**Załącznik nr 3**

# AUTOREFERAT

**dr Gabriela Gołębiowska-Pikania**
Zakład Biologii Komórki i Genetyki
Instytut Biologii
Wydział Geograficzno-Biologiczny
Uniwersytet Pedagogiczny
*im. Komisji Edukacji Narodowej* w Krakowie
ul. Podchorążych 2, 30-084 Kraków

Kraków 2019

**dr Gabriela Gołębiowska-Pikania**
Zakład Biologii Komórki i Genetyki
Instytut Biologii
Wydział Geograficzno-Biologiczny
Uniwersytet Pedagogiczny
*im. Komisji Edukacji Narodowej* w Krakowie
ul. Podchorążych 2, 30-084 Kraków
E-mail: gabriela.golebiowska-pikania@up.krakow.pl

## I. IMIĘ I NAZWISKO: Gabriela Julia Gołębiowska-Pikania

## II. WYKSZTAŁCENIE, POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

**2008 r. – Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii** uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Mechanizmy odporności pszenżyta ozimego (x *Triticosecale* Wittm.) na różową pleśń śniegową wywołaną przez *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallett", wykonanej w Zakładzie Biologii Komórki w Instytucie Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Promotor pracy doktorskiej: prof. dr hab. Maria Wędzony. Praca obroniona przed Radą Instytutu Botaniki im. *Władysława Szafera* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

**2004 – 2008 r.** Międzynarodowe Studia Doktoranckie Nauk Przyrodniczych PAN przy Instytucie Botaniki im. *Władysława Szafera* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Projekt pracy doktorskiej nagrodzony trzyletnim stypendium doktoranckim Prezesa Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Ludwika Legockiego.

**2003 – 2004 r.** Kontynuacja analiz podjętych w pracy magisterskiej (umowa zlecenie), Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.

**2003 r. – Stopień magistra biologii** uzyskany z wyróżnieniem na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Oczyszczanie kompleksu białkowego zawierającego miozynę z kalafiora", wykonanej w Zakładzie Fizjologii Roślin na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Promotor pracy magisterskiej: dr hab. Przemysław Malec.

**1998 – 2003 r.** Studia magisterskie na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Stypendium naukowe na II, III i V roku studiów.

**1999 r. – Nauczyciel fortepianu i rytmiki**, Państwowa Szkoła Muzyczna II Stopnia im. *Władysława Żeleńskiego* w Krakowie.

**Znajomość języków obcych:** angielski (płynnie w mowie i piśmie), włoski (dobry w mowie i piśmie).

## III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

**Adiunkt (od 01.12.2008 r. do chwili obecnej, okres mianowania do 30.09.2021 r.)** w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego *im. Komisji Edukacji Narodowej* w Krakowie.

**Asystent (od 01.07.2008 r. do 01.03.2013 r.)** w Zakładzie Biologii Komórki w Instytucie Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

**Biolog (od 01.10.2004 r. do 30.06.2008 r.)** w Zakładzie Biologii Komórki w Instytucie Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

## IV. INFORMACJA O ODBYTYCH URLOPACH MACIERZYŃSKICH

Czas trwania urlopu macierzyńskiego, dodatkowego urlopu macierzyńskiego oraz urlopu rodzicielskiego: łącznie 530 dni.

## V. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO 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 POZ. 882 ZE ZM. W DZ. Z 2016R POZ. 1311.):

### Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl sześciu oryginalnych prac eksperymentalnych, ujętych pod wspólnym tytułem:

**Wybrane zmiany molekularne towarzyszące tolerancji krzyżowej zbóż na pleśń śniegową i niskie temperatury**

**Słowa kluczowe:** pszenżyto, jęczmień, niska temperatura, *Microdochium nivale*, enzymy antyoksydacyjne, białka odporności, QTL

**Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego** (chronologicznie):

**B1.** Szechyńska-Hebda M., Wędzony M., Tyrka M., **Gołębiowska G.**, Chrupek M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Żur I., Golemiec E. **2011.** Identifying QTLs for cold-induced

resistance to *Microdochium nivale* in winter triticale. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 9: 296-299, DOI: 10.1017/S1479262111000268, ISNN: 1479-2621, EISNN: 1479-263X, Wydawca: CAMBRIDGE UNIV PRESS.
**IF**$_{2013}$: 0,728; **Punkty MNiSW**$_{2013}$: 20, **liczba cytowań**$_{WoS}$: 7

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- udziale w pozyskaniu finansowania na przeprowadzone badania (akcja COST 860);
- udziale w zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych;
- udziale w rozmnażaniu 90 linii DH w warunkach kontrolowanych i przygotowaniu materiału do doświadczeń;
- udziale w namnażaniu izolatu grzybni *Microdochium nivale* w warunkach *in vitro*;
- udziale w przeprowadzeniu inokulacji siewek pszenżyta grzybnią *M. nivale*;
- udziale w fenotypowaniu stopnia porażenia pleśnią śniegową wywołaną *M. nivale*;
- udziale w analizie danych i interpretacji wyników;
- udziale w przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Mój udział szacuję na 30% nakładu pracy włożonej w powstanie tej publikacji.

**B2.** Żur I., **Gołębiowska G.**, Dubas E., Golemiec E., Matušíková I., Libantová J., Moravčiková J. **2013.** β-1,3-glucanase and chitinase activities in winter triticales during cold hardening and subsequent infection by *Microdochium nivale*. Biologia 68(2): 241-248, DOI: 10.2478/s11756-013-0001-0, ISNN: 0006-3088, EISNN: 1336-9563, Wydawca: Versita.
**IF**$_{2013}$: 0,506; **Punkty MNiSW**$_{2013}$: 15, **liczba cytowań**$_{WoS}$: 12

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na:
- współudziale w przygotowaniu wniosku projektu, z którego były finansowane badania składające się na powyższą publikację;
- opracowaniu koncepcji badań;
- udziale w zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych w tym:
    - hodowli siewek pszenżyta dwóch odmian w warunkach kontrolowanych;
    - rozmnożeniu inokulatu grzybni *Microdochium nivale* w warunkach *in vitro*;
    - przeprowadzeniu inokulacji siewek pszenżyta grzybnią *M. nivale*;
    - obserwacji postępów infekcji;
- współudziale w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych w tym:
    - pobraniu i przygotowaniu próbek materiału do analiz;
    - wykonaniu pomiarów aktywności chitynazy metodą fluorymetryczną;
    - wykonaniu pomiarów aktywności glukanazy metodą spektrofotometryczną;
    - wykonaniu oceny aktywności chitynazy i glukanazy metodą żelową;
- analizie danych i interpretacji wyników;
- współudziale w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział szacuję na 50% nakładu pracy włożonej w powstanie tej publikacji.

**B3. Gołębiowska-Pikania* G.**, Golemiec* E. **2015.** Cold-enhanced gene expression of the foliar thiol-specific antioxidant protein in triticale (x*Triticosecale* Wittm.) seedlings resistant to *Microdochium nivale* (Samuels & I.C. Hallett) infection. Acta Biologica 22: 98-117, DOI:10.18276/ab.2015.22-08, ISSN: 2450-8330, EISSN: 2353-3013, Wydawca: Uniwersytet Szczeciński, Open Access
**Punkty MNiSW**$_{2015}$: 9

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- opracowaniu koncepcji badań;
- pozyskaniu finansowania na przeprowadzone badania w postaci grantu NCN Nr NN310 140239, jako kierownik i główny wykonawca projektu;
- udziale w wyprowadzaniu i namnażaniu populacji mapującej linii DH Hewo x Magnat;
- zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych w tym:
    - hodowli siewek pszenżyta dwóch odmian i czterech linii w warunkach kontrolowanych;
    - rozmnażaniu izolatu grzybni *Microdochium nivale* w warunkach *in vitro*;
    - przeprowadzeniu inokulacji siewek pszenżyta grzybnią *M. nivale*;
    - przeprowadzeniu obserwacji postępów infekcji;
- współudziale w zaplanowaniu i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych w tym:
    - pobraniu próbek do analiz;
    - analizie danych i interpretacji wyników;
- przygotowaniu całości tekstu manuskryptu oraz wykresów;
- ostatecznym zredagowanie manuskryptu po recenzjach w roli autora korespondującego.

*Posiadam status pierwszego autora tej publikacji wspólnie z Elżbietą Golemiec (*equal contribution*). Mój udział szacuję na 50% nakładu pracy włożonej w powstanie tej publikacji.

**B4.** Gawrońska* K., **Gołębiowska-Pikania* G. 2016.** The effects of cold-hardening and *Microdochium nivale* infection on oxidative stress and antioxidative protection of the two contrasting genotypes of winter triticale. European Food Research and Technology, 242(8): 1-10, DOI: 10.1007/s00217-015-2630-8, ISNN: 1438-2377, EISSN: 1438-2385, Wydawca: Springer.
**IF**$_{2016}$: 1,433; **Punkty MNiSW**$_{2016}$: 25, **liczba cytowań**$_{WoS}$: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- opracowaniu koncepcji badań;
- pozyskaniu finansowania na przeprowadzone badania w postaci grantu NCN Nr NN310 140239, jako kierownik i główny wykonawca projektu;
- udziale w wyprowadzaniu i namnażaniu populacji mapującej linii DH Hewo x Magnat;
- zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych w tym:
    - hodowli siewek pszenżyta dwóch linii w warunkach kontrolowanych;
    - rozmnażaniu izolatu grzybni *Microdochium nivale* w warunkach *in vitro*;
    - przeprowadzeniu inokulacji siewek pszenżyta grzybnią *M. nivale*;
    - przeprowadzeniu obserwacji postępów infekcji;
- współudziale w zaplanowaniu i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych w tym:
    - pobraniu próbek do analiz;
    - analizie danych i interpretacji wyników;
- przygotowaniu całości tekstu manuskryptu oraz wykresów;
- ostatecznym zredagowanie manuskryptu po recenzjach w roli autora korespondującego.

*Posiadam status pierwszego autora tej publikacji wspólnie z Katarzyną Gawrońską (*equal contribution*). Mój udział szacuję na 50% nakładu pracy włożonej w powstanie tej publikacji.

**B5. Gołębiowska-Pikania* G.**, Kopeć* P., Surówka E., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Malaga S., Żur I. **2017.** Changes in protein abundance and activity involved in freezing tolerance acquisition in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Proteomics, 169: 58-72, DOI: 10.1016/j.jprot.2017.08.019, ISSN: 1874-3919,

Wydawca: Elsevier.
**IF**$_{2017}$: 3,722; **Punkty MNiSW**$_{2016}$: 35, **liczba cytowań**$_{WoS}$: 1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- wykonaniu połowy rozdziałów białek ekstraktów siewek jęczmienia metodą dwukierunkowej elektroforezy żelowej (2 DE);
- wykonaniu całości analizy bioinformatycznej profili białkowych w programie PDQuest;
- analizie danych i interpretacji wyników 2 DE, bioinformatycznych oraz spektrometrii mas;
- przygotowaniu rozdziałów manuskryptu: 2.8. Protein extraction, 2.9. Two-dimensional gel electrophoresis, 2.10. Mass spectrometric identification of protein species, 3.4. Low temperature impact on protein patterns and its variation between DH lines of barley significantly differentiated in freezing tolerance level, 3.5. Identification of proteins related to freezing tolerance acquisition;
- przygotowaniu fragmentów abstraktu i dyskusji dotyczących zidentyfikowanych białek różnicujących genotypy wrażliwe i tolerancyjne;
- przygotowanie tabeli 3, 4 oraz figury 5A;
- udziale w ostatecznym zredagowanie manuskryptu po recenzjach w roli autora korespondującego.

*Posiadam status pierwszego autora tej publikacji wspólnie z Przemysławem Kopeć (*equal contribution*). Mój udział procentowy szacuję na 50% nakładu pracy włożonej w powstanie tej publikacji.

**B6. <u>Gołębiowska-Pikania G.</u>**, Dziurka M., Wąsek I., Wajdzik K., Dyda M., Wędzony M. **2019.** Changes in phenolic acid abundance involved in low temperature and *Microdochium nivale* (Samuels and Hallett) cross-tolerance in winter triticale (x*Triticosecale* Wittmack). Acta Physiologiae Plantarum 41(3): 38, DOI:, ISSN: 0137-5881, EISSN: 1861-1664, Wydawca: SPRINGER HEIDELBERG.
**IF**$_{2019}$: 1,438; **Punkty MNiSW**$_{2016}$: 25, **liczba cytowań**$_{WoS}$: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:
- opracowaniu koncepcji badań;
- pozyskaniu finansowania na przeprowadzone badania w postaci grantu NCN Nr NN310 140239 jako kierownik i główny wykonawca projektu;
- udziale w wyprowadzaniu i namnażaniu populacji mapującej linii DH Hewo x Magnat;
- udziale w zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych w tym:
    - hodowli siewek pszenżyta dwóch odmian i dwóch linii w warunkach kontrolowanych;
    - rozmnażaniu izolatu grzybni *Microdochium nivale* w warunkach *in vitro*;
    - przeprowadzeniu inokulacji siewek pszenżyta grzybnią *M. nivale*;
    - przeprowadzeniu obserwacji postępów infekcji;
- współudziale w zaplanowaniu i przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych w tym:
    - pobraniu próbek do analiz;
    - analizie danych i interpretacji wyników;
- przygotowaniu całości tekstu manuskryptu oraz wykresów;
- ostatecznym zredagowanie manuskryptu po recenzjach w roli autora korespondującego.

Mój udział szacuję na 90% nakładu pracy włożonej w powstanie tej publikacji.

Zestawienie łącznej liczby punktów i cytacji dla ww. cyklu publikacji przedstawiono w Tabeli 1:

**Tabela. 1. Sumaryczne zestawienie punktów i cytacji z różnych źródeł.**

| Rodzaj publikacji | Liczba publikacji | Wskaźnik IF2 | Punkty MNiSW3 | Liczba cytowań (Web of Science[4]) |
|---|---|---|---|---|
| JCR[1] | 5 | 7,827 | 120 | 20 |
| Spoza listy JCR[1] | 1 | 0 | 9 | 0 |
| **Sumarycznie** | **6** | **7,827** | **129** | **20** |

1 – Journal Citation Reports, Thomson Reuters
2 - Impact Factor (IF) – zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku publikacji za 2019r podano IF2017).
3 - Punkty MNiSW przypisano na podstawie ujednoliconego wykazu czasopism naukowych za lata 2013-2016 z dnia 26.01.2017r. (w przypadku publikacji z 2017r i 2019r podano ilość punktów za 2016r).
4- Dane z Web of Science na 25.03.2019r

Oświadczenia współautorów prac, szczegółowo określające ich indywidualny wkład w powstanie tych prac zamieszczone są w **Załączniku nr 6**.

# VI. Cel naukowy i uzyskane wyniki prac ujętych w ramach głównego osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem ich potencjalnego wykorzystania

## Wprowadzenie

Uprawy zbóż ozimych w środkowej i północnej Europie są stale pod wpływem kombinacji czynników **stresowych, abiotycznych i biotycznych**, mających wpływ na rozwój i plon roślin. Współwystępowanie obniżonej temperatury i mrozu, suszy oraz infekcji grzybami chorobotwórczymi obniża produkcję roślinną w większym stopniu, niż w przypadku wystąpienia pojedynczego stresora. W odpowiedzi na czynniki stresowe rośliny wykazują specyficzne reakcje fizjologiczne i molekularne, które, obok wspólnych niespecyficznych procesów, stanowią część strategii tolerancji. Rośliny wystawione na działanie jednego czynnika stresowego mogą nabywać odporność na działanie innego stresora – jest to zjawisko **tolerancji krzyżowej** (ang. *Cross-tolerance*).

Tolerancja na **pleśń śniegową** jest podstawową cechą zimotrwałości zbóż. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych i zjadliwych grzybów fitopatogenicznych w klimacie umiarkowanym i zimnym jest *Microdochium nivale* (Samuels i Hallett). Grzyb ten powoduje znaczne straty w ilości i jakości plonów, powodując choroby: różową pleśń śniegową, zarazę siewek, zgniliznę korzeni i źdźbła oraz jest komponentem fuzariozy kłosów w warunkach polowych i laboratoryjnych (Cichy i Maćkowiak, 1993; Tronsmo i in., 2001, Hudec i Bokor, 2002; Prończuk i in., 2003; Sliesaravičius i in., 2006; Bateman, 2008; Gołębiowska i Wędzony, 2009; Żukowski i Iljuk, 2010; Dubas i in., 2011; Szechyńska-Hebda i in. 2011, 2013; Nielsen i in., 2013; Arseniuk i Góral, 2015; Ren i in., 2015; Stricker i in., 2017). Grzyb ten jest psychrotrofem, rozwijającym się zarówno pod okrywą śniegową, jak i bez jej obecności w warunkach wysokiej wilgotności; jest zdolny do długiego przetrwania w glebie dzięki wytwarzaniu form przetrwalnikowych (Tronsmo i in., 2001). *M. nivale* wykazuje interakcje nekrotroficzne z roślinami podatnymi oraz biotroficzne z tolerancyjnymi (Szechyńska i in., 2013; Dyda i in., 2018). Patogeniczność *M. nivale* zależy od genotypu grzyba oraz infekowanej rośliny, a także lokalnego mikroklimatu (Sperschneider i in., 2015).

Tolerancja na ten patogen jest najprawdopodobniej złożoną **cechą ilościową**, która zależy od wielu genów i zmienia się pod wpływem czynników środowiskowych (Szechyńska i in., 2015; Dyda i in., 2018). Dotychczas stosowane fungicydy przeciwko pleśni śniegowej są bardzo szkodliwe dla środowiska i niewystarczająco skuteczne (Leroux i in., 2006; Bateman, 2008; Parry i in., 2008; Nielsen i in. 2013); dlatego ważne jest znalezienie genotypów zbóż i traw tolerancyjnych na *M. nivale* oraz przeanalizowanie mechanizmów tolerancji w celu wyprowadzenia nowych, bardziej tolerancyjnych odmian.

