

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU

Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Mgr inż. Ada Dorczyk

**Piramidyzacja genów odporności w pszenicy
jarej.**

Praca doktorska wykonana w firmie Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR
pod kierunkiem dr hab. inż. Kamili Nowosad prof. Uczelni

Smolice - Wrocław 2023

Spis treści

1. Wprowadzenie	4
2. Przegląd literatury	8
2.1. Pochodzenie pszenicy zwyczajnej	8
2.2 Znaczenie gospodarcze pszenicy	9
2.3 Cechy morfologiczne	11
2.4 Choroby powodowane przez patogeny	12
2.4.1 Rdza brunatna pszenicy	13
2.4.2 Rdza żółta	14
2.4.3 Mączniak prawdziwy	16
2.5 Hodowla odpornościowa	17
2.6 Odporność roślin	18
2.7 Piramidyzacja genów	20
2.8 Geny odporności	22
3. Materiał i metody	23
3.1. Materiał	23
3.2. Metodyka	29
3.2.1 Genotypowanie markerami PCR	29
3.2.2 Analiza statystyczna wyników genotypowania	31
4. Wyniki - Analiza statystyczna	34
4.1.1 Wysokość roślin	34
4.1.2. Mączniak prawdziwy (Pm)	37
4.1.3. Brunatna plamistość liści zbóż (DTR)	41
4.1.4. Rdza brunatna (Lr)	44
4.1.5. Rdza żółta (Yr)	47
4.1.6. Septorioza liści (Stb)	50
4.2. Korelacja markerów PCR z cechami odporności na choroby powodowane przez patogeny grzybowe	54

4.3 Zidentyfikowane markery PCR z podziałem na rodziny.	58
4.4 Analiza dystansu genetycznego	61
5 . Dyskusja	73
6 . Wnioski	79
7. Streszczenie	81
8. Abstract	82
9. Literatura	83
10. Spis źródeł internetowych	99
11. Spis rysunków	99
12. Spis rycin	100
13. Spis tabel	102

1. Wprowadzenie

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest zbożem chlebowym, uprawianym od najstarszych dziejów. Pierwsze ślady uprawy pszenicy pochodzą sprzed 7000 lat p.n.e. z archeologicznych wykopalisk na Bliskim Wschodzie (Budzyński i Szempliński, 1999), a obecnie jest najpowszechniej uprawianym zbożem w świecie. W miarę rozwoju cywilizacji narastał problem w dostarczaniu energii w pożywieniu i dlatego poszukiwano źródeł węglowodanów, a pszenica oraz ryż stanowią najważniejsze źródło kalorii (Hanczakowski, 2001). Pszenica uprawiana jest na wszystkich kontynentach od równika po strefy podbiegunowe, od poziomu morza do 3000 m wysokości nad poziomem morza (Ruebenbauer, 1976).

Areal uprawy pszenicy w świecie w ciągu ostatniego czterdziestolecia nie zwiększył się istotnie i utrzymuje się na poziomie powyżej 200 mln hektarów. W Polsce w 2018 roku powierzchnia uprawy pszenicy wynosiła 2 417 227 ha (Tabela 1), a dane Agencji Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa podają, że w 2021 roku była uprawiana na powierzchni ok. 2 391 000 ha.

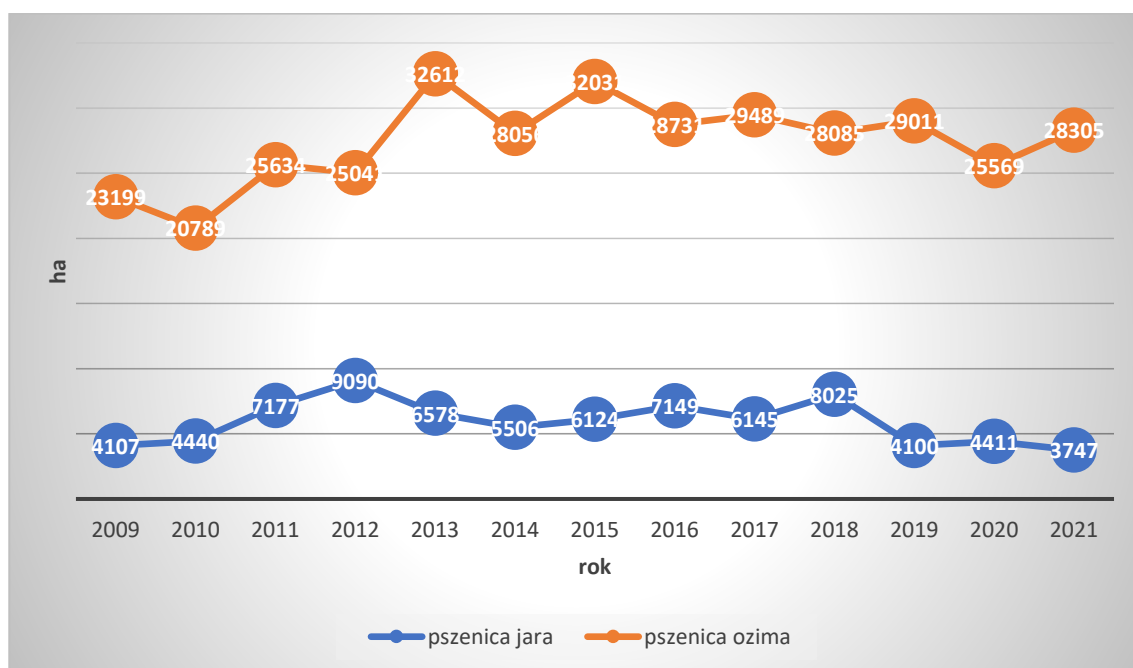
Tabela 1: Powierzchnia uprawy, średni plon oraz produkcja pszenicy w Polsce w latach 2009 -2018 (wg FAO Statistical Databases, 2020)

Rok	Powierzchnia uprawy (tys. ha)	Średni plon (t/ha)	Produkcja (tys. t)
2009	2346	4,2	9789
2010	2124	4,4	9408
2011	2258	4,1	9339
2012	2077	4,1	8607
2013	2137	4,4	9485
2014	2338	5,0	11628
2015	2395	4,6	10957
2016	2364	4,6	10827
2017	2391	4,9	11665
2018	2417	4,1	9820

Powierzchnia uprawy zbóż ogółem w 2020 r. w Polsce wyniosła około 7,4 mln ha i zmniejszyła się o 6,1% w porównaniu do roku 2019. W 2020 roku powierzchnia pod pszenicą wynosiła około 1,64 mln ha. Zagospodarowanie materiału siewnego w Polsce w roku 2019 wyniosło 12,338 mln ton dla pszenicy jarej oraz 103,878 mln ton dla pszenicy ozimej.

W eksporcie ziarna zbóż dominującą pozycję zajmowała pszenica. Wolumen eksportu pszenicy w 2020 r. wyniósł 4,7 mln ton. Najwięcej pszenicy sprzedano na rynku poza unijnym około 82%, przede wszystkim do: Arabii Saudyjskiej (1,7 mln t – 36%), Republiki Południowej Afryki (0,8 mln t – 16%), Algierii (0,4 mln t – 9%), Turcji i na Kubę (po 0,2 mln t – po 4%) oraz do Maroko, Mozambiku, Kenii i Tanzanii (po ok. 0,1 mln t) (GUS. Rocznik Statystyczny Rolnictwa. Główny Urząd Statystyczny, 2020 (<http://www.stat.gov.pl/>)).

W Polsce, w uprawie, dominuje forma ozima pszenicy zwyczajnej, która uzyskuje plony wyższe niż forma jara, jednak o gorszej jakości (Gąsiorowski i Klockiewicz-Kamińska, 2004).



Rysunek.1. Powierzchnia plantacji nasiennych pszenicy w Polsce w latach 2009 – 2021 (wg PIORIN).

Na wysokość plonu ziarna, w uprawie zarówno pszenicy ozimej, jak i jarej wpływa wiele czynników. Jednym z istotniejszych jest podatność na choroby powodowane przez grzyby, takie jak rdza brunatna (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*), rdza żółta (*Puccinia striiformis*) mączniak prawdziwy traw (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), septorioza (*Stagonospora nodorum* syn. *Septoria nodorum*) i fuzarioza (*Fusarium* spp.). Porażenie roślin może występować w różnym nasileniu, zależnie od warunków pogodowych. W latach sprzyjających rozwojowi patogenów, straty w plonach są stosunkowo duże, a ich wielkość szacuje się w granicach od 27% do 50% (Witkowska i in., 2011; Jańczak i Pawlak, 2006).

Istnieją dwa sposoby ograniczania występowania chorób w zbożach: ochrona i zwalczanie chemiczne oraz wykorzystanie odporności genetycznej. Kontrola genetyczna, to hodowla odpornościowa, która zyskuje na znaczeniu ze względów środowiskowych i ekonomicznych, szczególnie w przypadku rolników w krajach rozwijających się, a także, z powodu możliwości uodpornienia się patogenów na substancje aktywne fungicydów (Oliver, 2014). Uprawa odpornych lub wysoce tolerancyjnych odmian jest dla rolnika skutecznym i bezpiecznym podejściem, zmniejsza jej koszty oraz straty produkcyjne z powodu występujących chorób (Chełkowski, 1999). Marasas i in. (2003) wykazali poprzez analizy ekonomiczne, że hodowla odpornościowa jest najbardziej opłacalną drogą walki z chorobami roślin uprawnych. Porównywali oni nakłady poniesione od 1973 na hodowlę odpornościową na rdzę brunatną w CIMMYT do otrzymanych korzyści z uprawy odmian pszenicy, stosunek wyniósł 27:1. Korzyści nie tylko płyną w stronę rolnika, ale również dla środowiska poprzez ograniczenie stosowania ogromnych ilości pestycydów (Sayre i in., 1998).

Hodowla roślin zmierza w kierunku zmniejszenia podatności na choroby powodowane przez patogeny grzybowe pszenic, poszukiwaniu nowych kierunków pozyskiwania źródeł odporności i wprowadzaniu ich do programów krzyżowań. Cennym źródłem genów odporności na rdzę brunatną, rdzę żółtą oraz mączniaka prawdziwego pszenicy są przede wszystkim gatunki dzikie pszenic oraz gatunki im pokrewne, tj.: *T. dicoccum*, *T. monococcum*, *T. spelta*, *T. carthlicum*, *T. dicoccoides*, *T. timopheevii*, *T. durum*, *T. sphaerococcum*, *T. tauschii* (syn. *Aegilops squarrosa*), *Ae. speltoides*, *Ae. longissima*, *Ae. ovata*, *H. villosa* (syn. *Dasypyrum villosum* L. Candargy) oraz żyto (*Secale cereale*) (McIntosh i in., 1998; Górny, 2004; Chełkowski i in., 2005b). Dobrym źródłem odporności jest również żyto, udało się bowiem przenieść z tego gatunku do pszenic 17 genów odporności (McIntosh i in., 2004). Mimo pozytywnych zalet jakimi są odporność na choroby, przedstawione powyżej gatunki mogą wносить wiele niekorzystnych cech, takich

jak: niski plon, podatność na wyleganie, czy niską mrozoodporność (Czembor i Wiewióra, 2001).

Hodowca w swej pracy może, a nawet powinien wykorzystywać dostępne źródła genetycznej odporności. Wymaga ona znajomości genetycznego uwarunkowania reakcji roślin na atak szkodnika lub patogena. Jeden genotyp może być podatny na określony genotyp patogena, a inny może być odporny. Z biegiem czasu zachodzą zmiany w populacjach patogenów, a co za tym idzie powstają nowe problemy w hodowli odpornościowej. Pojawiają się nowe wirulentne patotypy dla dotychczas odpornych odmian, stąd też istnieje konieczność prowadzenia ciągłych intensywnych badań na ten temat.

Istnieją dwie ogólne klasy genów oparte na ich fenotypowych skutkach, geny odporności na patogeny specyficzne dla rasy lub szczepu – geny główne (geny R; ang. Major Resistance Genes) i geny warunkujące odporność roślin dorosłych (APR ang. adult plant resistance). Obecnie istnieje pogląd wśród wielu hodowców i patologów, że większy nacisk należy położyć na odkrywanie, charakteryzowanie i stosowanie genów APR w celu uzyskania trwałej odporności, z domyślną sugestią, że mniejszy nacisk należy położyć na stosowanie genów odporności (R), ponieważ nie mają one trwałości. Jednak przy zwalczaniu chorób należy używać każdego dostępnego narzędzia genetycznego (Jeffrey i in., 2014).

Większość z genów odporności na rdzę brunatną, rdzę żółtą i mączniaka prawdziwego, są to geny główne, nazywane również genami R, warunkujące odporność monogeniczną czyli odporność pionową (wertykalną) opartą na teorii „gen na gen” (Flora 1956), gdzie dziedziczenie zarówno odporności gospodarza, jak i zdolności pasożyta do wywoływania choroby jest kontrolowane przez pary pasujących do siebie genów. Jednym z nich jest gen roślinny zwany genem odporności (R), drugi to gen patogena zwany genem awirulencji (Avr). Rośliny wytwarzające określony produkt genu R są odporne na patogen, który wytwarza odpowiedni produkt genu Avr. (Flor, 1955; McIntosh i in., 1995; Tyrka i Chełkowski, 2003; Chełkowski i Koczyka, 2005a; Perugini i in. 2008; Chen i in. 2005; Huang i Röder, 2004). Zdecydowanie mniej jest genów warunkujących odporność niespecyficzną, charakterystyczną dla odporności poziomej - horyzontalnej (Dilbirligi i in., 2004).

Podjęty w niniejszej pracy problem piramidyacji genów odporności na różne patogeny jest pracochłonny i czasochłonny. Jest to zabieg hodowlany, który wymaga wielokrotnych krzyżowań przy jednoczesnej selekcji wspomaganą markerami molekularnymi oraz selekcji fenotypowej. Zakres doświadczeń ujęty w tej pracy został tak

dobrany, aby w jak najlepszy sposób móc przetestować wybrane linie. Piramidyżacja genów w jednej linii hodowlanej może znacznie zwiększyć zakres odporności na różne rasy (patotypy) tego samego patogena, jak również na rozszerzenie zakresu odporności na różne patogeny. Skumulowanie różnych kombinacji genów warunkujących odporność na ważne z punktu widzenia rolniczego choroby, w tym również genów o charakterze ilościowym, przyczynia się do zmniejszenia presji selekcyjnej na patogena, jednocześnie daje to możliwość uzyskania trwalszej w czasie i kompleksowej odporności uprawianych odmian. Celem pracy jest piramidyżacja genów odporności na rdzę brunatną, rdzę żółtą oraz mączniaka prawdziwego, którą będzie można wykorzystać do przyszłych prac w tworzeniu nowych odmian odpornych na porażenie przez wymienione patogeny, co może zwiększyć ich potencjał plonotwórczy. Ponadto odporne odmiany pszenicy mogą być wykorzystywane w gospodarstwach ekologicznych nie stosujących środków fungicydowych. Stosowanie w uprawie odmian odpornych na patogeny przyczyni się również do obniżenia kosztów produkcji oraz będzie miało bezpośredni wpływ na ochronę środowiska i zachowanie równowagi w biocenozie (uniknięcie zatrucia płodów rolnych), co w rezultacie może korzystnie wpływać na zdrowie ludzi i zwierząt.

