

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego
w produkcji roślinnej w 2022 roku

Tytuł zadania

Występowanie *Puccinia graminis*
na pszenicy i pszenzycie, jego różnicowanie
oraz poszukiwanie fenotypowych, molekularnych
i metabolicznych markerów odporności na rdzę źdźbłową

Decyzja MRiRW:

DHR.hn.802.6.2022 z dnia 28 kwietnia 2022 r., zadanie nr 8

Okres realizacji zadania:

01.01.2022–31.12.2022

Podmiot realizujący zadanie:

Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Kierownik zadania:

dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk, prof. PBŚ

Pracownia Mykologii Molekularnej, Fitopatologii i Entomologii

Katedra Biologii i Ochrony Roślin

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii PBŚ

Al. prof. Sylwestra Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz

tel.: +48 52 3749491 / +48 52 3749342

e-mail: Grzegorz.Lemanczyk@pbs.edu.pl

Wykonawcy zadania:

dr hab. inż. Anna Baturó-Cieśniewska

dr hab. inż. Dariusz Kulus, prof. PBŚ

dr inż. Aleksander Łukanowski

dr inż. Natalia Miler

Pomoc techniczna:

dr Karol Lisiecki

dr inż. Sebastian Sendel

1. Tytuł zadania

Występowanie *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie, jego zróżnicowanie oraz poszukiwanie fenotypowych, molekularnych i metabolicznych markerów odporności na rdzę żdźbłą

2. Cele zadania

Celem zadania jest określenie nasilenia występowania *Puccinia graminis* na pszenicy i pszenżycie w Polsce, stworzenie krajowej kolekcji izolatów tego patogena, zbadanie wrażliwości genotypów zbóż (odmian, rodów, linii hodowlanych) oraz poszukiwania markerów fenotypowych, molekularnych i metabolicznych do identyfikacji genów odporności na rdzę żdźbłą

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

Określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu było określenie nasilenia występowania rdzy żdźbłowej w uprawach pszenicy i pszenżyta w Polsce.

Materiały i metody

Przeprowadzono ocenę nasilenia występowania objawów chorobowych rdzy żdźbłowej na roślinach pszenicy i pszenżyta uprawianych na polach produkcyjnych oraz na poletkach doświadczalnych należących głównie do Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU) zlokalizowanych w różnych rejonach Polski, reprezentujących powierzchnię całego kraju i poszczególne województwa (Fot. 1). Kryterium wyboru pól/miejscowości do planowanych obserwacji nasilenia występowania rdzy żdźbłowej była wstępna informacja od pracowników COBORU poszczególnych Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian dotycząca występowaniu objawów tej choroby.



Fot. 1. Doświadczenia z odmianami pszenicy i pszenżyta uprawianymi w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian COBORU w Głubczycach – jedna ze stacji w których wykonywano oceny nasilenia występowania objawów rdzy żdźbłowej

Ocenę wykonywano również w stacjach badawczych należących do firm zajmujących się hodowlą roślin (Fot. 2). Ponadto oceniano nasilenie objawów tej choroby na polach

produkcyjnych pszenicy i pszenżyta. Założeniem było objęcie obserwacjami wszystkich województw Polski. Oceniano procent źdźbeł z objawami rdzy źdźblowej. Przeprowadzono ją w lipcu, pod koniec okresu wegetacyjnego badanych gatunków zbóż, tj. pszenicy i pszenżyta. Ponadto pobierano próbki źdźbeł, na których widoczne były objawy rdzy źdźblowej, do dalszych etapów wykonywanych badań realizowanych w ramach projektu. Objawy porażenia na źdźblach badanych zbóż potwierdzano w warunkach laboratoryjnych.



Fot. 2. Doświadczenia z odmianami pszenicy uprawianymi w Zakładzie Hodowli Roślin w Dębnie

Wyniki

W trakcie obserwacji prowadzonych w 2022 roku nie stwierdzono występowania objawów chorobowych rdzy źdźblowej zarówno na roślinach pszenicy jak i pszenżyta uprawianych na polach produkcyjnych. Zapewne przyczyniła się do tego stosowana ochrona fungicydowa na tych polach towarowych oraz warunki pogodowe panujące w okresie wegetacji pszenicy i pszenżyta. W roku 2022 panowały niekorzystne warunki pogodowe dla rozwoju rdzy źdźblowej. Początek wiosny był stosunkowo chłodny, co sprawiło, iż okres dla rozwoju *P. graminis* był zbyt krótki by grzyb ten zdążył zainfekować wpierw żywiciela pośredniego a następnie zboża.

Nasilenie rdzy źdźblowej w stacjach badawczych należących do COBORU oraz firm hodowlanych, w których były również kombinacje bez ochrony fungicydowej, także obserwowano bardzo mało objawów chorobowych. Objawy chorobowe rdzy źdźblowej na pszenicy obserwowano w dziewięciu województwach, a na pszenżycie tylko w dwóch województwach. Na źdźblach roślin jak już stwierdzono obecność choroby, to najczęściej obserwowano tylko pojedyncze uredinia grzyba.

Wnioski

- A) W 2022 roku nie stwierdzono występowania objawów rdzy źdźblowej zarówno na pszenicy jak i pszenżycie uprawianych na polach produkcyjnych.
- B) Wyraźne objawy rdzy źdźblowej obserwowano na poletkach doświadczalnych z różnymi genotypami zbóż oraz niektórych uprawach bez ochrony fungicydowej, jednak objawów tych było bardzo mało. Na pszenicy najwięcej objawów rdzy źdźblowej stwierdzono w województwie małopolskim.

3.2. Temat badawczy 2

Utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis*.

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu jest utworzenie krajowej kolekcji izolatów *Puccinia graminis* przez pozyskanie zarodników letnich sprawcy rdzy źdźblowej, tj. uredospor.

Materiały i metody

W celu utworzenia krajowej kolekcji izolatów *P. graminis* podczas wykonywania ocen nasilenia występowania objawów rdzy żdźbłowej pobierano próbki żdźbeł, na które składały się fragmenty żdźbeł roślin pszenicy, pszenżyta a także żyta z wyraźnymi objawami tej choroby. Próbki te pobierano z odmianowych poletek doświadczalnych COBORU, zlokalizowanych w różnych rejonach Polski, w trakcie prowadzenia monitoringu nasilenia występowania rdzy żdźbłowej, podczas obserwacji prowadzonych na zróżnicowanych genotypach zbóż. Ponadto pobierano je ze stacji doświadczalnych należących do firm zajmujących się hodowlą zbóż. Próbek takich nie pobrano z pól produkcyjnych pszenicy i pszenżyta ponieważ nie stwierdzono na nich występowania objawów rdzy żdźbłowej.

