

**Załącznik 2**

**AUTOREFERAT**

**Przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych  
w szczególności określonych w art. 16 ust. 2 ustawy  
w języku polskim**

**dr inż. Tomasz Warzecha**

**Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie**

**Kraków 2016**

## Załącznik 2

### **Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych, w szczególności określonych w art. 16 ust. 2 ustawy w języku polskim**

**1. Imię i nazwisko** Tomasz Warzecha

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania**

**1995 - magister inżynier** - Wydział Rolniczy Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie).

Praca magisterska pt.: „Wpływ temperatury wzrostu i fazy kwitnienia roślin donorowych na efektywność kultur mikrospor rzepaku ozimego” wykonana w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa pod kierunkiem dr Hanny Kruczkowskiej

**2001 - doktor nauk rolniczych** - Wydział Rolniczy Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie).

Praca doktorska pt. „Genetyczne zróżnicowanie podatności na *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. linii DH o ziarnie nagim i oplewionym” pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Adamskiego z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

**2002 - 2005** – zatrudnienie na etacie asystenta naukowo – dydaktycznego w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydział Rolniczy Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie).

**2005 – obecnie** – zatrudnienie na stanowisku adiunkta w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydział Rolniczy Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie).

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**

**A) tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Cykl pięciu publikacji pod wspólnym tytułem:**

**Fizjologiczno-hodowlane aspekty odporności zbóż na fuzariozy**

**B) publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego:**

Autor/autorzy, data wydania, tytuł, wydawca lub czasopismo, tom, strony

**B.1.** Warzecha T., Adamski T., Kaczmarek Z., Surma M., Goliński P., Perkowski J.M., Chełkowski J., Wiśniewska H., Krystkowiak K., Kuczyńska A. 2010. Susceptibility of hulled and hulless barley doubled haploids to *Fusarium culmorum* head blight. Cereal Research Communication 38, 220–232. **IF: 0,084; punkty MNiSW: 15; cytacje: 6 (wg Web of Science: 5, dodatkowo inne źródła: 1)**

**B.2.** Warzecha T., Adamski T., Kaczmarek Z., Surma M., Chełkowski J., Wiśniewska H., Krystkowiak K., Kuczyńska A. 2011. Genotype-by-environment interaction of barley DH lines infected with *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. Field Crops Research 120: 21-30. **IF: 2,232; punkty MNiSW:40; cytacje: 9 (wg Web of Science: 7, dodatkowo inne źródła: 2)**

**B.3.** Warzecha T., Zieliński A., Skrzypek E., Wójtowicz T., Moś M. 2012. Effect of mechanical damage on vigor, physiological parameters, and susceptibility of oat (*Avena sativa*) to *Fusarium culmorum* infection. Phytoparasitica 40(1): 29-36. **IF: 0,724; punkty MNiSW:20; cytacje: 2 (wg Web of Science: 2, dodatkowo inne źródła: 0)**

**B.4.** Warzecha T., Skrzypek E., Sutkowska A. 2015. Effect of *Fusarium culmorum* infection on the selected physiological and biochemical parameters of barley (*Hordeum vulgare* L.) DH lines. Physiological and Molecular Plant Pathology 89: 62–69. **IF: 1,407; punkty MNiSW:25; cytacje: 0 (wg Web of Science: 0, dodatkowo inne źródła: 0)**

**B.5.** Warzecha T., Lundh D., Mandal A. 2011. Effect of *Fusarium culmorum* infection on survivability of a T-DNA tagged mutant of *Arabidopsis thaliana* harboring a mutation in the peptide transporter gene *At5g46050*. Biotechnologia 92(1): 77-84. **IF: - ; punkty MNiSW:13; cytacje: 1 (wg Web of Science: 0, dodatkowo inne źródła: 1)**

Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **4,653**. Suma punktów według ujednoliconego wykazu czasopism punktowanych MNiSW z dnia 31 grudnia 2015 r. wynosi **113**. Prace i oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie stanowią **załącznik 4** wniosku.

### **C) omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **Alfabetyczny wykaz zastosowanych skrótów:**

- 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
- ACR (ang. arsenate reductase) – reduktaza arsenianowa
- BC<sub>n</sub> (ang. back cross) – kolejne pokolenie krzyżowań wstecznych
- CMS (ang. cytoplasmic male sterility) – cytoplazmatyczna męska sterylność
- COBORU – Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych
- DH (ang. doubled haploids) – podwojone haploidy
- DIC – kwas 3,6-dichlorobenzoesowy
- F<sub>1</sub> – pierwsze pokolenie mieszańców
- FHB (ang. fusarium head blight) – fuzarioza kłosów
- FSB (ang. fusarium seedling blight) – fuzarioza siewek
- GISH (ang. genomic *in situ* hybridization) – genomowa hybrydyzacja *in situ*

ISSR-PCR (ang. inter simple sequence repeats-polymerase chain reaction) – polimorfizm odcinków DNA między mikrosatelitami  
KIN – 6-furfuryloaminopuryna  
NAA – kwas naftylo-1-octowy  
OWK – ogólna wartość kombinacyjna  
PCS (ang. phytochelatine synthase) – syntaza fitochelatynowa  
PIC – kwas 4-amono-3,5,6-trichloropikolinowy  
QTL (ang. quantitative trait *loci*) – *loci* cech ilościowych  
S<sub>n</sub> (ang. selfing) – kolejne pokolenie uzyskane w wyniku samozapylenia  
SSR (ang. simple sequence repeats) – proste sekwencje powtórzone  
SWK – swoista wartość kombinacyjna  
T-DNA (ang. transfer DNA) – transferowy DNA

## **Wprowadzenie i cel badań**

### ***Znaczenie fuzarioz***

Produktywność zbóż uzależniona jest od czynników genetycznych (odmianowych), agrotechnicznych, jak również od występowania chorób, w tym wywoływanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. *Fusarium culmorum* należy do grupy patogenów pszenicy, pszenżyta, jęczmienia i innych zbóż, wywołujących zgorzel siewek (FSB, ang. *fusarium seedling blight*) oraz zgniliznę korzeni (Grey i Mathre 1988, Ren i in. 2015). Gatunek ten powoduje ponadto fuzariozę kłosów (FHB, ang. *fusarium head blight*), będącą ogromnym zagrożeniem dla większości zbóż drobnoziarnistych. Poza *F. culmorum* i *F. graminearum* do kompleksu patogenów wywołujących fuzariozę kłosa zaliczyć należy *F. langsethiae*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *Microdochium nivale* i *M. majus* (Nielsen i in. 2011, 2013). W Polsce od 1998 roku w badaniach rejestrowych COBORU, określa się odporność pszenicy na fuzariozę kłosów (Behnke 1998). Fuzariozy zbóż powodują straty ilościowe plonu oraz obniżenie jakości ziarna ze względu na zmniejszenie masy i rozmiarów ziarniaka, jak również z powodu akumulacji metabolitów wtórnych, wytwarzanych przez patogeniczne gatunki *Fusarium spp.* (Berek i in. 2001, Wiśniewska i Kowalczyk 2005). Spektrum syntetyzowanych substancji zależy od gatunku grzyba porażającego ziarno. *F. culmorum* tworzy głównie deoksyniwalenol (DON) i jego pochodne: 3-acetylodeoksyniwalenol (3-AcDON) i 15-acetylodeoksyniwalenol (15-AcDON), oraz niwalenol (NIV) (Perkowski i in. 2008). Substancje syntetyzowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* posiadają działanie fito-, zoo-, cytotoksyczne i antybiotyczne. Z punktu widzenia ochrony roślin największe zainteresowanie wzbudzają związki o charakterze fitotoksycznym, do których zalicza się: antybiotyki (np. enniatyny, likomarazminę), kwasy (np. fuzariowy, dehydrofuzariowy, pikolinowy), barwniki (np. fuzarubinę, marticynę, izomarticynę, nowarubinę), mikotoksyny (np. trichoteceny, zearalenon i pochodne,

moniliforminę) (Packa 2005, Perkowski i in. 2008). Efekty działania fitotoksyn przejawiają się poprzez hamowanie kiełkowania oraz wzrostu korzeni i pędów, redukcję świeżej masy korzeni i pędów, nekrozy i chlorozy, więdnienia, obniżenie aktywności enzymów oraz zmiany w przepuszczalności błon cytoplazmatycznych (Wojciechowski i in. 1996). Toksyny fuzaryjne z grupy trichotecyn bardzo silnie oddziałują na przebieg mitozy u zbóż i bobiku, powodując obniżenie indeksu mitotycznego, wywołując zmiany w morfologii chromosomów oraz zakłócenia w rozdziale chromosomów do komórek potomnych (Packa 2005). Ponadto, blokują działanie enzymów łańcucha oddechowego, oraz łączą się z podjednostką rybosomalną komórek eukariotycznych, zatrzymując elongację łańcuchów polipeptydowych (Harvey i in. 1997). Toksyny fuzaryjne wywołują również silne efekty toksyczne u zwierząt, powodując zapalenia skóry, efekty wymiotne i brak łaknienia oraz choroby serca. Wpływają na obniżenie przyrostów masy ciała. U człowieka wywołują zespoły chorobowe zwane toksykozami o słabo jak dotąd poznanym mechanizmie. Posiadają one również właściwości immunosupresyjne (Berek i in. 2001).

Inokulum *F. culmorum* może znajdować się w zainfekowanym ziarnie lub pochodzić z gleby (Łacicowa i in. 1990, Perkowski i in. 2008). Patogen ten jest groźny również ze względu na jego dużą odporność na niekorzystne warunki klimatyczne. Jest odporny na wahania wilgotności oraz zdolny do zarodnikowania także w warunkach niskiego potencjału wodnego (Łacicowa i in. 1990). Podatność na fuzaryjną zgorzel siewek badana była w oparciu o ocenę uszkodzenia systemu korzeniowego (Miedaner 1988) lub nasilenie nekrozy liści (Grey i Mathre 1998, Arseniak 1993). Chełkowski i in. (1997) porównywali porażenie pszenicy ozimej przez *F. culmorum* i *F. avenaceum* na podstawie nekroz korzeni i liści siewek. Według tych autorów, właśnie ocena porażenia korzeni pozwala na bardziej precyzyjne oszacowanie różnic w podatności genotypów na fuzaryjną zgorzel siewek niż ocena porażenia liści. Podobne wyniki otrzymano porównując podatność na fuzaryjną zgorzel siewek wybranych polskich odmian pszenicy, pszenżyta i żyta (Arseniuk i in. 1993).

Wpływ patogena na system korzeniowy jest bardziej destrukcyjny niż na liście, co obserwowano, badając podatność jarych i ozimych odmian pszenicy inokulowanych *F. culmorum*. Uszkodzenia korzeni okazały się średnio 1,5 razy większe niż liści (Wojciechowski i in. 1997). Konsekwencje uszkodzenia systemu korzeniowego mogą być widoczne również w dalszym rozwoju rośliny ze względu na zaburzenia procesów fizjologicznych, związanych z pobieraniem i transportem wody i soli mineralnych oraz dystrybucją asymilatów.

