

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego
w produkcji roślinnej w 2023 roku

Tytuł zadania

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

Decyzja MRiRW:

DHR.hn.802.7.2023 z dnia 13 września 2023 r., zadanie nr 8

Okres realizacji zadania:

01.01.2023–31.12.2023

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 żdźbłową

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 żdźbłowa

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 zbóż i traw na roślinach pszenicy i pszenżyta uprawianych 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. Kryterium wyboru pól/miejscowości do planowanych obserwacji nasilenia występowania rdzy żdźbłowej była wstępna informacja od pracowników COBORU poszczególnych Stacji Doświadczalnych Oceny Odmian dotycząca występowania objawów tej choroby. Ponadto oceniano nasilenie objawów rdzy żdźbłowej na polach produkcyjnych pszenicy i pszenżyta. Założeniem było objęcie obserwacjami wszystkich województw Polski. Oceniano procent żdźbeł z objawami chorobowymi rdzy żdźbłowej. Ocenę przeprowadzono w lipcu, pod koniec okresu wegetacyjnego badanych gatunków zbóż, tj. pszenicy i pszenżyta. Ponadto pobierano próbki żdźbeł, na których widoczne były objawy rdzy żdźbłowej, do dalszych etapów wykonywanych badań realizowanych w ramach projektu. Objawy porażenia na żdźbłach badanych zbóż potwierdzano w warunkach laboratoryjnych.

Wyniki

Nasilenie rdzy żdźbłowej w stacjach badawczych należących do COBORU, w których były również kombinacje bez ochrony fungicydowej, obserwowano bardzo mało objawów chorobowych. Objawy chorobowe rdzy żdźbłowej na pszenicy obserwowano w jedenastu województwach, a na pszenżycie tylko w trzech województwach. Na żdźbłach roślin jak już stwierdzono obecność choroby, to najczęściej obserwowano tylko pojedyncze uredinia.

W trakcie obserwacji prowadzonych w 2023 roku nie stwierdzono występowania objawów chorobowych rdzy żdźbłowej zbóż i traw 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 2023 panowały niekorzystne warunki pogodowe dla rozwoju rdzy żdźbłowej. Początek wiosny był stosunkowo chłodny,

co sprawiło, iż okres dla rozwoju *P. graminis* był zbyt krótki by grzyb ten zdążył zainfekować w pierw żywiciela pośredniego a następnie zboża.

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 żdźbłowej, tj. uredospor.

Materiały i metody

W celu utworzenia krajowej kolekcji izolatów *Puccinia 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. Próbkę 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. Próbek takich nie pobrano z pól produkcyjnych pszenicy i pszenżyta ponieważ nie stwierdzono na nich występowania objawów rdzy żdźbłowej. Kilkunastocentymetrowe fragmenty żdźbeł badanych zbóż z objawami chorobowymi wywołanymi przez *P. graminis*, tj. żdźbłami z urediniami i uredosporami zostały umieszczone w papierowych, a po wyschnięciu foliowych torebkach. W laboratorium żdźbła z objawami chorobowymi były potwierdzane pod kątem przynależności gatunkowej zebranych izolatów, a następnie ich zarodniki zostały przeniesione do probówek typu Eppendorf i umieszczone w zamrażarce w temperaturze -75°C . Tak zabezpieczone próbki przechowywane są do następnych etapów badań.

Wyniki

W trakcie prowadzonych badań pozyskano 72 próbek żdźbeł z objawami rdzy żdźbłowej, głównie były to próbki pobrane z pszenicy ozimej. Spośród nich przeprowadzono selekcję i wybrano 40 do dalszych analiz. 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. Propagacja uredospor została przeprowadzona w komorze wilgotnościowej, w której zostały umieszczone siewki po zainfekowaniu zarodnikami uzyskanymi z fragmentów pobranych wcześniej roślin z objawami chorobowymi. W celu stworzenia warunków sprzyjających rozwojowi infekcji rośliny po kilkunastu godzinach zostały umieszczone w fitotronie na 21 dni w temperaturze $20-21^{\circ}\text{C}$, w układzie 16 godzin światła i 8 godzin ciemności.

3.3. Temat badawczy 3

Badania zróżnicowania populacji *Puccinia graminis*

Cel tematu badawczego 3

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

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano izolaty *P. graminis* zgromadzone w kolekcji, pozyskane w 2022 i 2023 r. W pierwszym etapie przeprowadzono identyfikację w celu potwierdzenia przynależności do *P. graminis* za pomocą mikroskopu (White i in. 1990, Abbasi i in. 2005).

- Weryfikacja zróżnicowania genetycznego izolatów *Puccinia graminis*

Analizy molekularne

Zostały podjęte próby przeprowadzenia analiz molekularnych 40 próbek celem potwierdzenia identyfikacji grzyba rdzawnikowego, zdiagnozowanego na podstawie morfologii i objawów na źdźbłach 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. W celu wyjaśnienia wątpliwości powstałych w trakcie analiz rDNA, obecność *P. graminis* w próbach dodatkowo zweryfikowano w reakcji specyficznej real-time PCR.

Izolacja i przygotowanie DNA do analiz

Materiał badawczy stanowiły zewnętrzne warstwy źdźbeł pszenicy ozimej i żyta ozimego, na których stwierdzono objawy chorobowe sugerujące infekcję grzybem *P. graminis*. 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, zmierzono fluorymetrycznie i rozcieńczono w ddH₂O do stężenia ng $\times \mu\text{l}^{-1}$ do dalszych analiz.

