



**RADA NAUKOWA DYSZYPLINY
ROLNICTWO I OGRODNICTWO**

mgr Karol Lisiecki

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ NA TEMAT:

**REAKCJA GENOTYPÓW PSZENICY (*TRITICUM
AESTIVUM* L.) NA PATOGENY Z RODZAJU *RHIZOCTONIA***

**WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) GENOTYPE REACTION TO PATHOGENS
OF THE *RHIZOCTONIA* GENUS**

DZIEDZINA: nauki rolnicze

DYSZYPLINA: rolnictwo i ogrodnictwo

PROMOTOR

DR HAB. INŻ. GRZEGORZ LEMAŃCZYK, PROF. UCZELNI

PROMOTOR POMOCNICZY

DR INŻ. ALEKSANDER ŁUKANOWSKI

PRACOWNIA MYKOLOGII MOLEKULARNEJ, FITOPATOLOGII I
ENTOMOLOGII

KATEDRA BIOLOGII I OCHRONY ROŚLIN
WYDZIAŁ ROLNICTWA I BIOTECHNOLOGII
UNIwersytet Technologiczno-Przyrodniczy
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH W BYDGOSZCZY

BYDGOSZCZ 2021

1. WSTĘP

Uprawom roślin zbożowych zagraża wielu patogenicznych grzybów pochodzenia glebowego, powodujących rozległe straty w agrocenozach. Patogeny poprzez oddziaływanie na gospodarkę wodną i pokarmową roślin, powodują obniżenie kondycji roślin, wzmożone reakcje na stres biotyczny i wiele innych oddziaływań, co z kolei przekłada się na wielkość oraz jakość uzyskiwanego plonu. Do patogenów o wzrastającym znaczeniu należą grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*, które powodują wiele problemów w uprawach zbóż, zwłaszcza form ozimych (Guo i in. 2005, Hamada 2011, Lemańczyk i Kwaśna 2013). Do najbardziej szkodliwych należy *Rhizoctonia cerealis* (E.P. Hoeven) R.T. Moore (teleomorfa *Ceratobasidium cereale* D.I. Murray et Burpee) powodujący ostrą plamistość oczkową. Ponadto znaczne straty wśród upraw wywołuje *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (teleomorfa *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk) powodujący porażenie kielków, korzeni, łodyg różnych gatunków roślin, w tym również zbóż.

Skuteczna ochrona roślin bazuje obecnie na stosowaniu preparatów chemicznych, często w formie zaprawy, aczkolwiek preparaty te nie są w stanie w pełni zagwarantować ochrony zarówno przed *R. cerealis* jak i *R. solani* w uprawach pszenicy i innych roślin. Ponadto konwencjonalna ochrona chemiczna jest metodą nieprzyjazną środowisku jak również jest krótkotrwała ze względu na powszechne zjawisko uodparniania się mikroorganizmów na substancje czynne fungicydów. Badania wielu naukowców wskazują na potrzebę pilnego poszukiwania alternatywnych metod ochrony roślin. Główny nacisk kładzie się jednak na poszukiwanie uwarunkowań odporności pszenicy na patogeny, co umożliwiłoby otrzymanie materiału, z którego można by wyhodować odmiany charakteryzujące się mniejszą podatnością lub nawet odpornością na ostrą plamistość oczkową.

Od wielu lat bada się zagadnienia odporności roślin na patogeny, procesy wnikania patogenów, sposobów odbioru i przekazywania informacji/sygnatów o infekcji, procesów indukcji mechanizmów obronnych, ich aktywacji oraz przebiegu. Rośliny i patogeny od zawsze pozostawały w „wyścigu zbrojeń” wmyśl tzw. „modelu zygzaka”. Obie grupy organizmów dopasowują strategie ataku (patogeny) i obrony (rośliny). W toku ewolucji rośliny wypracowały wiele mechanizmów obronnych wobec patogenów oraz szkodników pasożytniczych lub żerujących na nich. Na skuteczność takiego mechanizmu nakłada się cały szereg innych indukowanych reakcji m.in. o podłożu genetycznym i biochemicznym (Liu i in. 2001, Patkowski 2008). Właściwe rozpoznanie patogenu przez roślinę w procesie infekcji jest kluczowe dla efektywnej obrony. Tak samo istotny jest niezakłócony ciąg reakcji informacyjnych oraz indukujących przeprowadzanych przez receptory roślin.

Najstarszą i zarazem najpowszechniej występującą formą odporności jest tzw. niegościnnosć (ang. nonhost). Zjawisko to wynika z istnienia specyficznych barier, które uniemożliwiają wtargnięcie patogenu do rośliny. Bariery takie mogą wynikać z budowy organu rośliny, struktury ściany komórkowej, grubej kutykuli, zawartości szkodliwych lub odstraszających związków chemicznych, niewrażliwości na działanie toksyn oraz enzymów wydzielanych przez patogeny oraz działania indukowanych mechanizmów obronnych. Patogeny na drodze ewolucji wypracowały jednak sposoby przełamania w/w barier przy użyciu szeregu mechanizmów. O patogenach takich mówimy jako o przystosowanych lub zaadaptowanych do danej rośliny (gospodarza). W odpowiedzi rośliny wytworzyły mechanizmy obronne oparte na rozpoznaniu specyficznego czynnika (efektora). Zjawisko takie nosi nazwę odporności indukowanej efektozem ETI (ang. effector triggered immunity).

Właściwe rozpoznanie elicytora, wchodzącego np. w skład ściany komórkowej bakterii lub grzyba, zapoczątkowuje szereg reakcji, które mają na celu zwalczanie patogena próbującego wtargnąć do ustroju rośliny, bądź też uniemożliwić jego dalszą ekspansję. Działanie takie opiera się m.in. na działaniu pewnych wyspecjalizowanych białek enzymatycznych znanych jako białka PR (ang. pathogenesis related).

2. CEL BADAŃ

Celem przeprowadzonych badań było przetestowanie dostępnych genotypów pszenicy pod kątem ich wrażliwości na grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*, w celu wyselekcjonowania materiału genetycznego charakteryzującego się obniżoną podatnością, który mógłby posłużyć do ewentualnej hodowli odpornościowej. Przeprowadzone badania miały również na celu scharakteryzowanie relacji roślina-patogen i rozpoznanie mechanizmów obronnych biorących udział w procesach ograniczania rozwoju patogenów. Mając na uwadze tak sformułowany cel główny za cele szczegółowe przyjęto:

- zweryfikowanie w warunkach polowych i w teście bibułowym podatności odmian pszenicy na porażenie przez *R. cerealis* i *R. solani*,
- określenie wpływu badanych mikroorganizmów na podstawowe parametry biometryczne różnych genotypów pszenicy,
- określenie występowania i aktywności wybranych markerów enzymatycznych z grupy oksydoreduktaz oraz hydrolaz w odpowiedzi na grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*,
- określenie zawartości metabolitów biologicznie aktywnych w procesach obronnych.

