu regionalnym. W: *Regionalne zróżnicowanie produkcji rolniczej w Polsce*. Raporty PIB, IUNG Puławy 3, 195–210.
- Lekan S., Terelak H., 1997. Zróżnicowanie środowiska glebowo-rolniczego Polski. *Mat. konf. nauk. nt. „Ochrona i wykorzystanie rolniczej przestrzeni produkcyjnej Polski”*. Puławy 1–2, 7–21.
- Maron P.A., Sarr A., Kaisermann A., Lévêque J., Mathieu O., Guigue J., Karimi B., Bernard L., Dequiedt S., Terrat S., Chabbi A., Ranjard L., 2018. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (9).
- ONW, IUNG, 2021. <http://onw.iung.pulawy.pl/>
- Silva A.P., Babujia L.C., Matsumoto L.S., Guimarães M.F., Hungria M., 2013. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in and oxisol of southern Brasil. *Open Agric. J.* 7, 40–47.
- Smolińska U., 2019. Znaczenie mikroorganizmów w rozwoju roślin. W: *Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń*, Podleśny J., Kowalska B. (red.), IUNG-PIB, Puławy, 51–63.
- Stuczyński T., 2006. Obszary o niekorzystnych warunkach gospodarowania w Polsce. IUNG-PIB Puławy.
- Stuczyński T., 2007. Przyrodnicze uwarunkowania produkcji rolniczej w Polsce. W: *Współczesne uwarunkowania organizacji produkcji w gospodarstwach rolniczych*. *Studia i Raporty IUNG-PIB* 7, 77–115.
- Szczech M., 2019. Dbłość o stan sanitarny upraw – bezpieczna żywność. W: *Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń*, J. Podleśny, B. Kowalska (red.). IUNG-PIB Puławy, 2019, 138–154.
- Ślusarczyk E., 1979. Określenie retencji użytkowej gleb mineralnych dla prognozowania nawodnień. *Melior. Rol.* 3, 1–10.
- Terelak H., Krasowicz S. i Stuczyński T., 2000. Środowisko glebowe Polski i racjonalne użytkowanie rolniczej przestrzeni produkcyjnej. *Pam. Puł.* 120(2), 455–469.
- Tieman L.K., Grandy A.S., Atkinson E.E., Marin-Spiotta E., McDaniel M.D., 2015. Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. *Ecol. Lett.* 18, 761 – 771.
- Van der Putten W.H., Bradford M.A., Brinkman E.P. i in., 2016. Where, when and how plant-soil feedback matters in a changing world. *Funct. Ecol.* 30, 1109–1121.
- Witek T. (red.). 1981. *Waloryzacja rolniczej przestrzeni produkcyjnej Polski według gmin*. Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy Zimny L. 1995, *Leksykon rolniczy PWN*. Wyd. PWN.
- Witek T. (red.), 1994. *Waloryzacja rolniczej przestrzeni produkcyjnej Polski wg gmin*. IUNG Puławy, 1(22), 41–57.

Reakcja obronna roślin w odpowiedzi na atak patogenów

Plant defense response to pathogen attack

Rośliny stanowią podstawę pożywienia wielu organizmów, w tym człowieka. Jednak są narażone na występowanie różnych patogenów i szkodników. Posiadają zarówno konstytutywny, jak i indukowany system obronny, który hamuje atak patogenów. Presja selekcyjna wywoływana przez te czynniki sprawiła, że rośliny wytworzyły szereg barier morfologiczno-anatomicznych i biochemicznych, dzięki którym mogą bronić się przed patogenami. Stres biotyczny wywołany przez bakterie, grzyby i wirusy zaburza fizjologię, metabolizm i może powodować znaczne straty produktywności roślin [Pandey i Senthil-Kumar 2019, Ramegowda i Senthil-Kumar 2015].

Odporność roślin została sklasyfikowana jako systemowa odporność nabyta (SAR – *Systemic Acquired Resistance*) lub systemowa odporność indukowana (ISR – *Induced Systemic Resistance*). Indukowana i konstytutywna odporność (SAR i ISR) obejmuje aktywację wielu genów lub szlaków sygnalizacji obronnej [Goyal i Manoharachary 2014].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie i usystematyzowanie informacji dotyczących odpowiedzi obronnych rośliny skierowanej przeciwko patogenom.

Interakcje roślina – patogen

Patogen rozpoznaje żywiciela, a poprzez chemiczne oddziaływanie z systemem roślinnym pozwala gospodarzowi zidentyfikować swoją obecność. Występowanie podatnego żywiciela i zjadliwego patogenu nie jest jedynym powodem zapoczątkowania procesu chorobowego. Konieczne jest występowanie korzystnych warunków środowiskowych, jak również odpowiednia gęstość inokulum prowadząca do rozwoju infekcji [Surico 2013]. W wyniku oddziaływania z patogenem albo roślina broni się przed patogenem, albo patogen manipuluje biologią systemu roślinnego, aby stworzyć sprzyjające środowisko dla swojego wzrostu i rozmnażania [Goyal i Manoharachary 2014].

Rośliny reagują na patogeny za pomocą wrodzonego układu odpornościowego, który jest podzielony na PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) (odporność wyzwalana wzorcem molekularnym lub PAMP) i ETI (*Effector-Triggered Immunity*) (odporność wyzwalana przez efektor). PTI jest aktywowane po rozpoznaniu PAMP, konserwatywnych

¹ Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Agrobioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, magdalena.cieplak@up.lublin.pl

² Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Agrobioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

motywów pochodzących z patogenów, przez receptory rozpoznające wzorce zakotwiczone w błonie powierzchniowej (PRR). Aby przewyciężyć tę pierwszą linię obrony, patogeny uwalniają się do efektorów komórek roślinnych, które hamują PTI i aktywują reakcję wrażliwości wywołaną przez efektor (ETS). Rośliny rozpoznają elicytory mikroorganizmów (np. flagelina w bakteriach, EF-Tu w grzybach), PAMP i efekторы awirulencji (Avr) dzięki receptorom powierzchniowym. Na poziomie podstawowym pierwsza interakcja zachodzi między receptorami MAMP / PAMP, takimi jak kinazy (RLK), które rozpoznają niespecyficzne patogeny. Fosforylacja biomolekuł wywołana aktywnością kinaz RLK aktywuje PAMP, które zatrzymują kolonizację patogenów i zapewniają PAMP (PTI). [Dodds i Rathjen 2010].

Przeciwdziałając tej strategii wirulencji, komórki roślinne syntetyzują białka odporności wewnątrzkomórkowej (R), które specyficznie rozpoznają efekторы patogenów lub czynniki awirulencji (Avr) i aktywują ETI. Złożony i dynamiczny związek między roślinnym gospodarzem a patogenem roślinnym jest ściśle związany z hipotezą Flora [1971] „gen for gen”, co oznacza, że gen wirulencji (Avr) patogena jest skierowany przeciwko odpowiedniemu genowi odporności (R) w roślinie. Podczas infekcji patogeny wydzielają arsenał cząsteczek, zwanych łącznie efektorami, kluczowych elementów patogenez, które modulują wrodzoną odporność rośliny i ułatwiają infekcję. Rośliny wyewoluowały geny oporności (R) kodujące białka R zdolne do rozpoznawania, bezpośrednio lub pośrednio, niektórych z tych efektorów zwanych wtedy białkami awirulencji (Avr) [Sharma i Gupta 2020].

Odpowiedź rośliny na patogenezę

Do mechanizmów obronnych roślin należą m.in. bariery fizyczne i chemiczne. Patogeny muszą przekraczać naturalne bariery żywiciela, aby mieć dostęp do składników odżywczych umożliwiających rozprzestrzenianie się infekcji [Goyal i Manoharachary 2014].

Fizyczne bariery

Rośliny posiadają wbudowane naturalne bariery fizyczne, takie jak gruba ściana komórkowa, śluz, włoski gruczołowe lub trichomy, które zapobiegają wnikaniu patogenów [Laluk i Mengiste 2010]. Stanowią one pierwszą linię obrony systemu roślinnego. Wykazano również, że organizacja cytoszkieletu reguluje wnikanie patogenów u wielu gatunków roślin [Janda i in. 2014, Porter i Day 2016]. Właściwości komórki roślinnej, takie jak grubość skórki i rozmiar aparatów szparkowych, mogą wpływać na zachamowanie wnikania patogenu. Kolejnym przykładem barier strukturalnych jest wosk, który zapewnia ochronę poprzez zwiększoną hydrofobowość i zmniejszony dostęp patogenu do wilgoci, uniemożliwiając tym samym jego namnażanie [Serrano i in. 2014]. Ponadto ściana komórkowa roślin jest chroniona przez kutykule. Niewiele patogenów grzybowych zawiera enzymy kutynazy, które niszczą kutykulę na powierzchni rośliny i umożliwiają wniknięcie do tkanek skórki [Freeman 2008]. Również substancja inkrustująca ściany komórkowe (np. lignina) stanowią barierę przed infekcją. Wykazano, że obecność zwiększonej zawartości ligniny utrudnia penetrację

patogenów grzybowych, zapewniając wytrzymałość mechaniczną ściany komórkowej roślin [Zhao i Dixon 2011]. Lignina również ogranicza swobodny transport składników odżywczych z komórki gospodarza [Smith i in. 2007]. Rola ligniny podczas ataku patogenów została opisana w przypadku mechanizmów obronnych pszenicy [Casassola i in. 2015], bawełny [Shi i in. 2012] oraz lnu [Wróbel-Kwiatkowska i in. 2007].

Wiele patogenów wnika również do komórki gospodarza za pośrednictwem naturalnych otworów, takich jak aparaty szparkowe, przetchlinki, rany itp. [Guan i in. 2015]. Dlatego rośliny w toku ewolucji wytworzyły szereg przystosowań ograniczających możliwość przedostania się patogenów tą drogą. Zaobserwowano, że suberyzacja i formowanie wtórnej tkanki okrywającej perydermy wokół przetchlinek zwiększa odporność roślin [Underwood i in. 2007]. Kolejnym przykładem jest wytworzenie rozległej tylozy (wytwór komórek miękkiszowych sąsiadujących z drewnem) w naczyniach ksylemu, która zapobiega rozprzestrzenianiu się patogenu przez tkanki przewodzące. Inne wytwory skórki, takie jak włosniki, włoski gruczołowe, zapewniają zarówno fizyczną, jak i chemiczną ochronę przed szkodnikami owadzi, które są wektorami przenoszącymi wirusy [Sharma i Gupta 2020].

Bariery chemiczne

Rośliny syntetyzują szereg wtórnych metabolitów, w tym terpeny, fenole, flawonoidy, alkaloidy, związki aromatyczne, które zwiększają odporność rośliny żywicielskiej. Stwierdzono również, że wyższe stężenie metabolitów wtórnych przyczynia się istotnie do aktywacji reakcji obronnych, ale kosztem zmniejszonego wzrostu [Siemens i in. 2002]. Zwiększona biosynteza związków fenolowych (takich jak kwas kumarowy, kwas salicylowy) po infekcji grzybowej jest powszechnym zjawiskiem obserwowanym u różnych roślin. Slatnar i in. [2016] zauważyli istotnie wyższą zawartość kwasu elagowego w zdrowych łodygach maliny w porównaniu z zakażoną tkanką, co wskazuje, że kwas elagowy i jego pochodne mają właściwości obronne. Lotna natura terpenów i flawonoidów wydzielanych przez odporne gatunki zapobiega infekcji patogenów. Wyższe terpeny, takie jak gossypol (diterpenoid) w bawełnie, limonoid w skórkach cytryny i pomarańczy, mają silne właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwgrzybicze nawet w bardzo niskich stężeniach. Monoterpenoidy, takie jak alfa i beta pinen, uwalniane przez sosnę, działają jako silne repelenty (środki odstrasżające) [Buonaurio 2008]. Ponadto koniugaty terpenoidów (takie jak pyretryny z *Chrysanthemum* spp.) działają jako silna neurotoksyna. Zastosowanie nawet niskiego stężenia pyretryny (0,1%) jest wystarczające do powstrzymania wciornastka zachodniego [Yang i in. 2013]. Emisja niektórych substancji lotnych roślin, glikozydów, związków aromatycznych na powierzchnię skórki może stymulować lub hamować namnażanie się patogenów. Stwierdzono również, że akumulacja kwasu chlorogenowego w odmianach ziemniaka hamuje rozwój parcha zwykłego ziemniaka. Fitoantypina jak avenacina w *Avena sativa*, kwas protokatechowy w cebuli, glukozynolany w *Brassica* spp. zapewniają ochronę przed patogenem przez ograniczanie kiełkowania zarodników i zahamowanie wydzielania substancji czynnych [Andersen i in. 2018].

Cząsteczki zaangażowane w obronę i przekazywanie sygnałów

Pokonanie barier fizycznych i chemicznych przez patogen pobudza aktywny mechanizm systemu obronnego, który obejmuje aktywację reaktywnych form tlenu, związków przeciwdrobnoustrojowych, fitoaleksyn itp. Działają one jako wtórne przekaźniki w regulacji genów odporności. Cząsteczki sygnatur uwalniane przez patogen, takie jak wzorce molekularne (PAMP lub MAMP), również uczestniczą we włączaniu i wyłączeniu genów odporności. Fitohormony i różne białka (zwłaszcza kinazy MAP, czynniki transkrypcyjne) są również kluczowymi czynnikami w regulacji biosyntezy metabolitów związanych z odpornością, prowadząc do miejscowej nadwrażliwości (HR) lub ogólnoustrojowej odpowiedzi nabytej (SAR), w celu ochrony przed infekcją i zahamowaniem rozwoju patogena [Sharma i Gupta 2020].

Reaktywne formy tlenu

Interakcja roślin z różnymi toksynami bądź elicytorami patogenów (MAMP i PAMP) wyzwala stres oksydacyjny prowadzący do powstania ROS (*Reactive Oxygen Species*) [Shetty i in. 2008]. Wiadomo, że organelle subkomórkowe są głównymi miejscami wytwarzania ROS w komórce gospodarza. Te małe cząsteczki ROS (anion ponadtlenkowy, H_2O_2 i rodnik hydroksylowy OH) są kluczowymi wtórnymi przekaźnikami w sygnalizacji obronnej ze względu na ich swobodną dyfuzję komórkową, a tym samym wpływają na ekspresję kilku jądrowych genów, kaskady kinaz, biosyntezę fitohormonów, peptydów oraz genów R [Karuppanapandian i in. 2011]. Jednak nadmiar stresu oksydacyjnego zakłóca komórkową homeostazę redoks, integralność błony, mechanizm antyoksydacyjny i metabolizm oddechowy, co prowadzi do fitotoksyczności. Dla utrzymania odpowiedniej produkcji ROS, komórka roślinna posiada zestaw antyoksydacyjnych enzymów, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalazy (CAT), peroksydaza glutationowa (GPX), peroksydaza askorbinianowa (APX) peroksyredoksyna (PrxR)), reduktaza glutationowa (GR). Oprócz enzymów, substancje takie jak kwas askorbinowy, glutation (GSH), tokoferole, karotenoidy i fenole, również regulują poziom ROS w miejscach ich powstawania [Sharma i Gupta 2020].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs – *Antimicrobial Peptides*) to naturalnie występujące białka wytwarzane jako pierwsza linia obrony gospodarza. Ta zróżnicowana klasa peptydów oddziałuje z fosfolipidami, powodując zmianę przepuszczalności błony, a ostatecznie prowadzi do lizy komórek i śmierci patogena. AMPs są z natury wszechobecne i zostały zidentyfikowane w różnych organach roślin, takich jak nasiona, kwiaty, korzenie, łodygi i liście [Sharma i Gupta 2020]. Ten naturalny system antybiotykowy składa się z dziewięciu rodzin: LTPs (*Lipid Transfer Protein*), tionin (*thionins*), defensyn (*defensins*), hawein (*heveins*), knotyn (*knottins*), peptydów typu cysteinowego (*cysteine types*), szeperdyn (*shepherdins*), cyklotyd (*cyclotides*) oraz snakin (*snakins*) [Yamuna i in. 2019]. Większość AMPs ma wielkość od 2 do 9 kDa i jest bogata w hydrofobowe aminokwasy. AMPs zostały sklasyfikowane jako anionowe AMP i kationowe AMP. Stwierdzono, że wysoka zawartość cysteiny w AMPs zapewnia

zwiększoną stabilność strukturalną poprzez tworzenie wiązań dwusiarczkowych w warunkach stresu wywołanego patogenem [Nawrot i in. 2014].

Geny odporności roślin (R)

Gen R (gen odporności) musi pasować do genu Avr (gen awirulencji), aby wywołać odpowiedź obronną [Numberger i in. 2004]. Geny odporności u gospodarza mogą być dominujące (R) (warunkujące odporność) lub recesywne (r) (brak odporności). Geny wirulencji mogą być dominujące (A) i recesywne (a). W związku z tym w interakcji gospodarz – patogen możliwe są cztery kombinacje genów: R-a, r-A, r-a i R-A. Trzy kombinacje R-a, r-A i r-a powodują kompatybilną reakcję i skuteczną infekcję. Jedna kombinacja R-A nie warunkuje wytworzenia kompatybilnej reakcji i nie warunkuje wystąpienia infekcji [Goyal i Manoharachary 2014]. Jednak z drugiej strony brak lub mutacja w którymkolwiek z patogennych genów Avr lub genów R gospodarza może wywołać proces chorobowy [Garcia-Brugger i in. 2006]. Reakcja odpornościowa roślin jest kaskadą sygnałów biochemicznych warunkowaną przez geny odporności, która zostaje zapoczątkowana przez białkowy produkt genu R wchodzący w interakcję z czynnikiem awirulencji wytworzonym przez patogen. Allele genów zjadliwości Avr kodują warianty białek efektorowych wirulencji, a gen R koduje zazwyczaj immunoreceptory wewnątrzkomórkowe (NB-LRR), które wykrywają białko Avr w obrębie zainfekowanej komórki roślinnej. Produkty R albo bezpośrednio oddziałują z cząsteczkami efektorowymi patogena, albo pośrednio poprzez połączenie z cząsteczkami, które są możliwymi celami cząsteczek efektorowych patogena. Jakakolwiek zmiana w konformacji strukturalnej docelowej cząsteczki gospodarza wpływa na interakcję genu R, a tym samym na odpowiedź sygnałową [Sharma i Gupta 2020].

Pomimo identyfikacji wielu produktów genu R w roślinach uprawnych, cząsteczki efektorowe wytwarzane przez patogen ewoluują szybciej, przez co nie są rozpoznawane przez R gen i tym samym stwarzają większe zagrożenie przełamania odporności u odmian [Friedman i Baker 2007]. Dlatego nowoczesne strategie hodowlane w programach ulepszania upraw koncentrują się albo na wzmocnieniu wrodzonego potencjału odpornościowego, albo na zapobieganiu rozpadowi kompleksu R-Avr poprzez introgresję nowych efektywnych genów odporności z dzikiej puli genów oraz piramidyzację genów R (wprowadzanie kilku genów jednocześnie) [Mundt 2018, Sharma i Gupta 2020].

Podsumowanie

Interakcja pomiędzy rośliną gospodarzem a patogenem jest bardzo skomplikowana i dynamiczna. Zrozumienie podstaw i złożoności tego procesu jest warunkiem koniecznym do osiągnięcia celu związanego z uzyskaniem długotrwałej i efektywnej odporności w różnych warunkach środowiska. Substancje uwalniane zarówno przez roślinę, jak i patogen determinują losy ich interakcji. Dlatego ich identyfikacja, zarówno na poziomie metabolicznym, jak i molekularnym, pomoże w zrozumieniu interakcji roślina – patogen i pozwoli na uzyskanie roślin uprawnych nowej generacji odpornych na wiele patogenów.

Bibliografia

- Andersen E.J., Ali, S., Byamukama E., Yen, Y., Nepal M.P., 2018. Disease resistance mechanisms in plants. *Genes (Basel)* 9, 7, 339. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>.
- Buonaurio, R. 2008. Infection and plant defense responses during plant- bacterial interaction. *Plant-Microbe Interact.* 661, 169–197.
- Casassola A., Brammer S.P., Chaves M.S., Martinelli J.A., Stefanato F., Boyd L.A., 2015. Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 89, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.12.004>
- Dodds P.N., Rathjen J.P., 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Flor H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- Freeman B.C., Beattie G.A., 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Heal. Instr.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0226-01>
- Friedman A.R., Baker B.J., 2007. The evolution of resistance genes in multi-protein plant resistance systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 493–499, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.08.014>
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinsot, B., Wendehenne D., Pugin A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 711–724. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0711>
- Goyal A., Manoharachary C., 2014. (eds.), *Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens.* *Fungal Biology.* https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1188-2_1
- Guan Y., Chang R., Liu G., Wang Y., Wu T., Han Z., Zhang X., 2015. Role of lenticels and microcracks on susceptibility of apple fruit to *Botryosphaeria dothidea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 317–330. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0682-z>
- Janda M., Matoušková J., Burketová L., Valentová O., 2014. Interconnection between actin cytoskeleton and plant defense signaling. *Plant Signal. Behav.* 9. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.976486>
- Karuppanapandian T., Moon J.C., Kim C., Manoharan K., Kim W., 2011. Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 709–725.
- Laluk K., Mengiste T., 2010. Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? *Arab. B.* 8, 136. <https://doi.org/10.1199/tab.0136>
- Mundt C.C., 2018. Pyramiding for resistance durability: Theory and practice. *Phytopathology.* 108, 792–802. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>
- Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Goździcka-Józefiak A., 2014. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 59, 181–196. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>
- Numberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 198, 249–266.
- Pandey P., Senthil-Kumar M., 2019. Plant-pathogen interaction in the presence of abiotic stress: What do we know about plant responses? *Plant Physiol. Reports.* 24, 541–549. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00483-7>
- Porter K., Day B., 2016. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 58, 299–311. <https://doi.org/10.1111/jipb.12445>
- Ramegowda V., Senthil-Kumar M., 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J. Plant Physiol.* 176, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
- Serrano M., Coluccia F., Torres M., L'Haridon F., Métraux J.P., 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>
- Sharma S., Gupta N., 2020. Defense signaling in plants against micro-creatures: do or die. *Indian Phytopathol.* 73, 605–613. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00249-4>

- Shetty N.P., Jørgensen H.J.L., Jensen J.D., Collinge D.B., Shetty H.S., 2008. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 121, 267–280. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9302-5>
- Shi H., Liu Z., Zhu L., Zhang C., Chen Y., Zhou Y., Li F., Li X., 2012. Overexpression of cotton (*Gossypium hirsutum*) dirigent gene enhances lignification that blocks the spread of *Verticillium dahliae*. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 44, 555–564. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms035>
- Siemens D.H., Garner S.H., Mitchell-Olds T., Callaway R.M., 2002. Cost of defense in the context of plant competition: *Brassica rapa* may grow and defend. *Ecology* 83, 505–517. <https://doi.org/10.2307/2680031>
- Slatnar A., Mikulič-Petkovšek M., Veberič R., Štampar F., 2016. Research on the involvement of phenolics in the defence of horticultural plants. *Acta Agric. Slov.* 107, 183–189. <https://doi.org/10.14720/aas.2016.107.1.18>
- Smith A.H., Gill W.M., Pinkard E.A., Mohammed C.L., 2007. Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *For. Pathol.* 37, 361–373. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00502.x>
- Surico G., 2013. The concepts of plant pathogenicity, virulence / avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 399–417.
- Underwood W., Melotto M., He S.Y., 2007. Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell. Microbiol.* 9, 1621–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00938.x>
- Wróbel-Kwiatkowska M., Starzycki M., Zebrowski J., Oszmiański J., Szopa J., 2007. Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *J. Biotechnol.* 128, 919–934. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.030>
- Yamuna S., Nithesh Kumar V., Bala Subramaniam D., Kumaravel K., 2019. Antimicrobial peptides from plants and their mode of action. *Am. Int. J. Res. Sci. Technol. Eng. Math.* 265–269
- Yang S., Li J., Zhang X., Zhang Q., Huang J., Chen J.Q., Hartl D.L., Tian D., 2013. Rapidly evolving R genes in diverse grass species confer resistance to rice blast disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18572–18577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318211110>
- Zhao Q., Dixon, R.A., 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: More complex than we thought? *Trends Plant Sci.* 16, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.005>

Wpływ powierzchni odbijającej sygnał na dokładność geodezyjnych pomiarów dalmierzem laserowym

Influence of the reflecting surface on the accuracy
of geodesic reflectorless distance measurements

Wstęp

Jednym z najważniejszych zagadnień, jakim zajmuje się geodezja, są pomiary odległości. Pierwsze znane ludzkości metody pomiaru dystansu były bardzo prymitywne. Powszechnie wykorzystywano metody bezpośrednie, polegające na zastosowaniu odpowiedniego przyrządu, który wielokrotnie odkładano wzdłuż mierzonego odcinka [Kosiński 2010, Kurałowicz 2010]. Miarami w starożytnym Egipcie były: łokieć, dłoń i palec. W starożytnym Rzymie do pomiarów wykorzystywano stopy, a krótsze odległości odnoszono do szerokości kciuka. Dla dłuższych odcinków stosowano jednostkę kroku, zaś tysiąc kroków było równe mili. Inną jednostką stosowaną przez kupców był jard, mierzono tak kawałki tkanin i była to odległość od brody przytrzymującej materiał do końca wyciągniętej ręki [Kurałowicz 2010]. Kolejnym narzędziem znanym od wieków jest odometer – proste urządzenie dołączane do pojazdu, rejestrujące liczbę obrotów koła. Znając obwód koła, łatwo można obliczyć odległość [Hycner i Dobrowolska-Weśółowska 2008].

Narzędziami wykorzystywanymi do pomiarów odległości w średniowieczu były kije i sznury. Narzędziem stosowanym w Polsce nawet do połowy XX w. był trójkąt mierniczy, zwany także kroczeniem czy krokiewką. Pomiar polegał na odkładaniu tej samej odległości wyznaczonej przez ramiona trójkąta [Kurałowicz 2010].

Wszystkie wspomniane powyżej metody cechowały się małą dokładnością. Dopiero w XX w. nastąpił stopniowy rozwój coraz bardziej precyzyjnych metod pomiaru, jak również określania i redukcowania błędów. Jako przymiary stosowano druty inwarowe (tzw. przymiary drutowe) oraz okute, drewniane łąty poligonowe (tzw. przymiary sztywne). Druty i łąty zostały zastąpione przez pomiary wstęgowe, polegające na pomiarze odległości za pomocą ruletki bądź taśmy. Są one stosowane do pomiarów małych odległości do dziś [Jagielski 2019].

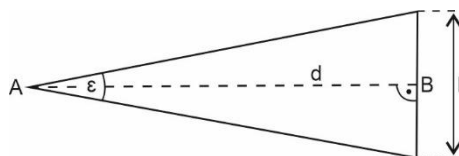
Drugim rodzajem pomiarów odległości, oprócz opisanych powyżej pomiarów bezpośrednich, są pomiary pośrednie, w których wykorzystywane są: dowolna konstrukcja geometryczna, paralaktyczny pomiar długości lub pomiar za pomocą dalmierza. Najczęściej wykorzystywaną i najdokładniejszą jest ostatnia z wymienionych metod [Świątek 2003]. Istnieją dwie grupy dalmierzy: optyczne oraz elektromagnetyczne [Wysocki 2008].

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, joanna.gmitrowicz@gmail.com

Optyczny pomiar odległości oparty jest na realizacji prostej koncepcji geometrycznej. W wydłużonym trójkącie równoramiennym odległość „d” między dwoma punktami „A” i „B” można obliczyć za pomocą krótkiej bazy „l” oraz małego kąta „ε”, zwanego paralaktycznym (schemat przedstawiono na rycinie 1). W punkcie A ustawiony jest instrument, zaś w punkcie B pozioma lub pionowa łąta. Wykorzystując odpowiedni instrument, można łącie zmierzyć bazę „l”, która pozostaje z odległością „d” na podstawie równania [Ząbek 2012]:

$$D = \frac{1}{2} \cdot ctg \frac{\varepsilon}{2}$$

gdzie: d – odległość między punktami A i B; l – długość bazy; ε – kąt paralaktyczny



Ryc. 1. Zasada pomiaru paralaktycznego. Opracowanie własne

Drugim rodzajem dalmierzy wykorzystywanych w geodezji są dalmierze elektroniczne. Ich działanie oparte jest na prostoliniowym rozchodzeniu się fal ze stałą prędkością. Elektroniczne pomiary odległości cechują się wysoką dokładnością i szybkością [Jagielski 2020, Hycner i Dąbrowska-Wesołowska 2008].

Pomiar dalmierzem elektronicznym wymaga zastosowania aparatury nadawczo-odbiorczej na punkcie A i aktywnego lub biernego układu retransmisyjnego w punkcie B. Po wysłaniu sygnału urządzenie pomiarowe, połączone z aparaturą nadawczo-odbiorczą, rejestruje czas przejścia sygnału z punktu A do B i z powrotem. W praktyce oznacza to, że urządzenie rejestruje czas: (a) wyjścia sygnału z nadajnika i (b) dotarcia odbitego sygnału do odbiornika. Na podstawie zmierzonego czasu i prędkości rozchodzenia się fal (ok. $300\,000\text{ km}\cdot\text{s}^{-1}$) obliczana jest przebyta przez sygnał odległość. Pomiar odległości przeprowadzony z użyciem dalmierza elektronicznego jest procesem w pełni zautomatyzowanym. Obliczenia wykonuje urządzenie, a końcowy wynik wyświetlany jest na wyświetlaczu ciekłokrystalicznym [Czarnecki 2015, Wanic 2007].

Dalmierze elektroniczne w zależności od wykorzystywanych fal dzielą się na dwie grupy: świetlne (fale świetlne) i radiowe (mikrofale). W geodezji dalmierze mikrofalowe stosowane są jedynie do pomiarów boków o długości powyżej 20 km, szerokie zastosowanie mają zaś dalmierze laserowe [Świątek 2003].

Dalmierze laserowe mogą stanowić oddzielne, ręczne urządzenia lub być częścią większego systemu, np. tachimetru. Pomiar może być wykonywany do przyzmatu geodezyjnego, który cechuje się wysokim odbiciem wiązki. Drugi tryb to pomiar bezlustrowy, na dowolną powierzchnię. Maksymalny zasięg pomiaru odległości na lustro wynosi do

5000 m, z dokładnością $\pm 1 \text{ mm} + 1,5 \text{ ppm}$ (ppm – liczba części na milion, w tym przypadku liczba milimetrów na kilometr). Zasięg rzeczywisty zależy w dużej mierze od warunków atmosferycznych, takich jak nasłonecznienie czy zamglenia [Jagielski 2019].

Zasięg i dokładność pomiaru bezlustrowego może różnić się w zależności od charakterystyki celu: koloru, gładkości, gęstości, przepuszczalności światła oraz struktury, które wpływają na stopień odbicia wiązki lasera. Zasięg wynosi od 1000 m (dla jasnych powierzchni o wysokim stopniu odbicia) do 200 m (cele ciemne, słabo odbijające sygnał). Na dokładność pomiarów, prócz właściwości powierzchni odbijającej sygnał, wpływają również warunki meteorologiczne i długość mierzonej odległości. Błąd pomiaru wynosi od $\pm 2 \text{ mm} + 2 \text{ ppm}$ na krótkich dystansach i przy dobrym odbiciu sygnału do $5 \text{ mm} + 3 \text{ ppm}$ na większych dystansach i słabym odbiciu [Lambrou i Pantazis 2010, Lenda i Mar-mol 2010, Specyfikacja Sokkia].

Celem badań była analiza wpływu powierzchni odbijającej sygnał na dokładność pomiarów odległości wykonanych dalmierzem bezlustrowym na dystansach 20 m i 40 m. Ponadto ustalono, czy takie parametry, jak kolor czy struktura powierzchni, mają wpływ na pomiary.

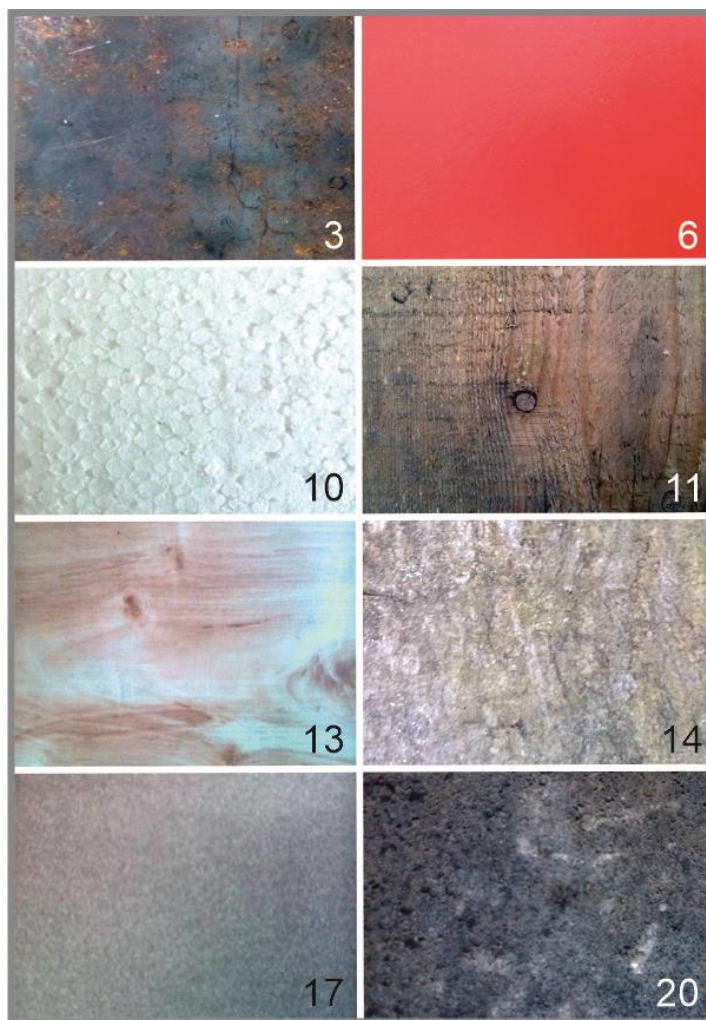
Materiały i metody

Eksperyment polegał na pomiarze odległości dalmierzem laserowym do różnych powierzchni na dystansach 20 i 40 metrów. Wybrano 20 różnych materiałów, które można spotkać w trakcie wykonywania podstawowych pomiarów geodezyjnych (część materiałów przedstawiona na rycinie 2). Różniły się kolorem, fakturą oraz przepuszczalnością wiązki laserowej:

- gładkie płyty metalowe w kolorze białym (próbka nr 1) i brązowym (2) oraz płyta metalowa skorodowana (3),
- gładkie panele o fakturze drewna (wykorzystywane np. w elewacjach budynków) w kolorze białym (4) i brązowym (5),
- płyty polipropylenowe (plastikowe) w kolorze czerwonym (6) i czarnym (7), o gładkiej powierzchni, nieprzepuszczające światła,
- płyta polipropylenowa (plastikowa) w kolorze zielonym (8), o średniej przepuszczalności światła i nierównej powierzchni,
- płyta polipropylenowa (plastikowa) w kolorze białym („mleczna”), o wysokiej przepuszczalności światła i gładkiej powierzchni (9),
- płyta wykonana z polistyrenu spienionego (styropianu, 10),
- płyty drewniane: ciemna o szorstkiej powierzchni (11), jasna o szorstkiej powierzchni (12), jasna o oszlifowanej powierzchni (13), płyta pokryta korą grabu (14),
- płyty tekturowe: szorstkie w kolorze białym (15) i beżowym (16) oraz szara o gładkiej powierzchni (17),
- płyta szklana w kolorze żółtym (18), o chropowatej powierzchni i wysokiej przepuszczalności światła,
- płyta ceramiczna, gładka, w jasnym kolorze (19),
- płyta betonowa o szorstkiej powierzchni i czarnym kolorze (20).

Wyniki pomiarów zostały porównane do pomiaru wyjściowego (do lustra geodezyjnego).

Pomiar wykonany został w czerwcu, w godzinach 19.00–20.00. Późna pora oraz zachmurzenie ograniczały wpływ warunków atmosferycznych, tj. nasłonecznienia i wysokiej temperatury na wyniki.



