

Dr inż. Mirosława Cieślińska

Instytut Ogrodnictwa

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3

96-100 Skierniewice

ZAŁĄCZNIK II

Autoreferat

„Zastosowanie techniki PCR-RFLP i analizy sekwencji fragmentu genu 16S rRNA do wykrywania i różnicowania fitoplazm porażających rośliny sadownicze”

Skierniewice, 2012

Autoreferat

Spis treści

1. Dane personalne.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	4
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	
b) Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej	
c) Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej	
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	17

1. Dane personalne

Imię i Nazwisko **Mirosława Cieślińska**

Miejsce pracy Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 3/1
96-100 Skierniewice

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

- 21.04.1983 r. - magister inżynier ogrodnictwa, Wydział Ogrodniczy Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Praca magisterska pt. „Porównanie plenności i niektórych cech pomologicznych kilku odmian i typów wiśni”
promotor - dr Włodzimierz Lech
- 06.11.1998 r. - doktor nauk rolniczych w zakresie ogrodnictwa, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach. Praca doktorska pt. „Charakterystyka i metody wykrywania wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) w drzewach owocowych”, z wyróżnieniem
promotor - prof. dr hab. Marianna Kamińska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Przebieg pracy zawodowej			
Okres		Nazwa i adres pracodawcy	Stanowisko
od	do		
02.08.1983	31.08.1988	Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice	inżynier ogrodnik, Z-d Upowszechniania Postępu
01.09.1988	31.10.1998	j.w.	asystent w Pracowni Wirusologii
6.11.1998	obecnie	j.w., obecnie Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, Skierniewice	Adiunkt w Pracowni Wirusologii
10.03.2003	17.10.2006	Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Pomologiczna 18, Skierniewice	p.o. kierownika Pracowni Wirusologii
18.10.2006	obecnie	j.w., obecnie Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, Skierniewice	kierownik Pracowni Wirusologii

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

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Moim osiągnięciem naukowym będącym podstawą do ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl ośmiu monotematycznych publikacji z lat 2004-2011 (obejmujących sześć prac oryginalnych i dwie prace przeglądowe) pod wspólnym tytułem: „**Zastosowanie techniki PCR-RFLP i analizy sekwencji fragmentu genu 16S rRNA do wykrywania i różnicowania fitoplazm porażających rośliny sadownicze**”. We wszystkich publikacjach będących przedmiotem habilitacji jestem pierwszym, a w trzech z nich jedynym autorem.

b) Publikacje wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej

1. **Cieślińska M.**, Komorowska B. Stankiene J. 2006. Occurrence and identification of aster yellows related phytoplasma in strawberry in Poland and Lithuania. Acta Horticulturae, 708: 141-145.

Mój wkład jako autora wiodącego polegał na planowaniu badań, lustracji plantacji, identyfikacji fitoplazm na podstawie wyników PCR-RFLP, udziale w analizowaniu i porównaniu sekwencji genu 16S rRNA badanych fitoplazm, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

2. **Cieślińska M.** 2011a. Detection and characterization of phytoplasmas associated with diseases of *Rubus* spp. plants in Poland. Journal of Plant Pathology, 93(1): 51-56. (IF 1,25*; MNiSW 20**)

Mój wkład jako autora wiodącego polegał na planowaniu badań, lustracji plantacji, identyfikacji fitoplazm na podstawie wyników PCR-RFLP oraz analizy sekwencji genu 16S rRNA badanych fitoplazm, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

3. **Cieślińska M.**, Morgaś H., Jakubowski T. 2004. Phytoplasma diseases of stone fruit trees in Poland. Acta Horticulturae, 657: 523-526.

Mój wkład jako autora wiodącego polegał na planowaniu badań, udziale w lustracjach nasadzeń, identyfikacji fitoplazm na podstawie wyników PCR-RFLP, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

4. **Cieślińska M.**, Morgaś H. 2011. Detection and identification of ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ in stone fruit trees in Poland. *Journal of Phytopathology*, 159 (4): 217-222. (IF 1,105; MNiSW 20)

Mój wkład jako autora wiodącego polegał na planowaniu badań, udziale w lustracji nasadzeń, identyfikacji fitoplazm na podstawie wyników PCR-RFLP oraz analizy sekwencji genu 16S rRNA badanych fitoplazm, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

5. **Cieślińska M.** 2011b. European stone fruit yellows disease and its causal agent, ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’. *Journal of Plant Protection Research*, 51(4): 441-447. (IF 0; MNiSW 9)
6. **Cieślińska M.** 2011c. Less common phytoplasmas infecting stone fruit trees. *Journal of Plant Protection Research*, 51(4): 435-440. (IF 0; MNiSW 9)

7. **Cieślińska M.**, Kruczyńska D. 2011. Molecular diagnosis of phytoplasmas infecting apple trees in Poland. *Bulletin of Insectology*, Vol. 64 (Supplement): 73-74 (IF 0,46; MNiSW 13).

Mój wkład jako autora wiodącego polegał na planowaniu badań, udziale w lustracji nasadzeń, identyfikacji fitoplazm na podstawie wyników PCR-RFLP oraz analizy sekwencji genu 16S rRNA badanych fitoplazm, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

8. **Cieślińska M.**, Kowalik B. 2011. The association of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ with stunting and leaf yellowing symptoms in European hazel in Poland. *Journal of Phytopathology*, 159(9): 585-588. (IF 1,105; MNiSW 20)

Mój wkład jako autora wiodącego polegał na planowaniu badań, identyfikacji fitoplazm na podstawie wyników PCR-RFLP oraz analizy sekwencji genu 16S rRNA badanych fitoplazm, opracowaniu wyników i przygotowaniu publikacji

**ze względu na brak danych dotyczących współczynnika wpływu (impact factor, IF) w 2011 r. podano średnią wartość IF za ostatnie 5 lat (2006-2010).*

*** liczba punktów zgodnie z wykazem czasopism punktowanych MNiSW z 2010 r.*

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji są zamieszczone w **Załączniku VII**.

c) Syntetyczne omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej

Fitoplazmy są sprawcami ponad 1000 różnych chorób roślin uprawnych oraz dziko rosnących szczególnie w rejonach położonych w tropikalnej i subtropikalnej strefie klimatycznej. Są jednokomórkowymi organizmami bezjądrowymi (*Procaryota*) o średnicy 100-800 nm, które nie posiadają ściany komórkowej. Zgodnie z przyjętą taksonomią, fitoplazmy należą do klasy *Mollicutes*, gromada bakterie i mają status gatunku kandydackiego ('*Candidatus* Phytoplasma'). Ich identyfikacja i klasyfikacja oparta jest głównie na analizie sekwencji konserwatywnego genu 16S rybosomalnego RNA (16S rRNA) oraz na badaniu polimorfizmu długości fragmentów po jego trawieniu enzymami restrykcyjnymi (ang. restriction fragment length polymorphism, RFLP).