**Pszenżyto** (x*Triticosecale* Wittm.) jest młodym zbożem. Należy ono do rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*), dla których podstawowa gametyczna liczba chromosomów wynosi x = 7 (Labudda i in., 2011). Obecnie uprawiane wtórne pszenżyto heksaploidalne o genomie AABBRR (x = 21) wyprowadzone jest najczęściej za pomocą krzyżowań wsobnych z oktoploidalnych międzyrodzajowych mieszańców o genomie AABBDDRR (x = 28), uzyskanych bezpośrednio z krzyżowań pomiędzy heksaploidalną pszenicą (*Triticum aestivum* L., AABBDD) i diploidalnym żytem (*Secale cereale* L., RR). Mieszaniec ten w trakcie chowu wsobnego preferencyjnie traci genom D pochodzący od pszenicy (Klocke i in., 2013) stabilizując się na poziomie heksaploidalnym. Dalsza hodowla prowadzona jest w oparciu o krzyżowanie z innymi liniami heksaploidalnymi liniami pszenżyta, ale również z gatunkami wyjściowymi, pszenicą i żytem, w celu stałego wzbogacania puli genetycznej. Genetyczna zmienność pszenżyta może być efektem rekombinacji genomów pszenicy i żyta, w obrębie wszystkich genomów składowych.

Ze względu na pochodzenie i metody hodowli, pszenżyto może łączyć w sobie korzystne cechy pszenicy i żyta w uprawie. Szczególnie pożądanym jest utrzymanie wysokiej jakości i wysokości plonu w połączeniu z odpornością na niekorzystne czynniki środowiskowe. Pszenżyto początkowo było uważane za odporne na choroby zbóż (Tarkowski, 1989; Gruszecka, 2005), jednakże wzrost areału zasiewów i kolejne lata jego obecności w uprawach umożliwił dostosowywanie się patogenów i powstawanie ich nowych ras, co dotyczy głównie grzybów porażających to zboże, takich jak pleśń śniegowa, mączniak prawdziwy, rdza brunatna, rdza żółta, septoriozy i fuzariozy (Gruszecka, 2005).

Areał upraw pszenżyta wciąż wzrasta, a Polska produkcja tego zboża jest wiodąca na świecie. Prócz pasz i kiszonek zboże to wykorzystuje się do produkcji mąki pszenżytniej oraz słodu browarnianego. Obecnie pszenżyto, jest często porażane przez patogeny obu roślin rodzicielskich – pszenicy i żyta, czemu sprzyja bliskie sąsiedztwo ich upraw. Ponadto ostatnio potwierdzono wytworzenie się ras patogenów specyficznych do pszenżyta (Menardo i in., 2016). Dlatego ważnym celem w uprawie pszenżyta jest **wyprowadzenie genotypów odpornych lub tolerancyjnych na patogeny**. Połączenie tej odporności z innymi pożądanymi cechami jest trudne i wymaga wielu lat hodowli, ze względu na złożony charakter tych cech.

Z kolei **jęczmień** (*Hordeum vulgare* L.) jest jednym z najważniejszych zbóż szeroko stosowanych w przemyśle piwowarskim oraz w produkcji żywności i pasz dla zwierząt gospodarskich. Jest to jedna z najstarszych roślin uprawnych o dużej zdolności adaptacyjnej o haploidalnym genomie oznaczanym jako HH (x = 7). Jednak dwie cechy agronomiczne mogą radykalnie ograniczyć jego produktywność: stosunkowo niska zimotrwałość i wysoka wrażliwość na deficyt wody na etapie wzrostu rozrodczego.

Jak wykazało wielu autorów, najważniejszym czynnikiem indukującym w siewkach zbóż ozimych tolerancję na infekcję *M. nivale* jest **hartowanie niską temperaturą** (Laroche, 1997; Ergon i in., 1998; Browne i in., 2008; Gołębiowska i Wędzony, 2009; Dubas i in., 2011; Szechyńska i in., 2011, 2013, 2015, 2016). Maksymalna tolerancja była stwierdzana wyłącznie u hartowanych roślin, ale poszczególne genotypy różnią się zdolnością do uzyskiwania wywoływanej niską temperaturą ekspresji odporności (Hömmo 1994; Ergon i in. 1998; Gołębiowska i Wędzony 2009). Relacja pomiędzy odpornością na mróz a odpornością na pleśń wciąż pozostaje nieznana (Ergon i in. 1998; Ergon i Tronsmo, 2006), chociaż znaleziono jeden wspólny region QTL u pszenicy (Kruse i in. 2017). Podczas hartowania rośliny przechodzą szereg zmian na poziomie fizjologicznym i biochemicznym, niezbędnych do uzyskania zimotrwałości, zależnych od ich statusu fotosyntetycznego (Janda i in., 2014). Pod wpływem niskiej temperatury siewki jęczmienia ozimego nabywają tolerancji na mróz (Sharma i in., 2005; Chinnusamy i in., 2006; Moellering i in., 2010).

Reakcje zbóż na stres są determinowane przez poziom nasilenia czynnika stresowego oraz przez aktualny stan metaboliczny rośliny. Każdy stres zakłócający homeostazę komórkową i procesy metabolizmu tlenowego powoduje nadprodukcję **reaktywnych form tlenu** RFT (Bartosz, 1995; Foyer i Noctor, 2005). Te częściowo zredukowane lub aktywowane pochodne tlenu odgrywają podwójną rolę w żywych komórkach. Rośliny w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe produkują w dużej ilości RFT takie jak tlen singletowy $^1O_2$, anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{-\bullet}$, rodnik hydroksylowy $OH^\bullet$, rodnik wodoronadtlenkowy $OH_2^\bullet$ i nadtlenek wodoru $H_2O_2$. Wszystkie one mogą być źródłem **stresu oksydacyjnego**, co rozumiemy jako niekontrolowane utlenianie różnych składników komórkowych – prowadzące do uszkodzeń, a nawet śmierci komórki (Mittler, 2004). Z drugiej strony wytwarzane z "fizjologicznie dopuszczalną" intensywnością cząsteczki te działają jako czynniki sygnalizacji stresu indukujące reakcje obronne oraz biorące udział w nabywaniu tolerancji na czynnik stresujący. Produkcja podwyższonej ilości RFT jest jedną z najwcześniejszych reakcji uruchamianych w komórkach organizmów roślinnych pod

wpływem stresów abiotycznych (Lopez-Cruz i in., 2017) oraz podczas interakcji pomiędzy rośliną-gospodarzem i patogenem (Wojtaszek, 1997; van Camp i in, 1998; Bolwell, 1999; Sudha i Ravishankar, 2002). Powstałe RFT mogą bezpośrednio uszkadzać komórki patogenu penetrujące tkankę gospodarza, a także mogą pełnić w roślinie funkcję przekaźnika informacji wewnątrzkomórkowej i tkankowej, indukując: programowaną śmierć komórki (PCD, ang. *Programmed Cell Death*) (Pellinen i in., 2002), lokalną reakcję nadwrażliwości (HR, ang. *Hypersensitive Response*) (Baker i Orlandi, 1995), ogólną systemiczną odporność nabytą (SAR, ang. *Systemic Acquired Resistance*) (Chen i in., 1993; Kuźniak i Urbanek, 2000) oraz systemiczną nabytą aklimację (SAA, ang. *Systemic Acquired Acclimation*) (Karpiński i in, 1999). Badania Dyda i in. (2018) wykazały, że podczas infekcji *M. nivale* uruchamiane są zarówno lokalne, jak i systemiczne reakcje odpornościowe.

**Nadtlenek wodoru** może pełnić rolę cząsteczki sygnałowej w uruchamianiu reakcji obronnych zarówno na stresy biotyczne jak i abiotyczne (Vranová i in., 2002; Mittler, 2002; Laloi i in., 2004; Mittler i in., 2004) oraz uczestniczy w uruchamianiu tolerancji krzyżowej. Jego rola w reakcjach odpornościowych roślin na infekcję patogenu polega między innymi na stymulowaniu powstawania peroksysomów, utlenianiu cząsteczek podczas programowanej śmierci komórki, modulacji ekspresji genów odpornościowych w tym kodujących enzymy antyoksydacyjne, aktywacji kanałów wapniowych, aktywacji kaskady kinaz typu MAP (ang. *Mitogen-Activated Protein kinases*), indukcji syntezy roślinnych białek związanych z patogenezą PR (ang. *Pathogenesis Related Proteins*) oraz produkcji fitoaleksyn i hormonów roślinnych (Kuźniak i Urbanek, 2000; Ślesak i in., 2007). Bezpośrednie, toksyczne działanie nadtlenku wodoru na grzyby chorobotwórcze może polegać na ograniczaniu wzrostu ich grzybni i hamowaniu kiełkowania zarodników (Kuźniak i Urbanek, 2000). Wraz z innymi RFT, nadtlenek wodoru wpływa także na procesy związane ze wzmacnianiem ściany komórkowej: lignifikację, tworzenie *papillae* oraz sieciowanie składników ściany, między innymi białek bogatych w hydroksyprolinę i prolinę oraz innych oligomerów (Kuźniak i Urbanek, 2000). Takie wzmocnienie barier komórkowych może ograniczać dostępność składników odżywczych dla patogenu oraz ograniczać wnikanie toksyn i enzymów wytwarzanych przez patogen do tkanek roślinnych. Podwyższoną zawartość $H_2O_2$ oraz podwyższoną aktywność peroksydazy stymulującą procesy lignifikacji ściany komórkowej stwierdzono między innymi w liściach pomidora traktowanych toksynami pochodzącymi z *Fusarium* (Kuźniak i in., 1999). Oprócz udziału w reakcjach związanych z patogenezą, nadtlenek wodoru pełni istotną funkcję między innymi w procesie aklimacji roślin do czynników stresowych często występujących w okresie zimy: niskich temperatur, ograniczonego dostępu światła oraz nadmiaru wody (Okpodu i in., 1996; Kuźniak i Urbanek, 2000). Nadtlenek wodoru działa niespecyficznie, ale w literaturze dyskutowana jest możliwość jego działania specyficznego (Neill i in., 2002; Pastori i Foyer, 2002; Torres i in., 2006) w kontekście zależności od miejsca generowania tej RFT oraz jej interakcji ze specyficznymi cząsteczkami: kwasem salicylowym (SA), tlenkiem azotu (NO), etylenem, auksynami i kwasem abscysynowym (ABA).

Wysokie stężenie RFT może być szkodliwe nie tylko dla komórek patogenu, ale także dla samej rośliny. Nagromadzenie RFT w komórce przesuwa równowagę procesów oksydo-redukcyjnych na korzyść procesów utleniania i może stać się przyczyną stresu oksydacyjnego. Aby nie doszło do oksydatywnego niszczenia komórek, poziom RFT musi być precyzyjnie kontrolowany przez **układ antyoksydacyjny**, złożony z komponentów enzymatycznych i nieenzymatycznych. Nieenzymatyczne antyoksydanty to kwas askorbinowy, glutation, tokoferole, ferredoksyny, flawonoidy, kwasy fenolowe oraz karotenoidy. Do enzymatycznych antyoksydantów zaliczamy specyficzne białka, usuwające RFT często przy współudziale nieenzymatycznych elementów, między innymi dysmutazę anionorodnika ponadtlenkowego (SOD), katalazę (CAT), peroksydazę klasy III (POX) oraz

peroksydazę askorbinianową (APX) (Kornaś i in., 2010). **Dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego** to metaloproteiny przekształcające na drodze dysmutacji anionorodnik ponadtlenkowy w nadtlenek wodoru i tlen. Forma manganowa Mn-SOD związana jest najczęściej z mitochondrialną stromą oraz ciałkami mikrosomalnymi. Z kolei forma żelazowa Fe-SOD związana jest z plastydami, głównie chloroplastami (van Camp i in., 1998). Forma miedziowo-cynkowa Cu/Zn-SOD jest obecna w największych stężeniach w tkankach roślinnych i występuje w cytozolu, w tylakoidach i stromie chloroplastów, w mitochondriach i peroksysomach oraz w apoplaście (Mittler i in., 2002). Aktywność SOD w wielu przypadkach może wpływać na odporność roślin na niską temperaturę (Fe-SOD), patogeny (Mn-SOD) oraz stres fotooksydacyjny (Hayakawa i in., 1984; Tsang i in., 1991; Bowler i in., 1994; van Camp i in., 1994). **Katalaza** jest głównym i powszechnie występującym antyoksydantem o bardzo wysokiej aktywności oraz efektywności i należy do enzymów bezwzględnie swoistych przeprowadzających reakcję dysproporcjonowania wyłącznie nadtlenku wodoru. Akumulacja nadtlenku wodoru powyżej pewnego poziomu może indukować ekspresję genów katalazy, co z kolei przyczynia się do utrzymywania RFT na względnie stałym poziomie (Neill i in., 2002). Podwyższona aktywność katalazy może w niektórych przypadkach przyspieszać wzrost patogenu (Mayer i in., 2001). Zanotowano także zmiany aktywności CAT pod wpływem toksyn i innych związków produkowanych przez grzyby, rosnących zarówno na świetle, jak i w ciemności. Aktywność CAT może wzrastać także pod wpływem aklimacji do niskich temperatur (Scandalios i in., 1997). Zarówno zbyt niskie, jak i zbyt wysokie stężenie nadtlenku wodoru może hamować działanie katalazy. Niektóre **peroksydazy** oprócz dekompozycji nadtlenku wodoru pełnią także rolę białek PR, biorąc pośrednio udział we wzmacnianiu ścian komórkowych: lignifikacji, mostkowaniu fenoli i glikoprotein oraz w suberyzacji (Ros Barceló i Aznar-Asensio, 2002; Fecht-Christoffers i in., 2006). Peroksydazy biorące udział w biosyntezie polifenoli ściany komórkowej są pośrednio źródłem anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenku wodoru (Pietras i in., 1997; Fecht-Christoffers i in., 2006). Ze względu na sekwencję aminokwasową, roślinne peroksydazy dzieli się na trzy klasy: klasę I zawierającą wewnątrzkomórkowe peroksydazy pochodzenia prokariotycznego w tym peroksydazę askorbinianową, klasę II obejmującą peroksydazy obecne w tkankach grzybów oraz klasę III zawierającą typowe peroksydazy roślinne (de Gara, 2004). We wcześniejszych badaniach udokumentowano niższy poziom stężenia nadtlenku wodoru i wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych w hartowanych niską temperaturą siewkach pszenżyta ozimego tolerancyjnych na *M. nivale* w porównaniu do wrażliwych (Gołębiowska i in., 2011).

Niekontrolowana akumulacja RFT prowadzi do uszkodzenia membran i układu fotosyntezy na poziomie komórkowym (Hussain i in., 2018). W konsekwencji następuje hamowanie fotosyntezy, dysfunkcja metaboliczna i uszkodzenia struktur komórkowych, co przyczynia się do zaburzeń wzrostu, zmniejszenia płodności i przedwczesnego starzenia rośliny. Negatywny wpływ stresu abiotycznego i biotycznego na fotosyntezę jest szeroko badany, a **pomiar fluorescencji chlorofilu** okazał się skutecznym i powtarzalnym narzędziem do oceny wskaźnika podatności roślin na niską temperaturę (Rizza i in., 2001; Ehlert i in., 2008) oraz pleśń śniegową (Gołębiowska i Wędzony, 2009; Szechyńska i in., 2015; Dyda i in., 2018). Metoda ta odzwierciedla podatność na uszkodzenia fotosystemu II (PSII) w łańcuchach transportu elektronów fotosyntezy (Maxwell i Johnson, 2000). Zdolność rośliny do właściwego utrzymania fotosyntezy ma zasadnicze znaczenie dla obrony. To, czy zaobserwowany wpływ na fotosyntezę jest zaprogramowaną częścią odpowiedzi obronnej, czy też jedynie produktem ubocznym, pozostaje jeszcze do ustalenia.

W odpowiedzi na infekcję grzybami i inne stresy rośliny wyższe mogą produkować specjalne białka należące do **białek związanych z patogenezą** (białka PR), które są klasyfikowane jako rodziny białek PR1-17 (Okushima i in., 2000). Ulegają one ekspresji

głównie w liściach, ale również w innych organach (Van Loon 1997, 2006). Między innymi **glukanazy** (PR2) i **chitynazy** (PR3, 4, 8 i 11) przyczyniają się do degradacji ściany komórkowej grzybów, podczas gdy białka PR1, peroksydazy (PR11) lub taumatyny działają jako antybiotyki, wpływając na przepuszczalność błon patogenu i inhibitory proteaz grzybowych. Ich aktywność może hamować postęp patogenezy/infekcji (Van Loon i Van Strien, 1999). Białka PR mogą być częścią pierwszej bariery obronnej, ponieważ są wytwarzane w apozycjach ścian komórkowych we wczesnym stadium patogenezy przed bezpośrednim kontaktem patogenu z gospodarzem. Sugeruje się także, że mogą odgrywać rolę w systemowej nabytej oporności (Tuzun i Somanchi, 2006). Hartowanie zwiększa odporność na pleśń śniegową - stwierdzono silniejszą i szybszą transkrypcję genów kodujących różne białka PR w roślinach hartowanych, w porównaniu z roślinami niehartowanymi pszenicy ozimej po inokulacji *M. nivale* (Ergon i in., 1998; Hiilovaara-Teijo i in., 1999; Gaudet i in., 2000; Kuwabara i in., 2002; Gaudet i in., 2003a, b). Jednak całkowity wpływ hartowania na aktywność PR ujawnia się szczególnie po inokulacji rośliny (Ergon i in., 1998; Gaudet i in., 2000). Wykazano, że białka PR akumulujące się podczas hartowania w apoplaście siewek żyta ozimego wykazują aktywność glukanaz i chitynaz dodatkowo do ich aktywności chroniących roślinę przed zamarzaniem (Hiilovaara-Teijo i in., 1999, Yeh i in., 2000) w przeciwieństwie do białek PR produkowanych w wyższych temperaturach. Dodatkowo, białka działające przeciw zamarzaniu (ang. *Anti-Freeze Proteins*, AFP) zidentyfikowane u żyta ozimego stanowią izoformy białek PR specyficznie indukowanych w niskiej temperaturze (Yeh i in., 2000). Ponadto w doświadczeniach na pszenicy ozimej stwierdzono obecność białka podobnego do taumatyny akumulowanego pod wpływem niskiej temperatury (Kuwabara i in., 2002). Transkrypcja genu defensyny, purotioniny i LTP (białka przenoszące lipidy) osiągnęła maksimum po 2-3 tygodniach hartowania i pozostawała stała aż do 7 dni w trakcie rozhartowywania (Gaudet i in., 2003a). Geny tych białek nie wykazywały podwyższonej ekspresji w roślinach niehartowanych. W badaniach innych autorów zaproponowano potencjalną rolę w odpowiedzi obronnej na infekcję *M. nivale* dla chitynazy, endochitynazy, 1,3-β glukanazy u żyta ozimego (Hiilovaara-Teijo i in., 1999, Yeh i in., 2000); chitynazy, endochitynazy, 1,3-β-glukanazy, białka PR1-a i peroksydazy u pszenicy ozimej (Ergon i in., 1998) oraz białka podobnego do taumatyny u pszenicy ozimej (Kuwabara i in., 2002). Przewidywana masa cząsteczkowa tych białek mieściła się w zakresie od 13 do 50 kDa.

