

AUTOREFERAT

DR JAKUB BARANEK

Zakład Mikrobiologii

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

1. Imię i nazwisko.

Jakub Baranek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe ~~lub artystyczne~~ – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

06.2014 – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biotechnologii-mikrobiologii

Podmiot nadający stopień: Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Aktywność owadobójcza białek Vip3A *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników z rzędu Lepidoptera żerujących na roślinach”

Praca realizowana w Zakładzie Mikrobiologii (Wydział Biologii, UAM)

Rozprawa doktorska z wyróżnieniem.

Skan dyplomu dostępny jest w **załączniku 9**.

06.2009 – dyplom magistra biologii

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Tytuł pracy magisterskiej: „Toksyczność białek Cry *Bacillus thuringiensis*”

Wyróżnienie za wyniki w nauce przyznane w dniu absolutorium

07.2007 – dyplom licencjata biologii, specjalność: biologia eksperymentalna

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Tytuł pracy licencjackiej: „Właściwości toksyczne *Bacillus thuringiensis* dla owadów”

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych ~~lub artystycznych~~.

10.2014 – obecnie; adiunkt (stanowisko badawczo-dydaktyczne); Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; obszary: mikrobiologia, biotechnologia, ochrona roślin przed szkodnikami

05.2015-11.2015; post-doc; Charles Sturt University (Graham Centre for Agricultural Innovation), Locked Bag 588, 2678 Wagga Wagga, NSW, Australia; obszary: biologiczna kontrola szkodników, mykologia, biologia molekularna

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Aktywność owadobójcza *Bacillus thuringiensis* wobec ważnych pod względem ekonomicznym szkodników z rzędu Lepidoptera

4.2. Publikacje wchodzące w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych:

- 1) **Baranek J.***, Pluskota M., Rusin M., Konecka E., Kaznowski A., Wiland-Szymańska J. (2023). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from tropical greenhouses towards *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua* larvae. BioControl doi: 10.1007/s10526-022-10173-3
[IF₂₀₂₁ = 2,581; IF_{5y} = 3,265; MEiN = 100 pkt; kwartył: Q1]
- 2) **Baranek J.***, Jakubowska M., Gabala E. (2023). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* towards *Agrotis exclamationis* larvae—A widespread and underestimated pest of the Palearctic zone. PLoS ONE 18(3): e0283077.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283077>
[IF₂₀₂₁ = 3,752; IF_{5y:2021} = 4,069; MEiN = 100 pkt; kwartył: Q1]
- 3) **Baranek J.***, Banaszak M., Kaznowski A., Lorent D. (2021). A novel *Bacillus thuringiensis* Cry9Ea-like protein with high insecticidal activity towards *Cydia pomonella* larvae. Pest Manag Sci 77(3):1401-1408. doi: 10.1002/ps.6157
[IF₂₀₂₁ = 4,463; IF_{5y} = 4,689; MEiN = 140 pkt; kwartył: Q1]
- 4) **Baranek J.***, Banaszak M., Lorent D., Kaznowski A., Konecka E. (2021). Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2 and Vip3 toxin combinations in *Spodoptera exigua* control: highlights on synergism and data scoring. Entomol Gen 41: 71-82. doi: 10.1127/entomologia/2020/995
[IF₂₀₂₁ = 6,608; IF_{5y:2021} = 4,803; MEiN = 70 pkt; kwartył: Q1]

- 5) **Baranek J.***, Pogodziński B., Szipluk N., Zielezinski A. (2020). TOXiTAXi: a web resource for toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein compositions towards species of various taxonomic groups. Sci Rep 10:19767. doi: 10.1038/s41598-020-75932-7

[IF₂₀₂₀ = 4,380; IF_{5y} = 5,516; MEiN = 140 pkt; kwartył Q1]

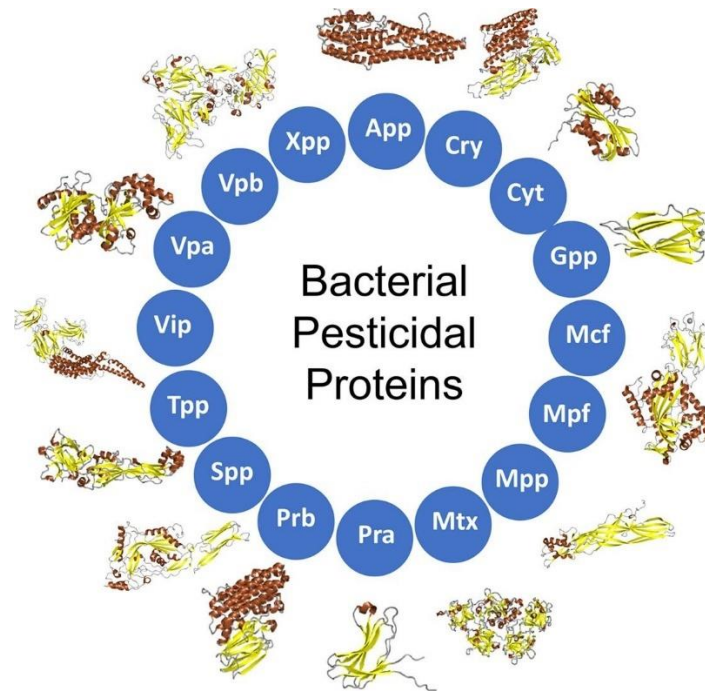
*** - autor korespondencyjny**

Wyniki badań składających się na główne osiągnięcie naukowe są przedstawione w postaci cyklu pięciu powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Wszystkie powyższe publikacje w formacie pdf są dostępne w **załączniku 4**. Prace te opublikowane zostały w latach 2020-2023, a ich sumaryczny impact factor (IF), według roku opublikowania jest równy **21,784** (IF 5-letni **22,342**), natomiast liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (wg. listy MNiSW z 09.02.2021) wynosi **550**. **We wszystkich pracach jestem pomysłodawcą koncepcji i planu badań oraz głównym wykonawcą zadań badawczych, interpretacyjnych i publikacyjnych, co jest odzwierciedlone w zamieszczeniu mojego nazwiska w charakterze pierwszego autora oraz autora korespondencyjnego.** Szczegółowy opis mojego wkładu w powstanie każdej pracy jest zaprezentowany w **załączniku 3 [rozdział I, punkt 2., podpunkty 1-5]**, natomiast oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w prace są dostępne w **załączniku 5**.

4.3. Omówienie osiągnięć naukowych

Wprowadzenie

Entomopatogenne właściwości *Bacillus thuringiensis* (Bt) są znane od ponad stu lat, jednak cały czas bakteria „odsłania” nowe aspekty o ogromnej wartości poznawczej i implementacyjnej [1,2]. Różne szczepy *B. thuringiensis* wytwarzają odmienne zestawy białek pestycydowych i innych rodzajów cząsteczek, działających toksycznie na bezkręgowce. Czynniki owadobójcze *B. thuringiensis* są obecnie podzielone na 16 klas/rodzin białkowych (rycina 1).

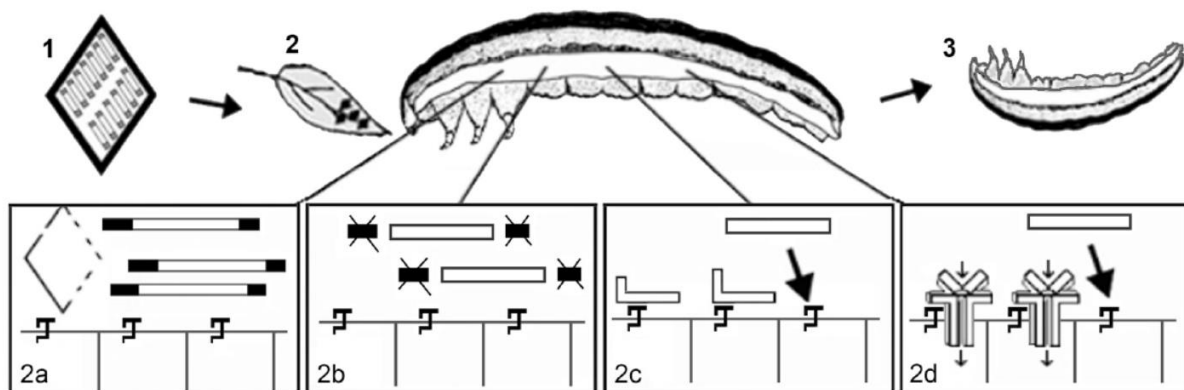


Ryc. 1. Rodziny pestycydowych białek bakteryjnych, klasyfikowane na podstawie struktury przestrzennej [3].

Powyższe białka klasyfikuje się do grup i podgrup na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów. Każdemu białku pestycydowemu nadano określoną nazwę, zgodnie z obowiązującą nomenklaturą – składa się ona z przedrostka (mnemonika) określającego klasę białka (np. Cry, Mtx, Vip) oraz z czterech rang nomenklatorycznych (reprezentowanych kolejno przez liczbę zapisaną cyframi arabskimi, wielką literę, małą literę i ponownie liczbę zapisaną cyframi arabskimi), np. Cry2Ab16, Vip3Af2 itd. [4]. Białka Cry, Cyt i Vip są uważane za najbardziej aktywne i najlepiej zbadane z obszernego arsenału charakterystycznego dla gatunku *B. thuringiensis* [5]. Do tej pory zidentyfikowano *in silico* 274 toksyny Cry, 16 toksyn Cyt i 15 toksyn Vip – dotyczy to tzw. toksyn holotypowych, tj. wariantów bez wliczania ostatniej, czwartej rangi nomenklatorycznej [3,6]. Różnice w sekwencji aminokwasowej odmiennych białek *B. thuringiensis* mają wpływ na poziom ich toksyczności i specyficzność wobec gatunków docelowych. Białka *B. thuringiensis* wykazują bardzo swoiste działanie wobec organizmów docelowych — poszczególne grupy toksyn są aktywne tylko przeciwko przedstawicielom wybranych taksonów. Na przykład, białka Cry1 i Cry2 są aktywne wobec larw motyli, Cry3 działają na chrząszcze, a Cry4, Cry10 i Cry11 są toksyczne wobec muchówek. Należy jednak pamiętać, że określone białko Cry/Cyt/Vip zwykle wpływa tylko na część gatunków w danej grupie bezkręgowców i jedynie precyzyjne

testy biologiczne mogą w rzetelny sposób wyznaczyć zakres działania danej toksyny *B. thuringiensis* [6].

Mechanizm działania poszczególnych czynników toksycznych wytwarzanych przez *B. thuringiensis* jest bardzo odmienny, choć cechą wspólną jest tu tzw. działanie żołądkowe, tj. konieczność połknięcia toksyny przez bezkręgowca (zazwyczaj wraz z pokarmem) w celu jej zadziałania. W przypadku toksyn z klas Cry i Vip można wyróżnić podobny zarys mechanizmu działania [5], obejmujący: (i) przedostanie się toksyny do układu pokarmowego; (ii) proteolityczną aktywację z udziałem proteaz jelitowych, polegającą na odcięciu części łańcucha peptydowego (część N- lub C-końcowa); (iii) zmianę konformacji przestrzennej toksyny; (iv) interakcję z receptorem znajdującym się w komórce nabłonkowej jelita (lub sekwencyjną reakcję z kilkoma receptorami); (v) oligomeryzację; (vi) utworzenie poru przez który odbywa się niekontrolowany transport jonów i wody i docelowo depolaryzację błony komórek nabłonkowych; (vii) zanik funkcji jelita i w konsekwencji zanik żerowania lub śmierć organizmu docelowego; rycina 2.



Ryc. 2. Mechanizm działania insektycydowych toksyn Cry i Vip *B. thuringiensis* [7].

Dysproporcje w specyficzności i poziomie toksyczności poszczególnych białek *B. thuringiensis* wobec konkretnych organizmów docelowych wynikają z różnic w mechanizmie działania, a konkretnie z różnic w: (i) receptorach jelitowych u różnych gatunków bezkręgowców; (ii) proteolitycznej aktywacji białek w jelicie; (iii) stabilności molekularnej danej toksyny [5].