Wyniki

Ze względu na W trakcie prowadzonych badań pozyskano 155 próbek żdźbeł z objawami rdzy żdźbłowej. Głównie były to próbki pobrane z roślin pszenicy ozimej. Spośród nich przeprowadzono selekcję i wybrano 40 izolatów *P. graminis*. Pierwszym etapem była wstępna identyfikacja gatunkowa przy użyciu mikroskopu lub binokularu w celu upewnienia się czy zebrany materiał badawczy stanowi *P. graminis*. Do kolejnych analiz izolaty zostały namnożone na młodych siewkach odmiany wykazującej wysoką podatność na rdzę żdźbłową.

Wnioski

A. W trakcie prowadzonych badań w 2022 roku pozyskano 155 próbek żdźbeł z objawami rdzy żdźbłowej zbóż i traw. Spośród nich wytypowano 40 izolatów *P. graminis* do dalszych badań, mających stanowić zaczątki kolekcji izolatów tego grzyba.

3.3. Temat badawczy 3

Badania zróżnicowania populacji *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego populacji *P. graminis*

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano izolaty *P. graminis* zgromadzone w kolekcji, pozyskane w 2021 roku. W pierwszym etapie przeprowadzono identyfikację w celu potwierdzenia przynależności izolatów do *P. graminis* za pomocą mikroskopu.

- Weryfikacja zróżnicowania genetycznego izolatów *Puccinia graminis*

Zostały podjęte próby przeprowadzenia analiz molekularnych celem potwierdzenia identyfikacji grzyba rdzawnikowego, zdiagnozowanego na podstawie morfologii i objawów na żdźbłach zbóż jako *P. graminis* przy pomocy analizy sekwencji regionów ITS (internal transcribed spacer) i LSU (large subunit) oraz określenie jego zróżnicowania genetycznego na podstawie analizy porównawczej badanych próbek oraz sekwencji zdeponowanych w GenBank NCBI.

Materiał badawczy stanowiły zewnętrzne warstwy żdźbeł pszenicy (33 próbki), pszenżyta (3 próbki) oraz żyta (6 próbek), na których stwierdzono objawy chorobowe sugerujące infekcję grzybem *P. graminis*. Zainfekowany materiał roślinny, zliofilizowany w urządzeniu CoolSafe, pocięto i homogenizowano na proszek przy pomocy stalowych kulek w młynie kulowym. DNA ekstrahowano przy użyciu zestawu Bead-Beat Micro AX Gravity i rozcieńczono w ddH₂O do dalszych analiz. Reakcje PCR mające na celu amplifikację regionów ITS i LSU przeprowadzono wykorzystując odczynniki PCR Mix Plus, DNA poszczególnych próbek oraz startery, odpowiednio ITS5-u/ITS4-u oraz LRust1R/LR6. Obecność produktów reakcji zweryfikowano po rozdiale elektroforetycznym w buforze TBE, przeprowadzonym na żelu agarozowym.

Produkty amplifikacji zostały oczyszczone i zsekwencjonowane przez Genomed. Sekwencjonowaniu poddano obie nici. Do analizy otrzymanych sekwencji użyto programu FinchTV 1.4. Analizę ClustalW przeprowadzono w MEGA11. Do identyfikacji gatunkowej na podstawie sekwencji ITS i LSU wykorzystano *Basic Local Alignment Search Tool* (w bazie NCBI. Do konstrukcji dendrogramu bazującego na sekwencjach LSU zastosowano metodę maksymalnego prawdopodobieństwa i model Hasegawa-Kishino-Yano w programie Mega11 Toolbar. Dendrogram sporządzono w celu zwizualizowania zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi izolatami oraz izolatami z GenBank NCBI.

- Badania patogeniczności izolatów *P. graminis*

Badania dotyczące testowania patogeniczności/wirulencji izolatów *P. graminis* wykonano w warunkach kontrolowanych, na roślinach pszenicy i pszenżyta, na odmianach, które w 2021 roku cechowały się wysoką podatnością na rdzę żdźbłową zaobserwowaną w trakcie prowadzenia obserwacji polowych. Przebadano 40 izolatów *P. graminis* pozyskanych w ramach tworzonej kolekcji. Doświadczenie założono w szklarni należącej do Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Politechniki Bydgoskiej. Inokulację roślin wybranymi izolatami *P. graminis* przeprowadzano w fazie BBCH 12–13. Przed procesem inokulacji aktywowano/pobudzano urediniospory *P. graminis*, tak aby mógł zajść proces infekcyjny. Proces ten przeprowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Sørensen. Inokulację przeprowadzano poprzez nanoszenie atomizerem na powierzchnię roślin zawiesiny zarodników *P. graminis*. Po upływie 2 tygodni od inokulacji dokonano oceny nasilenia objawów chorobowych. Następnie nadziemną część rośliny pobierano i zabezpieczano do dalszych analiz.

Wyniki

- Weryfikacja zróżnicowania genetycznego izolatów *Puccinia graminis*

Startery uniwersalne, pozwalające na amplifikację regionów ITS (internal transcribed spacer) oraz LSU (large subunit) zastosowane w analizach molekularnych były zawężone pod względem specyficzności do amplifikacji regionów DNA grzybów rdzawnikowych. Wnioskując na podstawie obrazów żeli agarozowych będących wynikiem elektroforezy przeprowadzonej w celu weryfikacji skuteczności amplifikacji i jakości produktów PCR oraz na podstawie uzyskanych wyników sekwencjonowań, produkty LSU miały o wiele większe stężenie oraz nie były częściowo zdegradowane. Dzięki analizie regionów ITS możliwa była jednoznaczna identyfikacja *P. graminis* w niektórych próbkach.

Fluorogramy ITS w wielu przypadkach były trudne do interpretacji. Fluorogramy LSU pozwalały w większości przypadków na jednoznaczny odczyt i w konsekwencji tego na identyfikację gatunku, jednak i w tych fluorogramach było widoczne tło pochodzące z sygnału matrycy więcej niż jednego gatunku. Analizy molekularne, zarówno dotyczące regionów ITS jak i LSU wykazały jednoznacznie obecność *P. graminis* w 11 próbkach na 40 zbadane. Oprócz makroskopowo zidentyfikowanego *P. graminis* było DNA kilku gatunków *Puccinia*, co uniemożliwiło jednoznaczny odczyt. Dziewięć sekwencji LSU *P. graminis* zdeponowano w GenBank NCBI.