2. Przegląd literatury

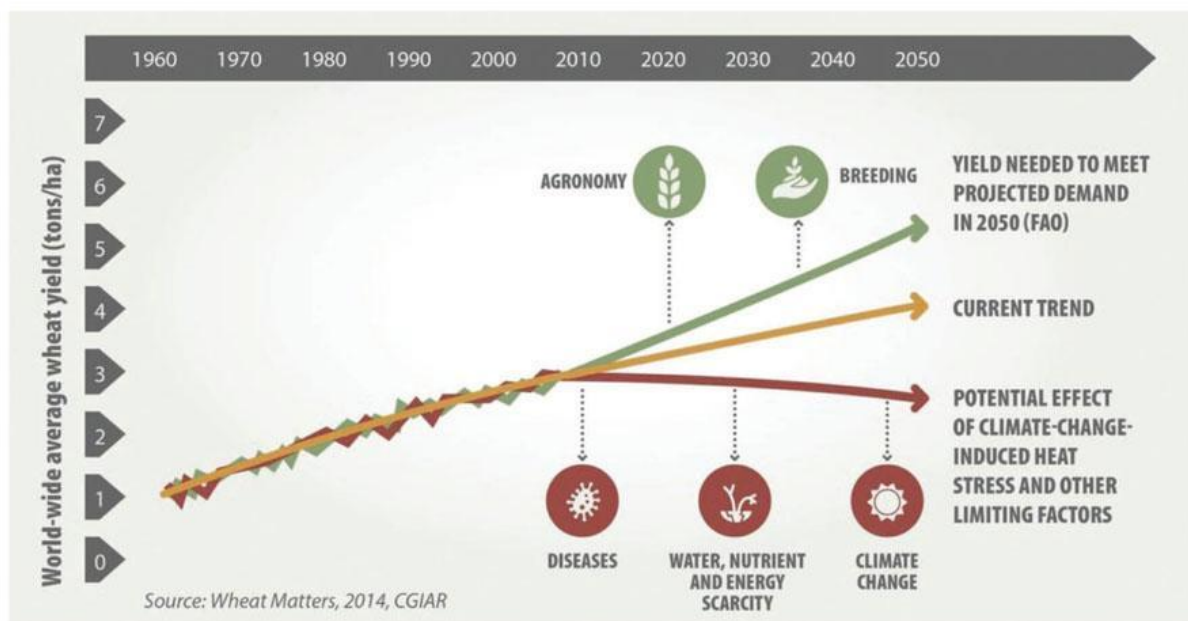
2.1. Pochodzenie pszenicy zwyczajnej

Pszenica należy do rodziny traw *Gramineae*, podrodziny wiechlinowatych *Poaceae*, będącej najbardziej istotną i różnorodną rodziną w królestwie roślin (Sehgal i in., 2012). Pszenica towarzyszyła człowiekowi od 10000 lat i przeszła do swojej obecnej postaci poprzez ciągłą selekcję i hodowlę roślin (Tigerstedt, 1997). Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum*) ewoluowała poprzez dwa zdarzenia poliploidyżacji między *Triticum urartu* (genom AA), a gatunkami związanymi z kozińcem *Speltoides Aegilops* (genom BB) 0,5 miliona lat temu, tworząc *Triticum turgidum* ssp. *diccocoides* oraz między *Triticum turgidum* ssp. *durum* (genom AABB) i *Aegilops tauschii* (genom DD) 10000 lat temu, tworząc nowoczesny heksaploid pszenicy zwyczajnej (AABBDD) (Huang i in., 2002; Moaine i in., 2016). Posiada największy genom wśród roślin uprawnych. Każdy z genomów posiada 7 chromosomów, stanowi 42 chromosomy ($2n=6x=42$). Wielkość genomu to w przybliżeniu 16 Gpz (giga par zasad). Stanowi to utrudnienie przy ulepszeniu tego gatunku

przy użyciu konwencjonalnych narzędzi genetycznych (Shah i in., 2009). Do form uprawnych prócz *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* (pszenica zwyczajna) zaliczamy również *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum aestivum* ssp. *spelta*. Rodzaj *Triticum* składa się z wielu gatunków form dzikich, uprawnych, ozimych jak i jarych (Dubas i Gładysiak, 1997).

2.2 Znaczenie gospodarcze pszenicy

Pszenica jest podstawowym pożywieniem dla 40% światowej populacji (Gupta i in., 2008). Jest uprawiana na 15,4% gruntów ornych na świecie w prawie wszystkich krajach. Zapewnia 21% kalorii żywności i 20% białka dla ponad 4,5 miliarda ludzi w 94 krajach rozwijających się (Braun i in., 2010). Jest drugą po ryżu najważniejszą, podstawową rośliną spożywczą i jest uprawiana na całym świecie na powierzchni około 220 mln ha na różnych szerokościach geograficznych, wysokościach nad poziomem morza, w różnych warunkach środowiskowych zarówno w wilgotnych, jak i suchych. Przewiduje się, że ze względu na wzrost liczby ludności i dobrobytu, popyt na pszenicę będzie rósł do roku 2050 w tempie 1,6% corocznie. Pszenica stanowi połowę kalorii spożywanych przez ludzi, a także dużą część ich wartości odżywczych. W rezultacie średni globalny plon pszenicy będzie musiał wzrosnąć z 3 ton do około 5 ton z hektara (Ravi i in. 2016). Prognoza wzrostu zapotrzebowania na pszenicę uwarunkowana jest zmianami trendów w populacji, nawyków żywieniowych oraz warunków gospodarczych i społeczno-gospodarczych, zwłaszcza w Afryce i Azji (International Grain Council [IGC], 2014). W ostatnich latach zauważalne zmiany temperatury i opadów deszczu na poziomie globalnym miały wpływ na produkcję pszenicy. Różne oszacowania wskazują na redukcję plonów pszenicy o 6–13% przy każdym wzroście temperatury o 1°C. W oparciu o obecne tendencje w produkcji pszenicy przewidywany wzrost wydajności pszenicy do 2050 r. będzie większy o 1 t/ha, co jest konieczne do zaspokojenia rosnącego popytu na świecie. (Rys.2)



Rysunek 2. Prognozowany popyt i tendencje wzrostu plonów pszenicy w kilku scenariuszach. Źródło www.cimmyt.org

W latach 2013/2014 kraje wchodzące w skład Unii Europejskiej wyprodukowały ponad 143 mln ton pszenicy, o 15% więcej niż Chiny, o 35% więcej niż Indie, i 60% więcej niż Stany Zjednoczone. Spośród państw członkowskich Unii Europejskiej, Francja i Niemcy są największymi producentami pszenicy, zbierając odpowiednio około 26 % i 17 % (Wielka Brytania zebrała około 8,5%). W ciągu ostatnich 10 lat tonaż metryczny Unii Europejskiej wzrósł o 23%, podczas gdy w tym samym okresie tonaże Stanów Zjednoczonych spadły o około 8 %. Unia Europejska obecnie eksportuje około 15% swoich zbiorów, a wielkość ta rośnie z roku na rok. Ziarno pszenicy uprawianej w Unii Europejskiej dostarcza kalorii dla ludzi (mniej niż jedna trzecia zbiorów) oraz dla zwierząt (około dwie trzecie zbiorów). Ziarno pszenicy jest również wykorzystywane do destylacji alkoholu, jako surowiec do biopaliw, a słoma pszenna używana jest jako ściółka, do pasz, na strzechy dachowe i do produkcji koszy (Fones i Gurr 2015).

Spotęgowana zmienność klimatu, częste ekstremalne zjawiska pogodowe oraz nowe rasy patogenów i szkodników dodatkowo zagrażają liniowemu wzrostowi wydajności w przyszłości. Hodowla pszenicy z tolerancją na zmiany klimatyczne i odpornością na choroby w połączeniu z dobrą agrotechniką może potencjalnie poprawić wydajność pszenicy, aby sprostać przyszłym wymaganiom (Mondal i in., 2016). W Polsce, jak i Unii Europejskiej (UE), pszenica należy do najważniejszej grupy roślin uprawnych. Jest podstawowym surowcem rolnym, mającym znaczenie strategiczne, gdyż jako najważniejszy produkt

spożywczy decyduje o bezpieczeństwie żywnościowym kraju (Urban, 2007). Jest typowym zbożem klimatu umiarkowanego (Ginter i Szarek, 2010). Na plony zbóż, w tym także pszenicy mogą mieć bardzo negatywny wpływ czynniki abiotyczne, takie jak dostępność składników odżywczych (Van der Bom i in., 2017) oraz ekstremalne zjawiska pogodowe, takie jak susza, upały i intensywne opady deszczu (Trnka i in., 2014; Van der Bom i in., 2017). Badania na pszenicy są bardzo trudne i rozległe. Służą one maksymalizacji produkcji, a także poprawie jakości ziarna. Konieczne jest poznanie sposobów dziedziczenia i działania genów warunkujących różne elementy struktury plonu roślin, aby rozpocząć produktywne programy hodowli roślin (Sehgal i in., 2012). Tworzenie nowych odmian odpornych na wiele patogenów jest stałym zadaniem w hodowli pszenicy, zwłaszcza w czasach rosnącego popytu na odmiany nadające się do uprawy w zrównoważonym rolnictwie. Mimo to niewiele wiadomo o relacjach między różnymi odpornościami na choroby powodowane przez grzyby na poziomie genetycznym i możliwych konsekwencjach dla strategii hodowli pszenicy (Stadlmeier, 2019).

2.3 Cechy morfologiczne

Pszenica jest rośliną jednoroczną. Forma jara wysiewana jest wiosną, natomiast forma ozima wysiewana jest jesienią (Szempliński, 2012). Duży wpływ na zmienność cech morfologicznych ma środowisko oraz system uprawy. Wysokość jest cechą ilościową, na którą może mieć wpływ temperatura, niska (12-16 °C) w okresie wzrostu źdźbła może powodować zmniejszenie wysokości roślin (Łubkowski, 1968). System korzeniowy pszenicy jest płytki. Nalot woskowy może pokrywać praktycznie wszystkie części rośliny, uwarunkowane jest to nie tylko genetycznie, ale również uzależnione jest od warunków środowiskowych, większą intensywność zaobserwujemy przy małej obsadzie i w latach suchych (Richards, 1984). Źdźbła są wyprostowane, gładkie, podzielone węzłami (kolankami) na międzywęzła zwykle od pięciu do sześciu, grube, wewnątrz puste. Pochwy liściowe silnie przylegają do międzywęzła wzmacniając źdźbło, które pod koniec okresu wegetacyjnego przybiera barwę złocistą. Kwiatostan stanowi kłos. Najczęściej spotykany kształt kłosa jest cylindryczny, typ wymłacalny, z niewielką osadką kłosową. Jednak kłosa różnić się mogą między sobą nie tylko formą, ale również długością i zbitością. Ziarno pszenicy jest nieoplewione, nasiona mają kształty owalne, jajowate lub baryłkowate (Dubas i Gładysiak, 1997; Budzyński i Szempliński, 2003; Jasińska, 2003). Najczęściej spotykany kolor ziarna to czerwony. Kolor ziarniaków jest uzależniony od obecności barwnika w trzech

różnych warstwach, warstwa owocni może zawierać barwnik purpurowy, okrywa czerwony, warstwa aleuronowa niebieski (Nawracała, 2004).

2.4 Choroby powodowane przez patogeny

Na całym świecie choroby pszenicy powodowane patogenami grzybowymi są bardziej groźne dla plonów i jakości ziarna niż choroby wywołane przez bakterie i wirusy. Ponieważ patogeny grzybowe są bardzo elastyczne i mogą szybko ewoluować w nowe szczepy, które mogą zainfekować rośliny wcześniej odporne na te patogeny. Na porażenie pszenicy przez grzyby wpływają różne czynniki: charakter patogena, podatność gospodarza, różnorodność zjadliwości, gęstość inokulatów i temperatura (Rajam i Van Ginkel 1996; McIntosh i in., 1998). Opisanych zostało prawie 200 chorób i szkodników zbóż z czego 50 jest ważnych ekonomicznie ze względu na ich potencjał do niszczenia upraw i obniżania dochodów rolników (Weiss, 1987). Silne porażenie roślin przez patogeny zmniejsza powierzchnię asymilacyjną co w rezultacie oddziałuje na procesy fotosyntetyczne (Stankowski i in., 2001; Rachoń i in., 2017). Ogólnie potencjalne straty plonu ziarna spowodowane chorobami oszacowano na 18%, a rzeczywiste straty przy obecnym zwalczaniu chorób na 13% (Oerke, 2006). Według Hysek (2016) i Kiselevy (2016) straty na skutek obniżenia masy ziarna oraz zmniejszenia ich liczby w kłosie mogą sięgać 10-40% co uzależnione jest głównie od przebiegu pogody, lokalizacji i nasilenia infekcji przez patogena.

Porażenie przez patogeny grzybowe zależy głównie od wykrywania patogenów, zmienności genetycznej i patologicznej w populacji, rozwoju odpornych odmian i wdrażania skutecznych genów odporności w różnych regionach epidemiologicznych. Ochrona pszenicy i hodowla odpornych odmian przy użyciu konwencjonalnych metod są czasochłonnymi, skomplikowanymi i powolnymi procesami. Markery molekularne stanowią doskonałą alternatywę w rozwoju ulepszonych odmian odpornych na choroby, które doprowadziłyby do wzrostu plonów. Są one wykorzystywane do oznaczania ważnych genów odporności na choroby i zapewniają cenną pomoc w zwiększaniu skuteczności selekcji cennych cech poprzez selekcję wspomaganą markerami (MAS). Bazując w hodowli roślin na znanych markerach odporności możliwe jest wytworzenie odpornych odmian pszenicy na różne choroby powodowane przez grzyby (Goutam i in., 2015).

Mimo, iż skala porażenia przez choroby może się rok rocznie zmieniać to patogeny są zawsze aktywne i mogą stanowić znaczące wyzwanie, nawet jeśli atakują tylko niektóre

części roślin. U pszenicy, podatne na porażenia są wszystkie części rośliny. Wystąpienie porażenia może ujawnić się w dowolnych warunkach środowiska i zależne jest od podatności odmian żywicielskich. Każde pojawienie się objawów choroby w różnym stopniu wpływa na plon i jakość ziarna lub słomy. Strategia obrony przed chorobami obejmuje odporność żywicielską, stosowanie ochrony chemicznej, kontrolę biologiczną. Najważniejsze choroby na świecie są powodowane przez grzyby biotroficzne, które mają wiele różnych szczepów lub ras fizjologicznych testujących odpowiedź gospodarza na infekcję (Ravi, 2016).

2.4.1 Rdza brunatna pszenicy

Rdza brunatna jest najbardziej rozpowszechnioną chorobą na świecie i jej głównymi regionami epidemicznymi są obie Ameryki, Europa, Azja, Północna Afryka i Australia, powoduje różne poziomy szkód (McCallum i in., 2012, Naik i in. 1998, Nocente i in. 2007). W Stanach Zjednoczonych straty gospodarcze wyniosły 350 mln USD w latach 2000-2004. W Chinach roczne straty plonów przypisane do rdzy brunatnej to 3 mln ton. W przeszłości była to również wyniszczająca choroba w Meksyku i Azji Południowej, ale w ostatnich dziesięcioleciach stała się mniej istotna przez powolne wprowadzenie genów odporności (Huerta-Espino i in., 2011). W Polsce porażenie źdźbeł pszenicy ozimej wynosi średnio 9,1% (Tratwal i Walczak, 2012). Według Kassem plon może się zmniejszać o 1% wraz ze wzrostem o 1% infekcji. (Kassem i in., 2011). Rdza stanowi globalny problem produkcji i zagraża światowej podaży pszenicy (Roelfs i in., 1992). Występuje zwykle w regionach, w których panują ciepłe i wilgotne warunki, a objawy zakażenia to zazwyczaj czerwonego koloru urediniospory na liściach, łodygach, plewkach kłosowych i ościach wrażliwych roślin (Kolmer, 2005). W Stanach Zjednoczonych zidentyfikowano około 70 różnych ras tego patogena. (Kolmer i in., 2007). Każdego roku we Francji powstaje od 30 do 50 nowych ras *P. recondita* f. sp. *tritici* (Goyeau i in., 2006). Straty plonów spowodowane przez rdzę brunatną są związane ze zmniejszeniem wielkości ziarna i ich jakości (Leonard i Szabo, 2005; Bremenkamp-Barrett i in., 2008). Chociaż rdza była dobrze kontrolowana w wielu częściach świata, prognozowanie modeli przy założeniu braku trwałej odporności szacuje, że globalne straty będą średnio wynosiły 6,2 mln ton metrycznych rocznie lub mogą być wyższe w przypadku poważnych epidemii (Pardey i in., 2013).