W Europie, fitoplazmy są między innymi czynnikami sprawczymi ważnych gospodarczo chorób kwarantannowych drzew owocowych: proliferacji jabłoni, zamierania gruszy i europejskiej żółtaczki drzew pestkowych. Badania nad chorobami fitoplazmatycznymi roślin sadowniczych rozpoczęto w Polsce w latach 60. ub. wieku. Ich obiektem była proliferacja jabłoni, występująca ówczesnie w dużym nasileniu szczególnie na południu kraju (Kamińska i Zawadzka, 1970; Kamińska, 1973; Maszkiewicz, 1977; Maszkiewicz i in., 1979). Na początku lat 90. XX w., stosując metodę PCR-RFLP, wykazano, że sprawcą zamierania drzew gruszy w Polsce była fitoplazma z grupy fitoplazm proliferacji jabłoni (Malinowski i in., 1996). Badania dotyczące występowania i wykrywania fitoplazm w truskawce i roślinach z rodzaju *Rubus* (Cieślińska i Zawadzka, 2000; Cieślińska, 2001; Cieślińska, 2002) zapoczątkowały szereg prac, których celem była charakterystyka fitoplazm porażających wybrane gatunki roślin sadowniczych przeprowadzona na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu 16S rybosomalnego RNA (16S rRNA). Ważnym celem badawczym było również poznanie przyczyn dotychczas nieznanymi chorobami roślin sadowniczych i określenie ich związku z porażeniem roślin przez fitoplazmy. Obiektem badań były rośliny truskawki, maliny, jeżyny i mieszańców z rodzaju *Rubus*, drzewa czereśni, wiśni, śliwy, brzoskwini, moreli, nektaryny, jabłoni oraz krzewy leszczyny rosnące w sadach, na plantacjach produkcyjnych i doświadczalnych oraz pochodzące z upraw amatorskich zlokalizowanych w różnych regionach kraju.

Wykrywanie i różnicowanie fitoplazm porażających truskawkę

Badania dotyczące fitoplazm występujących na plantacjach truskawki prowadzone były w latach 2002-2004. Ich wyniki przedstawiłam w **publikacji 1** wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej (Cieślińska i in., 2006).

Truskawka porażana jest głównie przez fitoplazmy z grupy fitoplazmy żółtaczki astra (*Candidatus Phytoplasma asteris*, 16SrI), które wywołują m.in. zniekształcenia kwiatów prowadzące często do ich sterylności i niemal całkowitej utraty plonu. W badaniach wykorzystywano rośliny odmian: 'Mara des Bois', 'Tango', 'Evita', 'Selva', 'Venta', 'Senga Sengana' i klonu hodowlanego 97093 pochodzące z plantacji produkcyjnych i doświadczalnych zlokalizowanych w Polsce i na Litwie. Stosując technikę PCR-RFLP w sześciu roślinach truskawki wykryto fitoplazmy z podgrup A, B i C grupy żółtaczki astra. Wzory restrykcyjne fragmentu genu 16S rRNA fitoplazm odpowiadały profilom po trawieniu analogicznej sekwencji fitoplazm wykrytych w roślinach truskawki w Czechach (Fránová Honetšlegrova i in., 1996). Na podstawie wyników analizy sekwencji nukleotydów, potwierdzono bliskie pokrewieństwo fitoplazm porażających rośliny 'Mara des Bois', 'Tango', 'Evita' i 'Venta' z fitoplazmą zaklasyfikowaną do podgrupy B grupy żółtaczki astra. Analiza porównawcza wykazała, że sekwencje nukleotydów badanych izolatów fitoplazm były identyczne z sekwencjami izolatów Btsv4S.i.1 i Btsv2S.i.9 wydzielonych w Teksasie, USA ze skoczków *Scaphytopius irroratus* (numery dostępu GenBank: AY180952, AY180943). Sekwencja fragmentu genu 16S rRNA fitoplazmy z truskawki 'Selva' była identyczna z analogiczną sekwencją szczepu wzorcowego CHRG z chryzantemy z Teksasu, USA zaklasyfikowanego do podgrupy A grupy żółtaczki astra (numer dostępu GenBank: AY180956). Choć wyniki RFLP wskazywały na to, że roślina 'Senga Sengana' z Litwy była porażona przez fitoplazmę z podgrupy C, to jednak na podstawie analizy sekwencji dokonano weryfikacji tej klasyfikacji. Wykazano całkowitą zgodność sekwencji tego izolatu z sekwencją 16S rDNA *Strawberry phylloid fruit phytoplasma* (numer dostępu: AY102275), którą wykryto w truskawce w Zachodniej Wirginii w USA i zaklasyfikowano do nowo utworzonej w grupie żółtaczki astra podgrupy R (Jomantiene i in., 2002). W pracy będącej częścią rozprawy habilitacyjnej po raz pierwszy opisano występowanie fitoplazmy z tej podgrupy w Europie.