Ryc. 2. Zdjęcia wybranych próbek materiałów (numery wg spisu powyżej). Opracowanie własne

Wykorzystano tachimetr Sokkia CX-107 (ryc. 2) z wbudowanym dalmierzem laserowym, posiadającym funkcję pomiaru bezlustrowego. Maksymalny zasięg pomiaru odległości to 5000 metrów w przypadku pomiarów na pryzmat (dokładność $\pm 2 \text{ mm} + 2 \text{ mm} \cdot \text{km}^{-1}$) oraz 500 metrów w przypadku pomiarów bezlustrowych (dokładność $\pm 3 \text{ mm} + 2 \text{ mm} \cdot \text{km}^{-1}$) [Specyfikacja Sokkia].



Ryc. 2. Tachimetr Sokkia CX-107 (po lewej) i ramka, do której przymocowywano próbki (po prawej)

Fot. J. Gmitrowicz-Iwan

Tachimetr ustawiony był na jednym statywie, zaś na drugim, oddalonym o 20 metrów, umieszone było lustro. Po wykonaniu pomiaru wyjściowego, w miejsce przyzmatu montowano specjalną ramkę (ryc. 2), do której można było mocować kolejne próbki materiałów. Ramka zamocowana była na wsporniku wyposażonym w libellę, który przymocowany był do spodarki za pomocą śruby sercowej. Pomiar kończył się ponownym celowaniem na lustro, dla sprawdzenia, czy w trakcie pomiaru instrumenty nie uległy przesunięciu. Te same czynności wykonano na drugim stanowisku, oddalonym od tachimetru o 40 metrów. Pomiary na obu stanowiska wykonywane były w trzech seriach.

Wyniki i dyskusja

Różnice w pomiarze odległości w większości przypadków były niewielkie i wynosiły $\pm 1-3$ mm (tab. 1). Odchylenie standardowe obliczone dla próbek na obydwu dystansach było niskie (od 0 mm do 2 mm), dlatego zostało pominięte w tabelach. Materiałami najlepiej odbijającymi sygnał dalmierza były jasna oszlifowana deska (próbka nr 13) oraz płyta ceramiczna (nr 19) – odchyłki wynosiły zero na obydwu dystansach. Wynikało to z gładkiej powierzchni tych materiałów oraz ich koloru – barwy jasne charakteryzują się

wysokim albedo, czyli stosunkiem promieniowania odbitego do padającego. Wartość albedo zawiera się w przedziale od 0 do 1, przy czym powierzchnie doskonale białe mają albedo równe 1, zaś doskonale czarne równe 0 [Lambrou i Pantazis 2010, Qin i in. 2018].

Tabela 1. Średnie odległości zmierzone do poszczególnych próbek

Nr	Nazwa próbki	Zmierzona odległość [m] na dystansie:	
		20 m	40 m
0	Pryzmat	20,000	40,000
1	Płyta metalowa biała	19,997	39,998
2	Płyta metalowa brązowa	19,997	39,998
3	Płyta metalowa skorodowana	19,999	39,999
4	Panel o fakturze drewna biały, gładki	19,998	40,000
5	Panel o fakturze drewna brązowy, gładki	19,997	39,998
6	Płyta plastikowa czerwona	19,999	39,998
8	Płyta plastikowa czarna	19,999	39,998
7	Płyta plastikowa zielona	19,997	40,001
9	Płyta plastikowa półprzezroczysta	20,123	40,099
10	Styropian	20,010	40,010
11	Płyta drewniana, ciemna, szorstka	20,001	40,002
12	Płyta drewniana, jasna, szorstka	19,998	40,000
13	Płyta drewniana, jasna, oszlifowana	20,000	40,000
14	Płyta drewniana pokryta korą	19,999	39,999
15	Tektura biała, szorstka	19,999	39,998
16	Tektura beżowa, szorstka	19,999	39,998
17	Tektura szara, gładka	19,999	39,999
18	Płyta szklana	20,003	39,999
19	Płyta ceramiczna, jasna	20,000	40,000
20	Płyta betonowa, czarna	19,999	39,999

W przypadku materiałów o nierównych, pofalowanych powierzchniach (8 – płyta plastikowa zielona, 18 – płyta szklana żółta) odnotowano odchyłki o różnych znakach. Wynikało to z padania wiązki lasera na „wypukłość” lub „zagłębienie” w powierzchni [Klimkowska i Wróbel 2009]. Należy też zaznaczyć, że próbka nr 8 charakteryzowała średnią przepuszczalnością światła, a więc część padającej wiązki lasera była przez nią przepuszczana. Urządzenie jednak było na tyle czułe, że stosunek promieniowania odbitego do wysłanego był wystarczający do pomiaru odległości.

Inne anomalie pomiaru odległości mogą być interpretowane kolorem bądź strukturą powierzchni [Zawiła-Niedźwiecki 2010]. Próbki o ciemnej barwie charakteryzowały się niskim albedo, czyli wysokim pochłanianiem promieniowania, co mogło przekładać się na niedokładny pomiar (2 – metalowa płyta w kolorze brązowym, 5 – panel o fakturze drewna brązowy, 6 – płyta plastikowa czerwona, 7 – płyta plastikowa czarna). Jednocześnie, odchyłki mieściły się w granicy błędów pomiaru bezlustrowego deklarowanego w specyfikacji dalmierza [Specyfikacja Sokkia]. Podobne wyniki otrzymali Bolkas i Martinez [2018] oraz Coaker [2009] w swoich pracach na temat błędów w pomiarach bezlustrowych.

Kolejnym czynnikiem, który mógł mieć wpływ na zaburzenie pomiaru odległości, była struktura powierzchni – niektóre próbki były pokryte płytkami żłobieniami. Dodatkowo, gęstość tych materiałów była niższa niż np. płyty ceramicznej (3 – płyta pokryta rdzą, 4 – panel o fakturze drewna jasny, 11 – deska ciemna o nierównej powierzchni, 12 – deska jasna i szorstka, 14 – deska pokryta korą). Nie wpływało to jednak znacząco na zaburzenia pomiaru odległości, błędy nie przekraczały ok. $\pm 0,15\%$ (tab. 2). Dodatkowo, wg Bolkasa i Martineza [2018], szorstkie materiały mogą odbijać wiązkę promieniowania lepiej niż gładkie powierzchnie, tym samym zwiększając precyzję pomiaru. Pokazuje to, że pomiary bezlustrowe mogą być stosowane do inwentaryzacji drzew [Brach 2009]. Wykonane pomiary do drewna lub kory nie były obciążone wysokimi błędami, wszystkie mieściły się w wartości błędu deklarowanego przez producenta ($\pm 3 \text{ mm} + 2 \text{ mm} \cdot \text{km}^{-1}$) [Specyfikacja Sokkia]. Jest to zgodne z otrzymanymi wynikami.

Dużym błędem obciążony był pomiar do płyty wykonanej z polistyrenu spienionego (styropianu, próbka nr 10). Na obydwu dystansach błąd był równy 1 cm. Gęstość badanej próbki wynosiła $30 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, a więc niewiele w porównaniu do np. płyty ceramicznej o gęstości równej ok. $340 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Mimo wysokiego albedo (styropian miał biały kolor, a więc teoretycznie dobrze odbijał światło) niska gęstość materiału przełożyła się na duży błąd pomiaru odległości [Lambrou i Pantazis 2010]. Płyty styropianowe są powszechnie wykorzystywane w pracach budowlanych do ocieplania budynków. Dlatego wykonując pomiary bezlustrowe do tego rodzaju powierzchni należy liczyć się z błędnym wynikiem.

Tabela 2. Względny błąd pomiaru odległości wyrażony w promilach

Nazwa próbki	Błąd względny [%] na dystansie:	
	20 m	40 m
0 Pryzmat	0,00	0,00
1 Płyta metalowa biała	-0,15	-0,05
2 Płyta metalowa brązowa	-0,15	-0,05
3 Płyta metalowa skorodowana	-0,05	-0,02
4 Panel o fakturze drewna biały, gładki	-0,10	0,00
5 Panel o fakturze drewna brązowy, gładki	-0,15	-0,05
6 Płyta plastikowa czerwona	-0,05	-0,05
8 Płyta plastikowa czarna	-0,05	-0,05
7 Płyta plastikowa zielona	-0,15	0,02
9 Płyta plastikowa półprzezroczysta	6,15	2,47
10 Styropian	0,50	0,25
11 Płyta drewniana, ciemna, szorstka	0,05	0,05
12 Płyta drewniana, jasna, szorstka	-0,10	0,00
13 Płyta drewniana, jasna, oszlifowana	0,00	0,00
14 Płyta drewniana pokryta korą	-0,05	-0,02
15 Tektura biała, szorstka	-0,05	-0,05
16 Tektura beżowa, szorstka	-0,05	-0,05
17 Tektura szara, gładka	-0,05	-0,02
18 Płyta szklana	0,15	-0,02
19 Płyta ceramiczna, jasna	0,00	0,00
20 Płyta betonowa, czarna	-0,05	-0,02

Płyty tekturowe również cechowały się stosunkowo niską gęstością (ok. $360 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$), jednak mierzone odległości były obarczone niewielkim błędem ($\pm 0,05\%$). Pokazuje to, że czynnikiem wpływającym na odbijanie się wiązki lasera jest nie tylko gęstość, ale również struktura materiału. Mimo że styropian i tektura miały podobną gęstość, to tylko pierwszy z wymienionych materiałów znacząco zaburzył pomiar. Wierzchnia warstwa tektury była gładka, stąd lepsze odbijanie wiązki promieniowania wysłanej przez dalmierz [Lambrou i Pantazis 2010].

Płyta plastikowa o wysokiej przepuszczalności światła (próbka nr 9) okazała się materiałem o najgorszych właściwościach w odniesieniu do bezlustrowych pomiarów odległości. Błąd na mierzonych dystansach wynosił odpowiednio $6,15\%$ i $2,47\%$. Wiązka lasera nie odbiła się od płyty, ale od operatora stojącego za statywem. Jest to powszechny problem w przypadku pomiarów laserowych do tego typu powierzchni [Lenda i Buczek 2020].

Analizując wyniki, można zauważyć, że kolor próbek nie był czynnikiem znacząco wpływającym na pomiary. Materiały w jasnych kolorach (np. nr 1, 4, 12), jak i w ciemnych (np. 2, 5, 7, 11) zazwyczaj zaniżały wynik o ok. 2 mm. Beshr i Elnaga [2011] w swojej pracy wskazują, że kolor w niewielkim stopniu wpływa na dokładność pomiaru odległości. Według autorów różnice między pomiarem do tego samego materiału w kolorze białym i czarnym wynoszą jedynie ok. 0,2 mm na dystansie 40 m i zmniejszają się wraz ze zmniejszającą się mierzoną odległością.

Należy podkreślić, że wykonane pomiary odległości (z wyłączeniem próbek nr 9 i 10) są zgodne ze specyfikacją urządzenia. W przypadku pomiarów bezlustrowych deklarowana dokładność wynosiła $\pm 3 \text{ mm} + 2 \text{ mm} \cdot \text{km}^{-1}$ [Specyfikacja Sokkia]. Dodatkowo, w większości przypadków mierzona odległość była zaniżona, podobne wyniki otrzymali Lambrou i Pantazis [2010]. Pomiar odległości do dwóch próbek znacząco różnił się od wartości rzeczywistej. W przypadku próbki nr 9 (płyty plastikowej o wysokiej przepuszczalności światła) wysoki błąd pomiaru odległości był uzasadniony, ponieważ wiązka lasera nie została od niej odbita. Jednak w przypadku próbki nr 10, czyli płyty styropianowej, pomiar był obarczony błędem dużo większym niż deklaruje to producent.

Wnioski

1. Pomiary do większości badanych materiałów dały zaniżone wyniki, jednak błędy mieściły się w granicach błędu deklarowanego przez producenta urządzenia (nie przekraczały 3 mm).
2. Kolor powierzchni odbijającej sygnał miał niewielki wpływ na dokładność pomiaru. Pomiary do ciemnych i jasnych powierzchni nie różniły się znacząco.
3. Pomiary do materiałów o nierównej, chropowatej powierzchni były obarczone niewielkim błędem.
4. Płyta styropianowa znacznie zaburzała pomiary odległości, na obydwu mierzonych dystansach błąd był równy 1 cm, był więc większy niż maksymalny błąd deklarowany przez producenta sprzętu.
5. W przypadku pomiarów do płyty o wysokiej przepuszczalności światła wiązka lasera przechodziła przez materiał i odbijała się od obiektów znajdujących się za statywem.

Bibliografia

- Beshr A., Elnaga I., 2011. Investigating the accuracy of digital levels and reflectorless total stations for purposes of geodetic engineering. *Alex. Eng. J.* 50(4), 399–405.
- Bolkas D., Martinez A., 2018. Effect of target color and scanning geometry on terrestrial LiDAR point-cloud noise and plane fitting. *J. Appl. Geodesy* 12(1), 109–127. <https://doi.org/10.1515/jag-2017-0034>
- Brach M., 2009. Pomiar położenia środka drzewa z wykorzystaniem tachimetru elektronicznego. *Sylvan* 153(4), 231–239.
- Coaker L.H., 2009. Reflectorless total station measurements and their accuracy, precision and reliability. University of Southern Queensland, Queensland, 82.
- Czarnecki A., 2015. Geodezja współczesna. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2011.12.004>
- Hycner R., Dobrowolska-Wesołowska M., 2008. Geodesy, surveying and professional ethics – a selection of Skurce text with translation for students, lecturers and surveyors. Wyd. Gall, Katowice.
- Jagielski A., 2019. Geodezja I. Wyd. Geodpis, Kraków.
- Jagielski A., 2020. Geodezja II. Wyd. Geodpis, Kraków.
- Klimkowska H., Wróbel A., 2009. Uwagi o wykorzystaniu tachimetrów bezlustrowych w inwentaryzacji architektonicznej. *Archiwum Fotogrametrii, Kartografii i Teledetekcji* 16, 297–303.
- Kosiński W., 2011. Geodezja. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Kurałowicz Z., 2010. Geodezja od taśmy mierniczej i krokiewki do GPS. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk.
- Lenda G., Buczek M., 2020. Influence of the setback of backgrounds behind semi-transparent synthetic targets on the accuracy of reflectorless distance measurements. *Surv. Rev.* 52(374), 463–472. <https://doi.org/10.1080/00396265.2019.1637095>
- Lenda G., Marmol U., 2010. Dokładność dalmierzy bezzwierciadlanych dla pomiaru obiektów wykonanych z materiałów syntetycznych. *Wyd. PAK* 11, 1280–1286.
- Qin Y., Luo Y., Chen Z., Mei G., Yan L., 2018. Measuring the albedo of limited-extent targets without the aid of known-albedo masks. *Sol. Energy* 171, 971–976. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2018.07.043>
- Specyfikacja Sokkia. Specyfikacja tachimetru Sokkia Seria CX.
- Stankiewicz B., Będkowski K., 2012. Dalmierz laserowy w zastosowaniu do pomiaru drzew – ocena dokładności. *Rocz. Geomat.* X 5(55), 61–66.
- Świątek B., 2003. Geodezja I. Wyd. UWM, Olsztyn.
- Wanic A., 2007. Instrumentoznawstwo geodezyjne i elementy technik pomiarowych. Wyd. UWM, Olsztyn.
- Wysocki J., 2008. Geodezja z fotogrametrią i geomatyką dla inżynierii i ochrony środowiska oraz budownictwa. Wyd. SGGW, Warszawa.
- Zawiła-Niedźwiecki T., 2010. Teledetekcja i fotogrametria obszarów leśnych. W: *Geomatyka w lasach państwowych*, cz. I. Podstawy, K. Okła (red.). CILP, Warszawa, 277–297.
- Ząbek J., 2012. Geodezja I. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa.

Anita Gorczyca¹, Joanna Toporowska¹, Antonina Krawczyk¹, Jan Sadurski¹,
Sylwia Sowa¹, Edyta Paczos-Grzęda¹

Ocena możliwości wykorzystania metody ISSR do analizy zróżnicowania wewnątrzgatunkowego *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*

Assessment of the possibility of using ISSR method to analysis
the intraspecific diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *Avenae*

Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.) jest przedstawicielem rodzaju *Avena* należącego do rodziny traw (*Poaceae*), podrodziny wiechlinowatych (*Poaeoideae*) i plemienia owsowatych (*Aveneae*). Produkcja owsa stanowi 1% światowej produkcji zbóż, w 2019 r. było to ok. 23,1 mln ton, a jednym z czołowych producentów tego zboża jest Polska [<https://www.fao.org>]. *A. sativa* jest rośliną jednoroczną, występującą w dwóch formach: jarej i ozimej, różniących się między sobą okresem wegetacji. W Polsce najczęściej uprawia się odmiany jare. Najważniejszymi wymaganiami w uprawie są wilgotność oraz dostępność w glebie niezbędnych składników pokarmowych, takich jak: azot, fosfor i potas. Ze względu na niskie wymagania uprawne oraz temperaturowe owies jest jednym z najczęściej uprawianych zbóż w Polsce [Gąsiorowski 1995, Zarzecka i in. 2018]. Owies wykorzystywany jest jako pasza dla zwierząt, a dzięki odkryciu jego korzystnych właściwości wzrosło jego znaczenie w żywieniu ludzi oraz w kosmetyce i medycynie. Pomaga zapobiegać chorobom serca, dlatego w połowie lat 80. XX wieku został uznany za zdrową żywność [Butt i in. 2008]. Ze względu na mniejszą zawartość węglowodanów oraz rozpuszczalnych cukrów i dekstryn owies uważany jest za najzdrowsze zboże. Stanowi alternatywę dla osób chorych na celiakię, ponieważ nie zawiera glutenu. Dzięki wysokiej zawartości błonnika pokarmowego znacznie poprawia perystaltykę jelit, a także powoduje redukcję cholesterolu we krwi ze względu na obecność β -glukanów. Produkty owsiane zaliczane są do żywności funkcjonalnej dzięki dużej zawartości substancji odżywczych oraz niwelowaniu ryzyka chorób cywilizacyjnych, takich jak: cukrzyca typu II, otyłość oraz choroby układu krążenia [Gibiński i in. 2005, Nazareno i in. 2018].

Owies postrzegany jest jako odporny na wiele chorób, jednak zakażenie przez patogeny znacząco wpływa na obniżenie jakości i wielkości jego plonu. Do najbardziej rozpowszechnionych chorób owsa można zaliczyć mączniaka prawdziwego, rdzę koronową, wirusa żółtej karłowatości, głownię, zgorzel podstawy źdźbła, a także rdzę źdźbłową powodowaną przez *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *avenae* Eriks. & E. Henn. (Pga) [Górny 2004].

Zakres żywicieli *P. graminis* obejmuje 365 gatunków zbóż i traw. Gatunek ten dzieli się na różne formy specjalne (sp.), z których każda jest przystosowana do określo-

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, anita.gorczyca13@gmail.com

nego żywiciela lub grupy żywicieli. Rdza żdźbłowa występuje zarówno na owsie uprawnym, jak i dzikim. *P. graminis* f. sp. *avenae* jest obligatoryjnym biotrofem, występuje w pięciu stadiach rozwojowych i atakuje głównie żdźbła, choć niekiedy również inne części nadziemne, takie jak blaszki liściowe oraz plewy [Berlin i in. 2013].

W wyniku infekcji na owsie początkowo tworzą się niewielkie zmiany chlorotyczne, które po 8–10 dniach od początku infekcji pękają, uwalniając czerwone urediniospory [Leonard i Szabo 2005]. Gdy okres wegetacji owsa dobiega końca, w miejscu urediniospor powstają czarne, dikariotyczne, dwukomórkowe zarodniki przetrwalnikowe – tzw. teliospory. W każdej z komórek szybko zachodzi proces kariogamii, w wyniku czego powstają komórki diploidalne. Proces ten przyczynia się do powstania nowej zmienności genetycznej i pojawienia się nowej wirulencji. Teliospory zimują w resztkach poźniwnych. Wiosną zaczynają kiełkować w przedgrzybnię, w której diploidalne jądra przechodzą mejozę i tworzą się haploidalne basidiospory. Infekują one wyłącznie gospodarza pośredniego, krzew berberysu (*Berberis* spp.) lub mahonii (*Mahonia* spp.), który jest niezbędny do przeprowadzenia kompletnego cyklu rozwojowego patogenu.

Efektem porażenia roślin berberysu jest wytworzenie spermogonii ze strzępkami chwytynymi (receptorami) i spermacjąmi zawierającymi jądro „+” lub „-”. Spermacja zostają przemieszczone na kompatybilne receptory, dochodzi do zapłodnienia i formuje się strzępka, która rozwija się w kierunku dolnej powierzchni liścia berberysu lub mahonii, a następnie przekształca w ecjum. W strukturze tej powstają ecjospory – dikariotyczne zarodniki zawierające jądra „+” i „-”, które posiadają zrekombinowany materiał genetyczny i infekują wrażliwe formy owsa z wytworzeniem dikariotycznych uredinii z jednokomórkowymi urediniosporami. W ten sposób powstają nowe patotypy, które mogą różnić się od siebie wirulencją i agresywnością [Agrios 2005, Chaves i in. 2008, Chong 2003, Harder i Haber 1992, Kryczyński i Weber 2010].

W regionach o odpowiedniej wilgotności w lecie i łagodnych zimach, *P. graminis* może utrzymywać się w fazie uredinialnej (bezpłciowej) na zbożach ozimych, na samosiewach zbożowych lub podatnych dzikich trawach [Chaves i in. 2013]. Populacje tego grzyba rozprzestrzeniają się w bardzo szybkim czasie oraz na duże odległości, co sprawia, że występuje na rozległym obszarze powodując znaczne starty plonów [Leonard i Szabo 2005]. Zagrożenie *P. graminis* dla globalnego bezpieczeństwa żywnościowego jest dodatkowo zwiększone przez zdolność do szybkiej ewolucji nowych ras o zwiększonej wirulencji [Bartaula i in. 2018]. Badania biologii gatunku *P. graminis* wskazują, że w jego obrębie występuje zróżnicowanie rasowe, objawiające się przede wszystkim różnym stopniem wirulencji.

Jednym z rodzajów markerów molekularnych umożliwiających badanie polimorfizmu w obrębie różnych gatunków są markery ISSR. W technice ISSR, będącej modyfikacją PCR, amplifikacji ulegają fragmenty DNA położone pomiędzy sekwencjami mikrosatelitarnymi zorganizowanymi w przeciwległych kierunkach. Fragmenty te charakteryzują się szybkim tempem ewolucyjnym, dzięki czemu wykazują wysoki poziom zmienności [Ziętkiewicz i in. 1994].

Markery ISSR należą do grupy markerów dominujących, służą do oceny polimorfizmu w obrębie badanego gatunku. Wynika on z mutacji, insercji lub delecji w obrębie sekwencji mikrosatelitarnych. Wymienione zmiany skutkują obecnością lub brakiem produktu na żelu w postaci prążka. Amplifikowane produkty mają zwykle 200–2000 pz długości. Możliwa jest ich detekcja zarówno z użyciem elektroforezy w żelu agarozowym jak i poliakrylamidowym. Metoda ISSR jest metodą prostą, szybką oraz odznaczającą się

wysoką powtarzalnością. Do przeprowadzenia analizy wymagana jest niewielka ilość materiału wyjściowego [Bolc 2020, Szucho i in. 2012].

Na duże zróżnicowanie w obrębie formy specjalnej patogenu oprócz zmienności osobniczej ma wpływ również zmienność występująca w obrębie populacji, będąca konsekwencją presji selekcyjnej i doboru naturalnego, migracji, a także dryfu genetycznego [Kryczyński i Weber 2010]. Poniższa praca koncentruje się na ocenie przydatności markerów ISSR do badania zróżnicowania genetycznego w obrębie *P. graminis* f. sp. *avenae*. Metoda ta dotychczas nie była wykorzystywana do analiz molekularnych polimorfizmu DNA tego chorobotwórczego grzyba.

Material i metody

W badaniach wykorzystano po dwa izolaty *P. graminis* f. sp. *avenae* z Buślar, Czermina, Polanowic, Kołobrzegu i Czesławic, oraz jeden z Aberystwyth w Wielkiej Brytanii (tab. 1). Izolaty pochodzące z pojedynczego zarodnika wyodrębniono z zebranych populacji poprzez 5-krotne pasażowanie. Pasażowanie prowadzono na fragmentach liści 10-dniowych siewek owsa odmiany Kasztan wyłożonych na szalki Petriego wypełnione agarem (0,6%) z dodatkiem benzimidazolu (3,4 mM). Szalki inokulowano zarodnikami z poszczególnych lokalizacji, a następnie umieszczano na 10 dni w fitotronie, w temperaturze 17°C przy kontrolowanym natężeniu światła 4 kLx i wilgotności powietrza 70%.

Tabela 1. Charakterystyka populacji i izolatów *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* wykorzystanych do analizy

Lp.	Nazwa	Poziom wyrównania	Lokalizacja	Kraj pochodzenia
1.	B.1	izolat	Buślary	Polska
2.	B.2	izolat	Buślary	Polska
3.	C.1	izolat	Czernin	Polska
4.	C.2	izolat	Czernin	Polska
5.	K.1	izolat	Kołobrzeg	Polska
6.	K.2	izolat	Kołobrzeg	Polska
7.	Cz.1	izolat	Czesławice	Polska
8.	Cz.2	izolat	Czesławice	Polska
9.	P.1	izolat	Polanowice	Polska
10.	P.2	izolat	Polanowice	Polska
11.	Aber	izolat	Aberystwyth	Wielka Brytania

Po zebraniu odpowiedniej ilości zarodników ok. 0,05 g przeprowadzono izolację całkowitego DNA z wykorzystaniem zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit. Przed wykonaniem izolacji na mikrokolumny naniesiono 40 µl buforu aktywacyjnego Buffer P i pozostawiono w temperaturze pokojowej do chwili naniesienia lizatu na kolumnę. Zarodniki zhomogenizowano w ciekłym azocie z wykorzystaniem moździerzka i tłuczka. Uzyskany materiał przeniesiono do 2 ml probówki typu Eppendorf. Osad zawieszono w 400 µl buforu Lyse F w celu osadzenia rozdrobnionej tkanki na dnie probówki. Do zawiesiny dodano 3 µl RNase A i 10 µl Proteinase K. Zworteksowano i inkubowano 30 min

w temperaturze 65°C. Podczas inkubacji mieszaninę dwukrotnie mieszano. Dodano 130 µl buforu AC, dokładnie wymieszano przez inwersje i inkubowano 5 min na lodzie. Wirowano 10 min z prędkością 15 000 × g. Znad osadu zebrano 400 µl supernatantu, przeniesiono do nowej probówki, a następnie dodano 350 µl buforu Sol P i 250 µl 96% etanolu. Wymieszano przez inwersję oraz zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 × g. Po zwirowaniu przeniesiono 600 µl supernatantu do minikolumny, znajdującej się w probówce odbierającej. Zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 × g. Wyjęto kolumnę, wylano przesącz, a następnie umieszczono minikolumnę z powrotem w próbce odbierającej. Pozostały supernatant przeniesiono do minikolumny. Zwirowano przez 1 min z prędkością 14 000 × g. Wylano przesącz, a minikolumnę umieszczono z powrotem w probówce odbierającej. Dodano 500 µl buforu płuczącego Wash PX i zwirowano przez 1 min z prędkością 14000 × g. Wirowanie powtórzono dwukrotnie. Minikolumnę umieszczono w nowej probówce typu Eppendorf 1,5 ml. Dodano 120 µl buforu Elution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ogrzanego do temperatury 80°C. Minikolumnę pozostawiono na 3 min w temperaturze pokojowej, a następnie zwirowano przez 1 min 14 000 × g, w celu zwiększenia wydajności izolacji. DNA gotowe do dalszych analiz, zamrożono w temperaturze -20°C.

Ocena stężenia i czystości DNA przeprowadzona została przy użyciu spektrofotometru Nanodrop, dla próby o objętości 1 µl. Na podstawie otrzymanych wyników wykonano rozcieńczenia wszystkich próbek do jednakowego stężenia 10 ng/µl. Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym. Do rozdziału wykorzystano zestaw do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Rozdział przeprowadzono w buforze 1 × TBE przez 1,5 godz. przy napięciu 120 V. Efekt rozdziału zwizualizowano w świetle UV i udokumentowano przy użyciu aparatu fotograficznego.

W celu amplifikacji regionów międzymikrosatelitarnych przeprowadzono reakcję PCR z zastosowaniem 80 starterów ISSR. We wstępnej analizie amplifikacja prowadzona była na dwóch wybranych losowo próbach DNA. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów wytypowano 13 starterów, które wykorzystano do przeprowadzenia dalszych analiz (tab. 2). W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 12 µl wchodziły: 1 × bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20) (Thermo Fischer); 200 µM każdego dNTP; 5 pM startera; 1,5 mM MgCl₂; 20 ng genomowego DNA; 0,5 U Dream Taq Polymerase (Thermo Fischer). Reakcje amplifikacji prowadzono w termocyklerze TProfessional Basic firmy Biometra®, stosując następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 7 min. W 94°C, 36 cykli: denaturacja 94°C – 30 s, przyłączenie starterów: trzy pierwsze cykle 54°C – 45 s, trzy kolejne cykle 53°C – 45 s i 30 cykli 52°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min, z końcową inkubacją 7 min w 72°C.

W celu wizualizacji produktów reakcji i identyfikacji możliwych polimorfizmów przeprowadzono rozdział elektroforetyczny. Elektroforezę przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA) przez 1,5 godz. przy napięciu 120 V. Produkty rozdzielone na żelu wizualizowano w świetle UV na transiluminatorze, a następnie dokumentowano przy użyciu aparatu fotograficznego.

W celu określenia polimorfizmu występowanie prążka potraktowano jako pojedynczą cechę i przypisano jej wartość w systemie 0/1. Otrzymaną matrycę poddano analizie statystycznej w programie PAST 4.0 [Hammer i in. 2001]. Oceniono dystans genetyczny, stosując współczynnik Dice'a [Dice 1945] i przeprowadzono grupowanie metodą UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) z testowaniem wiarygodności metodą bootstrap (1000) oraz analizę koordynat głównych metodą PCoA (Principal Coordinate Analysis).

Wyniki i dyskusja

Markery ISSR z powodzeniem wykorzystywano do oceny polimorfizmu w obrębie niektórych gatunków z rodzaju *Puccinia* Pers. Unartngam i in. [2011] zastosowali metodę ISSR do oceny zróżnicowania genetycznego 31 izolatów amerykańskiej rdzy kukurydzy (*P. polysora*) pobranych z linii wsobnych *Zea mays* L. w Tajlandii. Dinu i in. [2014] wykorzystali ISSR do detekcji molekularnego polimorfizmu rdzy brunatnej pszenicy (*P. triticina*) występującej w Rumunii. Technika ISSR ma wiele zalet, łączy korzyści SSR z uniwersalnością RAPD, jednak do tej pory nie była wykorzystywana w badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym rdzy żdźbłowej owsa, dlatego w podjęto niniejsze badania.

W celu oceny możliwości wykorzystania metody ISSR do analizy polimorfizmu DNA *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* przeprowadzono wstępne reakcje z DNA dwóch losowo wybranych izolatów, aby zidentyfikować spośród 80 testowanych starterów ISSR te, które inicjowały amplifikację największej ilości łatwo rozróżnialnych produktów. Wytypowano startery: ISSR 1, ISSR 6, ISSR 17, ISSR 33, ISSR 42, ISSR 45, ISSR 46, ISSR 47, ISSR 54, ISSR 86, ISSR 87, ISSR 89 oraz ISSR 90 (tab. 2), które wykorzystano do reakcji PCR-ISSR, stosując jako matryce DNA 11 izolatów *P. graminis*.

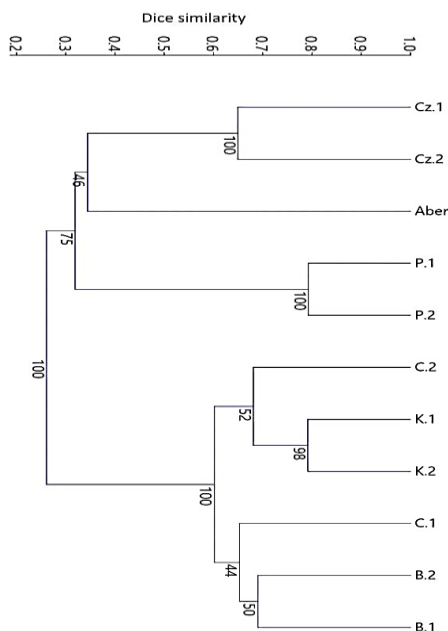
Tabela 2. Charakterystyka polimorfizmu zidentyfikowanego metodą ISSR

Lp.	Starter	Sekwencja 5'-3'	Liczba fragmentów			
			Całkowita	Polimorficznych	Monomorficznych	Specyficznych
1.	ISSR1	(AG) ₈ G	19	17	3	1
2.	ISSR6	(GT) ₈ C	42	42	0	22
3.	ISSR17	(GA) ₈ YC	22	22	0	6
4.	ISSR33	(AG) ₈ T	20	19	1	4
5.	ISSR42	(AG) ₈ YA	36	36	0	12
6.	ISSR45	(GA) ₈ T	16	16	0	6
7.	ISSR46	(GA) ₁₀ A	11	11	0	2
8.	ISSR47	(CA) ₈ A	9	9	0	1
9.	ISSR54	(CT) ₉ T	10	10	0	1
10.	ISSR86	(CA) ₈ T	16	15	1	7
11.	ISSR87	(GT) ₈ T	13	13	0	3
12.	ISSR89	(GT) ₈ YC	22	22	0	9
13.	ISSR90	(GT) ₈ YG	18	17	1	11
		Suma	254	249	6	85
		Średnia	19,5	19,2	0,5	6,5
		%	100	98,0	2,4	33,5

Trzydzieści starterów ISSR inicjowało amplifikację łącznie 254 fragmentów DNA, z których aż 249 (98%) było polimorficznych (tab. 2). Średnio na starter przypadało 20 amplikonów o wielkości od 220 do 3200 pz. Największą ilość zamplifikowanych frag-

mentów obserwowano w przypadku startera ISSR6, jednocześnie z tym starterem uzyskano największą ilość fragmentów polimorficznych. Liczba produktów monomorficznych była niewielka i stwierdzono maksymalnie 6 produktów (2,4%). Badane startery inicjowały również amplifikację 85 produktów specyficznych dla *P. graminis*, które stanowiły 33,5% wszystkich fragmentów. Największą liczbę fragmentów specyficznych zaobserwowano również w przypadku reakcji ze starterem ISSR6.

Na podstawie polimorfizmu zidentyfikowanego metodą ISSR-PCR dla 11 badanych izolatów określono ich podobieństwo genetyczne. Średnia wartość podobieństwa wynosiła 0,390, wahając się od 0,156 pomiędzy B.1 a P.2 do 0,793 pomiędzy P.1 i P.2 (tab. 3). Posługując się uzyskanymi wynikami, skonstruowano dendrogram z wykorzystaniem metody UPGMA (ryc. 1). Na dendrogramie wyodrębniono cztery grupy skupień. Wspólnemu grupowaniu uległy izolaty z Polanowic (P.1 i P.2) oraz Czesławic (Cz.1 i Cz.2). Kolejny klaster stanowiły izolaty pochodzące z Buślar (B.2, B.2), Czernina (C.1, C.2) i Kołobrzegu (K.1, K.2). Izolat z Aberystwyth w Wielkiej Brytanii uległ grupowaniu z izolatami z Czesławic, jednak podobieństwo pomiędzy tymi genotypami było na niskim poziomie.