Do infekcji może dochodzić w każdym niemal warunkach, jednak najbardziej sprzyjająca temperatura to od 15°C do 18°C. (Weber i in., 2012). Objawy obserwujemy w

każdej fazie rozwojowej rośliny, zarówno na pszenicy ozimej jak i jarej. Jeśli zakażone zostaną oziminy to objawy obserwujemy już wczesną wiosną, zwłaszcza na górnej stronie liści. Początkowo ujawniają się jako chlorotyczne plamy, później jako brodawki poduszeczkowatych skupień koloru rdzawego rozsiewających się podczas wegetacji. Z początkiem lipca pojawiają się na dolnej stronie liści czarne skupienia zarodników zimujących - teliospory (Tratwal i Walczak, 2012; Korbas, 1998). Zmniejszenie plonów zależy od kilku czynników, takich jak: czas początkowego zakażenia, etap rozwoju rośliny oraz względnej odporności lub podatności odmian pszenicy. Wyższe straty plonów obserwuje się jeśli początkowa infekcja występuje na początku sezonu wegetacyjnego. Jednakże jeśli zakażenie wystąpiło podczas nalewania ziarna to może to spowodować mniejszą utratę plonu (Agrios 1997). Straty plonów pszenicy są powodowane ze względu na zmniejszenie liczby ziaren w kłosie i masy ziaren. W zależności od stadium porażenia i czasu trwania zakażenia, straty mogą wahać się do 50% u wrażliwych odmian pszenicy (McInstosh i in., 1995).

Hodowla odporności na rdzę brunatną u pszenicy jest najtrudniejszym zadaniem dla hodowcy, ponieważ odporność może zostać całkowicie pokonana przez zmianę dominującej rasy patogenów w populacji rdzy. Dlatego stosowanie odporności genetycznej jest stosunkowo obiecującą opcją zwalczania epidemii rdzy w roślinach uprawnych. Odporność genetyczna ma dwa wymiary; jednym z nich jest monitorowanie dynamicznych zmian populacji patogenów rdzy w celu identyfikacji nowych zjadliwych ras, a drugi polega na wdrażaniu genów odporności, aby pokonać nową rasę patogenów (William i in., 2008).

2.4.2 Rdza żółta

Jedną z głównych chorób pszenicy jest rdza żółta powodowana przez grzyb *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks (Chen 2014, Mukhtar i in. 2015, Talha i in. 2016). Głównie infekuje pszenicę, ale może również powodować infekcje w jęczmieniu, życie, i pszenżycie. Po raz pierwszy odnotowano infekcję w USA (Carleton 1915). Rdza żółta została zidentyfikowana w ponad 60 krajach na każdym kontynencie z wyjątkiem Antarktydy, gdzie nie uprawia się pszenicy (Chen 2005). Najnowszy wpis na liście krajów epidemii rdzy pasiastej (żółtej) to Zimbabwe (Boshoff i in., 2020). Epidemia występuje częściej (co 2-3 lata do 5 lat) w Pakistanie, Indiach, Chinach, Nepalu, Jemenie, Etiopii, Uzbekistanie, Kenii, Australii, Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych, Chile, Nowej Zelandii, Ekwadorze, Peru, Kolumbii i Meksyku (Shakra, 2020). Obecnie ponad 35%

powierzchni pod uprawą pszenicy jest dotknięte chorobą rdzy żółtej (Singh i in., 2004). Choroba jest stara, ale często pojawia się jako ponownie pojawiający się problem, a także rozszerza się na nowe obszary. Epidemie rdzy żółtej na dużą skalę występują, gdy w populacji patogenów rozwijają się nowe rasy pokonujące określone geny oporności i/lub gdy występują ekstremalne warunki pogodowe sprzyjające chorobom (Chen, 2020). Rdza jest rozpowszechniona na głównych obszarach produkcji pszenicy na świecie i może powodować znaczne obniżenie jakości ziarna i plonów w wrażliwych odmianach (Dimmock, 2002). Zmniejszona produkcja suchej masy, wzrost korzeni, wysokość roślin, wielkość i liczba kwitających kwiatków oraz wielkość i liczba ziaren to parametry na które wpływ ma infekcja. Efekty te są bardziej widoczne z zakażeniem rozpoczynającym się na etapie siewki, chociaż zakażenia inicjowane w późniejszym stadium są również związane ze zmniejszoną masą korzeni i wydajnością ziarna (Wellings 2011, Pooja i in. 2019). W ostatniej dekadzie pojawiły się nowe rasy, które są w stanie dostosować się do wyższych temperatur, rozszerzyły profile zjadliwości i są bardziej agresywne niż wcześniej charakteryzowane (Hovmoller, 2010). Rdzy żółtej sprzyjają chłodne warunki i jest bardziej aktywna wiosną. (Singh i in., 2002). Urediniospory zwykle rosną, gdy jest duża wilgotność, a temperatura minimum około 7–12°C i maksymalnie 20–26°C. Z biegiem czasu patogen ten przystosował się do wysokiej temperatury i powoduje to epidemie występujące również na obszarach subtropikalnych. Patogen w powietrzu może przemierzyć tysiące mil i spowodować nagłą epidemię (Wang i Chen, 2017). Straty mogą być poważne zwykle do 50% z powodu utraty powierzchni fotosyntetycznej na porażonych liściach, co skutkuje zmniejszeniem plonów jak i pogorszeniem jakości ziarna. W ekstremalnych sytuacjach przy bardzo wrażliwych odmianach w połączeniu z wczesnymi infekcjami i sprzyjającymi warunkami klimatycznymi rdza żółta może powodować 100% utraty plonów (Singh i in., 2002). Według Beddow (2015) w ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci rdza żółta zdewastowała światową produkcję pszenicy, ujawniając 80% odmian pszenic na nią podatnych. Roczna strata w wysokości 5 milionów ton przy szacowanym koszcie USD to każdego roku strata 1 miliarda. Jak dotąd zaobserwowano 51 głównych epidemii na całym świecie od 1939 do 2016 roku z różną intensywnością, od 2% strat plonów do całkowitego nieurodzaju (Chen 2020). Rdza kończy swój cykl życiowy u dwóch różnych niespokrewnionych gatunków żywicieli to znaczy u pszenicy i *Berberis* spp. (Zhao i in., 2016). W porównaniu z wieloma innymi chorobami rdza żółta jest stosunkowo łatwa do rozpoznania. Rdzę żółtą nazywamy również rdzą paskowaną, ponieważ patogen tworzy „paski” na porażonych liściach, które składają się z uredyniów (w kolorze pomarańczowym)

w liniach między nerwami liści w stadiach dojrziałych roślin. Urediniospory uwolnione z uredinii mogą zainfekować tą samą roślinę, inne rośliny na tym samym polu lub rośliny żywicielskie oddalone o setki kilometrów. Teoretycznie jedna urediniospora jest zdolna do wywołania epidemii na dużą skalę, która może całkowicie zniszczyć uprawę. Oprócz tworzenia się uredii nie liściach patogen ten może indukować śmierć komórek żywiciela co objawia się w postaci chlorotycznych lub nekrotycznych plam na liściach (Chen, 2020).

2.4.3 Mączniak prawdziwy

Sprawca choroby – *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* może powodować straty plonu sięgające 34–50%. Uważana jest za jedną z trzech najgroźniejszych chorób zbóż (Czajowski i Czembor, 2016, Griffey i in., 1993). Jest jedną z najbardziej wyniszczających pospolitych chorób. Występuje na wielu obszarach w tym w Chinach, Niemczech, Japonii, Rosji, Wielkiej Brytanii, Azji Południowej i Zachodniej, Afryce Północnej i Wschodniej oraz w południowo-zachodniej części Stanów Zjednoczonych. (Bennett, 1984). Występuje na polach pszenicy, gdzie dostępna jest wysoka wilgotność (Shao i in., 2005, Liu i in. 2017). Stosowanie fungicydów i hodowla odpornościowa są najskuteczniejszymi metodami walki z mączniakiem prawdziwym zbóż i traw (Kowalczyk i in., 2011). Mączniak należy do organizmów, które potrafią szybko wykształcić odporność na substancje czynne zawarte w fungicydach, dlatego metody hodowlane są uważane za najbardziej skuteczne (Szwarc i in., 2019). Dąży się do tworzenia kombinacji genów Pm. Piramidy genowe są procesem pracochlennym, a czynnikiem decydującym o skuteczności powodzenia procesu hodowlanego jest dobór efektywnych źródeł odporności (Tomkowiak, 2017). Niektóre objawy porażenia mogą być wizualnie obserwowane, jednak gdy nasilenie jest stosunkowo poważne zwykle jest już za późno, aby zapobiec i kontrolować chorobę (Zaho, 2020). Mączniak prawdziwy infekuje głównie liście, ale w poważnych przypadkach infekuje również łodygę i kłos i widoczny jest w postaci szarobiałego nalotu. *B. graminis* jest grzybem biotroficznym, który rozmnaża się tylko na żywej tkance komórkowej i infekuje pszenicę od stadium siewki. Infekcja nie tylko niekorzystnie wpływa na parametry jakościowe, ze względu na zmieniony skład zawartości ziarna i wyczerpanie rezerw węglowodanów, ale także na takie parametry jak masa tysiąca nasion (Gao, 2018). Optymalna temperatura dla rozwoju to od 10°C do 20°C, wysoka wilgotność sprzyja tworzeniu się i inwazji zarodników. W takich warunkach infekcja jest zastrzona. Jednak

duże opady nie sprzyjają powstawaniu konidii, również światło słoneczne jest czynnikiem hamującym (Austin i in., 2011). Gdy gęstość zasiewów jest zbyt duża, a wentylacja łanu pszenicy jest zbyt słaba wzrasta możliwość infekcji. Wysokie dawki nawozów azotowych, duże nawadnianie sprzyja namnażaniu się patogena (Gao i in., 2018). Zmniejszona bioróżnorodność genetyczna nowych odmian pszenicy, wzrost intensywności upraw przez nawadnianie oraz nawożenie i uprawa półkarłowych odmian wysokoplonujących przyczynia się do szybszego powstawania nowych ras (Ma i in., 2014; Hovhannisyan i in., 2011).

2.5 Hodowla odpornościowa

Udomowienie pszenicy 10000 lat temu oraz intensywna hodowla i selekcja doprowadziły do zawężenia puli genetycznej. Współczesne rolnictwo dodatkowo zawęziło bazę genetyczną, wprowadzając ekstremalne poziomy jednolitości na szeroką skalę przestrzenną i czasową. To zmniejszenie złożoności genetycznej sprawia, że gatunek ten jest podatny na nowe i pojawiające się szkodniki i patogeny. Dzicy krewni pszenicy stanowią ważne źródło zmienności genetycznej odporności na choroby. Przez prawie sto lat rolnicy, hodowcy i cytogenetycy starali się uzyskać dostęp do źródeł odporności w celu poprawy pszenicy zwyczajnej. Odporność została wprowadzona do pszenicy z co najmniej 52 gatunków z 13 rodzajów, co świadczy o niezwykłej plastyczności genomu pszenicy. Dwa główne problemy utrudniają skuteczne rozmieszczenie genów odporności w celu poprawy tego gatunku: jednoczesne wprowadzanie niekorzystnych cech oraz szybkie załamanie się odporności (Wulff i Moscou, 2014). Hodowla odpornościowa odmian jest złożonym przedsięwzięciem, które wymaga długoterminowego zaangażowania i znacznych inwestycji. Sukces w hodowli roślin opiera się na dwóch obowiązkowych warunkach: zmienności genetycznej cechy, która nas interesuje oraz narzędzi, które umożliwiają wiarygodną identyfikację pożądaných genotypów. Poczyniono postępy w obu aspektach, które doprowadziły do lepszego zrozumienia genetycznej kontroli oporności oraz do zarejestrowania ulepszonych odmian.

Stosowanie odpornych odmian jest najbardziej przyjaznym dla środowiska podejściem w celu zmniejszenia strat plonów z powodu chorób (Uloth i in., 2016, Liu i in., 2017). W Polsce od 1 stycznia 2014 roku obowiązuje IPM – zintegrowana ochrona roślin. To strategia, która zachęca do ograniczenia stosowania pestycydów poprzez stosowanie różnych niechemicznych metod zwalczania czynników chorobotwórczych np.: bakterii,

grzybów i wirusów, a także: nicieni, owadów, roztoczy, chwastów w celu powstrzymania ich poniżej poziomu strat ekonomicznych (Ehler, 2006). W wyniku ciągłej zmienności ras czynników chorobowych istnieje potrzeba poszukiwania nowych genów odporności. Ważne są badania mające na celu ocenę odmian odpornych na główne patogeny pochodzenia grzybowego co stanowi podstawę do selekcji pod kątem pożądanych cech (Święcicki i in., 2011).

Ważnym aspektem staje się skrócenie cyklu hodowlanego ze względu na to, że pszenica jest podstawowym pożywieniem dla populacji ludzkiej, opracowywane są i wykorzystywane coraz nowsze techniki hodowlane (Gupta i in., 2010).

2.6 Odporność roślin

Wyróżniamy dwa typy odporności na patogeny grzybowe. Pierwsza to odporność R – uwarunkowana przez geny główne (McIntosh i in., 2003). Druga grupa obejmuje geny odporności cząstkowej, których kilka lub kilkanaście genów zapewnia odmianom zadowalającą odporność (Keller i in., 2000). Pierwszy typ jest nazywany odpornością monogeniczną (pionową) lub specyficzną dla rasy, która jest skuteczna w przypadku niektórych izolatów, jest ona krótkotrwała i łatwa do przełamania, gdy pojawia się patogen który posiada odpowiednie geny wirulencji. Odporność rasowo-specyficzna polega głównie na reakcji „gen-na-gen”. Działa przez cały cykl życia rośliny. Chociaż odporność specyficzną dla rasy była szeroko stosowana w programach hodowli pszenicy, skutkuje presją selekcyjną wywieraną przez odmiany z genami odporności specyficznymi dla rasy szybkie gromadzenie się izolatów z dopasowanymi genami wirulencji. Następnie opór charakterystyczny dla rasy spada w konfrontacji z izolatami patogenów o pasujących genach wirulencji, a zatem jest efemeryczny. (Alam i in., 2011). W interakcji tej, na każdy gen odporności gospodarza przypada gen awirulencji patogena. Tak więc do zakażenia nie dochodzi jedynie wtedy, gdy u rośliny zawierającej gen odporności (R), występuje czynnik awirulencji patogena (AVR). Natomiast gdy brak allelu R w roślinie, będzie ona porażana, nawet jeśli patogen nie będzie posiadał czynnika awirulencji (AVR) (Tomczyńska i Śliwka, 2011; Abdelbacki i in., 2013). Reakcja odpornościowa jest to ciąg sygnałów biochemicznych następujących po sobie warunkowaną przez geny odporności R, która jest zapoczątkowana przez białkowy produkt genu R, wchodzący pośrednio lub bezpośrednio w interakcję ze specyficznym czynnikiem awirulencji (AVR). Czynnikiem ten jest wyprodukowany przez patogen. Są to białka zaangażowane w wykrycie wnikańców do

rośliny grzybów, bakterii, wirusów, nicieni, owadów oraz zapoczątkowanie reakcji odpornościowej, w szczególności reakcji nadwrażliwości, czyli programowanej śmierci zainfekowanych komórek i zatrzymania infekcji (McHale i in., 2006).

Drugim typem jest odporność, która powodowana jest przez wiele genów odporności nazywana poziomą, horyzontalną, poligeniczną lub ilościową. Działa w wyniku interakcji wielu genów roślinnych. Wpływ jednego może być zbyt słaby i dopiero suma efektów wielu może zapewnić poprawę odporności. Zwykle nie hamuje ona całkowicie choroby, a jedynie spowalnia i ogranicza występowanie objawów chorobowych (Castro i in., 2003; Tomczyńska i Śliwka, 2011). Wymienione typy odporności mają przypisaną różną trwałość. Trwałość pojedynczego genu R zależy od tempa ewolucji jednego genu patogena – czynnika AVR, podczas gdy przełamanie odporności ilościowej wymaga od patogena zmian interakcji z wieloma białkami rośliny. W związku z tym odporność ilościowa jest uznawana za trwalszą – pojedyncza mutacja w genie AVR jest wysoce prawdopodobna i może powodować zmianę tego genu, która przełamie monogeniczną odporność rośliny, podczas gdy jednoczesne zmiany wielu genów komplementarnych do wielu różnych genów sumujących się w odporności poziomej są zjawiskiem mało prawdopodobnym (Tomczyńska i Śliwka, 2011). Przełamanie odporności „gen na gen” jest zjawiskiem znanym i znane są przypadki, kiedy wirulencja patogena zmieniała się szybciej niż odmiany, które hodowcy byli w stanie stworzyć z kolejnym pojedynczym genem odporności R. Problem przy odporności ilościowej stanowi skutek rekombinacji w kolejnym pokoleniu. Podlega ona silnym wpływom środowiska, a więc hodowli stoją na przeszkodzie obszerne i kosztowne testy polowe, co czyni program hodowlany trudniejszym (Castro i in., 2003).