Wykrywanie i różnicowanie fitoplazm porażających krzewy z rodzaju *Rubus*

W latach 2002-2004 prowadzono badania, których celem była charakterystyka molekularna fitoplazm porażających rośliny z rodzaju *Rubus*. Wyniki tych prac przedstawiłam w **publikacji 2** wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej (Cieślińska, 2011a). Materiał badawczy stanowiły krzewy maliny czerwonej odmian 'Canby', 'Polka' i 'Veten', jeżyny (*R. fruticosus*) oraz mieszańców *loganberry* (*R. loganobaccus*) i *tayberry* (*R. loganobaccus* x *R. idaeus*). Na podstawie wyników PCR-RFLP oraz analizy porównawczej sekwencji nukleotydów fragmentu genu 16S rRNA wykazano, że krzewy odmian 'Canby', 'Polka' i 'Veten' oraz mieszańca *tayberry* były porażone przez fitoplazmę z podgrupy E grupy fitoplazmy żółtaczkki wiązu ('*Candidatus* Phytoplasma ulmi', 16SrV-E). Podobieństwo badanej sekwencji tych czterech izolatów wynosiło 99,7-99,9%. Analiza filogenetyczna wykazała, że tworzą one monofiletyczny klastery ze szczepem referencyjnym RS z *Rubus fruticosus* z Włoch (numer dostępu GenBank: Y16395) i są spokrewnione genetycznie z izolatem FD z *Vitis vinifera* z Francji (numer dostępu GenBank: X76560). Izolaty te, zaklasyfikowane do podgrupy E fitoplazmy żółtaczkki wiązu, są sprawcą karłowatości maliny, która w Europie jest jedną z najgroźniejszych chorób uprawnych i dziko rosnących krzewów maliny czerwonej (*Rubus idaeus*), jeżyny (*R. fruticosus*, *R. laciniatus*) i mieszańców tych gatunków. W Polsce, objawy tej choroby obserwowano na plantacjach maliny w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, jednak ze względu na ówczesny brak metod diagnostycznych, czynnik sprawczy nie został zidentyfikowany. Karłowatość maliny prowadzi do degeneracji roślin, a często nawet do ich zamierania. Ze względu na zmiany fizjologiczne w obrębie kwiatu plonowanie chorych krzewów jest znikome, a nieliczne dojrzewające owoce mają niską wartość handlową i konsumpcyjną. Sporadycznie rośliny z rodzaju *Rubus* mogą być też porażane przez fitoplazmy z grupy fitoplazm choroby X (16SrIII) lub żółtaczkki astra (16SrI). W Anglii, Davies (1998; 2000) wykrył w krzewach mieszańca *Rubus loganobaccus* fitoplazmę z grupy 16SrIII. Stosując metodę PCR-RFLP oraz analizę sekwencji nukleotydów genu 16S rRNA, w roślinie tego mieszańca stanowiącej przedmiot prezentowanych badań zidentyfikowano fitoplazmę należącą do podgrupy A grupy fitoplazmy choroby X. Na podstawie wyników analizy filogenetycznej badany izolat został zaklasyfikowany do jednego klastra ze szczepem referencyjnym CYE z koniczyny z Kanady (nr dostępu GenBank: L33766) fitoplazmy żółtaczkki brzegowej koniczyny (Clover yellow edge phytoplasma). Podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA obydwu izolatów wynosiło 99,8%. Fitoplazmy z grupy 16SrIII rzadko były wykrywane w roślinach sadowniczych

uprawianych w Europie. Znane są doniesienia o ich występowaniu na wiśni i czereśni na Litwie (Valiūnas i in., 2009) oraz na drzewach wiśni importowanych z USA do Włoch (Paltrinieri i in., 2001; Landi i in., 2007). Można domniemywać, że fitoplazma choroby X została zawleczona do naszego kraju wraz ze sprowadzonymi z Anglii sadzonkami *loganberry*. W trakcie swoich badań, w jednym z krzewów jeżyny (*Rubus fruticosus*) rosnącym w warunkach naturalnych zidentyfikowałam fitoplazmę z podgrupy B grupy fitoplazmy żółtaczkii astra (*Candidatus Phytoplasma asteris*, 16SrI-B). Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazałam wysokie podobieństwo (99,9% i 99,5%) badanej sekwencji z sekwencjami szczepów wzorcowych *Candidatus Phytoplasma asteris* OAY z wiesiołka z Michigan, USA (nr dostępu GenBank: M30790) oraz SAY z selera z Kalifornii, USA (nr dostępu GenBank: M86340). Fitoplazmę z podgrupy B grupy 16SrI zidentyfikowano również w krzewach jeżyny w Austrii, Wielkiej Brytanii i Pakistanie (Borroto Fernández i in., 2007; Reeder i in., 2010; Fahmeed i in., 2009).

Wykrywanie i różnicowanie fitoplazm porażających drzewa pestkowe

W latach 2002-2003 r. prowadzono badania nad przyczyną żółknięcia i zwijania się liści czereśni, brzoskwini, moreli i nektaryny rosnących w sadzie doświadczalnym Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Dąbrowicach. Wyniki prac przedstawiono w **publikacji 3** (Cieślińska i in., 2004) wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej. Analiza restrykcyjna fragmentu genu 16S rRNA wykazała, że badane drzewa były porażone przez fitoplazmę z grupy fitoplazmy żółtaczkii wiązu (*Candidatus Phytoplasma ulmi*, 16SrV). Fitoplazma ta nie była opisywana na drzewach pestkowych uprawianych w Europie. Przypuszczalnie pierwotnym źródłem tego patogena były sprowadzone z Chin drzewa moreli rosnące w przedmiotowym sadzie. Fitoplazmę *Candidatus Phytoplasma ziziphi* zaklasyfikowaną do grupy żółtaczkii wiązu wykryto w drzewach czereśni, moreli i ałyczy w Chinach (Lee i in., 1995a; Zhu i in. 1998; Yue i in., 2009; Hong i in., 2011) oraz brzoskwini w Indiach (Thakur i in., 1998).

W latach 2006-2009 prowadzono monitoring występowania fitoplazm w sadach drzew pestkowych zlokalizowanych w siedmiu województwach (świętokrzyskie, dolnośląskie, mazowieckie, łódzkie, lubelskie, lubuskie i wielkopolskie). Łącznie przebadano próby pobrane z 435 drzew pestkowych w tym: 145 czereśni, 121 brzoskwini, 102 wiśni, 38 moreli, 13 śliwy, 9 śliwy japońskiej oraz 5 nektaryny. Wyniki badań przedstawione zostały w **publikacji 4** wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej (Cieślińska i Morgaś, 2011).