Reakcje PCR

Reakcje PCR mające na celu amplifikację regionów ITS i LSU przeprowadzono w objętości 37,5 μL zawierającej odczynnik PCR Mix Plus, DNA poszczególnych próbek oraz startery, odpowiednio ITS5-u/ITS4-u oraz LRust1R/LR6 (Beenken i in. 2012, White i in. 1990). Wykorzystano do tego celu urządzenie Eppendorf EP Mastercycler i zastosowano następujący protokół reakcyjny: denaturacja wstępna w 95°C przez 5 min; 40 cykli: 95°C przez 1 min, 53°C (ITS) lub 56°C (LSU) przez 50 sek, 72°C przez 50 sek (ITS) lub 80 sek (LSU); i końcowe wydłużanie w 72°C przez 10 min.

Obecność produktów reakcji zweryfikowano po rozdziale elektroforetycznym w buforze TBE, przeprowadzonym na 1,2% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika SimplySafe (EURX) nanosząc po 2 μL mieszaniny poreakcyjnej każdej z próbek. 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 (BLAST)* w bazie. Do konstrukcji dendrogramu bazującego na sekwencjach LSU zastosowano metodę maksymalnego prawdopodobieństwa (Maximum Likelihood) i model Hasegawa-Kishino-Yano w programie Mega11 Toolbar. Dendrogram sporządzono w celu zwizualizowania zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi izolatami oraz izolatami z GenBank NCBI, w tym badanymi w ramach niniejszego projektu w poprzednim roku.

Reakcje real time PCR

Analizy real time PCR mające na celu identyfikację obecności w badanych próbach źdźbeł z *P. graminis* przeprowadzono w aparacie LightCycler 480 II w objętości 10 μL zawierającej: a) odczynnik RT HS-PCR Mix Probe będące gotową mieszaniną do real time Hot Start PCR przeznaczoną do użycia z sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi, b) DNA poszczególnych próbek, startery ITS1rustF10d/ITS1rustR3c, specyficzną gatunkowo sondę TaqMan Pg FAM 1 i wodę.

- 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 źdźbłową zaobserwowaną w trakcie prowadzenia obserwacji polowych, tj. prowadzono odpowiednio na odmianach SY Dubaj (pszenica) oraz SU Tadeus (pszenżyto). Przebadano 40 izolatów *P. graminis* pozyskanych w ramach tworzonej kolekcji.

Doświadczenie założono w szklarni należącej do Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Politechniki Bydgoskiej. Ziarno zbóż wysiewano do podłoża Klassman Substrate Select znajdującego się w pojemnikach 30x40 cm po 25 ziaren pszenicy lub pszenżyta w czterech

powtórzeniach na kombinację. Kielkujące ziarniaki trzymano w temperaturze w 18-19°C bez naświetlania, do momentu pojawienia się pierwszych wschodów. Po tym czasie włączano lampy doświetlające i ustawiano fotoperiod na 16 godzin dzień i 8 godzin noc, przy temperaturze 18-19°C. Inokulację roślin wybranymi izolatami *P. graminis* przeprowadzano w fazie dwóch-trzech liści. Przed procesem inokulacji aktywowano/pobudzano urediniospory *P. graminis*, tak aby mógł zająć proces infekcyjny. Inokulację przeprowadzano poprzez nanoszenie atomizerem na powierzchnię roślin zawiesiny zarodników *P. graminis*, według metodyki zaproponowanej przez Sørensen i in. (2017). Następnie rośliny okrywano foliowymi kapturkami na okres 48 godzin, przy wyłączonym doświetlaniu i temperaturze 20–21°C. Po upływie 48 godzin foliowe okrywy zdejmowano i włączano lampy na uprzednio wspomniany fotoperiod 16/8 godz., temperatura 20–21°C.

Po upływie 2 tygodni od inokulacji dokonano oceny nasilenia objawów chorobowych, uwzględniając powierzchnię liści z objawami chorobowymi. Następnie nadziemną część rośliny pobierano i zabezpieczano do dalszych analiz.

Wyniki

- Weryfikacja zróżnicowania genetycznego izolatów *Puccinia graminis*

Makroskopowa ocena porażenia źdźbeł sugerowała obecność *Puccinia graminis*. W niektórych próbach roślin, na pochwach liściowych, dodatkowo były widoczne śladowe objawy wskazujące na prawdopodobną infekcję innymi gatunkami *Puccinia*. Startery uniwersalne, pozwalające na amplifikację regionów ITS oraz LSU zastosowane w analizach molekularnych były zawężone pod względem specyficzności do amplifikacji regionów DNA grzybów rdzawnikowych. Zatem, jeżeli w próbce, oprócz będącej przedmiotem analiz *P. graminis*, znajdowały się nawet niewielkie domieszki/ zanieczyszczenia DNA innej rdzy, co uniemożliwiło jednoznaczny odczyt wyniku z sekwencjatora.

Wniosując 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 tak, jak miało to miejsce w przypadku nici niektórych prób sekwencjonowanych ze starterami ITS, pomimo zastosowania zróżnicowanych protokołów, zarówno izolacji DNA, jak i reakcji PCR, mających na celu wyeliminowanie tych niedoskonałości. W związku z tym, jednoznaczna identyfikacja *P. graminis* w niektórych próbkach możliwa była jedynie dzięki analizie regionów LSU.