Fuzarioza siewek i fuzarioza kłosa są odrębnymi jednostkami chorobowymi. Dane literaturowe dotyczące korelacji między tymi jednostkami chorobowymi są rozbieżne. Bruins i in. (1993), Ruckenbauer i in. (2001) oraz Gosman i in. (2005) wykazali brak istotnej korelacji między objawami fuzariozy siewek i fuzariozy kłosów, natomiast Masterhazy (1987) wykazał wysoce istotną korelację pomiędzy fuzaryjną zgorzelą siewek 101 genotypów pszenicy, a wizualną oceną porażenia kłosów.

Lemmens i in. (1994) badali również wpływ toksycznych metabolitów *F. culmorum* (głównie DON) na liczbę kiełkujących ziarniaków pszenicy i rozwój siewek. Wszystkie genotypy, których rozwój siewek był zahamowany z powodu obecności DON, były wysoce podatne na fuzariozę kłosa. Wykazano, że z pięciu genotypów najlepiej tolerujących obecność DON, trzy okazały się również bardziej odporne na fuzariozę kłosa. Tamburin-Ilincic i in. (2009), badając populację 91 linii pszenicy wykazali, brak korelacji pomiędzy oceną bonitacyjną fuzariozy siewek, fuzariozy kłosów, a zawartością DON w ziarnie. Ale jedna linia, posiadająca największą odporność na fuzariozę siewek i fuzariozę kłosów, znalazła się w grupie 10 linii o najniższej zawartości DON w ziarnie.

### ***Elementy struktury oraz jakość plonu***

Jęczmień wykazuje różny stopień podatności na fuzariozę kłosa, przejawiający się zróżnicowaną redukcją plonu i cech plonotwórczych takich jak liczba i masa ziarna z kłosa, masa 1000 ziarniaków (MTZ), celność ziarna oraz zdolność kiełkowania (Nielsen i in. 2014). Autorzy ci wykazali, że *F. culmorum* i *F. graminearum* są jednymi z najgroźniejszych patogenów wywołujących fuzariozę kłosów, zmniejszających wartość browarną jęczmienia. Ziarno zainfekowane przez *Fusarium spp.* utrudnia proces produkcji piwa przez wypienianie się piwa. Ponadto wykazano, że po sztucznej infekcji *F. culmorum* nastąpiły takie zmiany wartości browarnej ziarna, jak zwiększenie kruchości słodu, zawartości proteazy,  $\beta$ -glukanazy, zmniejszenie aktywności amylazy, zwiększenie proporcji wolnych aminokwasów i azotu rozpuszczalnego przy zmniejszeniu zawartości  $\beta$ -glukanu, czy zwiększeniu zawartości białka w stosunku do słodu uzyskanego z ziarna nieinokulowanego (Nielsen i in. 2014).

### ***Rola związków fenolowych i cukrów rozpuszczalnych w procesach odpornościowych***

Związki fenolowe występują we wszystkich roślinach i są one, lub produkty ich utleniania, uznawane za związki biorące udział w procesach odpornościowych. Według Nicholson i Hammerschmidt (1992) naturalna reakcja obronna organizmu roślinnego na

infekcję patogenem objawia się między innymi uwalnianiem związków fenolowych wchodzących w skład ścian komórkowych i ich intensywną akumulacją oraz syntezą w miejscu infekcji. Związki fenolowe działają toksycznie na patogena lub poprzez udział w lignifikacji ścian komórkowych i wytworzeniu barier strukturalnych zapobiegają wnikaniu patogena do komórek sąsiadujących z miejscem infekcji (Lattanzio i in. 2006). Proces wytworzenia mechanicznej bariery dla patogena prowadzi do ograniczenia wydzielania toksyn do komórek gospodarza oraz zahamowania pobierania składników odżywczych z rośliny (Siranidou i in. 2002). Wiele związków fenolowych występujących w roślinach ma również właściwości cząsteczek sygnałowych, jako fitoantycypiny, fitoaleksyny, modulatory patogenezы i aktywatory roślinnych genów odporności, czyli pełnią różnorodną rolę w procesach odpornościowych roślin (Dakora 1996, Nicholsson i Hammerschmidt 1992). Bakan i in. (2003) wykazali, że kwasy fenolowe efektywnie hamowały produkcję fumonizyny B1 przez *Fusarium verticillioides*, a rozpuszczalne w wodzie związki fenolowe, ekstrahowane z kukurydzy, redukowały gromadzenie trichotecen. Interesujące jest, że zahamowanie produkcji tych mikotoksyn wystąpiło przy koncentracji związków fenolowych nie powodującej ograniczenia rozwoju patogena, co sugeruje, że związki fenolowe nie miały działania fungistatycznego lecz wywołały zmianę w biosyntezie toksyn. Hamowanie syntezy DON/AcDON wytwarzanych *in vitro* przez *F. culmorum* obserwowano po zastosowaniu frakcji fenolowych ekstrahowanych z otrąb pszennych. Sugeruje to możliwą rolę kwasów fenolowych w odporności pszenicy twardej na akumulację trichotecen (Boutingny i in. 2008). Udowodniono, że u pszenicy wysoka zawartość fenoli hamuje produkcję mikotoksyn przez *Fusarium spp.* (Mpofu i in. 2006). Daje to możliwość wykorzystania tej cechy w selekcji genotypów o obniżonej zawartości trichotecen grupy B w zainfekowanych ziarniakach (Boutingny i in. 2008). Znaczenie cukrów rozpuszczalnych może być rozpatrywane w aspekcie ich wpływu bezpośredniego, jak i pośredniego na procesy odpornościowe. Roślinne patogeny grzybowe posiadają określony zakres tolerancji potencjału wodnego, niezbędnego do optymalnego wzrostu i rozwoju. Akumulacja cukrów i innych substancji osmotycznie czynnych zmniejsza potencjał wodny w komórkach gospodarza i może ograniczyć rozwój patogena (Farrar 1989). Trawy odporne na kompleks patogenów wywołujących pleśń śniegową cechowały się niską zawartością wody i wysokim stężeniem cukrów w komórkach (Yoshida i in. 1997). Cukry mogą także wpływać na ekspresję roślinnych genów odporności. Heksozy indukują ekspresję wielu genów poprzez heksokinazową transdukcję sygnału, np. poprzez aktywację genów odpowiedzialnych za produkcję peroksydazy i białek PR (ang.

patogen related) oraz mogą być źródłem prekursorów związków o charakterze obronnym (Herbers i in. 1996).

### ***Zmiany funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego podczas infekcji *Fusarium spp.****

Wydajność fotosyntezy roślin może dostarczyć przydatnych informacji o ich zdolności do walki ze stresem biotycznym, spowodowanym infekcją. Pomiar fluorescencji chlorofilu daje możliwość zbadania wpływu stresów środowiskowych na rośliny i zdolności do ich tolerowania oraz w jakim stopniu ten stres powoduje uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego (Maxwell i Johnson 2000). Stąd też produktywność roślin może być oceniana poprzez zbadanie aktywności fotosyntezy i jej elementów składowych, takich jak kinetyka fluorescencji chlorofilu *a*. Badania te dostarczają ważnych informacji o fotosystemie II (PSII), o jego fotochemicznej wydajności, a także ilości energii wzbudzonej i zatrzymanej w aktywnych centrach reakcji PSII w czasie fotosyntezy. Dodatkowo, takie pomiary dają możliwość oceny ilości pochłanianej energii świetlnej, ilości energii uwalnianej z PSII, liczby aktywnych centrów reakcji utlenionych i zredukowanych oraz energii kwantowej użytej do transportu elektronów (Baker i Rosenqvist 2004). Fotosynteza zależy od chlorofilu, którego kluczową funkcją jest pochłanianie i wykorzystywanie energii świetlnej, przez co wpływa on na skuteczność fotosyntezy. Dodatkowe wyjaśnienie funkcji molekularnej parametrów fluorescencji chlorofilu oraz ich relacji z barwnikami asymilacyjnymi może mieć potencjalną wartość dla poprawy wydajności procesu (O'Neill i in. 2006). Parametry fluorescencji chlorofilu *a* zostały wykorzystane do wykrycia nawet niewielkich różnic w aktywności aparatu fotosyntetycznego między genotypami roślin uprawnych. Co więcej, okazało się, że znaleziono istotne korelacje między plonem pszenżyta i niektórymi parametrami fluorescencji chlorofilu *a* oraz wymianą gazową liści (Hura i in. 2009).

### ***Hodowlane aspekty odporności***

Hodowla roślin wciąż poszukuje źródeł ważnych gospodarczo cech takich jak plon i jego jakość oraz odporność na stesy biotyczne i abiotyczne. Możliwość wniesienia tego typu cech stwarza krzyżowanie istniejących odmian z innymi odmianami hodowlanymi, liniami, rodami hodowlanymi czy spokrewnionymi gatunkami dzikimi, co wiąże się jednak z wprowadzeniem wielu niekorzystnych genów obniżających plon potomstwa. Krzyżowanie wypierające połączone z selekcją pozytywną cechy odporności wraz z selekcją negatywną na niekorzystne cechy wniesione przez donora odporności, bazuje na ocenie fenotypowej.



Efektywność takiego sposobu postępowania może być bardzo mała ze względu na duży modyfikujący wpływ środowiska, a także ze względu na koszty przeprowadzenia oceny na dużą skalę (Masojć 2002). Obserwuje się zróżnicowaną reakcję roślin na porażenie przez *Fusarium ssp.* co świadczy o występowaniu genetycznej zmienności podatności roślin na fuzariozy. Odporność na *Fusarium spp.* ma charakter ilościowy i jest warunkowana przez wiele genów, co znacznie utrudnia prace selekcyjne (Wiśniewska i Kowalczyk 2005). Sposobem na pokonanie powyższych trudności może być zastosowanie identyfikacji genotypowej z zastosowaniem markerów molekularnych, biochemicznych czy fizjologicznych. Daje to możliwość testowania dużej liczby genotypów w warunkach laboratoryjnych w celu wstępnej selekcji i ograniczenia inokulacji w warunkach polowych. Identyfikacja form odpornych i podatnych na fuzariozy na poziomie DNA mogłoby się przyczynić do usprawnienia hodowli jęczmienia. Prowadzone są badania mające na celu lokalizację i poznanie sekwencji DNA sprzężonych z odpornością jęczmienia między innymi na fuzariozy (Chełkowski 2003).

De la Peña i in. (1999) jako pierwsi przy użyciu markerów molekularnych podjęli próbę identyfikacji regionu QTL odpowiadającego za odporność na fuzariozy u jęczmienia. Autorzy ci zidentyfikowali u jęczmienia kilka potencjalnych regionów, które mogłyby posłużyć w dalszej analizie genetycznej i stać się narzędziem dla selekcji roślin przy użyciu markerów (MAS, ang. marker assisted selection): 1) na chromosomie 2 i 3 regiony sprzężone z odpornością na fuzariozę kłosa (FHB, ang. Fusarium head blight), 2) na chromosomie 6, dwa regiony związane z odpornością na odbarwienie ziarna, 3) na chromosomie 2 jeden region sprzężony z odpornością na fuzariozę kłosa, odbarwienie ziarna i akumulację mikotoksyny DON (deoksyniwalenolu).