3. METODYKA BADAŃ

3.1. Badania wrażliwości odmian pszenicy prowadzone w warunkach polowych

W latach 2013–2014 i 2016–2017, w warunkach prowokacyjnych ze sztuczną inokulacją, przeprowadzono doświadczenie poletkowe dotyczące podatności genotypów pszenicy (203 odmiany) na porażenie przez grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*. Doświadczenie wykonano w Stacji Badawczej Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii UTP w Mochełku. Przedplon dla pszenicy był rzepak ozimy. Na mikropoletka o powierzchni 0,35 m² (0,35 × 1,0 m) wysiewano po 100 niezaprawionych ziarniaków poszczególnych odmian pszenicy i dodawano po 15 g inokulum *R. cerealis* (AG-DI) lub *R. solani* (AG-5) przygotowanego na autoklawowanym ziarnie prosa. W czasie trwania doświadczenia nie stosowano ochrony fungicydowej.

W celu otrzymania materiału inokulacyjnego do kolb Erlenmeyera naważano po 50 g ziaren prosa po czym zalewano 30 ml wody destylowanej. Następnie ziarno autoklawowano przez 60 min w 121°C. Na tak przygotowany materiał naszczepiano skrawki pożywki PDA przerośnięte grzybnią testowanych izolatów *Rhizoctonia* (*R. cerealis* AG-D podgrupa, izolat Ww 542 oraz *R. solani* AG-5, izolat Ww 11). Do badań wybrano izolaty *Rhizoctonia* odznaczające się silną wirulencją, pozyskane z podstawy źdźbeł pszenicy ozimej. Inokulum inkubowano przez 3 tygodnie w temp. 20°C do całkowitego przerośnięcia ziaren prosa grzybnią. Po 7 dniach inkubacji codziennie potrząsano kolbami w celu rozbicia większych skupisk. Tak przygotowane inokulum zostało wykorzystane zarówno w polowych badaniach prowokacyjnych jak również w badaniach wazonowych.

3.2. Badanie wrażliwości odmian pszenicy prowadzone w teście bibułowym

W teście bibułowym przebadano wrażliwość 162 odmian pszenicy. W tym celu na płytkach Petriego Anumbra (200×30 mm), wyłożonych trzema zwilżonymi (16 ml sterylnej wody) sączkami bibuły, nakładano krążki agar przerośnięte grzybnią *R. solani* lub *R. cerealis*. Na wyłożone krążki nakładano następnie podkiełkowane (3 dniowe) ziarniki pszenicy. Po upływie 10 dni dla *R. solani* i 15 dni dla *R. cerealis* rośliny oceniano pod względem występowania objawów chorobowych. Oceny dokonywano na podstawie 5-stopniowej skali bonitacyjnej (0 - brak objawów, 4 - silne porażenie). Uzyskane wyniki poddawano przeliczeniu na indeks chorobowy według przekształcenia Townsenda-Heubergera (1943).

3.3. Badania aktywności wybranych markerów odporności

W celu zbadania reakcji genotypów pszenicy założono eksperyment wazonowy. W doświadczeniu wykorzystano 5 genotypów pszenicy: *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* cv. Toras, *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. Karmadur, *Triticum aestivum* ssp. *spelta* cv. Rokosz, *Triticum sphaerococcum*, *Triticum persicum*, które stanowiły pierwszy czynnik doświadczalny. W celu ułatwienia zapisu w niniejszej pracy przyjęto skrócone nazwy gatunków, odpowiednio: *T. aestivum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. persicum*. Wymienione genotypy roślin pochodziły z kolekcji genotypów roślin Katedry Agronomii Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii UTP. Jako drugi czynnik zastosowano różne genotypy grzybów z rodzaju *Rhizoctonia* (*R. cerealis* AG-DI izolat Ww 542, *R. solani* AG-5 izolat Ww 11, *R. solani* AG-IIC, *Rhizoctonia* sp. AG-B0). Wszystkie wykorzystane w badaniach izolaty grzybów pochodziły z kolekcji patogenów Pracowni Mykologii Molekularnej, Fitopatologii i Entomologii, WRiB UTP.

Testowane rośliny uprawiano na podłożu składającym się z substratu torfowego Gramoflor Profisubstrat i piasku kwarcowego (w proporcji 4 : 1 objętościowo). Do każdej doniczki wysiewano po 20 ziaren pszenicy w 4 powtórzeniach. Wysiane ziarniki przykrywano warstwą piasku

kwarcowego, na który wykładano inokulum, po 2 g ziarna prosa przerosnięte grzybnią *Rhizoctonia*. Następnie warstwę z inokulum przykrywano podstawowym substratem glebowym. Doświadczenie prowadzono w komorze wzrostowej (fitotronie) w następujących warunkach: fotoperiod 16 : 8 (dzień/noc), promieniowanie PAR 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura 20°C w dzień i w nocy, wilgotność powietrza minimum 80%.

Rośliny od momentu wschodów codziennie liczono i oceniano pod kątem występowania ewentualnych objawów chorobowych. Po upływie 15 dni rośliny ważono i poddawano ocenie porażenia w skali 5-stopniowej. Uzyskane wyniki poddawano przeliczeniu na indeks chorobowy według przekształcenia Townsenda-Heubergera (1943). Następnie materiał roślinny zabezpieczano do dalszych analiz poprzez zamrożenie w -80°C.

3.4. Oznaczenia aktywności wybranych markerów

Materiał pochodzący z doświadczeń fitotronowych wykorzystano do oznaczenia aktywności wybranych markerów odporności. Badanymi markerami były m.in.: enzymy klasy hydrolaz biorących udział w bezpośrednim zwalczaniu patogenów (chitynaz i glukanz), enzymy z klasy oksydoreduktaz biorących udział w wybuchu oksydacyjnym oraz utrzymywaniu homeostazy redoks – dysmutaza ponadtlenkowa. Ekstrakcję białek PR prowadzono w 50 mM buforze Sorensena o pH 7,0 z dodatkiem 1 M NaCl, 1% PPVP, 1 mM EDTA i 1 mM akorbinianu sodu. Otrzymany ekstrakt traktowano jako źródło białek cytozolowych, apoplastycznych i jonowo związanych z ścianą komórkową.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) określono według metody Beauchampa i Fiodorovicha (1971), w której miarą aktywności enzymatycznej jest zdolność do hamowania fotochemicznej redukcji błękitu tetrazoliowego. Jako jednostkę aktywności przyjęto reakcję hamowania redukcji NBT w odniesieniu do próbki kontrolnej (o 50%) zgodnie z definicją zaproponowaną przez McCord i Fridorovich (1969). Aktywność enzymów określano w przeliczeniu na 1 g świeżej masy i 1 mg białka.