Chromatogramy ITS w wielu przypadkach były trudne do interpretacji, a w niektórych w ogóle nie nadawały się do odczytu. Widocznych było kilka nakładających się produktów, co sugeruje niejednorodną matrycę DNA. Jedynie w przypadku czterech prób fragmenty sekwencji ITS wskazały na obecność w nich DNA *P. graminis*. Chromatogramy LSU w większości przypadków pozwalały na odczyt sekwencji. Wskazywały jednak na inny gatunek rdzy niż *P. graminis*, np. na *P. trititina*. Sekwencje LSU charakterystyczne dla *P. graminis* uzyskano w przypadku pięciu prób żyta i trzech pszenicy. Zdeponowano je w GenBank NCBI i porównano z sekwencjami *P. graminis* dostępnymi w GenBank.

Osiem uzyskanych w niniejszych analizach sekwencji LSU *P. graminis* nie różniło się między sobą. Wykazywały 100% podobieństwa do sekwencji o numerach akcesyjnych KM249852, MT965559 i HQ412648, pochodzących odpowiednio z Australii, Węgier i Omanu oraz na analogicznym odcinku do dłuższych sekwencji KY798389, KY764124, KY798400, K952782, MT965648, MK952783 z różnych regionów świata. Były także identyczne z pięcioma polskimi sekwencjami *P. graminis* pochodzącymi z pszenicy (OP926044, OP926046, OP926902, OP926904 i OP926906) i dwoma z żyta (OP926907 i OP926909) zdeponowanymi przez nas w ubiegłym roku, a od dwóch z pszenicy (OP926045 i OP926903) różniły się pojedynczymi nukleotydami.

Zależności pomiędzy ośmioma sekwencjami LSU *P. graminis*, a sekwencjami dostępnymi w GenBank NCBI przedstawiono graficznie na dendrogramie. Widoczna jest odrębność wyżej wymienionych dwóch polskich sekwencji OP926045 i OP926903 od

pozostałych. Badane osiem sekwencji oraz wyżej wymienione zostały pogrupowane w jednym kładzie wraz sekwencjami AF522177 i MT965637. Odrębność tych sekwencji związana jest ze zróżnicowaniem dotyczącym odpowiednio jednego i dwóch nukleotydów (w tym zdegenerowanych). Sekwencja KY798370 została pogrupowana oddzielnie. Różniła się od pozostałych 4 nukleotydami. Analiza sekwencji LSU wykazała zatem niewielkie zróżnicowanie pomiędzy badanymi izolatami, a izolatami zdeponowanymi w GenBank.

Analizy real-time PCR wskazały na obecność *P. graminis* w 16 na 24 badane próbki. Identyfikację gatunkową *P. graminis* potwierdzał odczyt fluorescencji emitowanej przez barwnik sprzężony z zastosowaną w reakcji sondą molekularną.

- 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 stwierdzić o większym zróżnicowaniu patogeniczności badanych izolatów i wskazać izolaty najbardziej/najmniej wirulentne. Nieznacznie więcej objawów chorobowych obserwowano po wykonaniu inokulacji izolatami Pg659 i Pg670, a na roślinach pszenżyta – Pg670.

3.4. Temat badawczy 4

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

Cel tematu badawczego 4

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

Materiały i metody

W 2023 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. Także w literaturze nie znaleziono informacji o genotypach, które sklasyfikowano by jako bardzo wrażliwe lub odporne na porażenie przez *Puccinia graminis*. Genotypy do badań wybrano na podstawie danych uzyskanych w trakcie realizacji niniejszego projektu.

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. Łącznie wyizolowano DNA ze 140 roślin (70 roślin dla każdego gatunku). Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu kolumnowego Genomic Mini AX Plant Spin. DNA matrycowe zawieszono w buforze TE i przechowywano w temperaturze -80°C w zamrażarce U101-86 Eppendorf, natomiast roztwory robocze o stężeniu 20 ng DNA·μL⁻¹ sporządzono na bazie 10 mM TRIS, pH 8,0. Stężenie i czystość genomowego DNA oznaczano za pomocą spektrofotometru NanoPhotometer serii NP80.

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. Amplifikację DNA przeprowadzono w C1000 Thermal Touch Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA), w następujących warunkach:

- RAPD: 4 min w 94°C wstępna denaturacja DNA; następnie 35 cykli: 1 min w 94°C denaturacja, 1 min w 36°C hybrydyzacja i 2 min w 72°C elongacja DNA, po ostatnim cyklu końcowe wydłużanie 4 min w 72°C,
- ISSR: 4 min w 94°C wstępna denaturacja DNA; następnie 45 cykli: 1 min w 94°C denaturacja, 1 min w 53°C hybrydyzacja starterów i 2 min w 72°C elongacja DNA, po ostatnim cyklu następował etap końcowego wydłużania 4 min w 72°C,
- SCoT: 4 min w 94°C wstępna denaturacja DNA; następnie 35 cykli: 1 min w 94°C denaturacja, 1 min w 50°C hybrydyzacja i 2 min w 72°C elongacja DNA, po ostatnim cyklu następował etap końcowego wydłużania 10 min w 72°C.

Amplifikowane fragmenty DNA rozdzielono na 1,5% (w/v) żelu agarozowym (Agarosa LE, Bliert, Warszawa, Polska), w buforze TBE przy napięciu 110 V przez 90 min. 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 GenAIEx 6.5 oraz pakietu Statistica 13.3. Przeprowadzono analizę wariancji molekularnej na bazie dystansu genetycznego pomiędzy populacjami (AMOVA), a istotność wyników zweryfikowano przy $p \leq 0,001$.