Analiza PCR/RFLP wykazała obecność fitoplazm w 29 drzewach w tym: 6 czereśni, 3 wiśni, 11 brzoskwini, 4 moreli, 3 śliwy japońskiej i 2 nektaryny. Większość z badanych drzew (27) była porażona przez fitoplazmę europejskiej żółtaczki drzew pestkowych (*Candidatus Phytoplasma prunorum*, 16SrX-B). Stopień podobieństwa sekwencji fragmentu genu 16S rRNA badanych izolatów wynosił 99,7-99,9%, a analiza porównawcza wykazała ich bliskie pokrewieństwo z innymi przedstawicielami podgrupy B grupy fitoplazmy proliferacji jabłoni (w tym ze szczepem wzorcowym ESFY-G1 z brzoskwini z Badenii Wittenbergii w Niemczech, nr dostępu GenBank: AJ542544). W sekwencji nukleotydów analizowanego fragmentu badanych izolatów wykryto kilkanaście różnic, jednak większość z nich nie miała wpływu na odmienność uzyskanych wzorów restrykcyjnych. Mutacje punktowe w sekwencji nukleotydów w pozycjach 908 i 919 przekładały się na zmianę miejsc restrykcyjnych po trawieniu odpowiednio enzymami *RsaI* i *SspI*. W obrębie sekwencji GTAC znajduje się miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym *RsaI*, zatem w przypadku fitoplazmy porażającej większość chorych drzew występowało dodatkowe miejsce trawienia, którego nie było w sekwencji nukleotydowej fragmentu genu 16S rRNA fitoplazmy z nektaryny 'Super Queen' i czereśni 'Kordia'. Po hydrolizie przy użyciu enzymu *SspI* miejsce trawienia występowało tylko w przypadku fitoplazmy porażającej nektarynę 'Super Queen', której fragment sekwencji ATAT jest rozpoznawany przez ten enzym. Analogiczny fragment genu 16S rRNA fitoplazm wykrytych w pozostałych drzewach nie ulegał trawieniu enzymem *SspI*. Na podstawie analizy sekwencji stwierdzono, że fitoplazma wykryta w drzewie nektaryny 'Super Queen' jest genetycznie spokrewniona z fitoplazmą proliferacji jabłoni (*Ca. P. mali*, 16SrX-A) i na dendrogramie tworzy jeden klastery z jej referencyjnym szczepem AP15 z jabłoni z północnych Włoch (nr dostępu GenBank: AJ542541). Wymienione metody były stosowane również do identyfikacji fitoplazmy zamierania gruszy (*Ca. P. pyri*, 16SrX-C) w próbce z drzewa czereśni 'Kordia'. Sekwencja nukleotydów fragmentu 16S rDNA tego izolatu była identyczna z analogiczną sekwencją szczepu wzorcowego PD1 z gruszy z Badenii Wittenbergii, Niemcy (nr dostępu GenBank: AJ542543). Wyniki obydwu analiz, RFLP i sekwencji, były zgodne i świadczyły o występowaniu w badanych drzewach pestkowych spokrewnionych ze sobą fitoplazm: '*Ca. P. mali*', '*Ca. P. prunorum*', i '*Ca. P. pyri*' należących do podgrup A, B i C wyodrębnionych w grupie fitoplazmy proliferacji jabłoni (16SrX). We Włoszech, w Czechach i Słowenii również wykrywano w drzewach pestkowych fitoplazmy zaklasyfikowane do tych podgrup (Paltrinieri i in., 2001; Navratil i in., 2001, Fialova i in., 2004; Mehle i in., 2007).

Dodatkowo, do cyklu publikacji stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej włączone zostały dwie prace, w których dokonałam przeglądu literatury światowej na temat fitoplazm porażających drzewa pestkowe (**publikacje 5 i 6**). Najważniejszą chorobą fitoplazmatyczną roślin z rodzaju *Prunus* jest europejska żółtaczką drzew pestkowych (ang. European stone fruit yellows, ESFY), której objawami są: chlorotyczny liściozwój moreli, leptonekroza śliwy, żółtaczką brzoskwini oraz zamieranie śliwy, brzoskwini i migdała. Czynnikiem sprawczym ESFY jest fitoplazma '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' zaklasyfikowana do podgrupy B, grupy fitoplazmy proliferacji jabłoni (16SrX-B). Ze względu na swą szkodliwość, patogen ten zaliczany jest do organizmów kwarantannowych. Zakres roślin żywicielskich fitoplazmy, zasięg geograficzny występowania i objawy choroby, a także kwestie dotyczące przenoszenia patogena, metod stosowanych do jego wykrywania i identyfikacji oraz możliwości zapobiegania chorobie wywoływanej przez fitoplazmę omówiłam w **publikacji 5** wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej (Cieślińska, 2011b).

Badania prowadzone w kilku krajach Europy wykazały, że drzewa pestkowe mogą być również porażane przez fitoplazmę proliferacji jabłoni i fitoplazmę zamierania gruszy. Ponadto, w drzewach pestkowych uprawianych w różnych częściach świata wykryto fitoplazmy: żółtaczką astra, miotlastości orzeszków ziemnych, choroby X, żółtaczką wiązu, żółtaczką jesionu, miotlastości nikli indyjskiej i stołburu. Przegląd literatury dotyczącej rzadziej występujących fitoplazm drzew pestkowych, ich szkodliwości i diagnostyki, wektorów oraz sposobów zapobiegania infekcji zaprezentowałam w **publikacji 6** wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej (Cieślińska, 2011c).

Wykrywanie i różnicowanie fitoplazm porażających jabłoni

W 2010 r. rozpoczęto badania nad występowaniem i charakterystyką molekularną fitoplazm porażających jabłoni. Ich wyniki zostały przedstawione w **publikacji 7** wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej (Cieślińska i Kruczyńska, 2011). Próby pobrane ze 127 drzew badano na obecność fitoplazm stosując metodę PCR-RFLP i analizę sekwencji fragmentów genu 16S rRNA. W pięciu drzewach jabłoni ('Sampion', 'Elstar', 'Golden Delicious', 'Oliwka Żółta', 'Koksa Pomarańczowa') oraz dwóch drzewach nieznanymi odmianami wykryto fitoplazmę proliferacji jabłoni ('*Candidatus Phytoplasma mali*', 16SrX-A). Wzory restrykcyjne uzyskane dla fragmentów genomu fitoplazm pochodzących z tych drzew były takie same jak wzory po trawieniu analogicznego fragmentu wzorcowego szczepu AP15 fitoplazmy proliferacji jabłoni (16SrX-A), który jest najbardziej rozpowszechniony w Europie

(Jarausch i in., 2000; Kison i in., 1994). Wykazano zgodność analizowanej sekwencji nukleotydów badanych izolatów oraz szczepu referencyjnego AT z jabłoni z Niemiec (nr dostępu GenBank: X68375). Z kolei, w dwóch badanych w pracy jabłoniach ('Evelina' i 'Pinova'), wykazujących słabe objawy zaburzenia dominacji wierzchołkowej pędów, zidentyfikowano fitoplazmę żółtaczkii astra (16SrI-B). Analiza sekwencji oraz analiza filogenetyczna fragmentu genu 16S rRNA badanych izolatów wykazała ich bliskie pokrewieństwo ze szczepem referencyjnym OAY (numer dostępu GenBank: M30790) z podgrupy B grupy 16SrI. Fitoplazmę z tej grupy wykryto również w Czechach w drzewach z objawami gumowatości drewna (Bertaccini i in., 1998) i deformacją pędów (Fránová, 2005) oraz na Litwie w jabłoniach, na których obserwowano wyrastanie żółknących liści z pnia i proliferację pędów (Jomantiene i Davis, 2005).