Aktywność chitynaz (CHI) i β -1,3-glukanaz (GLU) oznaczano zmodyfikowaną metodą Abeles (1970a,b) na podstawie reakcji Millera (1959). Wartość uwolnionych ekwiwalentów glukozy odczytywano z krzywej wzorcowej w zakresie 20–100 μg . Aktywność enzymów określano w jednostkach u (1 u = 1 nM) w przeliczeniu na 1 h, i 1 g świeżej masy lub na 1 mg białka.

Stężenie białka oznaczono za pomocą metody Bradford (1976). Jako standardu do krzywej wzorcowej użyto albuminy wołowej w stężeniu w zakresie 0–50 μg . Zawartość wolnych cukrów określano według metody DuBois (1956) zmodyfikowanej przez Bacete i in. (2017). Zawartość wolnych ekwiwalentów glukozy określano na podstawie krzywej kalibracyjnej dla glukozy w zakresie 0–40 μg . Zawartość wolnych cukrów przeliczano na g świeżej masy.

3.5. Analizy statystyczne

Otrzymane dane poddano analizie statystycznej wykonanej w MS Excel, programie Statistica 13.3 oraz R Core Team (wersja 4.0.3) z nakładką R Studio. Normalizację rozkładu danych empirycznych przeprowadzono za pomocą transformacji Boxa-Coxa. Dla wyników opisujących stopień porażenia roślin, biomasę oraz stopnia relatywnej intensywności interakcji, zarówno dla pojedynczej rośliny jak i w ujęciu całościowym, aktywności chitynaz, β -1,3-glukanaz, SOD, zawartości wolnych cukrów przeprowadzono dwuczynnikową/dwukierunkową analizę wariancji przy użyciu testu post-hoc HSD Tukeya dla poziomu istotności $p=0,05$, w celu wyznaczenia obiektów istotnie różnych, jak również istotności interakcji między czynnikami. Do obliczeń zależności pomiędzy wartościami indeksów chorobowych dla poszczególnych odmian pszenicy a testowanym patogenem oraz zależności stopnia porażenia pomiędzy poszczególnymi częściami roślin wykorzystano współczynnik korelacji liniowej r -Personna. Wielowymiarowa technika eksploracyjna składowych głównych PCA (ang. principle component analysis) została wykorzystana do wyjaśnienia wielocephowego różnicowania gatunków pszenicy w odniesieniu do każdego z badanych patogenów oraz klasyfikacji odmian pszenicy w ujęciu dwóch pierwszych składowych. W celu określenia adekwatności doboru zmiennych wejściowych do analizy czynnikowej wykonano test KMO (Kaisera-Meyera-Olkina). Wykonano analizę hierarchiczną metodą K-średnich w odniesieniu do przetestowanych genotypów pszenicy na patogeny *R. solani* AG-5 i *R. cerealis* AG-DI w doświadczeniach polowych jak i laboratoryjnych - bibułowych. Ilość wymaganych grup (klastrów)

obliczono z zastosowaniem algorytmu „Gap statistic”, „Wss” i „Silhouette”, bootstrap 1000. Znając optymalną liczbę grup wykonano grupowanie gatunków pszenicy o podobnym charakterze w układzie dwuwymiarowym według Kassambara (2017a,b).

