

Załącznik nr. 1 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie Nauk Rolniczych w dyscyplinie Agronomia

Autoreferat

Dr inż. Adam Kuzdraliński

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

Lublin 2019

1. Dane personalne

Imię i Nazwisko: Adam Kuzdraliński

Data urodzenia: 02.02.1982

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu

Doktor nauk rolniczych, w zakresie technologia żywności i żywienia - mikrobiologia żywności (09.2011); Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

Tytuł rozprawy doktorskiej: Grzyby i tworzone przez nie mikotoksyny w owsie ekologicznym i jego produktach.

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Solarska.

Magister inżynier biotechnologii (06.2006), Wydział: Nauk o Żywności i Biotechnologii, Akademia Rolnicza w Lublinie.

Tytuł pracy magisterskiej: Wykorzystanie RT-PCR do analizy transkryptów w liniach izogenicznych pszenicy zwyczajnej 'Bezostaja' Rht 12.

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Kowalczyk.

3. Doświadczenie zawodowe

3.1. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

01.10.2012 – obecnie

Stanowisko: **adiunkt**

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia
Człowieka,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

01.10.2011 – 30.09.2012

Stanowisko: **asystent**

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia
Człowieka,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

3.2. Pozostała aktywność zawodowa

2015-2018	Pomysłodawca, założyciel , Prezes Zarządu w Nexbio sp. z o.o. Przedmiot działalności: fitopatologia molekularna
2015 – 2016	Współpomysłodawca, założyciel , Prezes Zarządu w VitaGenum sp. z o.o. Przedmiot działalności: genetyka człowieka
2013 – 2015	Pomysłodawca, założyciel , Wiceprezes Zarządu w spółce technologicznej VitaGenum, dyrektor ds. technologii i wdrożeń Przedmiot działalności: genetyka człowieka

3.3. Współpraca z przemysłem

2017-2018	Współpraca z Agrosimex Sp. z o.o. w zakresie detekcji i genotypowania wybranych patogenów roślin występujących na jabłoniach. Podmiot współpracujący: NEXBIO sp. z o.o.
2017-2018	Współpraca z Agroinwestycja Sp. z o.o. w zakresie detekcji wybranych patogenów roślin występujących na roślinach zbożowych. Podmiot współpracujący: NEXBIO sp. z o.o.
2017-2018	Współpraca z Bayer CropScience w zakresie detekcji i genotypowania wybranych patogenów roślin. Podmiot współpracujący: NEXBIO Sp. z o.o.
2015-2018	Współpraca z Sumi Agro Poland w zakresie detekcji i genotypowania wybranych patogenów roślin. Podmiot współpracujący: NEXBIO Sp. z o.o.
2015 – 2016	Współpraca z Euroimmun Polska Sp. z o.o. w zakresie podwykonawstwa badań wybranych markerów genetycznych człowieka.

Podmiot współpracujący: VitaGenum Sp. z o.o.

2007 – 2012

Współpraca z **Bayer CropScience, Syngenta, Sumi Agro Poland, Dow Agro Science** i in. producentami środków ochrony roślin poprzez udział w badaniach rejestracyjnych środków ochrony roślin kierowanych przez prof. dr hab. Ewę Solarską.

Podmiot współpracujący: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595 ze zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Cykl 6 publikacji pod wspólnym tytułem:

Identyfikacja specyficznych markerów DNA przydatnych do detekcji wybranych patogenów grzybowych pszenicy zwyczajnej i możliwości ich praktycznego wykorzystania w hodowli i uprawie tego zboża.

- 4.2. Autor/autorzy publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa (podano IF oraz punkty MNiSW z roku opublikowania pracy, w przypadku prac opublikowanych w latach 2013-2018 roku podano punkty MNiSW wskazane w komunikacie <https://www.gov.pl/web/nauka/wykaz-czasopism-naukowych-zawierajacy-historie-czasopisma-z-publikowanych-wykazow-za-lata-2013-2016>)

O1. Kuzdraliński A., Szczerba H., Kot A., Ostrowska A., Nowak M., Muszyńska M. (2018). Development and application of a new PCR method for detection of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28, 137–146.

IF_{5-letni}: 1,718; MNiSW: 25.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji przeprowadzenia badań, zebraniu literatury, zaprojektowaniu metod molekularnych, nadzorowaniu wykonania doświadczeń, analizie i opracowaniu części wyników, dyskusji wyników,

napisaniu znaczącej części manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O2. Kuzdraliński A., Nowak M., Szczerba H., Dudziak K., Muszyńska M., Leśniowska-Nowak, J. (2017). The composition of *Fusarium* species in wheat husks and grains in south-eastern Poland. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(7), 1530-1536.

IF₂₀₁₇: 1,042; MNiSW: 25.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji przeprowadzenia badań, zebraniu literatury, nadzorowaniu wykonania doświadczeń, analizie i opracowaniu statystycznym wyników, dyskusji wyników, napisaniu znaczącej części manuskryptu, utworzeniu grafik ilustrujących uzyskane wyniki, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O3. Kuzdraliński, A., Kot A., Szczerba H., Ostrowska A., Nowak M., Muszyńska M., Lechowski M., Muzyka P. (2017). Novel PCR assays for the detection of biological agents responsible for wheat rust diseases: *Puccinia triticina* and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 299-305.

IF₂₀₁₇: 1,462; MNiSW: 25.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji przeprowadzenia badań, zebraniu literatury, zaprojektowaniu metod molekularnych, nadzorowaniu wykonania doświadczeń, analizie i opracowaniu części wyników, dyskusji wyników, napisaniu znaczącej części manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O4. Kuzdraliński A., Kot A., Szczerba H., Nowak M., Muszyńska M. (2017). A Review of conventional PCR assays for the detection of selected phytopathogens of wheat. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 175-189.

IF₂₀₁₇:1,462; MNiSW: 25.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji pracy, zebraniu literatury, analizie i opracowaniu części materiałów, napisaniu znaczącej części manuskryptu, opracowaniu rysunków i schematów, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

O5. Kuzdraliński A., Szczerba H., Tofil K., Filipiak A., Garbarczyk E., Dziadko P., Muszyńska M., Solarska E., 2015. Early PCR detection of the *Mycosphaerella*

graminicola in the leaves of winter wheat in Poland. Romanian Agricultural Research 32(32).

IF₂₀₁₅: 0,272; MNiSW: 15.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji przeprowadzenia badań, zebraniu literatury, nadzorowaniu wykonania doświadczeń, analizie i opracowaniu części uzyskanych wyników, dyskusji wyników, napisaniu części manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

O6. Kuzdraliński A., Szczerba H., Tofil k., Filipiak A., Garbarczyk E., Dziadko P., Muszyńska M., Solarska E. 2014. Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. European Journal of Plant Pathology, 140(3), 491-502,

IF₂₀₁₄: 1,49; MNiSW: 30.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji przeprowadzenia badań, zebraniu literatury, nadzorowaniu wykonania doświadczeń, analizie i opracowaniu części uzyskanych wyników, dyskusji wyników, napisaniu części manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

Kopie prac naukowych stanowiących główne osiągnięcie naukowe wraz z oświadczeniami współautorów określających ich indywidualny wkład w powstanie każdej publikacji, stanowią załącznik nr 5.

4.3. Omówienia celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Od 2011 roku realizuję prace badawcze dotyczące detekcji i genotypowania patogenów pszenicy zwyczajnej w próbkach środowiskowych.

Uzyskane rezultaty opublikowałem w postaci cyklu prac (**O1 – O6**), które uważam za swoje największe osiągnięcie w dotychczasowej działalności naukowej i przedkładałem jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

4.3.1. Wprowadzenie

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) to jedno z najczęściej uprawianych zbóż w Polsce i na świecie. Gatunek ten, ze względu na duże znaczenie gospodarcze, stanowi przedmiot wielu badań naukowych. Prowadzone prace badawcze oraz aplikacyjne mają na celu przede wszystkim poprawę parametrów jakościowych oraz ilościowych plonu ziarna pszenicy. W tym celu dokonuje się m.in. analiz genomu, transkryptomu, proteomu i metabolomu pszenicy, usprawnia agrotechnikę, uzyskuje odmiany o nowych cechach oraz rozwija środki ochrony chemicznej i biologicznej przed agrofagami (Balafoutis i in. 2017; International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2014; Kosova i in. 2016; Schonhofen i in. 2016; Balafoutis i in. 2017).

Straty powodowane przez patogeny grzybowe zboz stanowią obecnie jeden z największych problemów w produkcji roslinnej. Duże nasilenie chorób grzybowych może być przyczyną znacącego ograniczenia plonowania pszenicy (Vergara-Diaz i in. 2015). Nie bez znaczenia są również zmiany klimatu, które mogą prowadzić do wzrostu zagrożenia wybranymi chorobami oraz mają wplyw na biologię agrofagów (Juroszek, i von Tiedemann 2013).

Choroby grzybowe atakują wszystkie organy pszenicy zwyczajnej. Występowanie grzybów na podstawach łodyg może przyczyniać się do bielienia roslin, prowadząc nawet do niewyksztalania się ziarniaków. Choroby obecne na liściach powodują zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej niezbędnéj dla procesu fotosyntezy. Patogeny występujące na kłosach pszenicy zwyczajnej powodują spadek jakości ziarniaków, są również przyczyną zanieczyszczenia miktotoksynami. Biologiczne i chemiczne właściwości miktotoksyn, a przede wszystkim ich toksycznoc są bardzo zróżnicowane. Wiele z tych związków posiada właściwości teratogenne, kancerogenne, estrogenne oraz immunosupresyjne dla zwierząt i czlowieka (Smiley 2009; De Ruyck i in. 2015).

Klasyczne metody identyfikacji mikroorganizmów są pracochłonne, czasochłonne oraz wymagają posiadania doświadczenia umozliwiającego rozpoznawanie cech morfologicznych charakterystycznych dla poszczególnych gatunków oraz rodzajów grzybów. Identyfikacja gatunków grzybów patogennych dla pszenicy przeprowadzana jest w czystych kulturach, bezpośrednio z zainfekowanego materiału roslinnego z uwzględnieniem cech mikro- i makromorfologicznych lub w warunkach polowych poprzez obserwację charakterystycznych dla poszczególnych gatunków grzybów objawów chorobowych. Jednakże grzyby występujące na pszenicy zwyczajnej charakteryzują się ogromną zmiennością cech morfologicznych. Trudności w ich identyfikacji wynikają przede wszystkim z niewielkich różnic makroskopowych i mikroskopowych pomiędzy poszczególnymi gatunkami (McCartney i in. 2003).

Najczulszą stosowaną obecnie metodą umożliwiającą detekcję występujących na pszenicy zwyczajnej patogenów grzybowych jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) z zastosowaniem specyficznych gatunkowo oligonukleotydów (starterów). Możliwe jest również zastosowanie PCR do określania przynależności gatunkowej mikroorganizmów z zastosowaniem oligonukleotydów umożliwiających amplifikację rejonów genomu ITS lub genów kodujących RNA podjednostek rybosomalnych, których sekwencja DNA jest gatunkowo specyficzna. Jednakże konieczne w tym przypadku zastosowanie metody sekwencjonowania DNA powoduje, że analiza jest bardziej skomplikowana, mniej opłacalna ekonomicznie i wymaga uzyskania czystej kolonii patogenu, umożliwiającej z kolei uzyskanie jednorodnego ampliconu PCR. Zastosowanie metody PCR umożliwiającej amplifikowanie odcinków DNA z wykorzystaniem oligonukleotydów hybrydujących do specyficznych gatunkowo fragmentów genomu jest obecnie najszybszą techniką molekularną umożliwiającą identyfikację gatunków mikroorganizmów występujących w badanym materiale (Chen i in. 2015; Covarelli i in. 2015).

