



University of Białystok
Faculty of Biology

Piotr Iwaniuk

**Study of selected crop plants responses in the pesticide –
biostimulator – pathogen system**

PhD dissertation

Supervisor: Prof. Bożena Łozowicka

Białystok 2023

Streszczenie

Rośliny uprawne odgrywają kluczowe znaczenie w zapewnieniu bezpieczeństwa żywnościowego społeczeństwa. W grupie roślin zbożowych, pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum*) jest rośliną uprawną o kluczowym znaczeniu w gospodarce człowieka, która jest wykorzystywana przede wszystkim do celów konsumpcyjnych. Natomiast wśród warzyw liściastych, sałata siewna (*Lactuca sativa*) jest powszechnie uprawianą rośliną alimentacyjną, która stanowi bogate źródło błonnika, składników mineralnych oraz witamin. Jednakże presja ze strony agrofagów (patogenów, chwastów i szkodników) negatywnie wpływa na zdrowotność roślin i utrudnia zapewnienie stabilnych oraz wysokojakościowych plonów. W celu ochrony roślin uprawnych przed patogenami grzybowymi, stosuje się fungicydy, które pomimo korzystnej roli w ochronie roślin, są czynnikami stresu abiotycznego i mogą wpływać na zmiany profilu metabolitów roślin uprawnych. Powszechnie występującym patogenem grzybowym w uprawie sałaty jest *Botrytis cinerea*, będący czynnikiem etiologicznym szarej pleśni, natomiast w uprawie pszenicy dominują grzyby z rodzaju *Fusarium* (w tym *Fusarium culmorum*), odpowiadające m.in. za fuzariozę kłosów. Ponadto, występowanie patogenów stanowi stres biotyczny i negatywnie oddziałuje na rośliny, prowadząc do pogorszenia cech jakościowych plonu oraz zmian metabolicznych. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie biostymulatorami, czyli związkami niezagrażającymi środowisku, które mogą poprawić wzrost i kondycję roślin, zwłaszcza w niekorzystnych warunkach klimatycznych i glebowych. Jednak istnieją nieliczne doniesienia naukowe przedstawiające wielowymiarowe badania reakcji roślin uprawnych w układzie pestycyd – biostymulator – patogen na poziomie metabolitów roślin.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była kompleksowa analiza reakcji dwóch roślin uprawnych, powszechnie wykorzystywanych do celów konsumpcyjnych, z grupy warzyw liściastych (*Lactuca sativa*) i zbóż (*Triticum aestivum*) na oddziaływanie pestycydów, biostymulatorów i grzybów patogenicznych (*Botrytis cinerea* i *Fusarium culmorum*). Ponadto, celem pracy było określenie roli biostymulatorów organicznych i nieorganicznych w łagodzeniu stresu abiotycznego, indukowanego pestycydami oraz stresu biotycznego, powodowanego obecnością grzybów patogenicznych, a także wpływu biostymulatorów i patogenów na dynamikę zanikania pestycydów w roślinach.

Powyższe cele zostały zrealizowane poprzez kompleksowe badania naukowe i analizy statystyczne. W ramach badań do pracy doktorskiej przeprowadzono doświadczenia w

warunkach kontrolowanych oraz wykorzystano nowoczesny warsztat analityczny, uwzględniający techniki spektrofotometryczne oraz chromatografię cieczową i gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC – GC – MS/MS).

W trakcie badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej uzyskano odmienną odpowiedź roślin jedno i dwuliściennych na stres abiotyczny i biotyczny.

Wykazano, że oddzielne zastosowanie dwóch fungicydów: anilinowego (fluazynam) z fungicydami chinonowym (ditianon) lub guanidynowym (dodyna) w sałacie wpłynęło na wzmożoną biosyntezę karotenoidów, białka i związków fenolowych oraz obniżenie stężenia węglowodanów, w porównaniu do aplikacji jednego fungicydu. Zastosowane fungicydy indukowały aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, peroksydazy NADH – zależnej i dysmutazy ponadtlenkowej), nieenzymatycznych antyoksydantów (glutation i askorbinian) oraz zwiększały potencjał antyoksydacyjny, wyrażony aktywnością rodnika DPPH. Jednakże nie wykazano wyższej aktywności markerów stresu oksydacyjnego, za wyjątkiem askorbinianu w łagodzeniu stresu abiotycznego, spowodowanego oddzielnym zastosowaniem dwóch fungicydów (ditianon + fluazynam lub dodyna + fluazynam), w porównaniu do pojedynczych związków (fluazynam, ditianon, dodyna). Obecność drugiej substancji czynnej w sałacie wpłynęła na wydłużenie czasu połowicznego rozkładu (DT_{50}) fluazynamu oraz skrócenie czasu degradacji ditianonu i dodyny.

Do kolejnego badanego układu wprowadzono fungicyd azoksystrobinę i przeprowadzono inokulację roślin sałaty grzybem patogenicznym *B. cinerea*. Wykazano, że łączne oddziaływanie stresu abiotycznego, spowodowanego zastosowaniem fungicydów (azoksystrobiny lub fluazynamu) oraz biotycznego (*B. cinerea*), nasiliło spadek stężenia chlorofili i karotenoidów oraz wzrost poziomu węglowodanów, związków fenolowych i białka, w porównaniu do roślin nieinokulowanych, na które aplikowano fungicydy. Wykazano, że oddziaływanie stresu abiotycznego i biotycznego indukuje aktywność enzymów antyoksydacyjnych (zwłaszcza katalazy i peroksydazy NADH – zależnej) oraz stężenie askorbinianu, w porównaniu do roślin nieinokulowanych, poddanych stresowi abiotycznemu. Zanotowano zróżnicowany poziom analizowanych metabolitów w zależności od stężenia fungicydów w trakcie ich degradacji (dynamiki zanikania). Ponadto, ustalono, że grzyb patogeniczny *B. cinerea* wpływa na dynamikę zanikania fungicydów, skracając czas połowicznego rozkładu azoksystrobiny, a wydłużając zanikanie fluazynamu.