Badane sekwencje Pg13Ta21, Pg136Ta21, Pg143Ta21, Pg145Ta21, Pg306Sc21, Pg367Sc21 wykazywały 100% podobieństwa do sekwencji o numerach akcesyjnych KM249852, MT965559 i HQ412648, pochodzących z Australii, Węgier i Omanu oraz na analogicznym odcinku do dłuższych sekwencji KY798389, KY764124, KY798400, K952782, MT965648, MK952783 z różnych regionów świata. W przypadku izolatów Pg92Ta21 i Pg116Ta21 podobieństwo było na poziomie 99,9% i wiązało się z różnicą dotyczącą jednego nukleotydu. Sekwencja Pg92Ta21 różniła się od nich jednym nukleotydem – posiadała Tyminę, podczas gdy pozostałe w tym miejscu miały Adeninę, natomiast sekwencja Pg116Ta21, również różniąca się od pozostałych także jednym nukleotydem jednak w innym miejscu, posiadała również Tyminę, ale zamiast Cytosyny.

Nasze izolaty oraz 9 wyżej wymienionych zostały umieszczone w jednym kładzie wraz z sekwencjami AF522177, MT965637. Odrębność tych sekwencji związana jest ze zróżnicowaniem dotyczącym odpowiednio jednego i dwóch nukleotydów. Sekwencja KY798370 została pogrupowana oddzielnie. Różniła się od pozostałych 4 nukleotydami. Niestety nie było możliwości porównania naszych sekwencji z innymi z Polski, gdyż sekwencje polskich izolatów w GenBank NCBI nie występują.

Analiza sekwencji LSU wykazała zróżnicowanie pomiędzy badanymi izolatami, co nie było związane z ich pochodzeniem (roślina żywicielska, region Polski), a także pomiędzy sekwencjami z GenBank pochodzącymi od izolatów pozyskanych w różnych częściach świata.

- Badania patogeniczności izolatów *P. graminis*

W trakcie badań obserwowano bardzo małe nasilenie objawów chorobowych powodowanych przez testowane izolaty *P. graminis*. Większość izolatów nie powodowała żadnych objawów chorobowych. Z tego też względu trudno jest jednoznacznie mówić o większym zróżnicowaniu patogeniczności badanych izolatów i wskazać izolaty najbardziej i najmniej patogeniczne. Jednak na pszenicy najwięcej objawów chorobowych obserwowano po wykonaniu inokulacji izolatami Pg474 i Pg473, a na roślinach pszenżyta – Pg474.

Wnioski

- A. Analizy molekularne, zarówno dotyczące regionów ITS jak i LSU (large subunit) wykazały jednoznacznie obecność *P. graminis* w 11 próbkach na 40 zbadane. Dokładna analiza fluorogramów wskazała jednak, że w badanych próbkach, oprócz makroskopowo zidentyfikowanego grzyba *P. graminis* było DNA kilku gatunków grzybów rdzawnikowych, co uniemożliwiło jednoznaczny odczyt. 9 sekwencji LSU *P. graminis* zdeponowano w GenBank NCBI.
- B. Pomimo niewielkiej liczby badanych izolatów, takie które dały wyraźne produkty, analiza sekwencji LSU wykazała zróżnicowanie pomiędzy badanymi izolatami, co nie było związane z ich pochodzeniem (roślina żywicielska, region Polski), a także pomiędzy sekwencjami z GenBank pochodzącymi od izolatów pozyskanych w różnych częściach świata. Badając sekwencje LSU nie wykazano zróżnicowania wynikającego z pochodzenia geograficznego izolatów, ani rośliny żywicielskiej.
- C. Przeprowadzone analizy dowiodły istnienie małego zróżnicowania izolatów *P. graminis* pod względem ich patogeniczności. Dla pszenicy najbardziej wirulentnymi izolatami były Pg474 i Pg473, dla pszenżyta – Pg474. Nasilenie objawów przez nie powodowane było niewielkie, większość izolatów nie powodowała żadnych objawów chorobowych.

3.4. Temat badawczy 4

Poszukiwanie markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności zbóż na *Puccinia graminis*.

Cel tematu badawczego 4

Celem tematu było oznaczenie zróżnicowania genetycznego wyselekcjonowanych genotypów roślin (gatunków, odmian, linii hodowlanych), wskazanie najlepszego systemu markerowego do identyfikacji genotypów u badanych gatunków oraz wskazanie najlepszego systemu markerowego do identyfikacji zmienności pomiędzy genotypami badanych gatunków oraz wskazanie potencjalnych genetycznych markerów odporności wspomagających hodowlę pod kątem odporności opartą na markerach (marker-assisted breeding, MAS).

Materiały i metody

W 2022 roku dla 10 genotypów pszenicy i 10 genotypów pszenżyta przeprowadzono analizy dotyczące molekularnych markerów odporności. Ze względu na brak genotypów

mogących stanowić linie kontrolne w badaniach nie zastosowano obiektów kontrolnych, do których można by odnosić uzyskane wyniki badań.

a) Charakterystyka zróżnicowania genetycznego badanych genotypów pszenicy i pszenżyta

Badanie zróżnicowania genetycznego wyselekcjonowanych genotypów pszenicy i pszenżyta oparto na systemach markerowych SCoT (Start Codon Targeted), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) i ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat).

Nasiona wyselekcjonowanych genotypów (po 10 genotypów pszenicy i pszenżyta wysiano w szklarni Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii, po około 10 dniach od skiełkowania, pobierano liście w celu izolacji genomowego DNA. Z każdego genotypu izolowano DNA z siedmiu roślin. Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu kolumnowego Genomic Mini AX Plant Spin. DNA matrycowe zawieszono w buforze TE i przechowywano w temperaturze -80°C. Stężenie i czystość genomowego DNA oznaczano za pomocą QuantiFluor dsDNA System.

Spośród łącznie 30 starterów dla systemów markerów RAPD, ISSR i SCoT wybrano 15 starterów (po pięć dla każdego systemu markerowego) dających powtarzalne prążki na bazie DNA wyekstrahowanego z roślin pszenicy i pszenżyta. Amplifikowane fragmenty DNA rozdzielono na 1,5% żelu agarozowym, w buforze TBE. Detekcję prążków uzyskano dzięki barwieniu żelu bromkiem etydyny. Wizualizację produktów PCR przeprowadzono w świetle UV za pomocą GelDoc System. Obrazy żelu rejestrowano i analizowano przy użyciu oprogramowania GelAnalyzer 2010. Wielkość fragmentów DNA oszacowano przy użyciu wzorca DNA o wielkości 100-5000 pz. Wiarygodne, powtarzalne *loci* rejestrowano przy użyciu systemu binarnego, wskazując obecność lub brak prążków odpowiednio jako 1 i 0, na tej bazie utworzono macierze binarne służące dalszej analizie.

