



**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

Mgr Lidia Kowalska

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Selekcja genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej
odporności na septoriozę liści i plew (*Parastagonospora nodorum*)
z wykorzystaniem metod biotechnologicznych**

Screening of winter triticale genotypes with increased resistance
to *Septoria nodorum* blotch (*Parastagonospora nodorum*) using methods
of biotechnology

Promotor: dr. hab. Tomasz Góral

Promotor pomocniczy: dr. Piotr Ochodzki

Zakład Biologii Stosowanej

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Państwowy Instytut Badawczy

Recenzenci:

Prof. dr hab. Małgorzata Jędrzycka

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin

Prof. dr hab. Wojciech Wakuliński

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk Ogrodniczych

WSTĘP I CEL PRACY

Pszenżyto jest mieszańcem międzyrodzajowym otrzymanym w wyniku skrzyżowania pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) z żytem (*Secale cereale* L.). Pszenżyto nie jest w czołówce najczęściej uprawianych zbóż na świecie, jednak zainteresowanie tym gatunkiem wciąż rośnie. Powierzchnia zasiewów pszenżyta na świecie wyniosła w 2020 roku 3,8 mln ha, z czego uprawy w Europie stanowiły ponad 3,3 mln ha. Polska jest liderem w światowej produkcji i hodowli odmian pszenżyta. W ciągu ostatnich pięciu lat areał upraw w Polsce wzrósł z 1,2 mln ha do 1,3 mln ha. Ze względu na większy plon najczęściej uprawiane są odmiany ozime tego gatunku.

Główną przyczyną strat w ilości i jakości plonu ziarna zbóż, a tym samym największym problemem hodowców są patogeny grzybowe (Singh i in. 2019). Wśród chorób pszenżyta, największe znaczenie ekonomiczne mają: mączniak prawdziwy, rdza żółta, rdza brunatna, septorioza paskowana liści oraz septorioza liści i plew. Każda z tych chorób znacząco wpływa na straty plonu ziarna i pogorszenie parametrów jakościowych pszenżyta ozimego.

Septorioza liści i plew (SNB ang. *Septoria nodorum blotch*) wywoływana przez nekrotroficzny grzyb *Parastagonospora nodorum* uważana była za chorobę powszechną, ale nigdy o znaczeniu epidemiologicznym. Straty plonu wywołane przez patogen mogą sięgać 31-50% (Eyal i in. 1987, Bhathal i in. 2003). Stopień rozwoju choroby zależy głównie od podatności roślin, dostępności inokulum, zmianowania i warunków klimatycznych.

W 2004 roku dokonano przełomowego odkrycia białkowych efektorów nekrotroficznych (NE) wytwarzanych przez *P. nodorum* (Liu i in. 2004). Do tej pory w patosystemie patogen - pszenica opisano dziewięć oddziaływań NE z genami roślin warunkującymi wrażliwość. Liczne badania potwierdzają, że efekторы białkowe SnToxA, SnTox1 i SnTox3 szczególnie wpływają na nasilenie septoriozy liści i plew oraz są szeroko rozpowszechnione w populacji *P. nodorum* (Liu i in. 2012, Richards i in. 2019, Lin i in. 2020). Co ciekawe, światowa literatura przedstawia badania dotyczące interakcji NE-Snn jedynie dla pszenicy. W Zakładzie Fitopatologii Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Jakub Walczewski (2014) po raz pierwszy zaproponował sprawdzenie oddziaływania efektorów białkowych dla odmian i linii DH zarówno dla pszenicy, jak i pszenżyta. Jego badania potwierdziły wysoką podatność pszenżyta na działanie efektora białkowego SnTox3 (Arseniuk i in. 2019, Arseniuk 2021).

Ochrona zbóż przed chorobami polega głównie na profilaktyce poprzez zastosowanie zabiegów agrotechnicznych, chemicznych i fizycznych. SNB najczęściej zwalczana

jest przez zastosowanie środków ochrony roślin (fungicydów), jednak jest to sposób drogi i negatywnie wpływający na środowisko (Cook 1999). Intensywne zabiegi i stosowanie fungicydów budzą spór społeczny oraz przyczyniają się do nabycia odporności przez patotypy *P. nodorum* oraz wyodrębnienia szczepów patogenu odpornych na środki ochrony roślin (Peever i in. 1994, Blixt i in. 2009, Lucas i in. 2015, Pereira i in. 2020). Szkody oraz ponoszone koszty ochrony roślin są wysokie, dlatego hodowla odmian odpornych na działanie grzybów patogennych stanowi ekonomiczną i ekologiczną alternatywę ochrony pszenżyta.

Celem niniejszej pracy była selekcja genotypów pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. Założono zweryfikowanie potencjału somatycznej embriogenezy i androgenezy jako drogi do wyprowadzenia linii pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na infekcję *P. nodorum* oraz działanie efektorów białkowych wytwarzanych przez patogen.

Cele szczegółowe:

- wyprowadzenie linii somaklonalnych i podwojonych haploidów pszenżyta ozimego;
- analiza fenotypowa odporności siewek w warunkach kontrolowanego środowiska i roślin dorosłych w warunkach polowych;
- analiza fenotypowa odporności badanych linii na efektor białkowy SnTox3, produkowany przez *P. nodorum*.

Hipoteza naukowa: Zastosowanie metod biotechnologicznych oraz testów przesiewowych z wykorzystaniem efektora białkowego SnTox3 umożliwi wyprowadzenie linii pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew.