Silne właściwości owadobójcze wybranych szczepów *B. thuringiensis* zostały wykorzystane w biologicznej ochronie roślin przed szkodnikami. Bioinsektycydy zawierające czynniki *B. thuringiensis* stosuje się w znacznej mierze do zwalczania larw owadów z rzędu Lepidoptera [8] – grupy szkodników, która powoduje jedne z największych strat w uprawach na świecie [9]. Wyróżnia się dwie najbardziej powszechne drogi podania szkodnikom

czynników toksycznych produkowanych przez *B. thuringiensis*: (i) preparaty mikrobiologiczne, składające się z endospor i parasporalnych kryształów białkowych (zawierających toksyny Cry i Cyt) *B. thuringiensis*; oraz (ii) transgeniczne rośliny produkujące toksyczne białka Cry/Vip w swoich tkankach. Bioinsektycydy oparte na czynnikach owadobójczych *B. thuringiensis* stanowią największy odsetek ze wszystkich stosowanych biologicznych środków ochrony roślin [2]. Środki te są alternatywą dla szkodliwych pestycydów syntetycznych, które działają nioselektywnie i mają długi okres półtrwania. W konsekwencji pestycydy chemiczne wpływają negatywnie na środowisko naturalne (w obszarze zabiegu agrotechnicznego i często daleko poza nim), m. in. obniżając bioróżnorodność [10]. Ponadto, pozostałości tych substancji wykrywane są w żywności wyprodukowanej z opryskiwanych upraw, co stanowi zagrożenie dla zdrowia konsumentów [11]. Ograniczenie stosowania syntetycznych środków ochrony roślin jest jednym z najistotniejszych punktów Integrowanej Ochrony Roślin [12] oraz celem wielu państw na całym świecie, czego przykładem są choćby legislacyjne inicjatywy Unii Europejskiej [13].

Motywacja i cel badań

Od momentu odkrycia *B. thuringiensis* przez japońskiego naukowca Shigetane Ishiwata w 1901 roku biologiczne właściwości tej bakterii były systematycznie zgłębiane, wliczając w to raptowne odkrycia ostatnich dekad, czerpiących garściami z technik genomiki, transkryptomiki i proteomiki [1]. Wydaje się jednak, że powstaje więcej pytań aniżeli odpowiedzi związanych z tym entomopatogenem, choćby w aspekcie specyficzności jego działania wobec organizmów docelowych. Pojawiają się też nowe zagadnienia i wyzwania, związane z przemysłowym użyciem *B. thuringiensis* w kontroli szkodników.

Gdy w 2009 roku Kees Van Frankenhuyzen opublikował pracę podsumowującą wszystkie testy aktywności dotyczące białek Cry i Cyt, znana liczba holotypowych toksyn wynosiła 174 [6]. Autor zauważył, że niemal jedna trzecia znanych białek pestycydowych (a właściwie należy użyć stwierdzenia „domniemanych białek pestycydowych”) nie była testowana wobec żadnego gatunku bezkręgowca. Co więcej, działanie zaledwie dziesiątej części tych białek było sprawdzone wobec kilkunastu lub więcej gatunków. W efekcie, jedynie niewielki odsetek białek był przedmiotem wystarczającej liczby badań, aby pozwolić na rzetelne wysunięcie wniosków, dotyczących spektrum wrażliwych gatunków organizmów. Ten bardzo ograniczony zestaw insektycydowych białek *B. thuringiensis* został użyty w opracowaniu transgenicznych upraw.

Obecnie, dzięki ogromnemu postępowi technologii sekwencjonowania genomów, znamy już 290 holotypowych form Cry i Cyt. Dodatkowo, w ostatnich latach wyróżniono jeszcze kilkanaście innych klas białek pestycydowych (np. App, Tpp, Xpp) – łącznie znanych jest na chwilę obecną aż 830 wszystkich holotypowych białek pestycydowych *B. thuringiensis* [3]. Oznacza to skokowy wzrost liczby znanych sekwencji nowych toksyn, a nawet nowych klas toksyn *B. thuringiensis* w ciągu ostatniej dekady. Niestety, przyrost wyników dotyczących biologicznej aktywności jest nieporównywalnie niższy niż przyrost danych genomowych. W efekcie, odsetek pestycydowych toksyn, które nie były nigdy testowane pod kątem aktywności biologicznej (lub były testowane wobec niewielkiej liczby wrażliwych gatunków) jest zdecydowanie wyższy niż w roku 2009 gdy Kees Van Frankenhuyzen opublikował swoją pracę. Oznacza to, że aspekt specyficzności *B. thuringiensis* wobec wrażliwych gatunków coraz bardziej umyka środowisku naukowemu, aniżeli przybliżamy się do jego zgłębienia. Jest to wyraźna biała plama w wiedzy dotyczącej „laseczek z Turyngii”. Konieczne są zatem wyężone wysiłki naukowe, pozwalające wskazać toksyczność poszczególnych białek wobec jak największej liczby gatunków bezkręgowców aby w sposób właściwy nakreślić „mapę” specyficzności działania *B. thuringiensis* wobec organizmów docelowych i rzucić większe światło na biologię, ewolucję i przede wszystkim rolę i skalę wpływu tego entomopatogena na ekosystemy.

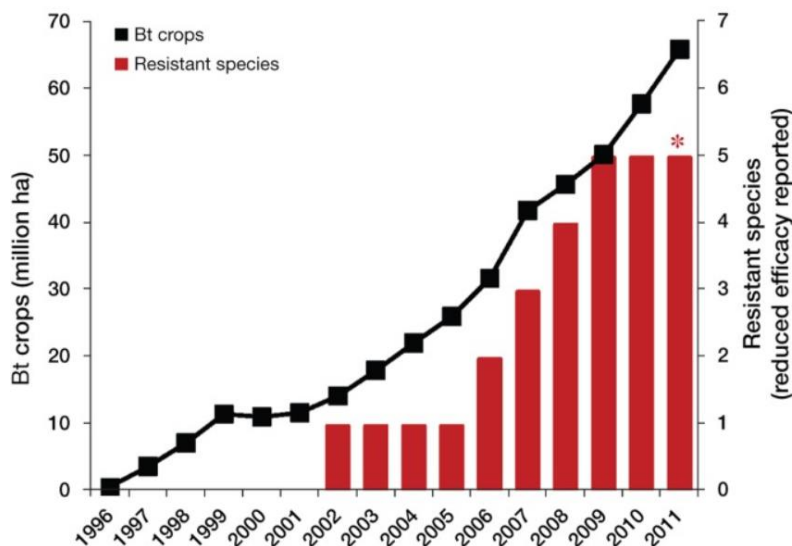
Kolejnym aspektem o dużej dozie niepewności jest zjawisko synergizmu/antagonizmu pomiędzy odmiennymi toksynami *B. thuringiensis*. Niektóre prace naukowe wskazują bowiem na możliwość uzyskiwania wyższej aktywności owadobójczej poprzez łączne działanie dwóch lub więcej toksyn *B. thuringiensis* [14–18]. Występowanie fenomenu synergizmu pomiędzy toksynami mogłoby mieć niebagatelny wpływ na zastosowanie *B. thuringiensis* w biologicznej ochronie roślin, a konsekwencje mogłyby być zarówno pozytywne jak i negatywne. Walorem takiej sytuacji byłaby oczywiście możliwość tworzenia bardziej efektywnych strategii kontroli szkodników, opartych na wzajemnych oddziaływaniach odpowiednio dobranych zestawów białek *B. thuringiensis* i uzyskiwanie lepszych rezultatów przy mniejszych dawkach insektycydu. Wskazywane jest jednak także zagrożenie, polegające na tym, że działające synergistycznie toksyny mogłyby stać się zagrożeniem dla organizmów innych niż docelowe [19]. Sam fenomen synergizmu jak i jego faktyczna skala w przypadku białek *B. thuringiensis* nie osiągnął do tej pory konsensusu w środowisku naukowym.

Niemniej istotne są wyzwania dotyczące wdrożeniowego aspektu bakterii *B. thuringiensis*. Komercyjne zastosowanie tego entomopatogena w kontroli szkodników z

rzędu Lepidoptera obejmuje użycie preparatów mikrobiologicznych (np. Dipel, Foray76B, XenTari, itp.) lub transgenicznych odmian roślin uprawnych takich jak kukurydza (np. MON810, Agrisure Duracade), bawełna (np. WideStrike, TwinLink, Bollgard, soja (np. Intacta RR2, DAS-81419-2) i in. Takie formy biologicznej ochrony plonów mają wiele zalet, z których największą jest możliwość redukcji stosowania pestycydów syntetycznych, a co za tym idzie większe bezpieczeństwo dla środowiska naturalnego i zdrowia konsumentów. Niestety, ww. technologie bioinsektycydowe również borykają się z niedoskonałościami. Podstawowym zagrożeniem jest w tym wypadku ograniczona różnorodność białek wchodzących w skład stosowanych obecnie bioinsektycydów opartych na czynnikach *B. thuringiensis*. W przypadku preparatów mikrobiologicznych aktywnych wobec motyli, do ich produkcji używa się obecnie zaledwie kilku szczepów bakteryjnych, wytwarzających bardzo ograniczony zestaw toksyn z grup Cry1 i Cry2. Najczęściej stosowane szczepy obejmują: (i) *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* (np. izolaty ABTS-351, SA-11), wytwarzające kryształy z białkami Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa [20,21]; oraz (ii) *B. thuringiensis* podgat. *aizawai* (np. izolaty ABTS-1857, GC-91), wytwarzające kryształy zawierające białka Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D, Cry2A [22,23]. Również w przypadku roślin transgenicznych, większość arealu upraw na świecie obejmują obecnie odmiany produkujące niewielki zestaw toksyn zabójczych dla motyli: Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105 (chimera toksyn Cry1Ab, Cry1Ac i Cry1F), Cry1Fa i Cry2Ab [24] – zestaw także zawężony do grup Cry1 i Cry2. Bardzo niewielka różnorodność stosowanych komercyjnie białek *B. thuringiensis* powoduje skutki o ogromnym znaczeniu makroekonomicznym. Pierwszym poważnym problemem jest niewrażliwość wielu grup owadów na stosowane bioinsektycydy, a co za tym idzie brak ochrony przed wieloma ważnymi pod względem ekonomicznym szkodnikami. Bardzo znamienym przykładem są tu gąsienice motyli z rodzaju *Agrotis* i *Spodoptera*, wykazujące wysoką naturalną niewrażliwość (lub niską podatność) na większość toksyn z grup Cry1 i Cry2 [25,26]. Z tym aspektem wiąże się m.in. zjawisko pojawiania się szkodników wtórnych w uprawach Bt. Dobrą ilustracją jest choćby drastyczny wzrost szkód spowodowanych żerowaniem *S. exigua* jako szkodnika wtórnego w uprawach transgenicznej bawełny, wytwarzającej toksynę Cry1Ac, w Chinach [27,28]. Pierwotną przyczyną stosowania w praktyce tak niewielkiej puli toksyn *B. thuringiensis* jest niewielka liczba danych o aktywności owadobójczej innych wariantów insektycydowych białek, w szczególności tych spoza grup Cry1 i Cry2. Obecnie, duże nadzieje pokłada się we włączeniu do biologicznej strategii ochrony roślin wegetatywnej toksyny owadobójczej (ang. vegetative insecticidal protein; Vip). Wykazano wysoką aktywność toksyny Vip (dokładnie Vip3Aa)

wobec niektórych szkodników owadzi z rzędu Lepidoptera i jest ona skuteczna wobec owadów, które wykształciły oporność na toksyny Cry, co idealnie ilustruje choćby przykład szkodników z rodzaju *Helicoverpa* [29]. Jednak choć pierwsze transgeniczne rośliny zawierające gen kodujący toksynę Vip3 zostały zarejestrowane w USA już w 2008 roku [30], to wskaźniki adopcji tych upraw na świecie są bardzo niskie. Według danych sprzed kilku lat w USA średni procent adopcji kukurydzy i bawełny wytwarzającej Vip3 wynosił mniej niż 5% [24]. W większości pozostałych krajów na świecie uprawy Vip3-pozytywne są niespotykane lub są w fazie procedur rejestracyjnych. Wynika to z niedoboru danych eksperymentalnych i w związku z tym z nieznaną efektywnością białek Vip. Bardzo istotne jest więc zdobycie jak największej ilości danych o aktywności i spektrum wrażliwych owadów w przypadku toksyn Vip3, w celu oszacowania skuteczności tych czynników w układach obejmujących różnorodne uprawy, szkodniki i rejony geograficzne.

Kolejnym poważnym zagrożeniem jest rosnąca oporność szkodliwych owadów na bioinsektycydy oparte na stosowanych obecnie białkach Cry *B. thuringiensis* (rycina 3).



Ryc. 3. Dynamika rosnącej oporności owadów na białka Cry zawarte w transgenicznych roślinach [31].