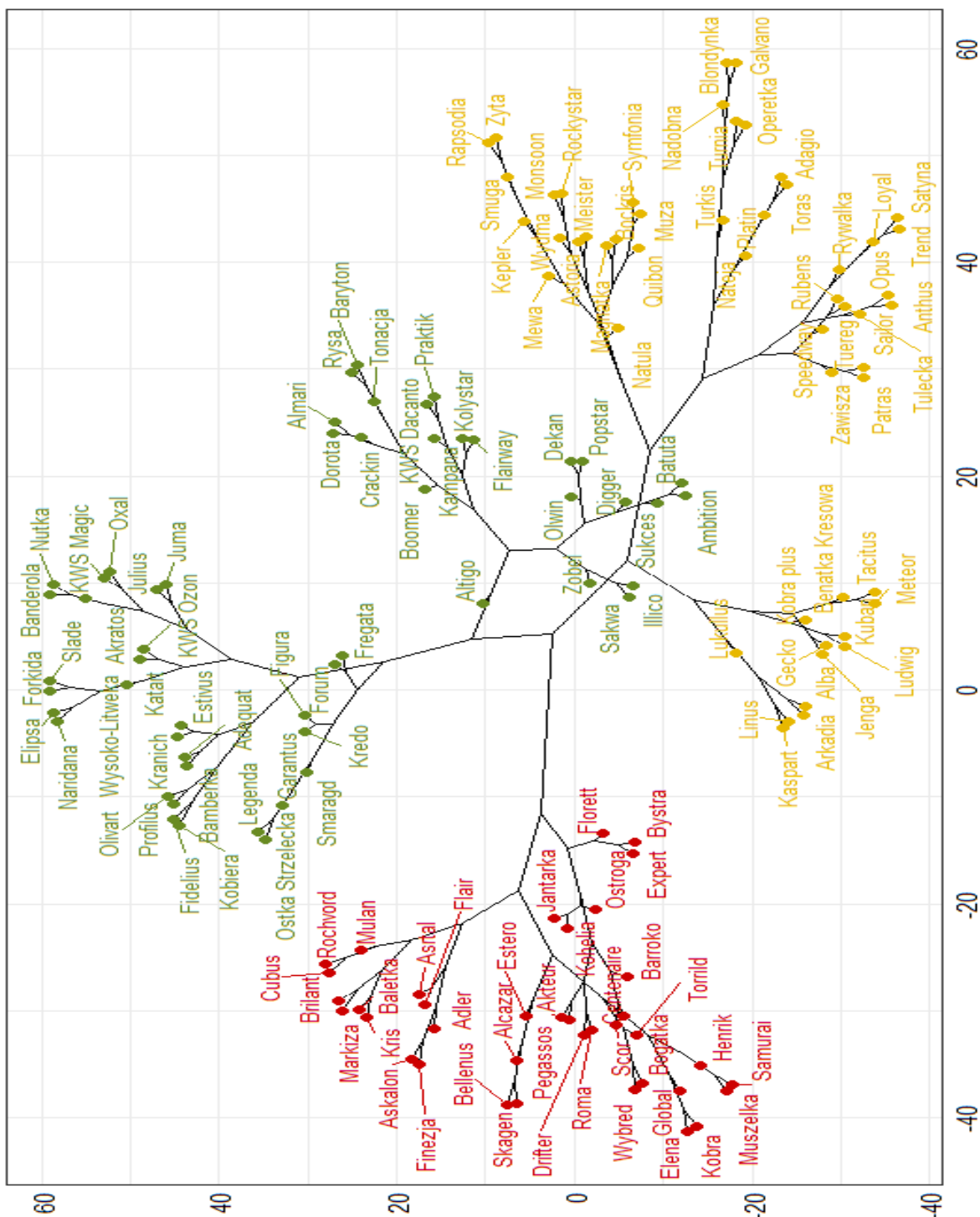
4. WYNIKI

4.1. Wrażliwość genotypów pszenicy na *Rhizoctonia* określana w warunkach polowych

W doświadczeniu polowym przeprowadzonym w warunkach prowokacyjnych obserwowano podobieństwa pod względem liczości przedziałów indeksu chorobowego (Tabela 1). 17,3% roślin nie wykazywało jakichkolwiek zmian chorobowych (DI = 0,0%) w kombinacjach z inokulacją *R. cerealis* AG-DI, z kolei dla wariantu z inokulacją *R. solani* AG-5 na 18,6% roślin nie stwierdzono objawów chorobowych. Podobnie rozkładała się liczość w przedziałach 0–5% wynosząca 32,7% dla *R. cerealis* i 30,2% dla *R. solani*. W przedziale liczości indeksu chorobowego 10–15% zdecydowanie więcej roślin porażonych było przez *R. cerealis* (17,3%), a w tym samym przedziale 6,9% genotypów porażonych zostało przez *R. solani*. Kolejne dwie klasy liczości reprezentowane były przez rośliny inokulowane *R. solani*, gdzie 9,3% z nich wykazywało porażenie w zakresie 15–20%, 2,3% w zakresie 20–25%, oraz 4,7% w zakresie 25–30%. Maksymalne odnotowane wartości indeksu chorobowego wyniosły 15% dla *R. cerealis* i 29,2% dla *R. solani*.

Tabela 1. Liczość dla indeksów chorobowych [%] obserwowana dla objawów chorobowych powodowanych przez *Rhizoctonia* w polowym doświadczeniu prowadzonym w warunkach prowokacyjnych w latach 2013–2014 oraz 2016–2017

Klasa	<i>R. cerealis</i> AG-DI	<i>R. solani</i> AG-5
$x \leq 0,0$	17,3	18,6
$0,0 < x \leq 5,0$	32,7	30,2
$5,0 < x \leq 10,0$	32,7	27,9
$10,0 < x \leq 15,0$	17,3	6,9
$15,0 < x \leq 20,0$	0,0	9,3
$20,0 < x \leq 25,0$	0,0	2,3
$25,0 < x \leq 30,0$	0,0	4,7



Rys. 1. Grupowanie hierarchiczne odmian pszenicy w testach polowych metodą K-średnich w formie drzewa filogenetycznego

Wyniki doświadczeń polowych poddano analizie wielowymiarowej w postaci grupowania hierarchicznego metodą K-średnich (Rys. 1). Testowane odmiany przyporządkowano do trzech grup różniących się pod względem podatności na *R. cerealis* AG-DI oraz *R. solani* AG-5. Grupa 1 zawiera 49 badanych odmian, z kolei grupa 2 zawiera 65 odmian oraz grupa 3, w której znajdują się 29 z badanych odmian pszenicy. W wyniku przeprowadzonej analizy określono dwa wymiary kolejno odpowiadające za 39,5% wariacji (wymiar 1) oraz 26,9% wariacji (wymiar 2).

Grupę 1 stanowiły rośliny o umiarkowanej podatności na patogeny z rodzaju *Rhizoctonia*. Dodatkowo grupa ta zlokalizowana jest dodatkowo względem wymiaru 2 oraz w dużej mierze ujemnie względem wymiaru 1. W skład wymienionej grupy wchodziły takie genotypy jak: Adagio, Alba,

Ambition, Anthus, Batuta, Benatka Kresowa, Blondynka, Bockris, Bogatka, Digger, Galvano, Gecko, Jenga, Kepler, Kuban, Loyal, Ludwig, Lukullus, Magnatka, Meteor, Mewa, Muza, Nadobna, Nateja, Olivart, Operetka, Opus, Patras, Platin, Quibon, Rapsodia, Rubens, Rywalka, Sailor, Satyna, Smuga, Speedway, Sukces, Symfonia, Tacitus, Toras, Trend, Tuereg, Tulecka, Turkis, Turnia, Wybred, Zawisza i Zyta.

Grupę roślin o najmniejszej podatności na badane patogeny zawiera klaster nr 2 zlokalizowany dodatkowo na wymiarze 1 oraz w dużej mierze ujemnie na wymiarze 2. Należą tutaj takie odmiany jak: Adequat, Akrotos, Akteur, Almari, Altigo, Arkadia, Astoria, Bamberka, Banderola, Baryton, Boomer, Bystra, Crackin, Dekan, Dorota, Drifter, Elipsa, Estivus, Fidelius, Figura, Flairway, Forkida, Forum, Fregata, Garantus, Illico, Julius, Juma, Kampana, Kaspart, Katart, Kobiera, Kobra Plus, Kohelia, Kolystar, Kranich, Kredo, KWS Dacanto, KWS Magic, KWS Ozon, Legenda, Linus, Meister, Monsoon, Naridana, Natula, Nutka, Olwin, Ostka Strzelecka, Ostroga, Oxal, Pegassos, Popstar, Praktik, Profilus, Rockystar, Roma, Rysa, Sakwa, Slade, Szmargd, Tonacja, Wydma, Wysoko-Litewka i Zobel.