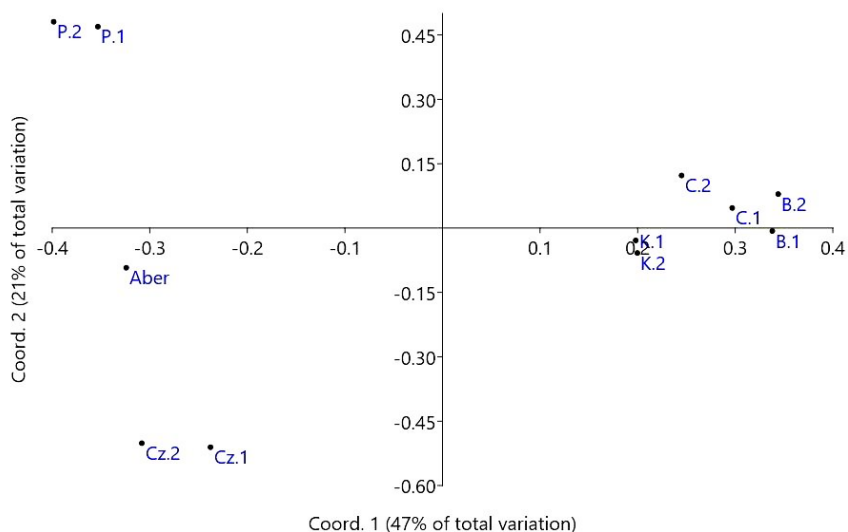


Ryc. 1. Dendrogram badanych izolatów *Puccinia graminis* uzyskany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany za pomocą metody ISSR-PCR

Analiza składowych głównych (PCoA) była zgodna z wynikami UPGMA (ryc. 2). Dwie pierwsze składowe tłumaczą 68% zmienności. Wykres obrazuje podobieństwo pomiędzy izolatami pochodzącymi z tego samego regionu.

Tabela 3. Matryca indeksów podobieństwa genetycznego Dice'a (pomiędzy analizowanymi izolatami i populacjami *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* określonymi na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą ISSR

	B.1	B.2	C.1	C.2	K.1	K.2	Cz.1	Cz.2	P.1	P.2	Aber
B.1											
B.2	0,690										
C.1	0,620	0,686									
C.2	0,598	0,656	0,681								
K.1	0,535	0,594	0,545	0,690							
K.2	0,588	0,615	0,603	0,672	0,792						
Cz.1	0,241	0,252	0,281	0,309	0,361	0,400					
Cz.2	0,234	0,197	0,232	0,270	0,338	0,359	0,650				
P.1	0,203	0,228	0,242	0,288	0,319	0,323	0,292	0,340			
P.2	0,156	0,187	0,206	0,322	0,261	0,276	0,313	0,307	0,793		
Aber	0,190	0,204	0,235	0,227	0,238	0,238	0,318	0,370	0,321	0,342	



Ryc. 2. Analiza PCoA badanych izolatów *Puccinia graminis* na podstawie polimorfizmu identyfikowanego za pomocą metody ISSR-PCR

Na podstawie przeprowadzonych badań molekularnych można stwierdzić, że 11 badanych izolatów o zróżnicowanym pochodzeniu geograficznym wykazywało wysoki polimorfizm na poziomie ok. 98%, a określony na podstawie współczynnika Dice'a dystans

genetyczny wyniósł średnio 0,39, wahając się od 0,156 do 0,793. Izolaty pochodzące z jednego regionu były do siebie bardziej podobne genetycznie niż izolaty pochodzące z terenów oddalonych, co obrazowały zarówno dendrogram UPGMA, jak i analiza PCoA. Uzyskane wyniki potwierdzają, że metoda ISSR-PCR jest efektywna i z powodzeniem może być wykorzystywana do badania polimorfizmu i oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie gatunku *P. graminis* f. sp. *avenae*.

Bibliografia

- Agrios G., 2005. Plant Pathology, 5th ed. Elsevier, London.
- Bartaula R., Melo A.T.O., Connolly, B.A., Jin, Y., Hale, I., 2018. An interspecific barberry hybrid enables genetic dissection of non-host resistance to the stem rust pathogen *Puccinia graminis*. J. Exp. Bot. 69(10), 2483–2493.
- Berlin A., Samils B., Djurle A., Wirsén H., Szabo L., Yuen J., 2013. Disease development and genotypic diversity of *Puccinia graminis* f. sp. *avenae* in Swedish oat fields. Plant Pathol. 62(1), 32–40.
- Bolc P., 2020. Charakterystyka wybranych markerów molekularnych. Biul. Inst. Hod. Aklim. Roślin 290, 27–32.
- Butt M.S., Tahir-Nadeem M., Khan M.K.I., Shabir R., Butt M.S., 2008. Oat: Unique among the cereals. Eur. J. Nutr. 47(2), 68–79.
- Chaves M.S., Martinelli J.A., Wesp-Guterres C., Graichen F.A.S., Brammer S.P., Scagliusi S.M., da Silva P.R., Wiethölter P., Torres G.A.M., Lau E.Y., Consoli L., Chaves A.L.S., 2013. The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat. Food Secur. 5(2), 157–176.
- Chaves M.S., Martinelli J.A., Wesp C. de L., Graichen F.A.S., 2008. The cereal rusts: an overview. Pest Technol. 2, 38–55.
- Chong J., 2003. Disease of Oat. W: Diseases of Field Crops in Canada, Bailey, K., Gossen, B., Gugel, R., Morrall, R. (red.). CPS Press, Saskatoon, 74–88.
- Dice L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26(3), 297–302.
- Dinu A.-D., Diguta C., Ciuca M., Ursu L., Cornea C., 2014. Detection of Molecular Polymorphism of *Puccinia Triticina* from Wheat in Romania. Sci. Bull. Ser. F. Biotechnol. 18.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Statistics division. URL www.fao.org [dostęp: 20.03.21].
- Gąsiorowski H., 1995. Charakterystyka ogólna. W: Owies: chemia i technologia. PWRiL, Poznań, 47–102.
- Gibiński M., Gumul D., Korus J., 2005. Prozdrowotne właściwości owsa i produktów owsianych. Żywność. ŻNTJ 4(45), 49–60.
- Górny A.G., 2004. Zarys genetyki owsa (rodzaj *Avena* L.). W: Zarys genetyki zbóż, Górny, A.G. (red.). IGR PAN, Poznań, 311–422.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4(4), 1–9.
- Harder D.E., Haber S., 1992. Oat diseases and pathological techniques. W: Marshall H.G., Sorrells M.E. (red.), Oat Science and Technology – Agronomy Monograph, 33. Madison, 307–425. <https://www.fao.org>
- Kryczyński S., Weber Z., 2010. Fitopatologia. Choroby roślin uprawnych, t. 2. PWRiL, Poznań.
- Leonard K.J., Szabo L.J., 2005. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. Mol. Plant Pathol. 6(2), 99–111.
- Nazareno E.S., Li F., Smith M., Park R.F., Kianian S.F., Figueroa M., 2018. *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: a threat to global oat production. Mol. Plant Pathol. 19(5), 1047–1060.

- Szućko I., Achrem M., Kalinka A., 2012. Charakterystyka i zastosowanie SSR oraz ISSR w badaniach genomów roślinnych. *Kosmos* 61(297), 597–602.
- Unartngam J., Janruang P., To-anan Ch., 2011. Genetic Diversity of *Puccinia polysora* in Thailand based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analysis. *J. Agric. Technol.* 7(4), 1125–1137.
- Zarzecka K., Gugala M., Mystkowska I., Baranowska A., Sikorska A., Zarzecka M., 2018. Odżywcze i prozdrowotne właściwości ziarna owsa i przetworów owsianych. *Kosmos* 67(2), 409–414.
- Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20(2), 176–183.

Ogławianie drzew, niewiedza czy celowe działanie?

Tree limbing, ignorance or deliberate action?

Ogłowienie jest zabiegiem likwidującym rozpieranie (gałęzie dużego pokroju), stosowanym w hodowli lasu jako element pielęgnacji drzewostanu [Siewniak 1987, Kosmala 2006, Tokarska i Osyczka 2011]. Dzięki ogławianiu drzew pozyskiwano kiedyś młode pędy wierzchołkowe z przeznaczeniem na karmę dla zwierząt, ze względu na cenne wartości pokarmowe [Sokół 2009], jak również w celach dekoracyjnych z przeznaczeniem florystycznym [Marciniak 2019]. Na terenach zurbanizowanych procesy ogławiania dojrzałych drzew wykonywane są pod nazwą „cięcie korygujących” głównie w celach estetycznych, aby uzyskać określoną, często sztuczną formę drzewa, jak również w celach zachowania bezpieczeństwa, ograniczając intensywny rozrost konarów [Suchocka i Błaszczuk 2015]. Ogłowione drzewa wypuszczają bardzo dużą ilość nowych pędów z pąków poniżej ran. Z czasem stają się one niebezpieczne, ponieważ nie są dostatecznie trwale zrosnięte z pniem, jak w przypadku gałęzi pierwotnych. Drzewo w celu zaleczenia powstałych ran wytwarza dużą ilość substancji, które przyciągają szkodniki [Kosmala 2006]. Reakcja drzew na cięcie zależy od gatunku. Niemniej znaczny rozmiar cięć powoduje pogorszenie stanu zdrowotnego drzewa, obniżenie jego żywotności, a nawet zamieranie [Suchocka i Błaszczuk 2015, Kujawa i in. 2017]. Rozwój patogenów i rozkład drewna powodują obniżenie zdrowotności i żywotności drzew oraz wpływają na pogorszenie ich właściwości statycznych [Kosmala 2006]. Reakcje drzew polegają na uruchomieniu zespołu reakcji obronnych, takich jak:

- rozwój tkanek drzewnych (gojenie powierzchniowe),
- fizjologiczne ograniczenie rozwoju grzybów poprzez wydzielanie związków chemicznych w rejonie rany i ich indukcję do głębszych warstw komórek (aktywność chemiczna tkanek w obrębie rany),
- likwidację drożności naczyń i cewek (blokada),
- regeneracyjny przyrost pędów z uaktywnionych pączków śpiących (zagęszczenie korony) [Szewczyk 2012].

Celem badań było poznanie opinii społecznej w kwestii przeprowadzania intensywnych cięć drzew tworzących zwartą zieleń miejską.

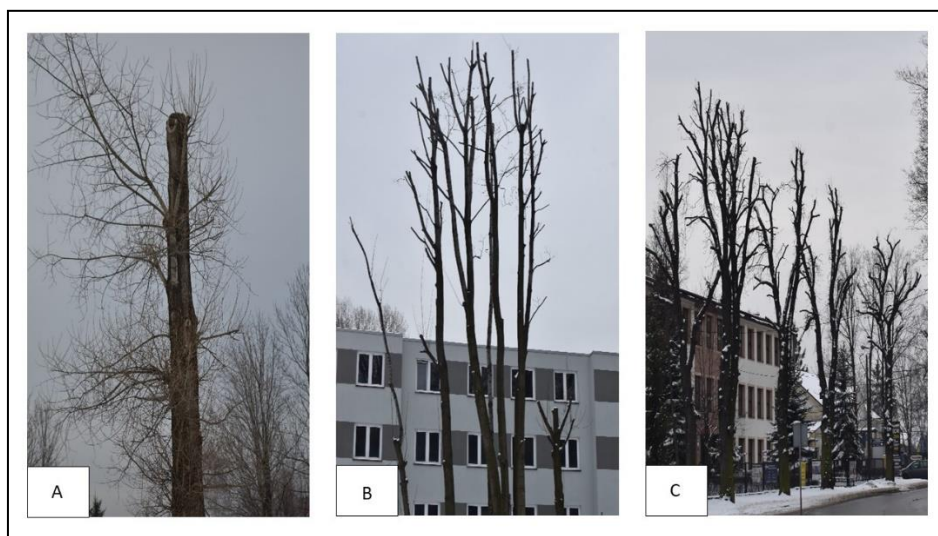
¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Studenckie Koło Naukowe Leśników Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, matias.koodziejczyk@gmail.com

² Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, Instytut Gleboznawstwa, Inżynierii i Kształtowania Środowiska, Zakład Przyrodniczych Podstaw Leśnictwa, natalia.korz@up.lublin.pl

Material i metody

Narzędziem badawczym była ankieta składająca się z czterech pytań ilościowych. Ankietę oparto na fotografiach następujących drzew: klon zwyczajny (*Acer platanoides* L.), topola osika (*Populus tremula* L.) oraz kasztanowiec pospolity (*Aesculus hippocastanum* L.), na których przeprowadzono inwazyjne cięcia przekraczające dopuszczalną redukcję aparatu asymilacyjnego. Po zapoznaniu się z fotografiami przedstawiającymi różne pokroje drzew po wykonaniu zabiegu ogławiania (ryc. 1) respondenci mieli za zadanie odpowiedzieć na następujące pytania:

- Czy wie Pan/Pani na czym polega zabieg „ogławiania drzew”?
- Czy uważa Pan/Pani, że cięcia przedstawione na powyższych zdjęciach zostały wykonane prawidłowo?
- Czy Pana/Pani zdaniem redukcja pni, konarów oraz gałęzi drzewa w tak dużym stopniu wpływa na poprawę bezpieczeństwa w aglomeracjach miejskich?
- Czy Pana/Pani zdaniem tak poprowadzone cięcia wpływają na poprawę estetyki drzewa, a tym samym Twojego miejsca zamieszkania?

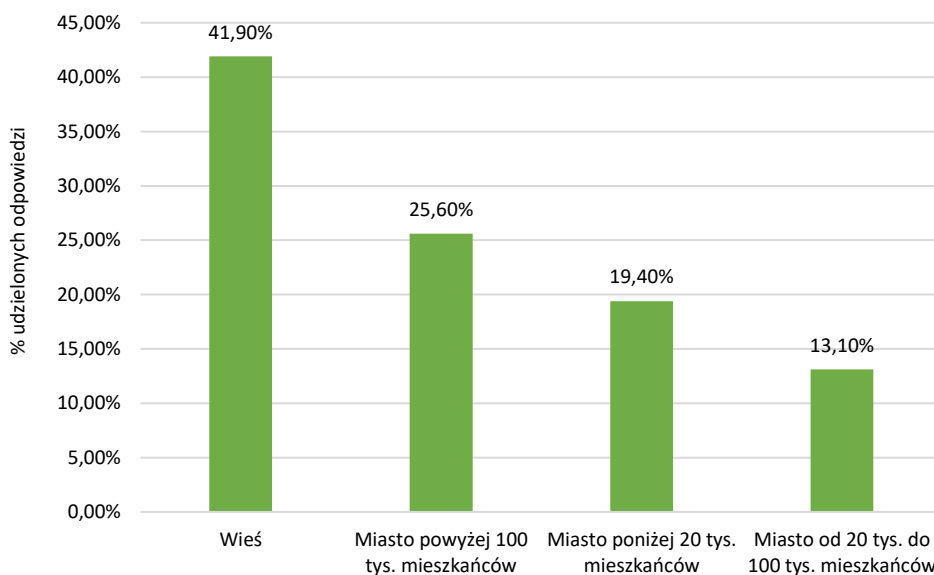


Ryc. 1. Zdjęcia drzew po zabiegu ogławiania wykorzystane w badaniu (A. topola osika, B. klon zwyczajny, C. kasztanowiec pospolity)

Dodatkowo respondentów pytano o płeć oraz miejsce zamieszkania. Ankietę przeprowadzono online w aplikacji Microsoft Forms ze względu na trwającą pandemię SARS-CoV-2. Opracowaną ankietę udostępniono na portalu społecznościowym Facebook, aby dotrzeć do jak największej liczby osób. Fotografie wykorzystane w ankiecie wykonano w mieście Końskie, położonym na północnym skraju Wyżyny Kielecko-Sandomierskiej w województwie świętokrzyskim, przy ul. 1 Maja oraz ul. Sportowej.

Wyniki i dyskusja

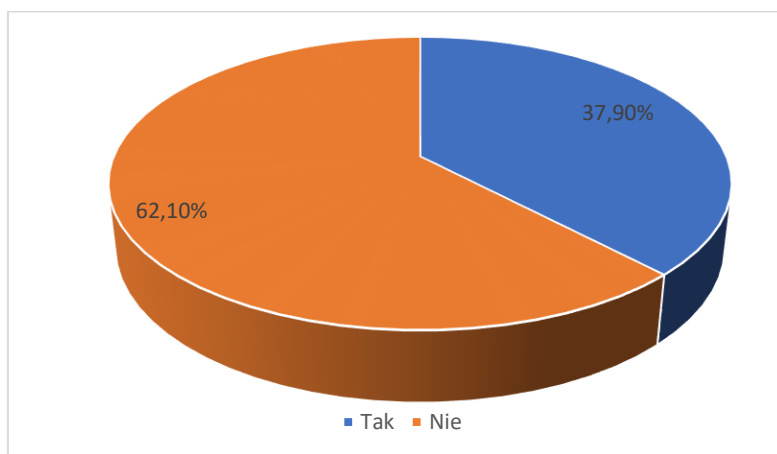
W badaniu wzięło udział 227 osób, w tym 157 kobiet oraz 69 mężczyzn. Najwięcej osób zamieszkiwało tereny wiejskie – 41,90%, najmniej zaś miejscowości liczące od 20 tys. mieszkańców do 100 tys. mieszkańców – 13,20% (ryc. 2).



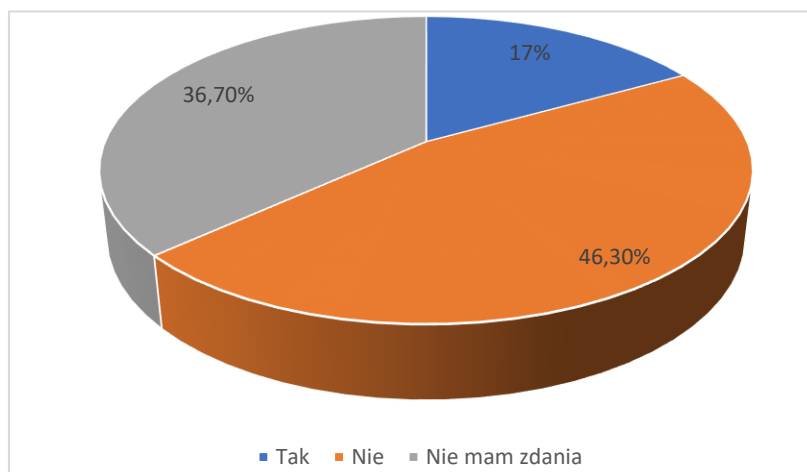
Ryc. 2. Miejsce zamieszkania respondentów

Większość ankietowanych – 61,1% spotkała się po raz pierwszy z terminem „ogławianie drzew” (ryc. 3), co znalazło potwierdzenie w innych pracach [Kosmala 2006, Szczepanowska 2008]. Jest to termin specjalistyczny powszechnie używany w leśnictwie, urbanistyce, czy w architekturze krajobrazu.

Na pytanie o poprawne wykonanie zabiegu 46,3% badanych twierdzi, że cięcia nie zostały prawidłowo wykonane, 36,8% nie ma w tej kwestii zdania, a tylko 15% stwierdza pełną poprawność zabiegu (ryc. 4). Respondenci słusznie zauważyli, iż cięcia ograniczające wzrost koron drzew nie zostały wykonane prawidłowo (ryc. 4), co znalazło potwierdzenie w pracy Szczepanowskiej [2008]. Autorka podkreśla, że zieleń przydrożna traktowana jest marginalnie, co skutkuje licznymi błędami dotyczącymi cięć niedostosowanych do gatunków drzew i wpływa zarówno na sztuczne formowanie koron, jak i na kondycję zdrowotną drzew. Zabieg ten jest sukcesywnie wykonywany w znacznej części aglomeracji miejskich w kraju. Tego typu cięcie, które w bardzo nagły sposób pozbawia drzewo aparatu asymilacyjnego, tj. środków do życia, jest narażone na infekcję różnorodnych chorób, szczególnie patogenów grzybiczych, zrakowaceń oraz wykształcenie jakościowo słabych pędów z pąków uspionych [Kosmala 2006, Tokarska i Osyczka 2011].

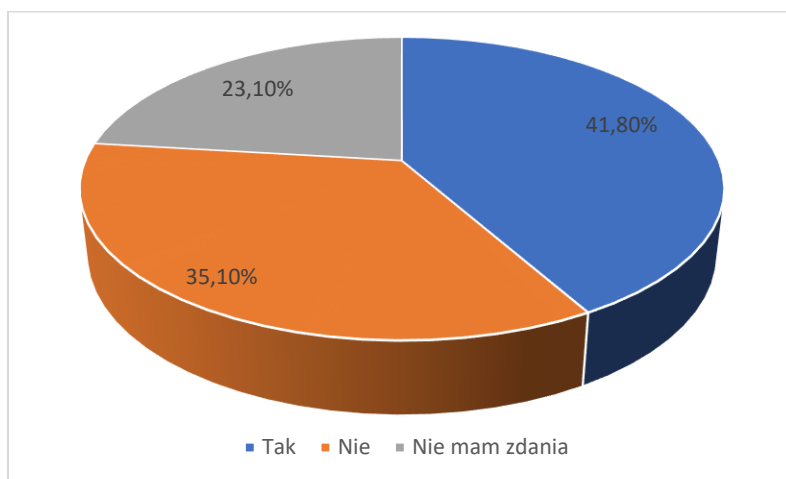


Ryc. 3. Preferencje respondentów dotyczące znajomości terminu „ogławianie drzew”

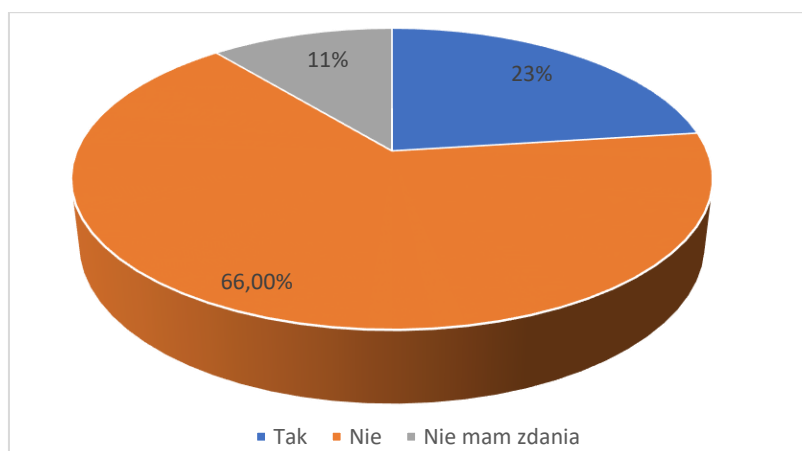


Ryc. 4. Preferencje respondentów dotyczące prawidłowości wykonania zabiegu ogławiania

Wśród respondentów 41,8% potwierdza, iż drzewa ogłowione są bardziej bezpieczne, 23,10% ankietowanych nie ma w tej kwestii zdania (ryc. 5). Zdaniem Kosmala [2006] zabieg ogławiania nie wpływa na bezpieczeństwo przechodniów czy na bezpieczeństwo wzdłuż dróg, ponieważ bezpieczeństwo w ruchu w głównej mierze zależy od czynnika ludzkiego. Niestety to mylne przekonanie o danym zabiegu można zaobserwować w naszych wynikach. Aż 41,80% ankietowanych uważa, że przycinanie koron drzew wpływa na bezpieczeństwo (ryc. 5).



Ryc. 5. Preferencje respondentów dotyczące bezpieczeństwa po wykonaniu zabiegu ogławiania



Ryc. 6. Preferencje respondentów dotyczące estetyki drzew dotkniętych cięciami ogławiającymi

Dwadzieścia trzy procent ankietowanych przyznaje, iż drzewa, na których przeprowadzono cięcia ogławiające, są atrakcyjne wizualnie oraz poprawiają wygląd ich miejsca zamieszkania, 66,4% stwierdza brak estetycznego aspektu w tego typu cięciach, zaś 11% wyraża brak zdania w danej kwestii (ryc. 6). Drzewa oprócz poprawy walorów krajobrazowych w aglomeracjach miejskich mają właściwości pochłaniania dwutlenku węgla i wydzielania tlenu, a także zatrzymywania pyłów i kurzu [Tokarska i Osyczka 2011]. Nasze wyniki badań znalazły potwierdzenie w pracach Kujawa i in. [2017] i Mrugałskiej [2011] w kontekście tego, iż okrzyszowanie drzew nie wpływa na walory estetyczne krajobrazów miejskich (ryc. 6). Baranowski [2008] podkreśla, że na przełomie ostatnich lat

odbywa się masowa wycinka i niszczenie drzew przydrożnych, a nieliczne nowe nasadzenia nie rekompensują wynikających z tego tytułu strat, również tych związanych z kształtowaniem się krajobrazu miejskiego czy podmiejskiego.

Podsumowanie

Mimo szerokiego zastosowania ogławiania drzew w praktyce arborystycznej zarówno w aglomeracjach miejskich, jak i podmiejskich termin ten nie jest znany respondentom. 61,1% osób biorących udział w badaniu miało do czynienia po raz pierwszy z terminem „ogławianie drzew”. Według badanych zabiegi te wykonywane są nieprawidłowo (46,3% ankietowanych udzieliło takiej odpowiedzi), niemniej w opinii społecznej wpływają na bezpieczeństwo (41,8% respondentów potwierdza to stwierdzenie). Ograniczanie wzrostu koron drzew nie wpływa na estetykę krajobrazów (66,4% ankietowanych udzieliło takiej odpowiedzi).

Bibliografia

- Baranowski T., 2008. Ochrona i pielęgnacja przydrożnych drzew. [W:] Zieleń miast i wsi: współczesna i zabytkowa, A. Greinert, M.E. Drozdek (red.). Wydawnictwo PWSZ, Sulechów.
- Kosmala M., 2006. Prawdy i mity o ogławianiu drzew. Ziel. Miej. 3, 10–11.
- Kujawa K., Orczewska A., Kras M., Kujawa A., Nyka M., Bohdan A., 2017. Znaczenie drzew i krzewów na terenach nieleśnych. Czy wolno nam liberalizować zasady wycinki drzew? Instytut Środowiska Rolniczego i Leśnego PAN, Poznań.
- Marciniak M., 2019. Materiał roślinny jako nośnik sztuki. SiD 20, 113–126.
- Mehta M., Rissanen J., Agrawal R. 1995. MDL-Based Decision Tree Pruning. In KDD, 21(2), 216–221.
- Mrugalska L., 2011. Ogławianie drzew – zabieg pielęgnacyjny czy okaleczanie? Regulacje prawne. Porad. Gospodar. 9.
- Siewniak M., 1987. Cięcie drzew i krzewów ozdobnych w obiektach zabytkowych. Kur. Konserwat., KOBIDZ, 8, 18–23.
- Sokół J.L., 2009. Jeleniowate na wolności i w chowie fermowym jako atrakcja dla turystów. Ekonom. Zarządz. 1, 107–119.
- Suchocka M., Błaszczak M. 2015. Uczestnicy procesu budowlanego a ochrona drzew. Ekonom. Środow. 3 (54), 200–212.
- Szczepanowska H.B., 2008. Drzewa w otoczeniu ulic – problemy inżynierskie, społeczne, ekonomiczne oraz bezpieczeństwa. Człow. Środow. 3 (32), 87–107.
- Szewczyk G., 2012. Arborystyka. Wybrane zagadnienia pielęgnacji drzew. Wyd. Uniwersytetu Rolniczego, Kraków.
- Tokarska A., Osyczka D. 2011. Okaleczanie drzew powszechnym zjawiskiem w przestrzeni. Zesz. Nauk. Inż. Środ., Uniwersytet Zielonogórski, 19–32.

Lipidy jako cenne markery chemotaksonomiczne fitopatogennych grzybów z rodzaju *Puccinia*

Lipids as valuable chemotaxonomic markers of phytopathogenic fungi
of the *Puccinia* genus

Grzyby rdzawnikowe należące do rzędu *Pucciniales* stanowią bardzo dużą grupę obejmującą 7000 gatunków obligatoryjnych patogenów roślin, zarówno nagonasiennych paproci, jak i jednoliściennych oraz dwuliściennych roślin [Kolmer i in. 2009]. Najbardziej licznym rodzajem w obrębie rzędu *Pucciniales* jest rodzaj *Puccinia*, do którego zaliczono 4000 gatunków grzybów [Kirk i in. 2008]. Grzyby rdzawnikowe są na ogół wysoce wyspecjalizowanymi patogenami o wąskim zakresie roślinnego żywiciela. Dzięki zdolności wytwarzania dużej liczby zarodników rozsiewanych przez wiatr, wodę i zwierzęta na znaczną odległość grzyby te mogą pasożytować na roślinach uprawianych niekiedy w odległych rejonach i w różnych strefach klimatycznych [Brzezicka-Szymczyk 1992]. Grzyby rdzawnikowe należą do pasożytów biotroficznych, które wywołują osłabienie roślin żywicielskich, ale nie doprowadzają do ich śmierci. Masowe porażenia roślin uprawnych i leśnych są przyczyną zmniejszenia plonów i obniżenia walorów dekoracyjnych roślin [Park i Wellings 2012, Voegelé i in. 2009]. Fitopatogenne grzyby pobierają substancje pokarmowe z tkanek żywiciela dzięki wyspecjalizowanym strukturom, tzw. haustoriom. W obrębie haustorii ulegają ekspresji geny kodujące małe białka sekrecyjne, które pełnią funkcję efektorów odpowiedzialnych za oddziaływanie z żywicielem. W genomach gatunków *Puccinia* wywołujących rdzę topoli oraz łodygi pszenicy zidentyfikowano geny kodujące ponad tysiąc białek efektorowych. Białka te charakteryzują się dużą różnorodnością w obrębie tych gatunków *Puccinia*, co odzwierciedla szybko postępującą ewolucję czynników wirulencji bezpośrednio zaangażowanych w interakcje z organizmem żywiciela [Duplessis i in. 2012].

Celem pracy była charakterystyka składu lipidowego zarodników grzybów z rodzaju *Puccinia*.

Cykle życiowe grzybów rdzawnikowych

Gatunki z rodzaju *Puccinia* pasożytują na roślinach należących do rodzin: *Asteraceae*, *Cyperaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Malvaceae*, *Poaceae*. Obejmują one heteroecyjne gatunki (dwudomowe) pasożytujące na niespokrewnionych taksonomicznie roślinach żywicielskich, na których wytwarzają różne rodzaje zarodników oraz gatunki

¹ Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, b.kowalczyk746@wp.pl

autoecyjne (jednodomowe) bytujące na tym samym żywicielu [Kirk i in. 2008]. Gatunki makrocykliczne, uznawane za najbardziej prymitywne, w cyklu życiowym rozwijają do pięciu typów zarodników: spermacja (0), ecjospory (I), urediniospory (II), teliospory (III) i bazydiospory (IV) [Hiratsuka i Suto 1982, Kolmer i in. 2009]. U dwudomowych gatunków grzybów rdzawnikowych infekujących rośliny uprawne zazwyczaj pierwszym żywicielem są dziko rosnące gatunki roślin, na których wytwarzane są spermacja i ecjospory. Rośliny te nazywane są żywicielami ecjalnymi. Drugim żywicielem są rośliny uprawne, na których wytwarzane są urediniospory i teliospory. Pełnią one rolę żywicieli telialnych. Dlatego rdze dwudomowe pojawiają się na roślinach uprawnych w okresie lata, a rdze jednodomowe już wczesną wiosną [Kryczyński i Weber 2011]. Zasięg żywiciela grzybów rdzawnikowych zależy od czynników ekologicznych, takich jak różnorodność żywicieli i bliskość obszaru geograficznego, na którym one występują. Wśród grzybów rdzawnikowych makrocykliczny heteroecyjny cykl życiowy należy do najbardziej powszechnych. W odpowiedzi na krótki okres wegetacyjny żywiciela, odmienną szerokość geograficzną i warunki pogodowe występujące w jego siedlisku wiele grzybów rdzawnikowych wytworzyło skrócone cykle życiowe [Savile 1976, Kolmer i in. 2009].

Cykl życiowy składający się z trzech lub mniej typów zarodników określany jest jako mikrocykliczny [Kolmer i in. 2009]. Gatunki mikrocykliczne zwykle tworzą tylko teliospory (III) i basydiospory (IV), chociaż niektóre z nich mogą również wytwarzać spermacja (0). Gatunki mikrocykliczne dzielą się na dwie grupy: leptosporyczne i mikrosporyczne. Teliospory gatunków mikrosporycznych kielkują po okresie odpoczynku (zwykle po zimie). Zarodniki gatunków leptosporycznych kielkują natychmiast po osiągnięciu dojrzałości. Występują także gatunki, które wytwarzają dwa rodzaje teliospor w jednym telium lub w sąsiednich teliach: typ cienkościenny kielkujący od razu, typ grubościenny przystosowany do spoczynku oraz typ odporny na niską temperaturę [Majewski 1977, Poelt i Zwetko 1997, Böllmann i Scholler 2006].

Grzyby wywołujące rdzę najczęściej zimują we wnętrzu tkanek zainfekowanych roślin lub na opadłych liściach w formie grzybni i grubościennych teliospor. Na wiosnę z kielkujących teliospor wyrastają bazydiospory odpowiedzialne za infekcję pierwotną. Na liściach tworzą się skupiska pomarańczowo-żółtych owocników, które wiosną przyjmują postać ecji, a następnie uredinii. Urediniospory wytwarzane w urediniach są anemochoryczne (wiatrosiewne), dzięki czemu dokonują infekcji wtórnych, przyczyniając się do rozprzestrzeniania zakażenia. Późnym latem oprócz urediniów wytwarzane są telia, które przyjmują ciemniejszą barwę – od brązowej do czarnej i mają charakter przetrwalników [Fiedorow i in. 2008, Kryczyński i Weber 2011].

Tradycyjne metody identyfikacji fitopatogennych grzybów z rodzaju *Puccinia* opierają się na specyficzności względem żywiciela, analizie morfologicznej zmian na roślinie oraz typie, wielkości i kształcie zarodników [Majewski 1977]. Jednak ograniczona liczba cech synapomorficznych oraz niepełny cykl życiowy utrudniają identyfikację tych grzybów na poziomie rodzaju i gatunku. W naturalnych ekosystemach grzyby z rodzaju *Puccinia* występują wyłącznie jako patogeny roślin i zaledwie dla kilku gatunków opracowano sztuczne podłoża hodowlane, np. dla *Melampsorium hiratsukanum* [Morrica i Ginetii 2015]. Brak wystandaryzowanych metod hodowli tych grzybów w warunkach laboratoryjnych znacznie utrudnia identyfikację za pomocą metod molekularnych. Ponadto badania molekularne sugerują dużą zmienność genetyczną na przykład w obrębie gatunku *P. coronata*, których przedstawiciele należą do siedmiu linii filogenetycznych [Berlin i in. 2017].

Charakterystyka kwasów tłuszczowych

Jedną z metod powszechnie wykorzystywanych jako narzędzie chemotaksonomiczne do identyfikacji i klasyfikacji mikroorganizmów jest analiza składu kwasów tłuszczowych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) [O'Donnell 1994].

Analiza porównawcza komórkowych kwasów tłuszczowych ponad 100 różnych gatunków grzybów saprofitycznych, nitkowatych i organizmów grzybopodobnych, należących do *Oomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* i *Basidiomycota*, wykazała znaczną różnorodność profili kwasów tłuszczowych i ich przydatność w identyfikacji grzybów [Stahl i Klug 1996].

Gatunki z rodzaju *Puccinia* syntetyzują kwasy tłuszczowe o długości łańcucha od 12 do 22 atomów węgla w cząsteczce, zarówno nasycone o prostym i rozgałęzionym łańcuchu, nienasycone oraz z dodatkowymi grupami (hydroxy, pierścieniem epoxy, cyklopropanowym). Wśród nasyconych kwasów dominują stearynowy i palmitynowy. W urediniosporach *P. coronata* kwas 16:0 stanowi ponad 50% zawartości wszystkich kwasów. Charakterystyczną cechą gatunków z rodzaju *Puccinia* jest występowanie jedno- (16:1, 18:1 Δ^9) i wielonienasyconych (18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}$) kwasów oraz długołańcuchowych, nienasyconych kwasów tłuszczowych (20:1). Nienasycone kwasy mogą stanowić od 15% (urediniospory *P. coronata*) do nawet 90% (teliospory *P. rubefaciens*) całkowitej zawartości komórkowych kwasów tłuszczowych [Tulloch i Ledingham 1962, 1964, Ben-Ze'ev i in. 2005].