Związane jest to z wysoką presją selekcyjną niewielkiej puli toksyn Cry zawartych w tych środkach, które dodatkowo wykazują zazwyczaj oporność krzyżową [24,31,32]. W celu rozwiązania wyżej opisanych problemów, konieczne jest: (i) poszukiwanie i scharakteryzowanie nowych izolatów *B. thuringiensis*, o wyższych właściwościach owadobójczych, zawierających geny kodujące nowe toksyny lub nowe zestawy toksyn; (ii) wykonanie testów aktywności owadobójczej niescharakteryzowanych lub

scharakteryzowanych w niewielkim stopniu pestycydowych białek owadobójczych względem możliwie dużej puli szkodników; (iii) wykorzystanie w biologicznej ochronie roślin nowych wariantów toksyn, o istotnych różnicach w sekwencji aminokwasowej, odmiennym mechanizmie działania i charakteryzujących się brakiem oporności krzyżowej z białkami Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Fa i Cry2Ab, stosowanymi w kontroli szkodników.

Podsumowując, można obecnie wyróżnić następujące braki w badaniach podstawowych i „białe plamy” w wiedzy na temat entomopatogennych właściwości *B. thuringiensis* oraz wyzwania związane z aplikacyjnym zastosowaniem tych bakterii:

- całkowity brak danych dot. aktywności owadobójczej w przypadku dużego odsetka znanych toksyn *B. thuringiensis*
- mała ilość danych (testy aktywności owadobójczej jedynie wobec niewielkiej liczby gatunków bezkręgowców), nie pozwalająca na poprawną ocenę spektrum aktywności większości toksyn *B. thuringiensis*, w tym dobrze rokujących toksyn z grupy Vip3
- brak danych o wrażliwości na pestycydowe białka *B. thuringiensis* w przypadku wielu gatunków szkodników, powodujących istotne straty w gospodarce człowieka
- niewielka liczba eksperymentów dot. interakcji pomiędzy toksynami *B. thuringiensis* i nieznana skala synergizmu w aktywności białek tej bakterii
- ograniczona pula pestycydowych białek *B. thuringiensis* używanych w biologicznej ochronie roślin i związany z tym brak skuteczności bioinsektycydów wobec wielu ważnych pod względem ekonomicznym szkodników
- rosnąca oporność owadów (w tym oporność krzyżowa) na stosowane obecnie w kontroli szkodników białka Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Fa i Cry2Ab *B. thuringiensis*
- konieczność izolacji nowych szczepów *B. thuringiensis*, zawierających geny kodujące nowe warianty toksyn lub nowe kombinacje toksyn, w celu potencjalnego zwiększenia puli pestycydowych czynników stosowanych w biologicznej kontroli szkodników

Praca naukowa, jaką dotychczas realizowałem, a w szczególności osiągnięcie habilitacyjne opublikowane w postaci cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowi odpowiedź na powyższe braki w badaniach podstawowych i co za tym idzie w dostępnej wiedzy. Jest to także odpowiedź na potrzeby, wynikające z aplikacyjnego użycia

entomopatogennej bakterii z gatunku *B. thuringiensis*. Poszczególne aspekty osiągnięcia zostały pisane poniżej.

Omówienie wyników przedstawionych w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych

A. Izolacja i scharakteryzowanie nowych szczepów *Bacillus thuringiensis*

W mojej pracy opublikowanej w 2023 roku w czasopiśmie BioControl [[33]; **załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 1)**] przedstawiłem wyniki dotyczące izolacji trzech nowych szczepów *B. thuringiensis* (BG11, BG12 i BG15) z materiału pozyskanego z tropikalnych szklarni Ogrodu botanicznego UAM. Wyosobnienie *B. thuringiensis* z tak charakterystycznego i w dużej mierze izolowanego środowiska jest niewątpliwie unikatowe jeśli chodzi o wszystkie wcześniejsze próby pozyskiwania tych bakterii. Trzy wyizolowane szczepy, charakteryzują się specyficznym zestawem wytwarzanych toksyn insektycydowych (w tym nowymi wariantami białka Cry1Ba), niespotykanym wśród szczepów *B. thuringiensis* użytych do produkcji komercyjnych preparatów insektycydowych. W pracy wykazano wysoką aktywność ww. izolatów względem larw owadów z rzędu Lepidoptera. Scharakteryzowane mikroorganizmy wykazują wysoki potencjał do produkcji nowych, biologicznych środków ochrony roślin i są elementem dalszych prac o charakterze zarówno badań podstawowych jak i wdrożeniowych.

Oprócz wyżej wymienionej i omówionej publikacji, wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego, brałem także udział w bardzo licznych projektach, mających na celu izolację lub analizę właściwości nowych entomopatogennych szczepów *B. thuringiensis*. Zarówno przed jak i po uzyskaniu stopnia doktora współpracowałem przy badaniach mających na celu: (i) wyosobnienie izolatów *B. thuringiensis* z gleby, wody oraz zakażonych owadów; (ii) opracowanie profilu genetycznego i fenotypowego uzyskanych bakterii; oraz (iii) określenie aktywności owadobójczej ww. drobnoustrojów wobec larw owadów, takich jak *Cydia pomonella*, *Dendrolimus pini*, *Leucoma salicis* i *Spodoptera exigua*, będących groźnymi szkodnikami upraw. Wyniki zostały opublikowane w postaci siedmiu artykułów w czasopismach naukowych [34–43] [**załącznik 3, rozdział II, punkt 4., podpunkty 6), 10), 12), 8), 9), 13), 14), 15), 16), 18)**].

Podsumowując, wyniki tej części mojej pracy badawczej przyczyniły się do scharakteryzowania dziesiątek szczepów *B. thuringiensis*, cechujących się różnymi właściwościami genetycznymi, fenotypowymi i entomopatogennymi. Przybliżyło to

uzyskanie pełniejszego obrazu co do biologii, genetyki, niszy ekologicznej i ewolucji „laseczek z Turyngii”, a ponadto poszerzyło zakres możliwych działań aplikacyjnych. Drobnoustroje te wchodzą obecnie w skład kolekcji szczepów Zakładu Mikrobiologii UAM, i od dłuższego czasu służą jako materiał badawczy do prowadzenia licznych prac eksperymentalnych, między innymi tych opisanych w dalszej części opracowania.

B. Określenie wrażliwości ważnych pod względem ekonomicznym szkodników na czynniki owadobójcze *Bacillus thuringiensis*

Jednym z najważniejszych nurtów mojej pracy badawczej była heterologiczna ekspresja białek Cry i Vip *B. thuringiensis* (w tym nowych wariantów tych toksyn) oraz ich scharakteryzowanie, a przede wszystkim określenie ich aktywności wobec istotnych dla światowej gospodarki szkodników owadzi. Wybrane szkodniki obejmowały organizmy znacząco obniżające zyski uzyskiwane z roślin handlowych/przemysłowych uprawianych w sadach, polach oraz w gospodarstwach leśnych. Poniżej, kolejno omówione zostały poszczególne badane gatunki owadów, ich znaczenie gospodarcze oraz przede wszystkim wyniki moich badań, w istotny sposób podnoszące stan wiedzy w danym obszarze.

Agrotis exclamationis (Linnaeus, 1758)

Agrotis exclamationis, zwana rolnicą czopówką, to gatunek owada należący do rzędu Lepidoptera, rodziny Noctuidae (sówkowate). Występuje w Eurazji i żeruje na licznych roślinach, w tym na ważnych pod względem ekonomicznym uprawach takich jak buraki, zboża, truskawki, liczne warzywa, a także młode drzewa w szkółkach oraz kwiaty i rośliny ozdobne [44–46]. Larwy rolnicy czopówki wykazują się dużą żarłocznością i bardzo często „scinają” całe siewki młodych roślin (co odzwierciedla angielska nazwa tych larw: *cutworms*). W związku z powyższymi, *A. exclamationis* jest poważnym szkodnikiem upraw w Eurazji i powoduje istotne straty w rolnictwie, jak również w ogrodnictwie i leśnictwie. Na przykład w Polsce, straty w uprawie buraka cukrowego spowodowane żerowaniem rolnic mogą sięgać nawet do 30% [47]. Obecnie do zwalczania szkodliwych owadów (w tym rolnic) stosuje się duże ilości szkodliwych syntetycznych pestycydów [48]. Alternatywą są biologiczne środki ochrony roślin. Niestety w przypadku *A. exclamationis* nie opracowano dotąd żadnych skutecznych strategii kontroli opartych na insektycydach biologicznych.

Jednym z założeń mojej pracy naukowej było kompleksowe określenie skuteczności działania *B. thuringiensis* wobec rolnicy czopówki – zarówno w aspekcie generowania śmiertelności owadów docelowych jak i na poziomie subletalnym. Praca dotycząca ww.

dociekań została opublikowana w czasopiśmie PLOS ONE w 2023 roku [[49]; załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 2)]. Wstępne wyniki pracy pokazały bardzo niewielką efektywność komercyjnych izolatów *B. thuringiensis* wobec *A. exclamationis* – nawet bardzo wysokie stężenia entomopatogena (znacznie przewyższające rekomendowane dawki polowe) nie powodowały nawet 50% śmiertelności w testowanych populacjach. Można zatem wysnuć wnioski, że obecnie stosowane mikrobiologiczne preparaty oparte na czynnikach toksycznych *B. thuringiensis* nie będą wystarczająco efektywne aby można ich było użyć w efektywnej kontroli ww. szkodnika. W celu wyjaśnienia niskiej aktywności ww. szczepów, w dalszych etapach niniejszej pracy określiłem wrażliwość larw *A. exclamationis* na poszczególne, uzyskane w wyniku heterologicznej ekspresji, białka Cry i Vip *B. thuringiensis*. Wyniki tej części studium pokazały niewielką podatność *A. exclamationis* na wszystkie testowane toksyny z grup Cry1 i Cry2 – choć wszystkie testowane białka spowodowały w pewnym stopniu ograniczenie wzrostu owadów, to nie wywołały znaczącej śmiertelności. Niemniej jednak, dwie inne testowane toksyny *B. thuringiensis* tj. Cry9Ea i Vip3Aa, wykazały wysoką aktywność insektycydową wobec larw rolnicy czopówki. Dodatkowo, w pracy przeanalizowano zmiany jakie powodują w jelicie owada białka Cry9Ea i Vip3Aa na poziomie tkankowym ale również komórkowym i organellowym, co jest ujęciem niekonwencjonalnym w przypadku badań nad toksynami *B. thuringiensis*.

Wnioski płynące z niniejszej pracy wskazują, że w celu skutecznej ochrony przed larwami *A. exclamationis*, należy bazować na białkach Cry9Ea oraz Vip3Aa. Niestety, zarówno bioinsektycydowe preparaty mikrobiologiczne oparte na „laseczkach z Turynii”, jak i większość uprawianych roślin transgenicznych (tzw. „Bt crops”) zawiera głównie toksyny z grup Cry1 i Cry2 – można więc domniemywać, że nie ma obecnie na świecie skutecznych strategii biologicznej kontroli *A. exclamationis* i prawdopodobnie innych rolnic.

Oprócz wyżej opisanego głównego nurtu badawczego, w trakcie analizy wyników niniejszej pracy, nieoczekiwanie w przypadku działania toksyn Cry1Ca i Cry1Ia zaobserwowano hormezę – dwufazowe zjawisko pojawiające się w testach zależności dawka-odpowiedź, charakteryzujące się stymulacyjnym efektem niskiej dawki i inhibycyjnym efektem wysokiej dawki. Hormeza jest zjawiskiem, które choć opisane już kilkadziesiąt lat temu, na znaczeniu zyskało w literaturze naukowej dość niedawno [50]. Ponadto, zagadnienie hormezy do tej pory nie było analizowane odnośnie czynników owadobójczych *B. thuringiensis* – w pracach opublikowanych do tej pory skupiano się bowiem na efektach bójczych, pomijając zazwyczaj efekty subletalne.

Cydia pomonella (Linnaeus, 1758)

Cydia pomonella, zwana owocówką jabłkóweczką to gatunek owada z rodziny Tortricidae (zwójkowate). Owady te są przede wszystkim szkodnikami jabłoni, ale żerują także na orzechach włoskich, gruszach, pigwie i in. Gatunek ten wywodzi się z Eurazji, lecz wraz z transportami owoców został zawleczony na inne zamieszkane przez człowieka kontynenty. Larwy *C. pomonella* powodują ogromne straty w uprawach owoców na całym świecie – w przypadku jabłek jest to nawet do 100%, przy braku zastosowanej kontroli. Ponadto, owady te wykazują znaczną oporność na chemiczne pestycydy, a ich biologia (krótki okres żerowania larwy na powierzchni owocu i długi wewnątrz tej naturalnej „bariery ochronnej”) sprawia, że walka ze szkodnikiem jest znacznym wyzwaniem [51,52]. Z powyższych względów *C. pomonella* jest jednym z najgroźniejszych szkodników owadzich na świecie i intensywnie poszukuje się skutecznych metod jego kontroli.