Analizę zmienności genetycznej i charakterystykę zróżnicowania genetycznego przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania GenAlEx 6.5 oraz pakietu Statistica 13.3. Przeprowadzono analizę wariacji molekularnej (AMOVA). Na podstawie współczynników dystansu genetycznego Neia przeprowadzono analizę skupień i wykreślono dendrogramy. Przeprowadzono analizę zróżnicowania pomiędzy genotypami w obrębie danego gatunku z wykorzystaniem metody analizy wielowymiarowej (PCoA) na podstawie macierzy binarnej i obliczonych euklidesowych odległości dystansu genetycznego. Obliczono stopień polimorfizmu wewnątrz genotypów (wyrażony jako udział procentowy *loci* polimorficznych) oraz poziom heterozygotyczności.

b) Poszukiwanie markerów odporności na *Puccinia graminis* u wybranych genotypów pszenicy i pszenżyta.

Z bazy internetowej maswheat.ucdavis.edu wybrano 10 markerów genów odporności. Przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów flankujących wybrany gen odporności. Przebadano po trzy rośliny reprezentujące każdy genotyp pod kątem obecności markerów odporności. Na podstawie protokołów zawartych w bazie markerów przeprowadzono reakcje PCR, dostosowując temperaturę przyłączenia do średniej temperatury T_m dla obu starterów. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym oraz wizualizowano, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Wielkość produktów oznaczano z wykorzystaniem programu komputerowego GelAnalyzer 10.0. Oznaczano częstotliwość występowania danego markera odporności wśród badanych genotypów oraz łączną liczbę markerów w każdym genotypie.

Wyniki

a) Charakterystyka zróżnicowania genetycznego badanych genotypów pszenicy i pszenżyta

Analiza produktów PCR uzyskanych po amplifikacji z testowanymi starterami trzech systemów markerowych RAPD, ISSR oraz SCoT pozwoliła na wskazanie łącznie 105 *loci*, każdy starter średnio generował 7 *loci*.

Liczba *loci* generowanych przez poszczególne systemy markerowe wynosiła 40 dla RAPD, 29 dla ISSR oraz 36 dla SCoT. Informatywność poszczególnych systemów markerowych była różna: najwyższy średni stopień polimorfizmu wyrażony udziałem procentowym *loci* polimorficznych (czyli faktycznie różnicujących rośliny w obrębie genotypów) uzyskano po amplifikacji ze starterami ISSR. Poziom polimorfizmu dla systemu SCoT wynosił średnio 0,56 % w genotypie. Amplifikacja ze starterami RAPD wygenerowała średnio 1% *loci* polimorficznych, ale należy podkreślić, że *loci* polimorficzne występowały tylko w jednym genotypie (NADZ:19796), natomiast pośród dziewięciu pozostałych genotypów system markerowy RAPD generował jedynie *loci* monomorficzne. Wspólna analiza matrycy binarnej uzyskanych *loci* z trzech systemów markerowych pozwoliła na obliczenie ogólnego średniego poziomu polimorfizmu pomiędzy roślinami reprezentującymi dany genotyp na poziomie 1,14%.

W połowie badanych genotypów: MIB 01007, SMH 497, Arkadia, KBP 21.33 i C3279/16-1 nie stwierdzono zmienności pomiędzy poszczególnymi roślinami reprezentującymi dany genotyp: żaden z systemów markerowych nie wygenerował *loci* polimorficznych. Świadczy to o wysokim stopniu homozygotyczności tych genotypów i ma swoje odzwierciedlenie w zerowej wartości heterozygotyczności. Powyższe wyniki sugerują wysoką stabilność wskazanych genotypów, które mogą stanowić bardzo dobry materiał hodowlany, szczególnie dla hodowli mieszańcowej.

Najwyższy stopień zróżnicowania genetycznego między osobnikami jednego genotypu stwierdzono w genotypie NADZ:19796: udział *loci* polimorficznych wynosił 4,76% a wartość heterozygotyczności była najwyższa wśród wszystkich badanych genotypów i wynosiła 0,039 (zidentyfikowana za pomocą markerów RAPD). Genotypy SMH 840, AND 19057 oraz Genotyp20 cechował taki sam udział *loci* polimorficznych a heterozygotyczność na poziomie 0,016 do 0,021 dla ISSR. Niewielki stopień heterozygotyczności i polimorfizmu wykazał Genotyp10, odpowiednio 0,16 dla ISSR oraz 0,95%.

Analiza zmienności molekularnej (AMOVA), zidentyfikowała zmienność wewnątrz genotypów na niskim poziomie 9% w analizie wspólnej dla wszystkich systemów markerowych. AMOVA wskazuje również jednoznacznie na istotne różnice między badanymi genotypami pszenicy, zmienność między genotypami oznaczono na poziomie 91% w analizie wspólnej dla trzech systemów markerowych. Każdy z wykorzystanych systemów markerowych okazał się efektywny w segregowaniu badanych genotypów ($\Phi_{PT} > 0$).

Pomimo przynależności do jednego gatunku, badane genotypy (odmiany i linie) okazały się na tyle zróżnicowane między sobą, że możliwe jest ich zidentyfikowanie za pomocą markerów molekularnych RAPD, ISSR i SCoT, niemniej żaden z systemów markerowych samodzielnie nie wykazał odrębności wszystkich odmian i linii. Jak wykazała analiza wielowymiarowa PCoA przeprowadzona na bazie binarnego dystansu genetycznego między populacjami, markery ISSR były najbardziej efektywne w różnicowaniu badanych genotypów: wskazały osiem punktów na wykresie koordynat, przy czym wspólne punkty miały genotypy Arkadia z C3279/16-1 oraz KBP 21.33 z SMH 497. Najmniejsze odległości euklidesowe stwierdzono po analizie PCoA za pomocą markerów RAPD: wskazano istnienie tylko dwóch grup identycznych genotypów: Arkadia i NADZ:19796 oraz Genotyp 10, SMH 840, MIB 01007, SMH 497, KBP 21.33, AND 19057, C3279/16-1 i Genotyp 20.