Inny podział genów odporności obowiązuje ze względu na czas występowania choroby. Wyróżniamy odporność rośliny dorosłej (z ang. Adult Plant Resistance-APR) oraz w stadium siewki (z ang. Seedling Plant Resistance-SPR) (Alam i in., 2011). APR opóźnia infekcję, wzrost i rozmnażanie się patogena u dorosłych roślin, ale nie w siewkach. Ten typ odporności można zidentyfikować u odmian z potwierdzonymi genami specyficznymi dla rasy lub bez znanych genów odporności specyficznych dla rasy (Hautea i in., 1987). Obecnie wśród niektórych hodowców panuje pogląd, że należy położyć większy nacisk na odkrycie, charakterystykę i wykorzystanie genów APR dla trwałej odporności (długotrwałe, gdy jest szeroko stosowane w rolnictwie) z sugestią, że mniejszy nacisk należy położyć na stosowanie genów oporności (R) ze względu na ich brak trwałości. Można stwierdzić, że jeśli chodzi o zwalczanie chorób należy użyć każdego dostępnego narzędzia genetycznego (Ellis J. i in., 2014).

Jednak oporność genów jest często pokonywana przez nowe izolaty, ponieważ obecność i częstotliwość zjadliwości w populacji patogenów zmieniają się w sposób ciągły (Leath i Murphy, 1985; Menzies i MacNeil, 1986; Limpert i in., 1987; Namuco i in. 1987). Skuteczna strategia walki polegała na zastąpieniu odmian, gdy ich odporność nie jest już skuteczna (Wolf, 1984; Leath i Heun, 1990).

Uprawa odmian odpornych daje efektywne, ekonomicznie racjonalne i bezpieczne dla środowiska podejście do eliminacji stosowania fungicydów i organicznie strat plonów spowodowane przez choroby.

2.7 Piramidyzacja genów

Stosowanie środków chemicznych jest kosztowne, ale też nieobojętne dla środowiska i rodzi coraz większy sprzeciw społeczeństwa. Uzyskanie dużego plonu dobrej jakości przy ograniczeniu stosowania środków chemicznych jest możliwe poprzez uprawę odmian odpornych na patogeny i szkodniki. Ważnym aspektem jest, aby odporność ta była trwała i efektywna w stosunku do różnych gatunków patogenów lub szkodników lub do różnych ras /patotypów patogena (Tomczyńska i Śliwka, 2011). Piramidyzacja jest sumą efektów pomiędzy wieloma genami. Pojedynczy gen może mieć zbyt słaby wpływ na odporność rośliny i dopiero ich suma daje poprawę (Tuzun, 2001). Sposobem, który daje nadzieje na zwiększenie spektrum działania i trwałości wykorzystania genów R w uzyskaniu odporności jest ich łączenie (Tomczyńska i Śliwka, 2011). Metoda ta jest uważana za skuteczny sposób na zwiększenie trwałej odporności na choroby w uprawach (Liu i in., 2020). Jest to proces długotrwały i pracochłonny, lecz jest on niezbędny do osiągnięcia szerokiego spektrum i trwałej odporności przed występującymi chorobami (Pietrusińska i Czembor, 2015).

Istnieje model tworzenia piramid, który zakłada, że prawdopodobieństwo kombinacji wirulencji w populacji patogena zmniejsza się proporcjonalnie do liczby nieprzełamanych genów R, które są użyte w piramidzie. Jest to wyłącznie model teoretyczny. Nie udowodniono zależności pomiędzy liczbą genów w linii, a trwałością odporności (Mundt 1991, Pink 2002). Ważne jest, aby rośliny te nie były uprawiane równocześnie. Rośliny z pojedynczym genem mogą stanowić pewnego rodzaju ułatwienie, dzięki któremu patogen będzie mógł ewoluować i zmieniać kolejne geny AVR uzyskując zdolność do infekcji odmiany zawierającej spiramidyzowane geny (Pink 2002, Tan i in.,

2010). Przy konwencjonalnej metodzie hodowli było możliwe wprowadzenie więcej niż jednego genu R, jednak bez możliwości potwierdzenia jednoczesnej obecności wprowadzanych genów. Z powodu efektu epistatycznego nie było możliwe rozróżnienie fenotypowo roślin odpornych posiadających jeden lub więcej genów. Tak więc hodowcy tworzyli piramidy dla których specyficzna wirulencja była już w populacji patogena. Jej trwałość była uzależniona od czasu, w którym patogen był w stanie zmutować oraz czasu w jakim nowy patotyp ustabilizował się w populacji (Pink 2002).

Efekt spiramidyzowania genów można osiągnąć różnymi sposobami: po pierwsze na drodze hodowli konwencjonalnej i wykorzystaniu dominujących i recesywnych genów odporności; po drugie na drodze inżynierii genetycznej (wdrażanie sekwencji genów pochodzenia roślinnego lub modyfikacje RNA), po trzecie połącznie hodowli konwencjonalnej z inżynierią genetyczną (Fuchs, 2017). Największy nakład pracy w procesie hodowli ponosi hodowca, który musi się skupić na tym, aby plon i jakość odmian nie były jedynym kryterium przy rejestracji nowych odmian, musi on skupić swoją uwagę również na tym, aby odporność roślin była efektywna, stabilna i trwała.

Trwałość odporności bezpośrednio zależy od biologii patogena. Przy patogenie glebowym, który ma zmniejszone możliwości by się rozprzestrzeniać, piramida z genów R dla których spotykane są kompatybilne izolaty patogena będzie wskazywać większą trwałość niż piramidy, które są stworzone dla patogenów łatwo rozprzestrzeniającymi się jak np. rdza czy mączniak (Pink 2002, Gebrewahid 2017). Zdarza się, że pomimo dodatkowego genu w roślinie nie obserwuje się spodziewanego efektu addytywnego (Sharma i in., 2004).

Mechanizmy odporności ilościowej nie są do końca poznane, ale mimo to podejmuje się próby połączenia QTL-i w celu uzyskania lepszej odporności. Richardson i in. (2006) zastosowali ocenę czterech parametrów skuteczność infekcji, opóźnienie infekcji w stosunku do czasu inokulacji, gęstość zarodników oraz wielkość porażonej tkanki roślinnej. Rośliny zawierające pojedyncze QTL odznaczały się lepszą odpornością pod względem wszystkich parametrów od podatnego rodzica. Zaobserwowano różnicę między siłą wpływu na cechę przez allele odporności pochodzące z różnych QTL-i. Piramidyzacja trzech dawała lepszy efekt z wyjątkiem parametru opóźnienia infekcji. Autorzy wysnuli wniosek, że nie zawsze wprowadzenie tych samych trzech QTL-i do różnych linii hodowlanych daje taki sam stopień odporności.

Piramidyzacja odporności ilościowej i jakościowej daje możliwość uzyskania wysokiej odporności, która jest uwarunkowana genami głównymi i jednocześnie trwałej na

skutek działania licznych QTL-i. Uzupełniając się nawzajem zmniejszają prawdopodobieństwo wyselekcjonowania izolatów patogena zdolnych do infekcji. Zapobiega to powstawaniu rasy zdolnej do przełamania obu źródeł. W sytuacji gdy patogen złamie odporność jakościową, odporność ilościowa będzie wciąż działać i chronić roślinę (Hittalmani i in., 2000).

Tworzenie piramid jest powszechnie wykorzystywanym procesem hodowlanym. Kumulacja genów jest efektywnym sposobem wykorzystania genów poprzez ich łączenie w jednym genotypie. Szczególnie przydatna jest kiedy pojedyncze geny R nie zapewniają trwałej odporności rośliny na patogena (Pietrusińska i Czembor, 2015). W wyniku ciągłych zmian wirulencji patogenów hodowla odpornościowa składa się z wielu sukcesów i porażek. Geny główne występujące pojedynczo często są przełamywane przez nowe patotypy. Hodowcy starają się wprowadzać kombinacje dwóch lub większej ilości genów w jednej odmianie. Dobór komponentów do krzyżowania stanowi postawę pracy nad hodowlą odpornościową pszenicy, w celu uzyskania odpowiednich piramid genowych (Kiel, 2019).

Piramidyzacja genów nabrała nowego znaczenia, gdy w 2014 roku w wyniku działań Unii Europejskiej również w Polsce została wprowadzona zintegrowana ochrona roślin (Ehler, 2006).

2.8 Geny odporności

Technologia markerów molekularnych jest nowatorskim narzędziem genetycznym ułatwiającym hodowlę wysokowydajnych odmian odpornych na choroby (Landjeva i in. 2007; Varshney i in., 2007). Markery molekularne mogą oznaczać obecność ważnych genów odporności i umożliwiać hodowcom szybkie i dokładne identyfikowanie genów odporności. Zapewniają one również znaczącą pomoc w zwiększaniu wydajności selekcji poprzez pośredni wybór cennych cech oraz wybór wspomagany znacznikami (MAS). W ten sposób MAS oferuje potencjalne narzędzie do wspierania konwencjonalnych metod hodowli roślin, aby wybrać cechy fenotypowe do badań przesiewowych roślin uprawnych odpornych na choroby (Todorovska i in., 2009). W związku z tym istniejące techniki hodowli roślin wraz z dostępnymi markerami molekularnymi (Gupta i in., 2010) i funkcjonalnymi narzędziami genomicznymi (Gupta i in., 2008), mogą pomóc hodowcy w wytworzeniu doskonałych odmian pszenicy odpornych na choroby powodowane przez grzyby. (Goyal i Prasad 2010). Różne rodzaje markerów, takich jak losowe markery DNA, markery genowe

(Gupta i in., 2010) i markery funkcjonalne (Liu i in., 2012) zostały opracowane w celu ułatwienia identyfikacji genów odpowiedzialnych za poszczególne cechy i poprawy potencjału stosowania MAS w programach hodowli pszenicy (Gupta i in., 2008). Rozwój systemów transferu genów roślin umożliwia nam wprowadzenie obcych genów do genomów roślin dla nowych strategii zwalczania chorób, zapewniając w ten sposób mechanizm poszerzenia zasobów genetycznych dostępnych dla hodowców roślin (Zhu i in., 2012).

3. Materiał i metody

3.1. Materiał

Materiał do badań stanowiły genotypy pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.), form jarych. Doświadczenia polowe prowadzone były w latach 2012 - 2020 na polu hodowlanym w firmie Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, leżącym w województwie wielkopolskim. Jako źródła odporności wybrano 5 odmian pszenicy jarej (Henika, Parabola, Santa, Hena, Triso). Obiekty stanowiły materiał ustabilizowany genotypowo i fenotypowo o bardzo dobrych cechach rolniczych i użytkowych. Formy te zostały wytypowane ze względu na obecność genów odporności na mączniaka prawdziwego, rdzę brunatną i rdzę żółtą. Niepublikowane badania wykonane przez Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR) Zakład Roślin Zbożowych w Krakowie wykazały, że odmiany te posiadają różne geny odporności (tab. 2).

Tabela 2. Komponenty rodzicielskie pszenicy jarej wybrane do krzyżowań w celu otrzymania roślin pokolenia F₁ do dalszych badań.

Pszenica jara		
Genotyp	Źródło	Gen odporności
Henika	Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o. o.	Lr1, Pm5
Parabola	Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o. o.	Yr5, Yr29, Lr46
Santa	Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o. o.	Lr1, Pm5
Hena	Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o. o.	Pm3d, Lr11
Triso	Centrala Nasienna Środa Śląska	Lr18, Lr20

Henika

Odmiana jakościowa zaliczona do grupy A o dobrej jakości wypiekowej mąki. Posiada dobrą zdrowotność, zwłaszcza na rdzę brunatną. Charakteryzuje się dużą odpornością na wyleganie i może być polecana na przeciętne stanowiska glebowe.

Parabola

Odmiana jakościowa z grupy A, ma dużą zawartość białka, duży wskaźnik SDS i dużą ilość glutenu, a wydajność mąki średnia. Charakteryzuje się bardzo dobrą odpornością na mączniaka, rdzę brunatną, septoriozę liści, fuzariozę kłosów i choroby podstawy źdźbła, średnią na septoriozę plew. Rośliny są średniej wysokości, o przeciętnej odporności na wyleganie. Należy do odmiany, która ma wczesne kłoszenie. Masa 1000 ziaren ma bardzo dużą, gęstość w stanie zsypanym średnią, a liczba opadania duża do bardzo dużej. Charakteryzuje się średnią tolerancją na zakwaszenie gleby. Uzyskiwana plenność jest dość dobra.

Santa

Średniowysoka odmiana o dużej odporności na wyleganie, terminie kłoszenia średnim. Charakteryzuje się dość dobrą odpornością na rdzę brunatną. Ziarno ma bardzo szkliste, średniej wielkości, przeciętnym wyrównaniu i o wysokiej gęstości w stanie zsypanym. Zarówno wydajność mąki jak i jej wartość wypiekowa jest średnia. Może być polecana na przeciętne stanowiska glebowe.

Hena

Odmiana jakościowa zaliczana do grupy B o dość dobrej wartości wypiekowej i bardzo dużej liczbie opadania. Otrzymana mąka jest średniej jakości. Posiada dobrą zdrowotność na choroby wywoływane przez grzyby prócz rdzy źdźbłowej. Odmiana jest średnio wysoka, niewylegająca o terminie kłoszenia i dojrzewania średnim. Hena ma dość dobrze wyrównane ziarno, o dużej gęstości w stanie zsypanym i przeciętnej masie 1000 ziaren. Plenność tej odmiany w skali kraju jak i w poszczególnych rejonach bardzo dobra, a wymagania glebowe przeciętne.

Triso

Odmiana jakościowa z grupy A o średniej wydajności mąki. Charakteryzuje się dużą zawartością białka, bardzo dużym wskaźnikiem SDS oraz liczby opadania i bardzo dużą ilością glutenu. Nasiona są dość drobne. Trio to odmiana odporna na choroby powodowane przez grzyby takie jak: rdza brunatna, septorioza liści, septorioza plew, fuzarioza kłosa i choroby podstawy źdźbła. Rośliny są dość niskie, o średniej odporności na wyleganie i

średnim terminie kłoszenia i dojrzewania. Plenność jest słaba i średnio toleruje zakwaszenie gleby.

Odmiany te stanowiły podstawę do rozpoczęcia programu krzyżowań w 2015 roku (tab. 3). Wykonano pięć kombinacji mieszańcowych. W pierwszym roku zostały wykonane krzyżowanie proste A x B. Zapis A x B oznacza, że linia o nazwie A jest formą mateczną, a linia o nazwie B jest formą ojcowską, czyli zapylaczem. Podana formuła A x B oznacza też, że jest to mieszańiec pojedynczy (ang. single cross - SC)(Tab.2).

Tabela 3. Komponenty rodzicielskie krzyżowane w 2015 roku w celu otrzymania roślin pokolenia F₁ do dalszych badań.

Lp.	Roślina mateczna	Roślina ojcowska
1	Henika	Parabola
2	Santa	Hena
3	Hena	Parabola
4	Parabola	Triso
5	Triso	Santa

W następnym roku wykonano kombinacje złożone, mające na celu dopełnienie brakujących genów odporności (A x B) x (C x D). Mieszańce czteroliniowe (ang. double-cross - DC), gdzie formę mateczną i ojcowską tworzą pojedyncze mieszańce (Tab. 4).

Tabela 4. Kombinacje złożone wykonane w 2016 roku w celu otrzymania roślin pokolenia F₁ do dalszych badań.

Lp.	Roślina mateczna	Roślina ojcowska
1	(Henika x Parabola)	(Santa x Hena)
2	(Santa x Hena)	(Hena x Parabola)
3	(Parabola x Triso)	(Santa x Hena)
4	(Triso x Santa)	(Henika x Parabola)

W 2017 roku każda uzyskana z krzyżowań forma została wysiana w polu na poletkach jednometrowych (F₁). W roku tym wykonano pierwsze oceny porażenia przez choroby powodowane przez grzyby. Porażenie oceniano w 9-stopniowej skali graficznej wykorzystywanej przez COBORU, gdzie 1 – maksymalne porażenie roślin, natomiast 9 – brak oznak porażenia. Oceny dokonano w okresie od początku kłoszenia do stadium pełnego wykłoszenia roślin.