Moja praca naukowa wpisała się w światowy nurt poszukiwania skutecznych biologicznych metod zwalczania larw *C. pomonella*. Według przeprowadzonych przeze mnie badań, toksyna Cry9Ea jest najbardziej toksycznym białkiem spośród wszystkich testowanych dotąd czynników *B. thuringiensis*, względem larw ww. szkodnika. Wartość LC₅₀ jest wielokrotnie niższa od pozostałych białek Cry/Vip. Warto również nadmienić, że były to pierwsze na świecie badania, mające na celu oznaczenie aktywności insektycydowej Cry9Ea. Ponadto, do tej pory wrażliwość *C. pomonella* nie była testowana na żadną inną toksynę z dobrze „rokującej” grupy Cry9. Rezultaty powyższych dociekań zostały opublikowane w Pest Management Science w 2021 roku [[53]; załącznik 3, rozdział I, paragraf 2., punkt 3)]. Badania te pozwoliły uzupełnić wiedzę dotyczącą specyficzności toksyn *B. thuringiensis* ale również sprawiły, że toksyny Cry9 zyskały na znaczeniu implementacyjnym. Wraz z tym odkryciem możliwe jest rozpoczęcie nowych strategii biologicznej kontroli larw *C. pomonella*, na przykład poprzez selekcję i późniejsze zastosowanie w formie oprysków efektywnych izolatów bakteryjnych, produkujących toksyny Cry9Ea.

W ramach niniejszej pracy określona została również wrażliwość larw *C. pomonella* na pięć innych toksyn *B. thuringiensis*. Wyniki wskazały na istotną toksyczność białek Cry1Aa, Cry2Ab i Vip3Aa wobec szkodnika, podczas gdy toksyny Cry1Ia oraz Cry1Ca okazały się najmniej efektywne. Na szczególną uwagę zasługują przeprowadzone testy dotyczące aktywności białka Vip3Aa, które nie wykazuje istotnego podobieństwa sekwencji do białek Cry, wiąże się z innymi receptorami w jelicie owada oraz wykazano brak oporności krzyżowej u owadów na toksyny Cry i Vip [54]. Vip3Aa jest więc idealnym kandydatem do strategii polegającej na jego połączeniu z toksynami Cry w bioinsektycydach (ang.

„pyramiding strategy”). Taką strategię z powodzeniem można więc zastosować do kontroli *C. pomonella*, w celu znacznego obniżenia strat spowodowanych żerowaniem tego szkodnika. Wydaje się, że połączenie Cry9Ea + Vip3Aa jest ze wszystkich testowanych najkorzystniejsze. Ze względu na bardzo dużą potencjalną wartość implementacyjną, preparaty zawierające białka aktywne wobec *C. pomonella* (Cry2Ab, Cry9Ea oraz Vip3Aa) zostały objęte ochroną prawną w postaci trzech patentów [zgłoszenia patentowe szerzej opisano poniżej, w punkcie 4.4, podpunkt D].

Spodoptera exigua (Hübner, 1808)

Spodoptera exigua, zwana światłówką naziemnicą, to gatunek owada należący do rzędu Lepidoptera i rodziny Noctuidae (sówkowate). Występuje on w ciepłych rejonach większości kontynentów [55] i jest polifagiem, żerującym m. in na: bawełnie, kukurydzy, soi, sorgo, burakach cukrowych i rozmaitych warzywach [56]. Ze względu na żarłoczność larw oraz wysoką oporność na chemiczne pestycydy [57,58] szkodnik ten powoduje poważne straty w światowym rolnictwie i intensywnie poszukiwane są alternatywne metody jego zwalczania.

Jednym z elementów mojej pracy naukowej było opracowanie skutecznych biologicznych metod zwalczania larw *S. exigua*. Analiza wrażliwości *S. exigua* wobec wyselekcjonowanych toksyn Cry i Vip została opublikowana w pracy opublikowanej w 2021 roku w czasopiśmie Entomologia Generalis [[59]; **załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 4**]. Wyniki moich wieloletnich prac pokazały, że toksyny o najwyższej aktywności owadobójczej względem światłówki naziemnicy to Cry1Ca i Vip3Aa. Aktywny okazał się również scharakteryzowany przeze mnie nowy wariant toksyny Cry2Ab (według oficjalnej nomenklatury, pełna nazwa to Cry2Ab36; https://www.bpprc-db.org/protein_detail/Cry2Ab36/), różniący się od testowanych wcześniej wersji kilkoma aminokwasami w istotnych fragmentach białka. Inne warianty toksyny Cry2Ab wykazują brak aktywności lub niewielką aktywność wobec *S. exigua* [25,60]. W przypadku toksyn najbardziej efektywnych wobec *S. exigua* (Cry1Ca i Vip3Aa), wygenerowane dane mają dużą wartość implementacyjną, ponieważ obecnie w większości upraw na świecie stosowane są toksyny takie jak Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa i Cry2Ab – zarówno w postaci preparatów mikrobiologicznych jak i roślin transgenicznych. W przytoczonym we wstępie przykładzie rolnictwa w Chinach, główna odmiana uprawianej na szeroką skalę bawełny produkuje białko Cry1Ac, które choć skuteczne wobec *H. armigera*, nie chroni przed larwami *S. exigua*. Na podstawie moich badań, można wskazać, że najlepszą strategią kontroli *S. exigua* byłoby włączenie jako składników aktywnych w bioinsektycydach białek z grup Cry1Ca i Vip3Aa.

Niezwykle interesujące z punktu widzenia badań podstawowych okazały się także wyniki testów aktywności owadobójczej białka Cry9Ea wobec larw *S. exigua*. W pracy opublikowanej w 2021 roku w *Pest Management Science* [[53]; załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 3)] wskazano zupełny brak aktywności testowanego białka z grupy Cry9 na ww. szkodnika. Przeciwnie, niepublikowane obserwacje prowadzone w trakcie badań unaoczniliły stymulacyjny efekt tego białka podanego larwom (większa średnia masa larw niż w kontroli). Uzyskane wyniki stały się przyczynkiem do prowadzonych obecnie analiz dotyczących funkcjonalnej analizy poszczególnych domen białek Cry9 i ich wpływu na toksyczność względem *S. exigua*.

C. Interakcje pomiędzy toksynami *B. thuringiensis*

Wzajemne interakcje pomiędzy różnymi toksynami *B. thuringiensis* to istotny temat debaty naukowej. Według niektórych prac efekt jaki wywołuje mieszanina dwóch lub więcej białek Cry/Cyt/Vip *B. thuringiensis* na owada może być inny niż prosta wypadkowa działania poszczególnych komponentów tej mieszaniny (addycja) – w przypadku gdy efekt insektycydowy jest większy niż oczekiwany mówimy o synergizmie, a gdy mniejszy niż oczekiwany stwierdzamy antagonizm. Zagadnienie to jest nie tylko ciekawe z punktu widzenia akademickiego ale może mieć również bezpośrednie przełożenie na aspekt aplikacyjny. Niestety, brak jest do tej pory konsensusu co do istoty i skali tego zjawiska w działaniu czynników toksycznych *B. thuringiensis*.

W pracy opublikowanej w 2021 roku [[59]; załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 4)] przetestowałem osiem kombinacji białek Cry i Vip wobec larw *S. exigua* i określiłem występujący typ interakcji w dwóch interwałach czasowych. Wygenerowane wyniki wskazały na istotny potencjał toksyn Vip do oddziaływań synergistycznych z wybranymi białkami Cry. Niemniej jednak, niniejsze badania pokazały istotne różnice w interakcjach, w zależności od czasu trwania eksperymentu (7 lub 10 dni). Wykazano więc, że „werdykt” czy grupa toksyn ma działanie synergistyczne, addytywne czy też antagonistyczne może zależeć od warunków eksperymentu. W powyższym przykładzie już prosta zmiana czasu odczytu wyników spowodowała uchwycenie dynamiki zamierania testowanej populacji w innym punkcie. To w oczywisty sposób tłumaczy bardzo rozbieżne wyniki uzyskiwane przez różnych autorów (którzy w prowadzonych eksperymentach zazwyczaj posługują się odmiennymi, autorskimi protokołami) oraz brak konsensusu co do samego zjawiska w środowisku naukowym.

W kolejnym aspekcie uwagę zwraca wartość, jaką osiąga w poszczególnych wariantach współczynnik synergii (stosunek uzyskanego przez mieszaninę LC₅₀ do spodziewanego LC₅₀ obliczonego jako wypadkowa działania poszczególnych komponentów). W przytoczonej powyżej pracy współczynnik synergii tylko w przypadku jednej mieszaniny (Cry1Ca + Vip3Aa) przekroczył cztery punkty, a w większości pozostałych wariantów był niższy niż dwa – co według wielu autorów (np. [61]) sugeruje, że synergizm nie jest istotny.

Podsumowując wyniki powyższej pracy należy zauważyć, że jedynie mieszanina Cry1Ca + Vip3Aa wykazuje wysoki współczynnik synergizmu, niezależnie od wariantu eksperymentu, u larw *S. exigua*. Dlatego, to właśnie połączenie czynników toksycznych jest rekomendowane w strategiach kontroli światłowki naziemnicy. Natomiast, ogólna obserwacja wyników pracy pozwala stwierdzić, że kombinatoryczne działanie toksyn skutkujące wysokim współczynnikiem synergii jest w testowanym zakresie rzadkie.

Wnioski, które uzyskałem w powyższej pracy, postanowiłem skonfrontować z rezultatami prac innych autorów i tym samym rzucić światło na całokształt badań w obszarze wzajemnych oddziaływań pomiędzy toksynami produkowanymi przez „laseczki z Turynii”. W trakcie mojej pracy wraz z zespołem biologów obliczeniowych zgromadziłem i przeanalizowałem wszystkie wyniki dostępne w literaturze w obszarze interakcji pomiędzy białkami Cry/Cyt/Vip/itd. *B. thuringiensis* [[62]; **załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 5)**]. Analiza zgromadzonych danych pozwoliła wysnuć następujące wnioski: (i) synergizm działania toksyn można zaobserwować w nieco ponad połowie eksperymentów; ale (ii) współczynnik synergii jest zazwyczaj bardzo niski (z wyjątkiem kombinacji Cry + Cyt); (iii) synergizm znacznie częściej obserwuje się pomiędzy toksynami Cry + Cyt aniżeli kombinacjami Cry + Cry, Cry + Vip, Cyt + Vip; (iv) częstotliwość występowania poszczególnych typów interakcji (synergizm/addycja/antagonizm) jest inna dla poszczególnych rzędów owadów (np. częściej obserwuje się synergizm u przedstawicieli Diptera aniżeli u Lepidoptera); (v) w większości przypadków poszczególne kombinacje toksyn były testowane tylko raz, to znaczy, że brak jest danych komparatywnych, generowanych przez różne grupy/laboratoria, pozwalających na rzetelne wnioskowanie co do badanego zjawiska; (vi) nie ma wypracowanego wspólnego ujednoliczonego standardu i norm prowadzenia eksperymentów dotyczących interakcji pomiędzy toksynami *B. thuringiensis*.

Nowe rezultaty eksperymentów dotyczących typów interakcji pomiędzy czynnikami toksycznymi są na bieżąco śledzone, analizowane i gromadzone w bazie danych, jaka powstała przy okazji powyższych analiz. Baza nosi nazwę TOXiTAXi, a jej zastosowanie i

funkcjonalności wykraczają znacznie poza analizę interakcji pomiędzy insektycydowymi białkami *B. thuringiensis*.