Różne czynniki stresowe wykazują pewne podobieństwa w regulacji **ekspresji genów**. Wiele genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie komórkowym ulega ekspresji różnicowej po stresie i wykazano, że modulacja niektórych czynników transkrypcyjnych (TF) związanych ze stresem indukuje zmiany poziomu metabolitów (Conde i in., 2011; Jeon i in., 2013).

W badaniach użyto unikalnego materiału roślinnego jakim są **linie podwojonych haploidów** (DH, ang. *Doubled Haploids*). Rośliny DH oprócz wykorzystania w hodowli roślin i bioinżynierii są również wykorzystywane do podstawowych badań fizjologicznych, genetycznych i biochemicznych. Jako całkowicie homozygotyczne organizmy o stabilnym genomie mogą stanowić obiekt trwałego mapowania oraz mogą służyć do integracji map genetycznych i fizycznych. Mają szerokie zastosowanie w genetyce cech ilościowych, dając wiarygodne informacje na temat lokalizacji głównych genów i **miejsc QTL** (ang. *Quantitative Trait Loci*) dla wielu cech botanicznych, fizjologicznych i agronomicznych. Linie DH dają także możliwość poprawy selekcji i możliwość wczesnej oceny cech ilościowych. W opisywanych badaniach wykorzystano linie DH wyselekcjonowane jako tolerancyjne i wrażliwe na niską temperaturę, mróz i różową pleśń śniegową. Populacje linii DH zostały wytworzone metodą hodowli pylników w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk dla pszenżyta ozimego (Hewo x Magnat)

(Szechyńska i in., 2011) i jęczmienia ozimego (Gołębiowska i in., 2017). W Instytucie Hodowli Roślin (Institute of Plant Breeding) w Hohenheim (Niemcy) wyprowadzono populację mapującą dla pszenżyta ozimego Saka x Modus na drodze zapylania mieszańca tych odmian kukurydzą. Najważniejszym kryterium preselekcji materiałów rodzicielskich była wysoka wartość ekonomiczna w okresie wyprowadzania tych populacji, w szczególności potencjał plonów i odporność na choroby. Kolejnym kryterium wyboru były wyniki testów tolerancji na pleśń śniegową przeprowadzonych w pracy doktorskiej (Gołębiowska i Wędzony, 2009; Dubas i in., 2011; Gołębiowska i in., 2011).

## Cel badań

W przedstawianej pracy badawczej ujętej w publikacjach naukowych stanowiących główny dorobek naukowy, postawiono **hipotezę badawczą**, że genotypy pszenżyta ozimego różnią się poziomem indukowanej niską temperaturą tolerancji siewek na różową pleśń śniegową, a także, że to zróżnicowanie znajduje odzwierciedlenie w różnicach zawartości i aktywności białek związanych z patogenezą oraz komponentów układu antyoksydacyjnego. Dodatkowo weryfikowano, czy podobne procesy mogą być związane z indukowaną niską temperaturą tolerancją na mróz w siewkach jęczmienia ozimego.

Celem cyklu przeprowadzonych badań ujętych w publikacjach wymienionych jako główne osiągnięcie naukowe była analiza wybranych zmian molekularnych biorących udział w aklimacji zbóż do chłodu oraz w indukowanej niską temperaturą tolerancji krzyżowej na różową pleśń śniegową wywołaną przez *Microdochium nivale* oraz na mróz.

Cele szczegółowe prowadzonych prac eksperymentalnych obejmowały:

- Przeprowadzenie **wieloletnich testów tolerancji** na *M. nivale* dla dwóch populacji mapujących pszenżyta ozimego Hewo x Magnat oraz SaKa 3006 x Modus, złożonych z linii podwojonych haploidów (DH);
- Identyfikację ***loci* cech ilościowych** (QTL) związanych z tolerancją pszenżyta ozimego na *M. nivale* z wykorzystaniem populacji mapującej linii DH SaKa 3006 x Modus;
- Analizę wpływu hartowania niską temperaturą, a także zaciemnienia i wysokiej wilgotności imitujących warunki panujące pod okrywą śniegową oraz kombinacji tych czynników z infekcją *M. nivale* w siewkach genotypów zróżnicowanych pod względem tolerancji na *M. nivale*, wyselekcjonowanych z badanych populacji mapujących, na **białka związane z patogenezą**:
    - Aktywność chitynaz i glukanaz
    - Względną ekspresję genów katalazy *cat1*, peroksydazy tioredoksynowej *Tsa* oraz białka związanego z patogenezą *PR1*
- Analizę wpływu hartowania niską temperaturą, a także zaciemnienia i wysokiej wilgotności imitujących warunki panujące pod okrywą śniegową oraz kombinacji tych czynników z infekcją *M. nivale* w siewkach linii DH zróżnicowanych pod względem tolerancji na *M. nivale*, wyselekcjonowanych z badanych populacji mapujących, na **komponenty układu antyoksydacyjnego**:
    - Stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (ang. *Thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS)

- Aktywność izoform peroksydaz (POX)
- Aktywność izoform dysmutaz anionorodnika ponadtlenkowego (SOD)
- Aktywność katalaz (CAT)
- Zawartość kwasów fenolowych

- Analizę wpływu hartowania niską temperaturą na fluorescencję chlorofilu, **aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz wzór profilów białkowych** dla siewek linii podwojonych haploidów jęczmienia ozimego tolerancyjnych i wrażliwych na mróz.

## Dyskusja wyników badań

### Testy porażenia oraz identyfikacja *loci* cech ilościowych (QTL) tolerancji pszenżyta ozimego na *M. nivale* dla siewek populacji mapującej linii DH Modus x SaKa 3006

Ze względu na złożoność mechanizmów tolerancji, słabo poznane uwarunkowania genetyczne oraz silne interakcje z warunkami pogodowymi w okresie zimowym, trudno jest ocenić odporność odmian pszenżyta na patogeny grzybowe za pomocą konwencjonalnych metod inokulacji. Jednocześnie wybór odmian zbóż zawierających geny odporności na infekcję jest najbardziej ekonomicznym i przyjaznym dla środowiska sposobem hodowli oraz kontroli porażeń. Dlatego celem podjętych badań (Szechyńska i in., 2011; **publikacja naukowa B1**) była identyfikacja *loci* cech ilościowych (QTL, ang. *Quantitative Trait Loci*) związanych z komponentami tolerancji pszenżyta ozimego na różową pleśń śniegową dla populacji mapującej złożonej z 90 linii podwojonych haploidów (DH), pochodzących ze skrzyżowania odmian rodzicielskich: Modus (tolerancyjna na *M. nivale*) i SaKa 3006 (wrażliwa). Odmiany rodzicielskie zostały wybrane na podstawie wyników testów tolerancji opisanych w pracy doktorskiej i opublikowanych w artykule naukowym (publikacja naukowa D1). W przedstawianych badaniach testy tolerancji wykonano dla całej nowej populacji mapującej standardową metodą komorową zastosowaną we wcześniejszych pracach oraz przy użyciu tego samego wysoce patogenicznego izolatu grzyba (szczep 38z/5a/01).

Obserwowano szeroki zakres tolerancji na *M. nivale*; 23% linii miało niższą zdolność przetrwania niż tolerancyjna odmiana Modus, 43% nie różniło się poziomem tolerancji od siewek odmiany Modus, a 20% linii było w pełni zregenerowanych po infekcji. W badaniach przeprowadzonych przez Dyda i in. (2018) izolat 38z/5a/01 wykazał najwyższą zdolność patogeniczną, a zastosowanie metody komorowej inokulacji dało najbardziej zróżnicowane wyniki poziomu tolerancji dla populacji mapującej linii DH Hewo x Magnat.

Mapowanie o wysokiej rozdzielczości przeprowadzono przy użyciu 1518 markerów molekularnych metodami technologii DArT (ang. *Diversity Arrays Technology*), prostych sekwencji powtórzeniowych (SSR, ang. *Simple Sequence Repeats*) oraz polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (AFLP, ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Otrzymana mapa obejmuje dystans obejmujący łącznie 2197 cM regionów genomowych, ze średnim przedziałem wynoszącym 1,44 cM pomiędzy sąsiednimi lokalizacjami markerów. Najwyższa gęstość markerów została ustalona na grupach sprzężeń odpowiadającym chromosomom żyta 4R, 5R, 6R i 7R.

Złożone mapowanie interwałowe (CIM, ang. *Composite Interval Mapping*), wykonane dla 14 grup sprzężeń odpowiadających chromosomom pszenicy i 7 grup sprzężeń odpowiadających chromosomom żyta, nie ujawniła w badanej populacji mapującej miejsc QTL dla ilości zregenerowanych roślin po infekcji. Natomiast wykryto dwa miejsca QTL

na grupach sprzężeń odpowiadających chromosomom pszenicy 2A i 3B (wokół regionu *Xbarc212* oraz *wPt-6802*, odpowiednio), znajdujące się w podobnej pozycji, dla dwóch cech dotyczących **liczby zregenerowanych liści** roślin zregenerowanych po infekcji (cechy 1 i 4, Tab. 2). Inne miejsca QTL dla tej cechy zostały wykryte na grupie sprzężeń odpowiadającej chromosomom 3B (w pobliżu *wPt-4625*) i 5B (w pobliżu *wPt-9872*). Zidentyfikowane miejsca QTL na grupie sprzężeń odpowiadającej chromosomom 3B i 5B były zgodne z wykrytymi przez innych autorów QTL odporności na chorobę plamistą wywołaną przez *Stagonospora nodorum* u pszenżyta i pszenicy (Reszka i in., 2007). W pobliżu regionu między lokalizacjami *Xgwm533.1* i *Xgwm493* na grupie sprzężeń odpowiadającej chromosomowi 3B inni autorzy znaleźli region zawierający QTL związany z odpornością na rdzę wywołaną przez *Fusarium sp.* u odmian pszenicy Ning894037 i Wangshuibai (Jia i in., 2005; Shen i in., 2006). Carter i in. (2009) zmapował QTL związane z odpornością na rdzę plamistą na grupie sprzężeń odpowiadającej chromosomowi pszenicy 3B. Powiązania

**Tabela 2. Wyniki analizy CIM dla najważniejszych miejsc QTL zidentyfikowanych dla badanych cech pszenżyta ozimego (źródło: Szechyńska i in., 2011).**

| Cecha | QTL | Chromosom | Marker | Pozycja QTL (cM)[a] | LOD | $R^2$ (%) | Add[b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ilość zregenerowanych liści/roślin po infekcji | 1 | 2A | Xbarc212 | 5,2 | 3,66 | 11,44 | 0,3457 |
| | 2 | 3B | wPt-6802 | 25,9 | 3,61 | 11,29 | -0,3458 |
| | 3 | 3B | wPt-4625 | 31,5 | 3,03 | 9,61 | -0,3170 |
| | 4 | 5B | wPt-9872 | 32,9 | 3,17 | 10,93 | 0,3343 |
| Ilość zregenerowanych liści/roślin kontrolnych | 1 | 1B | rPt-399959 | 87,8 | 7,82 | 27,54 | 0,4384 |
| | 2 | 7R | rPt-399750 | 11,3 | 3,85 | 11,61 | -0,2862 |
| Procent przeżywalności roślin kontrolnych | 1 | 2B | rPt-509666 | 56,7 | 3,42 | 12,57 | -0,0121 |
| Ilość zregenerowanych liści/roślin po infekcji | 1 | 2A | Xbarc212 | 5,2 | 6,27 | 20,35 | 0,3455 |
| | 2 | 3B | wPt-6802 | 25,9 | 4,58 | 14,22 | -0,3324 |
| Ilość zregenerowanych liści/roślin kontrolnych | 1 | 5A | Xwmc713 | 0 | 4,18 | 12,51 | -0,2900 |
| | 2 | 1B | rPt-399959 | 83,8 | 7,49 | 25,78 | 0,4226 |
| | 3 | 7B | wPt-3723 | 84,1 | 3,36 | 10,01 | 0,2567 |
| Wysokość zregenerowanych roślin po infekcji | 1 | 5A | rPt-389308 | 7,9 | 6,59 | 21,02 | 0,6645 |
| Wysokość zregenerowanych roślin kontrolnych | 1 | 5A | rPt-389308 | 7,9 | 3,60 | 10,9 | 0,5601 |
| | 2 | 7B | wPt-9880 | 116,4 | 3,20 | 9,61 | 0,5251 |
| Sucha masa zregenerowanych roślin po infekcji | 1 | 6A | Xgwm1009 | 55,6 | 3,40 | 12,48 | -0,0175 |
| | 2 | 6A | rPt-507997 | 64,3 | 5,75 | 20,08 | -0,0255 |
| Sucha masa zregenerowanych roślin kontrolnych | 1 | 3A | Xcfa2193 | 106,9 | 4,54 | 16,47 | 0,0122 |

$R^2$ (%), procent zmienności fenotypowej wyjaśniony przez dane miejsce QTL
Add – efekt addytywny miejsc QTL
a pozycja miejsca QTL od pierwszego markeru w centrymorganach
b wartość pozytywna oznacza że allel z odmiany Modus podności wartość cechy

te sugerują, że choroby grzybicze mogą być kontrolowane przez zbliżone *loci* u pszenicy i pszenżyta. Kruse i in. (2017) zidentyfikowali kilka nowych QTL z niewielkimi efektami u pszenicy, z czego jeden dla tolerancji pleśni śniegowej, wywołanej przez różne grzyby patogeniczne, na grupie sprzężeń 6B, i jeden wspólny dla tolerancji pleśni śniegowej i tolerancji mrozu na grupie sprzężeń 5A. Dyda i in. (2018) zidentyfikowali najwięcej miejsc QTL związanych z tolerancją pszenżyta ozimego na *M. nivale* na grupie sprzężeń 4R i 6R.W badaniach zidentyfikowano również miejsca QTL związane z **wysokością i suchą masą siewek** zregenerowanych po infekcji (Tab. 2). Z kolei miejsca QTL opisujące ogólną żywotność nieinokulowanych siewek kontrolnych były kontrolowane głównie przez genom pszenicy – zidentyfikowano je na grupach sprzężeń 1B, 2B, 3A, 5A, 7B i 7R.

**Podsumowując, wyniki były zgodne z obserwacją, że tolerancja pszenżyta na *M. nivale* ma charakter poligenowy, a częściowe składniki tolerancji tj. potencjalne miejsca QTL, wykryto na grupach sprzężeń 1B, 2A, 3A, 3B, 5A, 5B, 6A, 6B i 7B przy wartości LOD w zakresie od 3,03 do 7,82.**

## Analiza zmian aktywności chitynaz i glukanaz w siewkach odmian pszenżyta Hewo i Magnat zróżnicowanych pod względem tolerancji na *M. nivale*

Aktywność dwóch białek związanych z patogenezą: β-1,3-glukanazy i chitynazy badano fluorymetrycznie, spektrofotometrycznie oraz na żelach poliakrylamidowych w ekstraktach liści siewek modelowych odmian pszenżyta Magnat (półkarłowej, wysokoplennej, wrażliwej na *M. nivale*) oraz Hewo (długosłomej, tolerancyjnej na *M. nivale*). Badano siewki niehartowane oraz hartowane niską temperaturą (4 tygodnie w 4°C), a także siewki po 7 dniach od okrycia sztuczną okrywą śniegową oraz 1, 3, 5 i 7 dni po inokulacji grzybnią *M. nivale* pod okrywami (Żur i in., 2013; **publikacja naukowa B2**).

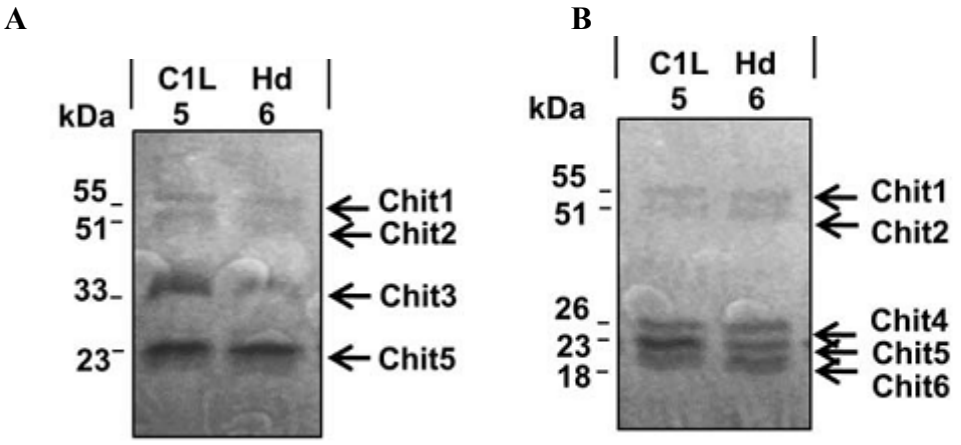
Hartowanie spowodowało zahamowanie całkowitej aktywności glukanaz i chitynaz w siewkach obu odmian do tego samego poziomu; zmiany te prawdopodobnie pokrywają się ze zmienionym metabolizmem. Ta obserwacja nie zgadza się z wynikami Ergon i in. (1998) i Gaudet i in. (2000; 2003a,b), którzy wykazali nagromadzenie niektórych transkryptów mRNA chitynazy i glukanazy w siewkach pszenicy ozimej zarówno po hartowaniu, jak i po infekcji grzybiczej. Zachowanie się pojedynczych izoform chitynazy w obrębie tej samej rośliny może jednak być różnie regulowane (Takenaka i in., 2009).