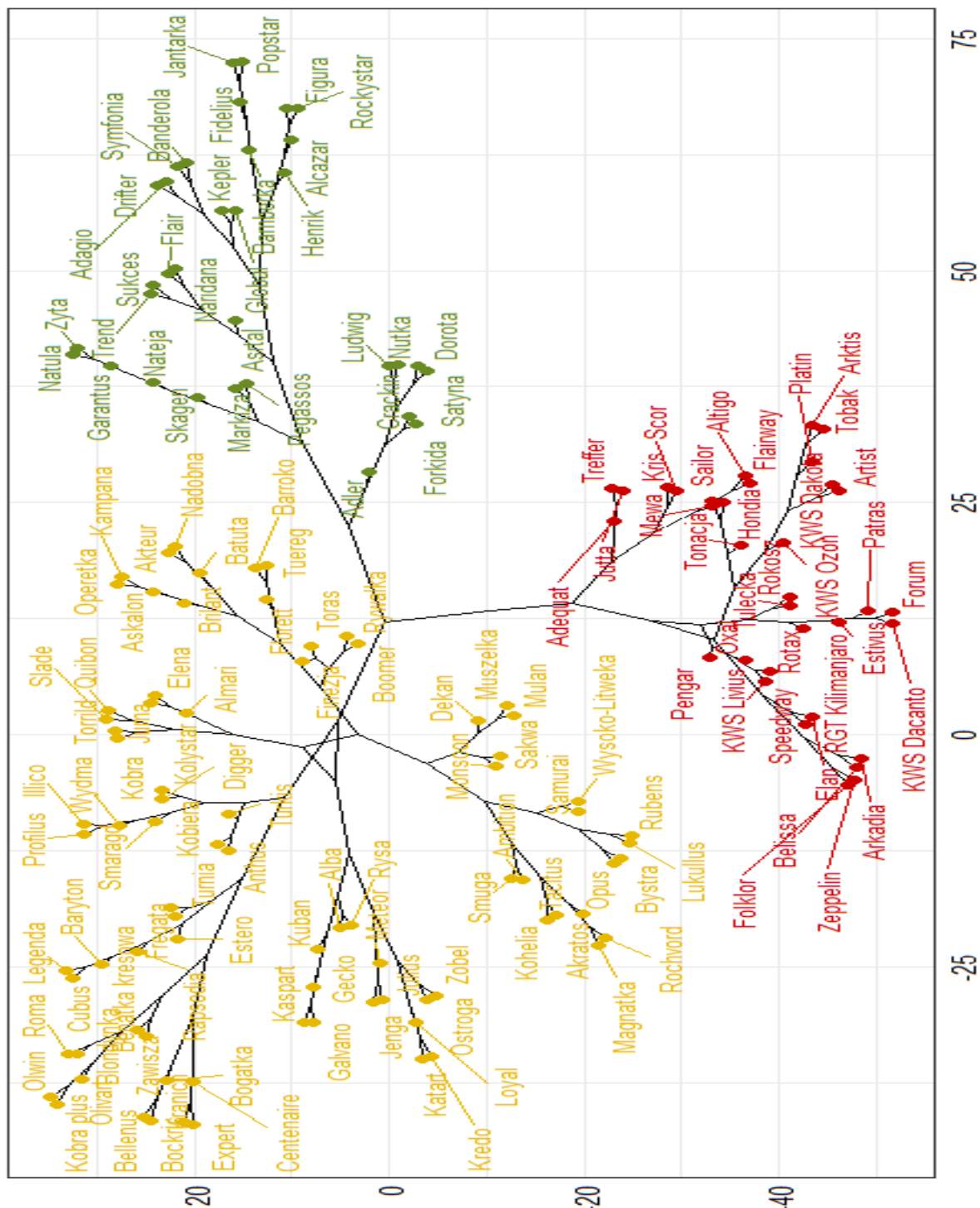
Najmniej liczną grupę (nr 3) stanowiły rośliny podatne na patogeny. Grupa zlokalizowana jest ujemnie względem obu wymiarów. Należą tutaj takie odmiany jak: Adler, Alcazar, Askalon, Asrtal, Baletka, Baroko, Bellenus, Brillant, Centenaire, Cubus, Elena, Estero, Expert, Finezja, Flair, Florett, Global, Henrik, Jantarka, Kobra, Kris, Markiza, Mulan, Muszelka, Rochvord, Samurai, Scor, Skagen, Torrild.

4.2. Wrażliwość odmian pszenicy na *Rhizoctonia* określana w teście bibułowym

Przeprowadzono testy bibułowe (Tabela 2), w których podkiełkowane ziarniaki pszenicy wystawione zostały na działanie *R. cerealis* AG-DI i *R. solani* AG-5. Następnie oceniano występowanie objawów chorobowych na korzeniach, podstawie pędu oraz liściach. Rośliny reagowały w zróżnicowanym stopniu na zastosowane patogeny.

Tabela 2. Nasilenie objawów chorobowych (DI w %) powodowanych przez *R. cerealis* AG-DI i *R. solani* AG-5 - test bibułowy

Klasa	<i>R. cerealis</i> AG-DI [%]			<i>R. solani</i> AG-5 [%]		
	korzenie	podstawa pędu	liście	korzenie	podstawa pędu	liście
$x \leq 0,0$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1
$0,0 < x \leq 10,0$	1,6	0,0	0,0	39,8	0,0	48,0
$10,0 < x \leq 20,0$	7,2	0,0	3,2	46,3	0,0	24,4
$20,0 < x \leq 30,0$	37,6	0,0	6,4	13,8	0,0	11,4
$30,0 < x \leq 40,0$	34,4	0,8	11,2	0,0	1,6	4,1
$40,0 < x \leq 50,0$	16,0	0,8	29,6	0,0	14,6	3,2
$50,0 < x \leq 60,0$	2,4	3,2	23,2	0,0	39,0	0,0
$60,0 < x \leq 70,0$	0,8	12,8	20,0	0,0	34,1	0,0
$70,0 < x \leq 80,0$	0,0	51,2	6,4	0,0	8,1	0,8
$80,0 < x \leq 90,0$	0,0	30,4	0,0	0,0	2,4	0,0
$90,0 < x \leq 100,0$	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0



Rys. 2. Grupowanie hierarchiczne odmian pszenicy w testach bibułowymi metodą K-średnich w formie drzewa filogenetycznego

Przeprowadzona wielowymiarowa analiza grupowania odmian pszenicy hierarchiczną metodą K-średnich wykazała optymalną liczbę grup na 3, przy wykorzystaniu algorytmu „Gap statistic”. Dlatego też wszystkie badane odmiany pszenicy w teście bibułowymi przyporządkowano według trzech różniących się grup. Grupowanie wykonano zarówno w ujęciu dwuwymiarowym jak i drzewa filogenetycznego (Rys. 2). Procedura grupowania skutkowało otrzymaniem trzech klastrów (grup) o licznosci kolejno: klaster 1 - 53, klaster 2 - 29 oraz klaster 3 - 67. W ramach klastru nr 1 zaobserwowano odmiany pszenicy o niskiej podatności na oba patogeny z rodzaju *Rhizoctonia*. W grupie nr 2 znalazły się odmiany roślin podatnych na badane patogeny. Trzeci klaster stanowią

rośliny o umiarkowanej podatności na wybrane patogeny. Jednocześnie klaster ten stanowi najliczniejszą grupę pod względem liczby zrzeszanych odmian.

Hierarchiczna metoda klasyfikacji odmian roślin w układzie dwuwymiarowym wykazała wariancję pierwszego wymiaru ma poziomie 40,7% oraz 20,2% dla drugiego wymiaru. Zaobserwowano, że w układzie dwuwymiarowym grupa nr 1 jest w zdecydowanej większości spolaryzowana dodatnio zarówno dla pierwszego jak i drugiego wymiaru. Grupa odmian o umiarkowanej podatności na patogeny wykazuje scentralizowany charakter, natomiast grupa roślin o charakterze podatnym na oba patogeny wykazuje ujemną polaryzację względem wymiaru nr 1 oraz dodatnią dla wymiaru nr 2.