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny

Badanie zostało przeprowadzone na genotypach pszenżyta ozimego. Materiał roślinny stanowiły linie somaklonalne (SE), podwojone haploidy (DH) otrzymane w latach 2015 – 2016 oraz ich formy rodzicielskie. Genotypy wyprowadzono na drodze androgenezy oraz somatycznej embriogenezy z pokolenia F₁ po skrzyżowaniu siedmiu odmian pszenżyta ozimego o zróżnicowanej odporności na septoriozę liści i plew: Algoso, Borowik, Borwo, Cyrkon, Meloman, Panteon, Tomko. Odmiany rodzicielskie zostały wytypowane na podstawie wyników badań prowadzonych przez Arseniuka i współpracowników pod kątem odporności

pszenżyta na nekrotroficzny grzyb *P. nodorum*. W doświadczeniach fitopatologicznych wykorzystano odmiany Fredro i Pigmej jako wzorce.

Izolaty *Parastagonospora nodorum*

Materiałem infekcyjnym w testach stopnia porażenia otrzymanych genotypów pszenżyta ozimego w warunkach polowych i kontrolowanego środowiska stanowiło inokulum składające się z 10 izolatów patogenu o wysokiej patogeniczności: 9074, 9282, 9079, 13-6-5, 9281, 2-7/11, 13-6-12, 7-1-11, 37-1, 5-5/11. Izolaty pochodziły z próbek naturalnie porażonych liści pszenicy i pszenżyta pozyskanych z siedmiu lokalizacji: Bartązek (woj. Warmińsko – mazurskie), Bonin (woj. Zachodnio – pomorskie), Borowo (woj. Wielkopolskie), Grodkowice (woj. Małopolskie), Małyszyn (woj. Lubuskie), Oleśnica Mała (woj. Dolnośląskie), Ożańsk (woj. Podkarpackie) i Smolice (woj. Wielkopolskie) w latach 2015 – 2016. Skład inokulum został dobrany tak aby odpowiadał populacji patogenu w Polsce. Identyczny skład inokulum stosowano w doświadczeniach polowych oraz w doświadczeniach prowadzonych w warunkach kontrolowanego środowiska w latach 2018 - 2020.

Przygotowanie efektoru białkowego SnTox3

Do przygotowania efektoru białkowego SnTox3 wykorzystano szczep drożdży metylotrofowych *Pichia pastoris* (X33 Invitrogen) zawierający plazmid pGAPZA ze sklonowanym genem *SnTox3*. Plazmid otrzymano z USDA-ARS Cereal Crops Research Unit, Edward T. Schafer Agricultural Research Center, Fargo, ND, 58102, Stany Zjednoczone.

Metody badawcze:

1. Analiza fitopatologiczna genotypów pszenżyta ozimego w warunkach polowych

Jednostkami doświadczalnymi pojedynczych ocen były 2 - 4-rzędkowe poletka o długości 1 m, rozstawie 15 cm i 10 roślinach/rzędek. W doświadczeniach polowych linie pszenżyta ozimego oraz odmiany rodzicielskie wysiano w trzech losowych blokach, z których dwa zakażano (powtórzenia) a jeden stanowił kontrolę. Kontrolny blok roślin opryskano fungicydem Tilt 250 EC przed rozpoczęciem inokulacji roślin na pasach zakażanych oraz posłużył głównie do monitorowania i oceny występowania ewentualnych symptomów chorobowych powodowanych przez zewnętrzne źródła *P. nodorum* i innych patogenów. Dwa rzędy poletek były inokulowane trzykrotnie w ciągu sezonu:

- pod koniec stadium butonizacji kłosa (GS 45) (stężenie zawiesiny $5 - 6 \times 10^6$ zarodników/ ml);
- 10 dni później (stężenie zawiesiny $5 - 6 \times 10^6$ zarodników/ ml);
- po wykłoszeniu (GS 59) (stężenie zawiesiny $2 - 3 \times 10^6$ zarodników/ ml).

Ocenę porażenia liści i kłosów przeprowadzono po pojawieniu się pierwszych objawów w 9° skali, gdzie 1- roślina krańcowo podatna, 9 - roślina całkowicie odporna oraz przy pomocy programu ImageJ, gdzie 100% oznacza podatny, 0%-odporny.

2. Analiza fitopatologiczna genotypów pszenżyta w warunkach kontrolowanego środowiska

Testy fitopatologiczne w warunkach kontrolowanego środowiska przeprowadzono na 8 czternastodniowych siewkach mających w pełni wykształcony drugi liść. Rośliny były inokulowane wodną zawiesiną zarodników *P. nodorum* o stężeniu $4 - 4,5 \times 10^6$ zarodników/ml i umieszczone w całkowitej ciemności w warunkach kontrolowanego środowiska: temp. 22°C i 100% wilgotności przez 72 godziny. Następnie powrócono do fotoperiodu 16 godzin dzień, 8 godzin noc, temp. 20°C w nocy i 22°C w dzień oraz naturalnej wilgotności względnej powietrza. Po 10 - 14 dniach inkubacji została przeprowadzona ocena stopnia porażenia drugiego liścia siewek. Ocenę porażenia liści i kłosów przeprowadzono przy pomocy programu ImageJ, gdzie 100% oznacza podatny, 0%-odporny.

3. Ocena fenotypowa wrażliwości genotypów pszenżyta ozimego na efektor białkowy SnTox3

Materiałem do przeprowadzenia testów wrażliwości na efektor białkowy SnTox3 były dwutygodniowe siewki, po 3 dla każdego genotypu. Zawiesinę zawierającą efektor białkowy SnTox3 wprowadzono w górną powierzchnię blaszki liściowej, zaznaczając obszar infiltracji nietoksycznym flamastrem. Siewki zostały umieszczone w warunkach fotoperiodu 16 godzin dzień, 8 godzin noc, w temp. 20°C w nocy i 22°C w dzień oraz naturalnej wilgotności względnej powietrza. Ocena wrażliwości genotypów pszenżyta ozimego na SnTox3 została przeprowadzona wizualnie po 4 - 8 dniach. Za wrażliwe genotypy pszenżyta ozimego zostały uznane linie, które w zaznaczonym obszarze wykazały chlorozy i nekrozy oraz zwijanie się liścia. Genotypy niewrażliwe nie wykazały żadnych zmian w granicach infiltrowanego obszaru. Wynik dla każdego genotypu był średnią z trzech roślin poddanych infiltracji.