Zarodniki grzybów *Puccinia* wytwarzają rzadko spotykany w przyrodzie kwas z pierścieniem epoxy, 9,10-epoksy-oktadekanowy. Wysoką zawartością tego kwasu charakteryzują się ecjiospory *P. coronata* (36% zawartości wszystkich kwasów), ecjiospory i urediniospory (około 30%), teliospory (41%) *P. graminis*. Ponieważ kwas ten występuje w większości przebadanych gatunków *Puccinia*, może stanowić chemotaksonomiczny marker przynależności do tego rodzaju. Kwas 9,10-epoksy-oktadekanowy występuje w kutynie wielu gatunków roślin, w tym naturalnych żywicieli grzybów rdzawnikowych [Özkan i Uzunhisarçıklı 2009, Akçin i in. 2011]. Obecność tego kwasu w zarodnikach grzybów *Puccinia* może ułatwiać kolonizację komórek gospodarza na zasadzie molekularnej mimikry. Ponadto grupa epoxy wykazuje zdolność do tworzenia wiązań krzyżowych, co może zwiększać właściwości adhezyjne zarodników i w ten sposób ułatwiać proces zakażenia rośliny.

Analiza ilościowa 18 węglowych kwasów: 9,10-epoksy-oktadekanowego oraz nienasyconych 18:1 i 18:2 w zarodnikach mikrocyklicznych grzybów wykazała zależność między ich zawartością a czasem kiełkowania teliospor. Gatunki *P. ustalis*, *P. rubefaciens* oraz *P. cnici-oleracei*, których teliospory kiełkują po okresie uspienia [Poelt i Zwetko 1997], charakteryzują się wysoką zawartością kwasu 18:1 (powyżej 60% u *P. rubefaciens* i *P. cnici-oleracei*) i 18:2 (powyżej 60% u *P. ustalis*), a także brakiem lub bardzo niską zawartością kwasu 9,10-epoksy-oktadekanowego (0-3,4%) [Tulloch i Ledingham 1962, 1964]. U *P. malvacearum*, którego teliospory kiełkują bezpośrednio po dojrzeniu (bez okresu spoczynku), wykazano odwrotną zależność między tymi kwasami, dużą zawartość kwasu 9,10-epoksy-oktadekanowego (71%) oraz bardzo niską zawartość kwasów 18:1 i 18:2 (łącznie ok. 3%). Natomiast w przypadku *P. glechomatis*, który tworzy dwa rodzaje teliospor, cienkościenne zarodniki kiełkujące natychmiast po osiągnięciu dojrzałości i grubościenne kiełkujące po okresie spoczynku, zawartość kwasów 9,10-epoksy 18:0 oraz nienasyconych 18:1 i C18:2 są porównywalne, tj. 21% (9,10-epoksy 18:0) i 19% (18:1 i 18:2) (dane niepublikowane). Podczas kiełkowania urediospory *P. graminis* intensywnie wykorzystują kwas 9,10-epoksy-oktadekanowy, a także kwas palmitynowy, oleinowy i linolenowy [Daly i in. 1967].

Lipidy obojętne, polarne i ceramidy grzybów

Główną frakcją lipidów gatunków z rodzaju *Puccinia* są lipidy obojętne (dwu- i trójglicerydy), które pełnią funkcję zapasową jako źródło węgla i energii. Te wysoce hydrofobowe związki lipidowe, w mikroskopie widoczne w postaci sferosomów i liposomów, charakteryzują się dużą strukturalną różnorodnością i zawierają kwas 9,10-epoksy-oktadekanowy [Ratledge i Wilkinson 1988].

W komórkach grzybów wśród fosfolipidów dominuje fosfatydyloetanoloamina (PE) i fosfatydylocholina (PC), która stanowi ponad 40% wszystkich fosfolipidów [Weete 1980]. PC i PE są nie tylko ważnymi składnikami, które budują błony grzybów, zaangażowane w utrzymanie ich integralności i funkcji, ale odgrywają istotną rolę podczas wegetatywnego wzrostu grzybów. Mutanty *Fusarium graminearum* defektywne w syntezie PC i PE wykazują większą wrażliwość na fungicydy i czynnik stresu oksydacyjnego [Wang i in. 2019]. Poza PC i PE komórki grzybów zawierają znaczne ilości fosfatydyloseryny (PS, 5-16%) i fosfatydyloinozytolu (PI, 3-10%) [Cerv 1993]. Patogeny grzybowe roślin z gromady *Oomycota* syntetyzują duże ilości fosfatydyloglicerolu (PG) i podobnie jak rośliny niewielkie ilości PS [Weete 1980]. Inne fosfolipidy: kwas fosfatydowy (PA), lizofosfatydyloetanoloamina (LPE) i lizofosfatydylocholina (LPC) na ogół występują w mniejszych ilościach, a ich zawartość jest uzależniona od etapu rozwoju grzybów [Prasad i Ghannoum 1996]. Większość gatunków grzybów wytwarza również kardiolipinę (CL), która zwykle stanowi 2-5% względnej zawartości fosfolipidów [Athenaki i in. 2017].

Inną klasą lipidów syntetyzowaną przez grzyby są sfingolipidy. Budowa tych amfipatycznych związków oparta jest na aminoalkoholu sfingozynie, która posiada dwie grupy hydroksylowe i jedną aminową. Różnice w strukturze sfingolipidów, np. poprzez włączenie różnych polarnych headgrup, hydroksylację, rozgałęzienia metylowe lub łańcuchy acylowe decydują o ich biofizycznych właściwościach i pełnionych funkcjach [Cerv 1993]. W komórkach grzybów dominującym składnikiem sfingolipidów jest fito-sfingozyna (t18:0 i t20:0). Długość łańcuchów kwasów tłuszczowych sfingolipidów u grzybów wynosi zazwyczaj od 16 do 26 atomów węgla, a łańcuchy te często hydroksylowane są w pozycji 2 [Buré i in. 2013]. Glikosfingolipidy zlokalizowane głównie w ścianie komórkowej są związane ze wzrostem grzybów, przemianami morfologicznymi oraz zaangażowane są w oddziaływania gospodarz-patogen [Ishibashi i in. 2013, Calixto i in. 2015, Rella i in. 2016]. Unikalna, wysoce konserwatywna wśród grzybów struktura heksozyloceramidów składa się z reszty glukozy lub galaktozy przyłączonej do szkieletu ceramidu złożonego z $\Delta^{8,9}$ metylosfingozyny połączonej z kwasem 2-hydroksyheksadekanowym lub 2-hydroksy-oktadekanowym [Rhome i in. 2007]. Glukozyloceramidy są kluczowymi regulatorami rozwoju grzybów strzępkowych [Rittenour i in. 2011].

Podsumowanie

Lipidy oraz kwasy tłuszczowe odgrywają zasadniczą rolę w architekturze i funkcjonowaniu błon biologicznych, a ich znaczenie w procesach biologicznych zdecydowanie wykracza poza funkcję bariery przepuszczalności. Profilowanie zawartości lipidów daje wgląd w fizykochemiczne zmiany strukturalne błon oraz pozwala na identyfikację unikalnych lipidów i kwasów tłuszczowych, które mogą służyć jako ważne biomarkery wspomagające tworzenie molekularnych wzorców mikroorganizmów. Dzięki rozwojowi

technik biologii molekularnej i analitycznej obok tradycyjnych metod klasyfikowania fitopatogennych grzybów coraz częściej wykorzystuje się analizy lipidomiczne z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Fitopatogenne grzyby z rodzaju *Puccinia* zawierają rzadko występujący w przyrodzie kwas 9,10-epoksy-oktadekanowy, który może stanowić chemotaksonomiczny marker przynależności do tego rodzaju. Grzyby z rodzaju *Puccinia* syntetyzują kwasy tłuszczowe z dodatkowymi grupami (hydroxy, cyklopropanowym) oraz lipidy o unikalnej strukturze, na podstawie których można identyfikować poszczególne gatunki.

Bibliografia

- Akçin Ö.E., Özyurt M.S., Åženel G., 2011. Petiole anatomy of some *Lamiaceae* taxa. *Pak. J. Bot.* 43, 1437–1443.
- Athenaki M., Gardeli C., Diamantopoulou P., Tchakouteu S.S., Sarris D., Philippoussis A., Papanikolaou S., 2017. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *J. Appl. Microbiol.* 124, 336–367. <https://doi.org/10.1111/jam.13633>
- Ben-Ze'ev I.S., Levy E., Eilam T., Anikster Y., 2005. Whole-cell fatty acid profiles – a tool for species and subspecies classification in the *Puccinia recondita* complex. *J. Plant Pathol.* 87, 187–197.
- Berlin A., Samils B., Andersson B., 2017. Multiple genotypes within aecial clusters in *Puccinia graminis* and *Puccinia coronata*: improved understanding of the biology of cereal rust fungi. *Fungal Biol. Biotechnol.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0032-3>
- Böllmann J., Scholler M., 2006. Life cycle and life strategy features of *Puccinia glechomatis* (*Uredinales*) favorable for extending the natural range of distribution. *Mycoscience.* 47, 152–158. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0282-z>
- Brzezicka-Szymczyk K., 1992. Grzyby rdzawnikowe (*Uredinales*) – pasożyty roślin. *Kosmos* 41, 223–233.
- Burè C., Cacas J-L., Mongrand S., Schmitter J-M., 2013. Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7130-8>
- Calixto R.O., Rollin-Pinheiro R., da Silv, MI, Liporagi-Lopes L.C., Vieira J.M., Sasaki G.L., Barreto-Bergter E., 2015. Structural analysis of glucosylceramides (GlcCer) from species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex. *Fungal Biol.* 120, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.007>
- Cerv G., 1993. *Phospholipids Handbook*. Dekker, New York, Basel.
- Daly J.M., Knoche H.W., Wiese M.V., 1967. Carbohydrate and lipid metabolism during germination of uredospores of *Puccinia graministritici*. *Plant. Physiol.* 42, 1633–1642. <https://doi.org/10.1104/pp.42.11.1633>
- Duplessis S., Joly D.L., Dodds P.N., 2012. Rust effectors. W: *Effectors in plant-microbe interactions*, F. Martin, S. Kamoun (red.). Wiley-Blackwell, New Delhi, India, 155–193.
- Fiedorow Z., Gołębiak B., Weber Z., 2008. *Choroby roślin rolniczych*. AR Augusta Cieszkowskiego, Poznań.
- Hiratsuka Y., Sato S., 1982. *Morphology and taxonomy of rust fungi*. W: *The rust fungi*, K. Scott, A.K. Chakravorty (red.). AP, New York, 1–36.
- Ishibashi Y., Kohyama-Koganeya A., Hirabayashi Y., 2013. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831, 1475–1485. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.06.001>
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A., 2008. *Dictionary of the fungi*, 10th ed. CABI, Wallingford, 609–112.

- Kolmer J.A., Ordonez M.E., Groth J.V., 2009. The rust fungi. W: Encyclopedia of life sciences (ELS). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021264>
- Kryczyński S., Weber Z., 2011. Fitopatologia, t. 2. Choroby roślin uprawnych. PWRiL, Poznań.
- Majewski T., 1977. Podstawczaki (*Basidiomycetes*), rdzawnikowe (*Uredinales*). W: Flora polska, Grzyby (*Mycota*), t. 9, J. Kochman, A. Skirgiełło (red.). PWN, Warszawa, Kraków, 394.
- Morrice S., Ginetii M., 2015. Saprophytic growth of the alder rust fungus *Melampsorium hiratsukanum* on artificial media. Fungal Biol. 119, 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.03.002>
- O'Donnell A.G., 1994. Quantitative and qualitative analysis of fatty acids in the classification and identification of microorganisms. W: The identification and characterization of pest organisms, D.L. Hawksworth (red.). CAB International, Wallingford, 323–335.
- Özkan A.M.G., Uzunhisarcıklı M.E., 2009. Stem and leaf anatomy of *Althaea* L. (*Malvaceae*) species growing in Turkey. J. Fac. Pharm. Hacettepe. 28, 133–148.
- Park R.F., Wellings C.R., 2012. Somatic hybridization in the *Uredinales*. Annu. Rev. Phytopathol. 50, 219–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095405>
- Poelt J., Zwetko P., 1997. Die Rostpilze Österreichs 2., revidierte und erweiterte Auflage des Catalogus Florae Austriae, III. Teil, Heft 1, Uredinales. Österreichische Akademie der Wissenschaften, Wien, 98–99.
- Prasad R., Ghannoum M.A., 1996. Fungal Lipids. W: Lipids of pathogenic fungi, M. Sancholle, D.M. Lösel D (red.). CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 26–62.
- Ratledge C., Wilkinson S.G., 1988. Microbial lipids. W: Fatty acids in fungal taxonomy, A. Botha, J.L.F. Kock (red.). AP, London, 1–242.
- Rella A., Farnoud A.M., Del Poeta M., 2016. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. Prog. Lipid. Res. 61, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.003>
- Rheme R., McQuiston T., Kechichian T., Bielawski A., Hennig M., Drago M., Morace G., Luberto Ch., Del Poeta M., 2007. Biosynthesis and immunogenicity of glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* and other human pathogens. Eukaryot. Cell. 6, 1715–1726. <https://doi.org/10.1128/EC.00208-07>
- Rittenour W.R., Chen M., Cahoon E.B., Harris S.D., 2011. Control of glucosylceramide production and morphogenesis by the *bar1* ceramide synthase in *Fusarium graminearum*. PLoS One. 6, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019385>
- Savile D.B.O., 1976. Evolution of the rust fungi (*Uredinales*) as reflected by their ecological problems. W: Evolutionary Biology, M.K. Hecht, W.C. Steere, B. Wallace (red.). Springer, New York, London, 137–207.
- Stahl P.D., Klug M.J., 1996. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4136–4146.
- Tulloch A.P., Ledingham G.A., 1962. The component of fatty acids of oils found in spores of plant rusts and other fungi. Part II. Can. J. Microbiol. 8, 379–387. <https://doi.org/10.1139/m62-050>
- Tulloch A.P., Ledingham G.A., 1964. The component of fatty acids of oils found in spores of plant rusts and other fungi. Part IV. Can. J. Microbiol. 10, 359–364. <https://doi.org/10.1139/m60-048>
- Voegelé R.T., Hahn M., Mendgen K., 2009. The *Uredinales*: cytology, biochemistry, and molecular biology. W: The *Mycota*, 5. Plant relationships, H.B. Deising (red.). Springer, Warszawa, 69–98.
- Wang J., Wang H., Zhang Ch., Wu T., Ma Z., Chen Y., 2019. Phospholipid homeostasis plays an important role in fungal development, fungicide resistance and virulence in *Fusarium graminearum*. Phytopathol. Res. 1, 16. <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0023-9>
- Weete J.D., 1980. Fatty acids. W: Lipid biochemistry of fungi and other organisms, J.D. Weete (red.). Plenum Press, Dekker, New York, Basel, 49–95.

Gabriela Michta¹, Anita Gorczyca¹, Joanna Toporowska¹, Jakub Chalimoniuk¹,
Edyta Paczos-Grzęda¹, Sylwia Sowa¹

Oceny zróżnicowania genetycznego *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* metodą ISSR

Assessment of genetic diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* by ISSR method

Uprawa owsa zwyczajnego (*Avena sativa*) zajmuje szóstą pozycję pod względem wielkości produkcji upraw zbożowych na świecie [FAO 2019]. Jak podaje Główny Urząd Statystyczny [GUS 2020], w Polsce powierzchnia uprawy owsa stanowi 7% (ok. 500 tys. ha) ogólnych zasiewów zbóż. Owies jest m.in. zbożem pastewnym, dlatego jego hodowla ma na celu podwyższenie plonu i doskonalenie paszowej wartości ziarna z wysoką zawartością białka i tłuszczu [Prażak i Romanowska 2014]. Zajmuje również wysokie miejsce wśród zbóż uprawianych na potrzeby żywieniowe. Ma on prozdrowotne działanie na organizm ludzki oraz zwierzęcy, gdyż jest bogatym źródłem składników odżywczych, np. błonnika i związków bioaktywnych, takich jak polifenole, kwas fitynowy i awentramidy [Zarzecka i in. 2018], a ponadto jego białko jest cenniejsze i bogatsze w aminokwasy egzogenne w porównaniu z innymi zbożami [Kawka i in. 2014]. Owies jest łatwym w uprawie zbożem, ze względu na doskonałe wykorzystanie składników pokarmowych znajdujących się w glebie, a także zdolność wzrostu na zakwaszonym podłożu o niskich wartościach pH. Owies jest rośliną jednoroczną różnicującą się na dwa typy ze względu na okres wegetacji. W większości krajów Europy uprawia się owies jary, który posiada pełną zdolność do rozwoju w trakcie jednego okresu wegetacyjnego [Chawade i in. 2012]. Występuje także owies ozimy, dający większe plony i umożliwiający wcześniejszy zbiór. Dzięki awenacynom owies jest zaliczany do roślin fitosanitarnych, dzięki czemu wykorzystywany jest w płodozmianie dla pszenicy [Wenda-Piesik i in. 2000].

Jedną z najczęściej występujących chorób grzybowych owsa jest rdza koronowa powodowana przez grzyb *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, który uszkadza tkankę liściową, co wywołuje nieprawidłowości w procesie fotosyntezy, a finalnie wpływa na obniżenie plonu oraz zmniejszenie masy i liczby ziarna [Kebede i in. 2019, Paczos-Grzęda i in. 2019]. Straty plonu wywołane tą chorobą, w zależności od jej nasilenia, mogą sięgać nawet 50%. Objawem zakażenia rdzą koronową owsa jest pojawienie się na liściach dużej ilości pomarańczowo-żółtych, okrągłych lub podłużnych skupisk urediniów. Uwalniające się z nich urediniospory mogą przemieszczać się na duże odległości za pomocą wiatru [Jackson i in. 2008]. W ten sposób może dojść do porażenia upraw owsa w promieniu wielu kilometrów. Do wykiełkowania urediniospory potrzebują temperatury w zakresie 15–25°C oraz braku intensywnego oddziaływania światła. Porażenie widoczne jest głównie na powierzchni liści, a sporadycznie także na pochwach liściowych, źdźbłach lub strukturach kwiatowych i często wiąże się z występowaniem chloroz lub nekroz. Największy odsetek upraw owsa porażonych rdzą koronową występuje na obszarach o dużej

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobiotechnologii, gabriela.michta@onet.pl

wilgotności i wysokiej temperaturze. Na rozwój rdzy koronowej ma wpływ osłabienie układu odpornościowego żywicieli, co warunkuje brak aktywacji odpowiedzi obronnych wobec patogenów grzybowych. Pierwszą linią obrony roślin jest rozpoznanie charakterystycznych składników grzyba. Choć patogeny rozwinęły umiejętność wydzielania białek efektorowych inaktywujących podstawowe mechanizmy obrony roślin, w odpowiedzi rośliny wytworzyły drugą linię obrony, czyli mechanizmy wykrywania danych efektorów [Dangl i in. 2013]. Odporność na rdzę koronową może być jakościowa i wynikać z obecności genu głównego, oparta na interakcji gen na gen, lub ilościowa warunkowana obecnością kilku genów o niewielkich, lecz sumujących się efektach [Kebede i in. 2019].

Puccinia coronata f. sp. *avenae* to grzyb należący do typu podstawczaków i pochodzący z rodziny rdzowatych (*Pucciniaceae*) rzędu rdzowców (*Pucciniales*). Po raz pierwszy opisana została przez Cordę w 1837 r. [Liu i Hambleton 2013]. Według Szabo [2006] *P. coronata* jest kompleksem gatunkowym obejmującym wiele linii filogenetycznych. Na podstawie badań Liu i Hambleton [2013] uwzględniających morfologię, właściwości molekularne, zasięg telialnego żywiciela i rozmieszczenie geograficzne, rozpoznano siedem taksonów, m.in. *P. coronata* var. *avenae*, który został podzielony na dwie grupy *P. coronata* var. *avenae* f. sp. *avenae* oraz *P. coronata* var. *avenae* f. sp. *graminicola*. Wykazano, że wśród przedstawicieli *P. coronata* występuje duży stopień różnorodności genetycznej i zmienności morfologicznej w obrębie taksonów i między nimi. Do rozmnażania i rozwoju grzyba niezbędne są tkanki żywych organizmów, a poza nimi mogą przetrwać jedynie w postaci wyspecjalizowanych zarodników. Patogen przechodzi złożony cykl życiowy, obejmujący pięć stadiów przetrwalnikowych oraz dwóch żywicieli. Cykl życiowy obejmuje powtarzające się fazy infekcji i sporulacji. Faza płciowa (wtórna) infekcji zachodzi na szlaku (*Rhannus* L.), nazywanym żywicielem alternatywnym, podczas gdy faza bezpłciowa (telialna) zachodzi wyłącznie na owsie. W fazie bezpłciowej grzyb jest dikariotyczny i ma formę jednokomórkowych urediniospor zawierających dwa haploidalne jądra, różniące się genetycznie, o niejednakowym udziale w wirulencji [Paczos-Grzęda i in. 2019]. Po wykiełkowaniu zarodniki te tworzą appressoria, czyli fragmenty strzępek umożliwiające przymocowanie grzyba do grzbietowej strony liścia. Później dochodzi do penetracji, co umożliwia grzybowi przedostanie się do przestrzeni między górną a dolną epidermą liścia. W jamie aparatu szparkowego dochodzi do wytworzenia pęcherzyka, z którego powstają wydłużające się strzępki infekcyjne. Z nich powstają haustoria – ssawki, czyli wyspecjalizowane struktury żywieniowe, umożliwiające pobieranie składników odżywczych i wydzielanie białek efektorowych do komórek gospodarza [Miller i in. 2018]. Rozgałęzianie strzępek między komórkami trwa do momentu utworzenia kolonii grzyba – urediniów, które po ok. 8 dniach wytwarzają nową partię urediniospor. Mutacje i rekombinacje somatyczne zachodzące podczas fazy bezpłciowej mają wpływ na pojawienie się nowych patotypów [Park 2008], ale główne znaczenie w tworzeniu nowych ras o zmienionej wirulencji ma faza płciowa. W fazie płciowej dochodzi do powstania teliospor, zdolnych do przetrwania mroźnych temperatur, co objawia się charakterystycznym czarnawym pierścieniem wokół urediniów [Berlin in. 2018]. Po kariogamii zachodzącej jesienią i podziale mejotycznym odbywającym się wiosną tworzą się haploidalne bazydiospory – zarodniki podstawkowe, powodujące infekcję liści szklaku, na których powstają spermogonia (syn. pyknie) wytwarzające pikniospory. Te w wyniku plazmogamii łączą się ze strzępkami receptywnymi i powstaje grzybnia dikariotyczna. Na dolnej stronie liści *Rhannus* wytwarza się ecjum, z którego uwalniane są ecjospory infekujące owies, co ponawia inicjację cyklu bezpłciowego [Nazareno i in. 2017]. Przejście fazy płciowej przyczynia się do zmienności genetycznej w populacji tego

grzyba. Ponieważ patogen wytwarza wszystkie pięć rodzajów zarodników, należy do grzybów makrocyklicznych. Ten biotroficzny grzyb posiada szeroki zasięg żywicieli obejmujący 290 gatunków traw [Nazareno i in. 2017].

Markery molekularne są narzędziem wykorzystywanym w biologii molekularnej do oceny zróżnicowania genetycznego. Technika ISSR wykorzystuje reakcję PCR i polega na amplifikacji fragmentów DNA, które znajdują się pomiędzy dwoma mikrosatelitarnymi regionami, zorientowanymi w przeciwnych kierunkach. Technikę tę można wykorzystać do analizy DNA każdego gatunku, który zawiera wystarczającą liczbę odpowiednio zlokalizowanych sekwencji mikrosatelitarnych. Otrzymane amplikony mają zwykle od 200 do 2000 bp długości. Uzyskane wyniki można łatwo zwizualizować za pomocą elektroforezy zarówno w żelu agarozowym, jak i poliakrylamidowym. Metoda ISSR jest relatywnie prosta, szybka oraz odznacza się wysoką powtarzalnością. Wiarygodność metody wynika m.in. z faktu stosowania stosunkowo wysokiej temperatury przyłączania starterów wykorzystywanych w reakcji. Startery w swojej sekwencji posiadają fragment komplementarny do sekwencji powtarzalnej oraz nukleotydy zakotwiczone na końcu 5' lub 3'. Dodatkowymi atutami metody są niewielka ilość materiału wyjściowego potrzebnego do przeprowadzenia analizy oraz brak konieczności znajomości jakichkolwiek sekwencji badanego gatunku. Uzyskiwane przy udziale tej metody markery mają charakter dominujący, a więc nie pozwalają na identyfikację alleli w obrębie jednego *locus*.

Zróżnicowanie genetyczne to jedna z najważniejszych cech charakteryzujących każdą populację. Jest ona efektem selekcji naturalnej występującej w środowisku. Zmieniające się warunki środowiska mogą prowadzić do zubożenia zmienności genetycznej w wyniku eliminacji określonych genotypów z populacji. Zróżnicowanie genetyczne stanowi podstawę zachowania zdolności adaptacyjnych populacji do zmiennych warunków środowiskowych. Jest czynnikiem stanowiącym ochronę przed stresem biotycznym lub abiotycznym, a także umożliwia zachowanie stabilności i trwałości populacji przy zmieniających się warunkach klimatycznych. Niski stopień zróżnicowania genetycznego prowadzi zazwyczaj do obniżenia zdolności adaptacyjnej populacji.

Celem prowadzonych badań było określenie zróżnicowania genetycznego izolatów *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* pochodzących z Polski, Kanady i Wielkiej Brytanii z wykorzystaniem metody ISSR, której dotychczas nie wykorzystywano do analiz molekularnych polimorfizmu DNA tego chorobotwórczego grzyba.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiło 20 izolatów i populacji *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* zebranych w różnych częściach Polski, Kanadzie i Wielkiej Brytanii (tab. 1).

Na terenie Polski urediniospory zbierane były w czterech lokalizacjach, w miejscach hodowli i uprawy owsa: w Polanowicach (woj. małopolskie), Czesławicach (woj. lubelskie), Kopaszewie (woj. wielkopolskie) oraz Strzelcach (woj. łódzkie). Z kolei w Kanadzie próby pobierano w prowincji Manitoba, zaś w Wielkiej Brytanii na terenie Walii w miejscowości Aberystwyth. Z zebranych populacji w celu uzyskania izolatów poprzez pięciokrotne pasażowanie wyodrębniono izolaty pochodzące z pojedynczego zarodnika. Pasażowanie prowadzono na fragmentach liści 10-dniowych siewek owsa odmiany Kasztan wyłożonych na szalki Petriego wypełnione agarem (0,6%) z dodatkiem

benzimidazolu (3,4 mM). Szalki inokulowano zarodnikami z poszczególnych lokalizacji, a następnie umieszczano na 10 dni w fitotronie, w temperaturze 17°C przy kontrolowanym natężeniu światła i wilgotności powietrza. Po zebraniu odpowiedniej ilości zarodników (0,05 g) przeprowadzono izolację całkowitego DNA z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Plant & Fungi DNA Purification Kit, stosując metodykę producenta. Przed izolacją zarodniki zhomogenizowano w ciekłym azocie z wykorzystaniem mózdzierza i tłuczka. Uzyskany materiał przeniesiono do 2 ml probówki typu Ependoerff i zawieszono w buforze Lyse F dedykowanym izolacji kwasów nukleinowych z grzybów. Po przeprowadzeniu kolejnych etapów procedury uzyskano roztwór DNA w buforze do elucji, który zamrożono w temperaturze –20 C.

Tabela 1. Charakterystyka populacji i izolatów *P. coronata* f. sp. *avenae* wykorzystanych do analizy

Lp.	Nazwa	Poziom wyrównania	Miejsce pochodzenia
1.	P. 17	populacja	Polska, Polanowice
2.	P.1.3/1	izolat	Polska, Polanowice
3.	P.1.3/5	izolat	Polska, Polanowice
4.	P.6.2/1	izolat	Polska, Polanowice
5.	S.17	populacja	Polska, Strzelce
6.	S.4.1/1	izolat	Polska, Strzelce
7.	S.6.3/4	izolat	Polska, Strzelce
8.	C.17	populacja	Polska, Czesławice
9.	C.1.1	izolat	Polska, Czesławice
10.	C.1.1/4	izolat	Polska, Czesławice
11.	C.1.1/6	izolat	Polska, Czesławice
12.	D.17	populacja	Polska, Kopaszewo
13.	D.6.1/1	izolat	Polska, Kopaszewo
14.	D.6.1/5	izolat	Polska, Kopaszewo
15.	230	izolat	Kanada, Morden
16.	241	izolat	Kanada, Morden
17.	254	izolat	Kanada, Morden
18.	Aber CR CH	izolat	Wielka Brytania, Aberystwyth
19.	Aber CR T	izolat	Wielka Brytania, Aberystwyth
20.	Aber CR T2	izolat	Wielka Brytania, Aberystwyth

W celu oznaczania jakości wyizolowanego DNA przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Do rozdziału wykorzystano zestaw do elektroforezy poziomej Agagel Maxi (Biometra). Rozdział przeprowadzono w buforze 1× TBE przez 0,5 godz. przy napięciu 120 V. Efekt rozdziału zwizualizowano w świetle UV i udokumen-

towano przy użyciu aparatu fotograficznego. Ocena stężenia wyizolowanego DNA przeprowadzona została przy użyciu spektrofotometru Nanodrop dla próby o objętości 1 µl. Na podstawie uzyskanych wyników wykonano rozcieńczenia wszystkich próbek do jednakowego stężenia 10 ng/µl. Uzyskano w ten sposób matrycę do reakcji PCR.

W celu amplifikacji regionów międzymikrosatelitarnych przeprowadzono reakcję PCR z zastosowaniem 80 starterów ISSR i rozdzielano na żelu agarozowym. We wstępnej analizie amplifikacja prowadzona była na dwóch wybranych losowo próbach DNA. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów wytypowano 11 starterów, które wykorzystano do przeprowadzenia dalszych analiz (tab. 2). Reakcję prowadzono w objętości 12 µl. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1 × bufor do PCR (75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20) (Thermo Fischer); 200 µM każdego dNTP; 5 pM startera; 1,5 mM MgCl₂; 20 ng genomowego DNA; 0,5 U Dream Taq Polymerase (Thermo Fischer). Zastosowano następujący profil termiczny: wstępna denaturacja przez 7 min w 94°C, 36 cykli: denaturacja 94°C – 30 s, przyłączanie starterów: trzy pierwsze cykle 54°C – 45 s, trzy kolejne cykle 53°C – 45 s i 30 cykli 52°C – 45 s, wydłużanie starterów 72°C – 1 min, z końcową inkubacją 7 min w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano w 2,5% żelu agarozowym z 0,01% EtBr w buforze TBE (89 mM Tris-boran, 2,5 mM EDTA). Żele fotografowano wykorzystując system dokumentacji żeli. Uzyskane zdjęcia analizowano przekształcając na matryce binarną. Obecność produktu ISSR oznaczano jako 1, zaś jego brak jako zero. Następnie otrzymane matryce poddano analizie statystycznej w programie PAST 3.19 (Hammer i in. 2001). Oceniono dystans genetyczny, stosując współczynnik Hamminga, a następnie przeprowadzono grupowanie metodą UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic mean*) z testowaniem wiarygodności metodą bootstrap (1000).

Wyniki i dyskusja

Markery ISSR są często wykorzystywane do oceny zróżnicowania w obrębie gatunku, a także do identyfikacji gatunkowej, określenia wzajemnych relacji filogenetycznych czy mapowania genów. Markery ISSR są wysoce polimorficzne. Amplifikują do stu loci z jednego genomu. Stosunkowo niskie koszty, łatwość analizy oraz wysoki polimorfizm wpływają na powszechność ich stosowania w badaniach [Boczkowska i in. 2016]. Niemniej jednak według naszej wiedzy jest to pierwsze opracowanie, w którym wykorzystano metodę ISSR do oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie populacji *P. coronata*. Ilość amplikonów uzyskanych tą metodą była bardzo zróżnicowana i wyniosła od 7 do 55. Największa ilość fragmentów ulegała amplifikacji, jeśli elementem powtarzalnym był dinukleotyd GA lub AG, co może świadczyć o dużej zawartości tego typu sekwencji powtarzalnych w genomie [Miller i in. 2018].

Tradycyjną metodą monitorowania zmienności genetycznej patogenów jest przeprowadzenie badań zjadliwości za pomocą linii referencyjnych z genami odporności oraz definiowanie patotypów na podstawie wzorów wirulencji [Fetch i Jin 2007]. Takie analizy okazały się wartościowe zarówno do wykrywania nowych patotypów, jak również

w opracowywaniu strategii kontroli dla hodowli pod kątem odporności na rdzę [Park i in. 2005, Paczos-Grzęda i Sowa 2019].

Należy jednak pamiętać, że analizy oparte na testach fizjologicznych badają efekt fenotypowy zmienności zlokalizowanej w niewielkiej części genomu związanej z wirulencją. Sekwencjonowanie dwóch genomów *P. coronata* wykazało, że rejony odpowiedzialne za powstawanie nowych patotypów są stosunkowo niewielkie, ale zmiany w nich zachodzące są bardzo dynamiczne [Nazareno i in. 2017, Miller i in. 2018].

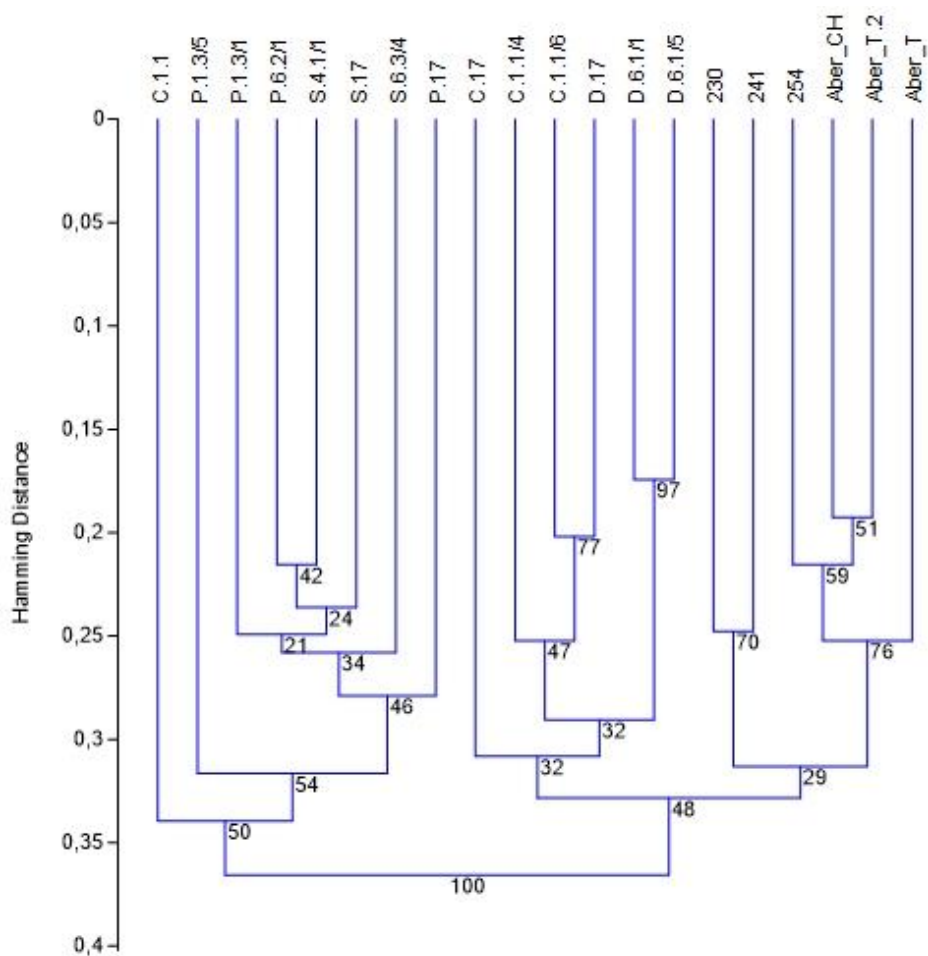
Aby ocenić możliwość wykorzystania metody ISSR do oceny polimorfizmu DNA *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, przeprowadzono wstępne reakcje z dwoma losowo wybranymi izolatami mające na celu zidentyfikowanie spośród 80 testowanych starterów ISSR tych, które inicjowały amplifikację największej ilości łatwo rozróżnialnych produktów. Na podstawie tego eksperymentu wytypowano startery: ISSR 1, ISSR 17, ISSR 33, ISSR 42, ISSR 45, ISSR 46, ISSR 47, ISSR 54, ISSR 86, ISSR 87, ISSR 90 (tab. 2). Jedenaście starterów wykorzystano do reakcji PCR-ISSR, stosując jako matryce DNA 20 izolatów i populacji *P. coronata* f. sp. *avenae*. W reakcji z ww. starterami uzyskano łącznie 220 fragmentów DNA, z których aż 211 (95,9%) było polimorficznych (tab. 2). Średnio na starter przypadało 20 amplikonów o wielkości od 220 do 3200 pz. Największą ilość zamplifikowanych fragmentów obserwowano w przypadku startera ISSR33, jednocześnie z tym starterem uzyskano największą ilość fragmentów polimorficznych. Dwaściecia dwa produkty specyficzne (10%) uzyskano dla 8 starterów. Produktów monomorficznych zidentyfikowano zaledwie 9 (4,1%). Po przeprowadzeniu reakcji na większej liczbie genotypów *P. coronata* oraz kontrolnie na innych gatunkach z rzędu *Pucciniales* możliwe byłoby opracowanie specyficznych markerów dla tego patogenu. Konieczne byłoby jednak wyizolowanie monomorficznych produktów, ich sklonowanie, zsekwencjonowanie, a następnie zaprojektowanie specyficznych starterów.