PCR jest szybką i wysoce specyficzną metodą o czułości pozwalającej na wykrycie pojedynczych cząsteczek DNA. Technika ta jest obecnie alternatywą wobec konwencjonalnych, mikrobiologicznych metod oznaczania grzybów. Gatunkowo-specyficzne startery umożliwiające wykrywanie patogenów pszenicy zwyczajnej są tematem wielu opracowań naukowych (Chen i in. 2015; Covarelli i in. 2015). Okazuje się jednak, że często wykazują one zmienną specyficzność i zdarza się, że pomimo obecności DNA patogenu nie uzyskuje się ampliconu lub uzyskuje się amplifikację w obecności DNA innego gatunku mikroorganizmu. Niejednokrotnie, podobnie jak w przypadku *Zymoseptoria tritici*, grzyba powodującego septoriozę paskowaną liści, po kilkunastu latach powszechnego korzystania z opublikowanej i znanej metody, zaprojektowane startery okazują się powielać również DNA innych gatunków grzybów lub nie pozwalają na identyfikację izolatu oznaczonego już do gatunku z wykorzystaniem innej metody (Guo et al. 2006). Yli-Mattila i in. (2006) uzyskali niespecyficzną amplifikację ze starterami zaprojektowanymi dla ilościowego oznaczania obecności DNA *Fusarium avenaceum*. Amplicony stwierdzano w obecności m.in. DNA *Fusarium arthrospoides*. Yli-Mattila i in. (2011) opisują również uzyskiwanie niespecyficzných wyników dla wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* dla oligonukleotydów opracowanych przez innych autorów z użyciem szczepów pochodzących wyłącznie z Europy. Autorzy wskazują niepełną walidację jako przyczynę nieprawidłowego działania metody.

W chwili obecnej do identyfikacji kilku najbardziej istotnych patogenów grzybowych pszenicy zwyczajnej opracowano metody molekularne charakteryzujące się

zmienną specyficznością i czułością (Moradi i in. 2010). Zwykle analizy przydatności zaprojektowanych oligonukleotydów prowadzone są na kilku lub kilkudziesięciu szczepach gatunku dla którego projektowana jest metoda oraz kilkudziesięciu szczepach innych, często podobnych morfologicznie gatunków (Wang i in. 2008). Wielu autorów w niedostatecznym stopniu wykorzystuje narzędzia bioinformatyczne i genetyczne zasoby bazy danych NCBI GenBank (Faria i in. 2011). Ponadto zdarza się, że zaprojektowane oligonukleotydy są testowane na nielicznych próbach środowiskowych. Co więcej, uzyskiwane amplikony powinny być sekwencjonowane w celu porównania ich z sekwencją gatunku badanego. Amplikony uzyskane na próbkach środowiskowych, których sekwencja nie była oznaczana, mogą pochodzić z powielania DNA innego gatunku mikroorganizmu posiadającego dany fragment genomu o sekwencji zbliżonej w miejscu hybrydyzacji oligonukleotydów do sekwencji gatunku badanego. Jest to szczególnie ważne dla tych fragmentów genomu, które reprezentują geny homologiczne, których obecność stwierdzana jest u wielu gatunków mikroorganizmów, a nawet w genomie badanej rośliny. Należy przypuszczać, iż jest to jedna z przyczyn niedoskonałości wielu dostępnych metod molekularnych (Guo i in. 2006).

4.3.2. Cel naukowy oraz omówienie wyników badań

Głównym celem osiągnięcia będącego podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.) jest identyfikacja markerów DNA umożliwiających detekcję kluczowych patogenów pszenicy zwyczajnej oraz ich praktyczne wykorzystanie w hodowli i uprawie tego zboża.

Szczegółowe cele pracy:

1. Identyfikacja nowych, specyficznych gatunkowo markerów DNA przydatnych do detekcji wybranych patogenów pszenicy.
2. Wykorzystanie markerów DNA w detekcji patogenów obecnych w próbach środowiskowych.
3. Przegląd, porównanie i ocena opisanych w literaturze naukowej markerów DNA służących detekcji patogenów pszenicy za pomocą technik analizy DNA.

Ad. 1.

W literaturze naukowej znanych jest kilkadziesiąt metod molekularnych dedykowanych detekcji wybranych patogenów pszenicy zwyczajnej. Wiele z nich zaprojektowanych zostało kilka lub kilkanaście lat temu i nawet pobieżna analiza z użyciem dostępnych dzisiaj algorytmów bioinformatycznych (np. Primer BLAST, BLASTn) wykazuje istnienie różnic pomiędzy zaprojektowanymi oligonukleotydami, a sekwencjami nukleotydowymi dla wybranego gatunku zdeponowanymi w bazach danych. Takie rozbieżności mogą prowadzić do obniżenia czułości testu oraz powodować pojawianie się wyników fałszywie negatywnych. Ponadto większość z dostępnych metod walidowanych było na niewielkiej liczbie prób środowiskowych. Niepełna walidacja może z kolei prowadzić do pojawiania się wyników fałszywie pozytywnych, będących skutkiem hybrydyzacji oligonukleotydów do DNA innych mikroorganizmów obecnych w próbkach.

Prace **O1**, **O3** stanowią wkład w rozwijanie diagnostyki molekularnej w oparciu o konwencjonalny PCR celem wykrywania patogenów pszenicy. Zaprojektowane metody to narzędzia umożliwiające szybką detekcję nawet niewielkiej ilości materiału genetycznego wybranych patogenów pszenicy. Testy molekularne zaprojektowane zostały z użyciem dostępnych baz danych sekwencji nukleotydowych oraz poddane walidacji na licznych próbach środowiskowych.

W pracy **O1** przedstawiono trzy pary oligonukleotydów umożliwiające wykrywanie DNA *B. graminis* f. sp. *tritici*. Uzasadnieniem dla zaprojektowania oligonukleotydów było istnienie obecnie jedynie dwóch metod molekularnych umożliwiających wykrywanie *B. graminis* f. sp. *tritici* za pomocą konwencjonalnego PCR lub jego modyfikacji (Zeng i in., 2010). Metody przedstawione w pracy **O1** zaprojektowane zostały z użyciem całych zasobów genetycznych dostępnych dla *B. graminis* f. sp. *tritici*, a walidacja odbyła się na kilkadziesiąciu próbach środowiskowych, na których wizualnie potwierdzono obecność tego patogenu oraz próbach gdzie obecność ta nie była stwierdzana. Zaprojektowane metody zostały przetestowane również pod kątem czułości oligonukleotydów oraz zdolności do przeprowadzania reakcji w triplex-PCR. Metody te zostały porównane do uprzednio dostępnej w literaturze metodyki nested PCR (Zeng i in., 2010).

Spośród kilkadziesiąciu par zaprojektowanych oligonukleotydów, po weryfikacji z użyciem oprogramowania bioinformatycznego, wstępnej weryfikacji na ograniczonej liczbie prób środowiskowych zawierających DNA patogenu oraz rozszerzonej walidacji z użyciem 67 prób zebranych w całej Polsce zdecydowano się na opublikowanie trzech par oligonukleotydów hybrydujących w obrębie genomu *B. graminis* f. sp. *tritici* do genów kodujących beta-tubulinę oraz 14-alfa-demetylazę. Oligonukleotydy zaprojektowane i zwalidowane przez autorów pracy **O1** okazały się wykrywać obecność

DNA patogenu we wszystkich analizowanych próbach środowiskowych, podobnie jak metoda nested PCR zaproponowana przez Zeng i in. (2010). Przewagą oligonukleotydów opublikowanych w pracy **O1** jest jednak krótsza procedura uzyskania wyniku (jednoetapowy PCR) przy porównywalnej czułości osiągającej 1 fg. Ponadto oligonukleotydy te okazały się zdolne do prowadzenia reakcji w układzie triplex-PCR, co może w przyszłości zapobiegać uzyskiwaniu wyników fałszywie negatywnych, w przypadku zaistnienia zmienności genetycznej w obszarach hybrydyzacji niektórych starterów. W pracy przedstawiono również analizę bioinformatyczną oligonukleotydów zaproponowanych przez Zeng i in. (2010), która wykazała istnienie zmienności wskazującej na możliwość niewykrycia obecności *B. graminis* f. sp. *tritici* w badanych próbach. Tego rodzaju zmienność nie została stwierdzona dla oligonukleotydów zaprojektowanych i zwalidowanych przez autorów publikacji **O1**.

Oligonukleotydy opisane w pracy **O1** posiadają potencjał aplikacyjny, w związku z czym zostały opatentowane w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej (załącznik 4, pozycja **II.B.1.**, **II.B.2.**, **II.B.3.**, **II.B.4.**, **II.B.5.**, **II.B.6.**, **II.B.7.**, **II.B.8.**, **II.B.9.**). Spis oligonukleotydów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Oligonukleotydy służące detekcji *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (publikacja **O1**).

Nazwa startera	Gen	Sekwencja oligonukleotydu (5'-3')	Długość amplikonu (pz)
LidBg13 LidBg14	<i>TUB2</i>	CGAGGTATCCGCAAYCATCA GACGAGAACAGCACGAGGAA	183
LidBg17 LidBg18	<i>CYP51</i>	AGCCACCGATCGTGTTCATT AGACAGGAGTCGTTAAGACTGAAT	288
LidBg21 LidBg22	<i>CYP51</i>	AATTCGGCTTTAGCATTGCGTT TTCGTGTTCCCCAGAATATATCA	232

Praca **O3** opisuje projektowanie oraz walidację metod umożliwiających detekcję materiału genetycznego patogenów powodujących rdze na pszenicy tj. *Puccinia triticina* oraz *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Obecnie znane są pary oligonukleotydów umożliwiających detekcję patogenów z rodzaju *Puccinia*, jednakże posiadają pewne ograniczenia. W przypadku *Puccinia triticina* znane są zaledwie 2 metody, z których ostatnia projektowana była w 2007 roku. Od tamtego czasu liczba sekwencji nukleotydowych zdeponowana w bazach danych dotyczących tego patogenu znacząco się powiększyła. Fraaije (2001) opisuje walidację metody w oparciu o zaledwie dwa izolaty *P. triticina*. Z kolei, Cao i in. (2007) nie walidowali uzyskanych oligonukleotydów na próbach środowiskowych. Znacząco więcej metod opublikowano dla *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, ale wiele z nich posiada podobne ograniczenia.

W pracy **O3** opisano proces projektowania starterów umożliwiających detekcję obu gatunków patogenów. W pierwszym etapie zaprojektowano kilkadziesiąt oligonukleotydów *in silico* z użyciem narzędzi bioinformatycznych. W wyniku selekcji bioinformatycznej oraz wstępnych testów weryfikacyjnych na materiale środowiskowym zawierającym DNA obu gatunków grzybów do dalszych testów wybrano po 3 pary oligonukleotydów. Łącznie testowano oligonukleotydy na 100 próbach środowiskowych zebranych w Polsce w sezonie wegetacyjnym 2014/15, 45 zawierających DNA *P. striiformis* f. sp. *tritici* oraz 55 zawierających DNA *P. triticina*. Oligonukleotydy testowane były również na próbach nie wykazujących objawów chorób pszenicy powodowanych przez oba patogeny. 5 spośród 6 par oligonukleotydów wykazało się 100% specyficznością. Jedynie z parą LidPr11/12 nie uzyskano amplifikacji we wszystkich próbach i poziom detekcji wyniósł 94,5%. W pracy testowano również warianty multiplex PCR celem uzyskania metody umożliwiającej detekcję obu gatunków w jednej próbce. W wyniku przeprowadzonych analiz obiecujące wyniki uzyskano dla pary LidPs9/10 (detekcja *P. striiformis* f. sp. *tritici*) oraz LidPr1/2 (detekcja *P. triticina*). Zastosowanie tych par oligonukleotydów umożliwiło wykrywanie jednocześnie obu patogenów, nie zaobserwowano niepożądanych produktów drugorzędowych tworzonych przez startery. W pracy **O3** przeprowadzono również analizę filogenetyczną dla wybranych odcinków DNA uzyskanych z zaprojektowanymi oligonukleotydami. Porównano je również z sekwencjami DNA zdeponowanymi w bazie NCBI GenBank. W wyniku tej analizy dowiedziono niewielką zmienność genetyczną w obrębie analizowanych sekwencji DNA, co z kolei może stanowić ważną informację na temat pochodzenia tych grzybów oraz ich biologii.

Oligonukleotydy opisane w pracy **O3** posiadają potencjał aplikacyjny, w związku z czym zostały złożone wnioski patentowe w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej. Spis oligonukleotydów przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Oligonukleotydy służące detekcji *Puccinia triticina* oraz *Puccinia striiformis f. sp. tritici* (publikacja O3).

Nazwa startera	Sekwencja DNA (5'–3')	Gen	Długość amplikonu (pz)
<i>P. triticina</i>			
LidPr1	CCGTCGTTGAGCCCTACAAT	<i>beta-tubulin 1</i>	144
LidPr2	TAAGGTCACCGTAGGTGGGT		
LidPr11	GACAACGAAGCCCTCTACGA	<i>beta-tubulin 1</i>	553
LidPr12	GGTGCGATGTCACAATGAGC		
LidPr15	ACGAAGCCCTCTACGACATC	<i>beta-tubulin 1</i>	302
LidPr16	GTCTGAGGCAGCCATCATGT		
<i>P. striiformis f. sp. tritici</i>			
LidPs9	TCGGTAAACTGCACCAATACCT	<i>RNA pol II second</i>	240
LidPs10	TCCAACAGTCCCCTTCTGT	<i>largest subunit</i>	
LidPs11	TTACGACATCTGCTTCCGCA	<i>beta-tubulin 1</i>	255
LisPs12	TGCGATGTCAACTCTGGGAC		
LidPs13	TACGACATCTGCTTCCGCAC	<i>beta-tubulin 1</i>	231
LidPs14	GATTGCCCGGTATTGTTGGC		

Ad. 2.

Fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni to jedna z najbardziej rozpowszechnionych chorób pszenicy zwyczajnej. Powodujące ją grzyby z rodzaju *Fusarium* zimują najczęściej na resztkach poźniwnych oraz w glebie. W przypadku wystąpienia choroby o silnym nasileniu obserwowane jest nawet zamieranie całych roślin. Wielu autorów uważa, że istotnymi czynnikami mającymi wpływ na rozwój fuzaryjnej zgorzeli podstawy źdźbła i korzeni są agrotechnika, płodozmian oraz środki ochrony roślin (Wiese i in. 1987; Cromey i in. 2006). Badania przeprowadzone na terenie Polski przez innych autorów wykazały, że najważniejszym czynnikiem mającym wpływ na wystąpienie tej choroby pszenicy jest pogoda, w mniejszym stopniu płodozmian i obecność chwastów (Jaczevska-Kalicka 2001; Korbas 2004; Narkiewicz-Jodko et al. 2005).

W pracy O6 przeprowadzono z użyciem metody PCR analizę obecności DNA *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* oraz *F. sporotrichioides* na podstawach pędów uzyskanych z próbek pszenicy zwyczajnej pozyskanych z terenu Polski w 2012 roku. Wyniki te analizowano statystycznie w zestawieniu z danymi geograficznymi, przedplonem, datą siewu oraz poziomem nawożenia azotem [kg/ha]. Reakcje PCR przeprowadzono z użyciem znanych metod dostępnych w literaturze naukowej

opracowanych przez Nicholson i in. (1998), Parry i Nicholson (1996) oraz Kulik i in. (2004).

W wyniku przeprowadzonych analiz na terenie Polski stwierdzono obecność wszystkich czterech gatunków *Fusarium*. Gatunek *F. graminearum* wykrywany był w 64,29% próbek. Obecność pozostałych gatunków stwierdzano w znacząco mniejszej liczbie lokalizacji tj. 15,71% - *F. culmorum*, 15,71% - *F. poae* oraz 5,71% - *F. sporotrichioides*. *F. graminearum* najczęściej wykrywano w próbkach z południowo-zachodniej Polski (72,73%). Największą liczbę gatunków *Fusarium* spośród analizowanych wykrywano w próbkach z Polski wschodniej, gdzie w co drugiej próbce znajdowały się minimum 2 gatunki. Najwięcej próbek, w których nie znaleziono żadnego z analizowanych gatunków stwierdzono w Polsce centralnej. Przeprowadzone analizy pozwoliły wykazać przydatność metody detekcji patogenów w próbkach środowiskowych niezależnie od zróżnicowania poziomu agrotechniki. Uzyskane wyniki identyfikacji patogenów z wykorzystaniem markerów DNA zestawiono z wybranymi zabiegami agrotechnicznymi. Dla analizowanych prób stwierdzono istnienie korelacji dodatniej pomiędzy *F. graminearum* i *F. culmorum*, jak również pomiędzy *F. poae* oraz *F. sporotrichioides* (Tab. 3). Wykazano częstsze występowanie *Fusarium* na badanych próbkach pszenicy, jeśli przedplonem była kukurydza. Zależność ta dotyczyła przede wszystkim *F. graminearum* oraz *F. culmorum*. Obecność gatunków *F. graminearum* i *F. culmorum* wzrastała wraz z późniejszą datą siewu, podczas gdy obecność *F. poae* oraz *F. sporotrichioides* była większa w próbkach, w których siew przeprowadzono wcześniej. Zauważalny był również wpływ użycia herbicydów na jesieni na występowanie *Fusarium*. Liczba prób, w których nie wykryto żadnego z analizowanych gatunków była o 100% wyższa w lokalizacjach, gdzie przeprowadzono zabieg herbicydowy. Nawożenie azotem nie miało statystycznie istotnego wpływu na liczbę stwierdzanych gatunków *Fusarium* w analizowanych próbkach.

Tabela 3. Współczynniki korelacji Pearsona pomiędzy występowaniem analizowanych gatunków *Fusarium* na podstawach pędów pszenicy w Polsce w 2012 roku (publikacja O6).

Gatunki <i>Fusarium</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	<i>F. poae</i>
<i>F. graminearum</i>	-	0.324*	ns**	ns
<i>F. culmorum</i>	0.324*	-	ns	ns
<i>F. sporotrichioides</i>	ns	ns	-	0.26*
<i>F. poae</i>	ns	ns	0.26*	-

* - korelacja jest istotna na poziomie $P < 0.05$

** - nieistotne statystycznie

Praca **O6** pozwoliła na analizę czynników mających wpływ na występowanie poszczególnych gatunków *Fusarium* na podstawach pędów pszenicy zwyczajnej. Użycie metody PCR umożliwiło precyzyjne określenie obecności DNA wybranych gatunków *Fusarium*. Wykryte interakcje oraz użycie szybkich testów PCR komentowane jest przez innych badaczy (Balmas i in. 2015; Santos i in. 2015; Lamichhane i in 2015). Praca stała się również źródłem dla opracowań o charakterze praktycznym skierowanych do rolników (Sawinska i in. 2017).

Zymoseptoria tritici to patogen pszenicy zwyczajnej powodujący septoriozę paskowaną liści. Choroba ta uznawana jest za najważniejszą chorobę liści pszenicy (Bearchell i in. 2005). Straty plonu powodowane przez septoriozę liści sięgają 30-40% (King i in. 1983; Eyal i in. 1987).

W pracy **O5** wykorzystano metodę PCR do detekcji obecności DNA patogenu *Z. tritici* w 160 próbach pszenicy ozimej zebranych na wiosnę oraz na jesieni 2012 roku w Polsce. Analiza przeprowadzona została na roślinach w fazie rozwojowej BBCH 13-14 (jesień) oraz BBCH 29 (wiosna). Na tym etapie rozwoju roślin stwierdzanie obecności patogenu jest najczęściej możliwe wyłącznie z użyciem metod molekularnych. W pracy **O5** użyto oligonukleotydy zaprojektowane i walidowane przez Consolo i in. (2009), które wykazywały się wysoką czułością i specyficznością. Czułość tej metody wynika przede wszystkim z komplementarności oligonukleotydów do wielokopijnego regionu ITS. Praca miała na celu analizę istnienia interakcji pomiędzy obecnością patogenu na liściach, a takimi czynnikami jak pora roku, odmiana, miejsce pobrania próby, data siewu oraz przedplon.

Badania wykazały, że dwukrotnie częściej wykrywano obecność DNA *Z. tritici* na wiosnę w porównaniu z jesienią. Największą liczbę próbek zawierających DNA patogenu stwierdzano w Polsce wschodniej oraz północno-zachodniej. Badania te nie wykazały istnienia korelacji pomiędzy odmianą pszenicy, a obecnością DNA *Z. tritici* na liściach. Analiza przedplonu pozwoliła stwierdzić, że częściej wykrywano obecność patogenu w pszenicy po rzepaku ozimym i pszenicy w porównaniu z kukurydzą. W pracy **O5** wykazano również, że późniejszy termin siewu miał wpływ na obniżenie liczby detekcji DNA *Z. tritici* w analizowanych próbach.

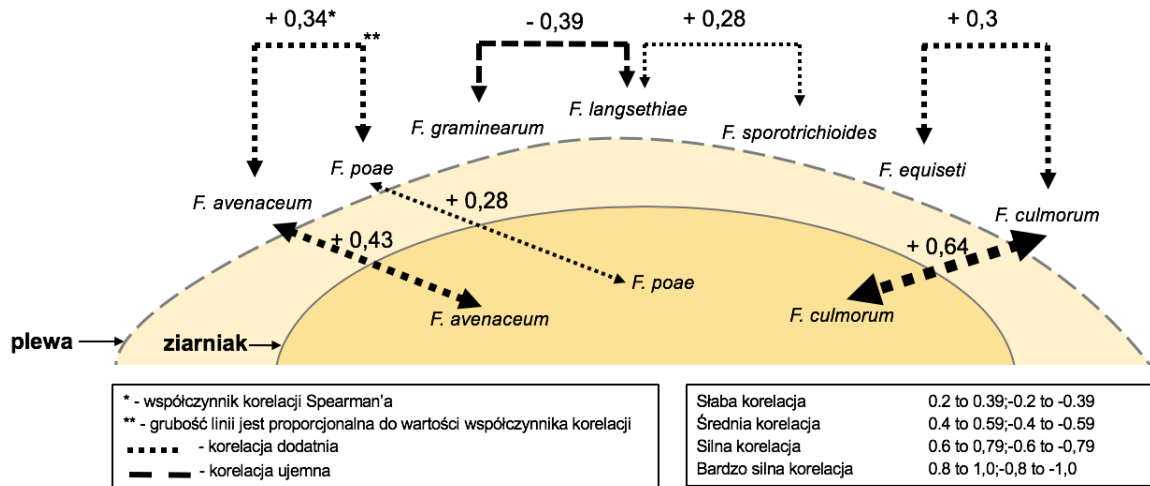
Praca **O5** pozwoliła na określenie interakcji pomiędzy obecnością *Z. tritici* na liściach pszenicy a wybranymi czynnikami co stanowi cenne źródło informacji dla praktyki.

Grzyby z rodzaju *Fusarium* stanowią znaczący problem w uprawie pszenicy. Jedną z najważniejszych chorób powodowanych przez tą grupę patogenów jest fuzarioza kłosów pszenicy, która może mieć wpływ na parametry jakościowe ziarna. Jednym z najważniejszych czynników pogarszających jakość ziarna jest zdolność *Fusarium* sp. do produkcji mikotoksyn. Związki te oddziałują na zdrowie człowieka oraz zwierząt (Smiley

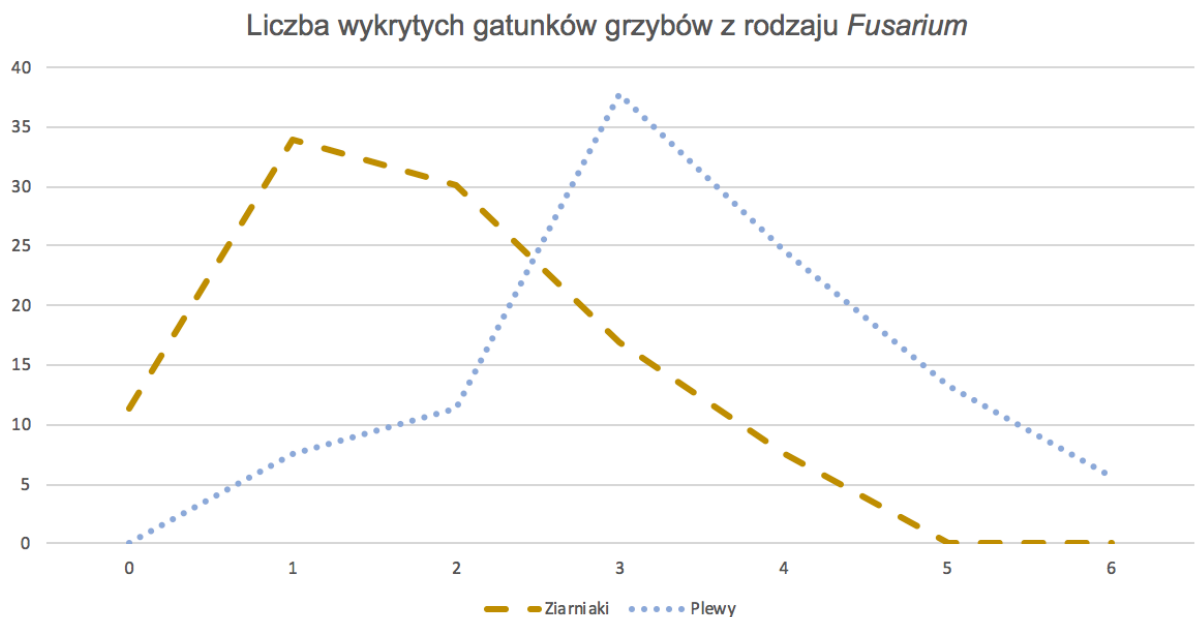
2009; De Ruyck i in. 2015). Z tego też powodu dąży się do ograniczania obecności grzybów z rodzaju *Fusarium* na kłosach (Wegulo i in. 2015).