Odmianami o najmniejszej podatności na *Rhizoctonia*, należące do klastru 1, były takie odmiany jak: Adagio, Adler, Akrotos, Akteur, Alcazar, Almari, Altigo, Asrtal, Bamberka, Banderola, Barroko, Batuta, Brilant, Crackin, Dorota, Drifter, Fidelius, Figura, Flair, Flairway, Florett, Forkida, Garantus, Henrik, Jantarka, Kampana, Kobra, Kohelia, Ludwig, Magnatka, Markiza, Mewa, Nadobna, Naridana, Nateja, Natula, Nutka, Operetka, Pegassos, Popstar, Rochvord, Rockystar, Sakwa, Satyna, Scor, Skagen, Slade, Sukces, Symfonia, Tacitus, Torrild, Trend i Zyta. Natomiast grupę 2, zrzeszającą odmiany o największej podatności na badane patogeny stanowiły takie odmiany jak: Adequat, Arkadia, Arktis, Artist, Belissa, Elan, Estivus, Folklor, Forum, Hondia, Jutta, Kris, KWS Dacanto, KWS Dakota, KWS Livius, KWS Ozon, Oxal, Patras, Pengar, Platin, RGT Kilimanjaro, Rokosz, Rotax, Sailor, Speedway, Tobak, Treffer, Tulecka i Zeppelin.

W skład klastru 3 wchodzi genotypy o umiarkowanej podatności na badane patogeny i należą tutaj takie odmiany pszenicy jak Alba, Ambition, Anthus, Askalon, Baryton, Bellenus, Benatka Kresowa, Blondynka, Bockris, Bogatka, Boomer, Bystra, Centenaire, Cubus, Dekan, Digger, Elena, Estero, Expert, Finezja, Fregata, Galvano, Gecko, Global, Illico, Jenga, Julius, Juma, Kaspert, Katart, Kepler, Kobera, Kobra Plus, Kolystar, Kranich, Kredo, Kuban, Legenda, Loyal, Lukullus, Meteor, Monsoon, Mulan, Muszelka, Olivart, Olwin, Opus, Ostroga, Profilus, Quibon, Rapsodia, Roma, Rubens, Rysa, Rywalka, Samurai, Smaragd, Smuga, Tonacja, Toras, Tuereg, Turkis, Turnia, Wydma, Wysokolitewka, Zawisza i Zobel.

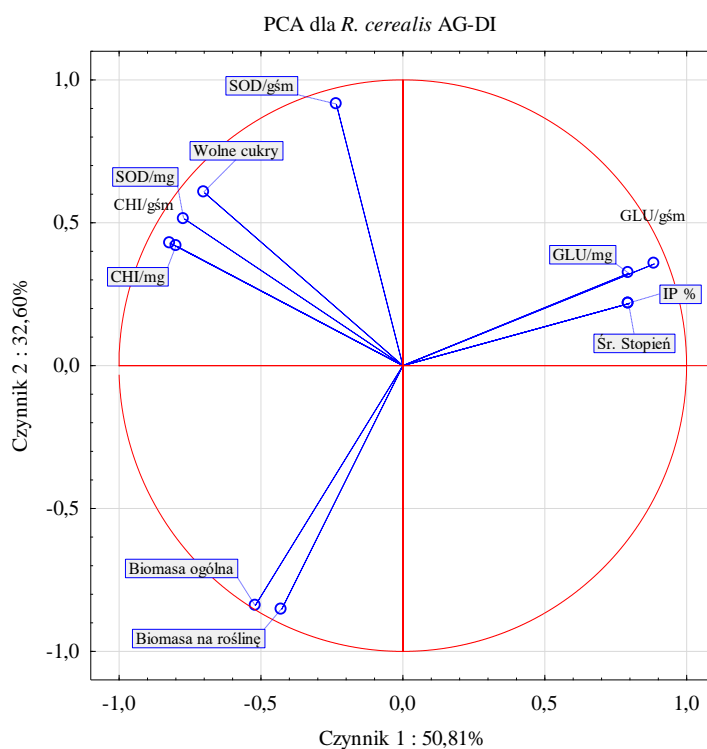
Należy ponadto nadmienić, że uzyskane wyniki hierarchizacji cech podatności odmian pozwoliły na zaobserwowanie pewnych zbieżności co do przynależności do poszczególnych klastrów roślin pochodzących z doświadczeń polowych oraz laboratoryjnych. W przypadku roślin podatnych na działanie obu patogenów zaobserwowano, że jedynie rośliny odmiany Kris, pochodzące z doświadczeń polowych jak i laboratoryjnych, znajdowały się w grupach o podobnej podatności, a tym samym lokalizacji względem wymiaru pierwszego. W przypadku grupy roślin o umiarkowanej podatności zaobserwowano zbieżność dla takich odmian jak: Alba, Ambition, Anthus, Benatka Kresowa, Blondynka, Bockris, Bogatka, Digger, Galvano, Gecko, Kepler, Kuban, Loyal, Lukullus, Meteor, Olivart, Opus, Quibon, Rapsodia, Rubens, Rywalka, Smuga, Toras, Tuereg, Turkis, Turnia, Zawisza. W przypadku trzeciej grupy roślin o najmniejszej podatności na badane patogeny zaobserwowano, że takie odmiany jak: Akrotos, Akteur, Almari, Altigo, Bamberka, Banderola, Crackin, Dorota, Drifter, Fidelius, Figura, Flairway, Forkida, Garantus, Kampana, Kohelia, Naridana, Natula, Nutka, Pegassos, Popstar, Rockystar, Sakwa i Slade wykazywały podobną lokalizację zarówno w doświadczeniach bibułowych jak i polowych, tj. oba klastry były dodatnie dla pierwszego wymiaru.

4.3. Badania relacji roślina-patogen - Analiza składowych głównych

Jedenaście zmiennych dla genotypów pszenicy uwzględniono w wielowymiarowej analizie składowych głównych (ang. principal component analysis, PCA). Zmiennym nadano symbole od x_1 do x_{11} według następującej kolejności:

- X_1 - CHI/gŚM
- X_2 - CHI/mg
- X_3 - GLU/gŚM
- X_4 - GLU/mg
- X_5 - SOD/gŚM
- X_6 - SOD/mg
- X_7 - wolne cukry/gŚM
- X_8 - indeks chorobowy (DI)
- X_9 - średni stopień porażenia
- X_{10} - g/biomasa na roślinę
- X_{11} - g/biomasa całkowita

W przeprowadzonej wielowymiarowej analizie składowych głównych dodatkowo wartości ładunków świadczyły o tym, że im większe natężenie cech tym większą rolę miał ich udział w składowej. Z kolei im wartość ładunku była mniejsza tym mniejsza jego rola w składowej. Długość wektora odpowiada wartości ładunku (min. 0,0; max. 1,0) a znak na skali (od -1 do +1) kierunkowi zależności. Im dalej dana zmienna położona jest od środka koła tym lepiej jest reprezentowana przez widoczny układ czynników.