Analiza skupień przeprowadzona na podstawie współczynnika dystansu genetycznego Neia potwierdziła wyniki uzyskane w analizie wielowymiarowej. Najwyższą wartość współczynnika dystansu genetycznego Neia wynoszący 0,123 stwierdzono po analizie markerów SCoT pomiędzy genotypami SMH 840 i KBP 21.33.

Podobnie jak u pszenicy, także u pszenżyta efektywność systemów markerowych w różnicowaniu genotypów i detekcji polimorfizmów w ich obrębie była zróżnicowana. Średnia liczba *loci* generowanych przez markery RAPD, ISSR i SCoT wynosiła 7,5 na starter. Najmniejszą liczbę *loci* wygenerowały startery ISSR (26), a za pomocą starterów RAPD i SCoT uzyskano odpowiednio 43 i 44 *loci*. Średni udział *loci* polimorficznych był niski i wyniósł 0,88%. Szczegółowa analiza wzorów prążkowych ujawniła niski (niższy niż u badanych genotypów pszenicy) stopień polimorfizmu pomiędzy roślinami należącymi do

poszczególnych genotypów pszenżyta, wyrażony udziałem *loci* polimorficznych i wartością heterozygotyczności.

Brakiem różnicowania wewnątrz populacji roślin reprezentujących daną odmianę lub linię charakteryzowało się sześć z dziesięciu badanych genotypów: SY Cappricia, SU Liborius, Sekret, DL 1015/19, Probus oraz SU Alteus. Oznacza to, że wymienione genotypy są bardzo jednorodne genetycznie.

Największy udział *loci* polimorficznych i najwyższą heterozygotyczność stwierdzono u genotypu DS.3432/20 - odpowiednio 6,19% *loci* polimorficznych we wspólnej analizie systemów markerów oraz heterozygotyczność na poziomie 0,037 zidentyfikowaną za pomocą markerów RAPD. Warto podkreślić, że ta odmiana była jedyną, u której system RAPD zidentyfikował zmienność wewnątrzpopulacyjną na wysokim poziomie 16,28%.

Analiza zmienności molekularnej AMOVA wykazała wysoką efektywność zastosowanych systemów markerowych w segregacji poszczególnych genotypów, wskazując bardzo wysoki udział zmienności pomiędzy odmianami i liniami (96% dla analizy wspólnej). Należy to interpretować tak, że wyselekcjonowane do badań genotypy pszenżyta różnią się istotnie między sobą pod względem genetycznym, natomiast pomiędzy osobnikami należącymi do jednego genotypu zmienność genetyczna jest niska. Badane genotypy pszenżyta należy uznać za stabilne i homozygotyczne w wysokim stopniu.

Na podstawie analizy wielowymiarowej PCoA oraz dendrogramów wykreślonych na bazie dystansu genetycznego Neia stwierdzono wysoką przydatność systemu SCoT do identyfikacji poszczególnych genotypów – na wykresie analizy wielozmiennych każda odmiana i linia analizowana przy pomocy tych markerów zajmuje odrębne współrzędne. Zerowy współczynnik dystansu genetycznego Neia na podstawie markerów RAPD uzyskano dla klastra złożonego z genotypów: SY Cappricia, MAH 36505-3, Sekret i DL 1015/19, natomiast za pomocą systemu markerowego ISSR wyodrębniono trzy klastry złożone z odmian między którymi nie stwierdzono różnic: (a) SY Cappricia, DS.3432/20, MAH 36505-3, (b) DL 1015/19 SU Atletus i (c) SU Liborius, Sekret. Odmiany wchodzące w skład jednego klastra nie różnią się między sobą genetycznie na podstawie analizy z wybranymi starterami.

Najbardziej równomierną dystrybucję genotypów pszenżyta w analizie wielozmiennych oraz najwyższe wartości współczynników dystansu genetycznego zaobserwowano po zastosowaniu markerów SCoT. System markerowy SCoT skutecznie różnicował wszystkie badane genotypy, a ich rozproszenie na wykresie analizy wielozmiennych było duże, co świadczy o wysokiej wartości współczynników dystansu genetycznego; współczynnik dystansu Neia była najwyższy pomiędzy genotypami DL 1015/19 a Probus i wyniósł 0,258.

b) Poszukiwanie markerów odporności na *Puccinia graminis* u wybranych genotypów pszenicy i pszenżyta

W wyniku reakcji łańcuchowej polimerazy z wybranymi starterami identyfikującymi geny odporności na rdzę żdźbłową w genomowym DNA badanych roślin stwierdzono różnice w występowaniu poszczególnych markerów odporności u różnych genotypów pszenicy i pszenżyta.

Stwierdzono obecność markerów odporności we wszystkich badanych genotypach obu gatunków zbóż, ale ich liczba była różnicowana w zależności od gatunku i odmiany lub linii. Najwięcej, pięć markerów odporności stwierdzono u pszenicy odmiany AND 19057. Markery odporności genów *Sr32*, *Sr49* i *Sr56* były obecne we wszystkich badanych genotypach pszenicy, natomiast u pszenżyta we wszystkich odmianach/liniach występował jedynie marker genu *Sr32*, ponadto był on polimorficzny dla połowy genotypów. U pszenicy ten gen markerowy był polimorficzny dla genotypów: Genotyp10, NADZ:19796 i MIB 01007, tzn. nie u wszystkich roślin reprezentujących dane genotypy uzyskano produkty amplifikacji markera *csSr32#1* o długości 184bp. Popularny marker genu odporności *Sr22* WMC633 nie został stwierdzony u żadnego genotypu pszenicy ani pszenżyta. Marker genu odporności *Sr24* w postaci prążka o długości 500 bp zidentyfikowany został u trzech genotypów pszenicy i u żadnego genotypu pszenżyta. Markery genów odporności *Sr35*, *Sr39* i *Sr45* nie zostały

stwierdzone u żadnego badanego genotypu obu gatunków. Marker genu odporności *Sr57* został stwierdzony tylko u niektórych roślin trzech genotypów pszenżyta: DC 16267-74, SU Liborus i SU Atletus. Marker genu *Sr28* występował jedynie w układzie heterozygotycznym – prążek wskazujący na odporność (220 bp) występował jednocześnie z prążkiem wskazujący na wrażliwość na rdzę żdźbłową (<208 bp).