W przeprowadzonych badaniach opublikowanych w ramach pracy **O2** analizowano obecność szerokiego spektrum gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. avenaceum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. pseudograminearum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. venenatum*, *F. subglutinans*, *F. langsethiae*) oddzielnie na ziarniakach oraz plewach okrywających ziarniaki pszenicy. Do badań wybrano próby zebrane z jednego regionu Polski tj. południowo-wschodniej celem ograniczenia wpływu warunków klimatycznych na wyniki. Kłosa zebrano w sezonie 2012/13. Celem badań było określenie składu gatunkowego *Fusarium* na kłosach pszenicy oraz analiza populacji tych grzybów oddzielnie na ziarniakach i plewach.

Badania wykazały znaczące różnice pomiędzy populacjami grzybów z rodzaju *Fusarium* zasiedlającymi ziarniaki i plewy. Plewy okazały się być barierą, która ograniczała występowanie mikroorganizmów na ziarniakach na poziomie od 29 do 100%. Gatunki *F. cerealis*, *F. langsethiae* oraz *F. verticillioides* wystąpiły jedynie na plewach. Ponadto, jeśli stwierdzano obecność danego gatunku na plewach w mniej niż 12% prób, jego obecność nie była wykrywana na plewach. Przeprowadzone analizy statystyczne pozwoliły również na znalezienie korelacji pomiędzy poszczególnymi gatunkami *Fusarium* analizowanymi oddzielnie w obrębie ziarniaka, plewy, jak również z uwzględnieniem wszystkich danych. Wszystkie stwierdzone korelacje międzygatunkowe wykazano pomiędzy gatunkami *Fusarium* występującymi na plewach oraz pomiędzy tymi samymi gatunkami występującymi i na plewach i na powierzchni ziarniaka. Znamienny jest fakt, że nie stwierdzono korelacji w obrębie gatunków *Fusarium* występujących na ziarniakach. Większość korelacji miała charakter dodatni. Istnienie korelacji międzygatunkowych wykazano dla *F. avenaceum* i *F. poae* (współczynnik korelacji +0,34), *F. graminearum* i *F. langsethiae* (współczynnik korelacji -0,39), *F. langsethiae* i *F. sporotrichioides* (współczynnik korelacji +0,28), *F. equiseti* i *F. culmorum* (współczynnik korelacji +0,3) (Rys. 1). Wyniki te mogą wskazywać na istnienie synergii pomiędzy wybranymi gatunkami grzybów. Rolę plew okrywających ziarniaki jako bariery dla grzybów z rodzaju *Fusarium* najlepiej obrazuje analiza stwierdzanej liczby gatunków. W 62,2% próbek plew stwierdzano obecność 3-4 gatunków *Fusarium*, podczas gdy w większości prób ziarniaków (64,2%) stwierdzano obecność 1-2 gatunków analizowanych grzybów (Rys. 2). W 10% ziarniaków nie wykazano obecności żadnego gatunku *Fusarium*, w przypadku plew nie stwierdzono próbek, w których nie występuje minimum 1 gatunek spośród analizowanych.



Rysunek 1. Interakcje pomiędzy badanymi gatunkami grzybów z rodzaju *Fusarium* stwierdzone na próbach kłosów pszenicy zwyczajnej zebranych w Polsce południowo-wschodniej w sezonie 2012/13 (publikacja O2).



Rysunek 2. Liczba gatunków *Fusarium* wykryta na ziarniakach oraz plewach prób kłosów pszenicy zwyczajnej zebranych w Polsce południowo-wschodniej w sezonie 2012/13 (publikacja O2).

Badania opublikowane w pracy O2 wykazały rolę plewy jako czynnika mogącego ograniczać występowanie *Fusarium* na ziarniakach. Badania te wykazały również jak istotna może być analiza populacji *Fusarium* na plewach celem określania presji ze strony tych patogenów. Ze względu na liczbę analizowanych za pomocą reakcji PCR gatunków *Fusarium* praca ukazuje również przekrój przez populację tych grzybów

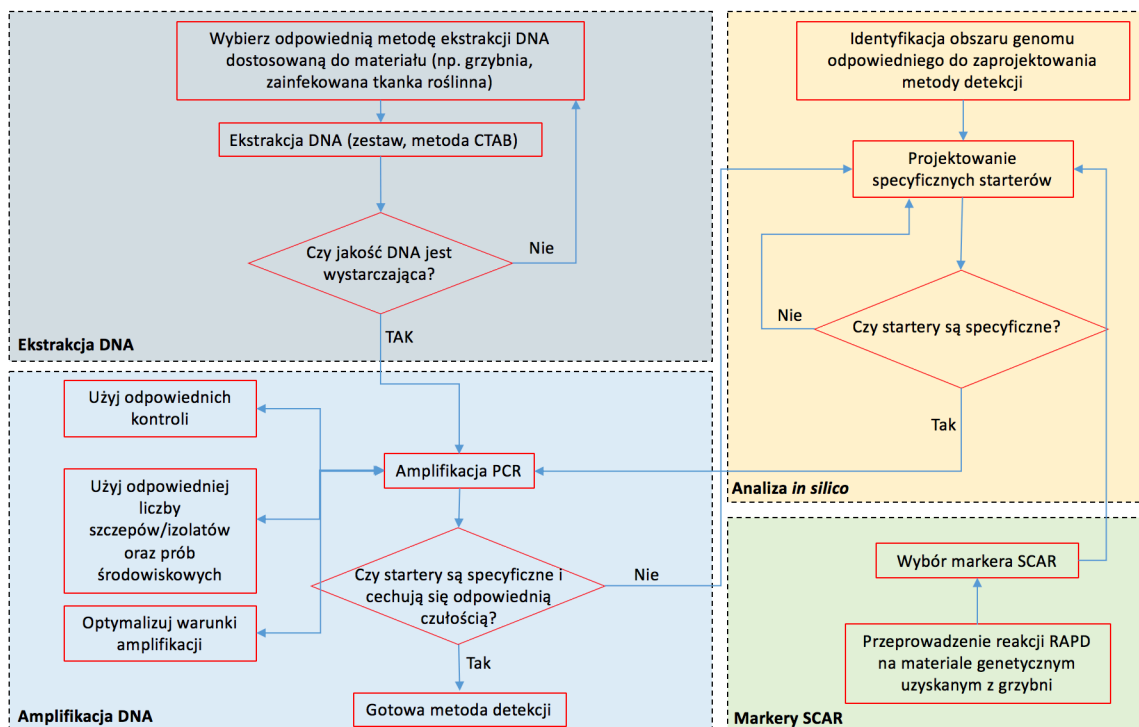
występujących na pszenicy zwyczajnej w sezonie 2012/13 w Polsce. Z tego też powodu, dla innych badaczy, stanowi źródło cennych informacji na temat struktury populacji *Fusarium* na kłosach pszenicy zwyczajnej [Bankina i in. 2017; Biliska i in. 2018; Ropelewska i Zapotoczny 2018].

Ad. 3.

Znanych jest 50 agrofagów, które uznawane są za najbardziej istotne w uprawie pszenicy zwyczajnej [Weiss, 1987]. Od lat 80-tych, kiedy metoda PCR została opracowana, zaprojektowano wiele oligonukleotydów umożliwiających detekcję patogenów pszenicy. Metoda ta umożliwia wykrycie obecności agrofaga nawet w fazie latentnej, kiedy to objawy choroby nie są na roślinie widoczne [Fones i Gurr, 2015].

Praca przeglądowa **O4** miała na celu zebranie wszystkich znanych oligonukleotydów umożliwiających detekcję patogenów grzybowych fylosfery pszenicy zwyczajnej z wykorzystaniem klasycznej reakcji PCR. Ważnym uzasadnieniem dla przygotowania pracy był brak do tej pory tego rodzaju opracowania w literaturze naukowej. Ponadto, celem pracy było przedstawienie procesu projektowania metod molekularnych, głównie w oparciu o doświadczenie autorów.

W pracy przedstawiono proces projektowania nowych metod molekularnych, który powinien być poprzedzony dogłębną analizą dostępnych zasobów genetycznych (Rys. 3). Wiele z dotychczas zaprojektowanych metod molekularnych celuje w obszary kodujące rRNA oraz przylegające do nich regiony ITS i ETS. Znane są również metody funkcjonujące w oparciu o geny metabolizmu wtórnego, dla rozwijania których uzasadnieniem jest unikalność genów, często charakterystycznych jedynie dla poszczególnych rodzajów grzybów jak np. geny kodujące enzymy biosyntezy trichotecenów u *Fusarium* sp. W pracy wskazano, że walidacja zaprojektowanej metody powinna odbywać się w oparciu o jak największą liczbę dostępnych szczepów lub izolatów wybranego gatunku patogenu oraz próby środowiskowe gdzie obecność patogenu stwierdzona jest minimum na podstawie obserwacji wizualnej. Nie mniej istotne jest testowanie metod na materiale środowiskowym, na którym nie stwierdzono obecności patogenu celem wykluczenia reakcji krzyżowych z DNA innych mikroorganizmów.



Rysunek 3. Schemat przedstawiający proces projektowania oligonukleotydów umożliwiających detekcję mikroorganizmów (publikacja **O4**).

W pracy **O4** przedstawiono wybrane patogeny fyloosfery pszenicy zwyczajnej, opisując powodowane przez nie straty ekonomiczne oraz wybrane informacje dotyczące biologii. Znamiennym jest, że kilkadziesiąt lat temu, niektóre ze znanych obecnie patogenów grzybowych pszenicy, nie miały takiego znaczenia jak obecnie lub nie występowały na pszenicy. Przykładem jest septorioza paskowana liści pszenicy powodowana przez *Z. tritici*, która stała się najgroźniejszą chorobą pszenicy w latach 70-tych XX wieku. Wcześniej patogenem grzybowym o największym znaczeniu w uprawie pszenicy była dziś rzadko stwierdzana *Parastagonospora nodorum* (kiedyś *Septoria nodorum*) (Shaw i in., 2008). Podobnie gatunek *Pyrenophora tritici-repentis*, który to patogen do lat 70-tych XX wieku nie występował na pszenicy zwyczajnej. Obecnie, głównie z powodu rozprzestrzeniania się agresywnych ras tego grzyba posiadających geny kodujące fitotoksyny *ToxA*, *ToxB* oraz *ToxC*, staje się on jednym z najgroźniejszych w uprawie pszenicy (Strelkov i Lamari, 2003).

W pracy **O4** przedstawiono obszary genomu grzybów, które są najczęściej wykorzystywane w celu identyfikacji markerów DNA służących detekcji patogenów pszenicy. Wskazano również najczęściej publikowane geny i fragmenty genomów w bazie danych NCBI Genbank.

Najważniejszym podrozdziałem opisywanej pracy jest opis metod molekularnych opublikowanych w literaturze. W pracy zestawiono metody umożliwiające detekcję materiału genetycznego: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F.*

sporotrichioides, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Puccinia triticina* (syn. *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*), *Zymoseptoria tritici*, *Paragonospora nodorum*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Pyrenophora tritici-repentis*. W pracy starano się przedstawić wszystkie znane do tej pory metody zaprojektowane dla wykrywania wymienionych patogenów z użyciem konwencjonalnego PCR. Opisano również sposoby ich walidacji oraz wybrane szczegóły techniczne pozwalające czytelnikom na wykorzystanie wymienionych metod we własnych badaniach. W pracy **O4** przedstawiono również przyszłe trendy, jakie zarysowują się w rozwoju fitopatologii molekularnej.

Praca przeglądowa **O4** stanowi istotne podsumowanie dotyczące detekcji patogenów pszenicy z użyciem konwencjonalnego PCR. Od momentu opublikowania praca stale znajduje się w Top5 najczęściej czytanych w kolejnych miesiącach prac czasopisma *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*.

W trakcie realizacji badań opisanych w pracach **O1-O6** uzyskiwano z wykorzystaniem oligonukleotydów literaturowych oraz autorskich amplikony DNA pochodzące z genomów wybranych grzybów. W wyniku oceny jakości uzyskiwanych sekwencji DNA podejmowano decyzje o ich publikacji w postaci rekordów bazy danych NCBI GenBank.