D. TOXiTAXi - uniwersalna baza danych i dedykowane narzędzie internetowe do przetwarzania danych dot. testów toksyczności

W 2020 roku, wraz ze specjalistami z dziedziny biologii obliczeniowej udało mi się stworzyć bazę danych TOXiTAXi [[62]; załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 5)], wraz z interaktywnym interfejsem do jej obsługi (<http://www.combio.pl/toxitaxi/>). Baza ta jest podsumowaniem i wciąż rozwijającą się „dyskusją” moich dotychczasowych i przyszłych wyników badań, dotyczących entomopatogennych właściwości *B. thuringiensis*. TOXiTAXi służy bowiem do gromadzenia, systematyzowania i analizy rezultatów testów biologicznych, wobec organizmów reprezentujących różne grupy taksonomiczne. Początkowo, narzędzie miało za zadanie wspomagać analizę testów dotyczących interakcji pomiędzy toksynami Cry, Cyt i Vip *B. thuringiensis* ale już od początku zostało zaprojektowane aby móc gromadzić wszystkie inne wyniki testów toksyczności – zazwyczaj skrajnie niejednorodne i bardzo rozproszone w dostępnej literaturze. W efekcie, obecnie znajdują się tam również rekordy obejmujące eksperymenty testujące wrażliwość rozmaitych grup bezkręgowców na: (i) poszczególne czynniki toksyczne. *B. thuringiensis* oraz innych entomopatogennych bakterii; (ii) enzymy o działaniu insektycydowym np. chitynazy; a także pilotażowo (iii) insektycydy biochemiczne; (iv) insektycydy syntetyczne; (v) grzyby entomopatogenne; a nawet na „egzotyczne” komponenty takie jak (vi) toksyny skorpionów.

Korespondencyjny odzew, jaki miał miejsce po uruchomieniu tej publicznie dostępnej bazy, świadczy o jej przydatności nie tylko dla środowisk akademickich ale także dla pracowników jednostek zajmujących się wdrożeniami w obszarze biologicznych środków ochrony roślin. Największym atutem bazy jest jej uniwersalność (jest zaprojektowana do gromadzenia ekstremalnie różnorodnych informacji), oraz jej otwarty charakter – baza cały czas powiększa się o nowe obszary i pakiety danych.

Docelowo, po zgromadzeniu odpowiedniej ilości informacji, chciałbym aby TOXiTAXi stało się pakietem wejściowych danych do stworzenia algorytmów uczenia maszynowego (w tym uczenia głębokiego), pozwalającego na predykcję *in silico* specyficzności biologicznych toksyn wobec organizmów, w tym szkodników owadzych.

PODSUMOWANIE

Rezultatem prac badawczych wykonanych przez habilitanta, zaprezentowanych jako cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, są następujące osiągnięcia:

- **pozyskanie i scharakteryzowanie nowych izolatów *B. thuringiensis* o szczególnych właściwościach owadobójczych, oraz utworzenie kolekcji, będącej materiałem do dalszych dociekaniach badawczych**
- **określenie aktywności insektycydowej białek Cry/Vip *B. thuringiensis*, w tym nowych wariantów toksyn oraz toksyn spoza nadreprezentowanych w biologicznej ochronie roślin grup Cry1 i Cry2**
- **ocena wrażliwości ważnych pod względem ekonomicznym szkodników z rzędu Lepidoptera na nowe izolaty *B. thuringiensis* oraz poszczególne toksyny Cry/Vip**
- **ocena wzajemnych interakcji nowych zestawów toksyn Cry/Vip wobec szkodników oraz całościowa analizę tego zjawiska w oparciu o własne i opublikowane dane literaturowe**
- **stworzenie publicznie dostępnego narzędzia bioinformatycznego w postaci bazy danych i aplikacji internetowej (TOXiTAXi), które umożliwia gromadzenie, systematyzowanie i analizowanie różnorodnych danych, dotyczących testów aktywności owadobójczych.**

4.4. Omówienie pozostałych istotnych osiągnięć naukowo-badawczych, nie ujętych w powyższym cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych

A. Określenie aktywności owadobójczej *B. thuringiensis* wobec szkodników drzew

Osiągnięciem naukowym są dwie prace opublikowane w czasopismach naukowych:

- 1) Baranek J., Konecka E., Kaznowski A. (2017). Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl* 62 (5): 649-658. doi: 10.1007/s10526-017-9828-6
- 2) Baranek J., Kaznowski A., Konecka E., Naimov S. (2015). Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. *J Invertebr Pathol* 130: 72-81. doi: 10.1016/j.jip.2015.06.006

Wiodący wkład w powstanie tych prac jest odzwierciedlony moim pierwszym autorstwem i został szczegółowo opisany w załączniku 3, rozdział II, punkt 4, podpunkty 8) i 9).

Dendrolimus pini (Linnaeus, 1758)

Dendrolimus pini, zwana barczatką sosnówką to owad należący do rodziny Lasiocampidae (barczatkowate). *D. pini* jest monofagiem, żerującym na sośnie zwyczajnej, choć w niektórych przypadkach może także żywić się innymi drzewami iglastymi. Gatunek ten występuje w większej części Europy i Azji Środkowej [63] i jest organizmem inwazyjnym choćby w Stanach Zjednoczonych. W Polsce i w innych częściach Europy Środkowo-Wschodniej obserwuje się relatywnie częste występowanie gradacji tego szkodnika, co skutkuje bardzo poważnymi stratami w gospodarce leśnej, w tym nierzadko gołożerami, całkowicie niszczącymi dziesiątki tysięcy hektarów sosny [63].

W celu kontrolowania barczatki sosnówki w Polsce stosowane są opryski zawierające insektycydy syntetyczne, takie jak diflubezuron oraz acetamipryd [63]. Niestety, środki te działają szerokospektralnie i wpływają na wiele elementów ekosystemu leśnego, który w odróżnieniu od pól uprawnych jest o wiele bardziej złożony i wrażliwy. Dodatkowo, nowe rygorystyczne dyrektywy UE, jak choćby Europejski Zielony Ład najprawdopodobniej spowodują znaczne (lub całkowite) ograniczenia w użyciu tego typu środków w leśnictwie. Alternatywnie, stosowane są dziś metody biologiczne, jednak ich spektrum jest zawężone do jednego tylko środka, tj. oprysków bezpiecznym, biologicznym preparatem Foray76B (Valent Biosciences), który zawiera endospory *B. thuringiensis* i białka Cry zawarte w parasporalnych

kryształach tej bakterii [63]. Chociaż do tej pory nie stwierdzono żadnego przypadku nabywania oporności przez *D. pini* na Foray76B i jest on wciąż uznawane za skuteczny, to w ramach mojej pracy badawczej przeprowadziłem próby wytyczenia nowych strategii biologicznej kontroli tego szkodnika w oparciu o inne czynniki toksyczne „laseczek z Turynгии”. W tym celu określona została wrażliwość *D. pini* na toksyny Vip3Aa. Białka te są wskazywane jako komponent bioinsektycydów nowej generacji w uprawach rolnych, jednak do tej pory nie sprawdzono efektywności białek Vip3Aa wobec szkodników upraw leśnych, w tym *D. pini*. W moich pracach opublikowanych w 2017 i 2015 roku, po uzyskaniu stopnia doktora [[42,43]; **załącznik 3, rozdział II, punkt 4., podpunkt 8) i 9)**], wykazałem, że białko Vip3Aa powoduje wysoką śmiertelność w przypadku larw *D. pini* w stadium L2. Ponadto, dużą skuteczność wykazały także toksyny Vip3Aa w połączeniu z białkami Cry w postaci parasporalnych kryształów – w zależności od proporcji poszczególnych składników mieszaniny wykazywały efekt addytywny lub synergistyczny. Powyższe badania stanowią podwaliny pod nowe programy kontroli *D. pini* oparte na białkach Vip3 *B. thuringiensis*. Mogą one być w przyszłości zastosowane jako dywersyfikacja obecnie istniejących metod lub jako jedyny skuteczny biologiczny czynnik, w przypadku najgorszego scenariusza, tj. pojawienia się praktycznej oporności wśród populacji *D. pini* na obecnie stosowane bioinsektycydy.

Leucoma salicis (Linnaeus, 1758)

W trakcie mojej pracy badawczej, przed uzyskaniem stopnia doktora, brałem także udział w projekcie w wyniku którego stwierdzono wysoką aktywność owadobójczą izolatów *B. thuringiensis* z lokalnej kolekcji szczepów wobec larw *L. salicis* [[39,40]; **załącznik 3, rozdział II, punkt 4., podpunkty 16) i 18)**]. *L. salicis*, zwana białką wierzbówką to owad należący do rzędu Lepidoptera, rodziny Erebidae (mrocznicowate). Jest to istotny z punktu ekonomicznego fitofag, żerujący na wierzbach, topolach oraz – co zaskakujące – na plantacjach herbaty [64]. Wyniki powyższych badań mają znaczenie implementacyjne.

B. Ochrona patentowa wynalazków, dotyczących biologicznej ochrony roślin przed szkodliwymi owadami

Osiągnięciem naukowym habilitanta są trzy patenty na wynalazki uzyskane po nadaniu stopnia doktora:

- 1) Patent nr 0428224 (przyznany 11.2020) dotyczący aktywności owadobójczej preparatów zawierających białka Cry2Ab i Vip3Aa *B. thuringiensis* wobec owadów i ich zastosowania w kontroli szkodników. Twórcy: **Baranek J.**, Kaznowski A., Banaszak M.
- 2) Patent nr 428225 (przyznany 12.2020) na wynalazek dotyczący owadobójczej aktywności preparatów zawierających białka Cry9 *B. thuringiensis* wobec owadów i ich zastosowania w kontroli szkodników. Twórcy: **Baranek J.**, Kaznowski A., Lorent D.
- 3) Patent nr 428223 (przyznany 12.2020) na wynalazek dotyczący aktywności owadobójczej preparatów zawierających białka Cry2Ab *Bacillus thuringiensis* wobec owadów i ich zastosowania w kontroli szkodników. Twórcy: **Baranek J.**, Kaznowski A., Banaszak M.

Wiodący wkład w powstanie tych wynalazków (oficjalny udział habilitanta wynosi w zależności od wynalazku od 80% do 95%) został szczegółowo opisany w załączniku 3, rozdział III, punkt 3, podpunkty 1), 2) i 3).

Dziedzina wiedzy, w jakiej się poruszam ma bardzo mocno zaakcentowany charakter aplikacyjny. Wiąże się to z wykorzystaniem działania *B. thuringiensis* w kontroli groźnych szkodników powodujących straty (szacowane na dziesiątki lub setki milionów dolarów rocznie) w rolnictwie, sadownictwie i leśnictwie na całym świecie. Uwarunkowania ekonomiczne, jakie niewątpliwie wiążą się z tym zagadnieniem, sprawiają, że prowadzone przeze mnie badania znajdują się na styku nauki i współpracy z gospodarką. Z tego względu, część moich odkryć została zastrzeżona w postaci patentów, co stanowi pierwszy krok do ich komercjalizacji. Za najważniejsze należy uznać trzy wyżej wypunktowane patenty, w których mój wkład jako twórcy wynosi minimum 80%: W skromnym stopniu przyczyniłem się także do opatentowania owadobójczego zastosowania preparatu, zawierającego kryształy białkowe *B. thuringiensis* i olejek gorczycowy [**załącznik 3, rozdział III, punkt 3., podpunkt 4)**].

Doświadczenie zdobyte w formułowaniu poprawnych wniosków o udzielenie patentu pozwoliło mi złożyć w sierpniu 2022 roku trzy kolejne zgłoszenia patentowe, dotyczące praktycznego użycia białek typu LPMO w kontroli szkodników [**załącznik 3, rozdział III, punkt 3., podpunkty 1), 2), 3)**]. LPMO to stosunkowo nowa grupa zależnych od miedzi enzymów oksydoredukcyjnych, o kluczowej roli w biodegradacji polisacharydów takich jak celuloza czy chityna. W toku moich prac okazało się, że te enzymy (pozyskane zarówno z bakterii gramujemnych jak i gramodatnich) mają negatywny wpływ na rozwój larw *S. exigua* po ich podaniu wraz z pożywką.

Końcowo, pragnę nadmienić, że w dalszej kolejności chcę podjąć następne kroki, zmierzające do komercjalizacji wyżej opisanych wynalazków oraz tych conceptów, które aktualnie są jeszcze w fazie inicjalnej.