Wykrywanie i różnicowanie fitoplazm porażających leszczynę

W 2008 r., próby pobrane z 22 krzewów leszczyny odmian Kataloński, Webba i Halle pochodzących z plantacji w południowo-wschodniej Polsce testowano na obecność fitoplazm. Na podstawie wyników badań uzyskanych metodami PCR-RFLP, analizy sekwencji i analizy filogenetycznej fragmentu genu 16S rRNA, stwierdzono, że pojedyncze rośliny wymienionych odmian były porażone przez '*Candidatus Phytoplasma asteris*' - fitoplazmę z podgrupy B grupy żółtaczkii astra (**publikacja 8** - Cieślińska i Kowalik, 2011 wchodząca w skład rozprawy habilitacyjnej). Wzory restrykcyjne po trawieniu fragmentu genu 16S rRNA badanych izolatów były charakterystyczne dla szczepu wzorcowego AY1 z kataranta różowego (nr dostępu GenBank: L33767) zaklasyfikowanego do podgrupy B grupy fitoplazmy żółtaczkii astra. Podobieństwo sekwencji nukleotydów tego fragmentu badanych izolatów i szczepu referencyjnego OAY z (nr dostępu GenBank: M30790) wynosiło 99,8%. Na podstawie analizy filogenetycznej fragmentu 16S rDNA badanych izolatów stwierdzono, że tworzą one jeden klastery. Uzyskane wyniki były w pewnym stopniu zbieżne z wynikami uzyskanymi przez Marcone i in. (1996) we Włoszech. Badacze ci, w leszczynie wykrywali fitoplazmy z grupy żółtaczkii astra, chociaż w większości chorych krzewów identyfikowali fitoplazmy z grupy proliferacji jabłoni, które w Europie najczęściej występują na roślinach tego gatunku.

Podsumowanie

- Efektem badań przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki PCR-RFLP i analizy sekwencji nukleotydów fragmentu genu 16S rRNA było zidentyfikowanie w roślinach sadowniczych fitoplazm zaklasyfikowanych do czterech grup 16Sr w tym:
 - fitoplazm z grupy żółtaczkii astra (16SrI, '*Candidatus Phytoplasma asteris*': podgrupa B w truskawce, jeżynie, leszczynie i jabłoni; podgrupa A i R w truskawce),
 - fitoplazmy choroby X (podgrupa A w grupie 16SrIII) w mieszańcu *Rubus loganobaccus*,
 - fitoplazm z podgrupy E (16SrV-E) grupy żółtaczkii wiązu ('*Candidatus Phytoplasma ulmi*') w czereśni, moreli, nektarynie, brzoskwini, malinie, jeżynie i mieszańcu *tayberry*,
 - fitoplazmy europejskiej żółtaczkii drzew pestkowych (16SrX-B, '*Candidatus Phytoplasma prunorum*') w czereśni, wiśni, brzoskwini, moreli i śliwie japońskiej,
 - fitoplazmy proliferacji jabłoni (16SrX-A, '*Candidatus Phytoplasma mali*') w jabłoni i nektarynie,
 - fitoplazmy zamierania gruszy (16SrX-C, '*Candidatus Phytoplasma pyri*') w czereśni.
- Po raz pierwszy w Polsce, wykazano obecność fitoplazm wywołujących europejską żółtaczkę drzew pestkowych, proliferację jabłoni i zamieranie gruszy w drzewach pestkowych oraz fitoplazmy żółtaczkii astra w jeżynie, leszczynie i jabłoni. Wykrycie na terenie naszego kraju fitoplazmy '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' wywołującej chorobę kwarantannową ma duże znaczenie poznawcze i praktyczne oraz uzasadnia prowadzenie wzmożonej kontroli fitosanitarnej i podejmowanie działań na rzecz uzyskiwania zdrowego materiału szkółkarskiego.
- Drugim z patogenów kwarantannowych będących przedmiotem rozprawy, jest '*Candidatus Phytoplasma mali*' wywołująca proliferację jabłoni, którą dotychczas w Polsce identyfikowano w jabłoniach na podstawie objawów chorobowych oraz wyników testów biologicznych lub serologicznych. W jednej z publikacji przedstawionych w rozprawie habilitacyjnej zaprezentowano rezultaty badań dotyczących wykrywania tej fitoplazmy metodami biologii molekularnej.
- Wykazano, że rośliny z rodzaju *Rubus* mogą być porażane przez fitoplazmy zaklasyfikowane do trzech grup: fitoplazmy żółtaczkii astra (16SrI), fitoplazmy choroby X (16SrIII) i fitoplazmy żółtaczkii wiązu (16SrV).
- Wykrycie w kilku gatunkach sadowniczych (czereśnia, jeżyna, jabłoń) fitoplazm, które dotychczas rzadko opisywano na tych roślinach dowodzi, że patogeny te są polifagami.

Przykładem jest fitoplazma proliferacji jabłoni zidentyfikowana w nektarynie, czy też wykryta w czereśni fitoplazma zamierania gruszy. Fitoplazmy z grupy żółtaczkii astra (16SrI) są najbardziej rozpowszechnione na świecie, lecz zakres ich roślin żywicielskich jest wciąż poznawany, o czym świadczy wykrycie fitoplazmy z tej grupy w krzewach jeżyny i leszczyny oraz w jabłoniach.