Jak dotychczas pojawiło się najwięcej prac związanych z poszukiwaniem markerów DNA sprzężonych z odpornością na fuzariozy u pszenicy. Buerstmayr i in. (2009) wykazali, iż dotychczas u pszenicy pojawiły się 52 informacje na temat mapowania regionów QTL, dziewięć badań na temat wykorzystania markerów molekularnych w selekcji, oraz siedem na temat wykorzystania markerów w poszukiwaniu źródeł odporności na fuzariozę kłosów FHB. Regiony QTL związane z odpornością na FHB zostały znalezione na wszystkich chromosomach poza 7D. Część regionów QTL zidentyfikowano w niezależnych badaniach potwierdzając ich stabilność i możliwość zastosowania w hodowli roślin. Najlepiej udokumentowany gen związany z odpornością na FHB to *Fhb1*, który został zlokalizowany na chromosomie 3B i związany jest z chińskimi źródłami odporności na FHB (odmiany

Sumai 3, Ning7840, Ning 8331, oraz linie W14, Huapei 57-2, Ning 894037 czy CJ 9306). Wykorzystując sprzężone markery SSR lub selekcję fenotypową, gen *Fhb1* został wprowadzony do wielu programów hodowlanych USA, Kanady, Australii czy Niemiec (Buerstmayr i in. 2009). Markery molekularne mogłyby być dobrym narzędziem wspomagającym klasyczną hodowlę odpornościową, jednakże pomimo wielu badań dotyczących dziedziczenia odporności na FHB, poza wspomnianym powyżej, niewiele markerów wydaje się być obiecujących (Buerstmayr i in. 2009).

Testowanie odporności w warunkach polowych wiąże się z dużymi nakładami finansowymi, zmiennymi warunkami pogodowymi oraz interakcją genotypowo-środowiskową. Dlatego uzasadnione wydaje się poszukiwanie metod pozwalających na wstępną selekcję roślin. Rozwiązaniem może być określenie odporności roślin na infekcje grzybowe przy zastosowaniu laboratoryjnych testów przesiewowych dla znacznie większej liczby genotypów niż w warunkach polowych. Pomocne byłoby również znalezienie dodatkowych narzędzi selekcyjnych w postaci parametrów fizjologicznych i biochemicznych jako pośrednich metod oceny, pod warunkiem wykazania ich związku z procesami odpornościowymi oraz bezpośrednią oceną uszkodzeń roślin pod wpływem infekcji.

#### **Główne cele badawcze przedstawianego osiągnięcia naukowego to:**

1. Określenie roli plewki jako potencjalnego mechanizmu obronnego na choroby fuzaryjne
  - a) fuzariozę kłosów
  - b) fuzariozę siewek.
2. Porównanie stabilności plonowania nieinokulowanych oraz inokulowanych *Fusarium culmorum* linii DH jęczmienia w różnych środowiskach.
3. Określenie przydatności metod pośrednich (parametry fizjologiczne i biochemiczne: fluorescencja chlorofilu *a*, zawartość związków fenolowych, cukrów rozpuszczalnych oraz chlorofilu *a*, *b* i karotenoidów) do oceny podatności jęczmienia i owsa na *Fusarium culmorum*.
4. Określenie korelacji między fuzariozą siewek, a fuzariozą kłosów.
5. Oszacowanie wpływu uszkodzeń mechanicznych nagich i oplewionych ziarniaków owsa poddanych różnym obciążeniom dynamicznym podczas zbioru na podatność na fuzaryjną zgorzel siewek.
6. Weryfikacja funkcji genu *AtPTR3* w odporności *Arabidopsis thaliana* na infekcję *Fusarium culmorum*.

W badaniach wykorzystano następujące obiekty roślinne: linie podwojonych haploidów (DH, ang. *doubled haploids*) jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.), nagie i oplewione odmiany owsa (*Avena sativa* L.) oraz formy dzikie i mutanty rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.). Rośliny infekowano grzybnią oraz zarodnikami konidialnymi *Fusarium culmorum* szczepu IPO 348-01 o średniej patogeniczności wywołującego fuzariozy siewek i kłosów, udostępnionego przez Research Institute for Plant Protection w Wageningen, w Holandii.

## Wyniki badań

Wyniki badań zaprezentowane w pracach **B.1.**, **B.2.** oraz **B.4.** wykazały większą podatność linii nagich niż oplewionych na fuzariozę kłosa i fuzariozę siewek. Zjawisko to można w pewnym stopniu tłumaczyć występowaniem substancji łączącej okrywę owocownasienną z plewką i jej ochronną rolą w rozprzestrzenianiu się infekcji po zakażeniu. Wyniki sugerują większą skuteczność selekcji roślin odpornych na fuzariozę kłosa w pokoleniach segregujących osobników oplewionych niż osobników o ziarnie nieoplewionym. W pracach **B.1.**, **B.2.** oraz **B.4.** materiałem roślinnym były nagie i oplewione linie DH, linie rodzicielskie, oraz dodatkowo w pracach **B.1.** i **B.2.** pokolenia segregujące F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub> jęczmienia. W odpornościowym teście polowym zbadano podatność na infekcje *Fusarium culmorum* w różnych środowiskach. Materiałem do badań były linie rodzicielskie oraz 30 linii DH (15 oplewionych i 15 nagich) jęczmienia jarego dwurzędowego losowo wybranych z populacji mieszańca F<sub>1</sub> pomiędzy liniami hodowlanymi RK63/1 (linia oplewiona) i 1N86 (linia naga). Linia RK63/1 o ziarnie oplewionym została otrzymana w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu z mieszańców F<sub>1</sub> Roland i Kristal, natomiast forma 1N86 o ziarnie nieoplewionym jest rodem wyhodowanym w Poznańskiej Hodowli Roślin, w Tulcach. Linie DH otrzymano metodą bulbosową w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. Badane formy inokulowano szczepem *Fusarium culmorum* IPO 348-01. Materiał roślinny testowany był w trzyletnim doświadczeniu na polach doświadczalnych Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa w Prusach koło Krakowa (50°06'52"N 20°04'23"E) oraz na polach doświadczalnych Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerekwicy koło Poznania (52°31'16"N 16°41'30"E). W pracy **B.1.** i **B.2.** uwzględniono wizualne objawy porażenia kłosów, masę ziarniaków z kłosa, masę 1000 ziaren, celność ziarna (procent ziarna o średnicy >2,5 mm) oraz dodatkowo w pracy **B.1.** oznaczono zawartość niwalenolu (NIV) w ziarnie, a w pracy

**B.2.** oceniono również wpływ nasilenia infekcji patogenem na stabilność i adaptacyjność genotypów jęczmienia.

Badane linie nieoplewione charakteryzowały się znacznie większą redukcją masy ziarniaków z kłosa, masą 1000 ziarniaków oraz celnością ziarna. Nie wykazano istotnych różnic w zawartości NIV pomiędzy formą nagą i oplewioną, co może wynikać z faktu akumulacji min. 50% mikotoksyn w plewce, która była usuwana z form nagich w czasie omłotu, a pozostała u form oplewionych. Zawartość NIV w ziarnie nieoplewionym byłaby prawdopodobnie większa gdyby uwzględniono również plewkę. Zdolność roślin do akumulacji mikotoksyn jest rozpatrywana jako jedna ze składowych odporności na fuzariozę kłosa, stąd też można wysnuć wniosek, że formy nieoplewione są bardziej podatne niż formy oplewione. Formy te charakteryzowały się również większą redukcją cech plonotwórczych (masa ziarniaków z kłosa, masa 1000 ziaren, procent ziarna o średnicy >2,5 mm i >2,2 mm). W pokoleniach F<sub>2</sub> i F<sub>3</sub> występowały formy nagie i oplewione. Ponieważ cecha braku plewki jest kontrolowana przez pojedynczy gen recesywny, w pokoleniach tych dominowały formy oplewione. Prawdopodobnie z tego powodu średnie wartości badanych cech dla tych pokoleń były zbliżone do średniej dla rodzica oplewionego.

W badaniach zaobserwowano wąski zakres zmienności porażenia linii DH w porównaniu do dość dużego zakresu zawartości NIV oraz redukcji cech plonotwórczych. Pomimo tego, wykazano istotną korelację pomiędzy objawami infekcji kłosa, a redukcją liczby ziaren z kłosa, masą 1000 ziarniaków oraz celnością ziarna. Nie odnotowano korelacji między stopniem porażenia, a zawartością NIV. W badanym materiale roślinnym zaobserwowano duże różnice w zawartości NIV oraz redukcję cech plonotwórczych, co sugeruje możliwość wyselekcjonowania genotypów o obniżonej podatności na fuzariozę kłosa i akumulujących niewielkie ilości NIV. Dwie linie spośród trzydziestu (R63N/9 oraz R63N/61) charakteryzowały się mniejszą redukcją cech plonotwórczych niż bardziej odporna forma rodzicielska RK63/1. Dodatkowo linie te akumulowały istotnie mniejszą ilość NIV, co świadczyć może o ich mniejszej podatności na fuzariozę kłosów. Jedna linia wśród trzydziestu badanych (R63N/9) zasługuje na uwagę, ponieważ wykazuje najmniejszy spadek liczby ziarna z kłosa we wszystkich badanych 6 środowiskach (2 lokalizacje, w każdej 3 lata badań). Trzy wspomniane powyżej linie są liniami oplewionymi.

Nie zaobserwowano zjawiska transgresji w odporności na fuzariozę kłosa wśród linii nieoplewionych. Co prawda w zestawie linii oplewionych jak i nieoplewionych wystąpił

jeden genotyp akumulujący mniejszą ilość NIV, ale u tych linii nie zaobserwowano jednocześnie mniejszej redukcji cech plonotwórczych.

Odporność roślin na *Fusarium spp.* jest cechą ilościową w znacznym stopniu determinowaną przez środowisko. Dlatego też kolejnym zagadnieniem badawczym opisanym w pracy **B.2.** było porównanie stabilności plonowania nieinokulowanych oraz inokulowanych linii DH jęczmienia przez *Fusarium culmorum*.

Bazując na efekcie głównym, określającym wpływ jednego czynnika niezależnego, jakim jest genotyp, na kształtowanie się zmiennych zależnych takich jak, elementy struktury plonu wskazano najlepsze genotypy (z największym pozytywnym istotnym efektem głównym) w kombinacji kontrolnej. Genotypy te cechowały się również wysokim i istotnym efektem głównym po inokulacji. Trzy linie DH (R63N/1, R63N/21 i R63N/61) spośród 32 badanych charakteryzowały się pozytywnym oraz istotnym efektem głównym genotypowym dla wszystkich analizowanych cech zarówno w kombinacji kontrolnej jak i inokulowanej. Liczba stabilnych genotypów różniła się w zależności od analizowanej cechy oraz traktowania (kontrola i inokulacja). Opierając się na interakcji genotypowo-środowiskowej, największy procent stabilnych linii, zarówno dla roślin kontrolnych jak i inokulowanych, znaleziono dla masy ziarna z kłosa (odpowiednio 67,6% i 47,0%), a najmniejszą dla masy 1000 ziaren (odpowiednio 38,2% i 23,5%). Liczba niestabilnych genotypów była większa w grupie roślin inokulowanych niż w grupie kontrolnej.