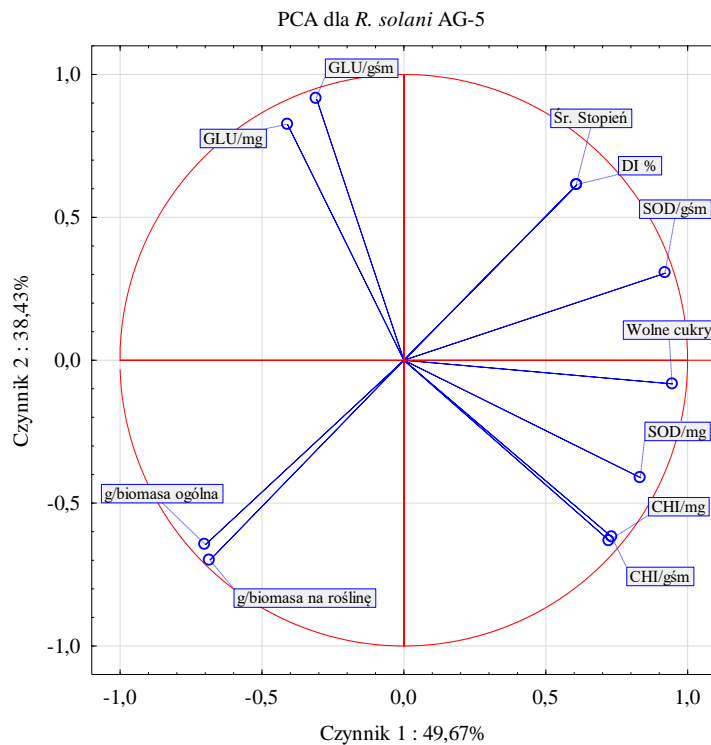
Rys. 3. Projekcja cech gatunków pszenic na płaszczyźnie składowych głównych dla porażenia przez *R. cerealis* AG-DI

PCA dla *R. cerealis* AG-DI (Rys. 3) wykazała, że pierwsza składowa, która wygenerowała 50,81% całkowitej wariancji, ma następujące ładunki dla poszczególnych cech:

$$Z_1 = -0,82 X_1 - 0,80 X_2 + 0,89 X_3 + 0,80 X_4 - 0,23 X_5 - 0,77 X_6 - 0,70 X_7 + 0,80 X_8 + 0,80 X_9 - 0,43 X_{10} - 0,52 X_{11}$$

Druga składowa, która wykazała 32,6% wariancji, ma następujące ładunki:

$$Z_2 = 0,43 X_1 + 0,42 X_2 + 0,36 X_3 + 0,32 X_4 + 0,91 X_5 + 0,51 X_6 + 0,61 X_7 + 0,22 X_8 + 0,22 X_9 - 0,85 X_{10} - 0,84 X_{11}$$



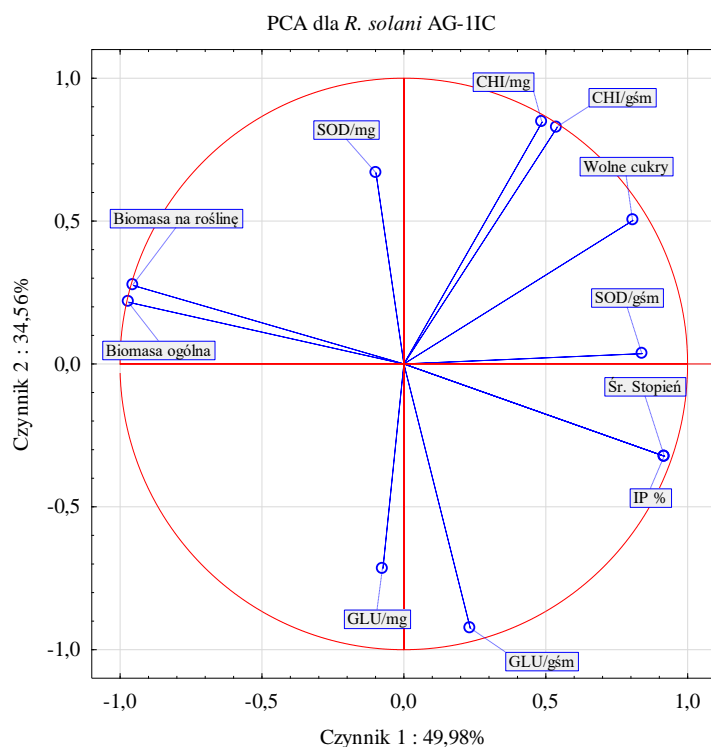
Rys. 4. Projektacja cech gatunków pszenic na płaszczyznę składowych głównych dla *R. solani* AG-5

PCA dla *R. solani* AG-5 (Rys. 4) wykazała, że pierwsza składowa Z_1 , która wygenerowała 49,76% całkowitej wariancji, ma następujące ładunki dla poszczególnych cech:

$$Z_1 = 0,73 X_1 + 0,72 X_2 - 0,31 X_3 - 0,41 X_4 + 0,92 X_5 + 0,83 X_6 + 0,95 X_7 + 0,61 X_8 + 0,61 X_9 - 0,68 X_{10} - 0,70 X_{11}$$

Druga składowa Z_2 , która wykazała 38,43% wariancji, ma następujące ładunki:

$$Z_2 = -0,62 X_1 - 0,63 X_2 + 0,91 X_3 + 0,82 X_4 + 0,30 X_5 - 0,41 X_6 - 0,08 X_7 + 0,61 X_8 + 0,61 X_9 - 0,70 X_{10} - 0,65 X_{11}$$



Rys. 5. Projektacja cech gatunków pszenicy na płaszczyznę składowych głównych dla *R. solani* AG-1IC

PCA dla *R. solani* AG-1IC (Rys. 5) wykazała, że pierwsza składowa Z_1 , która wygenerowała 49,98% całkowitej wariancji, ma następujące ładunki dla poszczególnych cech:

$$Z_1 = 0,54 X_1 + 0,49 X_2 + 0,23 X_3 - 0,07 X_4 + \mathbf{0,84} X_5 - 0,10 X_6 + \mathbf{0,81} X_7 + \mathbf{0,92} X_8 + \mathbf{0,92} X_9 - \mathbf{0,95} X_{10} - \mathbf{0,97} X_{11}$$

Druga składowa Z_2 , która wykazała 34,56% wariancji, ma następujące ładunki:

$$Z_2 = \mathbf{0,83} X_1 + \mathbf{0,85} X_2 - \mathbf{0,92} X_3 - \mathbf{0,72} X_4 + 0,04 X_5 + 0,67 X_6 + 0,50 X_7 - 0,32 X_8 - 0,32 X_9 + 0,27 X_{10} - 0,22 X_{11}$$