Wnioski

- A) Wyselekcjonowane do badań genotypy pszenicy charakteryzują się niewielką zmiennością genetyczną i są w większości homozygotyczne. Wybrane genotypy pszenżyta różnią się istotnie między sobą pod względem genetycznym, natomiast występująca w obrębie poszczególnych genotypów zmienność genetyczna jest mała. Badane genotypy pszenicy i pszenżyta należy uznać za stabilne i w wysokim stopniu homozygotyczne.
- B) Przeprowadzone analizy dowiodły zróżnicowanej przydatności poszczególnych systemów markerów molekularnych w detekcji zmienności genetycznej u pszenicy i pszenżyta. Samodzielnie żaden z zastosowanych systemów markerowych nie różnicuje wszystkich badanych genotypów pszenicy. Najbardziej skuteczne w identyfikowaniu odmian pszenżyta są markery SCoT. Najmniej efektywne w identyfikowaniu genotypów oraz w oznaczaniu polimorfizmu w obrębie genotypów są markery RAPD zarówno u pszenicy, jak i pszenżyta.
- C) Wszystkie badane genotypy pszenicy i pszenżyta posiadają markery odporności na rdzę żdźbłową w liczbie od dwóch do pięciu. Świadczy to o wysokim potencjale odporności badanych genotypów na rdzę żdźbłową.
- D) Badane genotypy pszenżyta charakteryzują się mniejszą częstotliwością występowania markerów genów odporności *Sr* niż badane genotypy pszenicy. Najwięcej (pięć) markerów odporności stwierdzono w genotypie pszenicy AND 190575.

3.5. Temat badawczy 5

Wrażliwość genotypów pszenicy i pszenżyta na *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 5

Celem tematu badawczego jest scharakteryzowanie genotypów pszenicy i pszenżyta (odmian, rodów hodowlanych) pod kątem wrażliwości na rdzę żdźbłową.

Materiały i metody

Badania dotyczące wrażliwości genotypów zbóż prowadzono w warunkach polowych i laboratoryjnych (szklarniowe testy fizjologiczne żywicieli-patogen).

- Testy polowe

Obserwacje występowania rdzy żdźbłowej przeprowadzono na doświadczeniach należących do COBORU oraz firm zajmujących się hodowlą zbóż, będących partnerami projektu, tj. DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR. W badaniach tych uwzględniono Stacje Doświadczalne Oceny Odmian, w których zaobserwowano najwięcej objawów rdzy żdźbłowej. Ponadto obserwacje prowadzono na doświadczeniach założonych przez firmy zajmujące się hodowlą zbóż. Obserwacje wrażliwości genotypów pszenicy i pszenżyta na *P. graminis* prowadzono w miejscowościach, w których nasilenie objawów była większa, co miało zapewnić lepszą selekcję genotypów. Ocena porażenia pszenicy i pszenżyta przez *P. graminis* wykonana została w lipcu.

W 2022 roku w badania wrażliwości genotypów testowano również w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym w Minikowie, należącym do Politechniki Bydgoskiej, w którym doświadczenia zostały przeprowadzone na mikropoletkach. Dla zapewnienia odpowiedniej presji patogena przygotowane zostały doniczki z roślinami pszenicy i pszenżyta z objawami porażenia przez *P. graminis* stanowiącymi pierwotne źródło infekcji, wcześniej przygotowanymi w szklarni, umieszczonymi następnie na mikropoletkach. Ocena porażenia przez *P. graminis* w uprawach pszenicy i pszenżyta wykonana została w lipcu.

- Testy laboratoryjne - testy fizjologiczne żywicieli-patogen

Testy fizjologiczne żywicieli-patogen prowadzone były w warunkach szklarniowych. Wrażliwość genotypów na rdzę żółtą oceniana była na liściach roślin pszenicy i pszenżyta. Badaniem objęte były już zarejestrowane odmiany pszenicy i pszenżyta oraz rody i linie hodowlane, udostępnione przez hodowców zbóż. W pierwszym etapie na młodych siewkach zbóż namnożono zarodniki wybranych izolatów *P. graminis*. Po tym okresie została określona wrażliwość poszczególnych genotypów zbóż, na podstawie obserwowanych zmian chorobowych stwierdzonych na liściach.

Wyniki

- Testy polowe

W 2022 roku w warunkach polowych obserwowano bardzo mało objawów chorobowych rdzy żółtej na pszenicy. Często były to pojedyncze skupienia uredniów *P. graminis*. Spośród wszystkich stacji badawczych najwięcej objawów chorobowych rdzy żółtej na pszenicy stwierdzono w Stacji Doświadczalnej Oceny Odmian w Węgrzcach, dlatego wnioskowanie co do wrażliwości genotypów pszenicy na *P. graminis* oparto głównie na podstawie danych uzyskanych z tej miejscowości. Spośród odmian pszenicy najwięcej objawów chorobowych rdzy żółtej obserwowano dla odmiany Moschus, a następnie Dubaj i 15 innych odmian. Znacznie mniej objawów rdzy żółtej obserwowano w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian w Radostowie. Spośród odmian pszenicy najwięcej objawów chorobowych rdzy żółtej obserwowano dla odmiany SY Yukon, a następnie Adamont, LG Keramik i Rotax oraz Artist i Euforia. Na większości odmian nie stwierdzono objawów tej choroby.

W 2022 roku w warunkach polowych obserwowano bardzo mało objawów chorobowych rdzy żółtej na roślinach pszenżyta. Spośród wszystkich stacji badawczych objętych obserwacjami najwięcej objawów chorobowych rdzy żółtej na roślinach pszenżyta odnotowano w Zakładzie Doświadczalnym Oceny Odmian w Radostowie. Spośród wszystkich analizowanych odmian pszenżyta najwięcej objawów chorobowych stwierdzono na roślinach odmiany Lanetto i SU Liborius, a następnie Meloman. Na pozostałych odmianach pszenżyta nie obserwowano objawów rdzy żółtej.

Na roślinach pszenicy uprawianych w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym Minikowo na mikroplotkach również obserwowano bardzo małe nasilenie objawów chorobowych rdzy żółtej. Pomimo zwiększenia presji patogena poprzez wystawienie wiosną roślin sztucznie inokulowanych zarodnikami *P. graminis* wcześniej przygotowanymi w szklarni, nie przyczyniło się do znacznego wzrostu nasilenia objawów choroby na testowanych roślinach pszenicy. Maksymalnie objawy rdzy żółtej stwierdzono na 3% źdźbeł, co odnotowano na odmianie Sikorka. Na sześciu genotypach odnotowano po 2% porażonych źdźbeł a na 17 genotypach po 1% porażonych źdźbeł.