W podjętych badaniach wykryto 3 izoformy glukanazy: ~36 kDa (Glu1) u odmiany tolerancyjnej oraz ~36k Da (Glu2) i ~55 kDa (Glu3) u odmiany wrażliwej; ich aktywność zmieniała się w różny sposób pod wpływem hartowania. Mimo spadku aktywności enzymu po hartowaniu, obserwowano stopniowy wzrost całkowitej aktywności beta-1,3-glukanazy w roślinach po inokulacji. Jednak to zjawisko wydaje się być związane z procesem fizjologicznym, nie wykazano wpływu typu genotypu. Jednakże bardziej szczegółowa analiza aktywności poszczególnych izoform może dać więcej informacji na temat ich roli w odpowiedzi na infekcję *M. nivale*. W badaniach Płażek i in. (2011) przedstawiono związek pomiędzy odpornością na *M. nivale* a wyższą całkowitą zawartością węglowodanów w liniach wsobnych ozimego żyta.

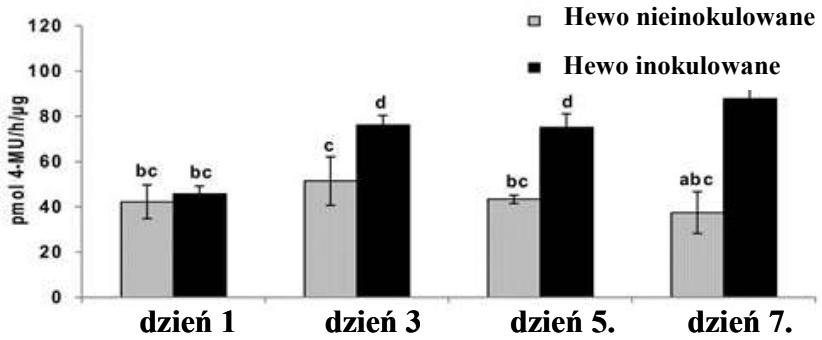
W przeciwieństwie do glukanazy, wzór izoform chitynazy był różny w siewkach badanych odmian (Rys. 1). Większą liczbę indywidualnych pasm chitynazowych wykryto u odmiany tolerancyjnej (pięć), w porównaniu do wrażliwej (cztery). Z wyjątkiem dwóch frakcji o wysokiej masie cząsteczkowej (Chit1 i Chit2), które wydają się być podobne u obu odmian, trzy izoformy o wielkości 18-26 kDa wykryto w siewkach odmiany Hewo (Chit4, Chit5 i Chit6), a tylko dwie chitynazy ~23 kDa i ~33 kDa obserwowano w siewkach odmiany Magnat (Chit3 i Chit5). Aktywności poszczególnych izoform nie były mierzone. Niemniej

jednak trudno byłoby powiązać je z całkowitą mierzoną aktywnością enzymu. Co więcej, przeciwstawne zachowanie niektórych izoform mogło spowodować pozorny brak jakiejkolwiek zmiany poziomu całkowitej aktywności enzymu. Aktywność poszczególnych izoform chitynazy może być maskowana przez sumę ich działań w danej próbie, dlatego są potrzebne dalsze szczegółowe badania metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D PAGE).

Po hartowaniu, inokulacja znacząco podniosła aktywność chitynaz w siewkach odmiany tolerancyjnej (Rys. 2). W przeciwieństwie do glukanaz, obserwowano znaczną interakcję z postępem czasu infekcji. Ich aktywność pozostawała wysoka nawet po tygodniu po zakażeniu. W przeciwieństwie do tego, zmiany w całkowitej aktywności chitynazy w inokulowanych siewkach genotypu wrażliwego nie były statystycznie istotne. Niestety, z powodu ograniczeń w ilości materiału nie było możliwości szczegółowego zbadania wzoru aktywności poszczególnych izoform chitynaz. Niemniej jednak z pewnością ich zachowanie w warunkach stresu biotycznego jest czymś bardziej złożonym. Literatura podaje wiele chitynaz o masie cząsteczkowej 28-35 kDa wykazujących działanie przeciwgrzybicze zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (przegląd w Ferreira i in., 2007; Kuwabara i in. 2009).




**Rysunek 1. Detekcja poszczególnych izoform chitynazy w hartowanych siewkach odmiany A) wrażliwej ma *M. nivale* w porównaniu do B) tolerancyjnej pszenżyta ozimego.** Ekstrakty siewek rozdzielono metodą SDS-PAGE na 12,5% żelach poliakrylamidowych, zawierających substrat enzymu glikolowaną chitynę (0,01%), a następnie wybarwiono 0,01% (w/v) Fluorescent Brightener 28 i obserwowano w świetle UV. C1L – kontrolne rośliny nie prehartowane i niehartowane, Hd – rośliny hartowane. Źródło: Żur i in., 2013.




**Rysunek 2. Zmiany całkowitej aktywności chitynazy w ekstraktach inokulowanych grzybnią *M. nivale* siewek odmiany tolerancyjnej Hewo po 1, 3, 5 i 7 dniach od inokulacji pod sztuczną okrywą imitującą śnieg.** Rośliny nieinokulowane rosły w tych samych warunkach, co rośliny inokulowane. Prezentowane dane stanowią średnie wartości z trzech replikacji biologicznych ± odchylenie standardowe. Różnymi literami oznaczono wartości, które wykazały istotne różnice w teście Duncan'a. Źródło: Żur i in., 2013.

Podsumowując, pomimo faktu, że hartowanie roślin spowodowało zahamowanie całkowitej aktywności chitynaz, otrzymane wyniki sugerują, że enzymy te mogą odgrywać rolę w obronie pszenżyta przeciwko infekcji *M. nivale*. **Po inokulacji aktywność chitynazy była wyraźnie indukowana w siewkach odmiany tolerancyjnej. Jednocześnie aktywność całkowitej β-1,3-glukanazy wydaje się być nie związana z infekcją obu testowanych odmian pszenżyta ani z ich genotypem.** Profil i/lub aktywność chitynaz w roślinach może być potencjalnym wskaźnikiem ich odporności /wrażliwości na *M. nivale*.

**Badania zmian poziomu ekspresji genów białek związanych z patogenezą w siewkach linii DH pszenżyta ozimego tolerancyjnych i wrażliwych na *M. nivale***

Celem dalszych badań podjętych w ramach projektu NCN Nr N N310 140902 było między innymi zidentyfikowanie potencjalnych genów zaangażowanych w zwiększoną tolerancję pszenżyta na *M. nivale*. W przedstawianym eksperymencie użyto czterech linii podwojonych haploidów (DH) o najwyższej i najniższej tolerancji na pleśń śniegową, wybranych na podstawie wielokrotnych testów w komorze chłodniowej przeprowadzonych dla całej populacji mapującej wyprowadzonej z odmian rodzicielskich Magnat (wrażliwa na *M. nivale*) i Hewo (tolerancyjna na *M. nivale*). Badano wpływ hartowania (4 tygodnie w 4°C) na względny poziom ekspresji genów peroksydazy tioredoksynowej *Tsa*, katalazy *cat1* oraz białka związanego z patogenezą *PR1* przy wykorzystaniu ilościowej reakcji odwrotnej transkryptazy Real-Time PCR (qPCR) (Gołębiowska-Pikania i Golemiec, 2015; **publikacja naukowa B3**).

Dla **peroksydazy tioredoksynowej Tsa oraz białka związanego z patogenezą PR1** wykazano wyższy względny poziom ekspresji genów w hartowanych siewkach genotypów tolerancyjnych Hewo i DH1 w porównaniu do siewek genotypów wrażliwych Magnat i DH92. Z kolei względny poziom ekspresji genów *cat1* i *Tsa* w liściach kontrolnych niehartowanych siewek pszenżyta wykazał słabą dodatnią korelację z podatnością roślin na różową pleśń śniegową. Hipotezę tę potwierdzają wyniki Szechyńskiej i in. (2015), którzy badając odmiany pszenżyta ozimego tolerujące zakażenie *M. nivale* potwierdzili zależny od genotypu wzrost ekspresji genów peroksyredoksyn wywołany przez niską temperaturę, jak również wyniki Gawrońskiej i Gołębiowskiej (2016) dotyczące całkowitej aktywności POX opisane poniżej.

Na podstawie powyższych wyników zasugerowano, że wskazane białka (Tsa i PR1) mogą być potencjalnymi kandydatami markerów podwyższonej tolerancji pszenżyta ozimego na niską temperaturę oraz, że mogą brać udział w odpowiedzi na infekcję *M. nivale*, jednakże konieczna jest dalsza weryfikacja wyników przeprowadzona po inokulacji.

**Analiza zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych w siewkach linii DH pszenżyta ozimego tolerancyjnych i wrażliwych na *M. nivale***

Celem badań podjętych w ramach projektu NCN Nr N N310 140902 było między innymi zidentyfikowanie potencjalnych markerów biochemicznych zaangażowanych w zwiększoną tolerancję pszenżyta na *M. nivale*. W przedstawianym eksperymencie użyto dwóch linii podwojonych haploidów (DH) o najwyższej (DH1, P = 38±10%,) i najniższej (DH92, P=71±19%) tolerancji na pleśń śniegową, wybranych na podstawie wielokrotnych testów w komorze chłodniowej przeprowadzonych dla całej populacji mapującej wyprowadzonej z odmian rodzicielskich Magnat (wrażliwa na *M. nivale*) i Hewo (tolerancyjna na *M. nivale*). Badano wpływ hartowania (4 tygodnie w 4°C), a także okrycia

roślin sztuczną okrywą imitującą pokrywę śniegową oraz inokulacji grzybnią *M. nivale* w liściach siewek, na poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), aktywność dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POX). Aktywność poszczególnych izoform SOD i POX mierzono na żelach poliakrylamidowych, a stężenie TBARS i aktywność CAT mierzono spektrofotometrycznie (Gawrońska i Gołębiowska-Pikania, 2016; **publikacja naukowa B4**).

Przeprowadzone badania wykazały odmienną reakcję genotypów wrażliwego i tolerancyjnego na zastosowane traktowania. Średnie stężenie TBARS wzrosło pod wpływem hartowania i inokulacji w siewkach obu odmian, ale było zawsze niższe w siewkach odmiany tolerancyjnej w porównaniu z wrażliwą, co sugeruje, że uszkodzenie tkanki było większe w roślinach drugiego genotypu. Inni autorzy wskazują, że RFT są czynnikiem wirulencji dla nekrotrofów (Dangl i in., 2001, Mengiste, 2012); są toksyczne nie tylko dla grzybów, ale także do struktur komórek roślinnych.

Dwie formy SOD: manganowa (MnSOD) oraz miedziowo-cynkowa (Cu/ZnSOD), zostały zidentyfikowane w ekstraktach liści obu linii DH. Aktywność MnSOD nie występowała w niehartowanych roślinach. Ekspozycja na niską temperaturę oraz okrycie roślin doprowadziło do wzrostu aktywności MnSOD w siewkach obu badanych genotypów, szczególnie w siewkach linii wrażliwej. Z kolei inokulacja roślin grzybnią obniżyła aktywność MnSOD w siewkach obu genotypów, szczególnie u linii tolerancyjnej. Wskazuje to na wyższy udział mitochondrialnych szlaków detoksykacji RFT w liściach siewek wrażliwej linii DH92 eksponowanych na niską temperaturę oraz infekcję *M. nivale*.

W liściach niehartowanych, hartowanych oraz rosnących pod okrywami roślin obu linii DH, Cu/ZnSOD była reprezentowana przez trzy izoformy, natomiast w liściach inokulowanych roślin przez cztery izoformy. W liściach niehartowanych roślin obu linii, średnia aktywność Cu/ZnSOD I była taka sama i wzrosła po ekspozycji na niską temperaturę w porównaniu z niehartowaną kontrolą. Ten wzrost był większy w siewkach tolerancyjnej linii DH1. Aktywność Cu/ZnSOD I nie zmieniła się po pokryciu roślin, ale spadek po ekspozycji na stres biotyczny i do podobnego poziomu odnotowano w siewkach obu linii DH. Bez hartowania aktywność Cu/ZnSOD II była taka sama w roślinach obu genotypów, a po hartowaniu wzrosła w porównaniu z niehartowanymi roślinami. Tej wzrost był większy dla tolerancyjnej linii DH1. Wynik ten może sugerować lepsze dostosowanie do niskiej temperatury linii tolerancyjnej. Inni autorzy również udokumentowali wzrost aktywności SOD po hartowaniu w siewkach pszenicy (Li i in., 2014) i pomidorów (Joe i in., 2012). Z kolei w prezentowanych badaniach przykrycie roślin połączone z inokulacją spowodowało spadek aktywności Cu/ZnSOD II u roślin obu genotypów, który był większy w liściach tolerancyjnego genotypu.

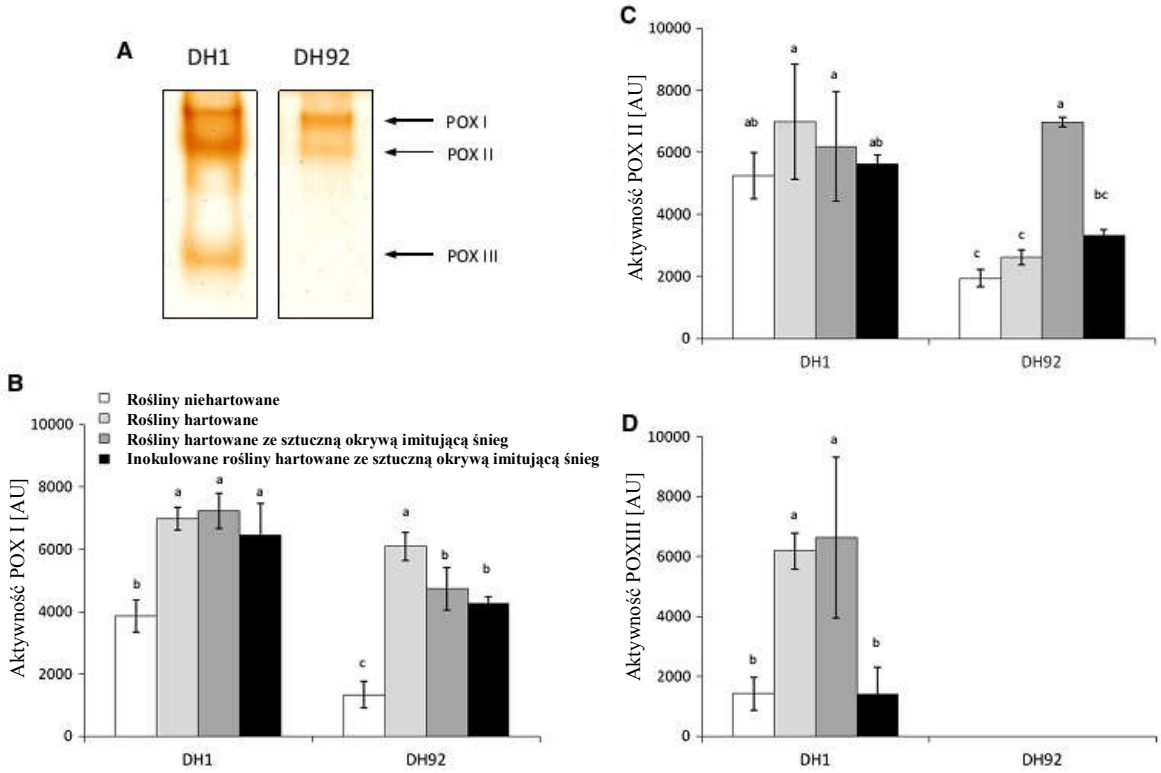
W liściach niehartowanych i hartowanych roślin aktywność Cu/ZnSOD III była podobna w roślinach obu genotypów. Dopiero przykrycie roślin spowodowało wzrost aktywności Cu/ZnSOD III, w porównaniu z roślinami hartowanymi, ale większy w siewkach DH92. Najwyższą aktywność Cu/ZnSOD III obserwowano w liściach inokulowanych siewek i była ona taka sama u obu genotypów. Aktywność Cu/ZnSOD IV nie była mierzalna w ekstraktach z liści niehartowanych, hartowanych oraz roślin ze sztuczną pokrywą śniegową. Wykryto ją tylko w liściach inokulowanych roślin i jej poziom był taki sam w siewkach obu genotypów.

W badaniach wykazano także zróżnicowaną indukcję aktywności CAT pomiędzy wrażliwym a tolerancyjnym genotypem. W niehartowanych roślinach tolerancyjnej linii DH1, aktywność CAT była niższa w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla DH92. Następnie aktywność enzymu została wzmocniona hartowaniem dla tolerancyjnego genotypu, ale nie dla wrażliwego, co sugeruje wyższą aktywność antyoksydacyjną siewek linii tolerancyjnej rosnących w niskiej temperaturze. Uzyskany wynik jest zgodny z wcześniejszymi wynikami

wykazującymi wyższą całkowitą aktywność CAT po hartowaniu w siewkach rodzicielskiej odmiany Hewo, w przeciwieństwie do Magnat (artykuł B3). Wzrost aktywności CAT w hartowanych siewkach pszenicy odpornej na mróz był obserwowany również w badaniach Janda i in. (2007). W przedstawianych badaniach okryte rośliny obu linii wykazały podobną aktywność CAT. Natomiast przykrycie roślin połączone z inokulacją spowodowało znaczny wzrost aktywności CAT u linii wrażliwej; u tych samych roślin obserwowano także znacznie wyższą aktywność MnSOD w porównaniu z genotypem tolerancyjnym.