4. Analiza danych meteorologicznych

Dane pogodowe zostały uzyskane ze stacji meteorologicznej zlokalizowanej w Radzikowie. Przebieg warunków pogodowych analizowano wykorzystując pomiary temperatury, wilgotności względnej powietrza i opadów atmosferycznych na podstawie dziennych danych dla dwóch okresów prowadzenia doświadczeń.

5. Analizy statystyczne przeprowadzono korzystając z pakietu Statistica v13 oraz Excel w pakiecie Microsoft Office 2019.

W celu ujednolicenia danych i zapewnienia rozkładu normalnego otrzymane surowe wyniki poddano transformacji logarytmicznej. Transformacje wykonano według wzoru (Rowlings i in. 2001):

$$T_{ln} = \ln\left(\frac{P}{100 - P}\right)$$

gdzie: P - wartość cechy, ln - logarytm naturalny

Przy pomocy analizy wariancji ANOVA opracowano wyniki analiz fitopatologicznych dla linii SE, DH i odmian rodzicielskich dla każdego typu doświadczenia. W celu zbadania między którymi grupami występują istotne różnice wykonano test Duncana.

Współczynnik korelacji Pearsona (r) zastosowano do oceny zależności między odpornością genotypów SE, DH oraz odmian rodzicielskich na SNB w warunkach polowych, w warunkach kontrolowanego środowiska oraz ich wrażliwości na efektor białkowy SnTox3.

WYNIKI I DYSKUSJA

Do niedawna pszenżyto uważane było za zboże charakteryzujące się wysoką odpornością na większość chorób. Obecnie obserwuje się coraz większe problemy ze zdrowotnością tego gatunku. Szacuje się, że przy przeciętnym porażeniu roślin przez patogen następuje spadek plonu o 10-15%, natomiast przy silnym porażeniu spadek ten może wynieść nawet kilkadziesiąt procent (Woś i Strzembicka 2011).

Septorioza liści i plew wywołana przez *Parastagonospora nodorum* to jedna z najważniejszych chorób pszenżyta ozimego. Stwierdzono, że w ostatnich latach *P. nodorum* był dominującym gatunkiem powodującym choroby liści pszenżyta określane jako septoriozy w Polsce (Bartosiak i in. 2021). Do zwalczania SNB wciąż najczęściej stosuje się środki ochrony roślin. Jednak w ostatnich latach zaobserwowano rozwój odporności *P. nodorum* na kilka fungicydów na skutek wysokiej presji selekcyjnej wśród populacji patogenu (Blixt i in. 2009, Pereira i in. 2017). Włączenie do uprawy odmian zbóż o podwyższonej odporności

na septoriozę liści i plew w znacznym stopniu przyczyni się do ochrony środowiska naturalnego przed nadmiernym skażeniem pestycydami.

Cele niniejszej pracy zostały zrealizowane przez otrzymanie linii pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew i niewrażliwych na działanie efektor białkowego wytwarzanego przez *P. nodorum*, SnTox3. Podejmowana tematyka stanowi wyzwanie naukowe, ponieważ do tej pory prace prowadzone nad wpływem efektorów białkowych były w Polsce nieliczne, zwłaszcza dla obiektów pszenżyta ozimego.

Analiza fenotypowa odporności siewek i roślin dorosłych na septoriozę liści i plew i efektor białkowy SnTox3 otrzymanych linii somaklonalnych i linii podwojonych haploidów

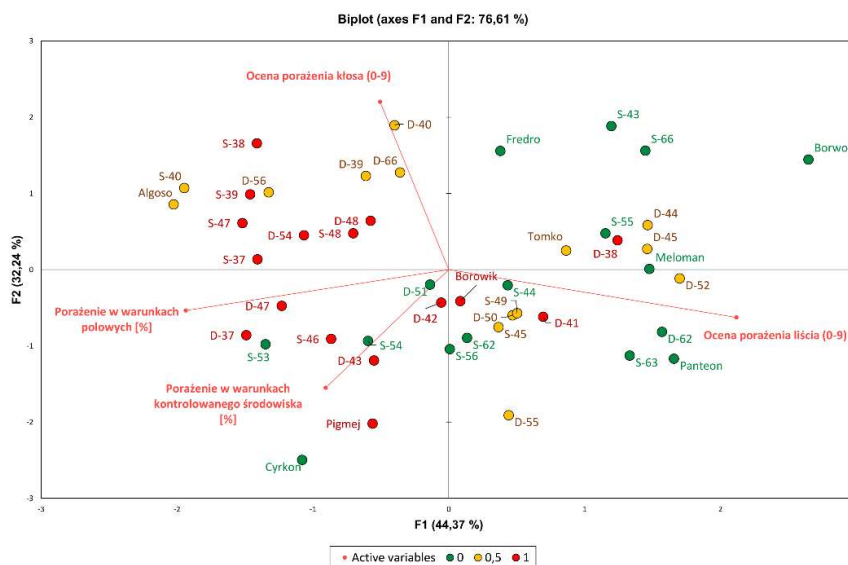
Zarówno w trakcie doświadczeń prowadzonych w Zakładzie Fitopatologii w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, jak i w doniesieniach literaturowych nie wytypowano do tej pory odmian całkowicie odpornych na działanie *P. nodorum* (Aguilar i in. 2005). Odporność całkowita na septoriozę liści i plew wśród odmian zbóż jest cechą rzadką (Shaner i Buechley 1995). W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę wytypowania linii pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew i niewrażliwych na efektor białkowy SnTox3. Przetestowano łącznie 18 linii somaklonalnych i 19 linii podwojonych haploidów oraz 9 odmian w latach 2018 - 2020. Wśród badanych materiałów pszenżyta ozimego również nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych, jednak wytypowano genotypy charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *P. nodorum*. Średni stopień porażenia badanych materiałów pszenżyta nie był mocno zróżnicowany, jednak wykazał statystycznie istotne różnice.