5. WNIOSKI

1. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń wykazano brak całkowitej odporności badanych odmian pszenicy na *R. cerealis* i *R. solani*. Oba patogeny wykazywały preferencje co do miejsca proliferacji tkanek. *R. cerealis* AG-DI infekował w silniejszym stopniu podstawę pędu natomiast *R. solani* AG-5 - korzenie.
2. W badaniach polowych i laboratoryjnych wyodrębniono grupę genotypów roślin, która charakteryzowała się wysoką jak i obniżoną podatnością na grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*. Tym samym określono pulę genotypów wykazujących preferowane cechy.
3. Najbardziej podatnym genotypem pszenicy okazała się odmiana Kris, zarówno w badaniach polowych jak i laboratoryjnych, tym samym nie wykazuje ona preferencji jako nośnik cech odporności w ewentualnej hodowli odpornościowej.
4. Najmniej podatne na porażenie okazały się takie odmiany jak: Akrotos, Akteur, Almari, Altigo, Bamberka, Banderola, Crackin, Dorota, Drifter, Fidelius, Figura, Flairway, Forkida, Garantus, Kampana, Kohelia, Naridana, Natula, Nutka, Pegassos, Popstar, Rockystar, Sakwa i Slade. Tym samym mogą one posłużyć do dalszych procesów hodowlanych jako rezerwuar cech obniżonej podatności na oba gatunki *Rhizoctonia*.
5. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy licznością obserwowanych objawów chorobowych na liściach (0,56), jak również intensywnością występowania objawów chorobowych (0,44)

- powodowanych przez *R. cerealis* i *R. solani*. Tym samym można przypuszczać o występowaniu podobnych reakcji obronnych w tych tkankach względem obu badanych patogenów.
6. Indeks interakcji roślina-mikroorganizm (RII) wykazał bardzo silny pasożytniczy charakter dla *R. solani* AG-1IC oraz silny dla *R. solani* AG-5. *R. cerealis* AG-DI charakteryzował się znacznie słabszym oddziaływaniem pasożytniczym wobec badanych roślin, dlatego też stanowił on mniejsze zagrożenie dla badanych roślin w porównaniu do obu szczepów *R. solani*.
 7. W badaniach wazonowych najmniej podatnymi genotypami na działanie *R. cerealis* AG-DI były pszenica twarda, pszenica okrągłoziałowa i pszenica zwyczajna. w przypadku obu szczepów *R. solani* najlepsze cechy oporności wykazywała tylko pszenica zwyczajna. Żaden z pozostałych genotypów nie wykazywał zadowalających cech oporności względem *R. solani*. Tym samym można stwierdzić, iż inne badane gatunki pszenic nie są dobrym źródłem odporności w hodowli odpornościowej pszenicy zwyczajnej.
 8. Najwyższą obserwowaną aktywnością chitynaz charakteryzowały się rośliny pszenicy okrągłoziałowej, aczkolwiek nie przekładała się ona na słabsze porażenie roślin przez *R. solani* czy *R. cerealis*. Najwyższą aktywnością β -1,3-glukanaz charakteryzowały się rośliny pszenicy twardej, co jednocześnie przekładało się na najslabsze porażenie roślin przez *R. cerealis*. Najwyższą aktywnością specyficzną dysmutazy ponadtlenkowej w tkankach charakteryzowały się rośliny pszenicy okrągłoziałowej oraz zwyczajnej. Jednocześnie obie pszenice lepiej radziły sobie w kontakcie z badanymi patogenami.
 9. Analiza PCA dla *R. cerealis* AG-DI wykazała dodatnie powiązanie aktywności β -1,3-glukanaz z średnim stopniem porażenia. Aczkolwiek analiza sugeruje występowanie cech oporności na składowej Z2 powiązanie z aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej, chitynaz oraz zawartością wolnych cukrów. Z kolei PCA dla *R. solani* AG-5 wykazała dodatnie, umiarkowane powiązanie aktywności enzymów z klasy, chitynaz, dysmutazy ponadtlenkowej oraz zawartością wolnych cukrów w tkankach, oraz w mniejszym stopniu z aktywnością β -1,3-glukanaz. Najsilniejsze powiązanie względem wymienionych cech zaobserwowano dla pszenicy okrągłoziałowej. Analiza dla *R. solani* AG-1IC wykazała natomiast dodatnie powiązanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej z zawartością wolnych cukrów. Najmocniej powiązane były one z pszenicą okrągłoziałową.
 10. Ekspozycja roślin na *Rhizoctonia* AG-B0 powodowała zróżnicowaną reakcję roślin pod kątem pobudzenia aktywności wybranych markerów. Zaobserwowano stymulację chitynaz w tkankach pszenicy okrągłoziałowej, której rośliny wykazywały istotnie większą aktywność. w przypadku glukanaz stymulujący efekt zaobserwowano dla roślin pszenicy orkisz. Istotnie większą zawartość cukrów zaobserwowano tylko dla pszenicy zwyczajnej. Wskazuje to na możliwość wykorzystania *Rhizoctonia* AG-B0 w biologicznej ochronie zbóż przed patogennymi gatunkami *Rhizoctonia*.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Abeles F.B., Bosshart R.P., Forrence L.E., Habig W.H. 1970a. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol.* 47: 129–134.
- 2) Abeles F.B., Forrence L.E. 1970b. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant. Physiol.* 45: 395–400.
- 3) Armas C., Ordiales R., Pugnaire F. 2004. Measuring plant interactions: a new comparative index. *Ecology* 85(10): 2682–2686.
- 4) Bacete L., Melida H., Pattathil S., Hahn M.G., Molina A., Miedes E. 2017. Characterization of plant cell wall damage-associated molecular patterns regulating immune responses [In] Shan L., He P. (eds.). 2017. *Plant Pattern Recognition Receptors: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* Springer Science + Buisness Media. USA: 13–24.
- 5) Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 279–287.
- 6) Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- 7) DuBois M., Gilles K.A. Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for the detemination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350–356.

- 8) Guo Y.X., Liu Q.H., Ng T.B., Wang H.X. 2005. Isarfelin, a peptide with antifungal and insecticidal activities from *Isaria felina*. *Peptides* 26: 2384–2391.
- 9) Hamada M.S. Yanni Y., Ma Z. 2011. Sensitivity to iprodione, difenoconazole and fludioxonil of *Rhizoctonia cerealis* isolates collected from wheat in China. *Crop Prot.* 30: 1028–1033.
- 10) Kassambara A. 2017a. Practical Guide To Cluster Analysis in R. Unsupervised Machine Learning. Edition I. STHDA.
- 11) Kassambara A. 2017b. Practical Guide to Principal Component Methods in R. Edition I. STHDA.
- 12) Lemańczyk G., Kwaśna H. 2013. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 135: 187–200.
- 13) Liu C.H., Zou W.X., Lu H., Tan R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *J. Biotechnol.* 88: 277–282.
- 14) McCord J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244: 6049–6055.
- 15) Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426–428.
- 16) Patykowski J. 2008. Rola apoplastu w interakcji roślina – patogen po infekcji pomidora przez *Botrytis cinerea*. Wyd. UŁ. Łódź.
- 17) Townsend G.R., Heuberger J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* 24: 340–343.