W kolejnych badaniach przeprowadzonych w roślinach pszenicy zastosowano układy z biostymulatorami. Wykazano, że biostymulatory nieorganiczne oparte na związkach krzemu i tytanu łagodzą stres abiotyczny, wywołany działaniem fungicydów należących do grupy

spiroketalamin (spiroksamina) i triazoli (cyprokonazol, propikonazol, tebukonazol, triadimenol), na poziomie białka, węglowodanów i związków fenolowych w ziarnie, co odzwierciedla wzrost stężenia tych związków w wyniku aplikacji biostymulatorów, w porównaniu do analogicznych zabiegów bez ich zastosowania. Wskazane oddziaływanie biostymulatorów jest wyrażone także wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i peroksydazy NADH – zależnej). Związki tytanu i krzemu poprawiły odżywianie fosforanowe poprzez spadek aktywności kwaśnych fosfataz, których indukcja jest charakterystyczna w warunkach niedoboru przyswajalnych form fosforu. Biostymulatory zredukowały również skażenie ziarna pszenicy mykotoksynami. Na podstawie wielowymiarowych analiz statystycznych wyrażonych analizą głównych składowych oraz współczynnikami korelacji Pearsona, wykazano, że stężenie aminokwasów takich jak fenyloalanina, arginina, kwas asparaginowy, izoleucyna, tyrozyna i kwas glutaminowy jest dodatnio skorelowane z aktywnością enzymów: katalazy oraz peroksydazy NADH – zależnej, dlatego mogą one stanowić materiał budulcowy dla białek o charakterze obronnym przed stresem abiotycznym. Ponadto, wykazano, że biostymulatory tytanowy i krzemowy zredukowały czas połowicznego rozkładu (DT_{50}) fungicydów, takich jak spiroksamina, tebukonazol i triadimenol, natomiast związki tytanu wpłynęły na szybszą degradację fungicydu propikonazol, co ma kluczowe znaczenie w optymalizacji terminu aplikacji i okresu karencji pestycydów.

Do kolejnego badanego układu pestycyd – biostymulator w pszenicy wprowadzono herbicyd sulfonilomocznikowy (sulfosulfuron) oraz przeprowadzono inokulację grzybem patogenicznym *F. culmorum*. Oddziaływanie herbicydu sulfosulfuronu, fungicydów z grupy spiroketalamin i triazoli oraz organicznych biostymulatorów (opartych na kwasach humusowych i nitrofenolach) skutkowało odmienną reakcją na poziomie części analizowanych metabolitów. Oddziaływanie stresu biotycznego (*F. culmorum*) i abiotycznego (pestycydy) oraz nitrofenoli wpłynęło na obniżoną zawartość białka, węglowodanów i związków fenolowych w ziarnie pszenicy, w porównaniu do zastosowania kwasów humusowych w roślinach inokulowanych, poddanych aplikacji pestycydów. Oddziaływanie pestycydów i kwasów humusowych w największym stopniu zmniejszyło aktywność kwaśnych fosfataz. Wykazano także, że enzymy: katalaza i peroksydaza NADH – zależna warunkowały łagodzenie stresu abiotycznego, wywołanego herbicydem sulfonilomocznikowym oraz fungicydami. Jednak tylko w przypadku katalazy wykazano indukcję jej aktywności w układzie pestycyd – biostymulator – patogen. Ponadto, stres biotyczny w roślinach pszenicy wpłynął na skrócenie czasu połowicznego rozkładu fungicydów, takich jak cyprokonazol, spiroksamina i

triadimenol. Oddziaływanie kwasów humusowych lub nitrofenoli w roślinach poddanych stresowi biotycznemu i abiotycznemu skutkowało wzmożonym skróceniem okresu degradacji herbicydu sulfosulfuronu oraz fungicydów: propikonazolu, cyprokonazolu, spiroksaminy i tebukonazolu, w porównaniu do oddziaływania biostymulatorów organicznych z pestycydami w roślinach nieinokulowanych.

W wyniku przeprowadzonych badań w warunkach kontrolowanych wykazano zróżnicowane reakcje roślin uprawnych w układzie pestycyd – biostymulator – patogen. Poziom metabolitów może podlegać okresowym fluktuacjom w zależności od gatunku rośliny uprawnej, rodzaju i stężenia pestycydu, zastosowania biostymulatorów, a także obecności grzybów patogenicznych. Wykazano, że markery stresu oksydacyjnego mają kluczowe znaczenie w łagodzeniu stresu wywołanego zastosowaniem środków ochrony roślin, a ich aktywność jest związana z dynamiką zanikania pestycydów. Biostymulatory organiczne/nieorganiczne spowodowały łagodzenie stresu abiotycznego/biotycznego w roślinach uprawnych i zwiększyły stężenie części pożądaných metabolitów. Ponadto, grzyby patogeniczne i biostymulatory mogą oddziaływać na dynamikę zanikania pestycydów, co ma kluczowy wpływ na okres ich karencji w roślinach uprawnych przeznaczonych do spożycia. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały korelacje pomiędzy częścią badanych związków w zastosowanych konfiguracjach eksperymentalnych. Wyniki niniejszej pracy doktorskiej rzucają nowe światło na reakcje roślin uprawnych w układzie pestycyd – biostymulator – patogen i mogą być implementowane do praktyki rolniczej.

mgr Piotr Iwaniuk