Trzy izoformy POX zidentyfikowano w ekstraktach siewek linii tolerancyjnej oraz dwie izoformy w przypadku linii wrażliwej (Rys. 3A). Badane genotypy istotnie różniły się pod względem aktywności izoform POX. Nawet w warunkach kontrolnych (rośliny niehartowane), średnia aktywność POX I była wyższa w liściach linii DH1 niż notowana dla linii DH92. W ekstraktach liści obu linii aktywność POX I wzrosła po hartowaniu. Nie obserwowano natomiast żadnych zmian w aktywności POX I po przykryciu roślin i inokulacji w liściach linii tolerancyjnej; była ona jednak wyższa w liściach linii DH1 niż dla linii DH92. Natomiast w liściach wrażliwej linii stwierdzono spadek aktywności w okrytych, hartowanych roślinach oraz po inokulacji (Rys. 3B). W niehartowanych i hartowanych roślinach aktywność POX II była wyższa w siewkach linii tolerancyjnej w stosunku do wrażliwej. Jej aktywność nie uległa znaczącej zmianie po przykryciu i inokulacji siewek linii DH1. Nie zmieniła się również w siewkach DH92 po inokulacji, ale zwiększyła się po samym okryciu roślin hartowanych (Rys. 3C). Aktywność POX III nie występowała w ekstraktach liści wrażliwej linii, została odnotowana tylko w liściach linii tolerancyjnej, w której została wzmocniona przez niską temperaturę, a następnie zmniejszona przez inokulację do poziomu obserwowanego w optymalnych warunkach (Rys. 3D).

W badaniach Takashima i in. (2013), kationowa peroksydaza była związana z podstawową tolerancją *Betula japonica* na grzyb *Inonotus obliquus*. Podwyższoną aktywność POX obserwowano także u odmian pszenicy tolerancyjnych na rdzę liściową (Southerton i Deverall, 1990). W dalszych badaniach należałoby przeprowadzić analizę aktywności izoform POX w większym zestawie linii o różnym poziomie tolerancji oraz po różnej liczbie godzin/dni po inokulacji. Badania przeprowadzone przez Szechyńska i in. (2015) także potwierdzają zależną od genotypu indukcję niską temperaturą i warunkami świetlnymi podwyższoną ekspresję genów peroksydaz (askorbinianowej APX, glutationowej GPX oraz peroksyredoksyny PRX) w siewkach pszenżyta ozimego tolerancyjnych na *M. nivale*. Z kolei w liściach kompleksu *Lolium-Festuca* za markery odporności *M. nivale* uznano podwyższoną całkowitą aktywność peroksydaz oraz obniżoną całkowitą aktywność katalaz obserwowaną w krótkim czasie po inokulacji (Marzec-Schmidt i in. 2018).




**Rysunek 3. Pasma aktywności POX, wizualizowane przy zastosowaniu natywnej PAGE, w liściach siewek pszenżyta ozimego linii tolerancyjnej (DH1) i podatnej (DH92) na infekcję *M. nivale*. A)** Wybarwione prążki odpowiadające trzem izoformom POX. Do studzienek nakładano ekstrakty zawierające 8 µg rozpuszczalnego białka. Kwantyfikacja działań POX I **(B),** POX II **(C)** i POX III **(D)** w siewkach linii DH1 i DH92, poddanych trzem rodzajom traktowań: hartowaniu; hartowaniu a następnie okryciu sztuczna okrywą imitującą pokrywę śnieżną oraz hartowaniu, inokulacji, a następnie okryciu sztuczna okrywą imitującą pokrywę śnieżną. Wartości oznaczają średnią ± SD (n = 3). Litery nad słupkami oznaczają grupy jednorodne zgodnie z testem Duncana przy $p \leq 0,05$. Źródło: Gawrońska i Gołębiowska-Pikania, 2016.

**Podsumowanie:**

**W przedstawianych badaniach stężenie TBARS wzrosło pod wpływem hartowania i inokulacji u obu odmian, ale było zawsze niższe w siewkach linii tolerancyjnej w porównaniu z wrażliwą, co sugeruje, że uszkodzenie tkanki było większe w roślinach drugiego genotypu. Poziom aktywności Cu/ZnSOD I i II, CAT oraz POX II i III był wyższy po hartowaniu w siewkach linii DH1; wynik ten może sugerować lepsze dostosowanie do niskiej temperatury w przypadku linii tolerancyjnej na *M. nivale*. Aktywność POX I wykazała wyższą aktywność w siewkach genotypu tolerancyjnego pod okrywami, zarówno z jak i bez inokulacji, w porównaniu do genotypu wrażliwego. Aktywność POX III została wzmocniona przez stres abiotyczny w liściach siewek DH1, podczas gdy nie wykryto jej w siewkach genotypu wrażliwego w żadnym terminie eksperymentu. Podsumowując, wyższa aktywność antyoksydacyjna była związana z niższym uszkodzeniem tkanek linii DH tolerancyjnej na infekcję *M. nivale* podczas wzrostu w niskiej temperaturze oraz podczas infekcji.**

## Analiza zmian zawartości kwasów fenolowych w siewkach genotypów pszenżyta ozimego tolerancyjnych i wrażliwych na *M. nivale*

W dalszych badaniach (Gołębiowska-Pikania i in., 2019; **publikacja naukowa B6**), podjętych w ramach projektu NCN NN 140239, przeprowadzono analizę metodą HPLC

stężenia poszczególnych kwasów fenolowych, zarówno wolnych, jak i związanych ze ścianą komórkową, w siewkach odmian rodzicielskich Hewo i Magnat oraz linii DH1 i DH92. Badano siewki: 1) hartowane przez 28 dni w temperaturze 4°C; 2) kontrolne nie prehartowane i niehartowane, znajdujące się w tej samej fazie rozwoju, co siewki w pełni zahartowane 3) hartowane inokulowane grzybnią *M. nivale* po 21 dniach od inokulacji i wzrostu pod sztucznymi okrywami oraz 4) kontrolne hartowane nieinokulowane po 21 dniach wzrostu pod sztucznymi okrywami.

Wśród zidentyfikowanych kwasów fenolowych, najwyższe stężenia miały kwasy: ferulowy, rozmarynowy, chlorogenowy, synapinowy i trans-cynamonowy. Zawartość większości fenoli zależała od genotypu i warunków wzrostu. **Dwa kwasy związane z ścianą komórkową: synapinowy i trans-cynamonowy,** mogą być wskazane jako potencjalnie powiązane ze zwiększonym poziomem tolerancji siewek pszenżyta ozimego na różową pleśń śniegową. W badaniach nie wykazano korelacji pomiędzy całkowitym stężeniem kwasów fenolowych a poziomem tolerancji, jednak proporcja pomiędzy całkowitym poziomem kwasów fenolowych związanych ze ścianą komórkową a całkowitym poziomem wolnych kwasów fenolowych w niskiej temperaturze może odgrywać rolę w utrzymaniu kondycji roślin poprzedzającej infekcję *M. nivale*. Badania innych autorów (Płażek i in., 2018) również wykazały różnice w zawartości kwasów fenolowych związane z tolerancją na infekcję *M. nivale* w hybrydach *Lolium-Festuca*: wyższą zawartość kwasu salicylowego w liściach i węzłach krzewienia obserwowano u odpornego genotypu po 3 tygodniach hartowania w temperaturze 4°C, przy czym istotna wydaje się być także sama dynamika akumulacji badanych komponentów w tym całkowitej zawartości związanych ze ścianą komórkową kwasów fenolowych.

## Analiza zmian sprawności fotosystemu II, aktywności enzymów antyoksydacyjnych i profilów biakowzch siewek jęczmienia tolerancyjnych i wrażliwych na mróz

Zmiany w zawartości białek indukowane przez hartowanie zostały przeanalizowane metodą elektroforezy dwukierunkowej 2 DE w siewkach dziesięciu linii podwojonych haploidów (DH) jęczmienia ozimego, silnie zróżnicowanych pod względem poziomu tolerancji na mróz (Gołębiowska-Pikania i in., 2017; **publikacja naukowa B5**). Wśród 45 różnicujących białek zidentyfikowanych metodą MALDI-TOF/TOF, większość została sklasyfikowana jako związana z fotosyntezą, metabolizmem węglodowanów, reakcjami utleniania-redukcji oraz odpowiedzi na stres. Wśród zidentyfikowanych białek wykryto wyższą zawartość dużej i małej podjednostki RuBisCO, małej izoformy aktywazy RuBisCO, dwóch białek kompleksu wydzielającego tlen Oxygen-evolving enhancer protein, reduktazy Ferredoxin-NADP, hydroksylazy kwasów tłuszczowych zależnej od cytochromu P450 i białka 14-3-3, w hartowanych siewkach linii tolerancyjnej na mróz w porównaniu do wrażliwej. Z kolei w hartowanych siewkach linii tolerancyjnej obserwowano niższy względny poziom hipotetycznej β podjednostki syntazy $F_1$ ATP, mitochondrialnego białka AtMg00810 i małej podjednostki rybosomalnej metylotransferazy G. Wyniki badań proteomicznych uzupełniono oceną funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego, wykazując wyraźne różnice między badanymi genotypami w liczbie aktywnych centrum reakcji fotosystemu drugiego PSII ($RC/CS_m$). Ponadto analiza aktywności enzymów antyoksydacyjnych sugeruje znaczenie nadtlenku wodoru jako cząsteczki sygnałowej, prawdopodobnie uczestniczącej w inicjacji aklimatyzacji roślin wywołanej przez niską temperaturę. Inni autorzy wykazali, że utrata aktywności aktywazy RuBisCO, która odgrywa kluczową rolę w wiązaniu węgla, zmniejsza obronę za pośrednictwem JA (Mitra i Baldwin, 2014).

**W siewkach linii DH jęczmienia ozimego o wysokiej tolerancji na mróz, podczas hartowania temperatura 4°C generacji nadtlenku wodoru towarzyszyła bardziej stabilna aktywność CAT oraz wyższa aktywność SOD, podobnie, jak w badaniach przeprowadzonych na hartowanych siewkach pszenżyta ozimego (Gawrońska i Gołębiowska-Pikania, 2016, artykuł B4; Gołębiowska i in., 2011, artykuł D6).**

## Najważniejsze nowatorskie osiągnięcia prezentowanych badań

Prace badawcze podjęte w ramach głównego osiągnięcia naukowego pozwoliły na identyfikację częściowych składników (potencjalnych miejsc QTL) tolerancji pszenżyta ozimego na pleśń śniegową wywołaną grzybnią *M. nivale*, **na grupach sprzężeń 1B, 2A, 3A, 3B, 5A, 5B, 6A, 6B i 7B.**

Następnie przeprowadzono analizę komponentów odpowiedzialnych za utrzymanie stanu redoks w komórce. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że siewki genotypów tolerancyjnych cechowała podwyższona lub stabilna aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych: katalaz, peroksydaz oraz dysmutaz anionorodnika ponadtlenkowego, zarówno w niskiej temperaturze, jak i pod sztuczną okrywą śniegową oraz podczas infekcji. Z kolei w siewkach genotypów wrażliwych pszenżyta obserwowano wyższą akumulację nadtlenku wodoru oraz substancji TBARS. **Aktywność Cu/ZnSOD I i II, CAT oraz POX II i III wzrosła pod wpływem hartowania w siewkach tolerancyjnej linii DH1 i była wyższa w porównaniu do linii wrażliwej DH92. Wynik ten może sugerować lepsze dostosowanie do niskiej temperatury dla linii tolerancyjnej. Aktywność POX I wykazała wyższą aktywność w siewkach genotypu tolerancyjnego pod okrywami, zarówno z jak i bez inokulacji, w porównaniu do genotypu wrażliwego. Aktywność POX III została wzmocniona przez stres abiotyczny w liściach siewek DH1, podczas gdy nie wykryto jej w siewkach genotypu wrażliwego w żadnym terminie eksperymentu.**

Ponadto w badaniach wykryto istotne różnice w zawartości i/lub aktywności białek związanych z patogenezą. Dla **peroksydazy tioredoksynowej Tsa oraz białka związanego z patogenezą PR1** wykazano wyższy względny poziom ekspresji genów w hartowanych siewkach genotypów tolerancyjnych w porównaniu do wrażliwych. Siewki genotypów tolerancyjnych wykazały wyższy poziom aktywności **chitynaz.**

Siewki genotypów tolerancyjnych wykazały wyższy poziom dwóch kwasów fenolowych związanych ze ścianą komórkową (**synapinowego i trans-cynamonowego**) po hartowaniu niska temperaturą. Proporcja pomiędzy całkowitym poziomem kwasów fenolowych związanych ze ścianą komórkową a całkowitym poziomem wolnych kwasów fenolowych w niskiej temperaturze może odgrywać rolę w utrzymaniu kondycji roślin poprzedzającej infekcję *M. nivale*.

Przeprowadzone analizy siewek jęczmienia ozimego, podobnie, jak uzyskane wyniki badań dla siewek pszenżyta ozimego, także sugerują udział **adaptacji fotosystemu II, regulacji poziomu stężenia nadtlenku wodoru oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych i innych białek indukowanych niską temperaturą** w nabywaniu indukowanej chłodem tolerancji tego zboża na czynnik stresowy następujący po hartowaniu.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że indukowana niską temperaturą tolerancja krzyżowa zbóż na pleśń śniegową i niską temperaturę jest związana ze skuteczniejszą aktywacją układu antyoksydacyjnego, lepszym zachowaniem funkcji fotosyntetycznych, akumulacją niektórych kwasów fenolowych oraz białek związanych z patogenezą w liściach siewek tolerancyjnych w porównaniu do siewek podatnych. Niektóre z powyższych mechanizmów i zależności były postulowane wcześniej we własnych pracach (Gołębiowska i Wędzony, 2009; Gołębiowska

i in., 2011) oraz znalazły potwierdzenie w pracach innych autorów (Szechyńska-Hebda i in. 2013, 2015, 2016; Płażek i in, 2018; Marzec-Schmidt i in. 2018; Dyda i in, 2018).

Przeprowadzenie badań na liniach DH pozwalających na wielokrotne powtarzanie doświadczeń oraz wykorzystanie dużej różnorodności metod i zbadanie wielu aspektów procesu z wykorzystaniem takiego samego genetycznie materiału dodaje wartości prezentowanym wynikom. Dlatego wykorzystanie unikalnego materiału wytypowanego do doświadczeń we wcześniejszych badaniach pozwoliło znacznie poszerzyć wiedzę dotyczącą krzyżowej odporności na niskie temperatury i infekcję pleśnią śniegową. Niemniej dla potwierdzenia, że wyłonione mechanizmy mają powszechny charakter potrzebne jest przeprowadzenie badań w szerszym tle genetycznym.

Wiele przeprowadzonych badań jest kosztochłonnych i pracochłonnych, dlatego trudno je wykorzystać w praktycznej hodowli. Jednakże uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania pomiaru parametrów fluorescencji chlorofilu w roślinach hartowanych temperaturą 4°C, jako potencjalnego fizjologicznego wskaźnika poziomu tolerancji zbóż na pleśń śniegową oraz mróz.

## Literatura


Arseniuk E., Góral T. 2015. Triticale biotic stresses - known and novel foes. [W:] F. Eudes (Red) Triricale, ss. 83-108, Springer, Cham

Baker C.J., Orlandi E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 299-321

Bartosz G. 1995. Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN

Bateman G.L. 2008. Control of seed-borne *Fusarium nivale* on wheat and barley by organomercury seed treatment. Ann. Appl. Biol. 83(2): 245-250

Bolwell G.P. 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 287-294

Bowler C., van Camp W., van Montagu M., Inze D. 1994. Superoxide dismutase in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 13: 199-218

Browne R.A., Mascher F., Golebiowska G., Hofgaard I.S. 2006. Components of partial disease resistance in wheat detected in a detached leaf assay inoculated with *Microdochium nivale* using first, second and third expanding seedling leaves. J. Phytopathol. 154(4/5): 204-208

van Camp W., Willekens H., Bowler C., van Montagu M., Inze D., Langebartels C., Sandermann H. 1994. Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. Biotechnology 12: 1703-1714

van Camp W., van Montagu M., Inze D. 1998. $H_2O_2$ and NO: redox signals in disease resistance. Trends Plant Sci. 3: 330-334

Carter A.H., Chen X.M., Garland-Campbell K., Kidwell K.K. 2009. Identifying QTL for high-temperature adult-plant resistance to stripe rust (*Puccinia striiformisf. sp. tritici*) in the spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar ‘Louise’. Theor. Appl. Gen. 119: 1119-1128

Chen Z., Silva H., Klessing D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 262: 1883-1885

Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. 2006. Gene regulation during cold acclimation in plants. Physiol. Plantarum 126: 52-61

Cichy H., Maćkowiak W. 1993. Intravarietal differences in winter triticale resistance to snow mould - *Fusarium nivale*. Plant Breed. Acclim. Seed. Sci. 37(3): 115-119

Conde A., Chaves M.M., Geros H. 2011. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. Plant Cell Physiol. 52: 1583-1602

Dangl J.L., Jones J.D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411(6839): 826-833

Dubas E., Golebiowska G., Zur I., Wedzony M. *Microdochium nivale* (Fr., Samuels & Hallett): cytological analysis of the infection process in triticale (x *Triticosecale* Wittm.). 2011. Acta Physiol. Plant. 33(2): 529-537

Dyda M., Wąsek I., Tyrka M., Wędzony M., Szechyńska-Hebda M. 2018. Local and systemic regulation of PSII efficiency in triticale infected by the hemibiotrophic pathogen *Microdochium nivale*. Physiol. Plantarum, DOI: 10.1111/ppl.12760

Ehlert B., Hincha D.K. 2008. Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in *Arabidopsis* leaves. Plant Methods. 4(1): 12