Dzięki temu liczba sekwencji nukleotydowych opublikowanych w bazach danych dla wybranych mikroorganizmów została znacząco wzbogacona. Liczba opublikowanych rekordów zawierających sekwencję DNA dla wybranych gatunków mikroorganizmów:

Fusarium poae (148),
Blumeria graminis f. sp. *tritici* (33),
Puccinia triticina (26),
Fusarium sp. (25),
Puccinia striiformis f. sp. *tritici* (22),
Epicoccum nigrum (17),
Fusarium sporotrichioides (16),
Fusarium avenaceum (10),
Fusarium culmorum (4),
Fusarium graminearum (3),
Fusarium equiseti (2),
Fusarium oxysporum (2),
Alternaria sp. (2).

Podsumowanie

Technologia PCR została opracowana w latach 80-tych XX wieku. Od tamtego czasu dokonał się ogromny postęp w dziedzinie analiz DNA, mimo to PCR wciąż pozostaje podstawowym narzędziem diagnostycznym w szczególności tam, gdzie ilość materiału nie pozwala na detekcję z użyciem innych technik lub brak innych możliwości identyfikacji grzybów. W porównaniu z innymi metodami identyfikacji, PCR posiada szereg zalet, do których należą szybkość wykonania oznaczenia, czułość metody pozwalająca na wykrywanie śladowych ilości materiału genetycznego oraz wysoka specyficzność (Bartlett i Stirling, 2003).

Potencjał reakcji PCR do wykrywania patogenów w materiale roślinnym został dostrzeżony zaledwie kilka lat po opracowaniu tej technologii w firmie Cetus. Schesser i in. (1991) jako jedni z pierwszych opracowali oligonukleotydy do detekcji jednego z patogenów pszenicy tj. *Gaeumannomyces graminis*, sprawcy zgorzeli podstawy źdźbła zbóż i traw. Zalety techniki PCR w diagnostyce patogenów roślin opisali w pracy Henson i French (1993). Wskazali tam zastosowania diagnostyki molekularnej PCR w badaniach podstawowych oraz aplikacyjnych w aspekcie szybkiej detekcji patogenów, poznawania ich biologii, zróżnicowania oraz badania interakcji host-patogen. Wraz z rozwojem techniki PCR pojawiały się kolejne modyfikacje tej metody. Ich autorzy podkreślali możliwość dokładniejszej oceny ryzyka w obrębie gospodarstwa rolnego, a nawet możliwość zwiększania efektywności stosowania zabiegów fungicydowych dzięki ocenie obecności patogenów w warunkach polowych (Fraaije i in., 1999). Do podobnych wniosków doszedł McCartney i in. (2003), który stwierdził, że wyniki uzyskane dzięki technice PCR mogą być wykorzystane do kontrolowania patogenów roślin, powodując podejmowanie racjonalnych decyzji dotyczących doboru i użycia fungicydów. Ten sam autor zauważył, iż pomimo, że molekularne metody stosowane są do diagnostyki mikroorganizmów powodujących choroby człowieka, nie stosuje się ich rutynowo do oceny obecności patogenów roślin. Wydaje się zatem wysoce uzasadniona potrzeba rozwijania testów molekularnych w tym kierunku.

Przedstawiony jako Osiągnięcie cykl prac stanowi kompilację zagadnień związanych z wykorzystaniem oraz rozwijaniem metody PCR celem detekcji patogenów pszenicy zwyczajnej. Podjęcie zaprezentowanej tematyki badawczej wynika z zapotrzebowania na rozwijanie technologii zmierzających do precyzyjnego zarządzania ryzykiem w gospodarstwie rolnym oraz poznawania biologii kluczowych patogenów pszenicy.

W pracach **O1**, **O3** przedstawiono nowe testy genetyczne umożliwiające, w oparciu o wybrane markery DNA, detekcję obecności wybranych patogenów pszenicy. Testy zaprojektowano z użyciem wszystkich dostępnych zasobów genetycznych, walidowane

były również na licznych próbach środowiskowych. Ze względu na potencjał aplikacyjny testów zdecydowano na ochronę opracowanych oligonukleotydów i przygotowano zgłoszenia patentowe do UPRP dla wszystkich 9 testów. Do tej pory uzyskano patenty dla testów umożliwiających detekcję DNA *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia recondita* oraz *Puccinia striiformis* (załącznik 4, pozycja **II.B.1.**, **II.B.2.**, **II.B.3.**, **II.B.4.**, **II.B.5.**, **II.B.6.**, **II.B.7.**, **II.B.8.**, **II.B.9.**).

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać przydatność analizy DNA do detekcji patogenów w próbach środowiskowych pochodzących z lokalizacji o zróżnicowanej agrotechnice (praca **O2**, **O5**, **O6**).

Praca przeglądowa **O4** opisuje metodykę projektowania i walidacji testów molekularnych oraz przedstawia aktualnie opublikowane oligonukleotydy umożliwiające detekcję najważniejszych patogenów grzybowych pszenicy zwyczajnej. Praca stanowi kompendium wiedzy dla badaczy, którzy chcą posługiwać się dostępnymi w literaturze metodami lub planują opracowanie nowych testów.

Prace **O1**, **O3**, **O4** zrealizowane zostały w ramach pozyskanego w 2014 roku projektu Lider V o nr. LIDER/014/263/L-5/13/NCBR/2014 pt. „Opracowanie nowych molekularnych testów diagnostycznych umożliwiających identyfikację kluczowych patogenów grzybowych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) do zastosowań w ukierunkowanej ochronie roślin” finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Wnioski

Badania podjęte w publikacjach stanowiących Osiągnięcie naukowe pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Zaprojektowane, w oparciu o specyficzne gatunkowo markery DNA, nowe testy PCR do detekcji DNA *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* okazały się bardziej specyficzne i szybsze od testów dostępnych w literaturze oraz przydatne do detekcji DNA patogenu.
2. Zaprojektowane, w oparciu o specyficzne gatunkowo markery DNA, nowe testy PCR do detekcji DNA *Puccinia triticina* oraz *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* okazały się przydatne w kierunku detekcji DNA obu patogenów w warunkach polowych.
3. Analizy obecności gatunkowo specyficznych markerów DNA w próbkach środowiskowych mogą stanowić źródło informacji na temat korelacji międzygatunkowych występujących w obrębie agrocenozy.
4. Wyniki wskazujące na funkcje barierowe plewy pszenicy zwyczajnej w stosunku do grzybów z rodzaju *Fusarium* mogą wskazywać na celowość uprawy odmian bardziej

oplewionych pszenicy w rejonach występowanie silnej presji ze strony tych patogenów.

5. Analiza dostępnych w literaturze naukowej testów DNA wskazuje na potrzebę projektowania i walidacji nowych markerów DNA służących detekcji patogenów grzybowych roślin.

Literatura:

1. Balafoutis, A. T., Beck, B., Fountas, S., Tsiropoulos, Z., Vangeyte, J., van der Wal, T., ... & Pedersen, S. M. (2017). Smart Farming Technologies—Description, Taxonomy and Economic Impact. In *Precision Agriculture: Technology and Economic Perspectives*(pp. 21-77). Springer, Cham.
2. Balmas, V., Scherm, B., Marcello, A., Beyer, M., Hoffmann, L., Migheli, Q., & Pasquali, M. (2015). *Fusarium* species and chemotypes associated with fusarium head blight and fusarium root rot on wheat in Sardinia. *Plant pathology*, 64(4), 972-979.
3. Bankina, B., Bimšteine, G., Neusa-Luca, I., Roga, A., & Fridmanis, D. (2017). What influences the composition of fungi in wheat grains?. *Acta Agrobotanica*, 70(4).
4. Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols* (pp. 3-6). Humana Press.
5. Bilska, K., Jurczak, S., Kulik, T., Ropelewska, E., Olszewski, J., Żelechowski, M., & Zapotoczny, P. (2018). Species composition and trichothecene genotype profiling of *Fusarium* field isolates recovered from wheat in Poland. *Toxins*, 10(8), 325.
6. Cao, L., Xu, S., Chen, W., Liu, T., & Lin, R. (2007). Molecular diagnosis and detection of *Puccinia triticina* in China.
7. Chen, S., Cao, Y. Y., Li, T. Y., & Wu, X. X. (2015). Simultaneous detection of three wheat pathogenic fungal species by multiplex PCR. *Phytoparasitica*, 43(4), 449-460.
8. Consolo, V. F., Albani, C. M., Berón, C. M., Salerno, G. L., & Cordo, C. A. (2009). A conventional PCR technique to detect *Septoria tritici* in wheat seeds. *Australasian Plant Pathology*, 38(3), 222-227.
9. Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Juan, C., ... & Mañes, J. (2015). *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 540-551.
10. Crome, M. G., Parkes, R. A., & Fraser, P. M. (2006). Factors associated with stem base and root diseases of New Zealand wheat and barley crops. *Australasian Plant Pathology*, 35, 391–400.
11. De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., & De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766, 32-41.
12. Faria, C. B., Abe, C. A. L., Silva, C. N. D., Tessmann, D. J., & Barbosa-Tessmann, I. P. (2011). New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 115-132.
13. Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3-7.
14. Fraaije, B. A., Lovell, D. J., Coelho, J. M., Baldwin, S., & Hollomon, D. W. (2001). PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 107(9), 905-917.

15. Fraaije, B. A., Lovell, D. J., Rohel, E. A., & Hollomon, D. W. (1999). Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of applied Microbiology*, 86(4), 701-708.
16. Guo J.R., Schneider F., Verreet J.A., 2006. Presymptomatic and quantitative detection of *Mycosphaerella graminicola* development in wheat using a real-time PCR assay. *FEMS Microbiology Letters* 262(2): 223–229.
17. Henson, J. M., & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual review of phytopathology*, 31(1), 81-109.
18. International Wheat Genome Sequencing Consortium. (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194), 1251788.
19. Jaczewska-Kalicka, A. (2001). Występowanie chorób i straty plonu pszenicy ozimej, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu warunków klimatycznych. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 41(2), 607–616.
20. Juroszek, P., & von Tiedemann, A. (2013). Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review. *European Journal of Plant Pathology*, 136(1), 21-33.
21. Korbas, M. (2004). Choroby podstawy żdźbła, możliwości i perspektywy zwalczania. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 44(1), 147–154.
22. Kosová, K., Urban, M. O., Vítámvás, P., & Prášil, I. T. (2016). Drought stress response in common wheat, durum wheat, and barley: transcriptomics, proteomics, metabolomics, physiology, and breeding for an enhanced drought tolerance. In *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2* (pp. 277-314). Springer, Cham.
23. Kulik, T., Fordoński, G., Pszczółkowska, A., Płodzień, K., & Łapiński, M. (2004). Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. *FEMS Microbiology Letters*, 239(1), 181–186.
24. Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in plant science*, 6, 385.
25. McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 59(2), 129-142.
26. Moradi, M., Oerke, E. C., Steiner, U., Tesfaye, D., Schellander, K., & Dehne, H. W. (2010). Microbiological and Sybr® Green Real-Time PCR detection of major *Fusarium* Head Blight pathogens on wheat ears. *Microbiology*, 79(5), 646-654.
27. Narkiewicz-Jodko, M., Gil, Z., & Urban, M. (2005). Stembase rot of winter wheat by *Fusarium* spp. - causes and effects. *Acta Agrobotanica*, 58(2), 319–332.
28. Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D.W., et al. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(1), 17–37.
29. Parry, D. W., & Nicholson, P. (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, 45, 383–391.
30. Ropelewska, E., & Zapotoczny, P. (2018). Classification of *Fusarium*-infected and healthy wheat kernels based on features from hyperspectral images and flatbed scanner images: a comparative analysis. *European Food Research and Technology*, 1-10.
31. Santos, C., Ventura, J. A., Costa, H., Fernandes, P. M., & Lima, N. (2015). MALDI-TOF MS to identify the pineapple pathogen *Fusarium guttiforme* and its antagonist *Trichoderma asperellum* on decayed pineapple. *Tropical Plant Pathology*, 40(4), 227-232.