C. Ocena utrzymywania się endospor *B. thuringiensis* w środowisku leśnym po aplikacji komercyjnego preparatu bioinsektycydowego

Kolejną ważną inicjatywą w jakiej brałem udział, to projekt pod kierownictwem prof. dr hab. Edyty Koneckiej (Zakład Mikrobiologii UAM), dotyczący oceny trwałości endospor *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* w środowisku leśnym, po zastosowaniu mikrobiologicznego preparatu Foray 04 UL [[65]; załącznik 3, rozdział II, punkt 4., podpunkt 11)]. Badania przeprowadzono we współpracy z Wydziałem Ochrony Lasu Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu. Preparat został rozpylony w 2011 roku nad lasem dębowym o powierzchni 195 hektarów, w okolicy Krotoszyna (woj. wielkopolskie). Opryski wykonano z powietrza, zgodnie z wytycznymi Lasów Państwowych RP, jako odpowiedź na gradację liściożernych larw owadów z rzędu Lepidoptera, a szacowane straty w drzewostanie przekroczyły próg decyzyjny. Warto nadmienić, że zabieg z użyciem środka zawierającego endospory *B. thuringiensis* odbył się na tym obszarze po raz pierwszy. W toku badań pobrane zostały próbki liści drzew oraz gleby zarówno przed wykonaniem oprysku jak i w różnych interwałach czasowych po nim, przez okres 18 miesięcy.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysnuć następujące wnioski: (i) endospory *B. thuringiensis*, które aplikowane są wraz z preparatami bioinsektycydowymi w środowisku leśnym utrzymują się relatywnie krótko na powierzchni liści drzew liściastych i stosunkowo długo (około roku) w glebie pod najniższymi warstwami lasu; (ii) ewentualna aktywność *B. thuringiensis* wobec organizmów innych niż docelowe i niekorzystne efekty uboczne mają niewielkie prawdopodobieństwo wystąpienia, ze względu na krótki czas ekspozycji na entomopatogena w nadziemnych częściach roślin; (iii) relatywnie długi okres trwania endospor *B. thuringiensis* w glebie może potencjalnie wywierać wpływ na organizmy nie będące celem zabiegu (w tym wywierać presję selekcyjną i indukować narastanie oporności), choć przetrwalnikowa (metabolicznie uśpiona) forma entomopatogena sugeruje niskie prawdopodobieństwo takich zdarzeń; (iv) należy monitorować ewentualne działania niepożądane powodowane przez zabiegi zawierające *B. thuringiensis*.

D. Potencjalna użyteczność karwakrolu w biologicznej kontroli szkodników

Choć na chwilę obecną bioinsektycydy zawierające czynniki toksyczne *B. thuringiensis* stanowią zdecydowaną większość komercyjnego rynku, to równolegle penetrowane są inne ścieżki badawcze, prowadzące do opracowania alternatywnych strategii biologicznej kontroli szkodników. Jedną z koncepcji jest zastosowanie w biologicznej ochronie roślin substancji pochodzenia roślinnego. W trakcie mojej pracy badawczej miałem okazję brać udział w pracy sprawdzającej skuteczność owadobójczą jednego z takich czynników. Wyniki zostały opublikowane w 2020 roku w czasopiśmie *BioControl* [[41]; załącznik 3, Rozdział II, punkt 4., podpunkt 6)] i wskazały potencjalną użyteczność karwakrolu (fenolowego monoterpenu występującego m. in. w olejku eterycznym oregano) oraz mieszanin karwakrolu i kryształów białkowych *B. thuringiensis* w ograniczaniu liczebności larw *S. exigua* i *C. pomonella*.

E. Charakterystyka mikrobioty kolonizującej obiekty dziedzictwa kulturowego i propozycja innowacyjnych narzędzi ich biokonserwacji

Ostatnią istotną aktywnością naukową, jaką należy wymienić w tej części jest rozpoczęta w 2018 współpraca z Uniwersytetem Basilicata (Potenza, Włochy). Jest to aktywność dość szczególna w mojej pracy naukowej, ponieważ nie dotyczy biologicznej ochrony roślin przed szkodnikami. Tematyka badawcza realizowana z włoskim uniwersytetem jest jednak nie mniej interesująca, i obejmuje biologiczne aspekty ochrony i odnowy architektonicznego dziedzictwa kulturowego. W ramach tej współpracy pełniłem rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim Matteo Santacrose, MSc, p.t. „Bacteria colonizing cultural heritage: phenotypical and molecular characterization. Proposal of innovative bio-preservative tools” [załącznik 3, rozdział II, punkt 9., podpunkt 2)]. Praca badawcza realizowana była w ramach europejskiego programu “Smart Cities and Communities and Social Innovation” realizowanego przez Ministerstwo Uniwersytetu i Badań Republiki Włoch. W trakcie prac przeprowadzonych z moim udziałem lub pod moją opieką wykonana została analiza mikrobioty wewnątrz „Santa Lucia Alle Malve” (SLM) – dawnej chrześcijańskiej świątyni, datowanej na VIII wiek, w całości wykutej w skalnym wapieniu i ozdobionej wewnątrz licznymi freskami. Choć ta zachwycająca perła architektury jest ujęta na liście zabytków UNESCO i jest coraz większą atrakcją dla turystów to ulega ona stopniowej degradacji zarówno przez czynniki fizyczne, jak i kolonizujące ją organizmy. Zadania badawcze realizowane we współpracy z Uniwersytetem Basilicata obejmowały

kompleksową analizę przyczyn biologicznej degradacji świątyni SLM jak i potencjalne metody jej bioremediacji.

W wyniku prac badawczych został określony skład gatunkowy hodowalnych bakterii zasiedlających ściany świątyni oraz jednocześnie zastosowane zostało podejście metagenomowe w identyfikacji bytującej tam mikrobioty. Obie drogi zgodnie potwierdziły przewagę bakterii z grupy Bacillota (dawniej Firmicutes), a w szczególności z rodzaju *Bacillus* – co odróżnia SLM od wielu innych zabytków. Pomimo bliskości taksonomicznej, zidentyfikowane mikroorganizmy wykazują ogromne bogactwo i zróżnicowanie właściwości fizjologicznych i metabolicznych, co w zależności od szczepu może się przejawiać zarówno w pozytywnym jak i negatywnym wpływie na strukturę wapienia, z którego powstał zabytek.

W dalszej kolejności przeprowadzone zostały prace eksperymentalne określające aktywność przeciwdrobnoustrojową nowych substancji pochodzenia roślinnego wobec mikroorganizmów zasiedlających SLM. W rezultacie, wytypowano szereg preparatów, które mają wysoki potencjał do zastosowania w biooczyszczaniu (ang. *biocleaning*) powierzchni ścian w SLM (oraz prawdopodobnie innych budowlach dziedzictwa kulturowego). W przeciwieństwie do środków chemicznych, zastosowanie ekstraktów roślinnych jest podejściem przyjaznym dla środowiska i pozwoli zachować bezpieczeństwo dla ludzi zwiedzających historyczne obiekty kultury.

W ostatnim aspekcie, prace z moim udziałem pozwoliły wskazać wysoką aktywność biomineralizacji (biokalcyfikacji) *in vitro*, w przypadku niektórych bakterii naturalnie występujących w SLM. Mikroorganizmy te są zdolne do wygenerowania stałej formy węgla wapnia po wzroście na pożywce z odpowiednimi suplementami. Wyniki prac sugerują możliwość powtórnej inokulacji wyselekcjonowanych natywnych dla SLM szczepów w przyszłości, i ich użycia w procesie bioremediacji powierzchni SLM poddanych wcześniej biooczyszczaniu.

Niniejsze badania wpisują się w aktualny, nabierający tempa nurt badawczy, obejmujący poszukiwanie naturalnych, bezpiecznych dla człowieka, biologicznych metod ochrony i restytucji zdegradowanych kamiennych zabytków dziedzictwa kulturowego [66]. Dotychczasowe wyniki wspólnych dociekań zostały opublikowane w postaci dwóch doniesień konferencyjnych [**załącznik 3, rozdział II, punkt 7., podpunkty 3) i 5)**] oraz jednej publikacji pokonferencyjnej, widniejącej w Journal Citation Reports [[67]; **załącznik 3, rozdział II, punkt 4., podpunkt 7)**].

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W rozwoju mojego doświadczenia naukowego niezwykle istotnym elementem była aktywność realizowana w jednostkach badawczych innych niż moja macierzysta uczelnia. Znaczna część mojego warsztatu badawczego i umiejętności została nabyta w trakcie staży, w tym staży zagranicznych, zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnie doktora. Poniżej opisane zostały poszczególne jednostki naukowe, oraz aktywność naukowa, jaką w nich prowadziłem.

Przed uzyskaniem stopnia doktora

Instytut Ochrony Roślin (Państwowy Instytut Badawczy) w Poznaniu

W pierwszej kolejności należy wymienić szkolenie jakie odbyłem w 2010 roku pod kierunkiem prof. Jadwigi Ziemnickiej w Instytucie Ochrony Roślin, Państwowym Instytucie Badawczym (IOR PIB) w Poznaniu [**załącznik 3, rozdział II, punkt 11., podpunkt 3**]. Szkolenie na terenie ww. placówki obejmowało hodowlę laboratoryjnych linii owadów lub ich pobór ze środowiska oraz projektowanie i wykonanie testów aktywności owadobójczej mikroorganizmów. Przedmiotem szkolenia były owady z rzędu Lepidoptera, takie jak: białka wierzbowka (*L. salicis*), światłówka naziemnica (*S. exigua*), owocówka jabłkówekczka (*C. pomonella*), oraz wybrane rolnice (*Agrotinae*) – owady te to organizmy docelowe w testach aktywności owadobójczej wielu moich prac już opublikowanych, aktualnie prowadzonych, a także projektów planowanych w przyszłości. Cenne umiejętności, które nabyłem w trakcie szkolenia, i których nieustannie używam w pracy naukowej, są dla mnie cennym atutem.

Wymiernym efektem współpracy z IOR PIB jest moje współautorstwo w czterech publikacjach [37,39,40,68], których wynikiem jest kompleksowe określenie aktywności insektycydowej szeregu nowych izolatów *B. thuringiensis*, i w efekcie wskazanie wysokiego potencjału tych izolatów w biologicznej ochronie roślin. Ponadto, niezwykle owocne są kontakty naukowe z pracownikami IOR (PIB) jakie wtedy zyskałem, a ich efektem jest na przykład niedawna wspólna publikacja, wskazująca po raz pierwszy na świecie potencjał *B*

thuringiensis w kontroli rolnicy czopówki (*Agrotis exclamationis*) – szkodnika upraw w strefie Palearktycznej [[49]; załącznik 3, rozdział I, punkt 2., podpunkt 2)].

Uniwersytet w Płowdiw “Paisii Hilendarski”, Płowdiw, Bułgaria

Po tym jak opanowałem techniki prowadzenia testów toksyczności wobec owadów postanowiłem zgłębić wiedzę i umiejętności dotyczące inżynierii genetycznej, związanej z pestycydowymi białkami *B. thuringiensis* – był to kolejny etap jaki uznałem za niezbędny w mojej przyszłej pracy naukowej. W tym celu, w ramach stażu zagranicznego w 2012 roku udałem się na Uniwersytet w Płowdiw, w Bułgarii [załącznik 3, rozdział II, punkt 11., podpunkt 2)]. W tej placówce w Zakładzie Fizjologii Roślin i Biologii Molekularnej miałem okazję uczyć się i obserwować jak pracuje dr Samir Naimov (oficjalny opiekun mojego stażu) oraz dr Ruud de Maagd – światowej klasy specjalści w zakresie biologicznej ochrony roślin i bioinsektycydów opartych na czynnikach *B. thuringiensis*. Podczas naszej współpracy miałem okazję zgłębić techniki klonowania oraz heterologicznej ekspresji genów kodujących owadobójcze toksyny *B. thuringiensis* – ten warsztat wykorzystuję obecnie rutynowo w większości moich prac badawczych. Współpraca z naukowcami z Uniwersytetu w Płowdiw zaowocowała bardzo istotną wspólną publikacją [[43]; załącznik 3, rozdział II, punkt 4., podpunkt 9)]. W tej pracy określona została wysoka aktywność uzyskanych w wyniku heterologicznej ekspresji białek Vip3Aa58 oraz Vip3Aa59 wobec ważnych pod względem ekonomicznym szkodników upraw polowych (*S. exigua*), sadowniczych (*C. pomonella*) i leśnych (*D. pini*) – w przypadku dwóch ostatnich gatunków owadów było to pierwsze na świecie oznaczenie ich wrażliwości na toksyny z grupy Vip3 *B. thuringiensis*. Praca ta wywarła istotny wpływ na dziedzinę badawczą, dotyczącą aktywności toksyn *B. thuringiensis* wobec szkodników, o czym świadczy niemała liczba cytowań (26 wg Web of Science).

Potwierdzenie odbycia stażu zawarto w **załączniku 6**.