Tabela 2. Charakterystyka polimorfizmu zidentyfikowanego metodą ISSR

Lp.	Starter	Sekwencja 5'-3'	Liczba fragmentów			
			Całkowita	Polimorficznych	Monomorficznych	Specyficznych
1.	ISSR1	(AG) ₈ G	17	15	2	3
2.	ISSR17	(GA) ₈ YC	29	29	0	0
3.	ISSR33	(AG) ₈ T	55	55	0	6
4.	ISSR42	(AG) ₈ YA	36	36	0	3
5.	ISSR45	(GA) ₈ T	24	22	2	0
6.	ISSR46	(GA) ₁₀ A	12	12	0	1
7.	ISSR47	(CA) ₈ A	14	14	0	4
8.	ISSR54	(CT) ₉ T	8	8	0	2
9.	ISSR86	(CA) ₈ T	9	6	3	0
10.	ISSR87	(GT) ₈ T	7	6	1	2
11.	ISSR90	(GT) ₈ YG	9	8	1	1
Suma			220	211	9	22
Średnia			20	19,18	0,81	2
%			100	95,9	4,1	10

Tabela 3. Matryca indeksów dystansu genetycznego Hamminga pomiędzy analizowanymi izolatami i populacjami *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* określonych na podstawie polimorfizmu identyfikowanego metodą ISSR-PCR

	P.17	P.1.3/1	P.1.3/5	P.6.2/1	S.17	S.4.1/1	S.6.3/4	C.17	C.1.1	C.1.1/4	C.1.1/6	D.17	D.6.1/1	D.6.1/5	230	241	254	Aber_CH	Aber_T	Aber_T.2
P.17																				
P.1.3/1	0,303																			
P.1.3/5	0,353	0,261																		
P.6.2/1	0,257	0,248	0,317																	
S.17	0,266	0,257	0,344	0,248																
S.4.1/1	0,271	0,243	0,303	0,216	0,225															
S.6.3/4	0,298	0,271	0,321	0,252	0,261	0,248														
C.17	0,358	0,395	0,335	0,339	0,330	0,335	0,317													
C.1.1	0,317	0,362	0,385	0,344	0,326	0,339	0,303	0,381												
C.1.1/4	0,349	0,376	0,390	0,330	0,367	0,326	0,326	0,303	0,289											
C.1.1/6	0,422	0,395	0,445	0,404	0,385	0,372	0,417	0,321	0,390	0,266										
D.17	0,404	0,358	0,417	0,395	0,330	0,344	0,372	0,284	0,381	0,239	0,202									
D.6.1/1	0,427	0,372	0,339	0,417	0,372	0,339	0,358	0,326	0,385	0,271	0,362	0,298								
D.6.1/5	0,381	0,381	0,349	0,362	0,326	0,303	0,339	0,307	0,385	0,252	0,298	0,261	0,174							
230	0,417	0,408	0,376	0,408	0,381	0,330	0,404	0,344	0,358	0,372	0,390	0,317	0,339	0,321						
241	0,399	0,390	0,413	0,344	0,344	0,339	0,312	0,353	0,358	0,307	0,362	0,252	0,312	0,275	0,248					
254	0,404	0,367	0,445	0,376	0,330	0,335	0,381	0,367	0,381	0,266	0,358	0,257	0,335	0,298	0,326	0,271				
Aber_CH	0,381	0,344	0,376	0,344	0,326	0,294	0,339	0,362	0,385	0,317	0,326	0,280	0,330	0,266	0,339	0,257	0,206			
Aber_T	0,436	0,353	0,404	0,372	0,362	0,358	0,358	0,408	0,376	0,362	0,399	0,307	0,376	0,275	0,349	0,312	0,280	0,257		
Aber_T.2	0,390	0,298	0,395	0,317	0,317	0,294	0,330	0,399	0,349	0,326	0,344	0,298	0,321	0,303	0,358	0,294	0,225	0,193	0,220	



Ryc. 1. Dendrogram badanych izolatów *Puccinia coronata* uzyskany metodą UPGMA w oparciu o polimorfizm identyfikowany za pomocą metody ISSR-PCR

Na podstawie polimorfizmu zidentyfikowanego dla 20 genotypów określono dystans genetyczny, stosując współczynnik Hamminga. Średnia wartość dystansu genetycznego wynosiła 0,333 i wahała się od 0,174 pomiędzy izolatami D.6.1/1 a D.6.1/5 do 0,445 pomiędzy izolatem P.1.3/5 a C.1.1/6 i 254 (tab. 3). Posługując się powyższymi danymi, skonstruowano dendrogram z wykorzystaniem metody UPGMA (ryc. 1). Na dendrogramie wyodrębniono 3 grupy. Pierwsza skupiała wszystkie izolaty i populacje pochodzące z Polanowic i Strzelec oraz jeden izolat z Czesławic (C.1/1), druga izolaty i populacje z Czesławic i Kopaszewa, trzecia zaś wyłącznie izolaty pochodzące z Kanady i Wielkiej Brytanii.

Podsumowanie

Analiza ISSR-PCR jest metodą wysoce efektywną w identyfikacji polimorfizmu genetycznego w obrębie *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Zastosowanie tej metody umożliwia ocenę zróżnicowania genetycznego w obrębie badanego gatunku.

Udział amplifikowanych produktów polimorficznych był wysoki i wynosił ok. 95%. Z kolei zidentyfikowane produkty monomorficzne mogą stanowić podstawę do opracowania potencjalnych sekwencji specyficznych możliwych do wykorzystania w identyfikacji patogenu, jakim jest *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*.

W oparciu o uzyskane wyniki można wywnioskować, że 20 badanych izolatów wykazywało wysokie zróżnicowanie a określony w oparciu o współczynnik Hamminga dystans genetyczny wyniósł średnio 0,333, wahając się od 0,174 do 0,445. Zaobserwowane na dendrogramie UPGMA grupowanie poszczególnych genotypów odpowiadało pochodzeniu geograficznemu, i tak izolaty pochodzące z Polski klasteryzowały oddzielnie aniżeli pochodzące z Kanady i Wielkiej Brytanii.

Bibliografia

- Berlin A., Wallenhammar A., Andersson B., 2018. Population differentiation of *Puccinia coronata* between hosts – implications for the epidemiology of oat crown rust. *Eur. J. Plant Pathol.* 152, 901–907.
- Boczkowska M., Łapiński B., Kordulasińska I., Dostatny D.F., Czembor J.H. 2016. Promoting the use of common oat genetic resources through diversity analysis and core collection construction. *PLoS ONE* 11(12), e0167855.
- Chawade A., Lindén P., Bräutigam M., Jonsson R., Jonsson A., Moritz T., Olsson O., 2012. Development of a Model System to Identify Differences in Spring and Winter Oat. *PLoS ONE* 7(1), e29792.
- Dangl J.L., Horvath D.M. Staskawicz B.J., 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341(6147), 746–751.
- Fetch T.G., Jin Y., 2007. Letter code system on nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*. *Plant Dis.* 91, 763–766.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 2019, FAOSTAT Statistical Database, Rome: FAO, Statistics division, www.fao.org [dostęp: 20.03.21].
- Główny Urząd Statystyczny (GUS), 2020. Wiosenna ocena stanu upraw rolnych i ogrodniczych w 2020 r. Informacja sygnalna.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(4), 1–9.
- Jackson E.W., Obert D.E., Chong J., Avant J.B., Bonman J.M., 2008. Detached-Leaf Method for Propagating *Puccinia coronata* and Assessing Crown Rust Resistance in Oat. *Plant Dis.* 92(10), 1400–1406.
- Kawka A., Achremowicz, B., 2014. Owies – roślina XXI wieku. Wykorzystanie żywieniowe i przemysłowe. *Nauka Przyr. Technol.* 8, 3, 41.
- Kebede A., Friesen-Enns J., Gnanesh B.N., Menzies J.G., Mitchell Fetch J.W., Chong J., Beattie A.D., Paczos-Grzęda E., McCartney C., 2019. Mapping Oat Crown Rust Resistance Gene Pc45, G3:9, 505–511.
- Liu M., Hambleton S., 2013. Laying the Foundation for a taxonomic review of *Puccinia coronata* s.l w kontekście filogenetycznym. *Mycol. Progress* 12, 63–89.
- Miller M.E., Zhang Y., Omidvar V., Sperschneider J., Schwessinger B., Raley C., Figueroa M., 2018. De Novo Assembly and Phasing of Dikaryotic Genomes from Two Isolates of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, the Causal Agent of Oat Crown Rust. *mBio* 9(1).

- Nazareno E.S., Li F., Smith M., Park R.F., Kianian S.F., Figueroa M., 2017. *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: a threat to global oat production. *Mol. Plant Pathol.* 19(5), 1047–1060.
- Paczos-Grzęda E., Sowa S., 2019. Virulence structure and diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd in Poland during 2013–2015. *Plant Dis.* 103, 7, 1559–1564.
- Park R.F., 2008, Breeding cereals for rust resistance in Australia. *Plant Pathol.* 57, 591–602.
- Park R.F., Jahoor A., Felsenstein F.G., 2000. Population structure of *Puccinia recondita* in western Europe during 1995, as assessed by variability in pathogenicity and molecular markers. *J. Phytopathol.* 148, 169–179.
- Prażak R., Romanowska A., 2014, Wykorzystanie postępu biologicznego w uprawie owsa w Polsce. *Pol. J. Agron.*, 17, 30–37.
- Szabo L.J., 2006, Deciphering species complexes: *Puccinia andropogonis* and *Puccinia coronata*, examples of differing modes of speciation. *Mycoscience* 47(3), 130–136.
- Wenda-Piesik, A., Lemaczyk, G., Kotwica, K., 2000. Fitosanitarna funkcja owsa i mieszanek z jego udziałem w ogniwie zmianowania. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol.* 470, 107–118.
- Zarzecka K., Gugala M., Mystkowska I., Baranowska A., Sikorska A., Zarzecka M., 2018, Odżywcze i prozdrowotne właściwości ziarna owsa i przetworów owsianych. *Kosmos* 67(2), 409–414.

Wpływ *Fusarium culmorum* na wytwarzanie wybranych zewnątrzkomórkowych metabolitów przez *Trichoderma harzianum*

Effect of *Fusarium culmorum* on selected extracellular metabolites production
by *Trichoderma harzianum*

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* charakteryzują się dużymi zdolnościami adaptacji do otaczającego ich środowiska i występujących czynników stresowych [Zeilinger i in. 2016]. Środowiskiem bytowania tych drobnoustrojów jest gleba, ale można je również zaobserwować na drewnie, korze i wielu innych podłożach [Pascale i in. 2017]. Grzyby te dzięki wydajnej przemianie składników pokarmowych mają zdolność do szybkiego wzrostu i namnażania się, wydzielają także wiele różnorodnych związków, m.in. alkoholi, ketonów, estrów, alkenów, monoterenów. Kolonizując korzenie roślin, owijają się, tworząc appressorium, a następnie przenikają do przestrzeni pomiędzy komórkami kory i ryzodermi roślin, gdzie mogą się rozwijać [Halifu i in. 2019]. Zewnątrzkomórkowe metabolity wytwarzane przez te drobnoustroje mogą hamować wzrost patogenów i indukować system obronny roślin, zwiększając w ten sposób ich odporność na choroby wywołane przez fitopatogeny [Vinale i in. 2013]. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* promują także wzrost roślin i tolerancję na stres abiotyczny wywołany przez różnorodne czynniki. Powyższe pozytywne cechy *Trichoderma* postanowiono wykorzystać, stosując wybrane szczepy grzybowe jako komercyjne biofungicydy [Mukherjee i in. 2013].

Trichoderma spp. wykazują niezwykle zróżnicowany metabolizm zdolny do katalizowania wielu różnych substratów wraz z bardzo zróżnicowaną produkcją metabolitów wtórnych. Ta różnorodność jest uzależniona od gatunku i konkretnego szczepu drobnoustroju. Metabolity wtórne to cząsteczki o małych masach, poniżej 1000 Da, produkcja których skorelowana jest z prekursorami pochodzącymi z metabolizmu pierwotnego, natomiast pełniona funkcja w komórkach drobnoustrojów nie jest całkowicie wyjaśniona [Zeilinger i in. 2015].

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* produkują szeroką gamę metabolitów wtórnych o możliwościach zastosowania w farmacji i biotechnologii. Wśród nich wyróżnia się peptydy nierybosomalne (ang. nonribosomal peptide, NRP) peptaibole, poliketyny, siderofory oraz lotne i nielotne terpeny [Vinale i in. 2008].

W glebie mikroorganizmy i rośliny komunikują ze sobą poprzez wymianę sygnałów chemicznych. Niemniej jednak transfer cząsteczek sygnałowych oraz odpowiedź na bodźce pomiędzy grzybami *Trichoderma* a innymi mikroorganizmami i roślinami są wciąż słabo scharakteryzowane [Contreras-Cornejo i in. 2016].

¹ Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, julia.mironenka@edu.uni.lodz.pl

Spośród różnego rodzaju metabolitów wytwarzanych przez gatunki *Trichoderma* warto wyróżnić peptaibole. Są to polipeptydy grzybowe zawierające od 7 do 20 reszt aminokwasowych, zawierające w szczególności kwas α -aminoizomasłowy oraz inne rzadko spotykane aminokwasy, takie jak etylonorwalina, izowalina i hydroksypolina [Keswani i in. 2019]. Ze względu na swój amfipatyczny charakter peptaibole mogą tworzyć kanały jonowe w dwuwarstwowych błonach lipidowych drobnoustrojów, uszkadzając ich prawidłowe funkcjonowanie. Ze względu na swoje właściwości antygrzybowe znalazły się one w kręgu zainteresowań badaczy z różnych ośrodków naukowych. Innymi metabolitami wtórnymi, produkowanymi przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* są także siderofory. Te małowczątkowe związki o wysokim powinowactwie do żelaza mogą wykazywać działanie przeciwgrzybicze i pobudzające wzrost roślin (np. kwas harzianowy). Innym metabolitem grzybowym o podobnych właściwościach jest żółty barwnik, heksaketyd T22-azaphilone. Powyższe związki zostały scharakteryzowane w innych pracach naukowych [Vinale i in. 2008, Braun i in. 2018, Mironenka i in. 2020]. Kwas harzianowy i T22-azaphilone wykazywały aktywność antybiotykową *in vitro* przeciwko *R. solani*, *Pythium ultima*, a także *Sclerotinia sclerotiorum* [Manganiello i in. 2018].

Wśród popularnych grzybów porażających rośliny uprawne jednym ze stanowiących największe zagrożenie jest *Fusarium culmorum*, spotykany na całym świecie. Jest on groźnym patogenem pszenicy powodującym zarazę siewek – FHB (ang. *Fusarium Head Blight*) [Wagacha i Wuthomi 2007].

Zanieczyszczenie upraw mykotoksynami, wytwarzanymi przez grzyby *Fusarium* może skutkować ogromnymi stratami w produkcji żywności i paszy. *Fusarium* porażają zboża, w szczególności kukurydzę, pszenicę, jęczmień, żyto, ryż i owies w uprawach na całym świecie. Głównymi mykotoksynami wytwarzanymi przez *F. culmorum* są deoksyniwalenol, niwalenol i zearalenon, które stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt [Wagacha i Wuthomi 2007].

Wykazano, że zearalenon, który jest mykotoksyną o strukturze estrogenowego laktonu, może stymulować wzrost ludzkich komórek raka piersi, powoduje także uszkodzenia wątroby u zwierząt. Udowodniono również, że zearalenon ma właściwości immunotoksyczne, hepatotoksyczne, nefrotoksyczne oraz indukuje peroksydację lipidów [Janik i in. 2020].

Celem pracy było oznaczenie wpływu produkowanych przez *F. culmorum* metabolitów, w tym zearaleonu, aurofusarin i rubrofusarin na syntezę wybranych metabolitów *T. harzianum* o właściwościach grzybobójczych i wspomagających wzrost roślin. Otrzymane wyniki będą pomocne w dalszych badaniach służących zastosowaniu *T. harzianum* w ochronie roślin.

Materialy i metody

Materialy

Rozpuszczalniki i akcesoria laboratoryjne z tworzyw sztucznych zostały zakupione od Avantor Performance Materials (Polska) i Eppendorf (Niemcy).

Przygotowanie ekstraktów *F. culmorum*

Szczep grzybowy *F. culmorum* DSM 1094 zakupiono z niemieckiej kolekcji mikroorganizmów DSMZ. Zarodniki wyizolowane z 7-dniowych kultur hodowanych na skosach agarowych ZT (zawierające (g/l): glukozę 4; ekstrakt drożdżowy Difco 4; agar 25; ekstrakt słodowy 6° Balling [BLG] do 1 l [1° BLG = 1 g substancji rozpuszczalnych wyekstrahowanych z ziarna na 100 mL ekstraktu słodowego]; pH 7,0) przenoszono do 20 mL podłoża płynnego Sabouraud (Difco). Hodowlę prowadzono na wytrząsarce obrotowej (160 obr./min) przez 24 godz. w 28°C. Z tak otrzymanej hodowli wstępnej przenoszono 2 mL (inokulum) do hodowli właściwej. Hodowle inkubowano na wytrząsarce obrotowej (160 obr./min) w 28°C. Po 5 dniach inkubacji hodowle grzybów przefiltrowano przez 115-mL filtr (Thermo Scientific), a następnie 10 mL supernatantu przenoszono do 50-mL próbówki Falcon.

Metabolity ekstrahowano z supernatantu metodą QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) opisaną przez Paraszkiwicz i in. [2017]. Mieszanekę soli (2 g MgSO₄, 0,5 g NaCl, 0,5 g C₆H₅Na₃O₇ x 2H₂O, 0,25 g C₆H₆Na₂O₇ x 1,5H₂O) i 10 mL acetonitrylu dodawano do 10 mL supernatantu i próbki worticowano przez 20 min. Po rozpuszczeniu mieszaniny soli próbki wirowano przy 4000 xg przez 10 min w temperaturze 4°C. Po ekstrakcji zbierano górną fazę i odparowywano pod ciśnieniem, a każdy ekstrakt rozpuszczono w 500 µl etanolu (EtOH).

W ekstrakcie z przesączu pochodzącego *F. culmorum* udało się oznaczyć takie mykotoksyny, jak zearalenon, oraz barwniki naftochinonowe – aurofusarin i rubrofusarin.

Hodowla *T. harzianum* z ekstraktem *F. culmorum*

Szczep grzybowy *T. harzianum* KKP534 pozyskano z kolekcji Mikroorganizmów Przemysłowych z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie i IM 0961 pozyskano z kolekcji Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytetu Łódzkiego.

Zarodniki grzybów wyizolowane z 7-dniowych kultur inkubowanych na skosach ZT zaszczerpiono, jak wspomniano wcześniej (pkt 2.1).

2 mL hodowli wstępnej dodano do 18 mL pożywki bulionowej Sabouraud (Difco). Próbę badaną zaszczerpiono ekstraktem *F. culmorum* rozpuszczonym w 0,5 mL etanolu, układ kontrolny przygotowano, dodając do hodowli 0,5 mL EtOH. Hodowle inkubowano na wytrząsarce obrotowej w wyżej wymienionych warunkach. Po 24-godzinnej inkubacji hodowlę grzybów przesączono z użyciem układu filtracyjnego, płyn pochodzący i biomasę przenoszono do próbek typu falkon i przechowywano w temperaturze -20°C.

W celu oceny wpływu dodanych ekstraktów na wzrost, po 24 godz. hodowli przesączoną biomasę suszono w piecyku laboratoryjnym w temperaturze 60°C do momentu całkowitego wysuszenia i następnie ważono.

Ekstrakcja metabolitów

Metabolity wtórne ekstrahowano z przesączu pochodzącego z użyciem octanu etylu. Do 10 mL przesączu dodawano 10 mL rozpuszczalnika, miksowano na wytrząsarce obrotowej przez 20 min. Całość wirowano przy 4000 xg przez 4 min w temperaturze 4°C, a następnie górną fazę przenoszono do nowego falkonu. Do pozostałego przesączu dodawano ponownie 10 mL octanu etylu i powtarzano wszystkie etapy. Do zebranego ekstraktu dodawano bezwodny siarczan sodu w celu usunięcia pozostałości wody, następie

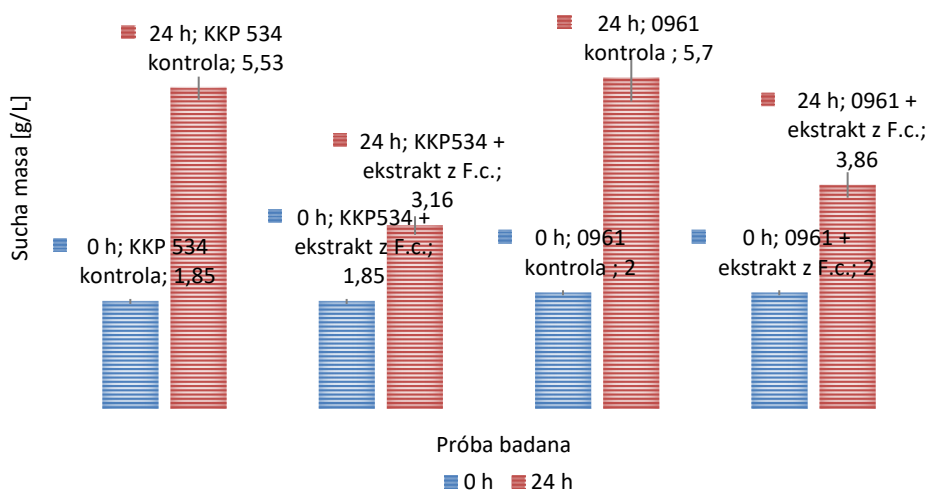
całość przesączano przez sącdek bibułowy (Whatman nr 2). Następnie zebrany ekstrakt przenoszono do kolbek okrągłodennych i odparowywano do sucha w wyparce obrotowej następujących warunkach: 100 obr./min, 250 bar, temperatura łaźni wodnej 45°C. Do wysuszonych ekstraktów dodawano 2 mL etanolu w celu rozpuszczenia metabolitów, całość przenoszono do nowych eppendorfów i wirowano 10000 xg przez 5 min w temperaturze 4°C. Próby rozcieńczono do oznaczeń na HPLC-MS/MS. Metodę HPLC opisano we wcześniejszych pracach [Mironenka i in. 2020].

Podwójna hodowla płytkowa *F. culmorum* i *T. harzianum*

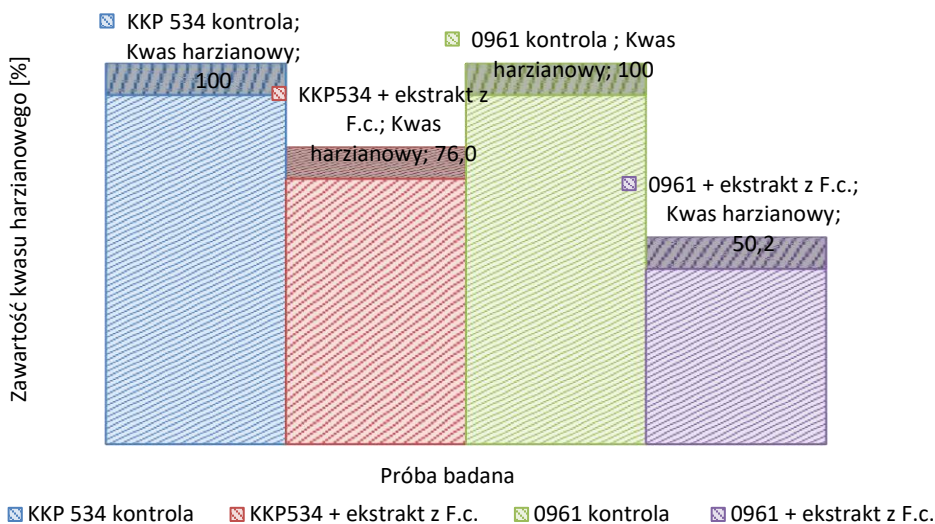
17 mL podłoża agarowego PDA roztopiono w laboratoryjnej łaźni wodnej w temperaturze 96°C przez 20 min. Następnie podłoże wylewano na 11 cm szalki Petriego i wystudowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Szczepy grzybowe rosnące na skosach zmyto 5 mL soli fizjologicznej i przelano do falkonu o objętości 15 mL. Za pomocą ezy nanoszono równe ilości roztworu zarodników równolegle po dwóch stronach szalki, z odstępem ok. 1 cm od brzegu płytki. Hodowlę prowadzono w 28°C, przez 10 dni do całkowitego zarośnięcia płytki przez grzybnię. W ostatnim dniu hodowli zmierzono średnicę wyrosniętych kultur grzybowych.

Wyniki

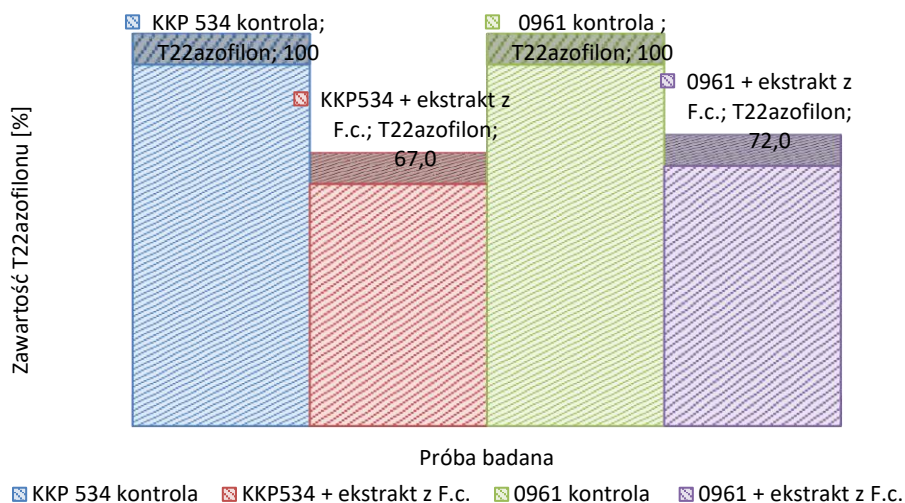
W pierwszym etapie badań oceniono wpływ zewnątrzkomórkowych metabolitów *F. culmorum* na wzrost grzybni wybranych szczepów *T. harzianum*. W tym celu przeprowadzono oznaczenia ilości biomasy *Trichoderma* poddanych działaniu ekstraktu.



Ryc. 1. Wpływ dodanych metabolitów *F. culmorum* na wzrost dwóch szczepów *T. harzianum* (KKP534, 0961)



Ryc. 2. Zmiany w wydzielaniu kwasu harzianowego w dwóch szczepach *T. harzianum* (KKP534, 0961) hodowanych w obecności metabolitów *F. culmorum*



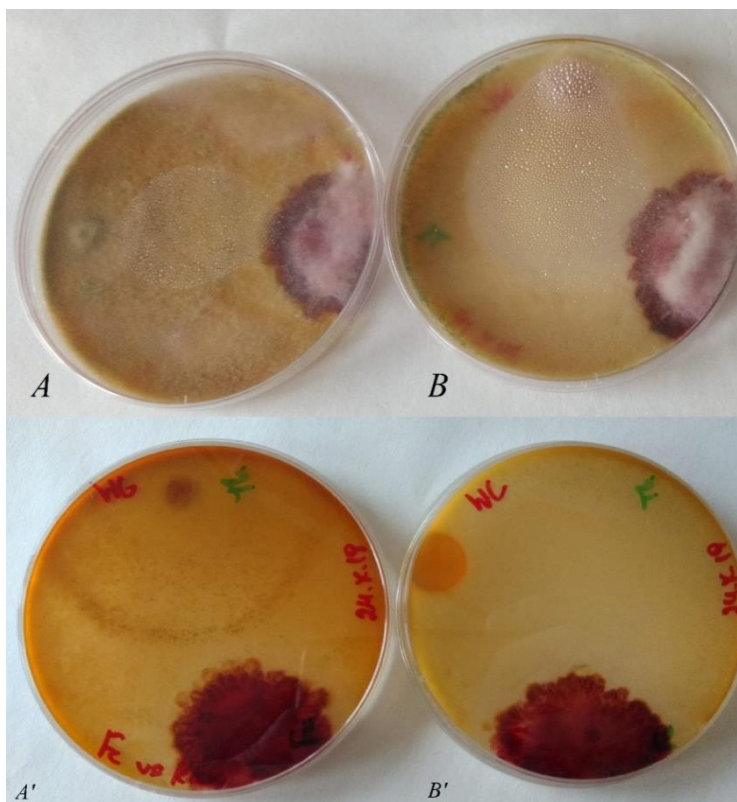
Ryc. 3. Zmiany w wydzielaniu T22 azophilonu w dwóch szczepach *T. harzianum* (KKP534, 0961) hodowanych w obecności metabolitów *F. culmorum*

Stwierdzono, że obecność ekstraktu *F. culmorum* wywiera hamujący wpływ na wzrost obu badanych szczepów *T. harzianum* po 24 h hodowli.

W kolejnym etapie pracy sprawdzono, jak obecność metabolitów fuzaryjnych wpływa na produkcję wybranych zewnątrzkomórkowych związków wydzielanych przez szczepy *T. harzianum*. W tym celu zmierzono zawartość kwasu harzianowego

(ryc. 2) i T22-azaphilone (ryc. 3) w przesączu pohodowlanym *T. harzianum* pochodzącym z 24-godzinnej inkubacji. Badania wykonano, stosując technikę LC-MS/MS.

Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano obniżoną zawartość kwasu harzianowego w przesączach pohodowlanych z prób, traktowanych metabolitami *F. culmorum* w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Wykazano, że obecność metabolitów fuzaryjnych wpłynęła na ok. 20% obniżenie ilości wytworzonego sideroforu dla szczepu KKP534 i prawie 50% dla szczepu 0961.



Ryc. 4. Podwójna hodowla płytkowa A – *T. harzianum* KKP534 vs *F. culmorum* (A' – wzrost powierzchniowy), B/B' *T. harzianum* 0961 vs *F. culmorum* (B' – wzrost powierzchniowy)

Zawartość T22 azophilonu w przesączu pohodowlanym również zmieniła się pod wpływem dodanych do hodowli metabolitów *Fusarium*. Dla każdego z badanych szczepów *T. harzianum* ilość oznaczonego metabolitu była niższa o ponad 35% w porównaniu z nastawionymi układami kontrolnymi.

Badania nad hodowlami grzybowymi uzupełniono o doświadczenia z obserwacją wzrostu drobnoustrojów na podłożach stałych. W celu oceny wzrostu badanych szczepów grzybowych w warunkach bez dodanych metabolitów nastawiono hodowle na szalkach Petriego.

Zauważono szybszy wzrost obu szczepów *T. harzianum* i ograniczenie późniejszego wzrostu *F. culmorum*. Nie zauważono różnic pomiędzy szczepami *T. harzianum* KKP 534 i 0961.

Dyskusja

Grzyby glebowe komunikują ze sobą w ekosystemach za pomocą wydzielanych na zewnątrz komórek metabolitów. W odpowiedzi na różne warunki środowiskowe, produkcja sygnałów może ulec zmianom. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są zaliczane do naturalnych środków stosowanych do kontroli biologicznej i wspomagania wzrostu roślin. Ich właściwości uzależnione są od produkcji zewnątrzkomórkowych metabolitów, w tym o właściwościach antybiotycznych i przeciwgrzybowych [Li i in. 2018].

Mykotoksyny są toksycznymi metabolitami grzybów, zanieczyszczającymi ziarna zbóż. Takie zanieczyszczenia środowiskowe stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt ze względu na ich toksyczność. Trichoteceny, fumonizyny, kwas fuзарowy są powszechnie wykrywanymi mykotoksynami produkowanymi przez różne gatunki *Fusarium*.

Jednym ze sposobów walki z zanieczyszczeniami żywności przez mykotoksyny jest zastosowanie grzybów, zdolnych do kontroli wzrostu grzybów toksynotwórczych. Do takich obiecujących drobnoustrojów zalicza się grzyby z rodzaju *Trichoderma* [Braun i in. 2018].

W pracy postanowiono ocenić wpływ mykotoksyn *Fusarium* na wzrost *T. harzianum* i produkcję wybranych zewnątrzkomórkowych metabolitów. Zauważono spadek biomasy w 24 h hodowli płynnej grzyba (ryc. 1). W celu weryfikacji szybkości wzrostu grzybów postanowiono założyć podwójną hodowlę na szalkach Petriego, prowadzoną do momentu całkowitego zarośnięcia płytki (ryc. 4). Zaobserwowano szybszy wzrost *T. harzianum*, który skutkowało ograniczeniem możliwości rozwoju *F. culmorum*. Podobny stosunek wzrostu wykazano w pracy Bunbury-Blanchette i Walkera [2019] badających wzrost *F. oxysporum* i *T. harzianum* na płytkach.

Grzyby glebowe wytwarzają zróżnicowane metabolity zewnątrzkomórkowe, dzięki czemu mikroorganizmy komunikują się w otaczającym środowisku. Dlatego postanowiliśmy zbadać, jak metabolity zewnątrzkomórkowe *Fusarium*, w tym zearalenon, barwniki naftochinonowe obecne w dodanym ekstrakcie (związki oznaczone z użyciem techniki LC-MS/MS, dane niezawarte w pracy) wpłynęły na syntezę wybranych związków zewnątrzkomórkowych *T. harzianum*. W obu szczepach widać wyraźny spadek zawartości kwasu harzianowego i T22-azaphilone po 24 godzinach inkubacji. Nie można wykluczyć, że takie zmiany w metabolizmie wtórnym mogą być związane z zahamowaniem wzrostu spowodowanego obecnością składników dodanego ekstraktu. Według Calvo i in. [2002] badających rozwój *A. nidulans* i wytwarzanie metabolitów wtórnych synteza tych związków jest związana ze wzrostem biomasy i środowiskiem, które je otacza.

Wnioski

Obecność metabolitów *F. culmorum* w hodowli płynnej *T. harzianum* skutkowało zahamowaniem przyrostu biomasy grzyba. Ilość produkowanych metabolitów znacząco

nie różniła się pomiędzy dwoma badanymi szczepami. Natomiast stwierdzono mniejsze ilości syntetyzowanych zewnątrzkomórkowych metabolitów *T. harzianum* w obecności ekstraktu fuzaryjnego. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad metabolomem grzybów z rodzaju *Trichoderma*.