32. Sawinska, Z., Świtek, S., Kosiada, T., Andrzejak R. (2017). *Fusarium* w uprawie pszenicy. Krajowa Federacja Producentów Zbóż. ISBN 978-83-946130-3-7.
33. Schesser, K., Luder, A., & Henson, J. M. (1991). Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, in infected wheat plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 553-556.
34. Schönhofen, A., Hazard, B., Zhang, X., & Dubcovsky, J. (2016). Registration of common wheat germplasm with mutations in SBEII genes conferring increased grain amylose and resistant starch content. *Journal of plant registrations*, 10(2), 200-205.
35. Shaw, M. W., Bearchell, S. J., Fitt, B. D., & Fraaije, B. A. (2008). Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytologist*, 177(1), 229-238.
36. Smiley, R. W. (2009). Water and temperature parameters associated with winter wheat diseases caused by soilborne pathogens. *Plant disease*, 93(1), 73-80.
37. Strelkov, S. E., & Lamari, L. (2003). Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(4), 339-349.
38. Vergara-Diaz, O., Kefauver, S. C., Elazab, A., Nieto-Taladriz, M. T., & Araus, J. L. (2015). Grain yield losses in yellow-rusted durum wheat estimated using digital and conventional parameters under field conditions. *The Crop Journal*, 3(3), 200-210.
39. Wang, X., Zheng, W., Buchenauer, H., Zhao, J., Han, Q., Huang, L., & Kang, Z. (2008). The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 120(3), 241-247.
40. Wegulo, S. N., Baenziger, P. S., Nopsa, J. H., Bockus, W. W., & Hallen-Adams, H. (2015). Management of Fusarium head blight of wheat and barley. *Crop Protection*, 73, 100-107.
41. Wiese, M. V. (1987). *Compendium of wheat diseases* (2nd ed.). St. Paul: American Phytopathological Society.
42. Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Jestoi, M., Klemsdal, S. S., & Rizzo, A. (2006). Genetic variation, real-time PCR, metabolites and mycotoxins of *Fusarium avenaceum* and related species. *Mycotoxin research*, 22(2), 79-86.
43. Yli-Mattila, T., Ward, T. J., O'Donnell, K., Proctor, R. H., Burkin, A. A., Kononenko, G. P., ... & Gagkaeva, T. Y. (2011). *Fusarium sibiricum* sp. nov, a novel type A trichothecene-producing *Fusarium* from northern Asia closely related to *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae*. *International journal of food microbiology*, 147(1), 58-68.
44. Zeng, X., Luo, Y., Zheng, Y., Duan, X., & Zhou, Y. (2010). Detection of latent infection of wheat leaves caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using nested PCR. *Journal of phytopathology*, 158(4), 227-235.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

3.1 Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

W 2006 roku ukończyłem studia biotechnologiczne na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie uzyskując tytuł magistra

inżyniera. Od II roku studiów otrzymywałem stypendium naukowe. Za bardzo dobre wyniki w nauce uzyskane w trakcie studiów otrzymałem Dyplom Wyróżniającego się Absolwenta oraz Honorową Odznakę Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Działalność naukową rozpocząłem w 2006 roku wraz z podjęciem studiów doktoranckich na Wydziale Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Zostałem włączony w prace zespołu kierowanego przez prof. dr hab. Ewę Solarską (promotor późniejszej dysertacji doktorskiej) zajmującego się m.in. porównaniem rolnictwa ekologicznego z konwencjonalnym w aspekcie grzybów toksynotwórczych oraz produkowanych przez nie metabolitów wtórnych.

Mikotoksyny produkowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium* stanowią znaczący problem w uprawie roślin zbożowych przyczyniając się do obniżenia jakości ziarna. Toksyny te mogą być produkowane zarówno w warunkach polowych, jak i przechowalniczych. Obecnie znanych jest kilkaset mikotoksyn zanieczyszczających również produkty spożywcze, zarówno przetworzone jak i nieprzetworzone. Właściwości biologiczne i chemiczne tych związków, jak również ich toksyczność są bardzo zróżnicowane. Wiele z tych metabolitów wtórnych posiada właściwości teratogenne, kancerogenne, estrogenne oraz immunosupresyjne (Pereira i in. 2014).

W latach 2006-2011 moje badania koncentrowały się na określaniu zawartości mikotoksyn w ziarnie zbóż oraz produktach spożywczych, w szczególności w aspekcie porównania systemów produkcji ekologicznej i konwencjonalnej. Wybrane badania dotyczyły również oceny czynników, które mogą mieć wpływ na ilość mikotoksyn (załącznik 4, pozycja II.D.8., II.B.9., II.D.10., II.D.11., II.D.12., II.D.13., II.D.14., II.D.15.). Badania zawartości mikotoksyn prowadzone były głównie z wykorzystaniem metod chromatografii cieczowej, gazowej oraz testów immunoenzymatycznych ELISA. Część publikacji opisujących wyniki badań uzyskanych w latach 2006-2011 ukazała się w latach 2012-13 (załącznik 4, pozycja II.D.3., II.D.4., II.D.5., II.D.6., II.D.7.).

W latach 2006-2011 porównywałem występowanie grzybów oraz produkowanych przez nie mikotoksyn w owsie i jego produktach z ekologicznego i konwencjonalnego systemu produkcji. Materiał stanowiły próbki ziarna owsa zebrane w gospodarstwach ekologicznych i konwencjonalnych w latach 2006-2008. W trakcie zbierania próbek przeprowadzana była również ankieta dotycząca odmiany, przedplonu i innych czynników mogących mieć wpływ na występowanie grzybów oraz mikotoksyn. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że głównym sprawcą fuzariozy wiech owsa z systemu produkcji ekologicznej i konwencjonalnej jest *Fusarium poae*. Ponadto stwierdzono korelację pomiędzy występowaniem grzybów i tworzonych przez nie mikotoksyn, a odmianą, miejscem pobierania prób, sezonem wegetacyjnym,

przedplonem oraz klasą gleby. Badania nie wykazały różnic w zawartości mikotoksyn w próbkach z obu systemów produkcji. W wyniku analizy statystycznej wykazano istnienie korelacji pomiędzy poszczególnymi gatunkami grzybów oraz produkowanymi przez nie mikotoksynami. Zdecydowanie więcej interakcji międzygatunkowych wykazano w owsie z upraw ekologicznych. Opisane rezultaty badań stanowiły podstawę rozprawy doktorskiej pt.: „Grzyby i tworzone przez nie mikotoksyny w owsie ekologicznym i jego produktach”, napisanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Ewy Solarskiej. Obrona rozprawy odbyła się w 2011 roku przed komisją powołaną przez Radę Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Decyzją Rady Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii uzyskałem stopień doktora nauk rolniczych w zakresie technologii żywności i żywienia, specjalność mikrobiologia żywności. Znacząca część badań opisanych w rozprawie doktorskiej wykonywana była w ramach grantu promotorskiego (N N312 309637): „Grzyby i tworzone przez nie mikotoksyny w owsie ekologicznym i jego produktach”, którego kierownikiem była prof. dr hab. Ewa Solarska (załącznik 4, pozycja II.I.4.).

W latach 2006-2011 prowadziłem również badania nad zawartością mikotoksyn w innych produktach spożywczych. Wyniki oznaczania obecności mikotoksyn w piwie opublikowałem w czasopiśmie Food Control (załącznik 4, pozycja II.A.5.). W badaniach tych oznaczano obecność deoksyniwalenolu (DON) oraz zearalenonu (ZEN) z użyciem technik immunoenzymatycznych. Obecność DON wykazano we wszystkich analizowanych próbach, podczas gdy ZEN zanieczyszczał 11% testowanych piw. W pracy wykazano różnice w zawartości mikotoksyn pomiędzy piwami górnej i dolnej fermentacji oraz jasnymi i ciemnymi. Zaobserwowano również niewielką korelację pomiędzy stężeniem alkoholu a zawartością mikotoksyn.

Równoległe z prowadzeniem badań naukowych poszerzałem swoją wiedzę w obszarze technologii żywności oraz żywienia człowieka biorąc udział m.in. w międzynarodowym programie szkoleniowym Socrates Intensive Programme: „Food and Consumer” (Burgos, Hiszpania, 2007) (załącznik 4, pozycja III.A.1.).

W latach 2006-2012 brałem udział w badaniach rejestracyjnych środków ochrony roślin prowadzonych pod kierownictwem prof. dr hab. Ewy Solarskiej, które prowadzone były na zlecenie firm Bayer CropScience, Syngenta, Sumi Agro Poland, Dow Agro Science i in. Do moich obowiązków należało przeprowadzanie doświadczeń polowych, ocena występowania chorób grzybowych, ocena efektywności badanych preparatów, ocena parametrów ilościowych i jakościowych plonu, analiza statystyczna wyników oraz przygotowywanie raportów z badań. Badania prowadzone były zgodnie z wytycznymi Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi oraz Europejskiej i Śródziemnomorskiej

Organizacji Ochrony Roślin (ang. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, EPPO).

W latach 2006-2011 brałem również udział, w charakterze wykonawcy, w licznych projektach z zakresu rolnictwa ekologicznego finansowanych głównie przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi pod kierownictwem prof. dr hab. Ewy Solarskiej. Wybrane projekty, które realizowałem to: „Opracowanie technologii produkcji chmielu ekologicznego” (VKT/U-95)”, „Określenie występowania mikotoksyn w różnych odmianach zbóż ozimych i jarych uprawianych metodami ekologicznymi” (VKT/U-96) (załącznik 4, pozycja **II.I.5.**, **II.I.6.**).

W latach 2006-2011 uczestniczyłem w konferencjach ogólnopolskich oraz międzynarodowych. W dn. 10.03.2007 uczestniczyłem w I Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów zorganizowanej przez Uniwersytet Rolniczy w Krakowie. Wygłosiłem referat pt. „Właściwości mikotoksyn z grupy trichotecenów oraz ich występowanie w zbożach” (załącznik 4, pozycja **II.K.5.**). Na międzynarodowej konferencji 31st Mycotoxin-Workshop , która odbyła się w dn.15-17.06.2009 w Niemczech, przedstawiono postery prezentujące wyniki badań zawartości mikotoksyn w próbach ziarniaków pszenicy orkisz, samopszy i płaskurki (załącznik 4, pozycja **III.B.16.**, **III.B.17.**, **III.B.18.**). W dn. 16-17.03.2009 uczestniczyłem w VII Konferencji Naukowej Doktorantów organizowanej przez Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie pt. „Problemy technologii produkcji roślinnej, zwierzęcej i żywności” podczas której wygłosiłem referat pt. „Grzyby i tworzone przez nie mikotoksyny w owsie i jego produktach” (załącznik 4, pozycja **II.K.4.**). Wyniki badań nad zawartością mikotoksyn w jęczmieniu oraz życie przedstawiono na krajowych konferencjach organizowanych przez Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy oraz Przemysłowy Instytut Maszyn Rolniczych, jak również podczas międzynarodowej konferencji 32nd Mycotoxin Workshop w Danii (załącznik 4, pozycja **III.B.13.**, **III.B.14.**, **III.B.15.**).

W dn. 04-10.07.2009 uczestniczyłem w zagranicznym seminarium wyjazdowym zorganizowanym przez Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie oddział w Radomiu pt. „Tematy i wyniki prac badawczych dotyczących rolnictwa ekologicznego, prowadzonych przez niemieckie i szwajcarskie instytuty naukowe”. Byłem również członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji „International Hop Growers` Convention I.H.G.C.”, która odbyła się w Lublinie w dn. 19-23.07.2011 (załącznik 4, pozycja **III.C.3.**).

1 października 2011 roku uzyskałem Dyplom uznania Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za osiągnięcia naukowe w latach 2008-2010 (załącznik 4, pozycja **II.J.1.**).

W latach 2006-2011 prowadziłem również działalność popularyzatorską, która zaowocowała nominacjami do nagród Polskiej Agencji Prasowej w konkursie Popularyzator Nauki 2012 oraz 2013 w kategorii Osoba oraz Nauka w Internecie. W ramach działalności popularyzatorskiej od 2006 roku prowadzę, jako redaktor naczelny oraz wydawca, portal internetowy e-biotechnologia.pl w ramach którego utworzyłem „Wirtualny Podręcznik Biotechnologii”, z którego korzystają studenci, doktoranci oraz młodzi naukowcy. W 2007 roku byłem współorganizatorem warsztatów podczas IV Lubelskiego Festiwalu Nauki. W 2008 roku prowadziłem zajęcia lekcyjne dotyczące biotechnologii dla uczniów Szkoły Podstawowej im. Zofii Trzcińskiej-Kamińskiej w Leścach. W latach 2007-2011 prowadziłem również lekcje promujące studiowanie biotechnologii dla uczniów klas maturalnych V Liceum Ogólnokształcącego im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W latach 2006-2011 byłem również autorem licznych artykułów popularnonaukowych na łamach m.in. onet.pl, wp.pl, Aktualności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Radar (załącznik 4, pozycja **III.Q.2.**, **III.Q.3.**, **III.Q.4.**, **III.Q.5.**, **III.Q.6.**, **III.Q.7.**, **III.Q.8.**, **III.Q.9.**, **III.Q.10.**, **III.Q.11.**, **III.Q.12.**, **III.Q.13.**, **III.Q.14.**, **III.Q.16.**). W 2008 roku zdobyłem wyróżnienie w konkursie organizowanym przez czasopismo „Forum Akademickie” pt. „Skomplikowane i proste – młodzi uczeni o swoich badaniach” (załącznik 4, pozycja **III.D.7.**). Wyróżnienie przyznane zostało za artykuły popularnonaukowy pt. „Toksyczny świat grzybów”, który następnie opublikowany został na łamach czasopisma (załącznik 4, pozycja **III.Q.15.**). W latach 2007-2009 współpracowałem również z miesięcznikiem popularnonaukowym „XXI wiek”.