Po uzyskaniu stopnia doktora

Uniwersytet Charles’a Sturt’a, Wagga Wagga, Nowa Południowa Walia, Australia

Kolejnym miejscem, gdzie zdobyłem ogromne doświadczenie w pracy naukowej był Uniwersytet Charles’a Sturt’a w konsorcjum z Graham Centre for Agricultural Innovation (CSU/GCAI), w Wagga Wagga (Australia, NSW) [załącznik 3, rozdział II, punkt 11.,

podpunkt 1)]. Zagraniczny staż podoktorski jaki tam odbyłem w roku 2015 był niezwykle rozwijającym doświadczeniem i pomimo pozostania w sferze biologicznej ochrony roślin pozwolił mi on zgłębić zupełnie nowe aspekty. Zajmowałem się tam entomopatogennym grzybem z rodzaju *Metarhizium* i jego aktywnością wobec szkodników takich jak mącznik młynarek oraz mszyce. W wyniku prac przeprowadzonych w ramach tego wyjazdu udało mi się zidentyfikować geny kodujące czynniki owadobójcze (enzymy degradujące owadzią kutykulę i matriks perytoficzną) u ponad 20 izolatów z gatunków takich jak *M. anisopliae*, *M. robertsii*, *M. acridum* i in. Przeprowadziłem następnie analizę korelacji występowania ww. genów z aktywnością owadobójczą poszczególnych entomopatogennych grzybów. W kolejnym aspekcie, przygotowałem procedury pozwalające na edycję genomu grzybów z rodzaju *Metarhizium* (genetyczny knock-out sekwencji kodujących enzymy degradujące chitynę) z użyciem technologii CRISPR/Cas9 – zyskałem w ten sposób dużą dozę doświadczenia w pracy z tym stosunkowo nowym i efektywnym narzędziem inżynierii genetycznej. W trakcie pobytu w CSU/GCAI miałem okazję pracować w kwarantannowym laboratorium QAP (ang. Quarantine Approved Premises) drugiej klasy zagrożenia biologicznego (BSL-2), co pokazało mi jak spełniać zasady dobrej praktyki laboratoryjnej w takich wyspecjalizowanych placówkach. Projekt wykonywany w laboratoriach naukowych w Wagga Wagga nie został jeszcze zakończony i kontynuuję go w mojej macierzystej jednostce. W ostatnim czasie zaprojektowałem i otrzymałem wektory ekspresyjne, które posłużą do heterologicznej ekspresji genów kodujących enzymy degradujące chitynę, charakterystyczne dla grzybów z rodzaju *Metarhizium*. W przyszłości planowane są dalsze procedury eksperymentalne, jak również publikacja obejmująca wszystkie powyższe wyniki badań, związane z pracą w CSU/GCAI.

Potwierdzenie odbycia stażu zawarto w **załączniku 6**.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Działalność dydaktyczna jest dla mnie niezwykle istotnym elementem pracy i kariery zawodowej. Nabyte przez lata wyteżonej pracy doświadczenie zawodowe i warsztat naukowy tylko poprzez rzetelną pracę dydaktyczną mogą być przekazane następnym „pokoleniom” naukowców i służyć rozwojowi nowych kadr. Dlatego w miarę moich umiejętności dokładam wielu starań aby zajęcia były bogate w wysokiej jakości merytoryczną treść ale również aby były inspiracją dla studentów do dalszego rozwoju.

W ramach mojej pracy na Uniwersytecie prowadziłem co roku zajęcia ćwiczeniowe z następujących przedmiotów: (i) „Mikrobiologia”; (ii) „Mikrobiologia ogólna i środowiskowa”; (iii) „Mikrobiologia żywności”; (iv) „Immunologia”. Dużo satysfakcji dają mi również zajęcia prowadzone dla studentów zagranicznych. W ramach kursu „General microbiology” prowadziłem zajęcia dla studentów North Carolina State University (NCSU) – zarówno laboratoria, jak i wykłady (semestr 2017 oraz 2019). W ramach niniejszej inicjatywy stworzyłem sylabus dla tego kursu, a także miałem okazję współpracować z dydaktykami z NCSU – nowe pomysły i techniki dydaktyczne, które wtedy zaadoptowałem są przeze mnie stosowane do dziś. Niedawno stworzyłem także autorski przedmiot „Environmental impact of crop protection (laboratoria i wykłady) w ramach anglojęzycznych studiów Environmental Protection na Wydziale Biologii UAM. Cennym doświadczeniem dydaktycznym był także przedmiot „Microorganisms” (wykłady + konwersatoria + laboratoria), jaki prowadziłem w ramach AMU Pre Med (kursu przygotowującego studentów międzynarodowych do egzaminu na studia medyczne) w latach 2014/2015, 2015/2016, 2016/2017.

Jedną z najbardziej odpowiedzialnych funkcji dydaktycznych, jakie mogłem piastować na Uniwersytecie było recenzowanie, a w szczególności promowanie prac dyplomowych. Do tej pory wypromowałem 12 prac licencjackich oraz dwie prace magisterskie (dodatkowo nad wieloma pracami magisterskimi pełniłem naukową opiekę). Miałem także okazję recenzować sześć prac licencjackich i jedną magisterską. Myślę, że swoje zadanie wypełniłem dość dobrze, ponieważ wśród wypromowanych przeze mnie dyplomantów (z większością mam stały kontakt) są zarówno absolwenci uczelni rozwijający swoją karierę w prywatnych podmiotach gospodarczych z sektora mikrobiologicznego/biotechnologicznego (w kraju i za granicą), jak i młodzi akademicy w trakcie studiów doktoranckich. Niedawno, byłem także promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Matteo Santacroe p.t. „Bacteria colonizing

cultural heritage: phenotypical and molecular characterization. Proposal of innovative bio-preservative tools” w ramach międzynarodowego programu doktorskiego „Applied Biology and Environmental Safeguard”; Settore Scientifico Disciplinare “AGR/13 – Chimica Agraria”.

W celu poszerzenia moich umiejętności dydaktycznych i rozwinięcia indywidualnego podejścia do podopiecznych ukończyłem w 2022 roku kurs, skutkujący nadaniem certyfikatu tutora, przez Collegium Wratislaviense. Poprzez działania tutorskie, chciałbym wspomagać rozwój kariery obiecujących młodych adeptów nauk biologicznych.

Specyficzną formą dydaktyki są działania popularyzatorskie. W ciągu roku na mojej Uczelni odbywa się kilka „wydarzeń” popularyzujących naukę wśród uczniów szkół podstawowych, szkół średnich, a także pozostałych części społeczeństwa, w tym rodzin z małymi dziećmi. Bycie częścią kadry prowadzącej takie zajęcia to dla mnie warunek *sine qua non*. Do tej pory uczestniczyłem jako prowadzący w wydarzeniach takich jak: Dni Akademickie dla uczniów klas patronackich Wydziału Biologii UAM (2017, 2018, 2019, 2020, 2023); Poznański Festiwal Nauki i Sztuki (2017); Fascynujący Świat Roślin (2016, 2017, 2022); Noc Naukowców (2022). Bardzo interesującym doświadczeniem był także otwarty kurs “Jak zapanować nad mikroorganizmami”, w ramach „KOLABORATORIUM UAM – program szkoleniowy dla mieszkańców regionu” nr POWR.03.01.00-00-T092/18. Wymiana doświadczeń i opinii z profesjonalistami z innych branży było wydarzeniem nietuzinkowym i ukazało szerszą perspektywę dziedziny wiedzy jaką się zajmuję.

W czasie swojej pracy na Uniwersytecie pełniłem także kilka funkcji organizacyjnych. W bieżącym roku pracuję w dwóch dziekańskich zespołach. Pierwszy ma za zadanie opracować program studiów II stopnia na kierunkach „Biotechnologia” (PL) oraz „Biotechnology” (ENG). W drugim zespole współpracuję przy napisaniu wniosku projektowego w ramach Funduszu Europejskiego dla Rozwoju Społecznego (FERS), dotyczącego dwóch działań: (i) współpracy z podmiotami w otoczeniu społeczno-gospodarczym i wpisującym się w obszar "bezpieczeństwo żywności, przemysł spożywczy i rolnictwo"; oraz (ii) podnoszenia kwalifikacji i kompetencji kadry prowadzącej dydaktykę. Ponadto, pełniłem funkcje opiekuna roku studiów, sekretarza w trakcie konkursów na studia doktoranckie, sekretarza w trakcie obrony prac doktorskich oraz członka zespołu przeprowadzającego wybory dziekana Wydziału Biologii UAM.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

W trakcie mojej wieloletniej działalności naukowej bardzo dużym wsparciem i motywacją do dalszej wyężonej pracy były nagrody jakie przyznawał mi mój Uniwersytet i Wydział Biologii (Nagroda Zespołowa UAM za osiągnięcia w pracy naukowej, 2016; stypendium UAM za wyróżniające osiągnięcia w pracy naukowej, 2013; stypendium dla najlepszych doktorantów, 2012) oraz inne jednostki naukowe (Nagroda FEMS Meeting Grant „Young Scientists”, 2012) i administracyjne (Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia Wielkopolski, Poddziałanie 8.2.2 PO KL.).

Najbardziej jednak owocna okazała się indywidualna nagroda **AgroBioTop** (VI edycja) jaką niedawno (12.2022) przyznał mi Komitet Biotechnologii PAN i firma Bayer <https://kbiotech.pan.pl/pl/345-nagroda-agrobiotop-dla-dr-jakuba-baranka>. Było to bardzo szczególne wyróżnienie, ponieważ w konkursie AgroBioTop laureatem jest rocznie tylko jeden naukowiec. Komisja doceniła zarówno moje publikacje w wysoko punktowanych czasopismach, jak i patenty na wynalazki z zakresu biologicznej ochrony roślin, których jestem twórcą. Osiągnięcie dotyczyło opracowania skutecznych strategii w kontrolowaniu ważnych pod względem ekonomicznym szkodników roślin. Idea konkursu AgroBioTop jest mi bardzo bliska, ponieważ uważam, że choć podstawowym zadaniem nauki jest wyjaśnianie zjawisk zachodzących w przyrodzie, to w dużej mierze nowe odkrycia powinny mieć charakter aplikacyjny służyć społeczeństwu.

Nagrodzenie moich prac i towarzyszący temu rozgłos medialny spowodował rozpropagowanie w Polsce idei biologicznej ochrony roślin – domeny niezwykle istotnej w rozwoju rolnictwa zrównoważonego i produkcji żywności dla rosnącej populacji ludzi. W kolejnym aspekcie, wzrost mojej rozpoznawalności spowodował bardzo szybki rozwój współpracy ze środowiskiem gospodarczym. W roku 2023 zrealizowałem współpracę z firmą Bacto-Tech Sp. z o.o. w zakresie określenia zawartości białek pestycydowych w kryształach szczepów bakteryjnych przeznaczonych do produkcji biologicznych insektycydów [**załącznik 3, rozdział III, punkt 5**]. Wykonałem także szereg ekspertyz dla firmy TIM [**załącznik 3, rozdział III, punkt 2**] w celu opracowania strategii produkcji i rejestracji nowych produktów bioinsektycydowych na rynek polski. Kolejne interakcje ze środowiskiem gospodarczym są w fazie doprecyzowania. W przyszłości, chciałbym kontynuować tę ścieżkę kariery, w której oprócz walorów poznawczych moja praca służyłaby wdrażaniu i komercjalizacji wyników badań naukowych.