Bibliografia

- Braun H., Woitsch L., Hetzer B., Geisen R., Zange B., Schidr-Heydt M., 2018. *Trichoderma harzianum*: inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *Int. J. Food Microbiol.* 280, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.021>
- Bunbury-Blanchette A.L., Walker A.K., 2019. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. *Biol. Control* 130, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.007>
- Calvo A., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.P., 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 66 (3), 447–459. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>
- Contreras-Cornejo H.A., Macias-Rodriguez L., del-Val E., Larsen J., 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *Microb. Ecol.* 92 (4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
- Halifu S., Deng X., Song X., Song R., 2019. Effects of Two *Trichoderma* Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Annual Seedlings. *Forest* 10, 1–17. <https://doi.org/10.3390/f10090758>
- Hermosa R., Cardoza R.E., Rubio M.B., Gutiérrez S., Monte E., 2014. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. Waltham, MA, Elsevier, 125–137.
- Janik E., Niemcewicz M., Ceremuga M., Stela M., Saluk-Bijak J., Siadkowski A., Bijak M., 2020. Molecular Aspects of Mycotoxins – A Serious Problem for Human Health. *nt. J. Mol. Sci.* 21(21), 8187. <https://doi.org/10.3390/ijms21218187>
- Keswani C., Singh H.B., Hermosa R., Garcia-Estrada C., Caradus J., He Y.-W., Mezaache-Aichour S., Glare T.R., Borriss R., Vinale F., Sansinenea E., 2019. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl. Micr. Biot.* 103, 9287–9303. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2>
- Li N., Alfiky A., Wang W., Islam M., Nourollahi K., Liu X., Kang S., 2018. Volatile Compound-Mediated Recognition and Inhibition Between *Trichoderma* Biocontrol Agents and *Fusarium oxysporum*. *Front Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02614>
- Manganiello G., Sacco A., Ercolano M.R., Vinale F., Lanzuise S., Pascale A., Napolitano M., Lombardi N., Lorito M., Woo S.L., 2018. Modulation of Tomato Response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and Its Secondary Metabolite Harzianic Acid. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01966>
- Mironenka J., Różalska S., Soboń A., Bernat P., 2020. Lipids, proteins and extracellular metabolites of *Trichoderma harzianum* modifications caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid as a plant growth stimulator. *Ecot. Env. Prot.* 194. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110383>
- Mukherjee P.K., Mukherjee A.K., Kranthi S., 2013. Reclassification of *Trichoderma Viride* (TNAU), the Most Widely Used Commercial Biofungicide in India, as *Trichoderma Asperelloides*. *Open Biot. J.* 7, 7–9.
- Paraszkiwicz K., Bernat P., Kuśmierska A., Chojniak-Gronek J., Plaza G.A., 2017. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *J. Env. Man.* 209, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.033>
- Pascale A., Vinale F., Manganiello G., Nigro M., Lanzuise S., Ruocco M., Marra R., Lombardi N., Woo S.L., Lorito M., 2017. *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop, Protect.* 92, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.010>

- Venkataramana M., Selvakumar G., Chandranayaka S., 2018. *Fusarium* Mycotoxin: Toxicity and Detection. W: Microbial Toxins, 465–494.
- Vinale F., Nigro M., Sivathamparam K., Flematti G., Ghisalberti E., Ruocco M., Varlese R., Marra R., Lanzuise S., Eid A., Woo S.L., Matteo L., 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. Microbiol. Letter. 347(2), 123–129. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12231>
- Vinale F., Marra R., Dcala F., Ghisalberti E.L., Lorito M., Sivasithamparam K., 2008. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Lett. Appl. Microbiol. 43(2), 143–148. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01939.x>
- Wagacha J.M., Wuthomi J.W., 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop. Prot. 26(7), 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.003>
- Zeilinger S., Gruber S., Bansal R., Mukherjee P.K., 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. Fungal. Biol. Rev. 30 (2), 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- Zeilinger S., Carlos-Estrada C., Martin J.-F., 2015. Fungal Secondary Metabolites in the „OMICS” Era. W: Biosynthesis and Molecular GENetics of Fungal Secondary Metabolites. Springer, New York, vol. 2, 1–12.

Mikroorganizmy i enzymy keratynolityczne

Keratinolytic microorganisms and their enzymes

Keratyna jest białkiem włóknikowym będącym rezerwuarem cennych biologicznie pierwiastków, jak C, N i S [Gupta i Ramnani 2006, Rodziewicz i Łaba 2006]. Odpady keratynowe oraz możliwości ich utylizacji, zagospodarowania i aplikacji przemysłowej stanowią cieszącą się dużym zainteresowaniem tematykę badawczą [Onifade i in. 1998, Gupta i Ramnani 2006, Rodziewicz i Łaba 2006, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011, Staroń i in. 2011]. Z danych literaturowych wynika, że duży udział pośród odpadów keratynowych stanowi pierze [Parihar i Kushwaha 2000, Sobolczyk i in. 2008, Choińska i in. 2011]. Keratyna tworzy również takie struktury, jak pazury, kopyta, rogi oraz wełna i włosie, a więc występuje u większości organizmów wyższych [Jayalakshmi i in. 2010].

Z aplikacyjnego punktu widzenia dużym zainteresowaniem cieszą się prace badawcze dotyczące badania uzdolnień keratynolitycznych mikroorganizmów [Łaba i Rodziewicz 2004, Gopinath i in. 2015]. Ich przedstawiciele należą do bakterii i promieniowców [Chao i in. 2007, Peddu i in. 2009], a także grzybów [Parihar i Kushwaha 2000, Bohacz 2017, Bohacz i Korniłowicz-Kowalska 2019, Bohacz i in. 2020]. Kontrolowana mikrobiologiczna biodegradacja odpadowej keratyny niweluje jej niekorzystny wpływ na środowisko naturalne, m.in. poprzez ograniczenie wydzielania toksycznych gazów, takich jak siarkowodór (H_2S) czy amoniak (NH_3) [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Ponadto mikrobiologiczna obróbka keratyny stwarza nowe możliwości jej zagospodarowania [Lasekan i in. 2013].

W celu komercjalizacji mikroorganizmów keratynolitycznych i syntetyzowanych przez nie enzymów prowadzone są badania dotyczące ich modyfikacji genetycznych, które obejmują technologie rekombinacji DNA, a także klonowania genów odpowiedzialnych za kodowanie keratynaz [Gupta i Ramnani 2006]. Częściej wykorzystuje się keratynazy pochodzenia grzybowego, ze względu na to, iż na ogół są bardziej aktywne i tańsze w otrzymywaniu [Gopinath i in. 2015]. W pełni uzasadnione staje się zatem poszukiwanie mikroorganizmów, które w sposób bezpieczny i efektywny ograniczą ilości zalegających w środowisku odpadów keratynowych z jednoczesnym pozyskaniem cennych bioproduktów [Cao i in. 2007, Choińska i in. 2011].

Celem niniejszej pracy było zestawienie i opisanie najważniejszych mikroorganizmów keratynolitycznych i ich enzymów uczestniczących w biodegradacji białka keratynowego. W sposób syntetyczny przedstawiono także mechanizm mikrobiologicznej biodegradacji keratyny oraz wyjaśniono znaczenie tego biorozkładu dla środowiska.

¹ Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Wydział Agrobiotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, michal.mozejko@up.lublin.pl

Mikroorganizmy keratynolityczne

Mikroorganizmami keratynolitycznymi nazywamy drobnoustroje, u których udowodniono uzdolnienia do rozkładu keratyny [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Enzymatyczne trawienie keratyny możliwe jest dzięki sekrecji specyficznych substratów wobec tego białka enzymów nazywanych keratynazami [Gopinath i in. 2015]. Pośród mikroorganizmów keratynolitycznych można wyróżnić przedstawicieli bakterii, w tym promieniowców, oraz grzybów strzępkowych i drożdży [Chao i in. 2007, Choińska i in. 2011, Godheja i Shekhar 2014]. Występują tutaj zarówno saprofity, jak i drobnoustroje pasożytnicze, zamieszkujące zróżnicowane środowiska [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Drobnoustroje te można znaleźć w środowiskach bogatych w keratynę, tj. glebie, ptasich gniazdach, czy bezpośrednio na strukturach keratynowych, jak pierze, sierść, czy wełna [Gupta i Ramnani 2006, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Pod względem wymagań temperaturowych mikroorganizmy keratynolityczne najczęściej zaliczane są do mezofili i termofili [Srivastava i in. 2011], natomiast po względem zapotrzebowania na tlen są zarówno tlenowcami, jak i mikroorganizmami beztlenowymi [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Uzdolnienia do lizy keratyny mają również organizmy wyższe, takie jak larwy moli *Hofmannophila pseudospretella* [Gerard 2002] oraz *Tineola bisselliella* (Hummel) [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Jednakże z uwagi na ochronę środowiska przed zaleganiem odpadowej materii organicznej, a jednocześnie przed marnotrawieniem wartościowych pod względem zawartości N i S odpadów bogatych w keratynę przy zastosowaniu biologicznych metod przyjaznych środowisku to właśnie mikroorganizmy powinny być poszukiwane, badane i wykorzystywane przez człowieka do celów praktycznych [Jahan i in. 2010].

Bakterie keratynolityczne

Dominującą grupę mikroorganizmów keratynolitycznych stanowią bakterie [Rodziewicz i Łaba 2006], które ze względu na szybkie tempo wzrostu i rozwoju (w porównaniu z grzybami) cieszą się zainteresowaniem pod kątem ich przemysłowego wykorzystania [Gopinath i in. 2015]. Keratyna jest przez nie przetwarzana jako źródło C, N i energii w celu budowy ich własnej biomasy [Łaba i Rodziewicz 2004]. Należą tutaj przedstawiciele laseczek tlenowych z rodzaju *Bacillus* sp., tj. *Bacillus cereus* i *Bacillus licheniformis* [Jahan i in. 2010, Choińska i in. 2011] oraz rzadziej szczepy *Bacillus pumilis*. Bakterie z rodzaju *Bacillus* sp. izolowane są często ze struktur keratynowych, takich jak pierze [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Pośród keratynolitycznych bakterii można spotkać także szczepy z rodzaju *Fervidobacterium* sp., takie jak *Fervidobacterium islandicum* czy *Fervidobacterium pannavorans* [Nam i in. 2002, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Właściwościami keratynolitycznymi charakteryzują się również bakterie z rodzaju *Sarcina* sp. [Łaba i Rodziewicz 2004].

W obrębie bakterii keratynolitycznych możemy wyszczególnić zarówno bakterie Gram-ujemne (G⁻), jak i Gram-dodatnie (G⁺) zróżnicowane pod względem budowy ściany komórkowej i właściwości fizjologicznych [Rodziewicz i Łaba 2006, Silhavy i in. 2010]. Pośród bakterii Gram-ujemnych (G⁻) znanych z uzdolnień do rozkładu keratyny wymienia się tlenowe i beztlenowe bakterie z rodzajów *Chrysobacterium* sp., *Fervidobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp. oraz *Vibrio* sp. [Riffel i Brandelli 2002, Rodziewicz i Łaba 2006, Gopinath i in. 2015].

Pośród mikroorganizmów Gram-dodatnich (G+) wymienić można przedstawicieli rodzaju *Bacillus* sp., tj. wcześniej wspomniane gatunki *Bacillus licheniformis* i *Bacillus subtilis*, oraz rodzaje *Kocuria* sp., *Lysobacter* sp. i *Microbacterium* sp. [Thys i in. 2004, Gopinath i in. 2015]. Bakteriami najliczniej izolowanymi z odpadowej keratyny, w tym odpadowego pierza, są laseczki *Bacillus licheniformis* [Rodziewicz i Łaba 2006]. Zasiadają one 80-90% pierza różnych gatunków ptaków [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Enzymy keratynolityczne laseczek *Bacillus* sp. charakteryzują się wysoką trwałością podczas przechowywania [Peddu i in. 2009]. Cytowani autorzy zauważyli, że keratynazy tych drobnoustrojów po zamrożeniu na okres jednego miesiąca wykazywały 90% swojej pierwotnej aktywności, natomiast po 2 miesiącach ich aktywność spadła dwukrotnie do ok. 50%.

Promieniowce keratynolityczne

Promieniowce stanowią specyficzną grupę tlenowych bakterii Gram-dodatnich (G+), które dzięki tworzeniu *pseudomycelium*, tj. rozgałęziających się i splatających wzajemnie strzępek przypominają morfologicznie grzyby strzępkowe [Sharma 2014]. Dodatkowo cytowany autor zaznacza, że ich kwasy nukleinowe są bogate w cytozynę i guaninę.

Promieniowce zasiedlają różne środowiska, w tym natlenione gleby w liczebności ok. 1 000 000 komórek w 1 gramie gleby [Jayalakshmi i in. 2010]. W przypadku obecności keratyny w środowisku swojego bytowania promieniowce przeprowadzają jej enzymatyczną degradację, czym przyczyniają się do oczyszczania środowiska naturalnego poprzez utylizację zalegających w nim odpadów keratynowych [Jayalakshmi i in. 2010]. Właściwości lityczne względem keratyny posiadają szczególnie promieniowce z rodzaju *Streptomyces* sp., spośród których można wymienić szczepy *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces graminofaciens* [Gopinath i in. 2015], *Streptomyces pactum* [Godheja i Shekhar 2014] i *Streptomyces thermoviolaceus* [Chitte i in. 1999]. Również w obrębie rodzaju *Thermoactinomyces* sp. spotykani są przedstawiciele o uzdolnieniach do rozkładu keratyny [Gousterova i in. 2005].

Promieniowce keratynolityczne są wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu, takich jak biomedycyna, przemysł farmaceutyczny, garbarski, a także w rolnictwie [Syed i in. 2009, Jayalakshmi i in. 2010]. Przykładem mogą być termotolerancyjne szczepy *Streptomyces gulbargensis* znajdujące zastosowanie w garbowaniu skór oraz podnoszeniu wartości pokarmowej odpadowej keratyny [Syed i in. 2009]. Z tego też powodu prowadzone są liczne badania dotyczące pozyskiwania i wykorzystania promieniowców [Jayalakshmi i in. 2010].

Grzyby keratynolityczne

Grzyby stanowią grupę eukariotycznych mikroorganizmów keratynolitycznych zasiedlających różne środowiska bogate w materię keratynową [Parihar i Kushwaha 2000, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Większość grzybów rozkładających keratynę należy do mezofili, jednakże występują tu również gatunki termotolerancyjne, takie jak *Chrysosporium* sp. czy *Microsporium gypseum*. Możemy tutaj wyróżnić grzyby o charakterze patogennym, tzw. dermatofity, oraz grzyby niepatogenne, czyli saprotrofy [Onifade i in. 1998, Rodziewicz i Łaba 2006, Godheja i Shekhar 2014]. Pośród grzybów keratynofilnych, tj. zasiedlających środowiska zasobne w keratynę [Kunert 2000], szczególne zna-

czenie mają rodziny *Arthrodermataceae* i *Onygenaceae* oraz klasy *Ascomycetes* i *Onygenales* [Godheja i Shekhar 2014]. Wśród rodziny *Arthrodermataceae* uzdolnienia keratynolityczne mogą posiadać m.in. gatunki należące do rodzaju *Arthroderma* sp., takie jak *Arthroderma tuberculatum* i *Arthroderma multifidum* [Bohacz i in. 2020].

W obrębie dermatofitów można wyróżnić 3 grupy ekologiczne uwarunkowane środowiskiem, w którym bytują, tj. zasiedlające glebę dermatofity geofilne oraz zasiedlające skórę i jej struktury u zwierząt i u ludzi odpowiednio dermatofity zoofilne i antropofilne [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Dermatofity są zatem w dużej mierze pasożytami organizmów wyższych, zasiedlając ich struktury keratynowe [Onifade i in. 1998].

Występowanie grzybów w środowisku glebowym uwarunkowane jest pH i wilgotnością gleby [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Dermatofity geofilne oraz inne grzyby keratynolityczne zasiedlają zarówno gleby kwaśne (*Trichophyton ajelloi*), obojętne (*Trichophyton terrestre*), jak i o odczynie zbliżonym do zasadowego (*Chrysosporium* sp.) [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2002, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Pod względem wilgotności grzyby te obecne są w środowiskach zarówno suchych (gatunki kserofilne), jak i wilgotnych (gatunki hydrofilne). Wśród kserofili można wyszczególnić *Trichophyton terrestre*, natomiast w obrębie hydrofili *Chrysosporium keratinophilum* [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Do zasiedlających struktury zwierząt, a nawet ludzi dermatofitów zoofilnych oraz antropofilnych można zaliczyć przedstawicieli rodzaju *Trichophyton* sp., takich jak *Trichophyton gallinae* oraz *Trichophyton mentagrophytes* [Tsuboi i in. 1987, Wawrzekiewicz i in. 1987, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Korniłowicz-Kowalska i Bohacz [2011] zaznaczają, iż mimo że zoofilne dermatofity są w stanie atakować organizm człowieka, w przypadku dermatofitów antropofilnych rzadko zdarza się, aby były aktywne wobec zwierząt. Dermatofity geofilne to natomiast w dużej mierze grzyby niepatogenne, saprotroficzne, zasiedlające środowiska bogate w białko keratynowe, takie jak gleba, odpady i ścieki komunalne oraz ich osady [Ulfig 1984, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Zdarza się jednak, że niektóre szczepy *Microsporium* sp., szczególnie *Microsporium gypseum*, mogą infekować również organizmy wyższe [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011].

Kolonizacja keratyny przez dermatofity związana jest z wrastaniem specyficznych strzępek, np. organów perforacyjnych, do wnętrza keratyny [Gopinath i in. 2015]. Rozkład keratyny związany z pozyskaniem C, N, S i energii dla wzrostu i rozwoju grzybów jest zatem możliwy na drodze mechanicznej oraz enzymatycznej [Onifade i in. 1998]. W zależności od poziomu aktywności enzymatycznej rozkład keratyny może odbywać się w sposób częściowy bądź całkowity [Parihar i Kushwaha 2000].

Poza dermatofitami wśród grzybów keratynolitycznych można wyszczególnić także grzyby z grupy *Chrysosporium*, do której zalicza się rodzaj *Chrysosporium* sp. oraz *Myceliophthora* sp., w tym jej teleomorfa *Ctenomyces* sp. [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011, Gopinath i in. 2015, Bohacz 2017]. W obrębie grzybów keratynolitycznych można wyróżnić typowe grzyby keratynolityczne oraz tzw. pleśnie ubikwistyczne, do których zalicza się keratynolityczne szczepy *Aspergillus fumigatus* zróżnicowane pod względem aktywności keratynolitycznej [Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Grzyby rozkładające poniżej 40% keratyny są określane mianem słabo keratynolitycznych, natomiast szczepy trawiące poniżej 20% keratyny – niekeratynolitycznych. Pleśnie ubikwistyczne w hodowli płynnej cechuje rozkład keratyny, np. w postaci pierza, rzędu 20–40%, natomiast typowe grzyby keratynolityczne przeprowadzają jej kompletną biodegradację [Kunert 2000, Korniłowicz-Kowalska i Bohacz 2011].

Enzymy keratynolityczne

Mikrobiologiczna, enzymatyczna biodegradacja keratyny zachodzi przy udziale specyficznych proteaz zwanych keratynazami bądź enzymami keratynolitycznymi [Onifade i in. 1998, Srivastava i in. 2020]. W zależności od szczepu i czasu jego hodowli enzymy keratynolityczne produkowane są w zróżnicowanej ilości [Sobolczyk i in. 2008]. Wytwarzane są one głównie podczas logarytmicznej i stacjonarnej fazy wzrostu drobnoustrojów [Gupta i Ramnani 2006]. Cechą, która różnicuje keratynazy na tle tradycyjnych proteaz i peptydaz, jest ich specyficzność substratowa [Onifade i in. 1998]. Są one bowiem aktywne zarówno wobec keratyny, białek włókienkowych, takich jak elastyna czy kolagen, jak i białek niewłókienkowych, jak albumina bądź kazeina [Rodziewicz i Łaba 2006]. Ponadto białka te cechują się aktywnością w szerokich zakresach pH i temperatury [Gupta i Ramnani 2006] i mogą być wydzielane w dwojaki sposób, tj. wewnątrzkomórkowo lub zewnątrzkomórkowo [Brandelli i in. 2015]. Jednakże większość keratynaz wydzielana jest poza obszar komórki [Srivastava i in. 2011]. Ponadto pośród keratynaz wyróżniamy enzymy, których sekrecja indukowana jest obecnością substratu keratynowego [Rodziewicz i Łaba 2006] oraz enzymy konstytutywne wydzielane pomimo braku keratyny w środowisku [Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2011].

Keratynazy zróżnicowane są pod względem charakteru centrum aktywnego, na którego podstawie zaliczamy je do proteaz aspartylowych, metaloproteaz, proteaz serynowych i tiolowych [Peddu i in. 2009]. Wśród enzymów keratynolitycznych największy udział stanowią enzymy z grupy proteaz serynowych i metaloproteaz [Gupta i Ramnani 2006] oraz proteaz obojętnych lub zasadowych [Brandelli i in. 2015]. Do głównych producentów keratynaz zaliczane są m.in. mezofilne grzyby i promieniowce oraz termofilne laseczki tlenowe z rodzaju *Bacillus* sp., ze szczególnym uwzględnieniem przemysłowym keratynaz *Bacillus licheniformis* [Jahan i in. 2010]. Z danych literaturowych wynika, że aktywność keratynolityczną wykazują enzymy z grupy metaloproteaz syntetyzowane przez *Flavobacterium* sp. KR6 [Riffel i Brandelli 2002] i *Microbacterium* sp. KR10 [Thys i in. 2004]. Aktywność keratynolityczną o charakterze alkalicznej proteazy wykazywał także *Streptomyces* sp. MG104 [Mohamedin 1999].

Mechanizm biodegradacji keratyny

Dokładny mechanizm keratynolizy nie jest jeszcze poznany, co stwarza potencjał badawczy [Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Wiadomo, iż keratyna inaczej rozkładana jest przez mikroorganizmy należące do *Procaryota* i *Eucaryota* [Sobolczyk i in. 2008]. Grzyby obok hydrolizy enzymatycznej związanej z wytwarzaniem egzoproteaz cechuje poprzedzająca je biodegradacja mechaniczna przy użyciu strzępek perforacyjnych [Onifade i in. 1998]. Mechanizm keratynolizy jest złożony z dwóch zachodzących równorzędnie procesów, tj. rozkładu hydrolitycznego i sulfitolizy [Gupta i Ramnani 2006]. Rozkład enzymatyczny związany jest z rozerwaniem podtrzymujących strukturę keratyny mostków disiarczkowych cystyny w procesie sulfitolizy [Onifade i in. 1998, Gopinath i in. 2015]. Dzięki rozbiciu zwartej struktury keratyny zwiększa się powierzchnia aktywnego oddziaływania enzymów proteolitycznych na to białko [Łaba i Rodziewicz 2004, Gopinath i in. 2015]. Rozkład enzymatyczny na drodze sulfitolizy wpływa na wzrost pH środowiska i na emisję amoniaku z odpadowej keratyny [Korniłłowicz-Kowalska i Bohacz 2011]. Rozerwanie disiarczkowych mostków cystynowych jest zatem jednym z potencjalnych mechanizmów keratynolizy [Onifade i in. 1998, Rodziewicz

i Łaba 2006]. Jednakże z uwagi na to, że proces ten wymaga dokładnego poznania prowadzone są stale badania w tym zakresie.

Podsumowanie

Keratyna doprowadzana jest do środowiska w postaci odpadów z szeregu gałęzi przemysłu, w którym duże znaczenie odgrywa przemysł drobiarski. Z racji, iż jest to białko trudnoodegradowalne, w dużej mierze odporne na rozkład fizykochemiczny i enzymatyczny konieczne jest zastosowanie różnych metod jej przetwarzania. Przyjazną środowisku szansę przetwarzania odpadowej keratyny stwarzają mikroorganizmy o uzdolnieniach keratynolitycznych.

Drobnoustroje keratynolityczne, zasiedlając zróżnicowane środowiska, przyczyniają się do naturalnej biodegradacji zalegającej w nich keratyny. W ich obrębie wyróżniamy przedstawicieli różnych taksonomicznie grup mikroorganizmów, tj bakterii, promieniowców, grzybów strzępkowych oraz drożdży. Pośród nich występują zarówno mikroorganizmy saprotroficzne, jak i potencjalnie patogenne. Liza keratyny przez te drobnoustroje możliwa jest dzięki syntezie specyficznych substratowo wobec tego białka enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych. Charakter takich enzymów uwarunkowany jest ściśle budową ich centrum aktywnego.

Mikrobiologiczny rozkład keratyny nie jest jednak do końca poznany, a ze względu na ograniczenie zagrożeń, z jakimi wiąże się niekontrolowana keratynoliza, konieczne jest dokładne poznanie mechanizmu tego procesu. W zależności od przynależności taksonomicznej mikroorganizmy wykształciły liczne sposoby na biodegradację keratyny, w których znaczącą rolę odgrywa eliminacja mostków disiarczkowych cystyny. Taki zabieg wiąże się ze zwiększeniem podatności keratyny na rozkład proteolityczny. Ważne zatem staje się poszerzenie badań dotyczących keratynolitycznych uzdolnień mikroorganizmów.

Bibliografia

- Bohacz J., 2017. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J. Microb. Biot.* 33, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2177-2>
- Bohacz J., Korniłowicz-Kowalska T., 2019. Fungal diversity and keratinolytic activity of fungi from lignocellulosic composts with chicken feathers. *Proc. Biochem.* 80, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>
- Bohacz J., Możejko M., Kitowski I., 2020. *Arthroderma tuberculatum* and *Arthroderma multifidum* isolated from soils in Rook (*Corvus frugilegus*) colonies as producers of keratinolytic enzymes and mineral forms of N and S. *Int. J. Env. Res. Pub. He.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249162>
- Brandelli A., Sala L., Kalil S. J., 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Res. Int.* 73, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.015>
- Cao L., Tan H., Liu Y., Xue X., Zhou S., 2007. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02327.x>

- Chao Y., Xie F., Yang J., Lu J., Qian S., 2007. Screening for a new *Streptomyces* strain capable on efficient keratin degradation. *J. Environ. Sci.* 19, 1125–1128. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60183-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60183-1)
- Chitte R.R., Nalawade V.K., Dey S., 1999. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 131–136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00484.x>.
- Choińska A., Łaba W., Rodziewicz A., Bogacka A., 2011. Proteoliza keratyny piór kurzych z wykorzystaniem pozakomórkowych enzymów proteolitycznych szczepu *Bacillus cereus* B5E/SZ. *Żywn. Nauka Technol. Jakość* 6, 204–213.
- Gerard P.J., 2002. The digestive system of keratin-feeding larvae of *Hofmannophila pseudospretella* (Lepidoptera: Oecophoridae). *New Zel. J. Zool.* 29, 15–22. <https://doi.org/10.1080/03014223.2002.9518285>
- Godheja J., Shekhar S.K., 2014. Biodegradation of keratin from chicken feathers by fungal species as a means of sustainable development. *J. Bioremed. Biodeg.* 5, 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000232>
- Gopinath S.C.B., Anbu P., Lakshmi Priya T., Tang T., Chen Y., Hashim U., Ruslinda A.R., Arshad M.K.M., 2015. Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. *J. Biomed. Biotechnol.* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/140726>
- Gousterova A., Braikova D., Goshev I., Christov P., Tishinov K., Vasileva-Tonkova E., Haertlé T., Nedkov P., 2005. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated *Thermoactinomyces* or by alkaline hydrolysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 335–340. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01692.x>
- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biot.* 70, 21–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0239-8>
- Jahan Z., Khan S.N., Mozammel Hoq M., 2010. Screening of keratinolytic bacteria from poultry wastes. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 45, 261–266. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i3.6535>.
- Jayalakshmi T., Krishnamoorthy P., Ramesh Kumar G., Sivamani P., 2010. Isolation and screening of a feather degrading keratinolytic *Actinomyces* from *Actinomyces* sp. *J. Am. Sci.* 6, 45–48.
- Korniłowicz-Kowalska T., Bohacz J., 2002. Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. *Acta Mycol.* 37, 101–116. <https://doi.org/10.5586/am.2002.009>
- Korniłowicz-Kowalska T., Bohacz J., 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manage.* 31, 1689–1701, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024>.
- Kunert J., 2000. Physiology of keratinophilic fungi. W: *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, R.K.S. Kushwaha, J. Guarro (red.). *Rev. Iberoam. Micol. (Suppl.)*, Bilbao, 77–85.
- Lasekan A., Abu Bakar F., Hashim D., 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Manag.* 33, 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.08.001>.
- Łaba W., Rodziewicz A., 2004. Biodegradacja odpadów keratynowych z przemysłu drobiowego przy udziale bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Sarcina*. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia* 3, 109–120.
- Mohamedin A.H., 1999. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *Int. Biodeter. Biodegr.* 43, 13–21. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00061-4)
- Nam G.W., Lee D.W., Lee H.S., Lee N.J., Kim B.C., Choe E.A., Hwang J.K., Suhartono M.T., Pyun Y.R., 2002. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 178, 538–547. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0489-0>

- Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban S., 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technol.* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00033-9).
- Parihar P., Kushwaha R.K.S., 2000. A survey of keratinophilic fungi as a tool for hen feather utilization. *Mycoscience* 41, 645–649. <https://doi.org/10.1007/BF02460932>
- Peddu J., Chitturi C., Lakshmi V., 2009. Purification and characterization of keratinase from feather degrading *Bacillus* sp. *Internet J. Microbiol.* 8, 1–9.
- Riffel A., Brandelli A., 2002. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 29, 255–258. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000307>.
- Rodziewicz A., Łaba W., 2006. Keratyny i ich biodegradacja. *Biotechnologia* 2, 130–147.
- Silhavy T. J., Kahne D., Walker S., 2010. The bacterial cell envelope. *CSH Perspect. Biol.* 2, 1–16, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Sobolczyk J., Rodziewicz A., Łaba W., Baranowska K., 2008. Bioutylizacja odpadów keratynowych z przetwórstwa drobiowego przez mezo- i termofilne bakterie. W: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*, B. Kołwzan, K. Grabas (red.). *Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych*, Wrocław, 397–402.
- Srivastava A., Sharma A., Suneetha V., 2011. Feather waste biodegradation as a source of amino acids. *Euro. J. Exp. Bio.* 1, 56–63.
- Srivastava B., Khatri M., Singh G., Kumar Arya S., 2020. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. *J. Clean. Prod.* 252, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119847>
- Staroń B., Banach M., Kowalski Z., 2011. Keratin – origin, properties, application. *Chemik* 65, 1019–1026.
- Sharma M., 2014. *Actinomycetes*: Source, identifications, and their applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3, 801–832.
- Syed D.G., Lee J.C., Li W., Kim C., Agasar D., 2009. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technol.* 100, 1868–1871. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.047>.
- Thys R.C.S., Lucas F.S., Riffel A., Heeb P., Brandelli A., 2004. Characterization of protease of a feather-degrading Microbacterium species. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 181–186, <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01558.x>
- Tsuboi R., Ko I.J., Matsuda K., Ogawa H., 1987. A new keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Dermatol.* 14, 506–508. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1987.tb03616.x>
- Ulfing K., 1983. A preliminary study on the occurrence of Dermatophytes and other keratinophilic fungi in bottom sediments of rivers and lakes. *Acta Mycol.* 19, 331–340. <https://doi.org/10.5586/am.1983.026>
- Wawrzekiewicz K., Łobarzewski J., Wolski T., 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton galinae*. *J. Med. Vet. Mycol.* 25, 261–268. <https://doi.org/10.1080/02681218780000601>

Ocena wydatku energetycznego podczas pracy w rolnictwie indywidualnym

Assessment of energy expenditure while working in private farming

Rolnictwo indywidualne w Polsce jest jednym z przodujących sektorów gospodarki pod względem różnorodności i ciężkości wykonywanej pracy. Według danych za rok 2018, które podaje Główny Urząd Statystyczny (GUS), liczba gospodarstw indywidualnych zbliżyła się do ok. 1 422 tys., natomiast liczba gospodarstw indywidualnych o powierzchni użytków rolnych przekraczających hektar wyniosła ok. 1 398 tys. [GUS 2019].

Ze względu na zróżnicowany wachlarz wykonywanych czynności oraz sezonowość, np. w produkcji roślinnej, rolnik indywidualny obciążony jest znacznie większym wysiłkiem fizycznym, a niekiedy też psychicznym, spowodowanym stałym pośpiechem i chęcią wykonania wyznaczonych zadań w ściśle określonym czasie. Również na uwagę zasługuje fakt, że rolnik w ciągu jednego dnia roboczego realizuje mnóstwo zadań, tym samym przedłużając ciągłość pracy nawet do kilkunastu godzin. Efektem długiej i ciężkiej pracy, wymagającej znacznego wysiłku fizycznego, są liczne dolegliwości ze strony układu mięśniowo-szkieletowego. Dzieje się tak z powodu długotrwałego pozostawania w jednej pozycji ciała, dźwigania ciężkich przedmiotów, używania nieodpowiednich, przestarzałych maszyn, urządzeń bądź narzędzi podczas pracy i wpływu innych warunków otoczenia [<https://www.ciop.pl>].

Podczas wykonywania pracy przez pracownika bardzo często dochodzi do nadmiernego obciążenia i zmęczenia, a to z kolei wiąże się z dolegliwościami układu mięśniowo-szkieletowego. Głównie wynika to z nieodpowiedniego sposobu wykonywania pracy, tj. nieodpowiedniej postawy podczas pracy, atmosfery czy zbyt długiego czasu pracy i braku przerw [Bartuzi i Kamińska 2010]. Podczas wykonywania pracy na pracownika oddziałują bodźce pochodzące ze środowiska, które mogą powodować znaczne obciążenia fizyczne i psychiczne [Krause i Profaska 2012].

Obciążenie pracą fizyczną to rodzaj obciążenia, na który składa się obciążenie dynamiczne, uwzględniające energię wydatkowaną przez organizm, obciążenie statyczne, dotyczące przyjmowanej podczas pracy pozycji, oraz obciążenie monotypowe, związane z wykonywaniem stałych i powtarzających się ruchów roboczych [Grzegorzczak 2001, Prędecka i in. 2006]. Wielkość wydatku energetycznego służy do sklasyfikowania kategorii stopnia ciężkości obciążenia pracą, jaka występuje podczas zmiany roboczej na danym stanowisku [Nowacka 2013].

Obciążenie psychiczne, podobnie jak obciążenie fizyczne, istotnie wpływa na organizm ludzki. Jest jednym z głównych elementów, które wpływają na wzrost zmęczenia

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Inżynierii Produkcji, Międzywydziałowe Studenckie Koło Naukowe BHP i Ergonomii, jessica_stankiewicz@o2.pl

wynikający z wykonywanej pracy. Monotonia pracy, a także wysiłek psychiczny z nią związany to główne składowe obciążenia psychicznego [Górska 2015, Karney 1988, Nowacka 2013].

Podczas wysiłku o charakterze fizycznym w organizmie człowieka mają miejsce różne procesy energetyczne, które są niezwykle ważne, aby móc ocenić obciążenie fizyczne na wybranym stanowisku. Jest ono przedstawiane jako wydatek energetyczny. Wydatek energetyczny jest ilością energii, którą produkuje człowiek podczas wykonywania zadań roboczych. Wydatek często jest określany jako ciężkość pracy i określa się go w dżulach (J) bądź w watach (W). Ilość energii jaką zużywa człowiek podczas wykonywania pracy dzieli się na wydatek energetyczny podczas jego spoczynku oraz wydatek energetyczny, kiedy czynności wymagają zużycia energii. Inaczej nazywa się to wydatkiem energetycznym efektywnej pracy (bądź netto) [Bugajska 2000].

Pomiar wydatku energetycznego jest niezwykle istotny ze względu na zapewnienie bezpieczeństwa i higieny podczas pracy. Jego wielkość pozwala na ocenę obciążenia pracą, które pojawia się w ciągu całej zmiany roboczej. Do oceny ciężkości pracy służy m.in. metoda gazometryczna, nazywana inaczej kalorymetrią pośrednią, która skupia się na określeniu wskaźników dotyczących wymiany gazowej pracownika. Metoda chronometrażowo-tabelaryczna (metoda szacunkowa) wykorzystuje natomiast dane dotyczące kosztu energetycznego poszczególnych czynności oraz pozycji, a także czasu ich trwania podczas dnia pracy. Ostatnia metoda polega na zmierzeniu częstości skurczów serca [Pacholski 1986].

Coraz większa świadomość rolników na temat obciążenia fizycznego oraz dolegliwości mięśniowo-szkieletowych, będących efektem tego obciążenia, pozwala znacznie zmniejszyć ryzyko ich wystąpienia. Najlepszym sposobem na wyeliminowanie negatywnych skutków obciążenia fizycznego jest wiedza o poziomie tych obciążeń i jej wykorzystanie podczas działań prewencyjnych prowadzonych wśród rolników.

Celem pracy jest ocena wydatku energetycznego podczas wykonywania wybranych prac w rolnictwie indywidualnym.