Na podstawie ocen fenotypowych stopnia porażenia liści w warunkach polowych otrzymanych linii somaklonalnych i podwojonych haploidów, czternaście linii DH i siedem SE zakwalifikowano do grupy charakteryzującej się podwyższoną odpornością na septoriozę liści i plew, co stanowi 56,76% wszystkich badanych genotypów otrzymanych w wyniku somatycznej embriogenezy i androgenezy. Ich średni stopień porażenia został oceniony w zakresie 0,21 – 1,64. Wśród genotypów o podwyższonej odporności, dla jedenastu linii nie wykazano wrażliwości na efektor białkowy SnTox3. Do grupy genotypów podatnych i bardzo podatnych włączono pięć linii DH i jednaście SE, co stanowi 43,24% badanych linii somaklonalnych i podwojonych haploidów. Ich średni stopień porażenia został oceniony w zakresie 1,77 – 3,55. Dla jedenastu linii podatnych na septoriozę liści i plew wykazano wrażliwość na SnTox3.

W przypadku ocen prowadzonych w warunkach kontrolowanego środowiska, czternaście badanych genotypów włączono do grupy o podwyższonej odporności na *P. nodorum*, co stanowi 37,84% wszystkich badanych linii pszenżyta otrzymanych w wyniku somatycznej embriogenezy i androgenezy. W tej grupie wyróżniono trzy linie DH i jednaście SE. Średni stopień porażenia oceniono w zakresie (-5,62) – (-2,95). Wśród genotypów charakteryzujących się podwyższoną odpornością na septoriozę liści i plew, dla ośmiu nie zaobserwowano wrażliwości na efektor białkowy SnTox3. Natomiast szesnaście linii DH i siedem SE to formy podatne i bardzo podatne, co stanowi 62,16% badanych genotypów somaklonalnych i podwojonych haploidów. Średni stopień porażenia oceniono w zakresie (-2,93) – (-1,61). Dla piętnastu z nich wykazano wrażliwość na SnTox3.

Podsumowując wyniki prezentowanej pracy na wykresie 1 przedstawiono analizę skupień (PCA ang. *Principal Component Analysis*) dla porażenia badanych genotypów przez *P. nodorum*. Kolorami oznaczono średni poziom wrażliwości genotypów na SnTox3: czerwony (1) - wrażliwość, zielony (0) - odporność na SnTox3, żółty - reakcja pośrednia (0,5). Większość linii i odmian niewrażliwych na efektor białkowy SnTox3 wykazała niskie lub średnie porażenie liści przez *P. nodorum*, zarówno w warunkach polowych (rośliny dorosłe) jak i w warunkach kontrolowanego środowiska (siewki). Linie i odmiany wrażliwe na SnTox3 w większości wykazały podatność na porażenie przez *P. nodorum*. Natomiast genotypy o niejednoznacznej reakcji na efektor SnTox3 miały zróżnicowaną reakcję na porażenie przez *P. nodorum*.

Wykres 1. Analiza skupień dla porażenia linii somaklonalnych, podwojonych haploidów i odmian przez *P. nodorum* w warunkach polowych i w warunkach kontrolowanego środowiska. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych.



Celem zwiększenia postępu hodowlanego wprowadza się nowe metody biotechnologiczne, między innymi kultury *in vitro*. Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że somatyczna embriogeneza i androgeniza powoduje powstanie zmienności genetycznej. Przy zastosowaniu selekcji genotypów wytypowano linie pszenżyta ozimego o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew. Na szczególną uwagę zasługują linie SE: S-43 (powstała w wyniku krzyżowania odmian Borowik x Cyrkon), S-66 (Tomko x Meloman), S-55 (Cyrkon x Borwo) i S-63 (Meloman x Panteon) oraz DH: D-62 (Panteon x Meloman), które wykazały wysoką odporność na działanie *P. nodorum* w warunkach polowych i w warunkach kontrolowanego środowiska. Dodatkowo, w przypadku tych linii nie zaobserwowano wrażliwości na efektor białkowy SnTox3. Rośliny te mogą być donorami w hodowli odpornościowej.

Należy podkreślić, że praca nad odpornością roślin na choroby grzybowe powinna mieć charakter ciągły, ponieważ równie ciągła jest zmienność patogenu. Odmiana Borowik została wprowadzona do uprawy jako odmiana odporna na działanie patogenów grzybowych, natomiast w prezentowanej pracy odmiana ta została zakwalifikowana do genotypów charakteryzujących się średnią podatnością na SNB w warunkach polowych. Wykazuje również wrażliwość na efektor białkowy SnTox3. Podany przykład jest dowodem na przełamanie odporności przez patogen w niedługim czasie stąd potrzeba zwiększenia efektywności i trwałości odporności odmian zbóż uprawnych na choroby w warunkach produkcyjnych (Wolfe 1985).

Niestety efekty zastosowania kultur *in vitro* do tworzenia zmienności odporności na stresy biotyczne są trudne do przewidzenia. Zmienność może prowadzić do spadku lub wzrostu odporności otrzymanych linii w stosunku do odmian rodzicielskich (Ahmed i in. 1996, Arseniuk i in. 1998a). Przykładem w pracy jest odmiana Panteon. Wszystkie linie somaklonalne i podwojone haploidy otrzymane w wyniku krzyżowania z tą odmianą okazały się być bardziej odporne na septoriozę liści i plew w warunkach kontrolowanego środowiska. Natomiast odmiana Borwo charakteryzowała się najwyższą odpornością na SNB w warunkach polowych. Wszystkie linie otrzymane z tej odmiany wykazały niższą odporność na działanie *P. nodorum*. Wśród pozostałych linii DH i SE zaobserwowano zarówno typy zwiększonej jak i obniżonej odporności w stosunku do odmian wyjściowych. Podobną zależność przedstawiono w badaniach Górala i Arseniuka (2003). Ponadto, udowodniono, że uzyskanie form o istotnie zwiększonej odporności na septoriozę liści i plew zależy nie tylko od genotypu pszenżyta wykorzystanego do krzyżowania, ale również od metody regeneracji.