Na roślinach pszenżyta uprawianych na mikroplotkach również obserwowano mało objawów chorobowych rdzy żółtej. Zwiększenie presji patogena nie przyczyniło się do wyraźnego wzrostu nasilenia objawów choroby na testowanych roślinach. Maksymalnie objawy rdzy żółtej stwierdzono na 2% źdźbeł, co odnotowano na odmianach Avokado, Panteon i Toro. Na dziewięciu genotypach odnotowano po 1% porażonych źdźbeł pszenżyta.

- Testy laboratoryjne - testy fizjologiczne żywicieli-patogen

W uprawach szklarniowych pszenicy i pszenżyta także nie obserwowano zbyt dużego nasilenia objawów rdzy żółtej na testowanych roślinach. Spośród 80 analizowanych genotypów pszenicy objawy tej choroby stwierdzono tylko na dziewięciu genotypach. Najwięcej był ich na roślinach genotypu NADZ:19040, nieco mniej na AND 19569, SMH 796 i Genotypie10. Na pozostałych genotypach nie odnotowano żadnych symptomów porażenia przez testowanego grzyba *P. graminis*.

Spośród 40 testowanych genotypów pszenżyta objawy chorobowe rdzy żdźbłowej obserwowano tylko na sześciu genotypach. Najwięcej był ich na roślinach DL 379/19, mniej na SU Tadeus, DL 246/19, Corado i DS. 2599/20.

Wnioski

- A) W warunkach doświadczeń poletkowych stwierdzono bardzo małe zróżnicowanie w podatności genotypów pszenicy i pszenżyta na porażenie przez *P. graminis*. Ze względu na znikome nasilenie trudno było jednoznacznie wytypować genotypy odporne i podatne na porażenie.
- B) Bardzo małe nasilenie objawów rdzy żdźbłowej w teście laboratoryjnym (szklarniowym) również nie pozwoliło na jednoznaczne określenie wrażliwości genotypów pszenicy i pszenżyta na porażenie przez *P. graminis*.

3.6. Temat badawczy 6

Poszukiwanie markerów metabolicznych wpływających na odporność zbóż na *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 6

Celem tematu było wytypowanie potencjalnych mechanizmów obronnych przeciw *P. graminis* wśród badanych roślin na podstawie obecności i aktywności markerów molekularnych.

Materiały i metody

Prowadzono poszukiwania metabolicznych i enzymatycznych markerów, które mogą być odpowiedzialne za cechy odporności roślin na badanego patogena. Badania te przeprowadzono dla 10 genotypów pszenicy i 10 genotypów pszenżyta. Rośliny do badań uprawiano w komorze wzrostowej. Materiał roślinny wysiewano do podłoża specjalistycznego Klassman Substrate Select na bazie torfu wysokiego. Do przygotowanych doniczek wysiewano po 10 ziaren wybranego materiału siewnego pszenicy i pszenżyta. Kiełkujące nasiona przetrzymywano w 18°C bez naświetlania, do momentu pojawienia się pierwszych wschodów. Inokulację przeprowadzano w fazie BBCH 12–13 poprzez nanoszenie atomizerem na powierzchnię roślin zawiesiny, według metodyki zaproponowanej przez Sørensen. Po 7 dniach od inokulacji dokonywano obserwacji objawów chorobowych na materiale roślinnym. Nadziemną część rośliny pobierano i zabezpieczano do dalszych analiz.

Pozyskiwanie markerów odporności z tkanek genotypów roślin prowadzono wieloetapowo w zależności od kompleksu enzymatycznego (markery enzymatyczne) czy też grupy analitów (markery nieenzymatyczne). Oznaczana była m. in. aktywność enzymów (białek PR) oraz zawartość wytypowanych związków organicznych biorących udział w odpowiedzi na infekcję *P. graminis*, t.j. chitynazy, β -1,3-glukanazy, zawartość reaktywnych form tlenu generowanych w czasie patogenezы, zawartość metabolitów aktywnie biorących udział w mechanizmach obronnych czy stan lignifikacji ściany komórkowej. Metody analityczne oparte zostały na spektrofotometrii, detekcji *in vivo*.

Wyniki

Po 7 dniach ekspozycji roślin na działanie patogena (inokulacji) rośliny oceniono pod względem występowania objawów chorobowych a następnie zabezpieczono materiał do dalszych analiz. Przeprowadzono badania nad stopniem indukcji jak i aktywnością enzymów z grupy chitynaz jakie mogą brać bezpośredni udział w zwalczaniu patogenów z gatunku *P. graminis*. W przypadku roślin pszenicy zaobserwowano iż spośród badanych genotypów roślin największą aktywnością chitynaz charakteryzował się Genotyp 10. Był to najbardziej aktywny genotyp pszenicy pod względem chitynolitycznym jaki zaobserwowano. Kolejnymi genotypami były NADZ: 19796 oraz SMH 840. Wszystkie trzy genotypy charakteryzowały się wysoką aktywnością, która w ciągu godziny była w stanie uwolnić ponad 2,0 nM

ekwiwalentów glukozy w ciągu jednej godziny. Tak wysoka aktywność pozytywnie wpływa na ewentualną obronę przeciwko pasożytom jakimi są patogeny z rodzaju *Puccinia*. Najmniejszą aktywnością chitynaz charakteryzowały się z kolei takie genotypy jak KBP, Arkadia oraz MIB 01007.

W przypadku roślin pszenżyta obserwowano, że trzy spośród badanych genotypów charakteryzowały się bardzo wysoką aktywnością chitynaz: Probus, MAH 3650 oraz DC 16267-74. Z kolei dwa osiągały bardzo zbliżoną aktywność do 2,0 nM ekwiwalentów glukozy uwalnianych w ciągu godziny: DS. 3432/20 oraz SU Atletus. Do najmniej aktywnych zaliczono dwa genotypy uwalniające poniżej 1.0 nM ekwiwalentu glukozy w ciągu jednej godziny: SY Capprica oraz SU Libor.

Kolejnym markerem o działaniu chitynolitycznym jaki badano w ramach prowadzonych analiz była aktywność enzymów z grupy β -1,3- glukanaz. Enzymy te wraz z chitynazami i innymi enzymami z klasy hydrolaz warunkują bezpośrednio zwalczanie proliferujących wewnątrz ustroju rośliny komórek patogenów grzybowych.

W przypadku roślin pszenicy zaobserwowano bardzo wysoką aktywność enzymu wśród wszystkich badanych genotypów osiągających wartość ponad 5,0 nM ekwiwalentów glukozy uwalnianych w ciągu godziny. Największą aktywnością charakteryzowały się trzy badane genotypy pszenicy: Genotyp 10, Genotyp 20 oraz Arkadia. Najniższą aktywnością enzymu charakteryzował się genotyp NADZ: 19796.