W latach 2008-2009 byłem stypendystą Urzędu Marszałkowskiego Województwa Lubelskiego w Lublinie w ramach projektu "Stypendia naukowe dla doktorantów", projektu realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

Literatura:

1. Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96-136.

3.2 Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w postaci oryginalnej pracy twórczej w czasopiśmie z listy A MNiSW, wyróżnionym w Journal Citation Reports (JCR) (załącznik 4, pozycja **II.A.6.**).

W 2011 roku zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, a następnie w 2012 roku na stanowisku adiunkta. Doświadczenie zdobyte podczas prowadzenia prac badawczych przed uzyskaniem stopnia doktora umożliwiło mi rozwinięcie własnego warsztatu badawczego. Oprócz głównego nurtu badań opisanego w Osiągnięciu, wykorzystywałem techniki molekularne do analizy fragmentów genomów wybranych mikroorganizmów, w tym m.in. genów *Lactobacillus rhamnosus* (załącznik 4, pozycja II.A.7.). Zaprojektowałem również oligonukleotydy umożliwiające uzyskanie sekwencji wybranych genów z genomu *Lactobacillus helveticus* (załącznik 4, pozycja II.A.4., III.B.12.). Uzyskane w ten sposób sekwencje nukleotydowe oraz aminokwasowe poddałem analizie bioinformatycznej. Uzyskane sekwencje opublikowane zostały w bazie NCBI GenBank (numery dostępne: **JQ952565, JQ952566, KF860892, KT285174, KT285175, KT285176, KT285177, KT285178, KT285179, KT285180, KT285181**).

Uczestniczyłem również w badaniach nowych szczepów drożdży uzyskanych z próbek środowiskowych. Moją rolą była identyfikacja izolatów drożdży, na podstawie sekwencji rDNA uzyskanych z użyciem starterów ITS1 oraz ITS4 (załącznik 4, pozycja II.A.2., II.A.3.). Sekwencje opublikowane zostały w bazie NCBI GenBank (numery dostępne: **KP783503, KP783504, KP783505, KP783506, KP783507**).

W 2011 roku przystąpiłem, w charakterze członka zespołu, do realizacji projektu PO IG 01.01.02-00-074/09 „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylogowych” realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (załącznik 4, pozycja II.I.3.). Do moich obowiązków należała izolacja i wstępna selekcja szczepów grzybów z rodzaju *Rhizopus*, analiza przynależności gatunkowej izolatów *Rhizopus* sp. z użyciem technik molekularnych oraz przygotowanie metodyki do prac nad modyfikacją genetyczną wybranych szczepów. Wybrane wyniki zostały opublikowane (załącznik 4, pozycja II.A.1.). Niektóre z wyników badań, w których brałem udział, zaprezentowano w formie posterów podczas 5th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2013 (załącznik 4, pozycja III.B.9., III.B.10., III.B.11.). W ramach realizacji projektu uzyskano również sekwencje DNA fragmentów genomów *Rhizopus* sp., które opublikowane zostały w bazie NCBI GenBank (numery dostępne: a. *Rhizopus oryzae*: **JX669568, JX669569, JX669570, JX669578, JX669563, JX669565, JX669566, JX669567, JQ313821, JQ313814, JQ313828, JQ313834, JQ313829, JQ313816, JQ313815, JQ313819, JQ313826, JQ313827, JQ313831, JQ313835, JQ313824, JQ313820, JQ313822, JQ313818, JQ313823, JQ313832, JQ313833, JQ313836, JQ313825, JQ313817, JX669582, JX669599, JX669583, JX669584, JX669597, JX669610, JX669611, JX669598, JQ313850**).

JQ313830, JQ313849, JQ313843, JX669581, JQ313841, JQ313842, JQ313844, JQ313847, JQ313860, JQ313863, JQ313846, JQ313848, JQ313859, JQ313853, JQ313855, JQ313858, JQ313837, JQ313839, JQ313845, JQ313852, JQ313862, JQ313854, JQ313861, JQ313875, JQ313851, JX669545, JX669546, JX669547, JX669548, JX669557, JX669558, JX669559, JX669562, JQ313898, JQ313890, JQ313882, JQ313892, JQ313895, JQ313897, JQ313876, JQ313877, JQ313878, JQ313879, JQ313880, JQ313881, JQ313883, JQ313884, JQ313885, JQ313886, JQ313887, JQ313888, JQ313889, JQ313891, JQ313893, JQ313894, JQ313896, JQ313899; *Rhizopus stolonifer*: JX669571, JX669572, JX669573, JX669574, JX669575, JX669576, JX669577, JX669579, JX669580, JX669564, JX669596, JX669602, JX669600, JX669595, JX669603, JX669585, JX669586, JX669587, JX669588, JX669589, JX669590, JX669591, JX669593, JX669594, JX669601, JX669604, JX669605, JX669606, JX669607, JX669609, JX669592, JX669608, JQ313871, JQ313870, JQ313873, JQ313856, JQ313857, JQ313864, JQ313865, JQ313866, JQ313868, JQ313874, JQ313867, JQ313838, JX669549, JX669550, JX669551, JX669552, JX669553, JX669554, JX669555, JX669556, JX669560, JX669561; *Rhizopus microsporus*: JQ313840, JQ313872, JQ313869). Wybrane wyniki uzyskane w ramach niniejszego projektu będą jeszcze publikowane.

W latach 2011-2017 pełniłem funkcję opiekuna naukowego Studenckiego Koła Naukowego Biotechnologów „Biom” Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W latach 2011-2017 członkowie Koła prezentowali wyniki swoich badań podczas krajowych oraz międzynarodowych konferencjach naukowych, do których należy zaliczyć m.in. Sympozjum Młodych Naukowców „Nowe oblicze nauk przyrodniczych” w Poznaniu, Międzynarodową Konferencję Naukową „Młodzi dla Nauki” – Ekonomia–Prawo–Nauki Społeczne i Przyrodnicze w Karpaczu, VI Międzynarodową Konferencję Studentów Biotechnologii w Łodzi, XX Międzynarodową Konferencję Studentów Kół Naukowych we Wrocławiu. Jedną z ważnych inicjatyw członków SKN „Biom” było zainicjowanie Lubelskiej Konferencji Młodych Naukowców, której pierwsza edycja odbyła się w dniach 27-28.04.2012 r. Ponadto, członkowie Koła prowadzili warsztaty dla uczniów szkół podstawowych m.in. z zakresu badań stosowanych w biotechnologii. Członkowie SKN „Biom” aktywnie uczestniczyli w Dniach Otwartych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz organizacji Lubelskiego Festiwalu Nauki (załącznik 4, pozycja III.J.19.).

W 2014 roku pozyskałem projekt Lider V o nr. LIDER/014/263/L-5/13/NCBR/2014 pt. „Opracowanie nowych molekularnych testów diagnostycznych umożliwiających identyfikację kluczowych patogenów grzybowych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) do zastosowań w ukierunkowanej ochronie roślin” finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (numer wewnętrzny projektu: VKT/PB-L/10)

(załącznik 4, pozycja II.I.2.). Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu opublikowane zostały w postaci prac naukowych (załącznik 4, pozycja O1, O3, O4) oraz prezentowane były w postaci referatów i posterów na konferencjach krajowych i międzynarodowych (załącznik 4, pozycja II.K.1., III.B.4., III.B.5., III.B.6., III.B.7., III.B.8.). Wybrane z opracowanych oligonukleotydów uzyskały patent UPRP (załącznik 4, pozycja II.B.1., II.B.2., II.B.3., II.B.4., II.B.5., II.B.6., II.B.7., II.B.8., II.B.9.). W ramach realizacji projektu uzyskano sekwencje DNA, które opublikowane zostały w zasobach NCBI GenBank (*Fusarium poae*: MG736143, MG736209, MG736153, MG736160, MG736163, MG736166, MG736170, MG736181, MG736205, MG736157, MG736186, MG736191, MG736094, MG736096, MG736161, MG736162, MG736164, MG736165, MG736175, MG736178, MG736179, MG736182, MG736201, MG736139, MG736146, MG736183, MG736211, MG736095, MG736100, MG736101, MG736109, MG736111, MG736116, MG736117, MG736118, MG736126, MG736131, MG736150, MG736193, MG736174, MG736088, MG736089, MG736098, MG736107, MG736110, MG736113, MG736122, MG736124, MG736125, MG736128, MG736140, MG736145, MG736147, MG736148, MG736086, MG736142, MG736144, MG736129, MG739224, MG739225, MG739226, MG739228, HQ198317, HQ198311, HQ198312, HQ198314, HQ198316, HQ198313, HQ198318, HQ198321, HQ198309, HQ198315, HQ198320, HQ198323, HQ198324, HQ198322, HQ198310, MG739229, MG739230, MG739231, MG739232, MG739233, MG739234, MG739235, MG739236, MG739237, MG739238, MG739239, MG739240, MG739241, MG739242, MG739243, MG739244, MG739245, MG739246, MG739247, MG739248, MG739249, MG739250, MG739251, MG739252, MG739253, MG739254, MG739255, MG739256, MG739257, MG739258, MG739259, MG739260, MG739261, MG739262, MG739263, MG739264, MG739265, MG739266, MG739267, MG739268, MG739269, MG739270, MG739271, MG739272, MG739273, MG739274, MG739275, MG739276, MG739277, MG739278, MG739279, MG739280, MG739281, MG739282, MG739283, MG739284, MG739285, MG739286, MG739287; *Blumeria graminis*: KY348706, KY348707, KY348708, KY348709, KY348710, KY348711, KY348712, KY348713, KY348714, KY348715, KY348716, KY348717, KY348718, KY348719, KY348720, KY348721, KY348722, KY348723, KY348724, KY348725, KY348726, KY348727, KY348728, KY348729, KY348730, KY348731, KY348732, KY348733, KY348734, KY348735, KY348736, KY348737, KY348738; *Puccinia triticina*: KY411496, KY411497, KY411498, KY411499, KY411500, KY411501, KY411502, KY411503, KY411504, KY411505, KY411506, KY411507, KY411508, KY411509, KY411510, KY411511, KY411512, KY411513, KY411514, KY411515, KY411516, KY411517, KY411518, KY411519, KY411520, KY411521; *Fusarium* sp.: MG736119, MG736132, MG736133, MG736134, MG736135, MG736136, MG736137, MG736138,

MG736120, MG736155, MG736154, MG736156, MG736167, MG736169, MG736177, MG736184, MG736185, MG736188, MG736097, MG736103, MG736121, MG736168, MG736099, MG736102, MG736087; *Puccinia striiformis*: KY411533, KY411534, KY411535, KY411536, KY411537, KY411538, KY411539, KY411540, KY411541, KY411542, KY411543, KY411522, KY411523, KY411524, KY411525, KY411526, KY411527, KY411528, KY411529, KY411530, KY411531, KY411532; *Epicoccum nigrum*: MG736198, MG736207, MG736208, MG736210, MG736197, MG736206, MG736195, MG736215, MG736196, MG736199, MG736200, MG736203, MG736189, MG736173, MG736092, MG736105, MG736123; *Fusarium sporotrichioides*: MG736141, MG736159, MG736202, MG736204, MG736176, MG736093, MG736108, MG736114, MG736130, MG736149, MG739227, MG739288, MG739289, MG739290, MG739291, MG739292; *Fusarium avenaceum*: MG736213, MG736214, MG736158, MG736212, MG736180, MG736152, MG736172, MG736115, MG736127, MG736151; *Fusarium culmorum*: MG736106, MG736104, MG739296, MG739297; *Fusarium graminearum*: MG739293, MG739294, MG739295; *Fusarium equiseti*: MG736112, MG736187; *Fusarium oxysporum*: MG736192, MG736190; *Alternaria* sp.: MG736091, MG736171; *Alternaria infectoria*: MG736194; *Fusarium acuminatum*: MG736090).