Inokulowane genotypy rosnące w warunkach deficytu wody uległy większemu różnicowaniu pod względem analizowanych cech plonotwórczych, niż genotypy nieinokulowane. Można to tłumaczyć występującą interakcją pomiędzy podatnością roślin na fuzariozę kłosa a odpornością na suszę, gdyż w latach 2003 i 2005 opady atmosferyczne w czerwcu były ekstremalnie niskie (odpowiednio 37 mm i 19 mm).

Zainfekowane genotypy silniej reagowały na zmianę warunków środowiska – liczba niestabilnych genotypów pod względem każdej z analizowanych cech plonotwórczych była wyższa niż w grupie kontrolnej. Linie bardziej podatne na infekcje są bowiem w większym stopniu narażone na środowiskowe czynniki abiotyczne niż linie odporne, co znalazło swoje odbicie w braku ich stabilności i występowaniu interakcji genotypowo-środowiskowej. Niektóre linie, zwłaszcza w grupie niżej plonujących (z ujemnym efektem głównym), po inokulacji cechowały się lepszym genotypowym efektem głównym jak np. linia R63N/43 z wyższymi wartościami masy 1000 ziarniaków i masy ziaren z kłosa. Dowodzi to, że redukcja

cech plonotwórczych wywołana infekcją była relatywnie mała i genotypy takie można uznać za bardziej odporne na fuzariozę kłosa.

Zastosowane metody statystyczne pozwoliły na wyodrębnienie jednej linii (R63N/1) z 32 badanych z wysokim dodatnim efektem głównym dla wszystkich badanych cech, oraz stabilnej w kombinacji kontrolnej i inokulowanej. Linia ta najwyżej plonowała w różnych warunkach środowiskowych oraz charakteryzowała się największą odpornością na infekcję *Fusarium culmorum* spośród badanych genotypów.

W pracy **B.2.** wykazano, że infekcja *F. culmorum* zmieniała reakcje linii DH jęczmienia na zmianę warunków środowiska. Większość linii stabilnych straciła swoją stabilność w konsekwencji infekcji patogenem. Odchylenia od regresji w grupie inokulowanej były wyższe i istotne w porównaniu do grupy kontrolnej. Dowodzi to, że reakcja inokulowanych linii na zmieniające się warunki środowiska nie była liniowa, a ich odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska nie była przewidywalna. Na uwagę zasługują wykorzystane w pracy metody analizy statystycznej. Ocena efektów głównych w grupie linii kontrolnych oraz inokulowanych, połączona z analizą regresji interakcji genotypowo-środowiskowej dla średnich ze wszystkich środowisk, pozwoliła na wyodrębnienie linii, które były jednocześnie bardziej odporne na chorobę oraz stabilne w różnych warunkach środowiskowych.

Badanie odporności w warunkach polowych wiąże się z dużymi trudnościami związanymi z nakładami finansowymi, zmiennymi warunkami pogodowymi oraz interakcją genotypowo-środowiskową, co wykazano w pracy **B.2.** Rozwiązaniem tego problemu może być określenie odporności roślin na infekcje grzybowe przy zastosowaniu laboratoryjnych testów przesiewowych dla znacznie większej liczby genotypów niż w warunkach polowych. Pomocne byłoby również znalezienie dodatkowych narzędzi selekcyjnych w postaci parametrów biochemicznych, pod warunkiem wykazania ich związku z procesami odpornościowymi. Zbadano wpływ infekcji *F. culmorum* na zmiany parametrów biochemicznych i fizjologicznych nagich i oplewionych odmian owsa oraz nagich i oplewionych linii DH jęczmienia, aby określić zależność między tymi parametrami a procesami odpornościowymi (**B.3.**, **B.4.**). W obu pracach badano podatność roślin na fuzariozę siewek z wykorzystaniem metod bezpośrednich (indeks patogeniczności – DR, ang. *disease rate*, redukcja świeżej masy siewek) oraz metod pośrednich (parametry fizjologiczne i biochemiczne: fluorescencja chlorofilu, zawartość związków fenolowych, cukrów rozpuszczalnych oraz chlorofilu *a*, *b* i karotenoidów). Zarówno nieoplewione linie DH

jęczmienia jak i nieoplewione odmiany owsa cechowały się większą podatnością na fuzariozę siewek.

Linie oplewione wykazały mniejszą podatność na infekcję *F. culmorum* korzeni (DR - 58,1%) w stosunku do nieoplewionych (DR - 75,9%). Podobne tendencje zaobserwowano dla średniej świeżej masy siewek (linie oplewione - 33,5 mg, linie nieoplewione - 15,9 mg). Infekcja wywołała wzrost zawartości związków fenolowych w korzeniach, zwłaszcza w większości genotypów nieoplewionych, przy znacznym spadku zawartości cukrów rozpuszczalnych w porównaniu z niezakażonymi roślinami. Pod wpływem infekcji doszło do zmniejszenia syntezy barwników oraz obniżenia ogólnej wydajności fotosystemu PSII (PI). Dodatkowo współczynniki korelacji wystąpiły między oceną porażania korzeni (DR) a zawartością związków fenolowych w liściach, cukrów rozpuszczalnych w korzeniach, jak i między świeżą masą korzeni, a zawartością chlorofilu *a*, *b*, karotenoidów i PI. Istotna dodatnia korelacja pomiędzy wyższą zawartością chlorofilu *a*, *b*, karotenoidów i PI, a mniejszą redukcją świeżej masy korzeni po zakażeniu, wskazuje na większą odporność badanych genotypów. Ujemne współczynniki korelacji między DR korzeni, a zawartością cukrów rozpuszczalnych w liściach, zawartością chlorofilu *a*, *b*, karotenoidów, oraz maksymalną wydajnością fotochemiczną PSII (Fv/Fm) sugerują, że genotypy są mniej odporne.

Wykazanie w pracach **B.3.** i **B.4.** istnienia korelacji pomiędzy parametrami fizjologicznymi i biochemicznymi a parametrami bezpośrednimi, stwarza możliwość stosowania parametrów fizjologicznych i biochemicznych jako markerów odporności na fuzariozę siewek. Istotne znaczenie ma również określenie zależności pomiędzy fuzariozą siewek a fuzariozą kłosów, gdyż ocena bezpośrednia prowadzona w stadium siewki nie zawsze pokrywa się z oceną prowadzoną w fazie kwitnienia. Stąd też, dodatkowe parametry np. w postaci molekularnych wskaźników odporności mogą przyczynić się do szybszego postępu w selekcji. Wyniki przedstawione w pracy **B.4.** dowodzą, że najmniej podatna na fuzariozę siewek okazała się linia R63N/9 (DR 43,7%), ale w grupie tej znalazły się też linie R63N/4 (DR 49,2%), R63N/21 (DR 49,5%) oraz linia R63N/1 (DR 51,5%). Potwierdzeniem tych wyników jest również wysoka średnia masa korzeni wymienionych linii, co świadczy o stosunkowo niewielkim zniszczeniu systemu korzeniowego przez patogena. Jak wykazano w pracy **B.2.** linia R63N/1 okazała się najbardziej odporna również na fuzariozę kłosa, cechując się najwyższymi wartościami cech plonotwórczych, ponadto linia ta była stabilna w różnych warunkach środowiskowych. Wynik ten przemawia za możliwością wykorzystania

laboratoryjnych testów przesiewowych na dużym materiale roślinnym, w celu wstępnej selekcji genotypów o podwyższonej odporności również na fuzariozę kłosów.

W pracy **B.3.** analizowano wpływ uszkodzeń mechanicznych ziarników owsa, poddanych różnym obciążeniom dynamicznym podczas zbioru, na podatność na fuzaryjną zgorzel siewek. W przeprowadzonych badaniach analizowano również wpływ infekcji na wybrane parametry biochemiczne, takie jak zawartość barwników fotosyntetycznie czynnych (chlorofil *a*, *b*, karotenoidy), związków fenolowych i cukrów rozpuszczalnych. W tym celu ziarniki owsa odmian nagich i oplewionych poddanych różnym prędkościom omłotu zakażono *Fusarium culmorum*.

U ośmiu odmian owsa nagoziarnistego oraz dwóch odmian oplewionych zebranych przy wilgotności 15% oznaczono wigor (procent normalnie wykształconych siewek po 10 dniach kiełkowania w kiełkowniku Szmała) oraz wybrane parametry biochemiczne. Owies poddany był omłotowi przy dwóch prędkościach obrotowych zespołu młócającego:  $1,6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  i  $2,4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , a następnie zainfekowany szczepem IPO 348-01 *F. culmorum*. Przeprowadzono ocenę mikrouszkodzeń ziarników nieoplewionych odmian w oparciu o komputerową analizę obrazu. Zdolność kiełkowania oceniono zgodnie z metodyką ISTA (2010) dla prób liczących po 100 ziarników w trzech powtórzeniach. Ziarniki następnie poddano laboratoryjnemu testowi odpornościowemu, w którym oznaczono porażenie siewek oraz redukcję ich świeżej masy jako bezpośrednie parametry związane z infekcją.

Zastosowanie wyższych obrotów przyczyniło się u nagoziarnistych odmian do wzrostu uszkodzeń mechanicznych, a w konsekwencji obniżenia zdolności kiełkowania i wigoru odpowiednio o 8 i 16 %. Zawartość chlorofilu *a* i *b*, a także karotenoidów uległa istotnej redukcji powyżej 64 % u odmian nagoziarnistych po zastosowaniu obrotów  $2,4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Infekcja patogenem wywoływała dwukrotny wzrost zawartości węglowodanów w korzeniach przy prędkości omłotu  $1,6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  oraz nieznaczny wzrost przy prędkości obrotów  $2,4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Zawartość związków fenolowych u obu botanicznych form owsa była dwukrotnie wyższa po inokulacji przy obu prędkościach omłotu. Powierzchnia mikrouszkodzeń oraz redukcja świeżej masy korzeni była istotnie skorelowana z parametrami biochemicznymi, co wykazano również w pracy **B.3.** Mniejsza powierzchnia mikrouszkodzeń i mniejsza redukcja świeżej masy siewek jest skorelowana z wyższymi wartościami parametrów biochemicznych, co potwierdza mniejszą podatność siewek na infekcję patogenem. Na podstawie wigoru ziarników i wybranych wskaźników biochemicznych można przewidywać stopień



podatności owsa na fuzaryjną zgorzel siewek podobnie jak w przypadku linii DH jęczmienia, co wykazano w pracach **B.3. i B.4.**