W przypadku roślin pszenżyta zaobserwowano podobną aktywność β -1,3- glukanaz w tkankach roślin. Średnia wartość oscylowała wokół 8,0 nM ekwiwalentów glukozy uwalnianych w czasie 1 godziny aczkolwiek jeden genotyp charakteryzował się istotnie większą aktywnością spośród badanych genotypów: MAH 3650. Z kolei takie genotypy jak DS. 3432/20 oraz Probus charakteryzowały się aktywnością ponad 8,0 nM ekwiwalentów glukozy na godzinę. W przypadku roślin pszenżyta nie obserwowano aktywności mniejszej niż 6,0 nM ekwiwalentów glukozy. Najmniejszą aktywnością badanego enzymu charakteryzował się genotyp DC 16267-74.

Kolejną grupą markerów o znaczeniu przeciw grzybowych jakie analizowano w czasie trwania tego etapu projektu, była zawartość wolnych związków fenolowych w tkankach roślin. W przypadku roślin pszenicy obserwowano małe zróżnicowanie co do zawartości badanych metabolitów wśród wszystkich badanych genotypach roślin. Największą zawartością charakteryzował się Genotyp 10. Kolejnymi genotypami charakteryzującymi się wysoką zawartością metabolitów była Arkadia oraz Genotyp 20. Najniższą zawartością metabolitów charakteryzował się SMH 840.

W przypadku roślin pszenżyta również obserwowano małe zróżnicowanie pod względem zawartości badanych metabolitów aczkolwiek całkowita zawartość wolnych związków fenolowych była większa w porównaniu z roślinami pszenicy. Największą zawartością metabolitów w czasie trwania infekcji charakteryzowały się rośliny genotypów SU Libor, SY Capprica, MAH 3650, oraz SU Atletus. Najmniejszą zawartością charakteryzowały się rośliny genotypów DD 321/19, DL 1015/19, oraz DS. 3432/20.

W toku prowadzonych badań przeanalizowano wybrane genotypy roślin pod względem stanu energetycznego roślin w postaci ilości uwalnianych do ustroju związków cukrów. W kontekście zawartości wolnych cukrów w tkankach roślin pszenicy zaobserwowano, że największą zawartością charakteryzowały się tkanki genotypu Arkadia. Kolejnymi genotypami były SMH 840 oraz AND 19057, jak również SMH 497. Najmniejszą ilością charakteryzował się NADZ: 19796, następnie Genotyp 10 oraz Genotyp 20.

Wśród roślin pszenżyta obserwowano podobny rozkład badanej cechy. Największą zawartością charakteryzowały się trzy spośród badanych genotypów tj. DC 16267-74, Probus oraz DL 1015/19. Z kolei najmniejszą zawartością charakteryzowały się MAH 3650 oraz DS. 3432/20.

W ramach prowadzonych badań przeanalizowano tkanki badanych roślin pod kątem stopnia lignifikacji. Proces lignifikacji tkanek jest mechanizmem obronnym skutecznym przy uniemożliwianiu rozprzestrzeniania się komórek patogenów w ustroju rośliny. Jest to proces długotrwały ale skutecznie utrudniający wzrost komórek patogenów roślin oraz odcinający

patogena od reszty ustroju. Lignina jako materiał ściany komórkowej roślin jest trudny pod kątem rozkładu enzymatycznego. Jako stopień lignifikacji brano pod uwagę ilość lignotioligoloko pochodnych ligniny (LTGA) uwalnianych w procesie hydrolizy.

Rośliny pszenicy charakteryzowały się znacznie większą ilością uwalnianego LTGA w porównaniu z roślinami pszenżyta, gdzie zaobserwowano kilkukrotnie mniejszy stopień lignifikacji tkanek. Wśród roślin pszenicy genotypy o najsilniejszym stopniu lignifikacji (ponad 30 mg/gSM LTGA) wymienić można NADZ: 19796 oraz SMH 840. Jako genotypy o najmniejszym stopniu lignifikacji wymienić można Arkadia, C3279/16-1 oraz KBP 21.33. W kontekście roślin pszenżyta zaobserwowano że największą zawartością LTGA charakteryzowały się tkanki roślin genotypu SU Atletus. Następnie genotyp MAH 3650, DS. 3432/20, DD 321/19. Najmniejszą zawartość LTGA (poniżej 10 mg/gSM) obserwowano natomiast w tkankach genotypów SY Capricia, SU Libor oraz Sekret.

Kolejnym markerem metabolicznym uwalnianym w czasie trwania patogenezы jest jedna z reaktywnych form tlenu w postaci H_2O_2 . Jest to cząsteczka silnie reaktywna w układach biologicznych (cytozolu) i jej wydzielanie może mieć działanie zarówno bezpośrednie zwalczające jak również sygnałowe. W kontekście badanych roślin pszenicy zaobserwowano pewne zróżnicowanie pod względem obecności badanego metabolitu. Największą zawartością wolnego H_2O_2 w tkankach roślin charakteryzował się genotyp C3279/16-1. Kolejnymi były Arkadia, SMH 840, NADZ: 19796 oraz Genotyp 20. Najmniejszą zawartością charakteryzowały się AND 19057 oraz MIB 01007. W kontekście tkanek roślin pszenżyta największą zawartością charakteryzował się SU Atletus, następnie MAH 3650, DS. 3432/20 oraz DD 321/19. Zauważalnie najmniejszą zawartością charakteryzował się genotyp SY Capricia.

Wnioski

- A. Zaobserwowano duże zróżnicowanie pod względem aktywności chitynolitycznej w kontekście roślin pszenicy oraz jeszcze większe dla roślin pszenżyta.
- B. Dla aktywności glukanaz obserwowano mniejsze zróżnicowanie niż w przypadku chitynaz dla roślin obu gatunków.
- C. Obserwowano synergistyczne działanie obu markerów (chitynaz, β -1,3-glukanaz) w roślinach pszenicy w czasie ekspozycji na *Puccinia graminis*.
- D. Spośród genotypów pszenicy potencjalne cechy odporności zaobserwowano w roślinach Genotypu 10, Genotypu 20 oraz SMH 840. Dla roślin pszenżyta potencjalne cechy odporności zaobserwowano w roślinach genotypów MAH 3650, Probus oraz SU Atletus.
- E. W toku prowadzonych badań nie zaobserwowano całkowitej oporności/oporności w na *P. graminis* zarówno u roślin pszenicy jak i pszenżyta.