Analiza związków między odpornością genotypów pszenżyta ozimego w warunkach polowych i kontrolowanego środowiska

Ze względu na mechanizm rozprzestrzeniania się septoriozy liści i plew oraz jej wielopokoleniowy charakter ważne jest, aby w odmianach stosować zarówno odporność siewek jak i roślin dorosłych. W niniejszej pracy ocenę odporności na septoriozę liści i plew prowadzono w warunkach infekcji polowej i w warunkach kontrolowanego środowiska stosując identyczną mieszaninę izolatów *P. nodorum* przez 3 lata prowadzenia badań. Na podstawie analizy korelacji wykazano istotną statystycznie zależność między procentowym uszkodzeniem powierzchni liści siewek i roślin dorosłych pszenżyta ozimego przez *P. nodorum*, zarówno dla oceny prowadzonej przy pomocy programu komputerowego (-0,59), jak i w 9°skali (0,29). Również w doniesieniach literaturowych wykazano, że odporność na SNB jest zależna od stadium rozwojowego rośliny (Rosielle i Brown 1980, Fried i Meister 1987, Bostwick i in. 1993, Czembor i in. 2003, 2019, Shankar 2008).

Po przeanalizowaniu współczynników korelacji między odpornością badanych genotypów pszenżyta ozimego w warunkach polowych i kontrolowanego środowiska zaobserwowano duże zróżnicowanie. Wartość współczynnika korelacji pomiędzy odpornością siewek a odpornością roślin dorosłych ocenianych obiema metodami nie był również powtarzalny dla poszczególnych lat. Podobnie w pracy Shankar i in. (2008), pomimo zastosowania identycznych izolatów do inokulacji w szklarni i na polu, współczynnik korelacji dla zależności pomiędzy porażeniem siewki przez *P. nodorum* a porażenia liści i kłosów roślin dorosłych był niski i wyniósł odpowiednio 0,31 i 0,09. Powyższe prace dowodzą, że na wyniki badań polowych może nadal wpływać naturalna populacja *P. nodorum*, nawet w przypadku, gdy zastosowano identyczny izolat lub mieszaninę izolatów dla obu przypadków. Dodatkowo, w 9° skali oceniano cały przekrój rośliny i postęp choroby, natomiast na siewkach prowadzono ocenę porażenia pojedynczych liści.

Pomimo, że objawy SNB na liściu i kłosie powodowane są przez ten sam patogen istnieje wiele doniesień literaturowych potwierdzających różne mechanizmy genetyczne kontrolujące porażenie liści i plew (Fried i Meister 1987, Wicki i in. 1999, Aguilar i in. 2005). Wartość współczynnika korelacji w prezentowanej pracy (0,05) potwierdziła słabą zależność pomiędzy porażeniem liści i porażeniem kłosów ocenianym w 9° skali. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że reakcja roślin na porażenie liści i porażenie kłosów w polu jest kontrolowana przez wiele niezależnych QTL-i (Ruud i Lillemo 2018, Czembor i in. 2019, Ruud i in. 2019, Francki i in. 2020) pogłębiając złożoność genetycznej odporności i podatności roślin na SNB.

Analiza fenotypowa związku między odpornością linii podwojonych haploidów i linii somaklonalnych na SNB a wrażliwością na efektor białkowy SnTox3

Efektory białkowe wytwarzane przez *P. nodorum* odgrywają istotną rolę nie tylko w wirulencji, ale również specjalizacji patogenu. Powstało już wiele prac dotyczących interakcji NE-*Snn* od momentu odkrycia pierwszych efektorów białkowych w patosystemie *P. nodorum* – pszenica (Liu i in. w 2004), jednak wciąż trwają dyskusje i spekulacje w jakim stopniu odporność/podatność gospodarza może być wyjaśniona przez te interakcje.

Na podstawie badań Jakuba Walczewskiego z Zakładu Fitopatologii IHAR-PIB oraz publikacji Arseniuka i in. (2019) wykazano najwyższy udział genów kodujących efektery białkowe SnTox1, SnTox3 oraz SnTox5 w populacji *P. nodorum* występującej w Polsce. Natomiast zaobserwowano niewielki udział efektorów SnToxA i SnTox2 oraz SnTox6. Dodatkowo nie zidentyfikowano izolatów wytwarzających SnTox4 i SnTox7. Po przeprowadzeniu analizy wariancji i związków korelacyjnych w badaniu Arseniuka i in. (2019), stwierdzono marginalny wpływ SnTox1, udział obiektów podatnych na ten NE wyniósł zaledwie 4%. Dla SnTox5 wykazano słabą zależność między odpornością na ten NE a fenotypową odpornością zbóż w stadium siewki (0,17) oraz w stadium rośliny dorosłej (0,13). Wśród badanych genotypów pszenicy i pszenżyta stwierdzono najwyższy udział obiektów podatnych na działanie SnTox3, szczególnie w przypadku pszenżyta (obiekty podatne stanowiły 60%). Dodatkowo, w publikacji zaobserwowano silny związek korelacyjny pomiędzy odpornością na efektor SnTox3 a fenotypową odpornością w warunkach polowych (Arseniuk i in. 2019).