Ergon Å., Klemsdal S.S., Tronsmo A.M. 1998. Interactions between cold hardening and *Microdochium nivale* infection on expression of pathogenesis-related genes in winter wheat. Physiol. Mol. Plant Pathol. 53: 301-310

Ergon Å., Skinnes H., Tronsmo A.M. 2003. Testing snow mould resistance of winter wheat: inoculation experiments with *Microdochium nivale* in the field. Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci. 53(3): 110-117

Ergon Å., Tronsmo, A.M. 2006. Components of pink snow mould resistance in winter wheat are expressed prior to cold hardening and in detached leaves. J. Phytopathol. 154 (3): 134-142

Fecht-Christoffers M.M., Führs H., Braun H.P., Horst W.J. 2006. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide - consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance. Plant Physiol. 140 (4): 1451-1463

Ferreira R.B., Monteiro S., Freitas R., Santos C.N., Chen Z., Batista L.M., Duarte J., Borges A., Teixeira A.R. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. Mol. Plant. Pathol. 8: 677-700

Foyer C.H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. The Plant Cell 17(7): 1866-1875

de Gara L. 2004. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. Phytochem. Rev. 5: 1-11

Gaudet D.A. 1994. Progress towards understanding interactions between cold hardiness and snow mould resistance and development of resistant cultivars. Can. J. Plant Pathol. 16: 241-246

Gaudet D.A., Laroche A. 1998. Winter survival of cereals parasitized by snow mould. [W:] Li P., Chen T.H.H. (Reds) Plant cold hardiness. Plenum Press, New York, pp. 331-342

Gaudet D.A., Laroche A., Frick M., Davoren J., Puchalski B., Ergon Å. 2000. Expression of plant defense-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. Physiol. Mol. Plant Pathol. 57: 15-24

Gaudet D.A., Laroche A., Frick M., Huel R., Puchalski B. 2003a. Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. Physiol. Plantarum 117: 195-205

Gaudet D.A., Laroche A., Frick M., Huel R., Puchalski B. 2003b. Plant development affects the cold-induced expression of plant defense-related transcripts in winter wheat. Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 175-184

Gawrońska K., Gołębiowska-Pikania G. 2016. The effects of cold-hardening and *Microdochium nivale* infection on oxidative stress and antioxidative protection of the two contrasting genotypes of winter triticale. Eur. Food Res. Technol. 242(8): 1-10

Gołębiowska G., Wędzony M. 2009. Cold-hardening of winter triticale (x *Triticosecale* Wittm.) results in increased resistance to pink snow mould *Microdochium nivale* (Fr., Samuels & Hallett) and genotype-dependent chlorophyll fluorescence modulations. Acta Phys. Plant. 31(6): 1219-1227

Gołębiowska G., Wędzony M., Plazek A. 2011. The responses of pro- and antioxidative systems to cold-hardening and pathogenesis differ in triticale (x*Triticosecale* Wittm.) seedlings susceptible or resistant to pink snow mould (*Microdochium nivale* Fr., Samuels & Hallett). J. Phytopathol. 159(1): 19-27

Gołębiowska-Pikania G., Golemiec E. 2015. Cold-enhanced gene expression of the foliar thiol-specific antioxidant protein in triticale (x*Triticosecale* Wittm.) seedlings resistant to *Microdochium nivale* (Samuels & I.C. Hallett) infection. Acta Biologica 22: 98-117

Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Surówka E., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Malaga S., Żur I. 2017. Changes in protein abundance and activity involved in freezing tolerance acquisition in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Proteomics 169: 58-72

Gołębiowska-Pikania G., Dziurka M., Wąsek I., Wajdzik K., Dyda M., Wędzony M. 2019. Changes in phenolic acid abundance involved in low temperature and *Microdochium nivale* (Samuels and Hallett) cross-tolerance in winter triticale (x*Triticosecale* Wittmack). Acta Physiol. Plant. 41(3): 38

Gruszecka B.D. 2005. Genetyka pszenżyta (x*Triticosecale* Wittmack) [W:] Górny A.G. (red.) Zarys genetyki zbóż tom 2. Wydawnictwo Drukarnia PRODRUK, Poznań, ss. 15-89

Hare M.C., Parry D.W., Baker M.D. 1999. The relationship between wheat seed weight, infection by *Fusarium culmorum* or *Microdochium nivale*, germination and seedling disease. Eur. J. Plant Pathol. 105(9): 859-866

Hayakawa T., Kanematsu S., Asada K. 1984. Occurrence of Cu/Zn-Superoxide Dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 25 (6): 883-889

Hiilovaara-Teijo M., Hannukkala A., Griffith M., Yu X.M., Pihakaski-Maunsbach K. 1999. Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. Plant Physiol. 121: 665-673

Hömmo L. 1994. Screening winter rye cultivars for snow mould (*Microdochium nivale*) resistance. Plant Pathol. 43(3): 740-750

Hömmo L. 1996. Effect of hardening and dehardening on snow mould (*Microdochium nivale*) resistance. Nord Jordbruksforskning 78(2): 89-92

Hudec K., Bokor P. 2002. Field patogenicity of *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* and *Microdochium nivale* on triticale. Physiol. Plantarum 115(1): 101-110

Hussain H. A., Hussain S., Khaliq A., Ashraf U., Anjum S.A., Men S., Wang, L. 2018. Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. Front. Plant Sci. 9: 393

Janda T., Szalai G., Leskó K., Yordanova R., Apostol S., Popova L.P. 2007. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. Phytochemistry 68: 1674-1682

Janda T., Majláth I., Szalai G. 2014. Interaction of temperature and light in the development of freezing tolerance in plants. J. Plant Growth Regul. 33: 460-469

Jeon J., Kim J. 2013. Cold stress signaling networks in *Arabidopsis.* Plant Biol. 56: 69-76

Jia G., Chen P., Qin G., Bai G., Wang X., Wang S., Zhou B., Zhang S., Liu D. 2005. QTLs for Fusarium head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra‘s’. Euphytica 146: 183-191

Joe M.M., Islam M.R., Karthikeyan B., Bradeepa K., Sivakumaar P.K., Sa T. 2012. Resistance responses of rice to rice blast fungus after seed treatment with the endophytic *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 strains. Crop Prot. 42: 141-148

Karpiński S., Reynolds H., Karpińska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. 1999. Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. Science 284: 654-657

Klocke B., Flath K., Miedaner T. 2013. Virulence phenotypes in powdery mildew (*Blumeria graminis*) population and resistance genes in triticale (*xTriticosecale*). Eur. J. Plant Pathol. 137(3): 463-476

Kornaś A., Kuźniak E., Ślesak I., Miszalski Z. 2010. The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. Act. Biochim. Pol. 57(2)

Kruse E.B., Carle S.W., Wen N., Skinner D.Z., Murray T.D., Garland-Campbell K.A., Carter A.H. 2017. Genomic regions associated with tolerance to freezing stress and snow mold in winter wheat. G3: Genes, Genomes, Genetics, 7(3): 775-780

Kuwabara C., Takezawa D., Shimada T., Hamada T., Fujikawa S., Arakawa K. 2002. Abscisic acid an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. Physiol. Plantarum 115: 101-110

Kuwabara C., Imai R. 2009. Molecular basis of disease resistance acquired through cold acclimation in overwintering plants. J. Plant Bio. 52: 19-26

Kuźniak E., Patykowski J., Urbanek H. 1999. Involvement of the antioxidative system in tomato response to fusaric acid treatment. J. Phytopathol. 47: 385-390

Kuźniak E., Urbanek H. 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. Acta Physiol. Plant. 22 (2): 195-203

Labudda M., Machczyńska J., Woś H., Bednarek P. 2011. Wybrane aspekty postępu biologicznego w hodowli pszenżyta (×*Triticosecale* Wittm. ex A. Camus). Postępy Nauk Rolniczych 4: 3-10

Laloi C., Apel K., Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 323-328

Laroche A., Gaudet D.A., Audy P., Frick M.M., Mullin J. 1997. Induction of freezing tolerance and snow mould resistance in winter wheat: biochemical and molecular perspectives. Acta Agron. Hun. 45(3): 279-283

Leroux P., Lanen C., Fritz R. 2006. Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against botrytis cinerea and *Fusarium nivale*. Pestic Sci. 36 (3): 255-261

Li X., Cai J., Liu F., Dai T., Cao W., Jiang D. 2014. Cold priming drives the subcellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. Plant Physiol. Bioch. 82: 34-43

López-Cruz J., Óscar C.S., Emma F.C., Pilar G.A., Carmen G.B. 2017. Absence of Cu–Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. Mol. Plant Pathol. 18(1): 16-31

Marzec-Schmidt K., Hura K., Płażek A. 2018. Changes in antioxidants activity in grasses from complex *Lolium-Festuca* as a response to *Microdochium nivale* infection. Physiol. Mol. Plant Pahol. 104: 40-47

Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. J. Exp. Bot. 51(345): 659-668

Mayer A.M., Staples R.C., Gil-Ad N.L. 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in host expressing the hypersensitive response. Phytochemistry 58: 33-41

Menardo F., Praz C.R., Wyder S., Ben-David R., Bourras S., Matsumae H., Schaefer L.K. 2016. Hybridization of powdery mildew strains gives rise to pathogens on novel agricultural crop species. Nat. Genet. 48(2): 201

Mengiste T. 2012. Plant immunity to necrotrophs. Annu. Rev. Phytopathol. 50: 267-294

Mitra S., Baldwin I.T. 2014. RuBPCase activase (RCA) mediates growth-defense trade-offs: silencing RCA redirects jasmonic acid (JA) flux from JA-isoleucine to methyl jasmonate (MeJA) to attenuate induced defense responses in *Nicotiana attenuata*. New Phytologist 201(4): 1385-1395

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7 (9): 405-410

Mittler R., Vanderuwera S., Gollery M., van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9 (10): 490-498

Młodzianowski F, Woźny A (Reds). 1990. Wykłady i ćwiczenia z biologii komórki roślinnej, ver. III. University of Poznan Press, Poland

Moellering E.R., Muthan B., Benning C. 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. Science 330: 226-228

Nakajima T., Abe J. 1996. Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mould caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. Can. J. Bot. 74: 1783-1788

Neill S., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D., Hancock J. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. J. Exp. Bot. 53: 1237-1247

Nielsen L.K., Justesen A.F., Jensen J.D. 2013. *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. Crop Prot. 43: 192-200

O'Brien T.P., McCully M.E. (Reds). 1981. The study of plant structure. Principles and selected methods. Termarcarphi Pty. Ltd. Melbourne Press, Australia

Okpodu C.M., Alscher R.G., Grabau E.A., Cramer C.L. 1996. Physiological, biochemical and molecular effects of sulfur dioxide. J. Plant Physiol. 148: 309-316

Okushima Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. 42: 479-488

Parry D.W., Rezanoor H.N., Pettitt T.R., Hare M.C., Nicholson P. 2008. Analysis of *Microdochium nivale* isolates from wheat in the UK during 1993. Ann. Appl. Biol. 126 (3): 449-455

Pastori G.M., Foyer C.H. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. Plant Physiol. 129: 460-468

Pellinen R.I., Minna-Sisko K., Tauriainen A.A., Palva E.T., Kangasja R.V.I. 2002. Hydrogen peroxide activates cell death and defence gene expression in birch. Plant Physiol. 130: 549-560

Pietras T., Małoliepsza U., Witusik A. 1997. Udział nadtlenku wodoru i reaktywnych postaci tlenu wytwarzanych przez oksydazę NADPH w odporności roślin przeciwko patogenom. Wiad. Bot. 41: 43-50

Płażek A., Dubert F., Pociecha E., Janowiak F., Kolasinska I., Maciejewski M. 2011. Resistance of winter rye (*Secale cereale* L.) to *Microdochium nivale* depends on soluble carbohydrate content but not on abscisic acid level. J. Phytopathol. 159: 751-758

Płażek A., Pociecha E., Augustyniak A., Masajada K., Dziurka M., Majka J., Perlikowski D., Pawłowicz I., Kosmala A. 2018. Dissection of resistance to *Microdochium nivale* in *Lolium multiflorum/Festuca arundinacea* introgression forms. Plant Physiol. Biochem. 123: 43-53

Prończuk M., Madej L. Kolasińska I. 2003. Research for resistance to *Microdochium nivale* among inbred lines of rye. Plant Breed. Seed Sci. 48: 83-86

Pulli S., Hjortesholm K., Larsen A., Gudleifsson B., Larsson S., Kristiansson B., Hommo L.M., Tronsmo A.M., Ruuth P., Kristensson K. 1996. Development and evaluation of laboratory testing methods for winterhardiness breeding. SLU, Alnarp, Sweden. Publications-Nordic Gene Bank 32: 1-68

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. Eur. J. Plant Pathol. 141(2): 281-294

Reszka E., Song Q., Arseniuk E., Cregan P.B., Ueng P.P. 2007. The QTL controlling partial resistance to *Stagonospora nodorum* blotch disease in winter triticale Bogo. Plant Pathol. Bull. 16: 161-167

Rizza F., Pagani D., Stanca A., Cattivelli L. 2001. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. Plant Breed. 120(5): 389-396

Ros Barceló A., Aznar-Asension G.J. 2002. Basic peroxidases in cell walls of plants belonging to *Astraceae* family. J. Plant Physiol. 159: 339-345

Samuels G.J., Hallett I.C. 1983. *Microdochium stoveri* and *Monographella stoveri*, new combinations for *Fusarium stoveri* and *Micronectriella stoveri*. Transactions of the British Mycological Society 81(3): 473-483

Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. [W:] Scandalios J.G. (Red.): Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; ss. 343-406

Sharma P., Sharma N., Deswal R. 2005. The molecular biology of the low-temperature response in plants. BioEssays 27: 1048-1059

Shen X., Francki M.G., Ohm H.W. 2006. A resistance-like gene identified by EST mapping and its association with a QTL controlling Fusarium head light infection on wheat chromosome 3BS. Genome 49: 631-635

Sliesaravičius A., Pekarskas J., Baranauskis K. 2006. Grain yield and disease resistance of winter cereal varieties and application of biological agent in organic agriculture. Agronomy Research 4 (Special issue): 371-378

Southerton S.G., Deverall B.J. 1990. Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. Plant Pathol. 39: 223-230

Sperschneider J., Gardiner D.M., Thatcherl L.F., Lyons R., Singhl K.B., Manners J.M., Taylor J.M. 2015. Genome-wide analysis in three *Fusarium* pathogens identifies rapidly evolving chromosomes and genes associated with pathogenicity. Genome Biol. Evol. 7: 1613-1627

Stricker S., Hsiang T., Bertrand A. 2017. Reaction of bentgrass cultivars to a resistance activator and elevated $CO_2$ levels when challenged with *Microdochium nivale*, the cause of *Microdochium* Patch. International Turfgrass Society Research Journal 13(1): 229-234

Sudha G., Ravishankar G.A. 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defence response, resistance to stres factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 71: 181-212

Szechyńska-Hebda M., Wędzony M., Tyrka M., Gołębiowska G., Chrupek M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Żur I., Golemiec E. 2011. Identifying QTLs for cold-induced resistance to *Microdochium nivale* in winter triticale. Plant Genet. Resour. C. 9: 296-299

Szechyńska-Hebda M., Hebda M., Mierzwiński D., Kuczyńska P., Mirek M., Wędzony M., van Lammeren A., Karpiński S. 2013. Effect of cold-induced changes in physical and chemical leaf properties on the resistance of winter triticale (×*Triticosecale*) to the fungal pathogen *Microdochium nivale*. Plant Pathol. 62(4): 867-878

Szechyńska-Hebda M., Wąsek I., Gołębiowska-Pikania G., Dubas E., Żur I., Wędzony M. 2015. Photosynthesis-dependent physiological and genetic crosstalk between cold acclimation and cold-induced resistance to fungal pathogens in triticale (*Triticosecale* Wittm.). J. Plant Physiol. 177: 30-43

Szechyńska-Hebda M., Hebda M., Mirek M., Miernik K. 2016. Cold-induced changes in cell wall stability determine the resistance of winter triticale to fungal pathogen *Microdochium nivale*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 126(1): 77-90

Ślesak I., Libik M., Karpińska B., Karpiński S., Miszalski Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. Act. Biochim. Pol. 54 (1): 39-50

Takashima Y., Suzuki M., Ishiguri F., Iizuka K., Yoshizawa N., Yokota S. 2013. Cationic peroxidase related to basal resistance of *Betula platyphylla var. japonica* plantlet No. 8 against canker-rot fungus *Inonotus obliquus* strain IO-U1. Plant Biotech. 30: 199-205

Takenaka Y., Nakano S., Tamoi M., Sakuda S., Fukamizo T. 2009. Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: Chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. Biosci. Biotech. Bioch. 73: 1066-1071

Tarkowski C. 1989. Biologia pszenżyta. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, ss. 276-383

Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. 1997. Subcellular localization of $H_2O_2$ in plants. $H_2O_2$ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. Plant J. 11: 1187-1194

Torres M.A., Jones J.D.G., Dangl J.L. 2006. Reactive oxygen species signalling in response to pathogens. Plant Physiol. 141: 373-378

Tronsmo A.M., Hsiang T., Okuyama H., Nakajima T. 2001. Low temperature diseases caused by *Microdochium nivale*. [W:] Iriki N., Gaudet D.A., Tronsmo A.M., Matsumoto N., Yoshida M., Nishimune A. (Reds) Low Temperature Plant Microbe Interactions Under Snow. Sapporo: Hokkaido National Agricultural Experimental Station, pp. 75-86

Tsang E.W.T., Bowler C., Hérouart D., van Camp W., Villarroel R., Genetello C., van Montagu M., Inzé D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. Plant Cell 3: 783-792

Tuzun S., Somanchi A. 2006. The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. [W:] Tuzun S., Bent E. (Reds.) Multigenic and induced systemic resistance in plants, ss. 51-67

Van Loon L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of plant pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol. 103: 753-765

Van Loon L.C., Van Strien E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 85-97

Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 135-162

Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. J. Exp. Bot. 53 (372): 1227-1236

Wędzony M. 2003. Protocol for doubled haploid production in hexaploid triticale (x *Triticosecale* Wittm.) by crosses with maize. A manual. In: Małuszynski (ed) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic Publisher, pp 123-128

Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Bioch. J. 322(3): 681-692

Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M., Xiong F., Yang D.S.C., Wiseman S.B., Sarhan F., Danyluk J., Xue Y.Q., Hew C.L., Doherty-Kirby A., Lajoie G. 2000. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. Plant Physiol. 124: 1251-1263

Zhukovsky A. 2006. Choroby pszenżyta ozimego w Białorusi. Abstract: winter triticale diseases in Belarus. English abstract/full text Polish. Progress Plant Prot. 46(2): 719-722

Zhukovsky A., Ilyuk A. 2010. Pleśń śniegowa w uprawach pszenżyta ozimego i skuteczność zapraw nasiennych na Białorusi. Prog. Plant Prot. 50(4):1841-1846

Żur I., Gołębiowska G., Dubas E., Golemiec E., Matušíková I., Libantová J., Moravčiková J. 2013. β-1,3-glucanase and chitinase activities in winter triticales during cold hardening and subsequent infection by *Microdochium nivale*. Biologia 68(2): 241-248

## VII. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH

### a) Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje łącznie **19** oryginalnych prac naukowych, w tym **17** opublikowanych w czasopismach z listy JCR oraz **1** pracę przeglądową z listy JCR i **49** doniesień konferencyjnych. Sumaryczne zestawienie informacji na temat dorobku naukowo-badawczego oraz wskaźników dokonań naukowych ujęto w formie tabeli (Tab. 3). Ponadto opisane badania zostały wykonane w ramach projektów, w których byłam kierownikiem, głównym wykonawcą, wykonawcą lub członkiem zespołu badawczego.