Cytowana literatura

1. Bertaccini A., Vibio M., Janecková M., Fránová-Honetslegrová J. 1998. Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms. *Acta Hort.*, 472: 693-700.
2. Borroto Fernández E.G., Calari A., Hanzer V., Katinger H., Bertaccini A., Laimer M. 2007. Phytoplasma infected plants in Austrian forests: role as a reservoir? *Bull. Insectol.* 60(2): 391-392.
3. Cieślińska M. 2001. Preliminary results on detection of phytoplasmas associated with small fruit diseases in Poland. *Acta Hort.*, 551: 87-92.
4. Cieślińska M. 2002. Choroby wirusowe i fitoplazmatyczne na plantacjach truskawki w Polsce. *Progr. Plant Protect./Post. Ochr. Rośl.*, Vol. 42 (2): 815-817.
5. Cieślińska M., Zawadzka B. 2000. Occurrence and identification of strawberry green petal phytoplasma. *IOBC wprs Bulletin*, 23 (11): 131-132.
6. Davies D., 1998. The occurrence of two distinct phytoplasma isolates associated with *Rubus* species in the UK. *Acta Hort.* 471: 63-65.
7. Davies D. 2000. The occurrence of two phytoplasmas associated with stunted *Rubus* species in the UK. *Plant Pathol.*, 49: 86-88
8. Fahmeed F., Rosete Y.A. Pérez, K.A. Boa, E., Lucas J. 2009. First report of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' (group 16SrI) infecting fruits and vegetables in Islamabad, Pakistan. *J. Phytopathol.*, 157: 639-64.
9. Fialová R., Navrátil M., Válová P., Lauterer P., Kocourek F., Poncarová-Voráčková Z. 2004. Epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in the Czech Republic. *Acta Hort.* 657: 483-487.
10. Fránová J. 2005. The occurrence of phytoplasmas in apple trees showing branch twisting. *J. Phytopathology*, 153: 384-388.
11. Fránová Honetšlegrova J., Vibio M., Bertaccini A. 1996. Electron microscopy and molecular identification of phytoplasmas associated with strawberry green petals in the Czech Republic. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 831-835.

12. Hong M., Zhang C., Li Z., Zhang J., Zhao Z., Song J., Wu Y. 2011. Identification of Elm yellows phytoplasma in plum trees in China. *J. Phytopathol.* 159 (1): 57–59.
13. Jarausch W., Saillard C., Heliott B., Garnier M., Dosba F. 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasma as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. *Mol. Cell. Probes*, 14: 17-24.
14. Jomantiene R., Davis R.E. 2005. Apple sessile leaf: a new disease associated with a ‘Candidatus *Phytoplasma asteris*’ subgroup 16SrI-B phytoplasma in Lithuania. *Plant Pathology*, 54: 237.
15. Jomantiene R., Maas J., Davis R. E. 2002. Molecular identification and classification of Strawberry phylloid fruit phytoplasma in group 16SrI, new subgroup R. In: GeneBank Accession No: AY102275.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>.
16. Kamińska M. 1973. Przebieg procesu chorobowego u młodych jabłoni porażonych proliferacją jabłoni. *Acta Agrobot.* 26: 103-113.
17. Kamińska M., Zawadzka B. 1970. Badania nad proliferacją (miotlastością) jabłoni w Polsce. I. Objawy chorobowe, porażone odmiany i występowanie. *Acta Agrobot.* 23: 329-340
18. Kison H., Schneider B., Seemüller E. 1994. Restriction fragment length polymorphism within the apple proliferation mycoplasma-like organism. *J. Phytopathol.*, 141: 395-401.
19. Landi F., Prandini A., Paltrinieri S., Mori N., Bertaccini A. 2007. Detection of different types of phytoplasmas in stone fruit orchards in northern Italy. *Bull. Insectol.*, 60(2):163-164
20. Lee I.M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D.E. 1995. Detection of multiply phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, 85: 728-735.
21. Malinowski T., Żandarski J., Komorowska B., Zawadzka B., 1996. Application of DAPI staining and PCR amplification of DNA for the identification of pear decline phytoplasma in declining trees in Poland. *Phytopathol. Pol.* 12: 103-110.
22. Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. 1996. Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. *Plant Pathol.*, 45(5): 857–863

23. Maszkiewicz J., Błaszczak W., Millikan D.F. 1979. Investigation on the apple proliferation disease I. Increased susceptibility of affected leaf tissue to *Podosphaera leucotricha*. *Phytoprotection* 60 (1): 47-54
24. Maszkiewicz J. 1977. Dalsze badania nad zależnością pomiędzy proliferacją jabłoni i mączniakiem *Podosphaera leucotricha* (Ell. Et Ev.) Salm. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 195: 205-206.
25. Mehle N., Brzin J., Boben J., Hren M., Frank J., Petrovič N., Gruden K., Dreo T., Žežlina I., Seljak G., Ravnikar M. 2007. First report of 'Candidatus Phytoplasma mali' in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. *Plant Pathol.* 56 (4): 721.
26. Navrátil M., Válová P., Fialová R., Petrová K., Fránová J., Nebesářová J., Poncarová-Voráčková Z., Karešová R. 2001. Survey for stone fruit phytoplasmas in Czech Republic. *Acta Hort.* 550: 377–382.
27. Paltrinieri S., Martini M., Stefani E., Pondrelli M., Fideghelli C., Bertaccini A. 2001. Phytoplasma infection in peach and cherry in Italy. *Acta Hort.* 550: 365–370.
28. Reeder R., Kelly P.L., Arocha Y. 2010. 'Candidatus Phytoplasma asteris' identified in blackberry (*Rubus fruticosus* agg.) in the United Kingdom. *Plant Pathology*, 59: 394.
29. Thakur P.D., Handa A., Chowfla S.C., Krczal G. 1998. Outbreak of a phytoplasma disease of peach in the Northwestern Himalayas of India. *Acta Hort.* 472: 737–742.
30. Valiūnas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Abraitis R., Graiciuno V., Staniene G., Zhao Y., Davis R.E. 2009. First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania. *Plant Dis.*, 93(5):550
31. Yue H.N., Sun R.H., Wei T., Wu Y.F. 2009. First report of a 16SrV-B group phytoplasma associated with a leafroll-type disease of apricots in Northern China. *J. Plant Pathol.* 91 (2): 500.
32. Zhu S.F., Hadidi A., Gundersen D.E., Lee I.M., Zhang C.L. 1998. Characterization of the phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches'-broom in China. *Acta Hort.* 472: 701–714.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Działalność naukową rozpoczęłam w 1988 roku, po zatrudnieniu mnie na stanowisku asystenta w Pracowni Wirusologii Zakładu Ochrony Roślin Sadowniczych w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach. Początkowo, pod kierunkiem dr Barbary Zawadzkiej, prowadziłam badania nad występowaniem chorób wirusowych truskawek w 12 rejonach Polski. Przeprowadziłam lustracje 108 plantacji truskawki, z których pobierałam próby do testów biologicznych na obecność wirusów. Badania wykazały, że około 6% testowanych roślin odmian ‘Senga Sengana’ i ‘Redgauntlet’, powszechnie uprawianych w tym czasie, było porażonych wirusem cętkowanej plamistości liści truskawki (*Strawberry mottle virus*, SMOV). Wyniki prac zostały przedstawione w dwóch oryginalnych publikacjach naukowych [IV.1.1, IV.1.2]. Następnie, rozpoczęłam badania nad rozprzestrzenianiem się SMOV na plantacji ‘Senga Sengana’, ‘Kama’ i ‘Dukat’. Część z roślin zaplanowanych do założenia doświadczenia inokulowano SMOV przez szczepienie liści. W zależności od odmiany, po trzech latach prowadzenia badań, 36,7-53,3% pierwotnie zdrowych roślin truskawki zostało zakażonych wirusem. Plon owoców z roślin porażonych wirusem był o 5-41% niższy, niż uzyskany ze zdrowych krzewów. Na poletkach doświadczalnych zidentyfikowano cztery gatunki mszyc: *Aphis forbesi*, *Amphorophora rubi*, *Acyrtosiphon pelargonii rogersi* i *Aulacorthum solani* będących wektorami wirusów. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy naukowej [IV.1.5]. W latach 1999-2001, mając na uwadze znaczenie truskawki w produkcji sadowniczej oraz zmieniającą się w Polsce strukturę uprawianych odmian, podjęłam dalsze badania dotyczące występowania wirusów i fitoplazm na plantacjach roślin tego gatunku. Lustracje były prowadzone na plantacjach owocujących i matecznych truskawki w województwach: pomorskim, kujawsko-pomorskim, wielkopolskim, mazowieckim, łódzkim, dolnośląskim, lubelskim, podlaskim, podkarpackim i małopolskim. Testy biologiczne wykonane na próbach pobranych z różnych odmian wykazały, że 15,6% roślin truskawek spośród 793 badanych było porażonych wirusem cętkowanej plamistości liści truskawki. Większość chorych truskawek pochodziło z plantacji zlokalizowanych na południu Polski. Niektóre rośliny wykazywały objawy charakterystyczne dla chorób wywoływanych przez fitoplazmy. Obecność tych patogenów potwierdzona została testem PCR. Wyniki badań dotyczących występowania wirusów i fitoplazm na plantacjach truskawki zostały opublikowane w oryginalnej pracy naukowej [IV.1.9].