Na podstawie współczynników dystansu genetycznego Neia przeprowadzono analizę skupień i wykreślono dendrogramy. Obliczono także wspólny dystans genetyczny Neia dla analizy łączonej wszystkich systemów markerowych oraz przeprowadzono analizę wariancji oraz testowanie średnich dystansów genetycznych metodą Tukeya przy $p=0,05$ dla poszczególnych genotypów. Przeprowadzono analizę zróżnicowania pomiędzy genotypami w obrębie danego gatunku z wykorzystaniem metody analizy wielowymiarowej (PCoA) na podstawie maczyzy binarnej i obliczonych euklidesowych odległości dystansu genetycznego. Obliczono stopień polimorfizmu wewnątrz genotypów (wyrażony jako udział procentowy *loci* polimorficznych) oraz poziom heterozygotyczności (w zakresie -1 do 1) (Nei 1978).

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

Z bazy internetowej maswheat.ucdavis.edu wybrano 10 markerów genów odporności. Markery zostały wybrane z bazy genów markerowych odporności na rdzę: <https://maswheat.ucdavis.edu/protocols>. Dodatkowo ich potencjalną przydatność sprawdzono w bazie efektywności genów markerowych <https://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/stem-pathotypetracker/stemeffectivesrgenes/fr/#c68998>.

Geny markerowe wybrane do badań charakteryzują się łatwą identyfikacją produktów amplifikacji po klasycznej reakcji PCR i elektroforezie poziomej na żelu agarozowym, co czyni je szczególnie przydatnymi do zastosowania w praktyce hodowlanej.

Przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem starterów flankujących wybrany gen odporności. Przebadano po trzy rośliny reprezentujące każdy genotyp pod kątem obecności markerów odporności.

Parametry reakcji PCR zostały dobrane na podstawie protokołów dla poszczególnych markerów dostępnych w bazie MasWheat <https://maswheat.ucdavis.edu/protocols>. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym oraz wizualizowano, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Wielkość produktów oznaczano z wykorzystaniem programu

komputerowego GelAnalyzer 10.0. Wyniki amplifikacji porównywano z oczekiwanymi produktami wskazanymi protokołach w bazie markerów odporności maswheat.ucdavic.edu. 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

Pszenica

Analiza produktów PCR uzyskanych po amplifikacji z testowanymi starterami trzech systemów markerowych RAPD, ISSR oraz SCoT pozwoliła na wskazanie łącznie 121 *loci*, każdy starter średnio generował 8 *loci*.

Liczba *loci* generowanych przez poszczególne systemy markerowe wynosiła odpowiednio 37 dla RAPD, 36 dla ISSR oraz 48 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 SCoT. Średni poziom polimorfizmu dla systemu ISSR wynosił zaledwie 0,83%, polimorficzne amplikony były obecne jedynie w jednym genotypie NAD 20484. Amplifikacja ze starterami RAPD wygenerowała średnio 1,89% *loci* polimorficznych. Wspólna analiza matrycy binarnej uzyskanych *loci* z trzech systemów markerowych pozwoliła na obliczenie ogólnego średniego poziomu polimorfizmu pomiędzy roślinami reprezentującymi dany genotyp na poziomie 5,04%. W Genotypie 10 nie stwierdzono a *loci* polimorficznych w żadnym z systemów markerowych, co świadczy o wysokim stopniu homozygotyczności i wyrównaniu genetycznym osobników reprezentujących ten genotyp i ma swoje odzwierciedlenie w zerowej wartości heterozygotyczności. System markerowy ISSR wygenerował u badanych genotypów pszenicy najmniej *loci* polimorficznych, natomiast najwięcej *loci* polimorficznych obserwowano wśród amplikonów wygenerowanych za pomocą systemu SCoT.

Najwyższy stopień zróżnicowania genetycznego między osobnikami jednego genotypu stwierdzono w genotypie DL 746/20 po amplifikacji ze starterami SCoT: udział *loci* polimorficznych wynosił 33,33%. Wartość heterozygotyczności była najwyższa wśród wszystkich badanych genotypów dla genotypu POB 0823 i wynosiła 0,106 (zidentyfikowana za pomocą markerów SCoT). W uwspólnionej analizie udziału *loci* polimorficznych, najwyższy ich udział stwierdzono u genotypów: DL 746/20 oraz Mandaryna oraz POB 0823.

Analiza zmienności molekularnej (AMOVA), zidentyfikowała zmienność wewnątrz genotypów na poziomie 41% w analizie wspólnej dla wszystkich systemów markerowych. AMOVA wskazuje również na różnice między badanymi genotypami pszenicy, zmienność między genotypami oznaczono na poziomie 59% w analizie wspólnej dla trzech systemów markerowych. Każdy z wykorzystanych systemów markerów okazał się efektywny w segregowaniu badanych genotypów ($\Phi_{PT} > 0$). Wykorzystanie markerów RAPD i SCoT wykazało stosunkowo wysokie poziomy zmienności wewnątrzpopulacyjnej (45% i 55%).