**Indeks Hirscha** (Web of Science[4]): **7** dla wszystkich publikacji, **7** bez autocytacji

Tabela 3. Wskaźniki dokonań naukowych wg najważniejszych baz danych (stan na dzień 25.03.2019r).

| **Period** | **Rodzaj publikacji** | **Liczba publikacji** | **Wskaźnik IF[2]** | **Punkty MNiSW[3]** | **Liczba cytowań (Web of Science[4])** |
|---|---|---|---|---|---|
| Przed doktoratem | Z listy JCR[1] | **1** | **0,817** | **15** | **12** |
| | Spoza listy JCR[1] | **0** | **0** | **0** | **0** |
| Po uzyskaniu stopnia doktora | **Główne osiągnięcie naukowe (JCR[1])** | **5** | **7,827** | **120** | **20** |
| | **Główne osiągnięcie naukowe (Spoza listy JCR)** | **1** | **0** | **9** | **0** |
| | Pozostałe z listy JCR[1] | **11** | **22,586** | **316** | **86** |
| | Spoza listy JCR | **1** | **0** | **4** | **0** |
| | Publikacja przeglądowa z listy JCR[1] | **1** | **0** | **0** | **57** |
| **Sumarycznie:** | | **20** | **31,230** | **464** | **175** |

1 Journal Citation Reports, Thomson Reutersł

2 Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* publikacji naukowych według listy JCR (zgodnie z rokiem opublikowania w przypadku publikacji z 2019r podano IF2017).

3 Sumaryczna liczba punktów MNiSW przypisanych na podstawie ujednoliconego wykazu czasopism naukowych za lata 2013-2016 z dnia 26.01.2017r. (w przypadku publikacji z 2017r i 2019r podano ilość punktów za 2016r).

4 Dane z bazy Web of Science z dnia 25 marca 2019r

## b) Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

*Praca doktorska*

Działalność naukową rozpoczęłam w 2004 roku wraz z podjęciem studiów doktoranckich po przyjęciu na Międzynarodowe Studia Doktoranckie Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk przy Instytucie Botaniki im. *Władysława Szafera* PAN w Krakowie. Dołączyłam wówczas do zespołu Zakładu Biologii Komórki Instytutu Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN w Krakowie, kierowanego przez dr hab. Marię Wędzony zajmującego się między innymi badaniami mechanizmów odporności zbóż na czynniki stresowe oraz metodami kultur *in vitro* wyprowadzania linii podwojonych haploidów. Mój projekt pracy doktorskiej, napisany pod opieką dr hab. M. Wędzony, został nagrodzony trzyletnim stypendium doktoranckim Prezesa Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Ludwika Legockiego. Wniósł on do prac zespołu nową tematykę badawczą: analizę stresu biotycznego związanego z infekcją patogenem grzybowym.

Badania, które wykonałam w ramach pracy doktorskiej (2004-08 r) polegały na poszukiwaniu procesów fizjologicznych warunkujących tolerancję pszenżyta ozimego (x *Triticosecale* Wittm.) na chorobę siewek nazywaną różową pleśnią śniegową wywołaną przez grzyb *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallett. W badaniach wstępnych przeprowadziłam szereg testów stopnia porażenia pleśnią śniegową dla wybranych odmian i linii hodowlanych pszenżyta ozimego w warunkach kontrolowanych oraz zbadałam wpływ hartowania niską temperaturą na poziom uzyskanej tolerancji. Na podstawie otrzymanych wyników wybrałam odmiany pszenżyta o stosunkowo wysokim i niskim poziomie tolerancji na *M. nivale* jako modelowe do dalszych badań. Następnie szczególną uwagę zwróciłam na próbę weryfikacji hipotezy dyskutowanej w literaturze przedmiotu, przypisującej układowi antyoksydacyjnemu traw i zbóż znaczącą funkcję w mechanizmie obrony przed infekcją grzybem chorobotwórczym oraz na interakcję pomiędzy funkcjonowaniem układu antyoksydacyjnego, a hartowaniem roślin niską temperaturą. W pracy podjęłam także analizy profili białkowych siewek pszenżyta o zróżnicowanej tolerancji na infekcję w poszukiwaniu białek o zróżnicowanej ekspresji po hartowaniu oraz inokulacji.

Potencjalnym celem utylitarnym prowadzonych badań było nakreślenie możliwości hodowli pszenżyta w kierunku zwiększenia odporności tego ważnego zboża na pleśń śniegową, będącą istotnym problemem rolniczym w naszej strefie klimatycznej. Celowi temu miało służyć wyznaczenie, na podstawie uzyskanej nowej wiedzy, fizjologicznych markerów odporności, które można badać w warunkach laboratoryjnych dla selekcji materiału roślinnego w procesie wyprowadzania nowych odpornych odmian.

Najważniejsze wyniki pracy doktorskiej obejmowały zaobserwowanie znaczących różnic w odporności siewek odmian pszenżyta ozimego Hewo i Magnat na infekcję *M. nivale*, które pozwoliły na wykorzystanie ich jako układu modelowego do badań nad mechanizmami odporności na pleśń śniegową. Dla badanych genotypów potwierdziłam, że do pełnej indukcji odporności siewek na pleśń śniegową niezbędny jest odpowiednio długi okres hartowania niską temperaturą. Wyniki moich analiz biochemicznych wskazują, że niższe stężenie nadtlenku wodoru w hartowanych siewkach koreluje pozytywnie z wyższą odpornością na infekcję patogenem. Mechanizmy obronne uruchamiane podczas hartowania w niskiej temperaturze prawdopodobnie obejmują enzymy antyoksydacyjne, gdyż wykazywały one wyższą aktywność u odporniejszej odmiany Hewo, co pozwala postawić hipotezę, że biorą udział w utrzymaniu względnie niskiego stężenia nadtlenku wodoru podczas wzrostu w niskiej temperaturze oraz we wczesnych etapach (katalazy) i późniejszych etapach (peroksydazy) patogenezy. Zwiększona wrażliwość na stresy abiotyczne obserwowana za pośrednictwem szeregu parametrów fizjologicznych w siewkach odmiany Magnat towarzyszyła jej niższej odporności na infekcję grzybnią *M. nivale*. Stężenie nadtlenku

wodoru obserwowane w siewkach Magnat było prawdopodobnie toksyczne dla tkanek gospodarza, natomiast nie stanowiło przeszkody dla rozwoju infekcji.

Ponadto siewki badanych odmian pszenżyta miały zróżnicowane profile białkowe zarówno pod wpływem hartowania niską temperaturą, jak i infekcji patogenem. Przeprowadzono analizę profilów białek rozpuszczalnych o masie do 50 kDa dla siewek odmian Hewo i Magnat po hartowaniu (4 tygodnie w 4°C) w porównaniu do kontrolnych siewek nie prehartowanych i nie hartowanych metodą dwuwymiarowej elektroforezy żelowej (2-DE) i wzmacnianej powierzchną laserowa desorpcja/ jonizacja w czasie lotu (SELDI-TOF, j. ang. *Surface-enhanced laser desorption/ionization Time of Flight*). Ekspozycja na niską temperaturę wywołała jedynie ilościowe zmiany w liściach obydwu odmian, powodujące wzrost lub spadek białek o masie 4-50 kDa. Wśród białek akumulowanych pod wpływem niskiej temperatury w liściach Hewo zidentyfikowano dwie peroksydazy tioredoksynowe BAS1 (przeciwutleniające białka specyficzne dla chloroplastycznego tiolu), podjednostkę mitochondrialnej ATP syntazy oraz białko opornościowe wiążące ADP. Z kolei hartowane siewki tego genotypu wykazały obniżony poziom małej podjednostki PW9 RuBisCO i epidermalnej peroksydazy 10. Co najmniej 15 białek niskocząsteczkowych o masie cząsteczkowej od 7,1 kDa do 10,8 kDa różnicowało profile białkowe hartowanych niską temperaturą oraz infekowanych grzybnią *M. nivale* siewek odmian Hewo i Magnat. Część pozostałych białek również może być związana z poziomem odporności na pleśń śniegową, jednak ich identyfikacja i określenie funkcji wymagają dalszych badań.

Uzyskane przeze mnie wyniki analiz proteomicznych wydają się potwierdzać zależność indukowanej niską temperaturą odporności na infekcję od działania systemu antyoksydacyjnego. Na podstawie wyników pracy doktorskiej można wnioskować, że pomiar sprawności fotosyntetycznej i stężenia nadtlenku wodoru w hartowanych siewkach pszenżyta ozimego może być wykorzystany do wstępnej oceny materiałów hodowlanych pod kątem ich potencjalnej odporności na infekcję *M. nivale*.

Uzyskane wyniki złożyły się na moją rozprawę doktorską zatytułowaną: „Mechanizmy odporności pszenżyta ozimego (x *Triticosecale* Wittm.) na różową pleśń śniegową wywołaną przez *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & Hallett", której promotorem była dr hab. Maria Wędzony. Obroniłam ją w dniu 24. czerwca 2008 roku przed Radą Instytutu Botaniki im. Władysława Szafera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, uzyskując **stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.** Uzyskane wyniki po przeredagowaniu i uzupełnieniu danych zostały wykorzystane po obronie doktoratu w publikacjach **D1, D5 i D6** o łącznym **IF=3,513, 50 punktach MNiSW oraz liczbie cytowań 12.** Prace omówiono poniżej.

Przed obroną pracy doktorskiej, wyniki doktoratu były prezentowane na **8** konferencjach naukowych, wymienionych w **Załączniku nr 8** (pozycje 41-48).

*Dorobek przed doktoratem nie objęty pracą doktorską*

Mój pozostały dorobek publikacyjny przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora objął jedną publikację oryginalną (o **IF=0,817, 15 punktach MNiSW oraz liczbie cytowań 12**) oraz **1** doniesienia na konferencji nie związanych z doktoratem. Brałam udział w **3 projektach badawczych międzynarodowych oraz 5 projektach badawczych krajowych**, prowadząc między innymi:

- analizy fizjologiczne i biochemiczne, w tym pomiary aktywności glukanaz i chitynaz, związane z poziomem odporności zbóż na patogeny grzybowe;
- analizę profilów białkowych nasion genotypu ryżu o niskiej zawartości kwasu fitowego w porównaniu do genotypu rodzicielskiego;
- kultury pylników zbóż w warunkach *in vitro*;

- obserwację procesu androgenezy i regeneracji na potrzeby wyprowadzania nowych linii podwojonych haploidów u zbóż.

Listę doniesień konferencyjnych podano w **Załączniku nr 8**, a listę projektów w **Załączniku nr 7**.

*Udział w szkoleniach*

**2007,** 18 kwietnia, szkolenie: „Proteomics RoadShow 2007", Bio-Rad Polska, Warszawa

**2007,** 28 lutego, Spotkanie brokerskie organizowane przez Centrum Transferu Technologii Politechniki Krakowskiej w obszarze badawczy „Environment (including Climate Change)", call FP7-ENV-2007-1, Kraków

**2004-2006,** szkolenia w ramach projektu CropStress, IFR PAN, Kraków: „Workshop on Molecular Biology" (20-21.02.2006r), „Molecular Markers for Plant Physiologists" (6.03.2006r), „International Advisory Board Meeting Workshop on Enhancing Basic Academic Skills" (3-9.03.2006r i 14-17.09.2004r), „Methods of molecular genetics in plant biology-Immunolocalization techniques in plant tissues" (16-19.03.2005r)

**2004,** 29 listopada Międzynarodowy workshop Crop Improvement Centre for Sustainable Agriculture CICSA "Resistance of cereals to biotic stresses", IHAR, Radzików

**2004,** 6-8 października "Centre of Excellence in Plant Agrobiology and Molecular Genetics PAGEN", Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

*Opublikowane wyniki pracy doktorskiej*

**Wybór odmian pszenżyta modelowych do badań i analizy fizjologiczne**

W badaniach będących częścią pracy doktorskiej (Gołębiowska i Wędzony, 2009; **artykuł D1**), analizowano wpływ traktowania niską temperaturą na stopień porażenia siewek pszenżyta (x *Triticosecale* Wittm.) ozimego przez różową pleśń śniegową wywołaną grzybnią *Microdochium nivale* (Samuels i Hallett) w trzech sezonach eksperymentalnych. Badane genotypy różniły się istotnie tolerancją na infekcję; spośród testowanych genotypów, dla odmiany Magnat we wszystkich trzech sezonach doświadczeń odnotowano wysoki średni indeks porażenia (85-98%), a dla odmiany Hewo – względnie niski (35-40%), po zastosowaniu hartowania temperaturą 4°C przed inokulacją grzybnią. Otrzymane wyniki poziomu porażenia dla genotypów tolerancyjnych i wrażliwych mieszczą się w zakresie podawanym w literaturze przez innych autorów (Ergon i in., 1998; Hare i in., 1999; Ergon i in., 2003; Prończuk i in., 2003; Zhukovsky, 2006).

Poziom tolerancji pszenżyta był zależny od genotypu, wzrastał liniowo podczas hartowania i osiągnął najwyższy obserwowany poziom po 4 tygodniach hartowania. Na podstawie uzyskanych wyników odmianę Magnat uznano za wrażliwą, a odmianę Hewo – tolerancyjną na różową pleśń śniegową. Natomiast siewki niehartowane niską temperaturą były całkowicie nieodporne na *M. nivale*, niezależnie od genotypu. Żaden z testowanych genotypów nie wykazał się całkowitą odpornością – brakiem porażenia. Objawy choroby obserwowane w inokulowanych roślinach można było wyłącznie przypisywać do infekcji, ponieważ same stresy abiotyczne (niska temperatura, wysoka wilgotność i zaciemnienie) nie były poważnie uszkadzające dla badanych roślin. Wyniki przeprowadzonych laboratoryjnych

testów przeprowadzonych w warunkach kontrolowanych korelowały z wynikami uzyskanymi przez hodowców na poletkach doświadczalnych dla wymienionych genotypów pszenżyta. Autorzy innych prac przeprowadzonych na pszenicy również obserwowali wzrost tolerancji na *M. nivale* wywołany hartowaniem (Gaudet, 1994; Hommo, 1994, 1996; Pulli i in., 1996; Nakajima i Abe 1996; Laroche i in., 1997; Ergon i in., 1998; Gaudet i Laroche, 1998; Gaudet i in., 2003a,b; Ergon i in., 2003; Browne i in., 2006;). Późniejsze prace przeprowadzone przez Dyda i in. (2018) także potwierdziły, że wszystkie badane genotypy pszenżyta ozimego były całkowicie nieodporne na *M. nivale* bez hartowania chłodem poprzedzającego infekcję.

Badane siewki siedmiu genotypów pszenżyta istotnie różniły się funkcjonowaniem fotosystemu drugiego PSII po 4 tygodniach hartowania. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że wyższy wskaźnik witalności Rfd, obliczony dla fotosystemu drugiego PSII na podstawie wzoru za Maxwell and Johnson (2000), w liściach siewek w pełni zahartowanych był skorelowany z wyższą tolerancją na infekcję ($r^2$=0,89; p=0,003), podczas, gdy różnice w innych parametrach fluorescencji nie były znaczące. Dalsze badania, przeprowadzone przez Szechyńska i in. (2015) potwierdzają, że niska temperatura i warunki świetlne mogą indukować zależne od genotypu mechanizmy tolerancji pszenżyta ozimego na *M. nivale*, a genotypy zdolne do rozwoju skutecznego mechanizmu obronne są elastyczne w procesie fotosyntezy: dostosowują reakcje w pobliżu PSII oraz bardziej wydajnie integrują pierwotne reakcje fotochemiczne z reakcjami ciemnościowymi. Wyższa maksymalna efektywność kwantowa PSII była skorelowana z niższym poziomem destrukcji liści po infekcji i z wyższym poziomem tolerancji na *M. nivale* (Dyda i in., 2018). Uzyskane dane sugerują możliwe zastosowanie pomiaru tego fizjologicznego parametru w siewkach hartowanych do badań przesiewowych materiału roślinnego prowadzonych na dużą skalę, w celu wybrania genotypów potencjalnie tolerancyjnych na *M. nivale*.