8. LITERATURA

1. Sanchis V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agron Sustain Dev*. 2011;31: 217–231. doi:10.1051/agro/2010027
2. Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol*. 2015;132: 1–41. doi:10.1016/j.jip.2015.07.009
3. Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC. Bacterial Pesticidal Protein Resource Center. 2023 [dostęp: 06.2023]. <https://www.bpprc.org/>
4. Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol*. 2020; 107438. doi:10.1016/j.jip.2020.107438
5. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 2014;6: 3296–3325. doi:10.3390/toxins6123296
6. Van Frankenhuyzen K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol*. 2009;101: 1–16. doi:10.1016/j.jip.2009.02.009
7. Konecka E, Kaznowski A, Baranek J. Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. *Postepy Mikrobiologii*. 2011;50: 303–311.
8. Kumar P, Kamle M, Borah R, Mahato DK, Sharma B. *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. *Egypt J Biol Pest Control*. 2021;31: 95. doi:10.1186/s41938-021-00440-3
9. Culliney TW. *Crop Losses to Arthropods. Integrated Pest Management*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. pp. 201–225. doi:10.1007/978-94-007-7796-5_8
10. Pisa L, Goulson D, Yang EC, Gibbons D, Sánchez-Bayo F, Mitchell E, et al. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28: 11749–11797. doi:10.1007/s11356-017-0341-3
11. Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Front Public Health*. 2016;4: 1–8. doi:10.3389/fpubh.2016.00148
12. Dhawan AK, Peshin R. *Integrated Pest Management: Concept, Opportunities and Challenges*. In: Peshin R, Dhawan AK, editors. *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*. Dordrecht: Springer; 2009. pp. 51–81. doi:10.1007/978-1-4020-8992-3_2
13. Barzman MS, Bertschinger L, Dachbrodt-Saaydeh S, Graf B, Jensen JE, Joergensen LN, et al. *Integrated pest management policy, research and implementation: European initiatives*. In: Peshin R, Pimentel D, editors. *Integrated Pest Management: Experiences with Implementation, Global Overview, Vol4*. Springer; 2014. pp. 415–428. doi:10.1007/978-94-007-7802-3_17
14. Ibargutxi MA, Muñoz D, Escudero IR de, Caballero P. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control*. 2008;47: 89–96. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.07.003
15. Fernández-Luna MT, Tabashnik BE, Lanz-Mendoza H, Bravo A, Soberón M, Miranda-Ríos J. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *J Invertebr Pathol*. 2010;104: 231–233. doi:10.1016/j.jip.2010.03.007

16. Gao Y, Hu Y, Fu Q, Zhang J, Oppert B, Lai F, et al. Screen of *Bacillus thuringiensis* toxins for transgenic rice to control *Sesamia inferens* and *Chilo suppressalis*. J Invertebr Pathol. 2010;105: 11–15. doi:10.1016/j.jip.2010.05.002
17. Li H, Bouwer G. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J Invertebr Pathol. 2014;121: 7–13. doi:10.1016/j.jip.2014.06.005
18. Wang Z, Fang L, Zhou Z, Pacheco S, Gómez I, Song F, et al. Specific binding between *Bacillus thuringiensis* Cry9Aa and Vip3Aa toxins synergizes their toxicity against Asiatic rice borer (*Chilo suppressalis*). Journal of Biological Chemistry. 2018;293: 11447–11458. doi:10.1074/jbc.RA118.003490
19. Hilbeck A, Otto M. Specificity and combinatorial effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in the context of GMO environmental risk assessment. Front Environ Sci. 2015;3: 1–18. doi:10.3389/fenvs.2015.00071
20. Alvarez F, Arena M, Auteri D, Borroto J, Brancato A, Carrasco Cabrera L, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain ABTS-351. EFSA Journal. 2021;19. doi:10.2903/j.efsa.2021.6879
21. Anastassiadou M, Arena M, Auteri D, Brancato A, Bura L, Carrasco Cabrera L, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain SA-11. EFSA Journal. 2020;18. doi:10.2903/j.efsa.2020.6261
22. Anastassiadou M, Arena M, Auteri D, Brancato A, Bura L, Carrasco Cabrera L, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* strain GC-91. EFSA Journal. 2020;18. doi:10.2903/j.efsa.2020.6293
23. Anastassiadou M, Arena M, Auteri D, Brancato A, Bura L, Carrasco Cabrera L, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* strain ABTS-1857. EFSA Journal. 2020;18. doi:10.2903/j.efsa.2020.6294
24. Tabashnik BE, Carrière Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. Nature Biotechnology. 2017. pp. 926–935. doi:10.1038/nbt.3974
25. Hernández-Martínez P, Ferré J, Escriche B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol. 2008;97: 245–250. doi:10.1016/j.jip.2007.11.001
26. De Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Molthoff JW, Naimov S. Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. Arch Microbiol. 2003;179: 363–367. doi:10.1007/s00203-003-0543-6
27. Su HH, Jiang LL, Wang HT, Yang TZ, Harvey-Samuel T, Zhou QX, et al. Sublethal effects of Bt toxin and chlorpyrifos on various *Spodoptera exigua* populations. Entomol Exp Appl. 2015;157: 214–219. doi:10.1111/eea.12358
28. Guo JY, Wu G, Wan FH. Activities of digestive and detoxification enzymes in multiple generations of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), in response to transgenic Bt cotton. J Pest Sci (2004). 2010;83: 453–460. doi:10.1007/s10340-010-0315-4
29. Yang F, Kerns DL, Little N, Brown SA, Stewart SD, Catchot AL, et al. Practical resistance to Cry toxins and efficacy of Vip3Aa in Bt cotton against *Helicoverpa zea*. Pest Manag Sci. 2022;78: 5234–5242. doi:10.1002/ps.7142
30. Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carrière Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data. J Econ Entomol. 2009;102: 2011–2025. doi:10.1603/029.102.0601
31. Tabashnik BE, Brévault T, Carrière Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nat Biotechnol. 2013;31: 510–521. doi:10.1038/nbt.2597

32. Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Reviews Entomology. 2002;47: 501–533. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145234
33. Baranek J, Pluskota M, Rusin M, Konecka E, Kaznowski A, Wiland-Szymańska J. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from tropical greenhouses towards *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua* larvae. BioControl. 2023. doi:10.1007/s10526-022-10173-3
34. Konecka E, Baranek J, Kaznowski A. Crystalline protein profiling and *cry* gene detection in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. Biological Letters. 2014;51: 82–92. doi.org/10.1515/biolet-2015-0008
35. Konecka E, Baranek J, Kaznowski A. Genetic similarity and distribution of *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic for *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocontrol Sci Technol. 2013;23: 474–479. doi:10.1080/09583157.2013.764400
36. Baranek J, Konecka E, Kaznowski A. Application of PCR and culture filtrate toxicity assay to determine potential insecticide activity of *Bacillus thuringiensis* Vip-proteins. Progress in Plant Protection. 2012;52: 777–780.
37. Konecka E, Baranek J, Kaznowski A, Ziemnicka J, Ziemnicki K. Interaction between crystalline proteins of two *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera exigua*. Entomol Exp Appl. 2012;143: 148–154. doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01254.x
38. Konecka E, Baranek J, Hrycak A, Kaznowski A. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. The Scientific World Journal. 2012;2012: 1–5. doi:10.1100/2012/710501
39. Konecka E, Baranek J, Ziemnicka J, Kaznowski A. Activity of a mixture of *Bacillus thuringiensis* MPU B7 and MPU B9 protein crystals against white satin moth (*Leucoma salicis* L.). Progress in Plant Protection. 2011;51: 393–396.
40. Konecka E, Ziemnicka J, Baranek J, Kaznowski A. Potential usefulness of *Bacillus thuringiensis* MPU B9 protein crystals for reducing the number of white satin moth (*Leucoma salicis* L.). Progress in Plant Protection. 2010;50: 357–360.
41. Konecka E, Kaznowski A, Grzesiek W, Nowicki P, Czarniewska E, Baranek J. Synergistic interaction between carvacrol and *Bacillus thuringiensis* crystalline proteins against *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua*. BioControl. 2020;65: 447–460. doi:10.1007/s10526-020-10011-4
42. Baranek J, Konecka E, Kaznowski A. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. BioControl. 2017;62: 649–658. doi:10.1007/s10526-017-9828-6
43. Baranek J, Kaznowski A, Konecka E, Naimov S. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. J Invertebr Pathol. 2015;130: 72–81. doi:10.1016/j.jip.2015.06.006
44. Alford D V. Pests of Fruit Crops. 2nd ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 2014. doi:10.1201/b17030
45. Robinson GS, Ackery PR, Kitching IJ, Beccaloni GW, Hernández LM. HOSTS - A Database of the World's Lepidopteran Hostplants. In: Natural History Museum, London [Internet]. 2010 [dostęp: 07.2023]. <https://data.nhm.ac.uk/dataset/hosts>
46. Carter DJ. Pest Lepidoptera of Europe: with special reference to the British Isles. Dordrecht: Dr W. Junk Publishers; 1984.
47. Bocianowski J, Wielkopolan B, Jakubowska M. AMMI Analysis of the Effects of Different Insecticidal Treatments against *Agrotis* spp. on the Technological Yield from Sugar Beet. Agriculture (Switzerland). 2022;12: 157. doi:10.3390/agriculture12020157

48. Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl Sci.* 2019;1: 1–16. doi:10.1007/s42452-019-1485-1
49. Baranek J, Jakubowska M, Gabała E. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* towards *Agrotis exclamationis* larvae—A widespread and underestimated pest of the Palearctic zone. *PLoS One.* 2023;18. doi:10.1371/journal.pone.0283077
50. Cutler GC, Amichot M, Benelli G, Guedes RNC, Qu Y, Rix RR, et al. Hormesis and insects: Effects and interactions in agroecosystems. *Science of The Total Environment.* 2022;825: 153899. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153899
51. Pajac I, Pejic I, Baric B. Codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) – major pest in apple production: an overview of its biology, resistance, genetic structure and control strategies. *Agriculturae Conspectus Scientificus.* 2011;76: 87–92. doi:10.1080/09583150802267046
52. Beers EH, Suckling DM, Prokopy RJ, Avilla J. Ecology and management of apple arthropod pests. *Apples: botany, production and uses.* Wallingford: CABI; 2003. pp. 489–519. doi:10.1079/9780851995922.0489
53. Baranek J, Banaszak M, Kaznowski A, Lorent D. A novel *Bacillus thuringiensis* Cry9Ea-like protein with high insecticidal activity towards *Cydia pomonella* larvae. *Pest Manag Sci.* 2021;77: 1401–1408. doi:10.1002/ps.6157
54. Gupta M, Kumar H, Kaur S. Vegetative Insecticidal Protein (Vip): A Potential Contender From *Bacillus thuringiensis* for Efficient Management of Various Detrimental Agricultural Pests. *Front Microbiol.* 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.659736
55. Zheng X-L, Wang P, Cheng W-J, Wang X-P, Lei C-L. Projecting overwintering regions of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* in China using the CLIMEX Model. *Journal of Insect Science.* 2012;12: 13. doi:10.1673/031.012.1301
56. Capinera JL. *Handbook of Vegetable Pests.* San Diego, California, USA: Academic Press; 2001.
57. Huang J-M, Zhao Y-X, Sun H, Ni H, Liu C, Wang X, et al. Monitoring and mechanisms of insecticide resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), with special reference to diamides. *Pestic Biochem Physiol.* 2021;174: 104831. doi:10.1016/j.pestbp.2021.104831
58. Ishtiaq M, Saleem MA, Razaq M. Monitoring of resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of the Southern Punjab, Pakistan to four conventional and six new chemistry insecticides. *Crop Protection.* 2012;33: 13–20. doi:10.1016/j.cropro.2011.11.014
59. Baranek J, Banaszak M, Lorent D, Kaznowski A, Konecka E. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2 and Vip3 toxin combinations in *Spodoptera exigua* control: highlights on synergism and data scoring. *Entomologia Generalis.* 2021;41: 71–82. doi:10.1127/entomologia/2020/0995
60. Somwatcharajit R, Tiantad I, Panbangred W. Coexpression of the silent *cry2Ab27* together with *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SP41 leads to formation of amorphous crystal toxin and enhanced toxicity against *Helicoverpa armigera*. *J Invertebr Pathol.* 2014;116: 48–55. doi:10.1016/j.jip.2013.12.008
61. Cedergreen N. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS One.* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0096580
62. Baranek J, Pogodziński B, Szipluk N, Zielezinski A. TOXiTAXi : a web resource for toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein compositions towards species of various taxonomic groups. *Sci Rep.* 2020;10: 19767. doi:10.1038/s41598-020-75932-7
63. Skrzecz I, Ślusarski S, Tkaczyk M. Integration of science and practice for *Dendrolimus pini* (L.) management – A review with special reference to Central Europe. *Forest Ecology and Management.* Elsevier B.V.; 2020. doi:10.1016/j.foreco.2019.117697

64. Sun YX, Wang L, Wei GQ, Qian C, Dai LS, Sun Y, et al. Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of *Leucoma salicis* (Lepidoptera: Lymantriidae) and Comparison with Other Lepidopteran Insects. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep39153
65. Konecka E, Baranek J, Bielińska I, Tadeja A, Kaznowski A. Persistence of the spores of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves. *Science of the Total Environment.* 2014;472: 296–301. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.077
66. Ortega-Morales BO, Gaylarde CC. Bioconservation of Historic Stone Buildings—An Updated Review. *Applied Sciences.* 2021;11: 5695. doi:10.3390/app11125695
67. Scrano L, Laviano R, Salzano G, Santacroce M, De Franchi SA, Baranek J, et al. Natural biocides and bio-calcite: innovative tools for cultural heritage. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2020;949: 012096. doi:10.1088/1757-899X/949/1/012096
68. Konecka E, Baranek J, Hrycak A, Kaznowski A. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012: 710501. doi:10.1100/2012/710501

.....
(podpis wnioskodawcy)