Próba wyjaśnienia molekularnych podstaw odporności roślin na infekcję jest praca **B.5.** Do identyfikacji i izolacji genów, które mogą być zaangażowane w tolerancję roślin na stresy biotyczne wykorzystano mutanty rośliny modelowej *A. thaliana* wygenerowane z zastosowaniem transformacji wykorzystującej T-DNA. Dowiedziono, że mutant *A. thaliana* (linia TAG\_009) wykazuje większą podatność na urazy mechaniczne i porażenie *Erwinia carotovora* oraz *Pseudomonas syringa* (Karim i in. 2005 i 2007). Sklonowano gen mutanta insercyjnego T-DNA, *At5g46050* (*AtPTR3*) pochodzący z *A. thaliana*, opierając się na charakterystyce funkcji tego genu przez Karim (2007), który postulował, że gen ten koduje białko, będące częścią systemu transportowego wymaganego do rozwoju mechanizmu odporności na stres biotyczny. Z tego powodu obiektem badań w tej pracy była roślina modelowa *A. thaliana*. Celem pracy było sprawdzenie, czy mechanizm ten jest uniwersalny dla innych patogenów i weryfikacja funkcji genu *AtPTR3* (*At5g46050*) w odporności *A. thaliana* na infekcję *F. culmorum*. Przez wstawienie fragmentu DNA o znanej sekwencji do genomu roślinnego można wywołać mutacje typu „knock-out” w konkretnym genie. Mutacja taka może skutkować otrzymaniem rośliny o konkretnym fenotypie. Publikacja **B.5.** przedstawia testowanie insercyjnych mutantów T-DNA *A. thaliana* na stres biotyczny wywołany infekcją *F. culmorum*. Rośliny mutantów insercyjnych TAG\_009, SALK\_003119 i SALK\_145209, dwa dzikie ekotypy: WT\_C24 i WT\_Col-0 oraz mutant TAG\_197-6 eksponowano na infekcję *F. culmorum*. Mutant SALK\_003119 zawiera insercję mutacyjną prawie identyczną do znajdującej się w linii TAG\_009 (gen *At5g46050*), podczas gdy SALK\_145209 posiada mutację identyczną do znajdującej się w linii TAG\_197-6 (gen *At4g20010*).

Stopień porażania liści roślin mutanta TAG\_009 wyrażony w skali 0 - 5 stopniowej było większe niż dzikiego typu WT\_C24 (odpowiednio 4,37 i 3,93), jednak różnica ta była nieistotna statystycznie. Istotne różnice w porażeniu zaobserwowano pomiędzy mutantem SALK\_003119, a dzikim typem WT\_Col-0 (odpowiednio 4,20 i 3,43). Wskaźnik śmiertelności roślin mutanta TAG\_009 był znacznie wyższy niż dzikiego typu WT\_C24 (odpowiednio 85,24% i 46,67%). Wyniki te potwierdziły poprzednie obserwacje, że mutant TAG\_009 oraz mutant SALK\_003119 są bardziej podatne na infekcję. Praca **B.5.** wykazuje, że mutacja genu dla peptydu transportującego *At5g46050* wpłynęła również na obniżenie odporności na patogena grzybowego *F. culmorum*. Wyniki badań potwierdziły zatem rolę

genu *At5G46050* w kaskadzie reakcji prowadzących do zwiększenia podatności na kolejny biotyczny czynnik stresowy jakim jest *F. culmorum*. Wyniki badań potwierdzają wyżej wymienioną funkcję genu *At5g46050*. Gen ten występuje również jako homolog u jęczmienia *HvPTR1* i wykazuje tkankowo specyficzną ekspresję w nasionach. Aktywność transportowa genu *HvPTR1* jest regulowana poprzez fosforylację w odpowiedzi na zwiększający się poziom aminokwasów w kiełkujących ziarniakach. Aktywne dwu-/trzypeptydowe związki transportowe były również znalezione u *Nepenthes sp.* (dzbanecznika) (*NaNTRI*), *Vicia faba* (bobiku) (*VfPTR1*) i *Hakea actites* (*HaPTR4*) (Zhao i in. 2010). Wykazano, że u jęczmienia gen *HvPTR1* koduje glikoproteinę, której aktywność jest regulowana post-translacyjnie poprzez fosforylację w odpowiedzi na rosnący poziom aminokwasów pochodzących z bielma jako wynik rozkładu białek zapasowych oraz ich migracji do zarodka (Waterworth i in. 2005)

W przyszłości planowane jest przetestowanie wpływu wyciszenia bądź zablokowania ekspresji homologicznego genu *HvPTR1* na podatność jęczmienia na *F. culmorum*, co wymagać będzie wygenerowania odpowiedniego mutantu tego gatunku.

## **Wnioski**

1. Nieoplewione linie DH jęczmienia są bardziej podatne zarówno na fuzariozę siewek jak i fuzariozę kłosa niż linie oplewione.
2. Zjawisko transgresji w odporności na fuzariozę kłosa występuje tylko wśród linii oplewionych jęczmienia (dwie oplewione linie jęczmienia charakteryzowały się mniejszą redukcją cech plonotwórczych oraz akumulowały istotnie mniejszą ilość niwalenolu niż odporniejsza oplewiona forma rodzicielska). Wskazuje to na trudności przeprowadzenia skutecznej selekcji roślin odpornych na fuzariozę kłosa w populacjach linii DH wśród osobników o ziarnie nieoplewionym.
3. Większość nieinokulowanych linii DH, wykazujących w zmiennych warunkach środowiska stabilność pod względem plonowania, w wyniku inokulacji utraciła swoją stabilność.
4. Analiza doświadczeń wielokrotnych z liniami DH, uwzględniająca badanie interakcji genotypowo-środowiskowej, umożliwi wyróżnienie linii najbardziej odpornych na fuzariozę kłosa, a także pozwala na uzyskanie informacji o zachowaniu się tych linii w różnych środowiskach (główne czynniki różnicujące to temperatura i opady w czasie infekcji) poprzez ocenę ich stabilności i zdolności adaptacyjnej.
5. Infekcja jęczmienia przez *F. culmorum* wywołuje wzrost zawartości związków fenolowych w korzeniach, zwłaszcza w większości genotypów nieoplewionych, przy znacznym spadku

zawartości cukrów rozpuszczalnych w liściach, zawartości barwników oraz obniżenia ogólnej wydajność fotosystemu PSII (PI) w porównaniu z niezakażonymi roślinami.

6. Istotna korelacja pomiędzy wybranymi parametrami pośrednimi (parametry biochemiczne oraz fluorescencji chlorofilu), a redukcją świeżej masy korzeni po inokulacji i DR korzeni, stwarza możliwość zastosowania tych parametrów w selekcji genotypów jęczmienia o podwyższonej odporności na infekcje *F. culmorum*.

7. Infekcja patogenem wywołuje wzrost zawartości związków fenolowych oraz spadek zawartości cukrów rozpuszczalnych w korzeniach obu botanicznych form owsa.

8. Na podstawie wigoru i wybranych wskaźników biochemicznych można przewidywać stopień podatności owsa na fuzaryjną zgorzel siewek.

9. Uszkodzenia mechaniczne ziarniaków mają istotny wpływ na wzrost podatności owsa na infekcje *F. culmorum* i nasilenie objawów fuzariozy siewek.

10. Mutacja w genie *AtPTR3* u *A. thaliana* prowadzi do zwiększenia podatności na biotyczny czynnik stresowy jakim jest infekcja *F. culmorum*.

## Literatura

Arseniuk E., Góral T., Czembor H.J. 1993. Reaction of triticale, wheat, and rye accessions to graminaceous *Fusarium* spp. infection at the seedling and adult plant growth stages. *Euphytica* 70: 175–183.

Bakan B., Bily A. C., Melcion D., Cahagnier B., Regnault-Roger C., Philogene B. J. R. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2826–2831.

Baker N.R., Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55, 1607–1621.

Behnke M. 1998. Syntezy wyników doświadczeń odmianowych. COBORU.

Berek L., Petri I. B., Masterhazy A., Teren J., Molnar J. 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicology in Vitro* 15: 25–30.

Boutigny A.L., Richard-Forget F., Barreau Ch. 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium trichothecenes*. *European Journal of Plant Pathology* 121: 411–423.

- Bruins M.B.M., Karsai I., Schepers J., Snijders C.H.A. 1993. Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for Fusarium head blight resistance. *Plant Science* 94: 195–206.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J.A. 2000. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 129: 1–26.
- Chełkowski J., Tyrka M., Sobkiewicz A. 2003. Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular marker. *Journal of Applied Genetics* 44(3): 291–309.
- De la Peña R.C., Smith K., Capettini F., Muehlbauer G.J., Gallo-Meagher M., Dill-Macky R., Somers D.A., Rasmusson D.C. 1999. Quantitative trait loci associated with resistance to Fusarium head blight and kernel discoloration in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 561–569.
- Gosman N., Chandler E., Thomsett M., Draeger R., Nicholson P. 2005. Analysis of the relationship between parameters of resistance to Fusarium head blight and *in vitro* tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609H. *European Journal of Plant Pathology* 111: 57–66.
- Grey W., Mathre D.E. 1988. Evaluation of spring barley for reaction to Fusarium culmorum seedling blight and root rot. *Canadian Journal of Plant Science* 68: 23–30.
- Harvey R.B., Kubena L.F., Rottinghaus G.E., Turk J.R., Buckley S.A. 1997. Effects of fumonisin and moniliformin from culture materials to growing swine. *Cereal Research Communication* 25: 415–417.
- Herbers K., Meuwley P., Frommer W.B., Metraux J.P., Sonnewald U. 1996. Systemic acquired resistance mediated by ecotopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793–803.
- Hura T., Hura K., Grzesiak M.T. 2009. The usefulness of chlorophyll fluorescence parameters in harvest prediction in 10 genotypes of winter triticale under optimal growth conditions. *Plant Biosystems* 143: 496–503.
- Karim S., Holmström K.O., Mandal A., Dahl P., Homann S., Brade, G., Palva E.T. Pirhonen M. 2007. AtPTR3, a wound-induced peptide transporter needed for defense against virulent bacterial pathogens in *Arabidopsis*. *Planta* 225:1431–1445.
- Karim S., Lundh D., Holmström K.O., Mandal A. Pirhonen M. 2005. Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress-induced peptide transporter of *Arabidopsis*. *Journal of Molecular Modeling* 11: 226–236.
- Łacicowa B., Kiecana I., Piętka D. 1990. Choroby podsuszkowe jęczmienia jarego (*Hordeum sativum* L.) uprawianego w Lubelskiem. *Roczniki Nauk Rolniczych* 20(1/2): 7–15.

- Lattanzio V., Lattanzio V. M. T., Cardinali A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 2006: 23–67.
- Lemmens M., Reisinger A., Buerstmayr H., Ruckenbauer P. 1994. Breeding for head blight (*Fusarium* spp.) resistance in wheat: development of a mycotoxin-based selection method of seedlings. *Acta Horticulture* 355: 223–232.
- Masojć P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7 (2A): 499–509.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.
- Mesterhazy A. 1987. Selection of head blight resistant wheat through improved seedling resistance. *Plant Breeding* 98: 25–36.
- Miedaner T., Gang G., Reinbrecht C., Geiger H.H. 1997. Lack of association between *Fusarium* root rot and head blight resistance in winter rye. *Crop Science* 37: 327–331.
- Mpofu A., Sapirstein H.D., Beta T. 2006. Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1265–1270.
- Nicholson R.L., Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369–389.
- Nielsen L.K., Cook D.J., Edwards S.G., Ray R.V. 2014. The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology* 179: 38–49.
- Nielsen L.K., Jensen J.D., Nielsen G.C, Jensen J.E., Spliid N.H., Thomsen I.K., Justesen A.F., Collinge D.B, Jørgensen L.N. 2011. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. *Phytopathology* 101: 960–969.
- Nielsen L.K., Justesen A.F., Jensen J.D., Jørgensen L.N. 2013. *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. *Crop Protection* 43: 192–200.
- O'Neill P.M., Shanahan J.F., Schepers J.S. 2006. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science* 46: 681–687.
- Packa D. 2005. Fitotoksyczna aktywność patogenów nekrotroficznych z rodzaju *Fusarium*. *Rozprawy i monografie* 106. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.