Zakres przeprowadzonych badań obejmuje wytypowanie do nich rolników, którzy prowadzą własną działalność w różnych gospodarstwach indywidualnych. Następnie wybranie czynności roboczych, charakterystycznych dla pracy w danym gospodarstwie. W końcowym etapie, dokonanie oceny obciążenia pracą podczas wybranych prac w poszczególnych gospodarstwach.

Material i metody

Badania zostały przeprowadzone w czterech gospodarstwach indywidualnych w województwie podkarpackim w powiecie przemyskim (miejscowości: Makowa i Huwniki). Przy wyborze gospodarstw indywidualnych wzięto pod uwagę różnorodność wykonywanych czynności pod względem obciążenia pracą rolników indywidualnych. Badania przeprowadzono w miesiącach październik – listopad 2020 r. Wybierając wcześniej wspomniane miesiące, sugerowano się największą ilością oraz dynamiką prac wykonywanych w wybranych gospodarstwach.

W przeprowadzonych badaniach uczestniczyło czterech rolników indywidualnych, którzy wykonywali odmienne i zróżnicowane prace we własnych gospodarstwach rolnych. Byli to mężczyźni w przedziale wiekowym od 24 do 63 lat, którzy nie zgłaszali

wcześniej chorób układu krążenia. W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę rolników indywidualnych uczestniczących w badaniu.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badawczej

Oznaczenie rolnika	Płeć	Wiek [lata]	Waga [kg]	Wzrost [cm]	Wykonywane prace
R1	Mężczyzna	30	64	169	Prace pszczelarskie
R2	Mężczyzna	38	93	175	Pozyskiwanie drewna
R3	Mężczyzna	63	79	172	Prace sadownicze
R4	Mężczyzna	24	89	170	Prace porządkowe w gospodarstwie warzywniczym

Źródło: opracowanie własne



Ryc. 1. Dokarmianie pszczół w badanym gospodarstwie pasiecznym
Fot. Dżesika Stankiewicz

Pierwszy z rolników uczestniczących w badaniach (R1) zajmuje się hodowlą pszczół. Pomiary prowadzono podczas dokarmiania pszczół na zimę (ryc. 1). Wszystkie czynności rolnik wykonuje samodzielnie, przyjmując różne pozycje ciała (siedzącą, pochyloną, stojącą). Podczas procesu dokarmiania pszczół, osoba badana wykonuje prace, takie jak: przenoszenie zgrzewek cukru i wiader wody do pomieszczenia gospodarczego, proces tworzenia syropu i przelewanie do 5-litrowych butelek, ręczny transport butelek

z syropem pod ule, dokarmianie pszczół czy ocieplanie uli. Ostatnim etapem prac było uprzątnięcie terenu pasieki oraz budynku gospodarczego znajdującego się w pobliżu.



Ryc. 2. Cięcie drewna opałowego za pomocą piły spalinowej
Fot. Dżesika Stankiewicz

Rolnik R2 prowadzi gospodarstwo, którego głównym kierunkiem działalności jest pozyskiwanie drewna. Badania przeprowadzono podczas pozyskiwania drewna na opał (ryc. 2). Większość prac, ze względu na bardzo małe zmodernizowanie gospodarstwa, była wykonywana ręcznie. Do wykonywanych czynności należało m.in. cięcie drewna opałowego za pomocą piły spalinowej, ręczne rąbanie drewna siekierą, ładowanie porąbanego drewna na taczkę i przewożenie pod drewnitnie. Ostatnią czynnością wykonywaną przez osobę badaną było układanie przywiezionego wcześniej drewna opałowego w stopy.

Kolejny rolnik (R3) uczestniczący w badaniach prowadzi gospodarstwo sadownicze. Pomiary przeprowadzono podczas ręcznego zbioru jabłek oraz ich transportu (ryc. 3). Prace sadownicze obejmowały zbieranie jabłek z drzew za pomocą zbieraka do owoców, przenoszenie skrzynek z owocami, zbieranie spadów w celu uprzątnięcia zgniłych jabłek oraz ogólne prace porządkowe. Podczas prac rolnik przyjmował zróżnicowane pozycje ciała (klęczącą, pochyloną, stojącą).



Ryc. 3. Zbieranie spadów
w celu uprzątnięcia sadu
Fot. Dżesika Stankiewicz



Ryc. 4. Ręczne przekopywanie podłoża
pod uprawę warzyw
Fot. Dżesika Stankiewicz

Kolejne pomiary przeprowadzono w gospodarstwie warzywniczym podczas sezonowych prac porządkowych, polegających na przygotowaniu podłoża na wiosnę do uprawy warzyw przez rolnika R4 (ryc. 4). Ze względu na niewielką przestrzeń przeznaczoną na uprawę warzyw w tym gospodarstwie (część pozostałych warzyw uprawiana była w tunelu) wszystkie prace wykonywano ręcznie, bez użycia zmodernizowanych maszyn i urządzeń. Badania przeprowadzono podczas wykonywania czynności, takich jak np. ściąganie ogrodzenia sezonowego, zabezpieczającego przed zwierzętami. Ogrodzenie znajdowało się wokół podłoża przeznaczonego na uprawę. Innymi wykonywanymi czynnościami były: usuwanie wszystkich pozostałości po uprawie warzyw oraz spulchnianie podłoża poprzez ręczne przekopywanie gleby. Ostatnią wykonywaną czynnością roboczą były prace porządkowe oraz czyszczenie sprzętu.

Metodyka badań

Ocena wydatku energetycznego polegała na określeniu kategorii ciężkości pracy na podstawie wyników pomiaru wydatku energetycznego. Do pomiarów wydatku energetycznego wykorzystano metodę polegającą na pomiarze częstości skurczów serca. Wybierając powyższą metodę, sugerowano się rodzajem pracy wykonywanej przez osoby badane. Czynności te wymagały dynamicznego zaangażowania dużych grup mięśniowych. Przy tym badani nie byli narażeni na obciążenie psychiczne pracą, a także na

wpływ stresu cieplnego. Po przeanalizowaniu okoliczności i charakteru wykonywanych prac, podjęto decyzję o wykorzystaniu metody polegającej na częstoci skurczów serca.

Podczas pomiaru wydatku energetycznego w trakcie wykonywania poszczególnych czynności przez rolników rejestrowano następujące parametry: średnie tętno (HR_{pracy}), minimalne tętno bazowe (HR_{min}), maksymalne tętno dla danego rolnika (HR_{max}).

Wyniki pomiarów posłużyły do obliczenia wskaźnika wykorzystania rezerwy tętna (WRT) wg wzoru:

$$WRT = \frac{HR_{pracy} - HR_{min}}{HR_{max} - HR_{min}} \cdot 100 [\%]$$

gdzie:

HR_{pracy} – jest średnim tętnem podawanym w uderzeniach/min [ud./min] przy wykonywaniu określonej czynności

HR_{min} – minimalne tętno bazowe [ud./min]

HR_{max} – maksymalne tętno dla danego człowieka [ud./min]

Następnie obliczono średnią WRT dla wszystkich czynności wykonywanych przez danego rolnika. Na tej podstawie określano wielkość wysiłku, opierając się na wytycznych zastosowanej metody badawczej (tab. 2).

Tabela 2. Klasyfikacja wysiłku przy pracy na podstawie rezerwy tętna

WRT określający rodzaj wysiłku [%]	
Bardzo mały wysiłek	< 25%
Relatywnie mały wysiłek	25–35%
Średni wysiłek	35–50%
Dopuszczalny wysiłek dla osób z prawidłowym układem krążenia	50–60%
Warunkowo dopuszczalny wysiłek	80%
Wysiłek niedopuszczalny	> 80%

Opracowane na podstawie: Groborz i Juliszewski 2005

Pomiary wykonano za pomocą nadajnika na klatkę piersiową firmy POLAR H10, który połączony z aplikacją Polar Beat, pozwolił na podstawie analizy tętna określić wydatek energetyczny występujący podczas wykonywanych poszczególnych czynności roboczych.

POLAR H10 składa się z opaski przeznaczonej do założenia na klatkę piersiową oraz przypinanego do niej za pomocą kapsli nadajnika (ryc. 5). Opisywany sensor tętna wykonuje pomiary, które zapisywane są w wewnętrznej pamięci, a następnie analizowane w aplikacji Polar Beat.



Ryc. 5. Nadajnik firmy Polar H 10
Fot. Dżesika Stankiewicz

Wyniki badań i dyskusja

Wyniki oceny wydatku energetycznego, przeprowadzonej podczas wybranych prac w rolnictwie indywidualnym przedstawiono w formie graficznej i opisowej.

W tabelach 3–6 przedstawiono wyniki pomiarów częstości skurczów tętna podczas prac związanych z dokarmianiem pszczół, pozyskiwaniem drewna na opał, prac sadowniczych oraz prac porządkowych w gospodarstwie warzywniczym.

Wskaźnik *WRT* obliczony na podstawie danych z tabeli 3 dla rolnika R1 podczas prac związanych z dokarmianiem pszczół wynosi 54%. Oznacza to, że sezonowe prace pszczelarskie wykonywane przez rolnika kwalifikują się do prac o dopuszczalnym wysiłku dla osób ze zdrowym układem krążenia. Nie są to prace lekkie, ale wymagające większego wysiłku fizycznego.

Praca wykonywana przez rolnika R2 zajmującego się pozyskiwaniem drewna na opał należała do prac wymagających siły oraz znacznego wysiłku fizycznego (tab. 4). Rezerwa tętna wynosi 66,25%, co kwalifikuje wykonywaną pracę jako warunkowo dopuszczalną. Jest to jednoznaczne z faktem, że wytypowany rolnik R2 wykonuje ciężkie prace, wymagające znacznego wysiłku fizycznego. U osoby badanej zauważono wzmożoną potliwość, przyspieszony oddech, a także zaczerwienienie skóry w okolicach twarzy.

Prace sadownicze obejmujące m.in. podnoszenie ciężkich skrzynek pełnych jabłek czy zbieranie popsutych spadów z drzew w celu uprzątnięcia wykonywane były przez najstarszego rolnika (mężczyzna w wieku 63 lat, waga 79 kg, wzrost 172 cm). Rezerwa tętna obliczona na podstawie wyników pomiarów częstości skurczów serca podczas tych prac przedstawionych w tabeli 5 wyniosła 52%. Wysiłek, którego wymagały powyższe

prace sadownicze, został zakwalifikowany jako dopuszczalny wysiłek dla osób z prawidłowym układem krążenia. Oznacza to, że wykonywana praca nie należy do najłżejszych, co więcej przekracza nawet średni wysiłek, ale mimo wszystko, sugerując się powyższymi wynikami, otrzymany WRT jest daleki od warunkowo dopuszczalnego wysiłku pracy bądź niedopuszczalnego.

Tabela 3. Wyniki pomiarów częstości skurczów serca podczas prac związanych z dokarmianiem pszczół przez rolnika R1 (mężczyzna w wieku 30 lat, waga 64 kg, wzrost 169 cm)

Wykonywana czynność	Czas trwania [min]	Tętno bazowe [ud./min]	Średnie tętno [ud./min]	Maksymalne tętno [ud./min]	WRT [%]
Przenoszenie zgrzewek cukru i wiader wody do pomieszczenia gospodarczego	23	63	98	128	54
Mieszanie wody z cukrem do rozpuszczania roztworu i przelewanie syropu do butelek	52	63	87	108	53
Ręczny transport butelek z syropem pod ule	19	63	95	114	63
Dokarmianie pszczół	50	63	94	118	56
Ocieplanie uli przed zimą	54	63	91	115	54
Prace porządkowe – uprzątnięcie pasieki i pomieszczenia gospodarczego	82	63	97	140	44

Źródło: opracowanie własne

Tabela 4. Wyniki pomiarów częstości skurczów serca podczas prac związanych z pozyskiwaniem drewna na opał przez rolnika R2 (mężczyzna w wieku 38 lat, waga 93 kg, wzrost 175 cm)

Wykonywana czynność	Czas trwania [min]	Tętno bazowe [ud./min]	Średnie tętno [ud./min]	Maksymalne tętno [ud./min]	WRT [%]
Cięcie drewna opałowego za pomocą piły spalinowej	48	68	102	119	67
Ręczne rąbanie drewna za pomocą siekiery	57	68	146	160	85
Ładowanie porąbanego drewna na taczkę i przewożenie do drewnutni	37	68	103	128	58
Układanie drewna w stopy	57	68	101	128	55

Źródło: opracowanie własne

Tabela 5. Wyniki pomiarów częstości skurczów serca podczas prac związanych ze zbiorem jabłek przez rolnika R3 (mężczyzna w wieku 63 lat, waga 89 kg, wzrost 171 cm)

Wykonywana czynność	Czas trwania [min]	Początkowe tętno [ud./min]	Średnie tętno [ud./min]	Maksymalne tętno [ud./min]	WRT [%]
Zrywanie jabłek z drzew za pomocą zbieraka do owoców	86	52	85	123	46
Zbieranie zepsutych spadów	37	52	83	119	46
Ręczne zbieranie jabłek do skrzynek i przenoszenie ich w wyznaczone miejsce	56	52	94	128	56
Uprzątnięcie sadu	57	52	96	124	61

Źródło: opracowanie własne

Ostatni badany rolnik R4 wykonywał sezonowe prace porządkowe w swoim gospodarstwie rolnym (tab. 6). Całkowity czas prac polegających na przygotowaniu podłoża pod uprawę warzyw na przyszły wiosenny sezon, podczas którego przeprowadzono badania, wyniósł 5 godz. 38 min. Wskaźnik WRT rolnika wyniósł 43,5%. Oznacza to, że praca obejmująca ww. czynności jest pracą wymagającą średniego wysiłku fizycznego. Pracownik nie wykonywał, tak jak w przypadku pozostałych badanych osób (R1, R2, R3), czynności związanych np. z dźwiganiem ciężkich przedmiotów. Wykonywana praca pozwalała także na zmianę pozycji ciała podczas pracy, co pozwoliło w jakimś stopniu na zminimalizowanie obciążenia wykonywaną pracą.

Tabela 6. Wyniki pomiarów częstości skurczów serca podczas prac związanych z przygotowaniem podłoża pod uprawę warzyw przez rolnika R4 (mężczyzna w wieku 24 lat, waga 67 kg, wzrost 175 cm)

Wykonywana czynność	Czas trwania [min]	Początkowe tętno [ud./min]	Średnie tętno [ud./min]	Maksymalne tętno [ud./min]	WRT [%]
Ściąganie sezonowego ogrodzenia zabezpieczającego wokół podłoża przeznaczonego pod uprawę	74	69	96	129	45
Usuwanie wszystkich pozostałości po uprawie warzyw	87	69	85	123	30
Przekopanie podłoża w celu spulchnienia gleby	124	69	96	136	68
Prace porządkowe oraz czyszczenie sprzętu	38	69	84	117	31

Źródło: opracowanie własne

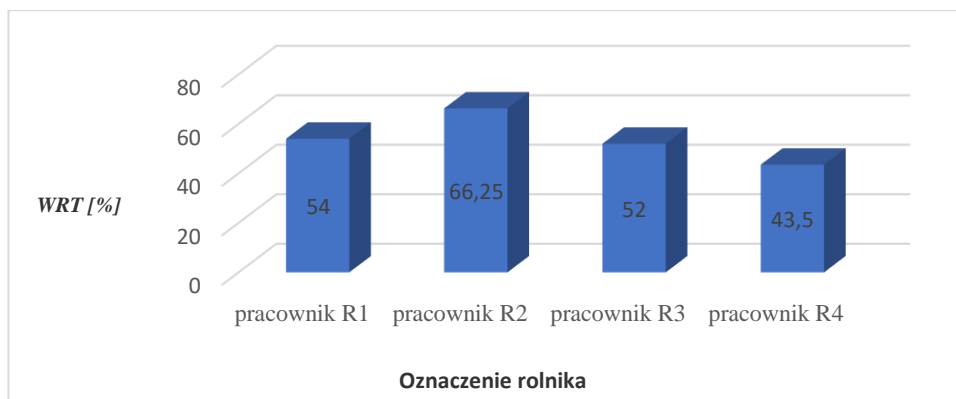
Na podstawie uzyskanych wskaźników rezerwy tętna dla poszczególnych czynności wykonywanych przez rolników wskazano czynności o najniższym i najwyższym wydatku energetycznym.

Najwyższy wskaźnik rezerwy tętna został zanotowany podczas prac związanych z ręcznym rąbaniem drewna za pomocą siekiery przez rolnika R2 ($WRT = 85\%$), przekopaniem podłoża w celu spulchnienia gleby przez badanego R4 ($WRT = 68\%$), dźwiganiem i ręcznym transportem ciężkich butelek z wodą przez rolnika R1 ($WRT = 63\%$) oraz pracami związanymi z uprzątnięciem sadu przez osobę badaną R3 ($WRT = 61\%$).

Były to czynności robocze, które wymagały użycia znacznej siły oraz większego zaangażowania układu mięśniowo-szkieletowego. Związane były z wysiłkiem fizycznym, klasyfikującym się jako dopuszczalny dla osób ze zdrowym układem krążenia oraz warunkowo dopuszczalnym.

Najniższy poziom wydatku energetycznego odnotowano głównie podczas drobnych prac porządkowych wykonywanych przez rolnika R1 i R4, dla których wskaźnik rezerwy tętna był najniższy (odpowiednio: 44% i 31%). Natomiast w gospodarstwach R2 i R3 były to czynności związane ze zbieraniem jabłek i spadów z drzew ($WRT = 46\%$) oraz układaniem drewna w stopy ($WRT = 55\%$). Mimo że powyższe prace wymagały najmniejszego wysiłku fizycznego spośród przebadanych czynności, to większość z nich wciąż nie należała do prac lekkich. Sklasyfikowane zostały jako prace o średnim wysiłku fizycznym.

Po przeprowadzeniu pomiarów częstości skurczów serca u poszczególnych rolników dokonano także porównania ciężkości wybranych prac w gospodarstwach indywidualnych na podstawie wskaźnika rezerwy tętna (WRT) (ryc. 6).



Ryc. 6. Porównanie rezerw tętna dla prac wykonywanych przez poszczególnych rolników
Źródło: opracowanie własne

Z porównania wskaźników WRT dla poszczególnych rolników wynika, że rolnik R2 zajmujący się pozyskiwaniem drewna na opał był narażony na najwyższy stopień wysiłku fizycznego. Jego praca należała do najcięższych w porównaniu z pozostałymi pracami osób badanych. W związku z powyższym jako jedyna zakwalifikowała się do rodzaju prac o warunkowo dopuszczalnym wysiłku. Wymagała dużego nakładu siły, np.

podczas rąbania drewna opałowego oraz podczas ręcznego transportowania drewna za pomocą taczek.

Praca rolników R1 i R3 również nie należała do najłżejszych. Sezonowe prace pszczelarskie wymagały znacznego wysiłku, chociażby podczas podnoszenia ciężkich daszków bądź podczas ręcznego transportu zgrzewek cukru na wyznaczone miejsce.

Prace sadownicze wykonywane przez najstarszego pracownika spośród przebadanych osób (R3) wiązały się m.in. ze zbieraniem jabłek z drzew oraz z podnoszeniem ciężkich skrzynek pełnych jabłek. Czynności te wymagały przyjęcia wymuszonych pozycji ciała, które znacznie obciążały układ mięśniowo-szkieletowy, prowadząc do szybszego zmęczenia wykonywaną pracą. Stopień wysiłku fizycznego rolnika R1 oraz R3 został określony jako dopuszczalny wysiłek dla osób z prawidłowym układem krążenia.

Natomiast wysiłek fizyczny czwartego badanego rolnika R4 określono jako średni. Rezerwa tętna podczas wykonywania pracy przez tego rolnika miała najniższą wartość. Jednocześnie u rolnika R4 odnotowano maksymalne tętno wynoszące 136 ud./min (tab. 6) podczas czynności związanych z ręcznym przekopywaniem podłoża, co wskazuje, że powyższa czynność wymagała od rolnika znacznego wysiłku fizycznego.

Podsumowanie

Przeprowadzone pomiary częstości skurczów tętna u rolników podczas wykonywania wybranych prac, pozwoliły na dokonanie oceny wydatku energetycznego w rolnictwie indywidualnym.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że badane prace należą do kategorii prac o średnim, dopuszczalnym i warunkowo dopuszczalnym wysiłku fizycznym.

Najniższy poziom wysiłku stwierdzono dla prac porządkowych w gospodarstwie warzywniczym. Średnia wartość WRT u rolnika R4, pracującego w gospodarstwie warzywniczym wyniosła 43,5%. Oznacza to, że wykonywana praca wymagała wysiłku fizycznego o średnim stopniu.

Wydatek na poziomie dopuszczalnym stwierdzono podczas sezonowych prac pszczelarskich (WRT = 54%) oraz prac sadowniczych (WRT = 52%).

Najwyższy stopień wysiłku fizycznego stwierdzono podczas prac związanych z pozyskiwaniem drewna na opał. Średni wskaźnik WRT z wszystkich wykonywanych czynności wyniósł aż 66,25% i był najwyższy z wszystkich badanych prac. Prace pozyskiwania drewna jako jedyne zakwalifikowano do rodzaju prac o warunkowo dopuszczalnym wysiłku.

Analizując poszczególne czynności wykonywane podczas badanych prac, najwyższy wskaźnik rezerwy tętna stwierdzono podczas czynności rąbania drewna za pomocą siekiery przez rolnika R2 (WRT = 85%), natomiast prace wymagające najniższego wydatku energetycznego to drobne prace porządkowe wykonywane przez rolnika R1 (WRT = 44%) i R4 (31%).

Podobne wartości WRT uzyskano w badaniach Groborz i Juliszewski [2006]. Podczas badań przeprowadzonych w trzech gospodarstwach rolnych, najwyższe wskaźniki rezerwy tętna odnotowano w pracach, które wymagały zaangażowania największej grupy mięśni. Wartości tętna podczas prac mieściły się w przedziale od 103 nawet do 142 ud./min. Tymi pracami były m.in. ręczny wysiew marchwi (WRT = 67,9%), mycie

marchwi w myjce (WRT = 42,4%) czy załadunek kapusty kiszzonej (WRT = 37,3%). Najniższe wartości wskaźnika rezerwy tętna odnotowano natomiast przy pracach, które nie wymagały znaczącego wysiłku fizycznego. Wartości tętna mieściły się w przedziale od 73 do 77 ud./min. Do powyższych prac należało m.in.: przygotowanie paszy dla zwierząt na gniotowniku (WRT = 16%), pakowanie (WRT = 13,5%) czy prace porządkowe (WRT = 12,5%).

Badania przeprowadzone przez Szast [2019] wskazują, że najwyższe wskaźniki rezerwy tętna odnotowano podczas prac, które wymagały udziału większej ilości grup mięśniowych. Zarówno u kobiet, jak i mężczyzn większy wydatek energetyczny występował podczas zbierania jablek spod drzew i przenoszenia wypełnionych owocami koszy. Mniejsze wartości wydatku energetycznego natomiast odnotowano przy pracach, które nie wymagały użycia większej siły oraz zaangażowania dużej ilości grup mięśniowych. Wyżej wspomnianymi pracami były np. prace związane ze zrywaniem owoców z drzew.

Bibliografia

- Bartuzi P., Kamińska J., 2010. Obciążenie i dolegliwości układu mięśniowo-szkieletowego a poziom wiedzy pracowników o ergonomii stanowiska komputerowego. *Bezpieczeństwo pracy: nauka i praktyka*. Wyd. CIOP, Warszawa, 21.
- Bugajska J., 2000. Ocena obciążenia pracą fizyczną dynamiczną na stanowisku pracy. Pakiet edukacyjny „Nauka o pracy – bezpieczeństwo, higiena, ergonomia”. Centralny Instytut Ochrony Pracy, 2–3.
- Groborz A., Juliszewski T., 2005. Analiza możliwości wykorzystania aparatury pomiarowej i programu komputerowego firmy Polar do rejestracji tętna. AR w Krakowie, Kraków, 109–110.
- Groborz A., Juliszewski T., 2006. Obciążenie pracą osób w gospodarstwach rolnych. AR w Krakowie, Kraków, 177–179.
- Grzegorzczak K., 2001. Obciążenie fizyczne pracą w rolnictwie. W: *Obciążenie fizyczne i psychiczne pracą w rolnictwie*, Bujak F., Solecki L., Zagórski J. (red.). IMW, Lublin, 15.
- Górska E., 2015. Podstawy projektowania ergonomicznego. *Ergonomia, projektowanie, diagnoza, eksperymenty*. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 282–283.
- Główny Urząd Statystyczny, 2019. Departament Rolnictwa, Użytkowanie gruntów i powierzchnia zasiewów w 2018 r. Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa.
<https://www.ciop.pl>
- Karney E.J., 1988. Człowiek w środowisku pracy. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa, 18, 128.
- Krause M., Profaska M., 2012. Aktualne wytyczne oceny ryzyka zawodowego dla obciążenia pracą fizyczną. *Systemy wspomagania w inżynierii produkcji*. Wyd. STE GROUP, Warszawa, 101–111.
- Nowacka Ł.W., 2013. Ergonomia i ochrona pracy wybrane zagadnienia. Wyd. SGGW, Warszawa, 70–72, 129.
- Pacholski L. (red.), 1986. Ergonomia. Wyd. Politechniki Poznańskiej, Poznań, 5, 129.
- Prędecka A., Węgrzyn M., Sowa M., Sulak E., 2016. Ocena wydatku energetycznego na stanowisku pracy piekarza metodą chronometrażowo-tabelaryczną wg Lehmana. *Zesz. Nauk. SGSP* 59(3), Warszawa, 138–139.
- Szast M., 2019. Ocena obciążenia fizycznego pracą w rolnictwie indywidualnym. Praca dyplom. (maszynopis), UP w Lublinie, Lublin, 23–27.

Wojciech Sokołowski¹, Bożena Kowalczyk¹, Karolina Włodarczyk¹,
Sylwia Wdowiak-Wróbel¹, Monika Marek-Kozaczuk¹

Możliwości wykorzystania bakterii z rodzaju *Methylobacterium* w zrównoważonej uprawie roślin

The potentiality of utilize bacteria of the *Methylobacterium* genus in sustainable crop production

Początek XX wieku i zapoczątkowane wówczas badania naukowe dotyczące mikrobiomu strefy korzeniowej przyczyniły się do zrozumienia roli interakcji pomiędzy mikroorganizmami glebowymi a roślinami. Zauważono, że mikroby mogą wykazywać dobroczynny wpływ na wzrost i rozwój roślin [Compant i in. 2010]. Ukierunkowane wykorzystywanie mikroorganizmów, wykazujących naturalną zdolność do wspomaganie wzrostu i rozwoju roślin dosyć szybko znalazło zastosowanie w praktyce rolniczej, m.in. poprzez zastosowanie w cyklu uprawowym bakterii o potwierdzonych właściwościach wiązania azotu atmosferycznego lub solubilizowania trudno rozpuszczalnych fosforanów. Niestety, pozbawiona głębszego zrozumienia podstaw teoretycznych technika, dawała zróżnicowane i niepewne rezultaty, w obliczu czego została porzucona na korzyść intensywnie rozwijającej się wówczas branży nawozów sztucznych i chemicznych środków ochrony roślin (pestycydów). Swoisty renesans idei wykorzystania bakterii promujących wzrost roślin (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria) rozpoczął się w latach 80. i 90. ubiegłego wieku i znalazł odzwierciedlenie w intensywnym rozwoju badań nad możliwością wykorzystania bakterii z grupy PGPB w praktyce [Glick 2020b]. Zdobyta wiedza i doświadczenie pozwoliły na głębsze zrozumienie mechanizmów promowania wzrostu i rozwoju roślin przez dobroczynne bakterie, dzięki czemu obecnie notuje się powolny, aczkolwiek stały rozwój rynku preparatów biologicznych (bionawozów, biostymulatorów, biopestycydów). Ich skuteczne wykorzystanie może być kluczowym elementem w zwiększaniu produkcji rolniczej, będącej jednym ze sztandarowych wyzwań ludzkości początku XXI wieku [Olanrewaju i in. 2017, Glick 2020a].

Bakterie należące do rodzaju *Methylobacterium* są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, a dzięki swojej plastyczności ekologicznej mogą kolonizować różnorakie środowiska, od osadów dennych wód słonych i słodkich po przestrzenie międzykomórkowe roślin. Wiele szczepów należących do rodzaju *Methylobacterium* wykazuje zdolność do promowania wzrostu i rozwoju roślin, ochrony przed fitopatogenami, czy detoksykacji niebezpiecznych związków chemicznych, w związku z czym są powszechnie zaliczane do PGPB [Dourado i in. 2015, Vadivukkarasi i in. 2018]. Celem niniejszego opracowania jest krótka charakterystyka bakterii z rodzaju *Methylobacterium* oraz przegląd współczesnego piśmiennictwa dotyczącego możliwości ich zastosowania w szeroko rozumianej uprawie roślin.

¹ Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, wojciech.sokolowski@poczta.umcs.lublin.pl

Charakterystyka rodzaju *Methylobacterium*

Rodzaj *Methylobacterium* (klasa α -*Proteobacteria*) należy do rzędu ryzobiowców i obejmuje, jak dotąd, 67 opisanych gatunków (zob. <https://lpsn.dsmz.de/genus/Methylobacterium>). Bakterie z tego rodzaju to Gram-ujemne, tlenowe pałeczki, tworzące na podłożach mikrobiologicznych kolonie o charakterystycznym, różowym lub pomarańczowo-czerwonym zabarwieniu, związanym z produkcją barwników karotenoidowych przez te bakterie. Rodzaj ten jest zaliczany do grupy fakultatywnych metylotrofów – cechą charakterystyczną bakterii z rodzaju *Methylobacterium* jest zdolność do oksydacji metanolu z wykorzystaniem enzymu dehydrogenazy (MDH) i utylizacja tego związku jako jedynego źródła węgla i energii [Dourado i in. 2015]. Bakterie z tej grupy wykazują również zdolność do wykorzystywania i utylizacji innych, jednowęglowych związków organicznych, takich jak mrówczan, formaldehyd, a nawet metan. Niektóre szczepy, poddane odpowiednim warunkom hodowli, mogą wytwarzać bakteriochlorofil, co sugeruje powiązanie filogenetyczne ich przodków z fototrofami [Green 2015].

Rodzaj ten jest dosyć szeroko rozpowszechniony w przyrodzie, tak w ekosystemach naturalnych, jak i antropogenicznych. Jego przedstawiciele mogą zasiedlać zarówno środowiska wodne, jak i lądowe, mogą znajdować się w glebie, powietrzu, kurzu, w systemach wodociągowych czy też zanieczyszczonych i skażonych siedliskach naturalnych. Ważnym rezerwuarem bakterii z rodzaju *Methylobacterium* są rośliny oraz ryzosfera; szczepy mają zdolność do kolonizacji tkanek wewnętrznych i funkcjonowania w formie endofitycznej lub zasiedlania powierzchni roślin. Stopień asocjacji tych mikroorganizmów z rośliną może przyjmować wieloraki charakter, od ścisłego, symbiotycznego, po luźny i fakultatywny. Szacuje się, że szczepy *Methylobacterium* współtworzą mikrobiom wielu gatunków roślin. Ponadto udowodniono, że metylotrofy kolonizujące fylosferę wykorzystują do wzrostu niewielkie ilości metanolu wydzielane przez aparaty szparkowe roślin, co stymuluje ich rozwój i jednocześnie może hamować wzrost innych mikroorganizmów. Żaden z dotychczas opisanych gatunków *Methylobacterium* nie wykazywał cech fitopatogenicznych lub saprofitycznych, pomimo dowodów na wytwarzanie przez nie enzymów rozkładających ścianę komórkową roślin, takich jak pektynazy czy celulazy. Z drugiej strony niektóre gatunki bakterii rodzaju *Methylobacterium* są uznawane za oportunistyczne patogeny człowieka [Holland 1997, Vadivukkarasi i in. 2018].

Współczesne kierunki badań mechanizmów wspomaganie wzrostu i rozwoju roślin przez szczepy bakterii z rodzaju *Methylobacterium*

W zależności od właściwości biochemicznych konkretnego szczepu oraz modelu i stopnia interakcji z roślinami bakterie z rodzaju *Methylobacterium* mogą realizować różne strategie i mechanizmy bezpośredniego lub pośredniego promowania wzrostu i rozwoju roślin, m.in. poprzez wspomaganie naturalnych procesów fizjologicznych zachodzących w tkankach roślinnych lub ryzosferze, zmniejszanie podatności roślin na stres abiotyczny, czy zwalczanie fitopatogenicznych mikroorganizmów [Abanda-Nkpwatt i in. 2006]. Szczepy należące do rodzaju *Methylobacterium* mogą wykazywać zdolność do wiązania azotu atmosferycznego oraz mobilizacji składników mineralnych, zwiększając tym samym rezerwuar łatwo przyswajalnych jonów, niezbędnych do prawidłowego roz-

woju roślin. Ponadto istotną gospodarczo cechą bakterii należących do omawianego rodzaju jest zdolność do syntezy fitohormonów (szczególnie auksyn i cytokinin) oraz związków regulujących poziom tych substancji w roślinach, co w sposób bezpośredni przekłada się na zwiększanie produkcji biomasy przez rośliny czy pobudzanie procesu kiełkowania nasion. Wykazano również, że szczepy *Methylobacterium* mogą przejawiać zdolność ograniczania skutków stresu abiotycznego roślin oraz pobudzać mechanizmy indukowanej odporności systemicznej (ISR, induced systemic resistance), stanowiącej naturalną, nieswoistą ochronę przeciwko patogenom bakteryjnym i grzybowym. Niektóre szczepy mogą również bezpośrednio przyczyniać się do ochrony roślin w wyniku konkrowania z patogenami o składniki pokarmowe i przestrzeń życiową, a także produkcję związków hamujących ich wzrost [Dourado i in. 2015, Vadivukkarasi i Bhai 2020]. Predyspozycja metylotrofów do rozkładu toksycznych substancji, takich jak 2,4,6-trinitrotoluen czy dichlorometan, oraz zdolność do kolonizowania zanieczyszczonych środowisk, znalazły odzwierciedlenie w wykorzystaniu niektórych gatunków *Methylobacterium* jako czynników biologicznych w procesach fitoremediacji i bioremediacji. Oprócz zdolności do rozkładu związków toksycznych lub wykorzystywania ich jako źródeł węgla i energii, bakterie te mogą wspomagać proces akumulacji metali ciężkich przez rośliny oraz zwiększać ich odporność na podwyższone stężenie tych pierwiastków w podłożu [Jinal i in. 2020].