Analiza wielowymiarowa PCoA na podstawie amplikonów uzyskanych z systemów RAPD i SCoT, pozwoliła na wskazanie grup genotypów o wysokim podobieństwie genetycznym: AND-20610, POB 0823, DL 746/20 i Genotyp10 na bazie RAPD oraz NAD 20484, AND-20610, Genotyp10 i C20 739-5 na bazie SCoT. Wyraźną odrębnością charakteryzowały się genotypy Mandaryna oraz NAD20708. W tym roku badań w segregowaniu badanych genotypów pszenicy żaden z systemów markerowych nie okazał się w pełni skuteczny, a także w analizie wspólnej nie było możliwe jednoznaczne odróżnienie wszystkich genotypów. Ze względu na zbyt małą zmienność wykazaną między populacjami genotypów pszenicy za pomocą systemu markerowego ISSR, nie było możliwe przeprowadzenie wielowymiarowej analizy skupień i stworzenie wykresu PCoA na podstawie analizy średniego binarnego dystansu genetycznego między populacjami.

Współczynniki dystansu genetycznego Neia pozwoliły na wykreślenie trzech dendrogramów prezentujących skupienia genotypów podobnych. Wartości dystansu

genetycznego dla analizy przeprowadzonej na bazie markerów RAPD była najniższa, najwyższy współczynnik dystansu Neia wynoszący 0,038 stwierdzono tu między genotypami NAD 20708 i NAD 20484. W systemie ISSR i SCoT najwyższy współczynnik wynosił 0,087 i ta wartość powtarzała się dla kilku genotypów. Jednocześnie najczęściej zerowych wartości dystansu czyli identyczność genotypów stwierdzono w połowie porównywanych par genotypów w analizie markerów ISSR. W systemie SCoT stwierdzono 13,6% identycznych par, a w systemie RAPD tylko 9% par z zerowym dystansem genetycznym. Wspólny średni współczynnik dystansu genetycznego oscylował pomiędzy wartościami 0,2 dla AND 20610 i Genotypu 10, a 0,42 dla KBP 22.29 i wartości te nie różniły się między sobą.

Pszenżyto

Badane genotypy pszenżyta wykazały się bardzo wysokim podobieństwem genetycznym oraz wewnątrzpopulacyjną stabilnością, co wyrażało się we wszystkich przeprowadzonych analizach polimorfizmu. *Loci* polimorficzne zostały zidentyfikowane w każdym systemie markerowym, ale tylko u trzech genotypów łącznie: DL 591/20, DL 598/20 oraz DWLL 17, co oznacza, że w pozostałych genotypach nie stwierdzono żadnych różnic genetycznych pomiędzy reprezentującymi je osobnikami. Najwyższą wartość heterozygotyczności stwierdzono w populacji roślin należących do genotypu DL 598/20 za pomocą detekcji markerami SCoT. Siedem spośród 10 genotypów charakteryzowała całkowita homozygotyczność – pomiędzy osobnikami należącymi do populacji danego genotypu nie było różnic. Analiza zmienności molekularnej AMOVA dała niejednoznaczne wyniki - wysoką efektywność zastosowanych systemów markerowych RAPD i ISSR w segregacji poszczególnych genotypów, wskazując wysoki udział zmienności pomiędzy genotypami oraz wskazując jako jedyne źródło zmienności zmienność wewnątrzpopulacyjną dla markerów SCoT. W analizie polimorfizmu za pomocą markerów SCoT zmienność stwierdzona była tylko u jednej rośliny genotypu DL 598/20, pozostałe wzory ampliconów były identyczne u wszystkich osobników i wszystkich genotypów, co świadczy o wysokim stopniu homozygotyczności oraz bardzo dużym podobieństwie genetycznym badanych roślin. Wysokie współczynniki podobieństwa genetycznego pomiędzy roślinami widoczne są również w analizie PCoA – za pomocą markerów RAPD zostały wskazane trzy monomorficzne grupy.

Większą efektywność segregacji genotypów i roślin uzyskano za pomocą markerów ISSR, przy czym także wyróżnia się odległość genetyczna DL 598/20 od pozostałych genotypów. Ze względu na zbyt małą zmienność wykazaną między populacjami genotypów pszenżyta za pomocą systemu markerowego SCoT, nie było możliwe przeprowadzenie wielowymiarowej analizy skupień i stworzenie wykresu PCoA. Największą efektywność w rozdzielaniu genotypów, a zatem w detekcji zmienności u pszenżyta uzyskano dzięki markerom ISSR, markery SCoT wyróżniły tylko grupę DL 598/20.

Wartości uwspólnionych współczynników dystansu genetycznego Neia wahają się pomiędzy wartością zerową między genotypami DS.3531/20 a DWLL 19 oraz DD 591/20 a DWLL 20, a najwyższą wartością wynoszącą 0,065 dla czterech par z genotypem DL 598/20. Genotyp DL 598/20 charakteryzował się istotnie wyższym średnim dystansem genetycznym niż pozostałe genotypy z wyjątkiem DL 652/20.