- Perkowski J., Buśko M., Chmielewski J., Góral T., Tyrakowska B. 2008. Content of trichodiene and analysis of fungal volatiles (electronic nose) in wheat and triticale grain naturally infected and inoculated with *Fusarium culmorum*. *International Journal of Food Microbiology* 126: 127–134.
- Ren R., Yang X., Ray R.V. 2015. Comparative aggressiveness of *Microdochium nivale* and *M. majus* and evaluation of screening methods for Fusarium seedling blight resistance in wheat cultivars 2015. *European Journal of Plant Pathology* 141:281–294.
- Ruckenbauer P., Buerstmayr H., Lemmens M. 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* 119: 121–127.
- Siranidou E., Kang Z., Buchenauer H. 2002. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defense responses in wheat cultivars differing in resistance to Fusarium head blight. *Journal of Phytopathology* 150: 200–208.
- Tamburic-Ilincic L., Somers D., Fedak G., Schaafsma A. 2009. Different quantitative trait loci for Fusarium resistance in wheat seedlings and adult stage in the Wuhan/Nyubai wheat population. *Euphytica* 165: 453–458.
- Waterworth W.M., Ashley M.K., West C.E., Sunderland P.A., Bray C.M. 2005. A role for phosphorylation in the regulation of the barley scutellar peptide transporter HvPTR1 by amino acids. *Journal of Experimental Botany* 56(416): 1545–52.
- Wiśniewska H., Kowalczyk K. 2005. Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew. *Journal of Applied Genetics* 46(1): 35–40.
- Wojciechowski S., Wiśniewska H., Chełkowski J. 1996. Influence of *Fusarium culmorum* infection and its metabolite deoxynivalenol on membrane stability in barley seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 18(1): 3–6.
- Wojciechowski S., Chełkowski J., Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 1997. Evaluation of spring and winter wheat reaction to *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Journal of Phytopathology* 145:99–103.
- Yoshida M., Abe J., Moriyama M., Shimokawa S., Nakamura Y. 1997. Seasonal changes in the physical state of crown water associated with freezing tolerance in winter wheat. *Physiologia Plantarum* 99: 363–370.
- Zhao X., Huang J., Yu H., Wang L., Xie W. 2010. Genomic survey, characterization and expression profile analysis of the peptide transporter family in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology* 10: 2–20.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Realizowana przeze mnie tematyka badawcza może zostać podzielona na następujące zagadnienia:

1. Odporność roślin na fuzariozy:

a) badanie odporności wybranych gatunków na fuzariozy: jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), pszenica (*Triticum aestivum* L.), pszenżyto ( $\times$ *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus), owies (*Avena sativa* L.), rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana* L.) w stadium siewki i w stadium kwitnienia. Badania prowadzono na odmianach, liniach DH i rodach zbóż oraz na mutantach i formach dzikich *A. thaliana*

b) analiza zmian biochemicznych i fizjologicznych wywołanych infekcją *F. culmorum*.

2. Wybrane aspekty heterozji u pszenżyta:

a) badanie odporności rodziców oraz mieszańców F<sub>1</sub> pszenżyta na fuzariozę siewek

b) badanie interakcji genomu pszenżyta w różnych cytoplazmach pod kątem ekspresji cechy męskiej sterility

c) poszukiwanie form dopełniających dla pszenżyta w systemie *cms-T.timopheevi* na drodze rekombinacji z żytem w systemie *cms-Pampa*.

3. Różnorodność genetyczna w procesie mejotycznej rekombinacji u kukurydzy.

5. Filogenetyczne prace badawcze w rodzaju *Bromus* i *Aconitum*.

6. Badania genów zaangażowanych w transport i akumulację arsenu w roślinach.

7. Otrzymywanie linii DH owsa i cytologiczno-molekularna identyfikacja częściowych mieszańców owsa z kukurydzą.

Od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich w 1996 roku dominującą dla mojej działalności naukowej tematyką badawczą była odporność roślin na fuzariozy. Kontynuowałem ją po rozpoczęciu pracy w Katedrze Hodowli Roślin i Nasiennictwa UR w Krakowie w 2002 roku. Tematyka ta została przedstawiona w części **IB**, w cyklu publikacji powiązanych tematycznie. Tam też zawarłem najistotniejsze prace dla rozwoju tego kierunku badań. Prowadziłem ponadto badania odpornościowe w aspekcie genetyki ilościowej i zagadnienia te przedstawiłem w pracach **II.D.1** i **II.D.4**. Ocenę podatności na fuzariozę siewek dwu populacji linii DH jęczmienia otrzymanych z mieszańców Maresi  $\times$  Klimek i Maresi  $\times$  Pomo przedstawiono w pracy **II.D.1**. Linie DH, formy wyjściowe oraz mieszańce F<sub>1</sub> i F<sub>2</sub> poddano inokulacji *Fusarium culmorum*, a następnie oceniono porażenie w skali 5-cio stopniowej. Po przeprowadzeniu analizy wariancji dokonano oceny efektów addytywnego

działania genów, dominacji i nieallelicznej interakcji. Stwierdzono, że na podatność siewek na *F. culmorum* wpływ miały wszystkie wymienione efekty, natomiast obserwowana zmienność genetyczna obu populacji pod względem podatności była wynikiem segregacji dwóch genów bądź grup genów ściśle ze sobą sprzężonych.

Genetyczne zróżnicowanie podatności na fuzariozę kłosa wywołaną przez *F. culmorum* u nagich i oplewionych linii podwojonych haploidów jęczmienia przedstawiono w pracy **II.D.4**. Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji oraz oszacowano efekty addytywnego działania genów, dominacji i nieallelicznej interakcji *loci* homozygotycznych i heterozygotycznych. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Pod wpływem infekcji *F. culmorum* doszło do zmniejszenia masy 1000 ziaren, masy i liczby ziaren z kłosa oraz celności ziarna. Na wspomnianą redukcję wielkości elementów struktury plonu istotny wpływ wywarły efekty addytywnego działania genów.
2. Efekty addytywnego działania genów wywarły istotny wpływ na wielkość redukcji masy 1000 ziaren, masy i liczby ziaren z kłosa oraz celność ziarna, wywołanej inokulacją.
3. Spadek liczby ziaren z kłosa linii inokulowanych wywołany był współdziałaniem genów homozygotycznych, które zwiększało wrażliwość badanych form na patogena.
4. Redukcja masy 1000 ziaren i celności ziarna form inokulowanych kontrolowana była przez geny w stanie heterozygotycznym.

Poza badaniami odpornościowymi jęczmienia na fuzariozy zajmowałem się również możliwością wykorzystania heterozji w hodowli odpornościowej pszenżyta (**II.D.6** i **II.D.8**). Informacja na temat podatności na fuzariozę pszenżyta z cytoplazmą *T. timopheevi* może być istotna dla hodowców ze względu na możliwość wykorzystania tej cytoplazmy jako źródła męskiej sterylności w hodowli heterozyjnej. Stąd też podjęto badania podatności linii cms pszenżyta z cytoplazmą *T. timopheevi* i linii dopełniających z cytoplazmą *T. aestivum* na infekcje *F. culmorum* (**II.D.6**). Wykazano, że porażenie liści linii męskosterylnych było trzy razy, a porażenie korzeni 1,5 raza większe niż linii dopełniających z cytoplazmą *T. aestivum*. Zaobserwowano również istotną interakcję cytoplazmy i genotypu w przypadku porażenia korzeni. Większa skłonność linii męskosterylnych z cytoplazmą *T. timopheevi* na porażenie przez *F. culmorum* niż linii dopełniających z cytoplazmą *T. aestivum* może wynikać z większego pomarszczenia ziarna linii męskosterylnych. Ma to bezpośredni związek z wielkością plonu i jakością mieszańcowego ziarna otrzymanego z wykorzystaniem męskosterylnych linii matecznych. Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski: 1. Linie cms pszenżyta z cytoplazmą *T. timopheevi* cechowały się większą



podatnością siewek na *F. culmorum* niż linie dopełniające z cytoplazmą *T. aestivum*. 2. Przy wytwarzaniu nasion mieszańcowych pszenżyta z wykorzystaniem systemu cms-*T. timopheevi* należy zwracać uwagę na podatność linii matecznych na *F. culmorum*.

Rozwinięciem badań nad heterozją u pszenżyta w aspekcie odpornościowym była praca **II.D.8**. Jej celem było zbadanie podatności męskosterylnych linii matecznych, rodów hodowlanych, użytych jako formy ojcowskie i mieszańców  $F_1$  na infekcję *F. culmorum* w stadium siewki oraz oszacowanie ogólnej wartości kombinacyjnej (OWK) i swoistej wartości kombinacyjnej (SWK) form rodzicielskich. Wykazano, że OWK i SWK badanych form rodzicielskich była wysoce istotna. Średni kwadrat OWK matek i ojców był dwukrotnie większy niż SWK w przypadku porażenia liści i prawie dwukrotnie mniejszy w przypadku porażenia korzeni. Sugeruje to odmienny typ genetycznej zmienności, tj. przewagę addytywnego działania genów w przypadku odporności liści i przewagę nieaddytywnego działania genów w przypadku odporności korzeni na *F. culmorum*. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano wysoce istotne zróżnicowanie porażenia liści i korzeni przez *Fusarium* w stadium siewek u rodziców i mieszańców oraz OWK i SWK badanych form rodzicielskich. Jeżeli przynajmniej jedna z form rodzicielskich charakteryzowała się ujemnymi efektami OWK przy ujemnych efektach SWK, porażenie liści i korzeni mieszańców było mniejsze.

Efektem zainteresowania zagadnieniami heterozji u pszenżyta był udział w granicy celowym nr 6PO6 2002C/05926: „Opracowanie i wdrożenie technologii wytwarzania odmian mieszańcowych pszenżyta ozimego w oparciu o system cytoplazmatycznej męskiej sterylności (*T. timopheevi*) i analizy DNA”, którego byłem wykonawcą. Efektem wspomnianego grantu była m.in. praca **II.D.7**, której celem było zbadanie stabilności męskiej sterylności 6 linii pszenżyta i przywrócenie płodności u 15 mieszańców  $F_1$  uzyskanych z krzyżowania 3 linii męskosterylnych z 5 formami ojcowskimi. Badania przeprowadzono w różnych środowiskach reprezentujących różne warunki. Na podstawie przeprowadzonych badań można wysnuć następujące wnioski: 1. Dwie linie wsobne (cms Salvo i cms 19) spośród 6 testowanych były stabilne pod względem męskiej sterylności. Mogą być one źródłem genów nie przywracających płodności przy wytwarzaniu nowych męskosterylnych genotypów oraz genotypów dopełniających. 2. Przywracanie płodności poszczególnych mieszańców było różne w różnych środowiskach i niepełne, dlatego powinno być testowane w różnych środowiskach, aby zidentyfikować najbardziej stabilne mieszańce. 3. Istotna

interakcja, linia mateczna x genotyp zapylacza, wskazuje na potrzebę testowania zdolności przywracania płodności z wykorzystaniem kilku form męskosterylnych.