Na podstawie doniesień literaturowych oraz wyników badań Arseniuka i Walczewskiego o istotnej roli SnTox3 dla pszenżyta (Arseniuk i in. 2019), w prezentowanej pracy przebadano wpływ tego efektora na rozwój septoriozy liści i plew dla linii SE, DH oraz odmian rodzicielskich. W 2018 roku otrzymano tylko jedną linię somaklonalną, dlatego odrzucono wyniki dotyczące odporności na efektor białkowy. Udział genotypów wrażliwych na SnTox3 w omawianej pracy (52,7%) był podobny do udziału obiektów wrażliwych w pracy Arseniuka i in. (2019) oraz do prac dotyczących europejskich odmian. W pracy Ruud i in. (2018) przetestowano odporność 157 odmian pszenicy jarej uprawianej w Norwegii na efektery SnToxA, SnTox1 oraz SnTox3. Podatność na SnTox3 wykazało 55% badanych odmian. W kolekcji 457 elitarnych linii uprawianych w Wielkiej Brytanii zaobserwowano podatność na SnTox3 dla 42% (Downie i in. 2018).

Współczynniki korelacji ze wszystkich typów doświadczeń w prezentowanej pracy miały wartość dodatnią potwierdzając hipotezę, że niewrażliwość badanych linii pszenżyta ozimego na efektor białkowy SnTox3 powoduje wzrost odporności roślin na septoriozę liści i plew zarówno w stadium siewki jak i w stadium rośliny dorosłej. Jedynym wyjątkiem były testy prowadzone w 2020 roku dla linii podwojonych haploidów, współczynnik korelacji wyniósł -0,28. W przypadku doświadczenia prowadzonego dla roślin dorosłych wykazano istotną statystycznie zależność między odpornością na SnTox3 a odpornością na SNB pszenżyta ozimego dla dwóch na trzy lata badań (w 2018 i 2020 roku), co świadczy o złożoności choroby.

Wszystkie linie SE oraz odmiany przebadane w niniejszej pracy (z wyjątkiem odmiany Pigmej) scharakteryzowane jako odporne i średnio odporne wykazały niewrażliwość na SnTox3. Co ciekawe, wszystkie linie DH zakwalifikowane jako średnio odporne były podatne na działanie efektora SnTox3. Warto sprawdzić odporność tych linii na inne efekторы białkowe. Interakcje NE-*Snn* mają zwykle charakter addytywny, dodatkowo epistaza NE odgrywa znaczącą rolę w kształtowaniu odporności fenotypowej gospodarza na SNB (Tan i Oliver 2017, John i in. 2022). Wszystkie odmiany scharakteryzowane jako podatne w warunkach polowych wykazywały wrażliwość na SnTox3.

W przypadku doświadczeń prowadzonych na siewkach, istotnie statystyczny współczynnik korelacji pomiędzy odpornością na SnTox3 a odpornością na septoriozę liści i plew otrzymano tylko w 2019 roku (0,37). Po przeanalizowaniu współczynników korelacji dla poszczególnych grup obiektów wykazano statystycznie istotny wpływ SnTox3 na odporność odmian w 2020 roku (współczynnik korelacji wyniósł 0,53) oraz linii somaklonalnych w 2020 roku (współczynnik korelacji wyniósł 0,40).

Analiza związków między odpornością genotypów pszenżyta ozimego a wybranymi czynnikami meteorologicznymi

W przedstawionych badaniach stwierdzono duży wpływ warunków pogodowych w pierwszych dniach od inokulacji na porażenie liści pszenżyta ozimego przez SNB. Analiza korelacji wykazała wysoką, dodatnią zależność między udziałem porażonej tkanki a wilgotnością względną podczas dwóch tygodni od infekcji (0,55), zarówno dla liści jak i kłosów. Stwierdzono również, że porażenie liści powodowane przez *P. nodorum* jest wyższe przy umiarkowanych temperaturach i opadach deszczu podczas 7 i 14 dni od zakażenia. Wysokie temperatury podczas dwóch tygodni od inokulacji ograniczają rozwój patogenu na liściu i kłosie. Natomiast suma opadów podczas pierwszych dni od inokulacji nie ma wpływu na wielkość porażenia kłosów przez patogen. Również w badaniach Arseniuka i in. (1998b)

zaobserwowano, że askospory najlepiej rozwijają się w temp. powyżej 0°C, przy opadach deszczu powyżej 1 mm oraz wysokiej wilgotności względnej powietrza. Natomiast temperatura powyżej 25°C utrudniała rozwój i uwalnianie zarodników *P. nodorum*. W pracy Bartosiaka i in. (2021) potwierdzono wpływ wysokiej temperatury na ograniczony rozwój zarodników patogenu.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Wyprowadzone w latach 2015 - 2016 linie somaklonalne i linie podwojonych haploidów oraz odmiany rodzicielskie pszenżyta ozimego różniły się między sobą pod względem odporności na septoriozę liści i plew. Wytypowano cztery grupy genotypów na podstawie ocen fenotypowych stopnia porażenia liści przez *P. nodorum* w warunkach polowych i w warunkach kontrolowanego środowiska.
2. Zmienność linii somaklonalnych i podwojonych haploidów może być stosowana jako dodatkowe źródło odporności pszenżyta ozimego na patogeny. Wskazano linie, które charakteryzowały się podwyższoną odpornością na septoriozę liści i plew w warunkach polowych i w warunkach kontrolowanego środowiska oraz wykazywały brak wrażliwości na efektor białkowy SnTox3. Wykazano, że jedna linia podwojonych haploidów: D-62 (Panteon x Meloman) oraz cztery linie somaklonalne: S-43 (Borowik x Cyrkon), S-66 (Tomko x Meloman), S-55 (Cyrkon x Borwo) i S-63 (Meloman x Panteon) mogą być donorami w hodowli odpornościowej. Nie wytypowano do tej pory genotypów całkowicie odpornych na działanie *P. nodorum*.
3. Efekty zastosowania kultur *in vitro* do tworzenia zmienności odporności na patogen są trudne do przewidzenia. Zmienność może prowadzić do spadku lub wzrostu odporności otrzymanych genotypów w stosunku do odmian rodzicielskich. Uzyskanie form o istotnie zwiększonej odporności na SNB zależy nie tylko od genotypu pszenżyta wykorzystanego do krzyżowania, ale również od metody regeneracji.
4. Badania nad poprawą odporności na septoriozę liści i plew powinny być prowadzone dla siewek i dla roślin dorosłych ze względu na mechanizm rozprzestrzeniania się choroby oraz jej wielopokoleniowy charakter. W doświadczeniach należy stosować identyczną mieszaninę izolatów lub pojedyncze izolaty *P. nodorum* w warunkach polowych i w warunkach kontrolowanego środowiska.
5. Wyniki analizy korelacji Pearsona wykorzystanej do porównania odporności badanych genotypów pszenżyta ozimego w różnych stadiach rozwojowych wskazują, że odporność siewek na septoriozę liści i plew nie warunkuje odporności w stadium rośliny dorosłej.