Niektóre z wyników badań prowadzonych w ramach prac magisterskich i inżynierskich również zostały upowszechnione w postaci prac naukowych (załącznik 4, pozycja II.D.2.) oraz posterów konferencyjnych (załącznik 4, pozycja III.B.2., III.B.3.).

Od 2013 roku prowadziłem również działalność w zakresie komercjalizacji wyników badań naukowych z zakresu genetyki w postaci opracowania metodyk badawczych, koordynacji pracy laboratoriów, nadzoru nad personelem laboratoriów w spółkach technologicznych Vitagenum oraz Nexbio.

W spółce Vitagenum opracowałem i koordynowałem wdrożenie nowatorskiej metody ekstrakcji DNA człowieka oraz opracowałem oligonukleotydy umożliwiające powielanie odcinków DNA otaczających wybrane markery genetyczne człowieka typu SNP. W opracowaniu testów posługiwałem się bazami bioinformatycznymi w celu wyznaczenia zmienności genetycznej badanych fragmentów oraz wykluczenia powielania obszarów homologicznych w tym m.in. pseudogenów. Opracowane metody wykorzystywane są przez spółkę do chwili obecnej. W ramach działalności spółki byłem również pomysłodawcą, realizowanego obecnie przez spółkę projektu finansowanego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Lubelskiego na lata 2014-2020, Oś Priorytetowa 1 Badania i innowacje, Działanie 1.2 Badania celowe pt. „Prace B+R w zakresie opracowania nowej technologii łączenia amplikonów wraz z odczytem sekwencji tak uzyskanego odcinka DNA”. W latach 2017/18 byłem kierownikiem

opisywanego projektu (załącznik 4, pozycja II.I.1.). Rezygnacja z kierowania projektem wynikała z zaprzestania współpracy ze spółką Vitagenum.

W spółce Nexbio opracowałem i koordynowałem wdrażanie technologii detekcji wybranych mikroorganizmów, utrwalania DNA zwierząt, sekwencjonowania DNA oraz oznaczania markerów genetycznych zwierząt. W trakcie działalności w ramach spółki Nexbio współpracowałem z gospodarstwami rolnymi, producentami i dystrybutorami środków ochrony roślin, uczelniami (m.in. SGGW, UJ, UW) i innymi przedsiębiorstwami (m.in. Grupa Azoty, Arkona). Spółka Nexbio była wielokrotnie nominowana i nagradzana, m.in.: 10.2017 - Nominacja do Nagrody Gospodarczej Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej, 10.2017 - Finalista konkursu UPC Digital Imagination Challenge, 01-07.2017 - Zwycięzca polskiej edycji Chivas Venture, finalista konkursu światowego, 05.2016 - Zwycięzca Startup Contest na międzynarodowej konferencji InfoShare w Gdańsku (załącznik 4, pozycja III.D.1., III.D.2., III.D.3., III.D.4., III.D.5.).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nadal angażowałem się w popularyzację nauki m.in. poprzez stałe powiększanie zasobów Wirtualnego Podręcznika Biotechnologii dostępnego na łamach e-biotechnologia.pl. W dniu 10.07.2012 r. przeprowadziłem warsztat popularnonaukowy pt. „Biotechnologia to przyszłość” dla grupy młodzieży ponadgimnazjalnej – stypendystów Fundacji Dzieło Nowego Tysiąclecia. W dniu 03.12.2013 r. brałem udział w spotkaniu informacyjno-promocyjnym na rzecz promowania kierunków matematyczno-przyrodniczo-technicznych zorganizowanym przez Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie wspólnie z MNiSW dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych.

W latach 2011 – 2018 wykonałem 6 recenzji dla czasopism naukowych: 3 w czasopismach wyróżnionych w Journal Citation Reports (JCR) (część A) i 3 w czasopismach wymienionych w wykazie MNiSW (część B) (załącznik 4, pozycja III.P.1., III.P.2., III.P.3., III.P.4., III.P.5., III.P.6.).

W latach 2006 – 2018 realizowałem zajęcia wykładowe i ćwiczeniowe na studiach pierwszego i drugiego stopnia w j. polskim na 2 wydziałach i 4 kierunkach studiów Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (załącznik 4, pozycja III.I.). Realizowane przedmioty dydaktyczne:

- a. w charakterze osoby odpowiedzialnej za przedmiot:
 - Genomika i transkryptomika, kierunek: Biotechnologia, II stopień, I semestr (letni).
 - Genetyka, kierunek: Biotechnologia, I stopień, III semestr (zimowy).
 - Działalność innowacyjna przedsiębiorstw, kierunek: Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka, II stopień, III semestr (letni).
 - Przedsiębiorczość w dietetyce, kierunek: Dietetyka, II stopień, IV semestr (letni).

- Komercjalizacja wyników badań naukowych, kierunek: Bioinżynieria, II stopień, I semestr (zimowy).
- b. pozostałe realizowane przedmioty:
 - Genomika, proteomika, metabolomika;
 - Proteomika i peptydomika;
 - Modyfikacje genetyczne drobnoustrojów przemysłowych;
 - Genetyka medyczna;
 - Biotechnologia medyczna;
 - Metody biotechnologiczne w diagnostyce i analityce;
 - Biotechnologia w ochronie środowiska;
 - Biotechnologia;
 - Opakownictwo i Przechowalnictwo;
 - Technologia specjalizacyjna: Ocena i kształtowanie jakości żywności;
 - Zafałszowania produktów;
 - Biotechnologia Żywności i Leków;
 - Inżynieria i aparatura bioprosesowa;
 - Techniki analityczne w biotechnologii;
 - Wirusologia molekularna;
 - Przedsiębiorczość w żywieniu i dietetyce;
 - Zarządzanie jakością towarów konsumpcyjnych;
 - Nutrigenomika;
 - Nutrigenomika i dietoterapia;
 - Zafałszowania żywności.

Pod moją opieką zrealizowano następujące prace magisterskie (załącznik 4, pozycja **III.J.3., III.J.4., III.J.11., III.J.13., III.J.14., III.J.15., III.J.16.**):

- Opracowanie i optymalizacja nowych metod molekularnych do identyfikacji wybranych patogenów zbóż z rodzaju *Fusarium*.
- Opracowanie testu diagnostycznego w kierunku identyfikacji wybranej mutacji w obrębie genu CFTR warunkującej wystąpienie mukowiscydozy.
- Wykorzystanie i optymalizacja metod molekularnych: PCR, qPCR i LAMP do identyfikacji *Fusarium culmorum*.
- Wykorzystanie nowych zestawów oligonukleotydów do identyfikacji grzybów z rodzaju *Rhizoctonia* za pomocą metody PCR.
- Zastosowanie metody PCR i jej modyfikacji do identyfikacji grzybów z rodzaju *Puccinia*.

- Wykorzystanie i optymalizacja metod molekularnych: PCR, qPCR i LAMP do identyfikacji *Fusarium graminearum*.

Pod moją opieką zrealizowano następujące prace inżynierskie (załącznik 4, pozycja III.J.1., III.J.2., III.J.5., III.J.6., III.J.7., III.J.8., III.J.9., III.J.10., III.J.17., III.J.18.):

- Znaczenie i osiągnięcia technologii sekwencjonowania w analizie gDNA mikroorganizmów.
- Zastosowanie i rozwój technologii PCR I, II i III generacji w identyfikacji mikroorganizmów.
- Opracowanie listy markerów genetycznych człowieka typu SNP w odniesieniu do cukrzycy typu 2.
- Określenie zasobów genetycznych *Fusarium oxysporum* oraz zaprojektowanie metod identyfikacji tych grzybów z zastosowaniem techniki PCR.
- Określenie zasobów genetycznych *Fusarium avenaceum* oraz zaprojektowanie metod identyfikacji z zastosowaniem techniki PCR.
- Opracowanie listy markerów genetycznych człowieka typu SNP powiązanych z nowotworem piersi.
- Markery genetyczne SNP warunkujące predyspozycje do uprawiania sportu.
- Opracowanie listy markerów genetycznych człowieka typu SNP związanych z próchnicą zębów.
- Analiza sekwencji DNA oraz filogenetyka wybranych genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy mikotoksyn fuzaryjnych.
- Analiza użyteczności markerów genetycznych związanych z otyłością.
- Wykorzystanie głębokiego mrożenia oraz mikrofal do izolacji DNA grzybów z rodzaju *Fusarium*.
- Wykorzystanie lizy alkalicznej i termicznej do izolacji DNA grzybów z rodzaju *Fusarium*.

6. Zestawienie dorobku

Mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się z 71 pozycji i obejmuje:

- oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z bazy JCR (13 pozycji), wszystkie opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora;
- oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza bazy JCR (14 pozycji), 6 zostało opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora;

- monografia naukowa (1 pozycja), opublikowana po uzyskaniu stopnia naukowego doktora;
- patenty uzyskane w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej (9 pozycji), otrzymane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora;
- 23 komunikatów naukowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, 15 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora;
- 16 publikacji w czasopismach niepunktowanych, 7 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

6.1. Wskaźniki dokonań naukowych

- Łączny IF prac opublikowanych w bazie JCR wynosi 21,729. Wszystkie prace z bazy JCR zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora, 6 z nich wchodzi w skład dorobku stanowiącego osiągnięcie habilitacyjne.
- IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego wynosi 7,446.
- Łączna punktacja dorobku wg MNiSW wynosi 669. Punktacja dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora wynosi 30, po uzyskaniu stopnia doktora 639.
- Indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science (na dzień 06.12.2018) wynosi: 4, według bazy Scopus (na dzień 06.12.2018) wynosi: 5, według Google Scholar (na dzień 06.12.2018) wynosi: 6.
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (na dzień 06.12.2018) wynosi: 53, według bazy Scopus (na dzień 06.12.2018) wynosi: 60, według Google Scholar (na dzień 06.12.2018) wynosi: 129.
- punktacja obejmuje oryginalne prace twórcze (27 pozycji – 379 punktów), monografie i podręczniki akademickie (1 pozycja – 20 punktów), patenty (9 pozycji – 270 punktów).

Tabela 4. Wskaźniki naukometryczne dorobku naukowego (włącznie z osiągnięciem będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego).

L.p.	Rodzaj publikacji		Liczba publikacji			IF*	Punkty MNiSW**
			Przed doktorem	Po doktoracie	Ogółem		
1.	Prace indeksowane w bazie JCR		0	13	13	21,729	320
2.	Prace opublikowane w czasopiśmie nieindeksowanych w bazie JCR		8	6	14	nd***	59
3.	Monografie naukowe		0	1	1	nd	20
4.	Komunikaty naukowe	Konferencje zagraniczne i międzynarodowe	5	9	14	nd	nd
		Konferencje krajowe	3	6	9	nd	nd
5.	Patenty		0	9	9	nd	270
6.	Dorobek ogółem		16	44	60	21,729	669
W tym oryginalne prace twórcze wchodzące w skład osiągnięcia:							
6.			0	6	6	7,446	145
Pozostałe							
7.	Realizowane projekty badawcze		6				
	- kierowane projekty badawcze		2				
8.	Indeks Hirsha wg bazy Web of Science		4				
9.	Indeks Hirsha wg bazy Scopus		5				

10.	Indeks Hirsha wg bazy Google scholar	6
-----	---	---

* - obowiązujący w roku opublikowania

** - zgodnie z listą czasopism punktowanych z roku opublikowania

*** - nie dotyczy

Tabela 5. Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe.

Czasopismo	Liczba punktów MNiSW	Liczba prac		Suma punktów MNiSW
		Przed doktoratem	Po doktoracie	
Czasopisma znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)				
Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology	25	0	3	75
Journal of Integrative Agriculture	25	0	1	25
Romanian Agricultural Research	15	0	1	15
European Journal of Plant Pathology	30	0	1	30
AMB Express	25	0	1	25
Polish Journal of Microbiology	15	0	1	15
Anaerobe	25	0	1	25
Food Control	35	0	2	70
The Journal of Antibiotics	20	0	1	20
Open Life Sciences (poprzednia nazwa: Central European Journal of Biology)	20	0	1	20
Publikacje naukowe w pozostałych czasopismach naukowych				
Journal of Plant Protection Research	9	0	1	9
Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering	6	1	3	24
Journal of Agricultural Science and Technology. A	5	0	1	5

Acta Agrophysica	5	0	1	5
Phytopathologia	2	3	1	8
Progress in Plant Protection	6	1	0	6
Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie	0	1	0	0
Nauki Przyrodnicze	2	0	1	2
Monografia w języku polskim	20	0	1	20
RAZEM		6	22	399

Adam Kuzdraliński