System *cms-T. timopheevi* charakteryzuje mała frekwencja genotypów dopełniających, a męska sterylność linii nie jest stabilna w różnych środowiskach. Większość rodów i odmian najczęściej w dużym stopniu, ale nie w pełni przywraca męską płodność. Ze względu na małą frekwencję genotypów utrzymujących męską sterylność, konieczne jest poszukiwanie ich wśród dużej liczby odmian i rodów oraz planowe wytwarzanie. Stąd też zrodził się pomysł wykorzystania innego źródła cytoplazmatycznej męskiej sterylności w celu kontrolowanego krzyżowania roślin na dużą skalę. Z tym zagadnieniem związane są badania prezentowane w pracach **II.D.11** i **II.A.5**. Celem pracy **II.D.11** było otrzymanie pokoleń  $F_1$  i  $BC_1$  z krzyżowań zwrotnych (w którym przemiennie występują rośliny jako mateczne i ojcowskie:  $A \times B$  i  $B \times A$ ) pszenicy heksaploidalnej z cytoplazmą *Aegilops sharonensis* z pszenżytem heksaploidalnym przy wykorzystaniu kultur *in vitro* niedojrzałych zarodków. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono: 1. Większy wpływ kierunku krzyżowania na liczbę zarodków i zielonych roślin niż rodzaju pożywki i aplikacji 2,4-D. 2. Potwierdzono większą efektywność otrzymywania roślin wczesnych pokoleń mieszańcowych z krzyżowań typu pszenżyto  $\times$  pszenica w porównaniu z krzyżowaniem odwrotnym. 3. Otrzymane mieszańce z krzyżowań pszenica  $\times$  pszenżyto, zawierające cytoplazmę *Ae. sharonensis* mogą być wykorzystane do badania efektu sterylizacji pyłku pszenżyta w cytoplazmie tego gatunku.

Próbie przeniesienia genów nie przywracających płodności z systemu *cms-Pampa* u żyta do systemu *cms-T. timopheevi* u pszenżyta przedstawiono w pracy **II.A.5**. System *cms-Pampa* u żyta cechuje pełna i stabilna męska sterylność. Założono, że geny nierestorujące funkcjonujące u żyta w systemie *cms-Pampa* przeniesione do pszenżyta z cytoplazmą *T. timopheevi* mogą funkcjonować podobnie stabilnie jak u żyta. Stąd też celem tej pracy było otrzymanie mieszańców między dopełniającymi liniami pszenżyta w systemie *cms-T. timopheevi* i dopełniającymi liniami żyta w systemie *cms-Pampa*. W pracy weryfikowano mieszańcowe pochodzenie pokolenia  $F_1$  z wykorzystaniem techniki ISSR-PCR oraz badano możliwość przeniesienia poprzez rekombinację stabilnych genów męskiej sterylności, współdziałających z cytoplazmą *Pampa* u żyta, do systemu *cms-T. timopheevi* pszenżyta. W kolejnych pokoleniach  $BC_1$  i  $BC_2$  tworzonych poprzez zapylenie w pełni męskosterylnych roślin matecznych z potomstwem  $F_1$  i  $BC_1$  liniami otrzymanymi przez ścisły chów wsobny z segregantów  $F_2$  (pochodzących z krzyżowania linii dopełniających żyta i linii dopełniających pszenżyta) udział roślin męskosterylnych zwiększył się odpowiednio do 65,4% i 75%. Udział

potomstw męskosterylnych wzrastał z powodu zwiększającej się homozygotyczności linii ojcowskich i selekcji linii w pełni męskosterylnych. Czternaście segregantów  $F_2$  (7,8 %) oraz linii  $S_1$  i  $S_2$  z nich utworzonych stabilnie utrzymywało męską sterylność w pokoleniu  $F_1$ ,  $BC_1$  i  $BC_2$ . Wyniki potwierdzają możliwość otrzymywania linii męskosterylnych pszenżyta poprzez rekombinację dopełniających linii pszenżyta i żyta z dwóch różnych systemów męskiej sterylności. Efektem wieloletnich prac nad heterozją u pszenżyta jest również monografia „Triticale” (II.D.11) poświęcona genetyce oraz hodowli pszenżyta. W monografii tej jestem współautorem rozdziału: „The development of hybrid triticale”.

Tematyka, która zrodziła się dzięki współpracy z prof. Abulem Mandalem i Noor Nahar z Uniwersytetu Skövde w Szwecji, dotyczyła szeroko pojętej ochrony środowiska i badań nad możliwością wykorzystania roślin w detoksykacji szkodliwych odpadów, bądź eliminacji szkodliwych dla człowieka związków występujących naturalnie w środowisku. Współpraca z prof. Abulem Mandalem z Uniwersytetu Skövde, dotyczyła badań nad genami zaangażowanymi w pobieranie i metabolizm arsenu w roślinach (prace II.A.1 i II.A.4). Badania miały na celu identyfikację genów odpowiedzialnych za pobieranie i degradację arsenu w roślinach oraz docelowo stworzenie nowych odmian roślin uprawnych np. ryżu o nowych właściwościach. Długotrwała ekspozycja na arsen może prowadzić do różnych chorób skórnych, neurologicznych, naczyniowych oraz nowotworowych. Jednym z możliwych rozwiązań jest wyprowadzenie nowych odmian roślin uprawnych ze zmodyfikowanym metabolizmem arsenu w celu uniknięcia jego wchłaniania z zanieczyszczonej gleby. Jednak mechanizm pobierania arsenu i jego magazynowanie w roślinach nie jest jeszcze dobrze poznany. Z pomocą analizy bioinformatycznej (tzw. *in silico*) zostały zidentyfikowane i poddane analizie dwa geny: *ACR2* (*Arsenate reductase 2*), *PCS1* (*Phytochelatinsynthase 1*), mające związek z pobieraniem i przemianami arsenu w roślinach. Badania symulacyjne wykazały nadekspresję genów *ACR2* (II.A.1) i *PCS1* (II.A.4) w tkankach *A. thaliana*, która powoduje znaczne zmniejszenie akumulacji arsenu w nadziemnych częściach tej rośliny (z 55  $\mu\text{g/g}$  s.m. do 18  $\mu\text{g/g}$  s.m.). Uzyskane wyniki sugerują, że białko *ACR2* jest zaangażowane w przekształcenie arsenianu do arseninu wewnątrz komórki roślinnej (II.A.1). Natomiast gen *PCS1* jest zaangażowany w wytwarzanie enzymu syntazy fitochelatynowej niezbędnej do wiązania kompleksu arsen-fitochelatyny, które mogą być transportowane i/lub przechowywane w wakuoli komórki roślinnej (II.A.4). Linie mające mutację w wymienionych genach *AtACR2* i *AtPCS1* eksponowane na arsen, gromadzą znacznie większe jego ilości w pędach w porównaniu z roślinami kontrolnymi typu

dzikiego. Na podstawie wyników uzyskanych *in silico* i *in vivo* potwierdzono zaangażowanie genów *AtACR2* i *AtPCSI* w rozkład, gromadzenie i/lub przechowywanie arsenu w *A. thaliana*. Wyniki te mogą być wykorzystane do wprowadzania badanych genów (*AtACR2*, *AtPCSI*) do roślin gatunków uprawnych będących źródłem pożywienia w krajach gdzie występuje naturalne skażenie gleb arsenem.

Rozwijałem również swoje zainteresowania technikami molekularnymi już w czasie studiów doktoranckich, kiedy to w 1998 roku zostałem zakwalifikowany do udziału w podyplomowym Międzynarodowym Kursie Biotechnologii Roślin i Mikroorganizmów, zorganizowanym przez Uniwersytet Hebrajski w Jerozolimie oraz Izraelskie Ministerstwo Spraw Zagranicznych (certyfikat z oceną). W czasie swojej pracy zawodowej odbyłem dwa staże naukowe. Pierwszy, u prof. Wojciecha Pawłowskiego w Katedrze Hodowli Roślin i Genetyki Uniwersytetu Cornell w USA, w terminie 20.04.2008 do 20.07.2008. W czasie stażu brałem udział w realizacji programu badawczego finansowanego przez National Science Foundation: „Różnorodność genetyczna w procesie mejotycznej rekombinacji u roślin na przykładzie kukurydzy”. Prace badawcze, które tam prowadziłem dotyczyły analizy zmienności sekwencji genów uznawanych za kluczowe w procesie mejotycznej rekombinacji (m. in.: *Spo*, *Mre*, *Rad*, *Brca*, *Dmc*, *Phs*, *Sgs*, *Msh*, *Mlh*, *Mus*, *Pms*). Prowadziłem amplifikacje egzonów genów, następnie cykliczne sekwencjonowanie produktów PCR oraz edycje i analizę sekwencji w zestawie linii wsobnych kukurydzy reprezentujących 80% zmienności istniejącej w tym gatunku.

W trakcie stażu w Uniwersytecie Cornell poznałem również metodykę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* FISH w celu badania zmienności liczby chiazmy w wybranych liniach wsobnych kukurydzy. Po zapoznaniu się z procedurą badawczą, wprowadziłem modyfikacje, które zredukowały degradację struktury chromosomów w preparatach usprawniając analizę i czyniąc ją bardziej czytelną.

Drugi staż odbyłem u prof. Roberta Hasteroka w Katedrze Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego w terminie 13.07.2015-31.07.2015 oraz 21.09.2015-25.09.2015. W czasie stażu zapoznałem się z metodami cytogenetyki molekularnej.

Zainteresowanie technikami molekularnymi zaowocowało uczestnictwem w grantie: NN 303 396136 „Pochodzenie populacji *Bromus erectus* i *Bromus benekenii* w Polsce”, finansowanym przez MNiSW. Wyniki badań zostały opublikowane w pracach **II.A.2** i **II.A.3**. Współpraca nawiązana podczas realizacji w/w projektu zaowocowała również publikacją **II.A.6**. We wspomnianych powyżej badaniach brałem udział w przeprowadzaniu analiz

molekularnych oraz interpretacji pewnych aspektów pochodzenia mieszańców rodzaju *Bromus*. Celem badań prezentowanych w pracy **II.A.2** była identyfikacja potencjalnych kryptorefugiów *Bromus erectus* i *B. benekenii*, gdzie mogły one przetrwać ostatnie zlodowacenie plejstocenijskie oraz określenie skąd i jakimi drogami doszło do rozprzestrzeniania się zasięgu tych gatunków. Wyniki badań dowodzą, że ostoje glacialne kserotermicznego *Bromus erectus* mogły istnieć w cieplejszych obszarach Europy południowej, oraz dalej na północ, głównie na Nizinie Węgierskiej i na Wyżynie Czesko-Morawskiej. Z refugiów południowo-europejskich *B. erectus* rozprzestrzenił się do wyższych szerokości geograficznych, zgodnie z modelem migracji długodystansowej, natomiast z „północnych” kryptorefugiów rozprzestrzenił się bardziej lokalnie, np. do Niemiec.