6. Nie wykazano zależności między porażeniem kłosów linii pszenżyta ozimego a porażeniem liści w doświadczeniu polowym.
7. Niewrażliwość badanych linii pszenżyta ozimego na efektor białkowy SnTox3 wiąże się z ich podwyższoną odpornością na septoriozę liści i plew zarówno w warunkach polowych jak i w warunkach kontrolowanego środowiska. Zależność ta warunkowana jest przez środowisko (rok prowadzenia doświadczenia).
8. Linie podwojonych haploidów zakwalifikowane jako średnio odporne na SNB oraz wrażliwe na działanie SnTox3 należy przetestować na inne efekторы białkowe ze względu na epistatyczne działanie NE względem siebie.
9. Czynniki hydrotermiczne: średnia temp. i wilgotność względną powietrza oraz suma opadów wpływają na rozwój SNB, zwłaszcza w pierwszym okresie od inokulacji pszenżyta ozimego izolatami *P. nodorum*.

SPIS LITERATURY

1. Aguilar V., Stamp P., Winzeler M., Winzeler H., Schachermayr G., Keller B., Zanette S., Messmer M.M. 2005. Inheritance of field resistance to *Stagonospora nodorum* leaf and glume blotch and correlations with other morphological traits in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor. Appl.Genet. 111:325-336.
2. Ahmed K.Z., Mesterhazy A., Bartok T., Sagi F. 1996. *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium* resistance in the somaclones. Euphytica 91: 341 — 349.
3. Arseniuk E. 2019. Recent Developments in Triticale Breeding Research and Production-An Overview. Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics, 5(2), 68-73.
4. Arseniuk E. 2021. Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum* i ich związek z patogenicznością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew (SNB). Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. Nr 295 / 2021: 55–62 E-ISSN: 2657–8913.
5. Arseniuk E., Czembor H.J., Zimny J., Scharen A.L., Laudański Z. 1998a. Somaclonal variation as a tool for improvement of triticale resistance to *Stagonospora nodorum* Proc. 4th International Triticale Symp., July 26-31, Red Deer, Canada: 124 — 147.
6. Arseniuk E., Góral T., Scharen A.L. 1998b. Seasonal Patterns of Spore Dispersal of *Phaeosphaeria* spp. and *Stagonospora* spp. Plant Dis. 82, 187–194
7. Arseniuk E., Walczewski J., Ochodzki P. 2019. Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum* i ich związek z patogenicznością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. 71-73. 10.37317/biul-2019-0016.
8. Bartosiak S.F., Arseniuk E., Szechyńska-Hebda M., Bartosiak E. 2021. Monitoring of natural occurrence and severity of leaf and glume blotch diseases of winter wheat and winter triticale incited by necrotrophic fungi *Parastagonospora* spp. And *Zymoseptoria tritici*. Agronomy:11, 967.
9. Bhathal J.S., Loughman R., Speijers J. 2003. Yield reduction in wheat in relation to leaf disease from yellow (tan) spot and *Septoria nodorum* blotch. Eur. J. Plant Pathol. 109:435-443.