W latach 1992-1994 byłam głównym wykonawcą projektu KBN PB-439/53/92/03 pt. “Badanie szczepów wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) występujących w

Polsce. Opracowanie metod wykrywania i identyfikacji”. Wyniki badań zostały opublikowane w czterech oryginalnych pracach naukowych [IV.1.3, IV.1.6, IV.1.7] i były podstawą do przygotowania mojej pracy doktorskiej pt. “Charakterystyka i metody wykrywania wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (ACLSV) w drzewach owocowych”, którą wykonałam w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach pod kierunkiem prof. dr hab. Marianny Kamińskiej. Po doktoracie kontynuowałam prace badawcze dotyczące ACLSV, a uzyskane wyniki przedstawione zostały w trzech publikacjach naukowych [IV.1.12, IV.1.23, IV.1.25]. W jednej z nich wykazano zróżnicowanie właściwości serologicznych i molekularnych izolatów ACLSV pochodzących z brzoskwini, czereśni i jabłoni z Bułgarii. Izolaty te różniły się zarówno między sobą, a także miały inne właściwości niż polskie izolaty wirusa. Kolejne badania dotyczyły wpływu ACLSV na wysokość plonu oraz jakość owoców jabłoni ‘Golden Delicious’ i ‘Szampion’. Prowadzono je w ramach projektu Akcji COST 924 „Enhancement and preservation of quality and health promoting components in fresh fruits and vegetables” (2004-2008). Badane parametry jakościowe obejmowały średni plon i masę owoców, procentowy udział powierzchni rumieńca, ordzawienie skórki, zawartość ekstraktu, indeks skrobiowy, kwasowość owoców i jędrność miąższu. Średni plon owoców uzyskany z jabłoni wolnych od wirusa był istotnie wyższy, a owoce ze zdrowych drzew obydwu odmian miały większą masę, niż z drzew porażonych przez ACLSV. Badania wykazały również różnice jakościowe pomiędzy owocami z drzew zdrowych i chorych.

Od 1997 r. prowadziłam prace dotyczące wpływu termoterapii i chemioterapii *in vitro* na eliminację wirusów występujących w roślinach sadowniczych. Celem badań było uwolnienie od wirusów kultur pędowych następujących gatunków roślin sadowniczych:

- jabłoni od ACLSV i wirusa żłobkowatości pnia jabłoni (*Apple stem grooving virus*, ASGV),
 - gruszy od ACLSV,
 - maliny od wirusa chlorozy nerwów (*Raspberry vein chlorosis virus*, RVCV),
 - *Fragaria virginiana* od SMoV,
 - ałyczy od ACLSV i wirusa nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni (*Prunus necrotic ring spot virus*, PNRSV),
 - śliwy od PNRSV oraz czereśni od wirusa karłowatości śliwy (*Prune dwarf virus*, PDV).
- Proliferyjące kultury poddawano przez kilka tygodni działaniu temperatury 37°C (termoterapia) i/lub preparatu Virazole® (ribawirina, 1-B-D ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) dodawanego do pożywki w dawkach 10, 25, 50 i 100 mg l⁻¹ (chemioterapia).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że skuteczność termoterapii zależała od wirusa i gatunku rośliny, z której były założone kultury pędowe. W większości przypadków, efektywną metodą eliminacji tych patogenów było jednoczesne stosowanie termoterapii i aplikowanie do pożywki Virazole® w dawkach 25 lub 50 mg l⁻¹. Preparat ten stosowany w ilości 100 mg l⁻¹ działał fitotoksycznie. Wyniki badań nad uwalnianiem roślin sadowniczych od wirusów *in vitro* opublikowane zostały w pięciu oryginalnych pracach naukowych [IV.1.8, IV.1.11, IV.1.14, IV.1.24, IV.1.30].