Fot: 1 i 2 Uzyskane rośliny z krzyżowań (Henika x Parabola) x (Santa x Hena)



Fot. 3 i 4 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola)



Fot. 5 i 6 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)



Fot. 7 i 8 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)

Cały materiał badawczy został zebrany i wysiany w 2018 roku (F_2) w ilości 800 ziarniaków na poletkach o powierzchni 10 m². Pozostałą część nasion wykorzystano do założenia doświadczenia ze sztuczną inokulacją na mączniaka w stadium siewki. Kombinacje wysiano w małych doniczkach po 15 nasion, w 3 powtórzeniach. Inokulat był przygotowany z zarodników zebranych podczas okresu wegetacyjnego. Zakażano rośliny w szklarni gdzie utrzymywano wysoki poziom wilgotności powietrza. Ocena odbywała się w skali 5 stopniowej (Skala wg. Mainsa i Daetza (1930) dla mączniaka prawdziwego, w której: 0 = brak widocznych objawów porażenia; 1 = niewielkie nekrozy; 2 = powiększające się nekrozy wraz ze skąpym zarodnikowaniem; 3 = chlorozy, grzybnia rozwinięta, lecz słabo zarodnikująca; 4 = dobrze rozwinięta grzybnia i zarodnikująca grzybnia. Odmiany – linie o reakcji 0 – 2, tworzyły grupę roślin odpornych, natomiast o reakcji 3 – 4 grupę roślin podatnych).

Z każdej kombinacji wytypowano 30 kłosów, które zostały wymłócone oddzielnie. W pokoleniu F_3 wysiano każdy kłos osobno na rzędkach jednometrowych i zebrano po jednym kłosie z każdego rzędka. W ten sposób zostały wyselekcjonowane linie z uzyskanych mieszańców.

W 2020 roku (F_4) wymłócono kłosy i wysiano ponownie na poletkach jednometrowych, na których wykonano ocenę porażenia przez choroby (skala 9-stopniowa).

Część nasion z zebranych rzędów została wysłana do Uniwersytetu Przyrodniczym we Wrocławiu, w celu dalszej analizy.

3.2. Metodyka

Analiza statystyczna wyników wykonana została w pakiecie R. Hipotezę o wpływie krzyżówki na analizowane cechy sprawdzono za pomocą analizy wariancji wykorzystując do tego model liniowy o ogólnym wzorze:

$$y = \mu + \alpha_i + \epsilon$$

gdzie:

μ - średnia ogólna cechy

α_i - i -ta kombinacja krzyżowania

ϵ - błąd

Do weryfikacji założeń testu ANOVA zastosowano test Levenesa - sprawdzenie homogeniczności wariancji w badanych grupach (układach krzyżowań). Test ten wykazuje istotność różnic ze względu na kombinację krzyżowania. Metoda ta testuje hipotezę zerową wskazującą na równość wariancji. Zatem jeżeli wartości istotności testu Levene'a uzyskują jest mniejsza niż $p < 0,05$ to oznacza, wtedy uznajemy wariancje za niejednorodne (heterogeniczne), tj. występują różnice między wariancjami w porównywanych grupach. Natomiast w przypadku nieistotnego statystycznie wyniku ($p > 0,05$), przyjmujemy założenie o homogeniczności wariancji. W przypadku niespełnienia założeń do przeprowadzenia analizy ANOVA do analizy wariancji i porównania średnich wykorzystane zostały testy nieparametryczne. Dla tych cech wykonano analizę wariancji wykorzystując test Kruskala-Wallisa. Test ten to nieparametryczny odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji. Wykrywa różnice w położeniu rozkładu. Ten test zakłada brak uporządkowania *a priori* k populacji, z których pobrano próby.

Założenie dotyczące normalności rozkładu błędów modelu sprawdzono wykonując histogram oraz wykres qqPlot.

3.2.1 Genotypowanie markerami PCR

DNA wyizolowano z młodych siewek z wykorzystaniem kitu DNeasy Plant Pro Kit (Qiagen, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. Po izolacji ilość i jakość DNA

sprawdzano elektroforetycznie i spektrofotometrycznie. Do dalszych analiz przygotowano roztwory DNA o stężeniu 30 ng/ul.

PCR wykonywano na termocyklerze Biometra. W reakcji amplifikacji wykorzystano 8 starterów ISSR z listy UBC#9 (University of British Columbia), tabela x. PCR przeprowadzono w objętości 15 ul, a mieszanina reakcyjna zawierała: 7,5 ul 2xPCR Master Mix Plus (AA Biotechnology, Polska), 0,53 uM startera, 0,8 uM dNPT oraz 36 ng matrycowego DNA. Ustalono następujący profil termiczny: wstępna denaturacja: 94°C przez 5 min, 40 cykli denaturacja: 94°C 30 sek., przyłączanie starterów: optymalna temperatura dla danego startera (tabela x) 30 sek., amplifikacja: 72°C 45 sek., końcowa amplifikacja: 72°C przez 7 min. Optymalną temperaturę dla każdego startera ustalono we wcześniejszych badaniach prowadzony w Katedrze Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa. Produkty amplifikacji rozdzielano z wykorzystaniem urządzenia Qiaxcel (Qiagen, Niemcy). Do rozdzielania używano zestawu Screening Kit (Qiagen, Niemcy) czas poboru próbki 10 s, czas rozdzielania 420 s, alignment 15bp – 3kbp, marker wielkości 100bp – 2,5 kbp. Do analizy danych po rozdzielaniu na urządzeniu Qiaxcel wykorzystano oprogramowanie QIAxcel ScreenGel (Qiagen, Niemcy).

Wyizolowane DNA użyto również do amplifikacji z wybranymi na podstawie literatury starterami dla opisanych markerów sprzężonych z odpornością na grzyby patogeniczne.

Tabela 5. Sekwencje starterów użytych w pracy.

Nazwa genu	Nazwa startera	Sekwencja F	Sekwencja R
Lr1	pTAG621	GGGTCA CGT ACT ACT ATA TA	CCT TGC CAG CCC AAA AGA AG
Lr46	Xwcm44	GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G	GTT GCT AGG GAC CCG TAG TGG
Pm3d	Pm3d	TGA CTA TTC GTG GGT GCA	GAC TGC GGC ACA GTT CAG C
Pm5	Xgwm577	ATGGCATAATTTGGTGAAA TTG	TGTTTCAAGCCCAACTTCTAT T
Lr18	wmc35	GTCCGCCGCACACATCTTA CTA	GTTTGATCCTGCGACTCCCTT G

Lr20	STS638	ACAGCGATGAAGCAATGAA A	GTCCAGTTGGTTGATGGAAT
Yr5	STS_Y R5	GTACAATTCACCTAGAGT	GCAAGTTTTCTCCCTATT
	Xwmc1 75	GATAAAATCATTATTGGGT GTCCTTT	TTCAAATAATCTTTCATCAGT CAAATG
	S23M4 1-275	TCAACGGAACCT-CCA- ATTTC	AGGTAG-GTGTTCAGCTTGC
Yr29	Ywmc 44_	GGT CTT CTG GGC TTT GAT CCT G	GTT GCT AGG GAC CCG TAG TGG
	Ywmc 44	ggTcTTcTgggcTTTgATccTg	TgTTgcTAgggAcccgTAgTgg

Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 15 ul, a mieszanina reakcyjna zawierała 7,5 ul 2xPCR Master Mix Plus (AA Biotechnology, Polska), 0,28 uM każdego z starterów, 0,8 uM dNPT oraz 24 ng matrycowego DNA. Profil termiczny: wstępna denaturacja: 94°C przez 5 min, 40 cykli denaturacja: 94°C 30 sek., przyłączanie starterów: optymalna temperatura dla danego startera (tabela y) 30 sek., amplifikacja: 72°C 45 sec, końcowa amplifikacja: 72°C przez 7 min. Rozdział produktów amplifikacji przeprowadzono analogicznie jak rozdział produktów amplifikacji ISSR-PCR.

3.2.2 Analiza statystyczna wyników genotypowania

Do analizy statystycznej wyników genotypowania wykorzystany został program R (R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). W obliczeniach wykorzystano pakiety: adegenet (Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405. phangorn (Schliep K.P. 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4) 592-593) oraz ape (Paradis E., Claude J. & Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290.). Macierz binarną utworzoną w programie Qiaxcel ScreeningGel (Qiagen) wczytano do programu R, a następnie dokonano jej konwersji do obiektu typu genind (S4 formal class). Dla tak przygotowanych wyników obliczono dystans genetyczny pomiędzy badanymi obiektami. Obliczeń dokonano według wzoru Nei (1979) $[s = 2a / (2a + b + c)]$. Do zobrazowania dystansu genetycznego pomiędzy badanymi obiektami wykorzystano metodę konstrukcji drzewa opartą o odległość – metodę średnich połączeń UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Do zobrazowania dystansu w

postaci „mapy cieplnej (ang. heat map) wykorzystano funkcję heatmap.2 z pakietu gplots (<https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/>).

Metodę skalowania wielowymiarowego (MDS) macierzy dystansu genetycznego wykorzystano do stworzenia wykresu 2d. Polega ona na przekształceniu pomiaru podobieństwa obiektów w skalach porządkowych na pomiar odległości między obiektami w skalach przedziałowych. Celem dokonywanej transformacji jest wychwycenie tzw. cech ukrytych obiektów.

Do określenia optymalnej liczby subpopulacji (klastrów) w obrębie badanej populacji wykorzystano algorytm k-means, który znajduje zadaną liczbę grup (k), maksymalizując wariancję między grupami B(X).

Przed analizą jednoczynnikowej wariancji sprawdzono założenia o równości wariancji w poszczególnych grupach za pomocą testu Levene'a. W przypadku niespełnienia założeń do przeprowadzenia analizy ANOVA do analizy wariancji i porównania średnich wykorzystane zostały testy nieparametryczne. Dla tych cech wykonano analizę wariancji wykorzystując test Kruskala-Wallisa

Test Levene'a jednorodności wariancji – test statystyczny stosowany do weryfikacji, czy wariancja w badanych próbach jest równa. Równość wariancji w poszczególnych próbach jest nazywana jednorodnością wariancji. Niektóre statystyczne procedury, np. analiza wariancji, zakładają jednorodność wariancji pomiędzy badanymi próbami. Test Levene'a służy sprawdzeniu, czy faktycznie założenia konieczne do przeprowadzenia analizy wariancji są spełnione. Test Levene'a jest równoważny jednoczynnikowej międzygrupowej analizie wariancji (ANOVA), gdzie zmienną zależną jest wartość bezwzględna różnicy między wynikiem a średnią grupy, do której należy wynik. Statystyka testowa W jest równoważna statystyce F, która zostałaby wygenerowana przez taką ANOVA, i jest zdefiniowana w następujący sposób:

$$W = \frac{(N - k)}{(k - 1)} \cdot \frac{\sum_{i=1}^k N_i (Z_{i.} - Z_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_{i.})^2},$$

gdzie:

k - liczba różnych grup

N_i - liczba przypadków w grupie

N - całkowita liczba przypadków

Y_{ij} - mierzona wartość dla j -tego przypadku w i -tej grupie

Z_{ij} - wartość bezwzględna różnica wartości Y_{ij} a wartością średnią i -tej grupy

Statystyka W w przybliżeniu posiada dystrybucję rozkładu F w $k-1$ i $N-k$ stopniami swobody (Brown i Forsythe 1974).

Test Kruskala-Wallisa – rangowy test statystyczny porównując rozkłady zmiennej w $k > 2$ populacjach. Test nie zakłada normalności rozkładów. Niekiedy uważany jest za nieparametryczną alternatywę dla jednoczynnikowej analizy wariancji pomiędzy grupami. Hipotezą zerową jest równość dystrybuant rozkładów w porównywanych populacjach. Danymi wejściowymi jest n -elementowa próba statystyczna podzielona na k rozłącznych grup o licznosciach n_1, n_2, \dots, n_k . Zakłada się, że każda grupa jest losowana z innej populacji. Wykonywane jest rangowanie całej próby (połączone wszystkie grupy). Statystyka testowa Kruskala-Wallisa dana jest wzorem:

$$T = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k n_i \left(\bar{R}_i - \frac{n+1}{2} \right)^2,$$

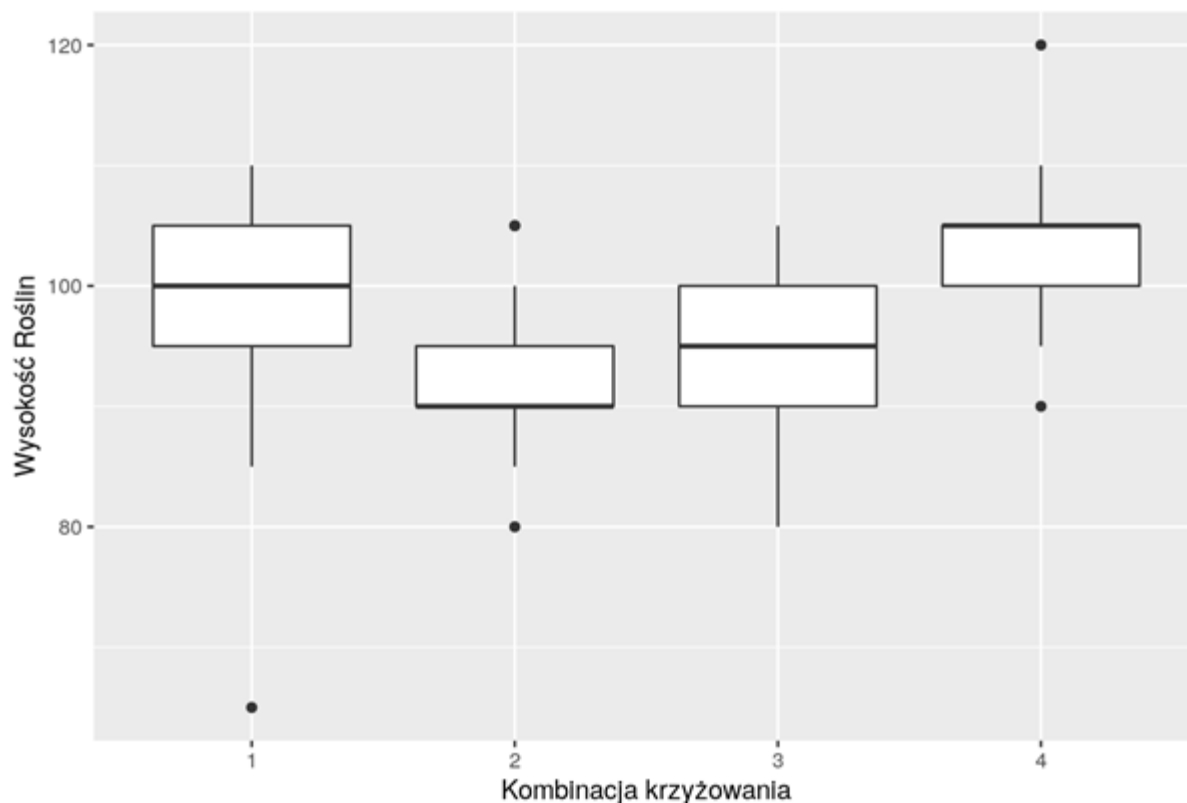
Statystyka ta jest miarą odstępstwa średnich próbkowych rang od wartości średniej wszystkich rang, równej $(n+1)/2$

Aby wyznaczyć optymalną liczbę klastrów (grup) algorytm ‘k-means’ uchroniony został przy różnych (wzrastających) wartościach k , a otrzymane wyniki zostały porównane ze sobą przy użyciu algorytmu BIC (ang. Bayesian Information Criterion). Wykres BIC w zależności od liczby grup (klastrów) przy minimalnej wartości BIC (lub lokalne minimum) wskazuje na optymalną liczbę klastrów w badanym materiale.

W celu porównania modeli z różnym podziałem obiektów na klastry wykonano analizę molekularnej wariancji ANOVA. Obliczenia wykonano w pakiecie poppr.