10. Blixt E., Djurlle A., Yuen J., Olson Å. 2009. Fungicide sensitivity in Swedish isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. *Plant Pathol.* 58, 655–664.
11. Bostwick D.E., Ohm H.W., Samer G. 1993. Inheritance of Septoria glume blotch resistance in wheat. *Crop Sci.* 33:439-443.
12. Cook R.J. 1999: Management by chemicals. W: Lucas J. A., Bowyer P., Anderson H. M. *Septoria on Cereals: a Study of Pathosystems*, 286-298. CAB Int., New York.
13. Czembor P.C., Arseniuk E., Czaplicki A., Song Q., Cregan P.B., Ueng, P.P. 2003. QTL mapping of partial resistance in winter wheat to *Stagonospora nodorum* blotch. *Genome*, 46(4), 546-554.
14. Czembor P., Arseniuk E., Radecka-Janusik M., Piechota U., Słowacki P. 2019. Quantitative trait loci analysis of adult plant resistance to *Parastagonospora nodorum* blotch in winter wheat cv. Liwilla (*Triticum aestivum L.*) *Eur. J. Plant Path.* 155, 1001–1016.
15. Downie R.C., Bouvet L., Furuki E., Gosman N., Gardner K.A., Mackay I.J. i in. 2018. Assessing European wheat sensitivities to *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effectors and fine-mapping the Snn3-B1 locus conferring sensitivity to the effector SnTox3. *Front Plant Sci* 9:881.
16. Eyal Z., Scharen A.L., Prescott, J.M., Van Ginkel M. 1987. The Septoria diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, 52.
17. Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., and Friesen T.L. 2010 A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*; 107:13544–9.
18. Francki M.G., Walker E., McMullan C.J., Morris W.G. 2020. Multilocation evaluation of global wheat lines reveal multiple QTL for adult plant resistance to Septoria nodorum blotch (SNB) detected in specific environments and in response to different isolates. *Front. Plant Sci.* 11:771.
19. Fried P.M., Meister E. 1987. Inheritance of leaf and head resistance of winter wheat to *Septoria nodorum* in a diallel cross. *Phytopathology* 77:1371-1375.
20. Góral T., Arseniuk E. 2003. Reakcja linii samoklonalnych pszenżyta ozimego na porażenie grzybami z rodzaju *Fusarium*. Część I. Fuzarioza kłosów powodowana przez *F. culmorum* WG Smith [Sacc]. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 228: 117-130.
21. John E., Jacques S., Phan H.T.T., Liu L., Pereira D., Croll D. i in. 2022. Variability in an effector gene promoter of a necrotrophic fungal pathogen dictates epistasis and effector-triggered susceptibility in wheat. *PLoS Pathog* 18(1): e1010149.
22. Lin M., Corsi B., Ficke A., Tan K.C., Cockram J., Lillemo M. 2020. Genetic mapping using a wheat multi-founder population reveals a locus on chromosome 2A controlling resistance to both leaf and glume blotch caused by the necrotrophic fungal pathogen *Parastagonospora nodorum*. *Theor. Appl. Genet.* 133(3):785-808.
23. Liu Z., Faris J.D., Meinhardt S.W., Ali S., Rasmussen J.B., Friesen, T.L. 2004. Genetic and physical mapping of a gene conditioning sensitivity in wheat to a partially purified host-selective toxin produced by *Stagonospora nodorum*. *Phytopathology* 94: 1056–1060.
24. Liu Z., Zhang Z., Faris J.D., Oliver R.P., Syme R., McDonald M.C., McDonald B.A., Solomon P.S., Lu S., Shelver W.L. 2012. The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by *Stagonospora nodorum* triggers susceptibility of wheat lines harboring *Snn1*. *PLoS Pathog.* 8: e1002467.
25. Lucas J.A., Hawkins N.J., Fraaije B.A. 2015. The evolution of fungicide resistance. *Adv Appl Microbiol* 90:29-92.

26. Peever T.L., Brants A., Bergstrom G.C., Milgroom M.G. 1994. Selection for decreased sensitivity to propiconazole in experimental field populations of *Stagonospora nodorum* (syn. *Septoria nodorum*). Canadian Journal of Plant Pathology 16, 109–117.
27. Pereira D.A., McDonald B.A., Brunner P.C. 2017. Mutations in the CYP51 gene reduce DMI sensitivity in *Parastagonospora nodorum* populations in Europe and China. Pest Manag. Sci. 73, 1503–1510.
28. Pereira D., McDonald B.A., Croll D. 2020. The genetic architecture of emerging fungicide resistance in populations of a global wheat pathogen. Genome Biol. Evol. 12:2231–2244.
29. Richards J.K., Stukenbrock E.H., Carpenter J., Liu Z., Cowger C. i. in. 2019. Local adaptation drives the diversification of effectors in the fungal wheat pathogen *Parastagonospora nodorum* in the United States. PLoS Genet. 15(10):e1008223.
30. Rosielle A.A., Brown A.G.P. 1980. Selection for resistance to *Septoria nodorum* in wheat. Euphytica, 29, 337–346.
31. Rowlings J.O., Pantula S.G., Dickey D.A. 2001. Applied Regression Analysis: a research tool. Second edition. New York.
32. Ruud A.K., Dieseth J.A., Ficke A., Furuki E., Phan H.T.T., Oliver R.P., Tan K.C. 2019. Genome-wide association mapping of resistance to *Septoria nodorum* blotch in a Nordic spring wheat collection. The Plant Genome 12, 3.
33. Ruud A.K., Dieseth J.A., Lillemo M. 2018. Effects of three *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effectors on spring wheat under Norwegian field conditions. Crop Sci. 58, 159–168.
34. Ruud A.K., Lillemo M. 2018. Diseases affecting wheat: *septoria nodorum* blotch. In: Burleigh Dodds Series in Agricultural Science. Burleigh Dodds Science Publishing Limited, Cambridge, UK:109–144.
35. Shaner G., Buechley G. 1995. Epidemiology of leaf blotch on soft red winter wheat caused by *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*. Plant Disease, 79, 928–938.
36. Shankar M., Walker E., Golzar H., Loughman R., Wilson R.E., Francki M.G. 2008. Quantitative trait loci for seedling and adult plant resistance to *Stagonospora nodorum* in wheat. Phytopathology 98(8):886–893.
37. Singh B., Mehta S., Aggarwal S.K., Tiwari M., Bhuyan S.I., Bhatia S., Islam M.A. 2019. Barley, disease resistance and molecular breeding approaches. W: Wani S.H. (red.) Disease resistance in crop plants. Springer Nature, Switzerland. Pp. 261-299.
38. Tan K.-C., Oliver R.P. 2017. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi. PLoS Pathog. 13(4): e1006241.
39. Walczewski J., Arseniuk E. 2014. Proteinaceous toxins of *Stagonospora nodorum*, the causal agent of triticale leaf and glume blotch. Commun Agric Appl Biol Sci. 79(4):228-232.
40. Wicki W., Winzeler M., Schmid J.E., Stamp P., Messmer M. 1999. Inheritance of resistance to leaf and glume blotch caused By *Septoria nodorum* Berk. In winter wheat. Theor. Appl. Genet. 99: 1265-1272.
41. Wolfe M.S. 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. Ann. Rev. Phytopath. 23: 251–273.
42. Woś H., Strzembicka A. 2011. Znaczenie hodowli odpornościowej w integrowanej ochronie pszenżyta. W: Metodyka integrowanej ochrony pszenżyta ozimego i jarego. IOR — PIB Poznań: 27 — 49.