W latach 2000-2002 byłem koordynatorem ze strony polskiej projektu QLRT-PL99-1553 „Improved diagnostic tools for the certification of strawberry propagation material” realizowanego w ramach 5. Programu Ramowego Unii Europejskiej. Celem badań było opracowanie metod wykrywania najważniejszych wirusów truskawki: cętkowanej plamistości liści (SMoV), marszczycy (SCV), otaśmienia nerwów liści (SVBV) oraz łagodnej żółtaczk brzegowej liści (SMYEV) z wykorzystaniem technik RT-PCR i amplifikacji kwasów nukleinowych w czasie rzeczywistym (AmpliDet RNA). Wspólnie z dr M. Klerksem i dr C. Schoenem z Plant Research International BV w Wageningen w Holandii, wykonałam testy RT-PCR i AmpliDet RNA, w wyniku których w próbach z 37 roślin pochodzących z Polski i Litwy (współpraca z dr J. Stankiene z Litewskiego Instytutu Ogrodnictwa w Babtai) zidentyfikowano wirusa cętkowanej plamistości liści truskawki. Opracowana w ramach projektu metoda RT-PCR znalazła zastosowanie w rutynowej diagnostyce chorób wirusowych truskawki stanowiąc alternatywę dla pracochłonnych i czasochłonnych testów biologicznych. W kolejnych badaniach prowadzonych w ramach 5. Programu Ramowego UE, na podstawie objawów chorobowych wywoływanych na kilkunastu gatunkach roślin zielnych wykazano zróżnicowanie właściwości wybranych izolatów SMoV. Wyniki tych badań opublikowane zostały w dwóch pracach naukowych [IV.1.17, IV.1.20].

W latach 2002-2004 byłem kierownikiem projektu własnego KBN 3 PO6A 024 22 pt. “Właściwości biologiczne i molekularne fitoplazm porażających rośliny jagodowe. Udoskonalenie metod wykrywania i identyfikacji badanych fitoplazm”. Wyniki badań związanych z występowaniem i charakterystyką molekularną fitoplazm porażających truskawkę oraz krzewy z rodzaju *Rubus* zostały zaprezentowane w pracach będących częścią rozprawy habilitacyjnej [IV.1.22, IV.1.33].

W latach 2003-2008 brałam udział w badaniach dotyczących wykrywania mało znanych w Polsce wirusów drzew pestkowych. Prace te, początkowo prowadzone w ramach działalności statutowej, były kontynuowane podczas realizacji projektu KBN, nr 2P06A 016 29 pt.

„Występowanie, wykrywanie, i charakterystyka sekwencji genu białka płaszczka mało znanych w Polsce wirusów wiśni i czereśni”, w którym byłam głównym wykonawcą. Wyniki badań, mających na celu wykrywanie i przeprowadzenie charakterystyki molekularnej izolatów wirusa czereśni A (*Cherry virus A*), wirusa drobnienia czereśni-1 i -2 (*Little cherry virus-1, -2*) oraz wirusa zielonej pierścieniowej pstrości czereśni (*Cherry green ring mottle virus, CGRMV*) w drzewach rosnących głównie w sadach doświadczalnych i kolekcyjnych zostały opublikowane w czterech pracach naukowych [IV.1.19, IV.1.21, IV.1.26, IV.1.27].

W latach 2006-2007 brałam udział w międzynarodowym projekcie „European ring test for the evaluation of three duplex protocols for virus detection in fruit trees”, kierowanym przez dr Sebastiena Massarta z Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx) w Belgii. Projekt ten był realizowany w dziewięciu europejskich laboratoriach i miał na celu analizę przydatności metody duplex-RT-PCR do wykrywania kompleksu następujących wirusów: wirusa karłowatości śliwy i wirusa nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni (PDV/PNRSV), wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni i wirusa mozaiki jabłoni (ACLSV/ApMV) oraz wirusa żółtkowatości pnia jabłoni i wirusa jamkowatości pnia jabłoni (ASGV/ASPV). Czułość, specyficzność i powtarzalność testów wykonywanych w różnych ośrodkach były bliskie 90%, a uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania metody w rutynowych testach do jednoczesnego wykrywania dwóch wirusów drzew owocowych. Wyniki wspólnych doświadczeń zostały opublikowane w oryginalnej pracy naukowej [IV.1.28].

W latach 2006-2009 kierowałam projektem MNiSW, nr 2 P06A 028 30 pt. „Występowanie, wykrywanie i charakterystyka właściwości biologicznych i molekularnych patogenów wirusopodobnych drzew pestkowych”. Badania prowadzone z zastosowaniem różnych technik biologii molekularnej (PCR-RFLP, sekwencjonowanie, hybrydyzacja molekularna) i testów biologicznych wykazały, że ok. 6% drzew pestkowych spośród 430 testowanych było porażonych przez fitoplazmy. Podczas lustracji sadów, ze 167 drzew brzoskwini, moreli i nektaryny pobrano również próby do badań na obecność utajonego wiroida mozaiki brzoskwini (*Peach latent mosaic viroid, PLMVd*). Wiroida wykryto w 46 drzewach, w tym w 40 drzewach brzoskwini, spośród których znaczna część była uprawiana w rejonie Sandomierza. Wyniki prac dotyczących charakterystyki molekularnej fitoplazm występujących w drzewach pestkowych zostały przedstawione w jednej z publikacji będących częścią rozprawy habilitacyjnej [IV.1.34].

Mój dorobek publikacyjny obejmuje 37 oryginalnych prac twórczych (z czego w 28 publikacjach jestem pierwszym lub jedynym autorem), 8 prac przeglądowych, 20 doniesień na konferencje i sympozja międzynarodowe, 41 doniesień na konferencje krajowe, 62 artykuły popularno-naukowe oraz współautorstwo w trzech wydawnictwach zbiorowych (Załączniki IV i VI). Byłam współwykonawcą projektów międzynarodowych (Akcje COST i 5. Program Ramowy Unii Europejskiej), kierownikiem trzech projektów własnych KBN i MNiSW, głównym wykonawcą lub współwykonawcą trzech projektów własnych KBN. Obecnie jestem kierownikiem projektu niewspółfinansowanego MNiSW realizowanego w ramach Akcji COST FA0807 oraz projektu badawczego z zakresu badań podstawowych uzyskanego w I. Konkursie Narodowego Centrum Nauki. Kieruję zadaniem 7.5 Programu Wieloletniego MRiRW realizowanego w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz koordynuję badania prowadzone w ramach programu statutowego S 5 pt. „Choroby wirusowe i wirozopodobne roślin ogrodniczych”.

Jolanta Krawiec