4. Wyniki - Analiza statystyczna

4.1.1 Wysokość roślin



Rycina 1. Analiza wysokości roślin w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

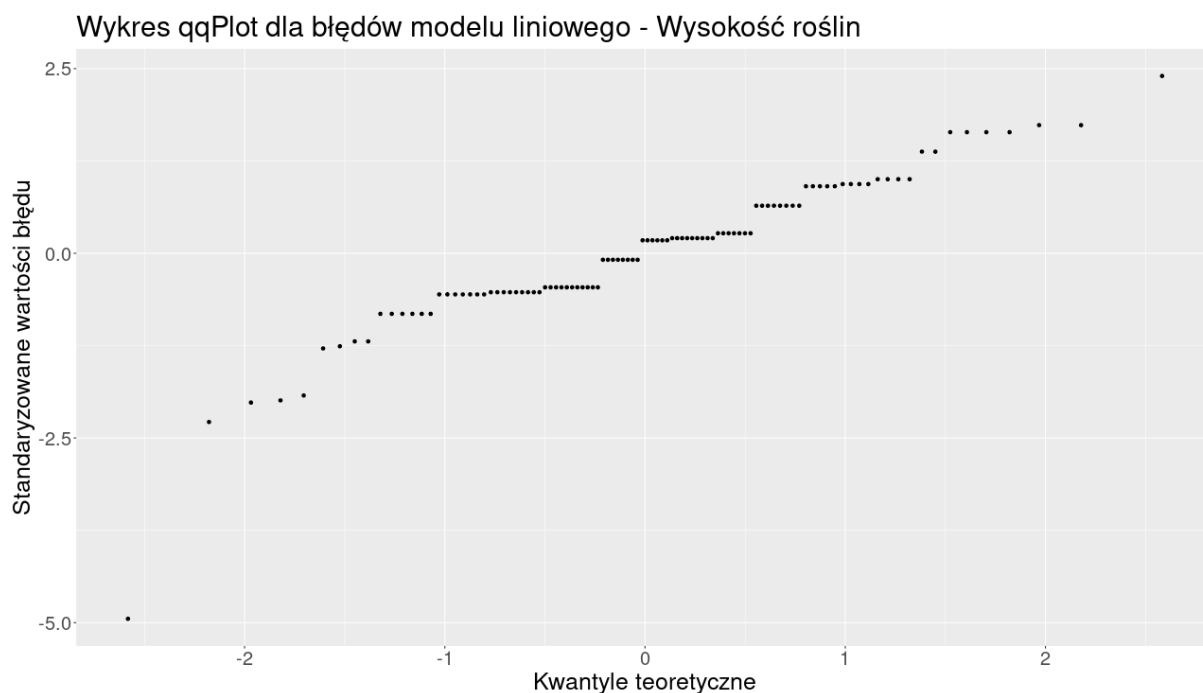
Na rycinie pierwszej przedstawiono wyniki pomiarów wysokości roślin dla linii wybranych z poszczególnych kombinacji krzyżówkowych w postaci wykresu blokowego. Wykazano, że analizowane rośliny z czterech kombinacji krzyżowań były zróżnicowane pod względem wysokości rośliny. Najwyższą średnią wysokością charakteryzowały się rośliny z kombinacji czwartej – (Triso x Santa) x (Henika x Parabola), gdzie rośliny osiągały wysokość od 90 cm do 120 cm (średnio 103,6 cm), a najniższą z kombinacji drugiej - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), gdzie rośliny miały od 80 cm do 100 cm wysokości (średnio 93,1 cm). Pozostałe dwie kombinacje osiągały następująco 1 kombinacja (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), – od 65 cm do 110 cm (średnio 98,8 cm), 3 kombinacja (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) - od 80 cm do 105 cm (średnio 95,6 cm).

Tabela 6. Wyniki analizy wariancji ANOVA, istotność różnic wysokości roślin ze względu na kombinację krzyżowania

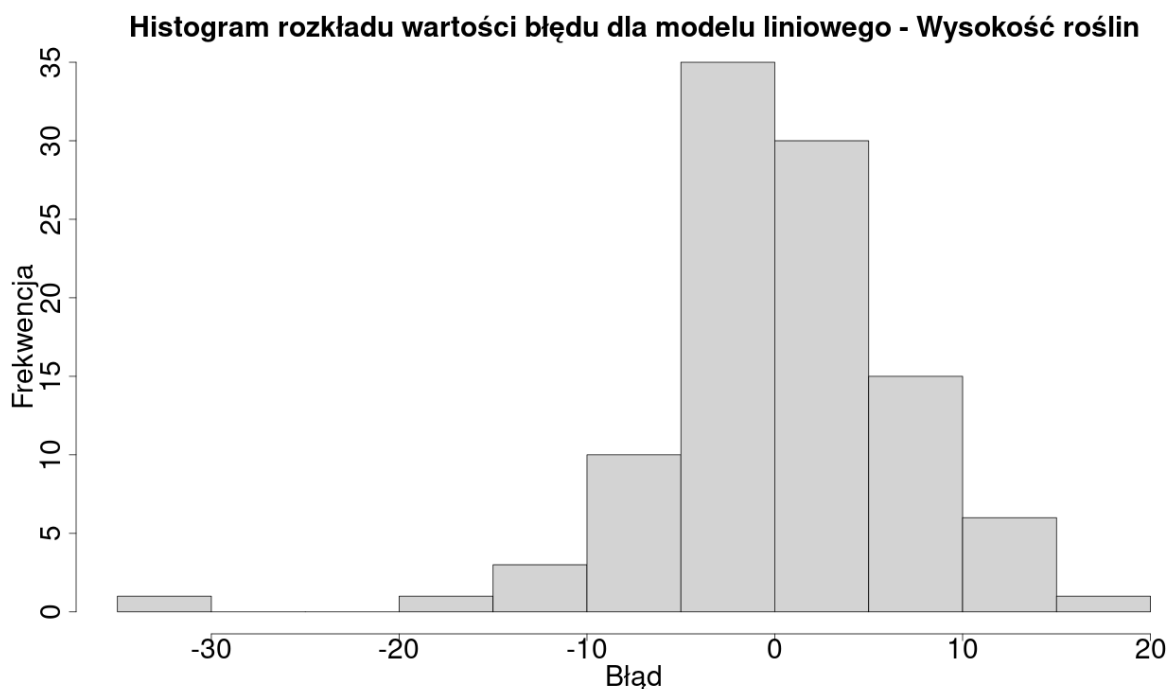
Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat	F _{emp.}	Poziom istotności
Genotyp	3	1570,2	523,39	10,882	115e-06 ***
Błąd	98	4713,4	48,10		

W tabeli 6 przedstawiono wyniki z analizy wariancji dla wysokości roślin, w której weryfikowano hipotezę o równości wysokości roślin dla wszystkich uzyskanych kombinacji krzyżówkowych. Na podstawie uzyskanych wyników analizy ANOVA wykazano, iż kombinacja krzyżowania ma istotny wpływ na wysokość roślin.

Sprawdzenie założeń



Rycina 2. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego – wysokość roślin.



Rycina 3. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu liniowego dla wysokości roślin.

Tabela 7. Wyniki analizy Leven, istotność różnic wysokości roślin ze względu na kombinację krzyżowania

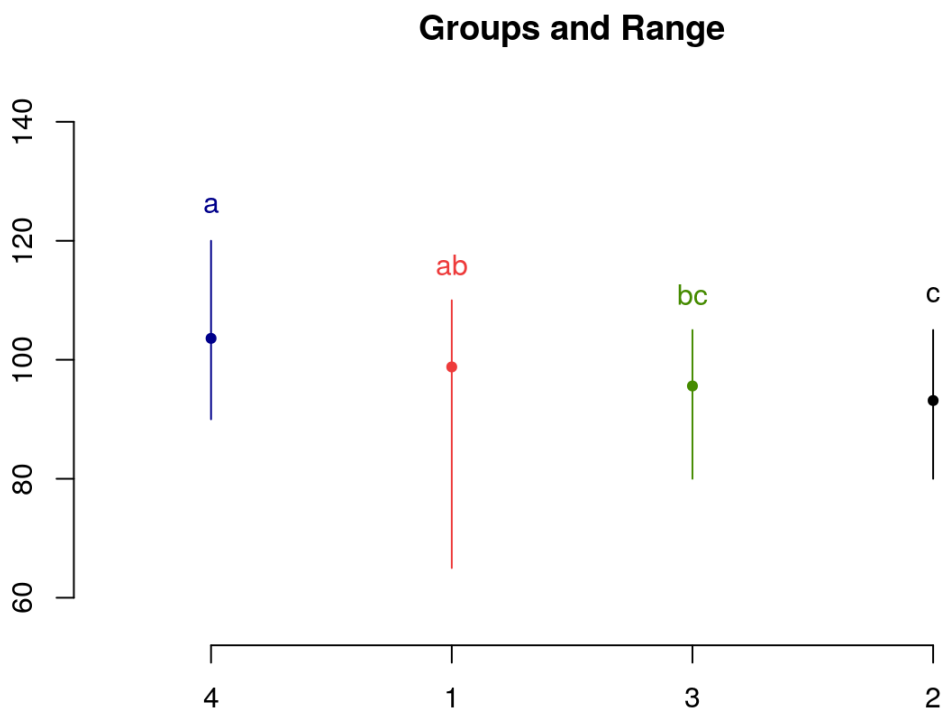
Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Wartość statystyki F	Poziom istotności
Genotyp	3	1,0404	0,3782
Błąd	98		

Na podstawie uzyskanych wyników (histogram, qqPlot, test Levenesa) można stwierdzić, iż założenia testu ANOVA zostały spełnione.

Tabela 8. Porównanie średnich wysokości roślin dla uzyskanych mieszańców (kombinacji krzyżówkowych)

Nazwa mieszańca	Średnia wysokość	Grupa z testu post-hoc
(Triso x Santa) x (Henika x Parabola)	103,6	a
(Henika x Parabola) x (Santa x Hena)	98,8	ab
(Parabola x Triso)	95,6	bc

x (Santa x Hena)		
(Santa x Hena) x (Hena x Parabola)	93,1	c



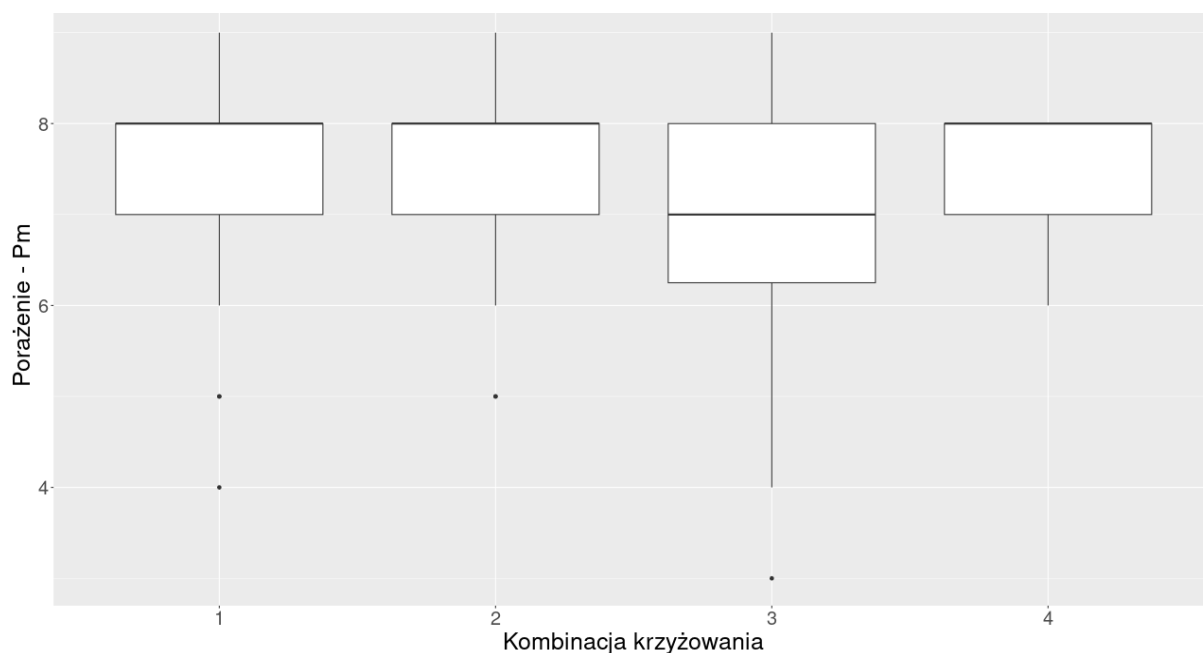
Ryc. 4. Wykres dla porównania średnich wysokości roślin dla uzyskanych mieszańców (kombinacji krzyżówkowych)

Porównując średnie wysokości roślin u analizowanych mieszańców (tab.8, ryc. 4) można stwierdzić, iż występują statystyczne różnice między kombinacjami pierwszą - (Henika x Parabola) x (Santa x Hena) i czwartą - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola), a drugą - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola).

4.1.2. Mączniak prawdziwy (Pm)

Porażenie roślin przez mączniaka prawdziwego oceniano w skali 9-cio stopniowej, gdzie 1 oznacza całkowite porażenie roślin przez patogena, natomiast 9 brak objawów porażenia. Porażenie roślin przez tego patogena wahało się od 3 do 9. W kombinacjach krzyżówkowych 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 (Santa x Hena) x (Hena x

Parabola) i 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola) większość roślin została oceniona na 7 i 8 chociaż występowały pojedyncze rośliny charakteryzujące się brakiem objawów porażenia, które zostały ocenione na 9. W przypadku roślin z kombinacji 3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) większość ocen wahała się od 6 do 8, choć zdarzały się rośliny bardziej porażone ocenione na 4 oraz rośliny w pełni odporne na mączniaka ocenione na 9 (ryc.5).



Rycina 5. Analiza porażenia roślin przez mączniaka prawdziwego w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

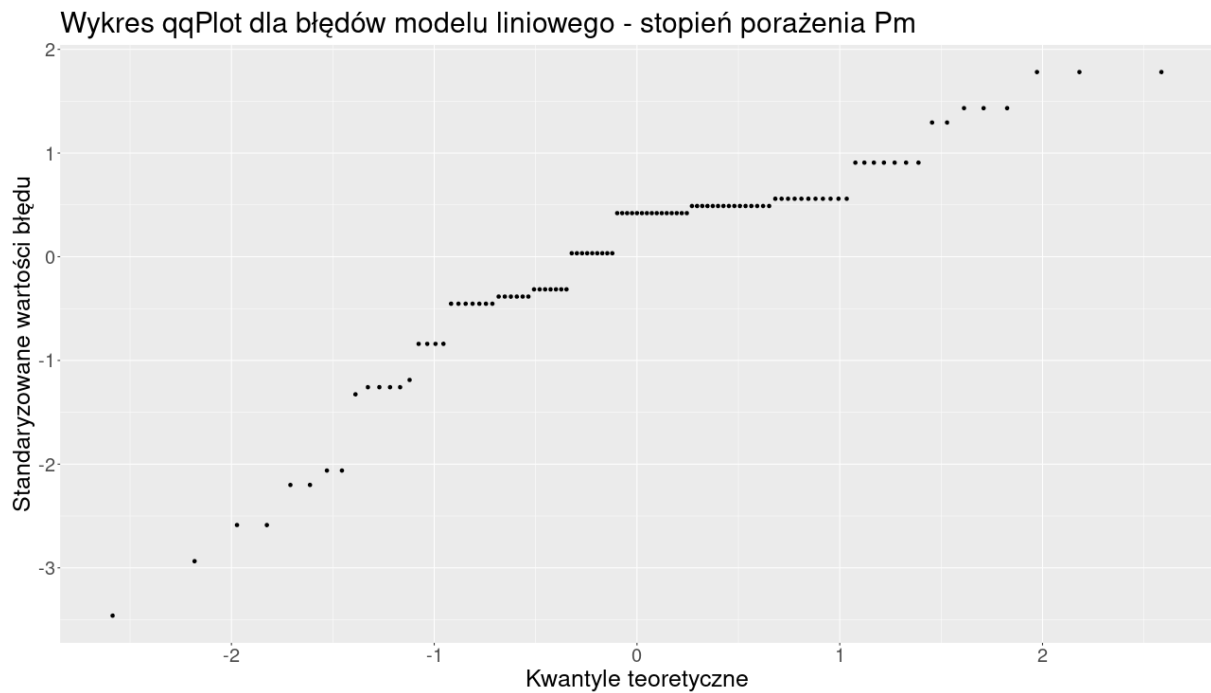
W przypadku analizy średnich wartości stopnia porażenia przez mączniaka prawdziwego roślin pochodzących z czterech kombinacji krzyżowań nie stwierdzono ich istotnego zróżnicowania. .