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 zróżnicowana w zależności od gatunku i odmiany lub linii. U sześciu genotypów pszenicy stwierdzono obecność czterech markerów odporności: AND-20610, C20 739-5, Mandaryna, KBP 22.29, Genotyp10, NAD 20484. Markery odporności genów *Sr32* i *Sr49* były obecne we wszystkich badanych genotypach pszenicy, natomiast u pszenżyta we wszystkich genotypach występował jedynie marker genu

Sr32. Jeśli stwierdzono obecność genów markerowych u danej odmiany, to występowały one u wszystkich badanych osobników danego genotypu z wyjątkiem markera genu *Sr28*, który u pszenicy odmiany Mandaryna nie występował u 1/3 badanych osobników. Popularny marker genu odporności *Sr22* WMC633 nie został stwierdzony u żadnego genotypu pszenicy ani pszenżyta. Marker genu odporności *Sr24* w postaci prążka o długości 500bp zidentyfikowany został u dwóch genotypów pszenicy i u żadnego genotypu pszenżyta. Markery genów odporności *Sr35*, *Sr39* i *Sr45* i *Sr57* nie zostały stwierdzone u żadnego badanego genotypu obu gatunków. Marker genu *Sr28* występował jedynie w układzie heterozygotycznym – prążek wskazujący na odporność występował jednocześnie z prążkiem wskazujący na wrażliwość na rdzę żdźbłową. Marker genu *Sr56* sun320 występował u dziewięciu genotypów pszenicy z wyjątkiem POB 0823, natomiast w genotypie pszenicy NAD 20484 nie występował u wszystkich badanych osobników. Prążek charakterystyczny dla genotypów odpornych na rdzę żdźbłową był amplifikowany tylko w dwóch genotypach pszenżyta: DL 598/20 i DWLL 22. Marker genu *Sr49* w postaci prążka o długości 200bp obecny był we wszystkich badanych genotypach pszenicy i pszenżyta, jednakże wynik ten jest niejednoznaczny, ponieważ w towarzystwie markera *sun479* występowały niespecyficzne prążki, zmniejszając ostrość odczytu. Marker odporności *Sr49* może mieć polimorficzny charakter, amplikony markera *sun479* u australijskich i nordyckich odmian pszenicy odpornych na rdzę żdźbłową miały długość od 150-200bp.

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. Cel ten zostanie osiągnięty. Wytypowano odmiany o mniejszej wrażliwości na porażenie, jednak nie udało się wyodrębnić genotypów całkowicie odpornych na porażenie.

Materiały i metody

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

- Testy polowe

Obserwacje występowania rdzy żdźbłowej przeprowadzono na doświadczeniach należących do Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU). W badaniach tych uwzględniono Stacje Doświadczalne Oceny Odmian, w których zaobserwowano najwięcej objawów rdzy żdźbłowej. Obserwacje wrażliwości genotypów pszenicy i pszenżyta na *Puccinia graminis* prowadzono w miejscowościach, w których nasilenie objawów była większa, co miało zapewnić lepszą selekcję genotypów. Ocena porażenia przez *P. graminis* w uprawach pszenicy i pszenżyta wykonana została w lipcu, pod koniec okresu wegetacji zbóż.

W 2023 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. Wiosną doniczki z roślinami pszenicy i pszenżyta, wcześniej przygotowanymi w szklarni, umieszczone zostały na poletkach obsianych wrażliwymi odmianami. Inokulacja kolejnych roślin na poletkach przebiegać miała samoistnie. Ponadto po kwitnieniu zbóż wykonano oprysk zarodnikami *P. graminis* w celu zwiększenia presji patogena. W doświadczeniu tym połowa roślin w stadium kłoszenia zostały skoszona do wysokości 10–15 cm nad ziemią, co umożliwił

miało rozwój dodatkowych (wtórnych) pędów. Ocena porażenia przez *P. graminis* w uprawach pszenicy i pszenżyta wykonana została w lipcu i na początku sierpnia.

- Testy laboratoryjne - testy fizjologiczne żywiciel-patogen

Testy fizjologiczne żywiciel-patogen prowadzone były w warunkach szklarniowych. Wrażliwość genotypów na rdzę żdźbłową oceniana była na liściach roślin pszenicy i pszenżyta. Badaniami 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*. W celu stworzenia warunków sprzyjających rozwojowi infekcji rośliny po inokulacji zostały przykryte na 48 godzin torebkami foliowymi. Rośliny takie uprawiano jeszcze przez 3 tygodnie w temperaturze 21°C, w układzie 16 godzin światła i 8 godzin ciemności. Po tym okresie została określona wrażliwość poszczególnych genotypów zbóż, na podstawie obserwowanych zmian chorobowych stwierdzonych na liściach.

Wyniki

- Testy polowe

W 2023 roku w warunkach polowych obserwowano bardzo mało objawów chorobowych rdzy żdźbłowej na pszenicy. Często były to pojedyncze skupienia urednieniów *P. graminis*. Spośród wszystkich stacji badawczych najwięcej objawów chorobowych rdzy żdźbłowej na pszenicy stwierdzono w SDOO w Zybiszowie i w SDOO w Głubczycach, następnie w SDOO w Pawłowicach. Z tego względu wnioskowanie co do wrażliwości genotypów pszenicy na *P. graminis* oparto głównie na podstawie danych uzyskanych z tych miejscowości. W SDOO w Zybiszowie najwięcej objawów chorobowych rdzy żdźbłowej obserwowano pszenicy odmiany Arevus, a następnie KWS Donovan i Bosphorus.

W 2023 roku w warunkach polowych obserwowano bardzo mało objawów chorobowych rdzy żdźbłowej zbóż i traw na roślinach pszenżyta. Spośród wszystkich stacji badawczych objętych obserwacjami najwięcej objawów chorobowych rdzy żdźbłowej na roślinach pszenżyta odnotowano w ZDOO w Dukli, następnie w SDOO w Węgrzcach oraz SDOO w Słupi. W ZDOO w Dukli spośród wszystkich analizowanych odmian pszenżyta najwięcej objawów chorobowych stwierdzono na roślinach odmiany SU Favonius, a następnie Meloman oraz Lombardo i Panteon.