Praca **II.A.3**, w której zaprezentowano badania nad *B. benekenii* dostarczyła informacji na temat występowania leśnych gatunków zielnych podczas późnego glacjału i holocenu, które były dotychczas dość skąpe i dotyczyły głównie gatunków drzew z rodzaju *Betula*, *Quercus*, *Corylus*, *Ulmus* i *Tilia*. Dzięki połączeniu modelowania niszy klimatycznej oraz wyników analiz molekularnych wskazano, że obszar południowej i południowo-zachodniej Europy oraz Bałkany, to obszary gdzie prawdopodobnie znajdowały się ostoje *B. benekenii* w czasie maksimum ostatniego zlodowacenia. Badania molekularne pozwoliły również wyznaczyć szlaki postglacialnej migracji tego gatunku na terenie Europy oraz wykazać po raz pierwszy zróżnicowanie genetyczne i odmienne pochodzenie tego gatunku w Polsce.

Głównym celem pracy **II.A.6** była weryfikacja hipotezy o mieszańcowym charakterze osobników *Bromus ramosus* × *B. benekenii* pochodzących z populacji w północnej części Francji, uznanych na podstawie cech morfologicznych za mieszańce oraz porównanie zmienności genetycznej form rodzicielskich ze zmiennością przypuszczalnych mieszańców. Dzięki kladystycznej analizie numerycznej wyników badań molekularnych wykazano, że mieszańce *B. ramosus* × *B. benekenii* zajmowały pozycję pośrednią między gatunkami rodzicielskimi, przy jednoczesnym większym powinowactwie genetycznym z *B. ramosus*, co sugeruje introgresję w kierunku tego gatunku. Obydwa badane gatunki różnią się także stopniem zmienności wewnątrzgatunkowej, a zmienność mieszańców przyjmuje wartości pośrednie między zmiennością taksonów rodzicielskich.

Zainteresowanie cytogenetycznymi technikami molekularnymi, które rozwijałem w czasie staży naukowych, zaowocowały przygotowaniem projektu grantu „Uzyskanie linii podwojonych haploidów owsa metodą krzyżowania oddalonego oraz identyfikacja częściowych mieszańców”. Projekt w 2015 roku otrzymał finansowanie NCBiR i obecnie jest

realizowany w ramach konsorcjum Instytutu Fizjologii Roślin im. F. Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. oraz Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. W projekcie tym Uniwersytet Rolniczy wykonuje zadanie badawcze nr 3 „Identyfikacja częściowych mieszańców owsa z kukurydzą”, którego jestem kierownikiem. Celem praktycznym projektu jest uzyskanie linii DH owsa i identyfikacja częściowych mieszańców owsa z kukurydzą oraz określenie wydajności uzyskiwania haploidalnych zarodków owsa w zależności od komponentów rodzicielskich użytych do krzyżowań, a także wpływ w/w czynników na konwersje haploidalnych zarodków i rozwój roślin DH. Tematyka ta została już przedstawiona na konferencji (II.B.23) oraz w publikacji II.A.8. Celem pracy była weryfikacja związku pomiędzy rodzajem zastosowanej pożywki regeneracyjnej, a zdolnością konwersji zarodków w różnych fazach rozwojowych w rośliny. Na podstawie wyników badań wyciągnięto następujące wnioski: 1. Kiełkowanie zarodków było zmienne w zależności od zastosowanych regulatorów wzrostu w pożywce regeneracyjnej. 2. Największa liczba zarodków kiełkowała na pożywce z 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA i 0,5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN, a najmniejsza na pożywce z 1 mg·dm<sup>-3</sup> DIC, 1 mg·dm<sup>-3</sup> PIC, i 0,5 mg·dm<sup>-3</sup> KIN. 3. Haploidalne zarodki < 0,5 mm były globularne i nie kiełkowały, podczas gdy zarodki ≥ 1,5 mm miały wyraźnie widoczny koleoptyl, korzonek zarodkowy i tarczkę zarodkową i kiełkowały. Pierwszy etap wykrywania częściowych mieszańców zaprezentowano w pracy III.B.24. Wykazano, że 11% linii DH posiadało fragment retrotranspozonu kukurydzy Grande1 o wielkości 500 pz.

Moje plany badawcze na najbliższe lata są związane z realizacją wyżej wymienionego projektu i kolejnych etapów identyfikacji częściowych mieszańców owsa z kukurydzą za pomocą techniki hybrydyzacji *in situ* GISH (te prace trwają obecnie i będą kontynuowane do 2018 roku) oraz identyfikacji poszczególnych chromosomów kukurydzy i określenia ich frekwencji w mieszańcach z wykorzystaniem markerów SSR.

We współpracy dr hab. Haliną Góral z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie w wyniku wieloletnich krzyżowań wypierających wprowadziliśmy do pszenżyta trzy sterylizujące cytoplazmy: *Pampa*, *Ae. sharonensis*, i *Ae. ventricosa*. Brałem udział w badaniach dotyczących wykorzystania cytoplazmy *T. timopheevi* w hodowli heterozyjnej pszenżyta zapoczątkowanych przez prof. Ludwika Spissa i dr hab. Halinę Góral. Ponieważ posiadamy cenne linie pszenżyta w odległych pokoleniach krzyżowań wstecznych z cytoplazmą *T. timopheevi*, dlatego też kolejnym zagadnieniem badawczym, którym planuję się zajmować w przyszłości, będzie badanie interakcji genomu pszenżyta w sterylizujących cytoplazmach: *T. timopheevi*, *Pampa*, *Ae. sharonensis* i *Ae. ventricosa* pod kątem ekspresji cechy męskiej sterylności. Otrzymane wyniki mogą pozwolić na hodowlę linii

męskosterylnych, dopełniających i przywracających męską płodność z wykorzystaniem cytoplazm *Pampa*, *Ae. sharonensis* i *Ae. ventricosa* oraz tworzenie alternatywnych dla cms-*T. timopheevi* systemów cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterylności, niezbędnej w hodowli heterozyjnej pszenżyta. Tematyka ta będzie realizowana w ramach przyznanego w 2016 roku przez MRiRW grantu: „Genetyczne podłoże męskiej sterylności pszenżyta z różnymi cytoplazmami oraz możliwość wykorzystania badanych cytoplazm do tworzenia systemów CMS u pszenicy”, którego jestem wykonawcą.

### Podsumowanie bibliometryczne osiągniętego dorobku publikacyjnego

**Tabela 1.** Dane bibliometryczne osiągniętego dorobku naukowego przed i po doktoracie

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Łączna liczba punktów MNiSW z 2015 roku	Sumaryczny IF (w roku opublikowania)
<b>Przed uzyskanie stopnia doktora</b>			
W czasopismach z bazy JCR	-	-	-
W recenzowanych czasopismach spoza bazy JCR	2	12	-
Doniesienia konferencyjne:			
- krajowe	4		
- międzynarodowe	1		
Razem przed doktoratem	7	12	-
<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>			
W czasopismach z bazy JCR	11	255	12,937
W recenzowanych czasopismach spoza bazy JCR	8	58	-
Artykuły w monografiach	3	-	-
Doniesienia konferencyjne:			
- krajowe	16		
- międzynarodowe	8		
Rozdziały w książkach	1	2	-
<i>Recenzowane streszczenia doniesień zjazdowych w czasopismach z bazy JCR</i> <i>Punktacja przyjęta wg zasad oceny parametrycznej jednostek naukowych.</i>	1	15	-
Razem po doktoracie	48	330	12,937
W czasopismach z bazy JCR (przyjęte do druku, oczekują na DOI) *	2	35	1,771
<b>Razem</b>	<b>50</b>	<b>377</b>	<b>14,708</b>

\* Decyzję o uwzględnieniu tych punktów pozostawiam Członkom Rady Wydziału UR i Recenzentom.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się z **55** prac (czasopisma z bazy JCR, czasopisma spoza bazy JCR, monografie, doniesienia i wystąpienia konferencyjne krajowe i zagraniczne). Jedenaście prac naukowych mojego dorobku zostało opublikowanych w czasopismach z bazy JCR, ich łączna miara oddziaływania IF zgodnie z rokiem

opublikowania wynosi 12,937 (14,708 łącznie z dwoma pracami przyjętymi do druku w październiku 2016). Są to czasopisma: **Acta Botanica Cracoviensia Series Botanica** (2 prace), **Cereal Research Communication** (1 praca), **Field Crops Research** (1 praca), **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant** (1 praca), **Journal of Molecular Modelling** (2 prace), **Physiological and Molecular Plant Pathology** (1 praca), **Phytoparasitica** (1 praca), **Plant Systematics and Evolution** (1 praca) **Spanish Journal of Agricultural Research** (1 praca). Chciałbym dodać, że w październiku 2016 roku, zostały przyjęte do druku, następujące prace, które na razie oczekują na DOI (dołączono potwierdzenia, Załącznik 3 str.18-19):

1. Sutkowska A., Boroń P., Warzecha T. and Mitka J. 2016. Hybridization and introgression among three *Aconitum* (Ranunculaceae) species of different ploidy levels in the Tatra Mts (Western Carpathians), *Plant Species Biology*, (**IF: 1,271; punkty MNiSW: 20 pkt.**)
2. Sutkowska A., Warzecha T. and Mitka J. 2016. Genetic variation of *Aconitum* sect. *Aconitum* (Ranunculaceae) at a macrogeographical scale in the Carpathians. *Polish Journal of Ecology*, (**IF: 0,5; punkty MNiSW: 15 pkt.**)

Zgodnie z załącznikami komunikatu MNiSW w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2015 r. łączna punktacja mojego dorobku naukowego po doktoracie wynosi 330 pkt. (365 pkt. łącznie z pracami przyjętymi do druku w październiku 2016). Po wyłączeniu 5 prac wchodzących w skład przedstawianego osiągnięcia naukowego mój pozostały dorobek naukowy po doktoracie stanowią prace naukowe o łącznym IF **8,284 (10,055** łącznie z pracami przyjętymi do druku w październiku 2016) i punktacji MNiSW **217 pkt. (252 pkt.** łącznie z pracami przyjętymi do druku w październiku 2016). Przedstawione w Tabeli 1 dane bibliometryczne dokumentują mój rozwój naukowy przed i po doktoracie. Liczba cytowań publikacji wg WoS: 23 bez autocytacji: 17, według bazy Google Scholar: 48, indeks Hirscha (wg WoS): 3 wg. bazy Google Scholar: 4. Pozostałe osiągnięcia w zakresie pracy naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej zostały przedstawione w Załączniku 3 do niniejszego wniosku.

Kraków, 28 grudnia 2016 r.



Podpis Wnioskodawcy