Tabela 9. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem mączniakiem prawdziwym ze względu na kombinację krzyżowania

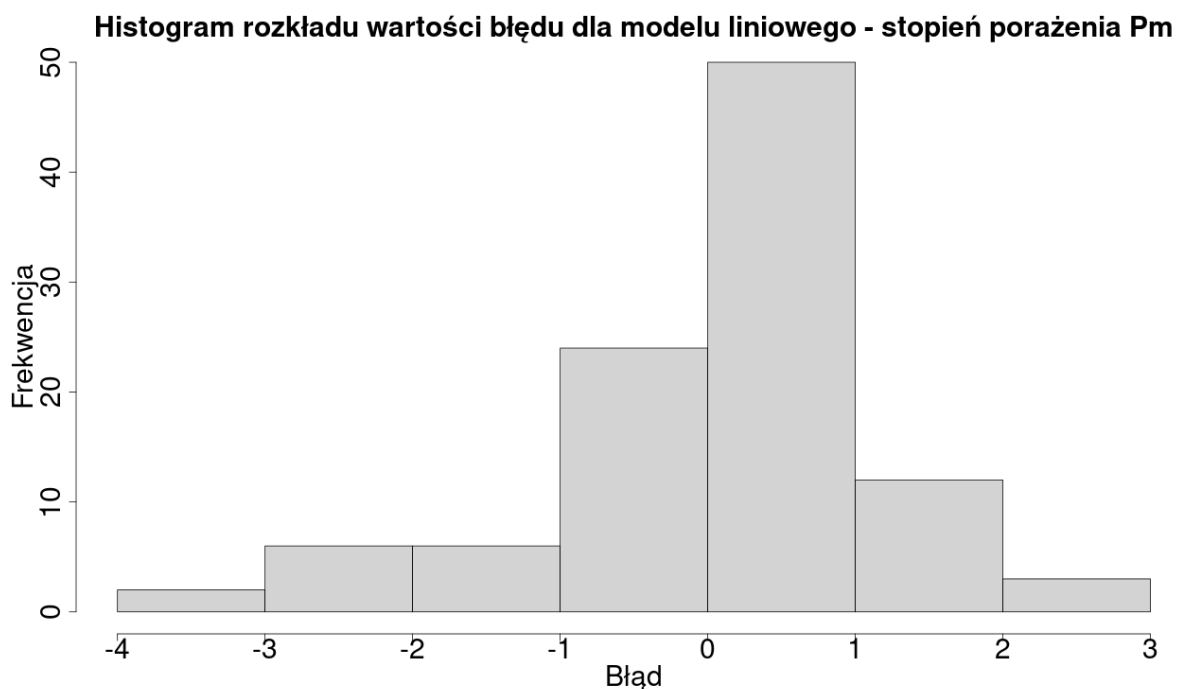
Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat	F	Poziom istotności
Genotyp	3	4,805	1,6016	1,1866	0,3188

Błąd	99	133,622	1,3497		
------	----	---------	--------	--	--

Na podstawie uzyskanych wyników analizy ANOVA można stwierdzić, iż kombinacja krzyżowania nie ma wpływu na wyniki porażenia mączniakiem prawdziwym (Pm).



Rycina 6. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez mącznika prawdziwego.



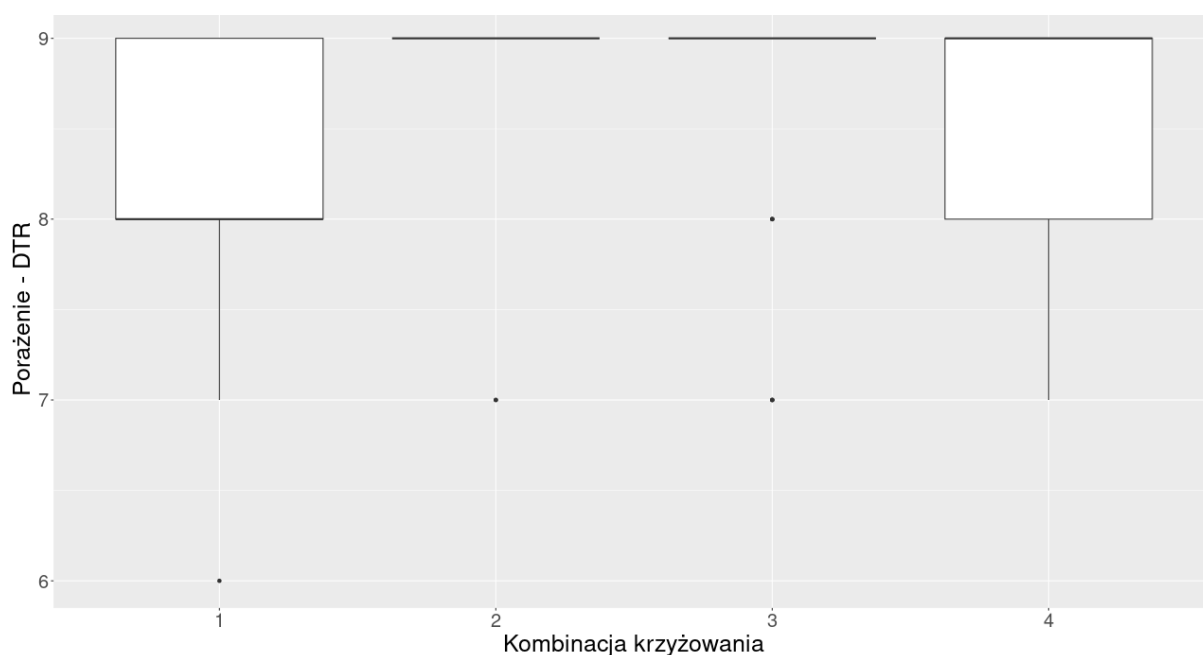
Rycina. 7. Histogram rozkładu wartości błędu dla modelu liniowego dla porażenia przez mączniaka prawdziwego.

Tabela 10. Wyniki analizy Leven, istotność różnic porażeniem mączniakiem prawdziwym ze względu na kombinację krzyżowania.

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	1,3644	0,2581
Błąd	99		

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych w postaci histogramu (ryc. 7), qqPlot (ryc. 6), testu Levenesa (tab. 10) można stwierdzić, iż założenia analizy ANOVA zostały spełnione.

4.1.3. Brunatna plamistość liści zbóż (DTR)



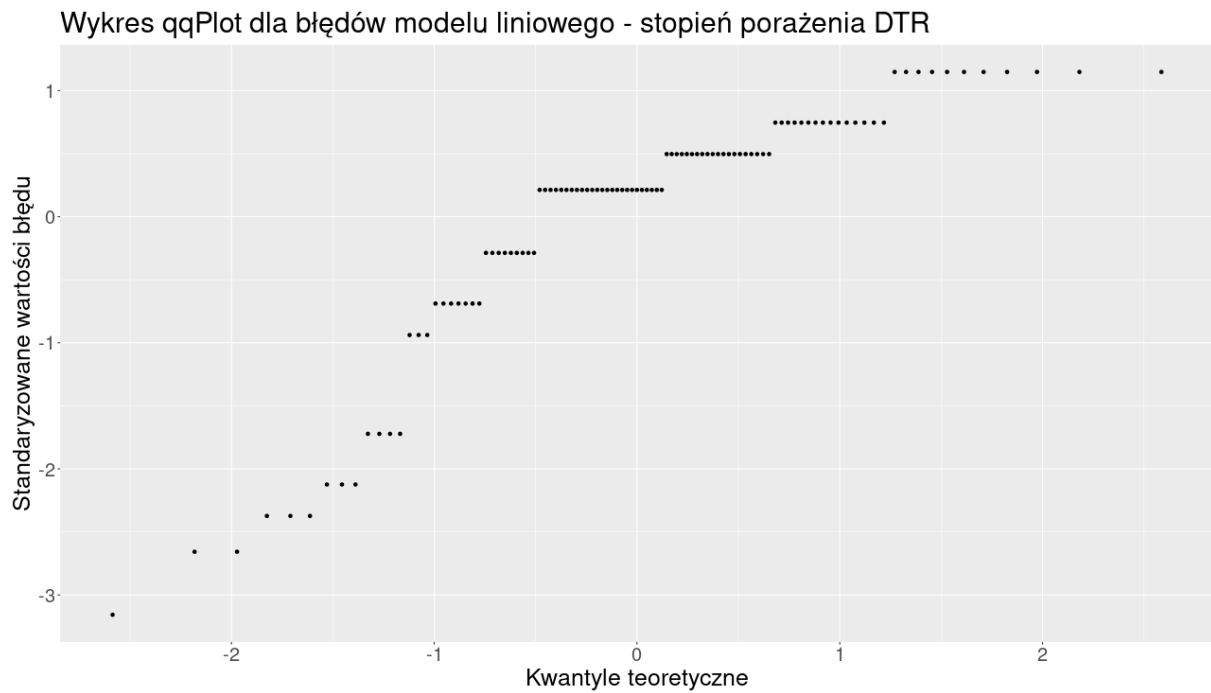
Ryc. 8. Analiza porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 - (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

Porażenie roślin przez brunatną plamistość liści zbóż oceniano w skali 9-cio stopniowej, gdzie 1 oznacza całkowite porażenie roślin przez patogena, natomiast 9 brak objawów porażenia. Porażenie roślin przez tego patogena wahało się od 7 do 9. W kombinacjach krzyżówkowych 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), i 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola) większość roślin została oceniona na 8 i 9. W przypadku roślin z kombinacji 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) i 3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) większość roślin została oceniona na 9.

Tabela 11. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż ze względu na kombinację krzyżowania.

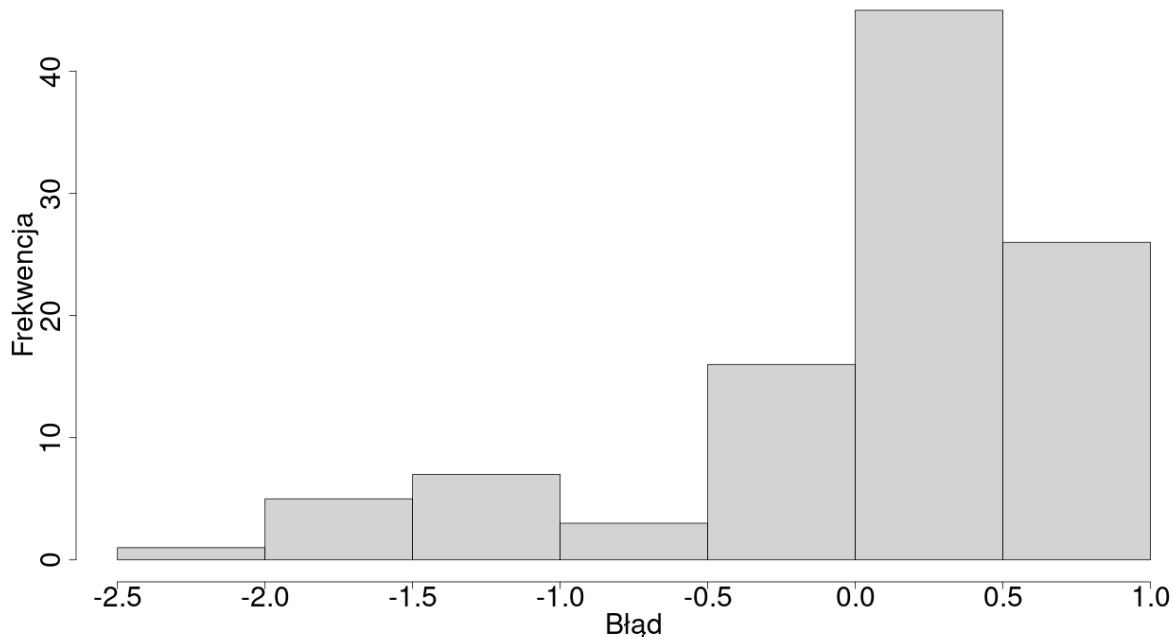
Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat	Statystyka F	Poziom istotności

Genotyp	3	5,924	1,97476	3,947	0,1049*
Błąd	99	49,532	0,50032		



Rycina 9. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż.

Histogram rozkładu wartości błędu dla modelu liniowego - stopień porażenia DTR



Rycina 10. Histogram rozkładu wartości błędu dla modelu liniowego dla porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż.

Tabela 12. Wyniki analizy Leven, istotność różnic porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	3,4518	0,01945*
Błąd	99		

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych na histogramie (ryc. 10), wykresie qqPlot (ryc.9) i wyników testu Levenesa (tab. 12) można stwierdzić, iż założenia testu ANOVA nie zostały spełnione. W związku z tym do analizy wariancji i porównania średnich wykorzystane zostały testy nieparametryczne. Wykonano analizę wariancji wykorzystując test Kruskala-Wallisa, a wynik przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Wyniki analizy Kruskala-Wallisa, istotność różnic porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż ze względu na kombinację krzyżowania

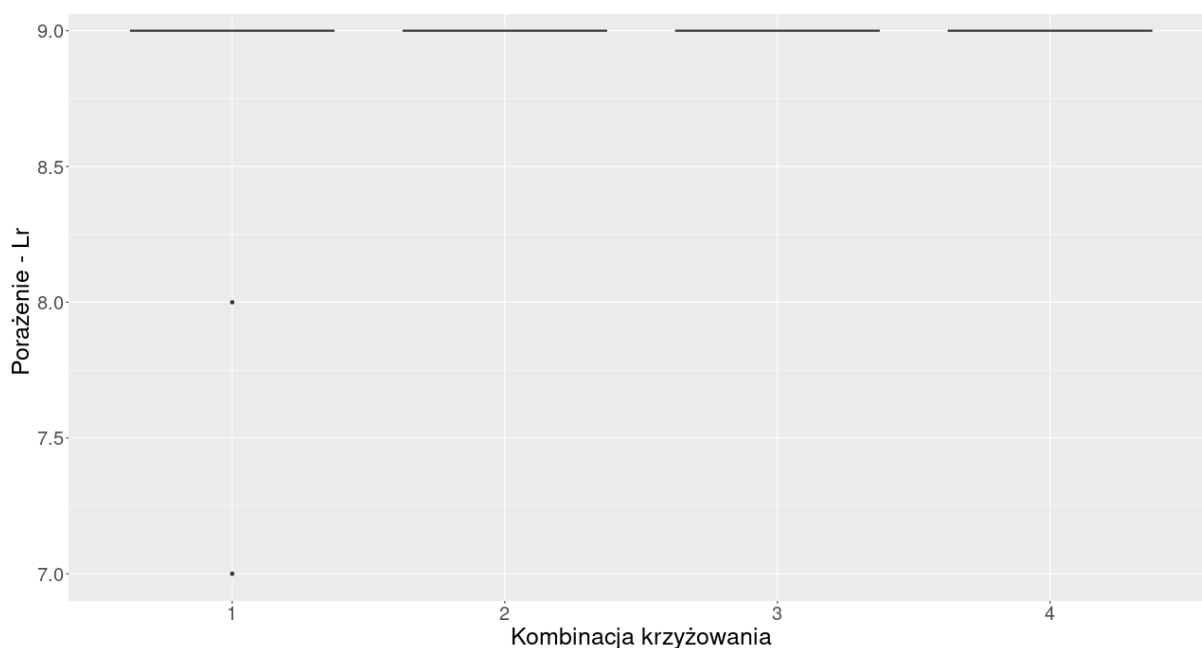
Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka χ^2	Poziom istotności
Genotyp	3	13,954	0,002968

Tabela 14. Wyniki analizy – test Wilcoxona i porównanie średnich - test Wilcoxona

	1	2	3
2	0.0028	-	-
3	0.0550	0.2112	-
4	0.2635	0.0323	0.2635

Na podstawie przedstawionych w tabeli 13 wyników można stwierdzić, iż kombinacja krzyżowania miała wpływ na stopień porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż (DTR). Istotne statystycznie różnice występowały pomiędzy kombinacją drugą - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), a kombinacją czwartą - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola), co obrazuje tabela 14.