Na roślinach pszenicy uprawianych w RZD Minikowo na mikropoletkach również obserwowano bardzo małe nasilenie objawów chorobowych rdzy żdźbłowej. Pomimo podjęcia prób 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 żdźbłowej stwierdzono na 3% źdźbeł, co odnotowano dla genotypu AND 19569. Na trzech genotypach odnotowano po 2% porażonych źdźbeł, a na 14 genotypach było po 1,5% i mniej porażonych źdźbeł. Na roślinach pszenżyta uprawianych na mikropoletkach również obserwowano bardzo mało objawów chorobowych rdzy żdźbłowej. Próby zwiększenia presji patogena nie przyczyniło się również do wyraźnego wzrostu nasilenia objawów choroby na testowanych roślinach. Maksymalnie objawy rdzy żdźbłowej stwierdzono na 2% źdźbeł, co odnotowano na rodzie DL 379/19. W sumie objawy chorobowe obserwowano tylko na 11 genotypach.

- Testy laboratoryjne - testy fizjologiczne żywiciel-patogen

W badaniach szklarniowych na testowanych roślinach pszenicy, podobnie jak w badaniach poletkowych, także obserwowano małe nasilenie porażenia przez *P. graminis*. Spośród 80 analizowanych genotypów pszenicy objawy chorobowe rdzy żdźbłowej zbóż i traw stwierdzono tylko na 23 genotypach. Najwięcej był ich na roślinach genotypów oznaczonych jako AND_20398, DD 296/20 i Genotyp14. Nieco mniej objawów

chorobowych stwierdzono na roślinach genotypów NAD 20335 i Genotyp2. Ze względu na bardzo małe nasilenie objawów chorobowych rdzy nie można jednak jednoznacznie wskazać genotypów odpornych lub też mało wrażliwych na porażenie przez *P. graminis*. W teście szklarniowym, spośród 40 testowanych genotypów pszenżyta objawy chorobowe rdzy żdźbłowej obserwowano tylko na 11 genotypach. Najwięcej był ich na roślinach genotypów DL 652/20, DWLL 17 i SU Liborius. Ze względu na bardzo małe nasilenie objawów chorobowych rdzy nie można jednak jednoznacznie wskazać genotypów odpornych lub też mało wrażliwych 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 (AND-20610, C20 739-5, DL 746/20, Genotyp1, Genotyp10, KBP 22.29, Mandaryna, MIB 1412, NAD 20708, POB 0823) i 10 genotypów pszenżyta (DC 16236, DD 591/20, DL 598/20, DL 652/20, DS.3531/20, DWLL 17, DWLL 19, DWLL 20, DWLL 22, DWLL 24). Rośliny do badań uprawiano w komorze wzrostowej. Inokulację przeprowadzano w fazie dwóch-trzech liści, poprzez nanoszenie zawiesiny atomizerem na powierzchnię roślin (Sørensen i in. 2017). Nadziemną część rośliny pobierano i zabezpieczano do dalszych analiz poprzez zamrożenie w -75°C .

Pozyskiwanie markerów odporności z tkanek genotypów roślin prowadzono wieloetapowo w zależności od kompleksu enzymatycznego (markery enzymatyczne) czy też grupy analitów (markery nieenzymatyczne). Oznaczane jest 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 patogenezy, zawartość metabolitów aktywnie biorących udział w mechanizmach obronnych czy stan lignifikacji ściany komórkowej. Metody analityczne oparte będą na spektrofotometrii, detekcji *in vivo* i Chitynazy i β -1,3-Glukanazy (markery enzymatyczne CHI, β -GLU)

W celu wyekstrahowania markerów badanej grupy enzymatycznej wykorzystano zaadaptowane metody Zhang i in. (2013) będącej rozwinięciem metody według Miller (1959). Ekstrakcję markerów wykonano poprzez homogenizację. W celu określenia aktywności enzymów chitynolitycznych wykorzystana została chityna koloidalna. Po inkubacji w celu wybarwienia ekwiwalentów glukozy uwalnianych z koloidalnej chityny wykorzystano reakcję z 1% kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS). W celu określenia aktywności β -1,3-glukanaz zastosowano roztwór laminaryny. W celu określenia zawartości ekwiwalentów glukozy ponownie wykorzystano reakcję z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym.

W celu analizy stopnia uwalniania wolnych cukrów (stanu zapotrzebowania energetycznego tkanek) zastosowano zaadaptowaną metodę Manes (2010) i Bacete i in. (2017). W celu oznaczenia wolnych cukrów ekstrakty alkoholowe (95%) wybarwione zostały za pomocą reakcji z 5% fenolem oraz stężonym kwasem siarkowym. Zawartość cukrów odczytana została z krzywej wzorcowej. Natomiast w celu oznaczenia skrobi w tkankach roślin osad pochodzący z etapu ekstrakcji alkoholowej wolnych cukrów poddany został hydrolizie w celu rozbicia wiązań w zawartej w tkankach skrobi. Zawartość cukrów prostych odczytana została na podstawie krzywej kalibracyjnej. Analiza zawartości wolnych związków fenolowych przeprowadzona została za pomocą zaadaptowanej metody Dragišić-Maksimovic

i Živanović (2012). Analiza zawartości H₂O₂ w tkankach przeprowadzona została z wykorzystaniem zaadaptowanej metody Khakdan i in. (2016). W tym celu przeprowadzona została ekstrakcja H₂O₂ z wykorzystaniem 0,1% roztworu kwasu trichlorooctowego (TCA). Analiza stopnia lignifikacji tkanek (LTGA) przeprowadzona została z wykorzystaniem zaadaptowanej metody Lloyd i in. (2017). W tym celu tkankę wykorzystaną do określenia zawartości wolnych związków fenolowych poddano płukaniu w stężonym alkoholu metylowym i następnie hydrolizie w celu uwolnienia pochodnych lignin.