Potencjał biochemiczny omawianej grupy bakterii oraz perspektywiczne możliwości wykorzystania dobroczynnych szczepów *Methylobacterium* wzbudzają zainteresowanie współczesnych badaczy, eksplorujących różnorakie ekosystemy w poszukiwaniu nowych szczepów o możliwie jak największym potencjale do wykorzystania w rolnictwie, ochronie środowiska oraz w wielu innych gałęziach gospodarki. Photolo i in. [2021] skupili swoją uwagę na analizie *in silico* genomu endofitycznego szczepu *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, wyizolowanego z autochtonicznego gatunku drzewa *Combretum erythrophyllum*, będącego rośliną hiperakumulatorową. Analiza porównawcza genomu badanego szczepu z genomami różnych gatunków bakterii o potwierdzonych właściwościach stymulacji wzrostu roślin pozwoliła na identyfikację w genomie *M. radiotolerans* MAMP 4754 genów kodujących białka związane z odpornością na podwyższone stężenie metali ciężkich. Ich aktywność została potwierdzona w badaniach *in vitro*; badany szczep charakteryzował się znacząco wyższym poziomem tolerancji na zwiększone stężenie miedzi, cynku i niklu w porównaniu z innymi, jak dotąd scharakteryzowanymi szczepami *Methylobacterium*, co pozwala domniemywać o jego wyspecjalizowanej funkcji detoksykacji metali ciężkich w tkankach gospodarza roślinnego i wskazuje na wysoki potencjał szczepu *M. radiotolerans* MAMP 4754 w procesie bioremediacji oraz wspomagania fitoremediacji. Dodatkowo, analizy wykonane za pomocą technik chromatografii gazowej ujawniły zdolność szczepu do produkcji kilku lotnych związków organicznych, mających wpływ na stymulację wzrostu roślin, m.in. kwasu salicylowego, pełniącego funkcję cząsteczki sygnałowej w procesie uruchamiania w roślinach mechanizmów systemicznej odporności nabytej. Z kolei Grossi i in. [2020] ocenili zdolność pozyskanego z korzeni roślin ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) szczepu *Methylobacterium* sp.2A do promocji wzrostu i rozwoju roślin, uprawianych w warunkach stresu solnego. Bazując na dokonanych analizach genomowych i biochemicznych oraz przeprowadzonych doświadczeniach *in planta* wykazali, że rośliny traktowane (zaszczepione) zawieszoną badanego szczepu charakteryzowały się zwiększoną produkcją biomasy w stosunku do roślin kontrolnych (niezaszczepionych) oraz większym wigorem i mniejszą podatnością na skarłowacenia pędów i korzeni spowodowane zasoleniem podłoża. Ponadto

rośliny zaszczerpione badanym szczepem wykazywały zwiększoną odpornością na infekcję powodowaną przez polifagiczny patogen *Phytophthora infestans*. Li i in. [2020] w swoich badaniach nad możliwością biodegradacji toksycznego chizalofop-P-etylu (QPE), substancji czynnej herbicydu powszechnie stosowanego m.in. w Chinach, stwierdzili, że wyizolowany z gleby pustynnej szczep YC-XJ1, przyporządkowany następnie do gatunku *Methylobacterium populi*, charakteryzuje się zdolnością do degradowania QPE oraz innych związków należących do grupy aromatycznych estrów kwasu oksyfenoksypropionowego (również wykorzystywanych jako herbicydy). Było to pierwsze doniesienie o wytwarzaniu przez szczepy z rodzaju *Methylobacterium* esteraz umożliwiających rozkład chizalofop-P-etylu. Substancja ta była skutecznie degradowana przez *Methylobacterium populi* YC-XJ1 do prostszych związków, których dalsza degradacja może zachodzić przy współdziałaniu innych mikroorganizmów. Lemes Jorge i in. [2019] badali wpływ zwiększonego stężenia cytokinin w tkankach roślinnych na wzrost i rozwój soczewicy (*Lens culinaris* Medik.) narażonej na okresy suszy w trakcie wegetacji. Badane rośliny zostały zaszczerpione, poprzez inokulację nasion, zawiesiną szczepu *Methylobacterium oryzae* LMG23582, charakteryzującego się zdolnością do produkcji stosunkowo dużej ilości cytokinin (szczególnie zeatyn) oraz potwierdzoną *in vitro* odpornością na stres abiotyczny wywołany niedoborem wody. Kompleksowe pomiary parametrów biometrycznych (waga roślin, sumaryczna długość korzeni) oraz fizjologicznych (m.in. intensywność procesów fotosyntezy i transpiracji, ilość zużycia wody przez rośliny czy pomiar poziomu cytokinin w liściach) jednoznacznie wykazały zdolność promowania wzrostu soczewicy narażonej na suszę poprzez bakteryzację roślin szczepem *M. oryzae* LMG23582. Zastosowany w celu oceny produktywności roślin współczynnik plonowania (HI) przewyższał czterokrotnie współczynnik HI roślin kontrolnych (niezaszczerpionych), uprawianych w takich samych warunkach wzrostu.

Wśród aktualnych kierunków badań nie brakuje również doniesień o pozyskiwaniu nowych gatunków z rodzaju *Methylobacterium*, izolowanych ze stanowisk naturalnych i antropogenicznych, wykorzystywaniu szczepów z omawianego rodzaju w procesie bioremediacji, czy w ochronie ekosystemów wodnych [Srivastva i in. 2017, Park i in. 2018, Hong i in. 2019, Lu i in. 2019, Kim i in. 2020, Bijlani i in. 2021].

Biopreparaty jako sposób na wykorzystanie dobroczynnych właściwości bakterii z grupy PGPB

O ile w toku badań naukowych – prowadzonych *de facto* na niewielką skalę – bakteryzacja roślin i ich kolonizacja przez badany szczep odbywa się zazwyczaj w kontrolowanych warunkach i przebiega zgodnie z poczynionymi założeniami badawczymi, o tyle uzyskanie efektu promocji wzrostu i rozwoju roślin w warunkach polowych wymaga wykorzystania specjalnie zaprojektowanych nośników w formie preparatów biologicznych. W zależności od ich składu oraz przeznaczenia biopreparaty mogą przyjmować nazwę bionawozów, biopestycydów, czy preparatów mikrobiologicznych, jednak wspólnym mianownikiem wszystkich form tych preparatów jest wykorzystanie w procesie produkcyjnym żywych szczepów bakterii. Biopreparaty zawierają odpowiednio przygotowany do transportu i przechowywania wyselekcjonowany szczep (lub szczepy) o potwierdzonych właściwościach użytecznych w ochronie roślin lub produkty metabolizmu docelo-

wych mikroorganizmów; ponadto w składzie biopreparatów znajdują się dodatkowe substancje biologiczne, mające na celu zwiększenie możliwości przetrwania szczepów oraz ułatwienie procesu kolonizacji i rozwoju w nowym środowisku. Niestety, skuteczna introdukcja dobroczynnych szczepów do środowisk rolniczych wymaga opracowania odpowiedniego składu i formulacji preparatów biologicznych, co przysparza obecnie wiele trudności [Olanrewaju i in. 2017, Grzyb i in. 2019].

Podsumowanie

Analiza opracowań dotyczących właściwości szczepów z rodzaju *Methylobacterium* i ich wykorzystania w praktyce rolniczej dowodzi wielokierunkowości mechanizmów promowania wzrostu i rozwoju roślin wykorzystywanych przez omawiane mikroorganizmy oraz użyteczności wybranych szczepów jako czynników biologicznych w procesach biokontroli, bioremediacji oraz pośrednio – w procesie fitoremediacji. Wydaje się, że istotnym z punktu widzenia uprawy roślin zagadnieniem, jest skuteczna introdukcja wyselekcjonowanych szczepów do ekosystemów rolniczych, co wiąże się z koniecznością potwierdzenia ich dobroczynnych właściwości w warunkach polowych oraz opracowania metod efektywnego namnażania, transportu i przechowywania szczepów w postaci biopreparatów. Kluczem do głębszego zrozumienia biologii bakterii należących do rodzaju *Methylobacterium* będzie zastosowanie w badaniach nowoczesnych technologii i metod badawczych, co pozwoli na właściwe wykorzystanie potencjału tych mikroorganizmów w różnych dziedzinach gospodarki człowieka.

Bibliografia

- Abanda-Nkpawt D., Musch M., Tschiersch J., Boettner M., Schwab W., 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57(15), 4025–4032. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl173>.
- Bijlani S., Singh N.K., Eedara V.V.R., Podile A.R., Mason C. E., Wang C.C.C., Venkateswaran K., 2021. *Methylobacterium ajmalii* sp. nov., isolated from the International Space Station. *Front. Microbiol.* 12, 639396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.639396>
- Compant S., Clément C., Sessitsch A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem.* 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Dourado M.N., Neves A.A., Santos D.S., Araújo W.L., 2015. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International* 909016. <https://doi.org/10.1155/2015/909016>
- Glick B.R., 2020a. Introduction to plant growth-promoting bacteria. W: *Beneficial plant-bacterial interactions*, B.R. Glick. Springer, Cham, 1–37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9_1
- Glick B.R., 2020b. Issues regarding the use of PGPB. W: *Beneficial plant-bacterial interactions*, B.R. Glick. Springer, Cham, 361–383. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9_11
- Grossi C.E.M., Fantino E., Serral F., Zawoznik M.S., Fernandez Do Porto D.A., Ulloa R.M., 2020. *Methylobacterium* sp. 2A is a plant growth-promoting rhizobacteria that has the potential to improve potato crop yield under adverse conditions. *Front. Plant Sci.* 11(71), <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00071>

- Green P.N., 2015. *Methylobacterium*. W: Whitman, Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey, W.B. (red.), 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00830>
- Grzyb A., Waraczewska Z., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A., 2019. Czym są biopreparaty i jakie jest ich zastosowanie? *Nauka Przyr. Technol.* 13(2), 65–76. <http://dx.doi.org/10.17306/J.NPT.00275>
- Holland M., 1997. *Methylobacterium* and plants. *Rec. Res. Dev. Plant Physiol.* 1, 207–213.
- Hong P., Shu Y., Wu X., Wang C., Tian C., Wu H., Donde O.O., Xiao, B., 2019. Efficacy of zero nitrous oxide emitting aerobic denitrifying bacterium, *Methylobacterium gregans* DC-1 in nitrate removal with strong auto-aggregation property. *Bioresour. Technol.* 293, 122083. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122083>
- Jinal H.N., Amaresan N., Sankaranarayanan A., 2020. *Methylobacterium*. W: Beneficial Microbes in Agro-Ecology, N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, A. Sankaranarayanan (red.). Academic Press, 509–519. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00024-1>
- Kim J., Chhetri G., Kim I., Lee B., Jang W., Kim M.K., Seo T., 2020. *Methylobacterium terricola* sp. nov., a gamma radiation-resistant bacterium isolated from gamma ray-irradiated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70(4), 2449–2456. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004054>
- Lemes Jorge G., Kisiala A., Morrison E., Aoki M., Nogueira A.P.O., Neil Emery R., 2019. Endosymbiotic *Methylobacterium oryzae* mitigates the impact of limited water availability in lentil (*Lens culinaris* Medik.) by increasing plant cytokinin levels. *Environ. Exp. Bot.* 162, 525–540. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.028>
- Li X., Wang J., Wu W., Jia Y., Fan S., Hlaing T.S., Khokhar I., Yan Y., 2020. Co-metabolic biodegradation of quizalofop-p-ethyl by *Methylobacterium populi* YC-XJ1 and identification of QPEH1 esterase. *Electron. J. Biotechnol.* 46, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.05.003>
- Lu X., Wang W., Zhang L., Hu H., Xu P., Wei T., Tang H., 2019. Molecular mechanism of N,N-dimethylformamide degradation in a *Methylobacterium* sp. strain DM1. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, e00275-19. <https://doi.org/10.1128/aem.00275-19>
- Srivastva N., Vishwakarma P., Bhardwaj Y., Singh A., Manjunath K., Dubey S.K., 2017. Kinetic and molecular analyses reveal isoprene degradation potential of *Methylobacterium* sp. *Biore-sour. Technol.* 242, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.002>
- Olanrewaju O.S., Glick B.R., Babalola O.O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33(197). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Park C., Lee Y.S., Park S., Park W., 2018. *Methylobacterium currus* sp. nov., isolated from a car air conditioning system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(11), 3621–3626. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003045>
- Photolo M.M., Sitole L., Mavumengwana V., Tlou M.G., 2021. Genomic and physiological investigation of heavy metal resistance from plant endophytic *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, isolated from *Combretum erythrophyllum*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18(3), 997. <https://doi.org/10.3390/ijerph18030997>
- Vadivukkarasi P., Bhai R.S., 2020. Phyllosphere-associated *Methylobacterium*: a potential biostimulant for ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivation. *Arch. Microbiol.* 202, 369–375. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01753-6>
- Vadivukkarasi P., Jayashree S., Seshadri S., 2018. Occurrence and ecological significance of *Methylobacterium*. *Trop. Ecol.* 59(4), 575–587

Rizobiowe czynniki Nod i ich interakcje z roślinnymi mechanizmami obronnymi

The rhizobium Nod factors and their interactions with plant defense mechanisms

Heterogenna grupa bakterii glebowych z rodziny *Rhizobiaceae* charakteryzuje się zdolnością do przystosowania się do warunków środowiska, w którym występuje. Bakterie te posiadają również zdolność nawiązywania interakcji symbiotycznej z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*), w której powstają na korzeniach specyficzne struktury, tzw. brodawki korzeniowe. To właśnie brodawki korzeniowe stanowią środowisko, w którym rizobia redukują azot atmosferyczny w procesie biologicznego wiązania azotu (BNF, ang. *biological nitrogen fixation*). Proces ten zapewnia dodatkowe źródło przyswajalnych form tego pierwiastka dla roślinnego gospodarza oraz odgrywa kluczową rolę w rolnictwie, ze względu na fakt, że rośliny bobowate stanowią ważne źródło pożywienia dla ludzi i zwierząt [Wang i in. 2012, Stasiak i in. 2016].

Niezbędnym warunkiem prawidłowego przebiegu symbiozy jest wzajemne rozpoznanie się dwóch kompatybilnych partnerów: bakterii symbiotycznych (rizobiów) oraz gospodarza roślinnego (rośliny bobowate), które jest możliwe dzięki wymianie molekularnych cząstek sygnałnych. Najważniejsze cząstki sygnałne roślin to flawonoidy, natomiast bakterie glebowe produkują czynniki Nod (NF, ang. *Nod factors*) [Stasiak i in. 2016, Buhian i Bensmihen. 2018].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najważniejszych zagadnień dotyczących czynników Nod oraz informacji na temat mechanizmów obronnych roślin, ważnych z punktu widzenia procesu symbiozy.

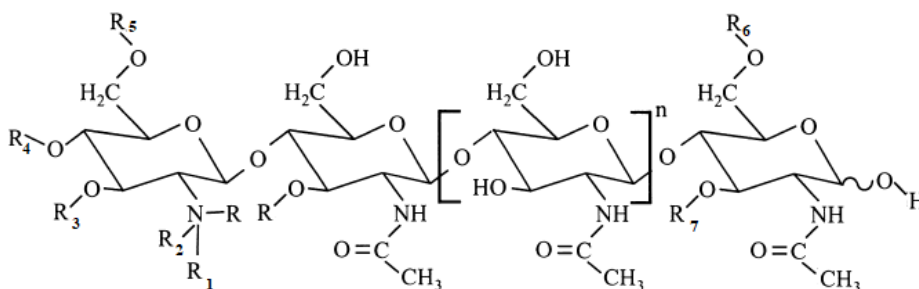
Czynniki Nod

Czynniki Nod to cząsteczki lipochitoooligosacharydów (LCO, ang. *lipochitooligosaccharides*) wytwarzane przez bakterie glebowe z rodziny *Rhizobiaceae*, które uwalniane są do ryzosfery [Cullimore i in. 2001, Haeze i Holsters 2002, Pudełko i in. 2017, Siczek i in. 2020]. W roztworze glebowym podlegają różnym procesom, tj. mikrobiologicznym, biochemicznym oraz chemicznym, które przyczyniają się do spadku ich aktywności i stężenia [Siczek i in. 2020]. NF jako sygnały molekularne odgrywają istotną rolę na wczesnych etapach interakcji symbiotycznej między roślinami bobowatymi (*Fabaceae*) a rizobiami [Pudełko i in. 2017, Siczek i in. 2020]. Czynniki te wpły-

¹ Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii, k.wlodarczyk06@gmail.com

wają na procesy zachodzące na korzeniach roślin bobowatych, inicjując rozwój wyspecjalizowanych organów roślinnych – brodawek korzeniowych oraz stymulują przebieg procesu wiązania azotu atmosferycznego przez bakteroidy [Kidaj i in. 2012, Pudełko i in. 2017, Siczek i in. 2020].

NF to amfifilowe cząsteczki zawierające hydrofobowe acylowe i hydrofilowe oligosacharydowe ugrupowania [Cullimore i in. 2001]. Cząsteczki NF zbudowane są ze szkieletu glikanowego złożonego z 2 do 6 reszt N-acetylo-D-glukozyminy połączonych wiązaniami β 1-4-glikozydowymi, które na nieredukujących końcach podstawione są N-acylowym kwasem tłuszczowym o różnej długości (16-18 atomów węgla) i o różnym stopniu nienasylenia [Cullimore i in. 2001, Janczarek i in. 2015] (ryc. 1). NF syntetyzowane przez różne szczepy, a także przez jeden szczep rizobium, mogą się różnić strukturalnie ze względu na różnice dotyczące m.in. liczby i typu substytucji, wariantów strukturalnych kwasów tłuszczowych przyłączonych do nieredukującego końca rdzenia LCO, jak również stopnia jego spolimeryzowania [Cullimore i in. 2001, Janczarek i in. 2015].

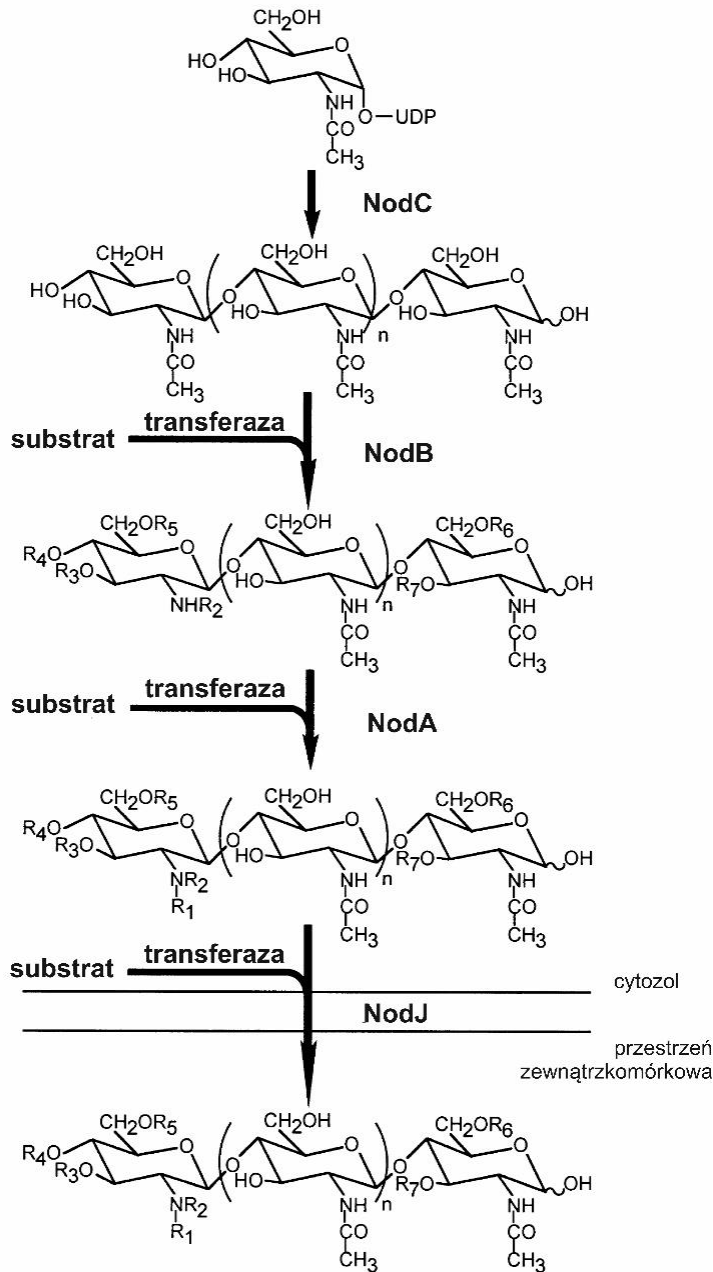


Ryc. 1. Strukturalna budowa NF. Objasnienia: R₁ – kwas tłuszczowy, R₂ – wodór lub grupa metylowa, R₃ – wodór lub grupa karbamoilowa, R₄ – wodór lub grupa karbamoilowa, R₅ – wodór, grupa karbamoilowa lub grupa acetylowa, R₆ – wodór, monosacharyd, grupa acetylowa lub grupa siarczanowa, R₇ – wodór lub monosacharyd, n – 3-6
Opracowanie na podstawie: Janczarek i in. 2015

Biosynteza czynników Nod

Geny odpowiedzialne za produkcję białek uczestniczących w biosyntezie NF występują w formie operonów zgrupowanych w dużym regionie zlokalizowanym na chromosomie w postaci wyspy symbiotycznej (ang. *symbiotic island*) lub na tzw. plazmidzie symbiotycznym (pSym, ang. *symbiotic plasmid*) [Wielbo i in. 2003, Janczarek i in. 2015]. Geny symbiotyczne można podzielić na trzy grupy:

- geny wspólne nodulacji (ang. *common nodulation genes*), zorganizowane w operon *nodABC*, występujące prawie u wszystkich rizobiów, odpowiedzialne za syntezę podstawowego szkieletu NF;
- geny specyficzności gospodarza (ang. *host specific nodulation genes*), które są odpowiedzialne za modyfikacje chemiczne rdzenia NF, w zależności od specyficzności gatunkowej;



Ryc. 2. Biosynteza czynników Nod. Produkty genów *nodA*, *nodB* i *nodC* uczestniczą w syntezie szkieletu głównego czynnika Nod. Modyfikacje struktury chemicznej NF warunkują swoistość zakażenia. W zależności od szczepu rizobium, szlak ten może ulegać przedłużeniu oraz modyfikacjom katalizowanym przez transferazy
 Opracowanie na podstawie: Mergaert i in. 1997

– geny regulatorowe (ang. *regulatory genes*), zaangażowane w regulację transkrypcji powyższych genów [Janczarek i in. 2015, Stasiak i in. 2016].

Produkty białkowe kodowane przez wspólne geny *nodABC* odgrywają kluczową rolę w biosyntezie podstawowej struktury NF – rdzenia LCO. Wystąpienie mutacji w obrębie tych genów *nodABC* prowadzi do ich inaktywacji, a w konsekwencji do zahamowania syntezy NF [Roche i in. 1994, Mergaert i in. 1997, Janczarek i in. 2015]. W pierwszym etapie biosyntezy cząsteczek NF produkt białkowy genu *nodC* – enzym N-acetyloglukozaminotransferaza, bierze udział w syntezie chitooligosacharydu, wykorzystując jako substrat UDP-N-acetyloglukozaminę. W następnym etapie dochodzi do deacetylacji nieredukującego końca LCO przy udziale produktu ekspresji genu *nodB*, enzymu N-deacetylazy. Powstający szkielet NF poddawany jest N-acetylowaniu w obecności enzymu N-acetylotransferazy (produkt ekspresji genu *nodA*). Modyfikacje występujące zarówno na redukującym, jak i nieredukującym końcu rdzenia LCO, charakteryzują się wysoką specyficznością gatunkową, zależną od genów kodujących enzymy transferazy, odpowiedzialne za podstawienia w rdzeniu [Mergaert i in. 1997] (ryc. 2).

W genomie bakterii glebowych zlokalizowane są również geny *nodIIJ*, których produkty ekspresji wykazują przynależność do rodziny transporterów ABC odpowiadających za transport nowo zsyntetyzowanych NF do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Mutacje w obrębie operonu *nodIIJ* nie powodują zahamowania procesu wydzielania cząstek NF, a jedynie obniżenie poziomu ich koncentracji, co może świadczyć o możliwości istnienia alternatywnego mechanizmu sekrecji czynników NF u rizobii [Mergaert i in. 1997].

Czynniki Nod a mechanizmy odporności roślin

Mikroorganizmy patogenne roślin zazwyczaj zasiedlają niszę zewnątrzkomórkową, dlatego rośliny wykształciły mechanizmy wykrywania obecności patogenów w tym środowisku. Są to takie mechanizmy, jak m.in. rozpoznawanie sygnałów molekularnych związanych z patogenami/mikroorganizmami (PAMP/MAMP, ang. *pathogen/microbes-associated molecular patterns*) czy wykrywanie wewnątrzkomórkowych cząstek wirulencji drobnoustrojów [Dodds i Rathjen 2010, Wang i in. 2012, Gourion i in. 2015]. Do chwili obecnej nie zidentyfikowano żadnych MAMP aktywowanych przez rizobia [Gourion i in. 2015], jednak reakcje obronne roślin zostają aktywowane po inokulacji rizobiami roślin bobowatych, a następnie są szybko tłumione [Dodds i in. 2010, Gourion i in. 2015].

Po syntezie i sekrecji NF inicjowany jest proces infekcji oraz powstawanie brodawek korzeniowych. Według badań przeprowadzonych przez Roux i in. [2014] aktywne przed infekcją geny *nod* pozostają dalej czynne w trakcie redukcji azotu atmosferycznego zachodzącego w brodawce *M. truncatula*. Dodatkowo, rizobia cechujące się nadekspresją cząstek NF, wydają się być bardziej konkurencyjne w procesie nodulacji. Obserwacje te sugerują, że NF uczestniczą zasadniczo w indukcji, jak i w procesach rozwojowych brodawek [Roux i in. 2014, Sugawara i Sadowsky. 2014, Gourion i in. 2015]. Jak sugerują badania Liang i in. [2013], cząsteczki NF przyczyniają się do zahamowania MTI (ang. *MAMP-triggered immunity*), niezależnie od szlaku symbiotycznego. Zaobserwowano to w przypadku mutantów *soi*, które zostały pozbawione zdolności do ekspresji receptorów

dla NF – NFR1 i NFR5. Supresję MTI poprzez NF potwierdziły badania przeprowadzone również na innych roślinach (pomidor, kukurydza) [Liang i in. 2014, Gourion i in. 2015], co sugeruje, że dla prawidłowego zajścia interakcji symbiotycznej konieczne jest stłumienie reakcji MTI, gdyż aktywność MAMP przyczynia się do zmniejszenia wrażliwości na cząstki NF syntetyzowane przez rizobia, a co za tym idzie, wpływa na przebieg procesu organogenezy brodawek korzeniowych [Gourion i in. 2015].

Inne badania wskazują, że nie wyłącznie same cząsteczki NF, ale również receptory je rozpoznające mogą brać udział w indukowaniu mechanizmów obronnych u roślin. W badaniach, które przeprowadzili Rey i in. [2013], mutant *M. truncatula* nfp (kodujący receptory dla NF) wykazywał zwiększoną podatność na zakażenie zarówno przez organizmy grzybopodobne, jak *Aphanomyces euteiches* (łęgnowce), jak również grzyby *Colletotrichum trifolii* odpowiedzialne za chorobę antraknozy lucerny [Gough i Jacquet 2013, Rey i in. 2013, Gourion i in. 2015]. Ekspresja aktywnych receptorów NF z *M. truncatula* lub *L. japonicus* w *Nicotiana benthamiana* wywołała śmierć komórek, co sugeruje, że silna ekspresja NFP w brodawkach *M. truncatula* powoduje uruchomienie reakcji obronnych gospodarza roślinnego [Madsen i in. 2010, Pietraszewska-Bogiel i in. 2013]. Chociaż aspekt ten wymaga dalszych badań, można przypuszczać, że zarówno cząsteczki NF, jak i elicytory chityny charakteryzują się podobieństwem strukturalnym i rozpoznawaniem przez kinazy podobne do receptorów lizynowych (LysM RLK) [Madsen i in. 2010, Pietraszewska-Bogiel i in. 2013, Moling i in. 2014, Gourion i in. 2015]. Zauważono, że już drobne zmiany w sekwencji aminokwasowej LysM RLK mogą nadawać specyficzność dla cząstek NF, jak również dla receptorów chityny MAMP. Silna ekspresja receptorów NF (NFR) w tytoniu wywoływała śmierć komórki, gdyż koreceptory chityny (CERK1) mogą również indukować śmierć komórki [Nakagawa i in. 2010, Gough i Jacquet 2013, Petutsching i in. 2014, Wang i in. 2014, Gourion i in. 2015]. Według Gourion i in. [2015] receptory dla NF, jak również dla chityny działają jako heterodimery. Potwierdzeniem tego są przeprowadzone na *M. truncatula*, gdzie NFP wchodzi w interakcję *in vivo* z receptorem Lyk3 LysM RLK, w brodawkach korzeniowych rośliny [Moling i in. 2014, Gourion i in. 2015]. Obecnie wiadomo, że receptory LCO oraz chityny to kompleksy wielobiałkowe, których poziom reakcji zależny jest od stężenia liganda, jak również od samego składu kompleksu receptorowego [Liang i in. 2014].

Jeśli roślina wytworzy odpowiedź obronną na symbiotyczne rizobia, to poprzez analogię do patogenów istnieje możliwość, że rizobia aktywnie stłumią tę reakcję. Supresja odpowiedzi immunologicznej rośliny, tj. wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) i akumulacji kwasu salicylowego (SA, ang. *salicylic acid*), została wykazana w korzeniach *M. truncatula* i *M. sativa* po ekspozycji NF. Dodatkowo, zaobserwowano obniżenie poziomu homologu PR2 (białko związane z patogenezą) u *M. truncatula* w odpowiedzi na inokulację *S. meliloti* w stosunku do kontroli [Mitra i Long 2004, Tóth i Stacey 2015]. Zastosowanie cząstek NF może wywołać supresję odpowiedzi nie tylko roślin bobowatych, ale również roślin nienależących do tej rodziny – np. w liściach *Arabidopsis* potraktowanych flg22 (fragmentem bakteryjnej flageliny rozpoznawanym przez MAMP) obserwuje się silną wrodzoną odpowiedź, która zostaje stłumiona przez dodanie NF [Liang i in. 2013]. Odkrycia te sugerują, że cząstki NF mogą odgrywać podwójną rolę w aktywnym indukowaniu rozwoju MTI, przy jednoczesnym aktywnym hamowaniu odporności roślin [Tóth i Stacey 2015].

Podsumowanie

Układ symbiotyczny między rizobium a roślinami bobowatymi jest niezwykle korzystny dla obu partnerów. Możliwość odgrywania podwójnej roli przez cząstki NF, czyli uczestnictwo w symbiozie i odporności roślin, rzuca nowe światło na rozwój procesu symbiotycznego, wskazując, że specyficzność i rozwój symbiozy zależą nie tylko od poprawnie odebranych sygnałów molekularnych przez obu partnerów układu, ale przede wszystkim od tłumienia lub omijania reakcji obronnych roślin. Jednakże osłabienie reakcji obronnych może stanowić przyczynę pojawiania się zakażeń gospodarza roślinnego patogenami chorobotwórczymi [Gough i Jacquet 2013, Gourion i in. 2015].

Bibliografia

- Buhian W.P., Bensmihen S., 2018. Mini-Review: Nod Factor Regulation of Phytohormone Signaling and Homeostasis During Rhizobia-Legume Symbiosis. *Front. Plant. Sci.* 9, article: 1247. <https://doi.org/10.3389/fpls/2018/01247>
- Cullimore J.V., Ranjeva R., Bono J.J., 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* 6(1), 24–30. [http://doi:10.1016/s1360-1385\(00\)01810-0](http://doi:10.1016/s1360-1385(00)01810-0)
- Dodds P.N., Rathjen J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Giraud E., Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M., Simon D., Cartieaus F., Prin Y., Bena G., Hannibal L., Fardoux J., Kojadinovic M., Vuillet L., Lajus A., Cruveiller S., Rouy Z., Mangenot S., Segurens B., Dossat C., Franck W.L., Chang W.S., Sunders E., Bruce D., Richardson P., Normand P., Dreyfus B., Pignol D., Stacey G., Emerich D., Verméglio A., Médigue C., Sadowsky M., 2007. Legumes Symbioses: Absence of *Nod* Genes in Photosynthesis Bradyrhizobia. *Science* 316(5829), 1307–1312. <https://doi.org/10.1126/science.1139548>
- Gough C., Jacquet C., 2013. Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions. *Trends Plant Sci.* 18(10), 566–574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.06.001>
- Gourion B., Berrabah F., Ratet P., Stacey G., 2015. Rhizobium – legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20(3), 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.008>
- Haeze W.D., Holsters M., 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12(6), 79–105. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.6.79r>
- Janczarek M., Rachwał K., Marzec A., Grządziel J., Palusińska-Szys M., 2015. Signal molecules and cel-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85, 94–113. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.010>
- Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A., 2012. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiol. Res.* 167(3), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.06.001>
- Liang Y., Cao Y., Tanak K., Thibivilliers S., Wan J., Choi J., Kang C.H., Stacey G., 2013. Nonlegumes Respond to Rhizobial Nod Factors by Suppressing the Innate Immune Response. *Science* 341(6152), 1384–1387. <https://doi.org/10.1126/science.1242736>
- Liang Y., Tóth K., Cao Y., Tanaka K., Espinoza C., Stacey G., 2014. Lipochitooligosaccharide recognition: an ancient story. *New Phytol.* 204(2), 289–296. <https://doi.org/10.1111/nph.12898>
- Madsen E.B., Antolín-Llovera M., Grossmann C., Ye J., Vieweg S., Broghammer A., Krusell L., Radutoiu S., Jensen O.N., Stosugaard J., Parniske M., 2010. Autophosphorylation is essential for the *in vivo* functional of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant J.* 65(3), 404–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04431.x>
- Mergaert P., Van Montagu M., Holsters M., 1997. MicroReview. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25(5), 811–817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1997.mmi526.x>

- Mitra R.M., Long S.R., 2004. Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol.* 134(2), 595–604. <https://doi.org/10.1104/pp.103.031518>
- Moling S., Pietraszewska-Bogiel A., Postma M., Fedorova E., Hink M.A., Limprens E., Gadella T.W.J., Bisseling T., 2014. Nod Factors Receptors Form Heteromeric Complexes and Are Essential for Intracellular Infection in *Medicago* Nodules. *Plant Cell* 26, 4188–4199. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129502>
- Nakagawa T., Kaku H., Shimoda Y., Sugiyama A., Shimamura M., Takanashi K., Yazaki K., Aoki T., Shibuya N., Kouchi H., 2010. From defense to symbiosis: limited alterations in the kinase domain of LysM receptor-like kinases are crucial for evolution of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant J.* 65(2), 169–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2010.04411.x>
- Petutsching E.K., Stolze M., Lipka U., Kopischke M., Horlacher J., Valerius O., Rozhon W., Gust A.A., Poppenberger B., Braus G.H., Nürnberger T., Lipka V., 2014. A novel Arabidopsis Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing. *New Phytol.* 204(4), 955–967. <https://doi.org/10.1111/nph.12920>
- Pietraszewska-Bogiel A., Lefebvre B., Koini M.A., Klaus-Heisen D., Takken F.L.W., Geurts R., Cullimore J.V., Gadella T.W.J., 2013. Interaction of *Medicago truncatula* Lysin motif Receptor-Like Kinases, NFP and LYK3, Produced in *Nicotiana benthamiana* Induces Defence-Like Responses. *PLoS ONE* 8(6), e65055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065055>
- Pudełko K., Narożna D., Króliczak J., Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A., Mądrzak C., 2017. Czynniki Nod Jako Potencjalne Stymulacyjny Procesu Brodawkowania Łubinu. *Zesz. Nauk. UP Wroc., Rol.* CXXIII 626, 115–132.
- Rey T., Nars A., Bonhomme M., Bottin A., Huguet S., Balzergue S., Jardinaud m.F., Bono J.J., Cullimore J., Dumas B., Gough C., Jacquet C., 2013. NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. *New Phytol.* 198(3), 875–886. <https://doi.org/10.1111/nph.12198>
- Roche P., Maillet F., Plazanet C., Debelle F., Ferro M., Truchet G., Prome J.C., Dénarié J., 1996. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(26), 15305–15310. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15305>
- Roux B., Rodde N., Jardinaud M.F., Timmers T., Sauviac L., Cottret L., Carrère S., Sallet E., Courcelle E., Moreau S., Debelle F., Capela D., de Carvalho-Niebel F., Gouzy J., Bruand C., Gamas P., 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant J.* 77(6), 817–837. <https://doi.org/10.1111/tpj.12442>
- Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A., 2016. Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Post. Mikrobiol.* 55(3), 289–299.
- Siczek A., Kalembsa S., Kalembsa D., Becher M., Symanowicz B., 2020. Influence of Nod factors on the quantity and distribution in faba bean of symbiotically fixed nitrogen as determined by the ¹⁵N isotope dilution method. *Crop Sci.* 60(5), 2720–2731. <https://doi.org/10.1002/csc2.20252>
- Sugawara M., Sadowsky M.J., 2014. Enhanced nodulation and nodule development by *nolR* mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific *Medicago* host genotypes. *Mol. Plant Microb. Interact.* 27(4), 328–335. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0312-R>
- Tóth K., Stacey G., 2015. Does plant immunity play a critical role during initiation of the legume-rhizobium symbiosis? *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00401>. PMID: 26082790, PMCID: PMC4451252
- Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H., 2012. Symbiosis specificity in legume-rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* 14(3), 334–342. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01736.x>
- Wang W., Xie Z.P., Staehelin C., 2014. Functional analysis of chimeric lysin motif domain receptors mediating Nod factor-induced defense signaling in *Arabidopsis thaliana* and chitin-induced nodulation signaling in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 78(1), 56–69. <https://doi.org/10.1111/tpj.12450>
- Wielbo J., Skorupska A., 2003. Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowe. *Post. Mikrobiol.* 42(3), 263–283.