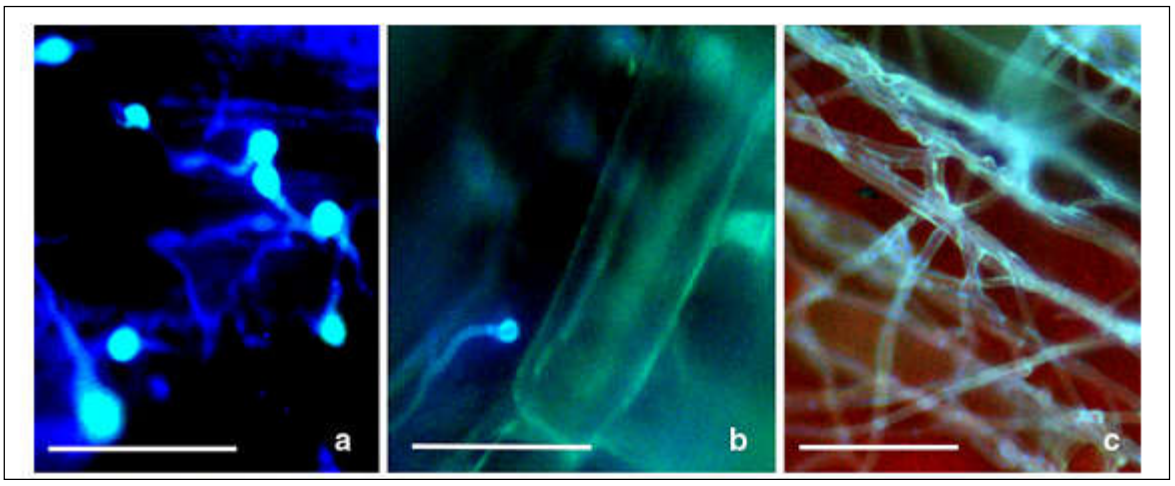
Przedstawiane badania przeprowadzone w pracy doktorskiej przyczyniły się do wybrania modelowych odmian do dalszych badań nad procesami na poziomie fizjologicznym, biochemicznym i genetycznym, związanymi z indukowaną niską temperaturą tolerancją krzyżową pszenżyta na różową pleśń śniegową, a także do wybrania odmian rodzicielskich (Hewo i Magnat oraz SaKa3006 i Ugo (Modus)) dla wyprowadzenia populacji mapujących złożonych z linii podwojonych haploidów (DH, j. ang. *doubled haploids)* służących do mapowania QTL wybranych cech pszenżyta.

**Analiza cytologiczna przebiegu infekcji *M. nivale* w różnych organach siewek pszenżyta**

W dalszej części pracy doktorskiej podjęto analizy cytologiczne przebiegu infekcji *M. nivale* u pszenżyta w świetle widzialnym i fluorescencyjnym (Dubas i in., 2011; **artykuł D5**) – tego typu badania nie były wcześniej przeprowadzone przez innych autorów. Badano rośliny (liście, pochwy liściowe, węzły krzewienia i korzenie) dwóch modelowych odmian pszenżyta ozimego – wrażliwej i tolerancyjnej na *M. nivale*. Grzybnię barwiono przy użyciu barwników fluorescencyjnych Calcofluor White (O'Brien i McCully, 1981) oraz błękitem aniliny (Młodzianowski i Woźny, 1990) przez 5 minut i obserwowano w świetle UV (filtr wzbudzenia 365 nm, lustro dichroiczne 395 nm, filtr barierowy 420 nm). Dodatkowo miejsca infekcji barwiono przy użyciu diaminobenzydyny (DAB, j. ang. *3,3′-Diaminobenzidine*) metodą za Thordal-Christensen et al. (1997) w celu wizualizacji miejsc akumulacji nadtlenku wodoru; **te analizy zostały podjęte po obronie doktoratu.**

Mikroskopowa analiza rozwoju *M. nivale* w różnych organach badanych siewek wykazała, że jest to proces dynamiczny. Co więcej, w obu testowanych odmianach proces hartowania niską temperaturą opóźniał wzrost grzybni *M. nivale* w siewkach. Wzrost grzybni w siewkach niehartowanych i hartowanych obserwowano w: (I) endodermie i komórkach korowych węzłów krzewienia; (II) komórkach epidermy liści (Rys. 4) oraz (III) pochwach

liściowych. Rozrost grzybni następował od węzłów krzewienia na poziomie gleby do zewnętrznych pochew liściowych i liści. Rozprzestrzenianie się patogenu przebiegało także poprzez penetrację ścian komórkowych, a następnie rozwój strzępek tworzących **haustoria** w obrębie żywych komórek epidermy liści lub endodermy komórek korowych węzłów krzewienia. W wielu przypadkach obserwowano przenikanie patogenu przez aparaty szparkowe liści. Natomiast obserwacja mikroskopowa nieinokulowanych siewek nie ujawniła jakiekolwiek poważnych uszkodzeń tkanki ani akumulacji związków fenolowych.




**Rysunek 4. Analiza cytologiczna przebiegu infekcji grzybnią *M. nivale* przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E-600, wyposażonego w system DIC oraz kamerę cyfrową o wysokiej czułości DXM 1200F.** Grzybnię barwiono przy użyciu barwników fluorescencyjnych Calcofluor White oraz błękitu aniliny przez 5 minut i obserwowano w świetle UV (filtr wzbudzenia 365 nm, lustro dichroiczne 395 nm, filtr barierowy 420 nm). **a)** Strzępki tworzące haustorium w komórkach skórki liści (niebieskie). **b)** Haustorium obok aparatu szparkowego. **c)** Gęsta sieć strzępek w liściach komórki skórki (żółto-białe). Czerwona autofluorescencja chlorofilu. Źródło: Dubas i in., 2011.

Analizy cytologiczne inokulowanych roślin wykazały, że niehartowane rośliny odmiany Magnat były znacznie bardziej podatne na infekcję *M. nivale*, niż rośliny hartowane znajdujące się w tym samym stadium rozwojowym. W węzłach krzewienia niehartowanych siewek tej odmiany strzępki grzybów znaleziono już po 1 godzinie po inokulacji. Wnikały one przez ściany komórkowe komórek węzłów krzewienia i wytwarzały haustoria. Dwie godziny później pojedyncze strzępki były widoczne na liściach. W tym samym czasie, w hartowanych roślinach odmiany Magnat komórki korowe węzłów krzewienia nie były jeszcze zainfekowane; jednak pojedyncze strzępki grzybów wykryto na powierzchni liści. Dzień po inokulacji, na powierzchni liści zarówno siewek hartowanych, jak i niehartowanych, odnotowano gęstą sieć strzępek *M. nivale*. W niehartowanych roślinach ekspansji grzyba towarzyszyło nagromadzenie związków fenolowych, wykryte w komórkach epidermy liści, w pobliżu aparatów szparkowych, a w trzecim dniu po inokulacji strzępki zaczęły penetrować przez aparaty szparkowe. W tym samym czasie, starsze liście hartowanych siewek odmiany Magnat nie wykazywały żadnych objawów infekcji, z wyjątkiem gromadzenia się związków fenolowych znajdujących się w pobliżu aparatów szparkowych. Najmłodsze liście hartowanych siewek odmiany Magnat były pierwszymi miejscami infekcji, z których grzyb zaczął się rozprzestrzeniać. Na powierzchni takich liści, blisko węzłów krzewienia, obserwowano pojedyncze strzępki, a począwszy od piątego dnia po inokulacji, poważne objawy infekcji (liczne strzępki na powierzchni lub w komórkach kory węzłów krzewienia, komórek epidermy liści i w pochwach liściowych), notowano zarówno w niehartowanych, jak i hartowanych siewkach odmiany Magnat.

W przeciwieństwie do odmiany wrażliwej, zarówno niehartowane jak i hartowane siewki odmiany Hewo nie wykazały żadnych oznak infekcji patogenem podczas pierwszych 24 godzin po inokulacji grzybnią *M. nivale*. Pierwszego dnia po inokulacji wykryto tylko pojedyncze strzępki na liściach niehartowanych roślin. Dwa dni później zakażenie rozwinęło się zarówno w niehartowanych, jak i hartowanych siewkach, w endodermie, komórkach korowych węzła krzewienia oraz na powierzchni liści. W niehartowanych siewkach odmiany Hewo zaobserwowano strzępki produkujące haustoria w komórkach skórki liści. Te strzępki wrastały przez szparki w głębsze warstwy komórek liścia. Od 5 dnia po inokulacji, pojawiły się międzykomórkowe i wewnątrzkomórkowe rozgałęzienia strzępek, rozchodzące się z zewnętrznych komórek skórki liści, pochew liściowych oraz komórek kory węzłów krzewienia, zarówno siewek niehartowanych, jak i hartowanych. Później, siódmego dnia po inokulacji w siewkach niehartowanych strzępki grzyba utworzyły haustoria w komórkach węzłów krzewienia. W tym samym czasie, wiele strzępek otaczało korzenie i włośniki. Na skutek postępu infekcji, komórki często były plazmolizowane, a strony kontaktowe były ciemne i przesiąknięte.

Nieinokulowane siewki obu odmian nie akumulowały nadtlenku wodoru w warunkach eksperymentalnych. Natomiast 7 dnia po inokulacji nastąpiła jego akumulacja w siewkach obu genotypów w miejscach penetracji w komórkach epidermalnych i mezofilowych. W niektórych przypadkach zaobserwowano również powstawanie nadtlenku wodoru w pobliżu miejsc zakażenia. Analizy początkowych etapów zakażenia potwierdziły penetrację w tkankach liścia za pośrednictwem aparatów szparkowych obserwowane za pomocą technik mikroskopii fluorescencyjnej. Badania innych autorów wykazały, że *M. nivale* zachowuje się jako biotrof siewkach tolerancyjnej odmiany Hewo, a jako nektrotrof u wrażliwej Magnat (Szechyńska i in., 2013). Równocześnie badania Szechyńska i in. (2016) wykazały, że traktowanie niską temperaturą indukuje modyfikacje strukturalne i chemiczne ściany komórkowej, które są skorelowane z większą tolerancją odmiany Hewo na infekcję *M. nivale*. Zmiany te obejmują bardziej zwartą oraz zintegrowaną strukturę celulozy, w tym grubsze i dłuższe włókna, a także większą masę molekularną i bardziej złożoną strukturę ligniny, w porównaniu do siewek wrażliwej odmiany Magnat. Infekcja, przy zastosowaniu standardowej komorowej metody inokulacji przebiega od korzenia, poprzez węzeł krzewienia do liści (Dyda i in., 2018).

Podsumowując uzyskane wyniki, modelowe odmiany różniły się zarówno poziomem infekcji, jak i dynamiką tego procesu, co potwierdziło ich różnice w tolerancji obserwowane w laboratoryjnych testach porażenia i dane uzyskane od hodowców. Ponadto analiza wykazała, że w obu odmianach hartowanie siewek niską temperaturą istotnie opóźniło wzrost grzybni. Wzrost strzępek obserwowano we wszystkich organach roślin, a po raz pierwszy w literaturze udokumentowano produkcję haustorium w tkankach badanych roślin. Wnikaniu strzępek towarzyszyła akumulacja nadtlenku wodoru. Uzyskane wyniki pozwoliły na lepsze zbadanie interakcji pomiędzy rośliną a patogenem, a także wskazanie optymalnych terminów pomiarowych dla dalszych badań. Dane także wskazują, że *M. nivale* jest patogenem hemibiotroficznym.

**Badania poziomu stężenia nadtlenku wodoru oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w siewkach modelowych pszenżyta w odpowiedzi na hartowanie niską temperaturą, sztuczną okrywę śniegową oraz infekcję grzybnią *M. nivale***

Analizy biochemiczne (Gołębiowska i in., 2011; **artykuł D6**) odpowiedzi siewek pszenżyta na hartowanie niską temperaturą oraz infekcję grzybnią *M. nivale* zostały przeprowadzone na modelowych odmianach pszenżyta Magnat (wrażliwej) i Hewo (tolerancyjnej). Zmierzono spektrofotometrycznie stężenie nadtlenku wodoru jako wskaźnika

stresu oksydacyjnego oraz całkowitą aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy (CAT, EC 1.11.1.6), peroksydazy (POX, EC 1.11.1.s), peroksydazy askorbinianowej (APX, EC 1.11.1.11) oraz dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego (SOD, EC 1.15.1.1) w siewkach: 1) po 14-dniowym prehartowaniu w temperaturze 12°C, 2) po 7, 14, 21 i 28 dniach hartowania w temperaturze 4°C; 3) inokulowanych po 2, 5 i 10 dniach wzrostu pod sztucznymi okrywami; 4) kontrolnych siewek nie prehartowanych i niehartowanych, znajdujących się w tej samej fazie rozwoju, co siewki w pełni zahartowane oraz 5) kontrolnych hartowanych siewek nieinokulowanych po 2, 5 i 10 dniach wzrostu pod sztucznymi okrywami.

Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że zwiększona aktywność CAT, POX i APX i wynikowy niższy poziom stężenia nadtlenku wodoru w badanych siewkach pszenżyta ozimego był pozytywnie skorelowany z tolerancją na niską temperaturę, niskie natężenie światła, wysoką wilgotność oraz infekcję różowej pleśni śniegowej. Z kolei wyższe poziomy nadtlenku obserwowane w siewkach wrażliwych prawdopodobnie wynikają z nierównowagi między produkcją a eliminacją RFT w warunkach stresowych.

*Podsumowanie najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej*

Prace badawcze podjęte w ramach pracy doktorskiej pozwoliły na wybór modelowych genotypów (odmian i linii) pszenżyta ozimego o skrajnym poziomie indukowanej niską temperaturą tolerancji na infekcję *M. nivale*, a także do wyboru odmian rodzicielskich dla wyprowadzenia populacji mapującej złożonej z linii podwojonych haploidów w celu mapowania QTL wybranych cech pszenżyta.

Modelowe odmiany różniły się zarówno poziomem infekcji, jak i dynamiką tego procesu, obserwowaną w świetle widzialnym i fluorescencyjnym, co potwierdziło ich różnice w tolerancji obserwowane w laboratoryjnych testach porażenia i dane uzyskane od hodowców. Ponadto analiza wykazała, że w przypadku obu odmian hartowanie siewek niską temperaturą istotnie opóźniło wzrost grzybni. Wzrost strzępek obserwowano we wszystkich organach roślin, a po raz pierwszy w literaturze udokumentowano wytwarzanie *haustorium* przez *M. nivale* w tkankach badanych roślin. Wnikaniu strzępek towarzyszyła akumulacja nadtlenku wodoru. Uzyskane wyniki pozwoliły na lepsze zbadanie interakcji pomiędzy rośliną a patogenem, a także wskazanie optymalnych terminów pomiarowych dla dalszych badań. Dane także wskazują, że *M. nivale* jest patogenem hemibiotroficznym.

Następnie na podstawie uzyskanych wyników zasugerowano wskaźnik witalności Rfd fotosystemu drugiego PSII w siewkach hartowanych przez 4 tygodnie w temperaturze 4°C jako potencjalny parametr fizjologiczny do przesiewowych testów poziomu tolerancji pszenżyta ozimego na pleśń śniegową. Ponadto w siewkach genotypów wrażliwych pszenżyta obserwowano akumulację nadtlenku wodoru. Natomiast siewki genotypów tolerancyjnych cechowała podwyższona lub stabilna aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych: katalaz, peroksydaz oraz dysmutaz ponadtlenkowych, zarówno w niskiej temperaturze, jak i pod sztuczną okrywą śniegową oraz podczas infekcji.

### c) Przebieg pracy naukowo – badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu tytułu nauk biologicznych w zakresie biologii rozpoczęłam pracę w Instytucie Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN w Krakowie, a następnie w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. *Komisji Edukacji Narodowej* w Krakowie.

Mój dorobek publikacyjny po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje **19** publikacji, w tym **16** publikacji oryginalnych z listy JCR oraz **1** publikację przeglądową z listy JCR

(łączny IF, zgodny z rokiem opublikowania – **30,413**, sumaryczna liczba punktów MNiSW, zgodna z rokiem opublikowania – **449**, liczba cytowań **163**), a także **41** doniesień konferencyjnych międzynarodowych i krajowych. Brałam udział w **4** projektach badawczych międzynarodowych oraz **7** projektach badawczych krajowych, z czego byłam **kierownikiem 1 projektu badawczego międzynarodowego oraz 1 projektu badawczego krajowego.** Podjęte tematy badawcze stanowiły zagadnienia rozwijane w licznych pracach magisterskich i licencjackich, których byłam opiekunem naukowym. Spośród prac naukowych, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, 6 oryginalnych prac eksperymentalnych weszło w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego.

d) **Kierunki prowadzonych badań nieuwzględnione w osiągnięciu naukowym**

Moje zainteresowania badawcze skupiły się wokół procesów związanych z nabywaniem przez siewki zbóż indukowanej chodem tolerancji krzyżowej patogeny i niską temperaturę, ale także zaangażowałam się w inne badania związane z procesami zachodzącymi w roślinach w warunkach suszy oraz z odpowiedzią mikrospor i pylników na czynniki stresowe. Badania te objęły:

Badania na poziomie białek

- Analizę różnic w profilach białkowych pomiędzy linią ryżu o niskiej zawartości kwasu fitynowego a linią rodzicielską (publikacja naukowa D4);
- Identyfikację różnic zmian w liczebności i aktywności białek wywołanych suszą podczas generatywnego rozwoju jęczmienia ozimego (publikacja naukowa D11);
- Analizę aktywności enzymów antyoksydacyjnych i wydajności metabolizmu komórkowego związanego z indukcją embriogenezy w izolowanej hodowli mikrospor pszenżyta ozimego (publikacja naukowa D2);
- Identyfikację białek związanych z reakcją embriogenezy w izolowanej hodowli mikrospor pszenżyta ozimego (publikacja naukowa D12).

Badania genetyczne

- Mapowanie *loci* cech ilościowych (QTL) pszenżyta ozimego związanych z indukcją rozwoju androgenicznego (publikacja naukowa D7, D8 i D10);
- Mapowanie *loci* cech ilościowych (QTL) pszenżyta ozimego związanych z wielkością plonu (publikacja naukowa E1).

Kraków, dn. 25 marca 2019r

Gabriela Gołębiowska-Pikania

dr Gabriela Gołębiowska-Pikania