Wyniki

Markery enzymatyczne

Aktywność chitynolityczna na podstawie aktywności chitynaz (CHI)

Przeprowadzono badania nad stopniem indukcji jak i aktywnością enzymów z grupy chitynaz, które mogą brać bezpośredni udział w zwalczaniu patogenów z gatunku *P. graminis*. Spośród badanych genotypów pszenicy roślin największą aktywnością chitynaz charakteryzował się genotyp KBP 22.29. Kolejnymi genotypami były NAD 20708 i DL 746/20. Wszystkie trzy genotypy charakteryzowały się wysoką aktywnością. Najmniejszą aktywnością chitynaz charakteryzował się genotyp Mandaryna. W przypadku pszenżyta zaobserwowano dwa genotypy charakteryzujące się najwyższą aktywnością, tj. DL 598/20 oraz DWLL 24. Jako najmniej aktywne zaklasyfikowano DWLL20, DWLL 22 i DL 652/20. Aktywność chitynolityczna na podstawie aktywności glukanaż (GLU)

Kolejnym markerem o działaniu chitynolitycznym jaki badano w ramach prowadzonych analiz była aktywność enzymów z grupy β -1,3- glukanaż. Podobnie jak w przypadku aktywności chitynolitycznej na podstawie występowania markera CHI, obserwowano zbliżone trendy wśród badanych genotypów. Największą aktywnością charakteryzowały się Genotyp KBP 22.29, NAD 20708 oraz DL 746/20. Najniższą aktywnością enzymu charakteryzował się genotyp Mandaryna. W przypadku pszenżyta zaobserwowano większe zróżnicowanie oraz zaobserwowano wielokrotnie większą aktywność kompleksu GLU niż w przypadku pszenicy. Jako genotyp o największej aktywności zaklasyfikowano DD 591/20. Kolejnym genotypem o zauważalnie wysokiej aktywności markera GLU był DWLL 20. Jako najmniej aktywne można określić DS. 3531/20 oraz DL 652/20.

Markery metaboliczne

Zawartość wolnych związków fenolowych

W przypadku roślin pszenicy obserwowano małe zróżnicowanie co do zawartości badanych metabolitów wśród wszystkich badanych genotypach roślin. Największą zawartością charakteryzował się DL 746/20. Kolejnymi genotypami charakteryzującymi się wysoką zawartością metabolitów była AND-20610 oraz NAD 20708. Najniższą zawartością metabolitów charakteryzował się genotyp Mandaryna. W przypadku genotypów pszenżyta zaobserwowano dwa genotypy charakteryzujące się wysoką zawartością wolnych metabolitów DD 591/20 oraz DWLL 20. Jako genotypy o najmniejszej zawartości badanej grupy metabolitów można zaliczyć DL 652/20 oraz DWLL 24.

Zawartość wolnych cukrów

Największą zawartością wolnych cukrów w tkankach roślin pszenicy charakteryzowały się tkanki genotypu AND-20610. Kolejnymi genotypami były Genotyp1 oraz DL 746/20. Najmniejszą ilością charakteryzował się POB 0823. W przypadku genotypów pszenżyta analizy wykazały dosyć duże zróżnicowanie pod względem badanej cechy. Dało się zaobserwować dwa genotypy uwalniające zauważalnie wyższą ilość wolnych cukrów, tj: DS. 3531/20 i DL 598/20. Spośród genotypów pszenżyta zaobserwowano trzy o istotnie mniejszej, tj. DL 652/20, DWLL 22 i DWLL 17.

Zawartość pochodnych lignin (LTGA)

Wśród roślin pszenicy genotypem o najsilniejszym stopniu lignifikacji należał Genotyp1. Następnie równie wysokim stopniem lignifikacji charakteryzowały się KBP 22.29 i Mandaryna. Jako genotyp o najmniejszym stopniu lignifikacji charakteryzowały się rośliny genotypu AND-20610. W przypadku genotypów pszenżyta zaobserwowano jeden

wyróżniający się genotyp pod względem zawartości LTGA, tj. DWLL 24. Natomiast jako najmniej ulegające lignifikacji okazały się tkanki roślin genotypu DWLL 17.

Zawartość H_2O_2

Największą zawartością wolnego H_2O_2 w tkankach roślin pszenicy charakteryzował się genotyp Mandaryna. Kolejnymi były DL 746/20 oraz AND 20610, NADZ: 19796 oraz Genotyp20. Najmniejszą zawartością charakteryzował się C20 739-5. W przypadku genotypów pszenżyta zaobserwowano trzy genotypy charakteryzujące się wysoką zawartością badanego rodnika, tj. DWLL 20, DD 591/20 i DWLL 24. Z kolei DL 652/20 charakteryzował się istotnie najmniejszą zawartością rodnika.