4.1.4. Rdza brunatna (Lr)



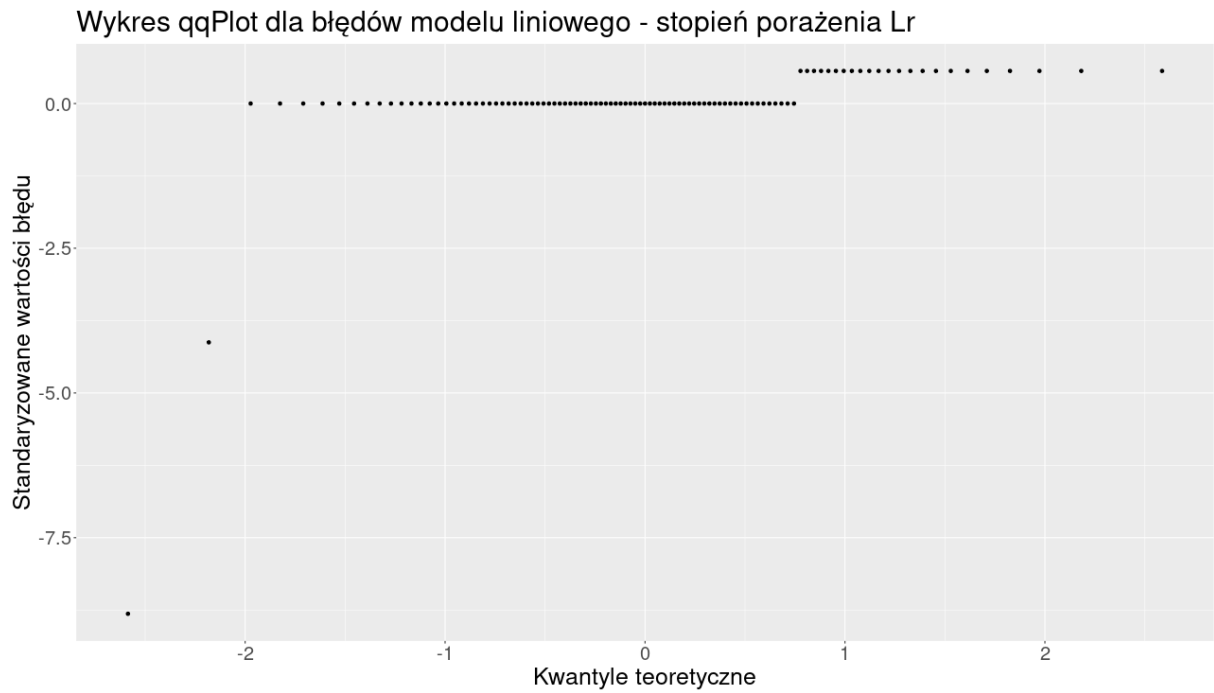
Ryc. 11. Analiza porażenia przez rdzę brunatną w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

Porażenie roślin przez rdzę brunatną oceniano w skali 9-cio stopniowej, gdzie 1 oznacza całkowite porażenie roślin przez patogena, natomiast 9 brak objawów porażenia. Porażenie roślin przez tego patogena wahało się od 7 do 9. W kombinacjach krzyżówkowych 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) i 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola) większość roślin została oceniona na 9, chociaż występowały pojedyncze rośliny o porażeniu w skali 7. Analizowane rośliny z czterech kombinacji krzyżowań nie były zróżnicowane pod względem stopnia porażenia przez rdzę brunatną (ryc. 11).

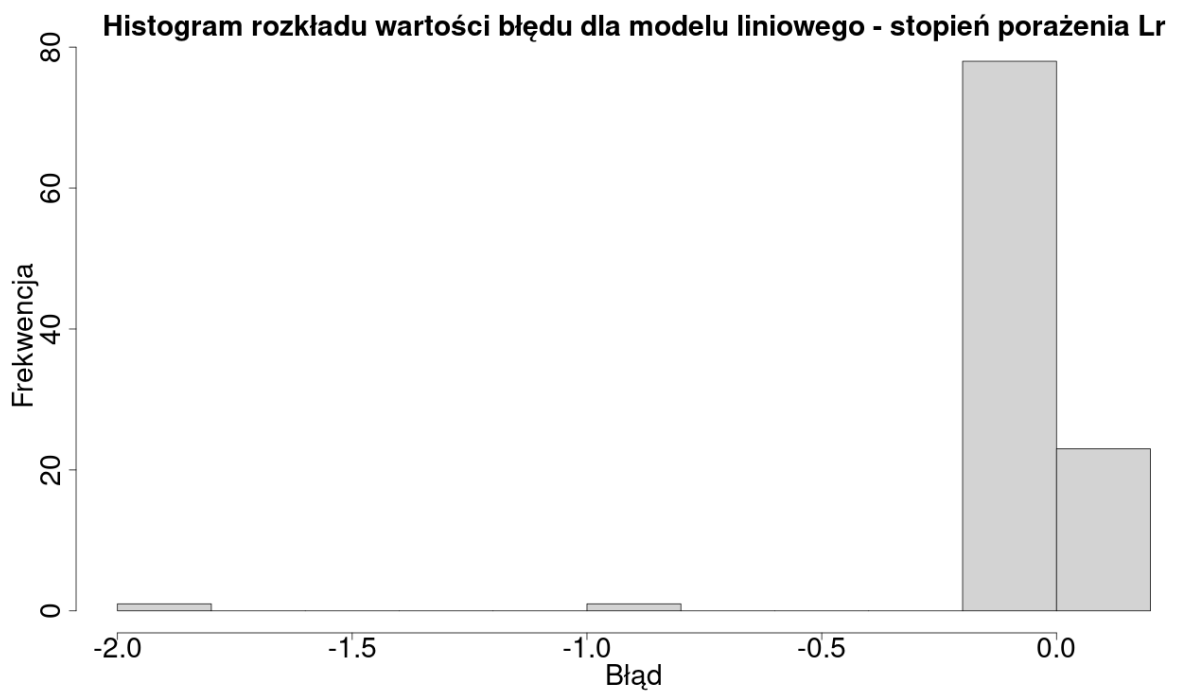
Tabela 15. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem na rdzę brunatną ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	0,2726	0,90874	1,9389	0,1282
Błąd	98	4,6400	0,046869		

Na podstawie uzyskanych wyników analizy ANOVA (tab.15) można stwierdzić, iż kombinacja krzyżowania nie ma wpływ na wyniki porażenia (Lr).



Rycina 12. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez rdzę brunatną.



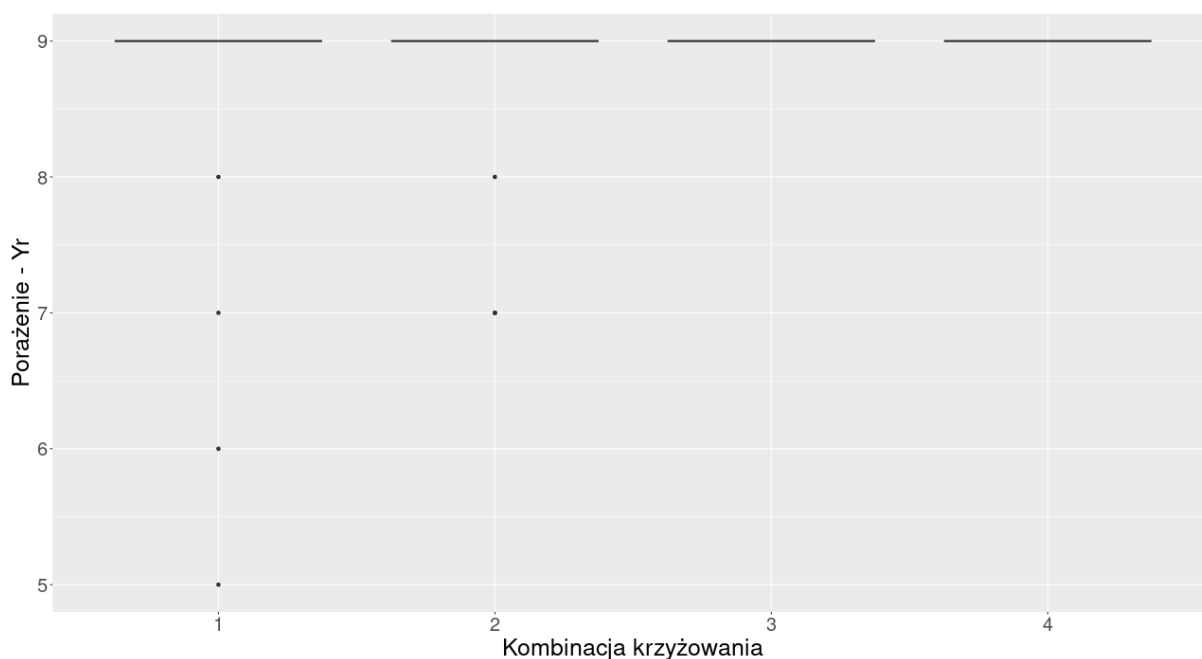
Rycina 13. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu liniowego dla porażenia przez rdzę brunatną.

Tabela 16. Wyniki analizy Leven, istotność różnic porażeniem na rdzę brunatną ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	1,9389	0,1282
Błąd	98		

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych na histogramie (ryc. 13), wykresie qqPlot (ryc.12) oraz wyników testu Levenesa (tab.16) można stwierdzić, iż założenia testu ANOVA zostały spełnione.

4.1.5. Rdza żółta (Yr)



Ryc. 14. Analiza porażenia przez rdzę żółtą w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

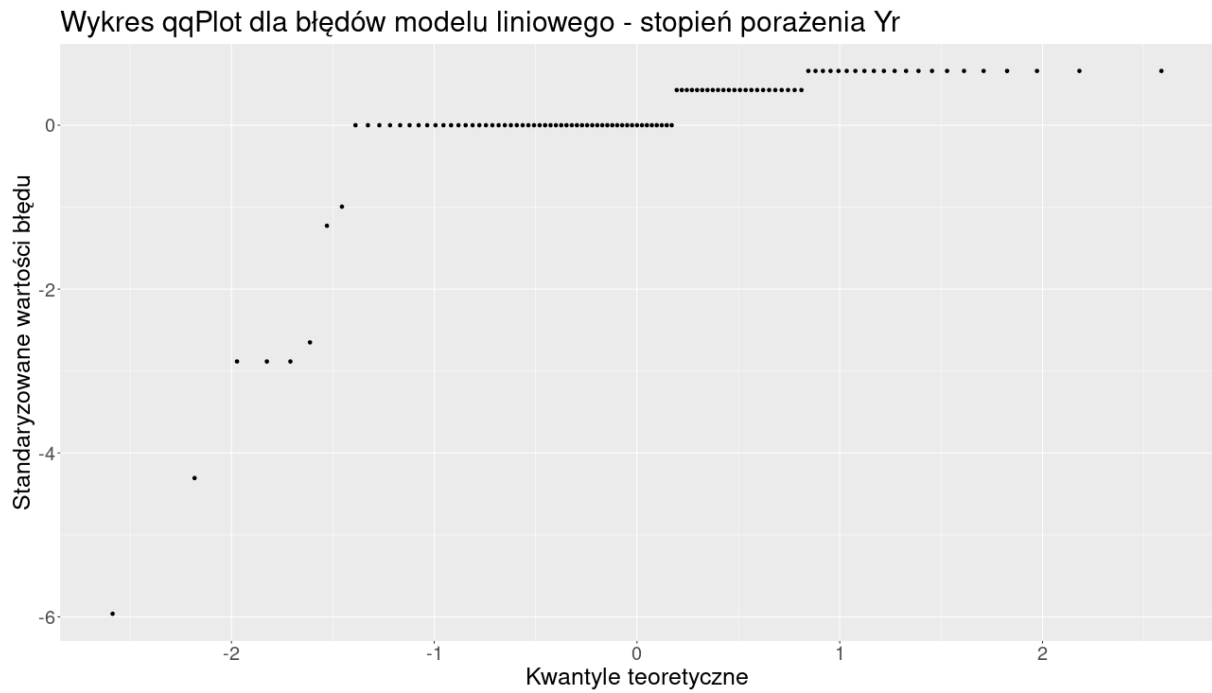
Porażenie roślin przez rdzę żółtą oceniano w skali 9-cio stopniowej, gdzie 1 oznacza całkowite porażenie roślin przez patogena, natomiast 9 brak objawów porażenia. Porażenie roślin przez tego patogena wahało się od 5 do 9. W kombinacjach krzyżówkowych 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) i 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola) większość roślin została oceniona na 9, chociaż w kombinacji numer 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena) występowały pojedyncze rośliny charakteryzujące się porażeniem, które zostało ocenione na 5. W przypadku roślin z kombinacji 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) zdarzały się rośliny bardziej porażone i ocenione na 7.

Analizowane rośliny z czterech kombinacji krzyżowań nie były zróżnicowane pod względem stopnia porażenia przez rdzę żółtą (ryc.14).

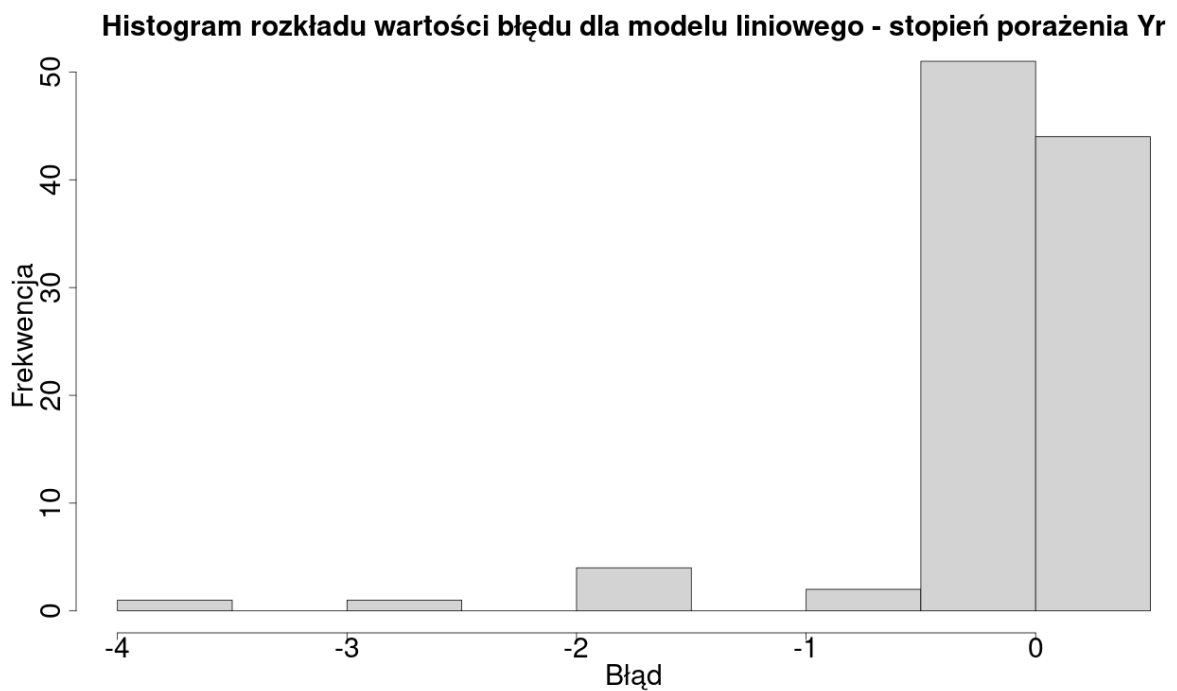
Tabela 17. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem na rdzę żółtą ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	3,009	01,00300	2,6703	0,01566
Błąd	98	37,185	0,37561		

Na podstawie uzyskanych wyników analizy ANOVA można stwierdzić, iż kombinacja krzyżowania nie ma wpływu na wyniki porażenia (Yr).



Rycina 15. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez rdzę żółtą.



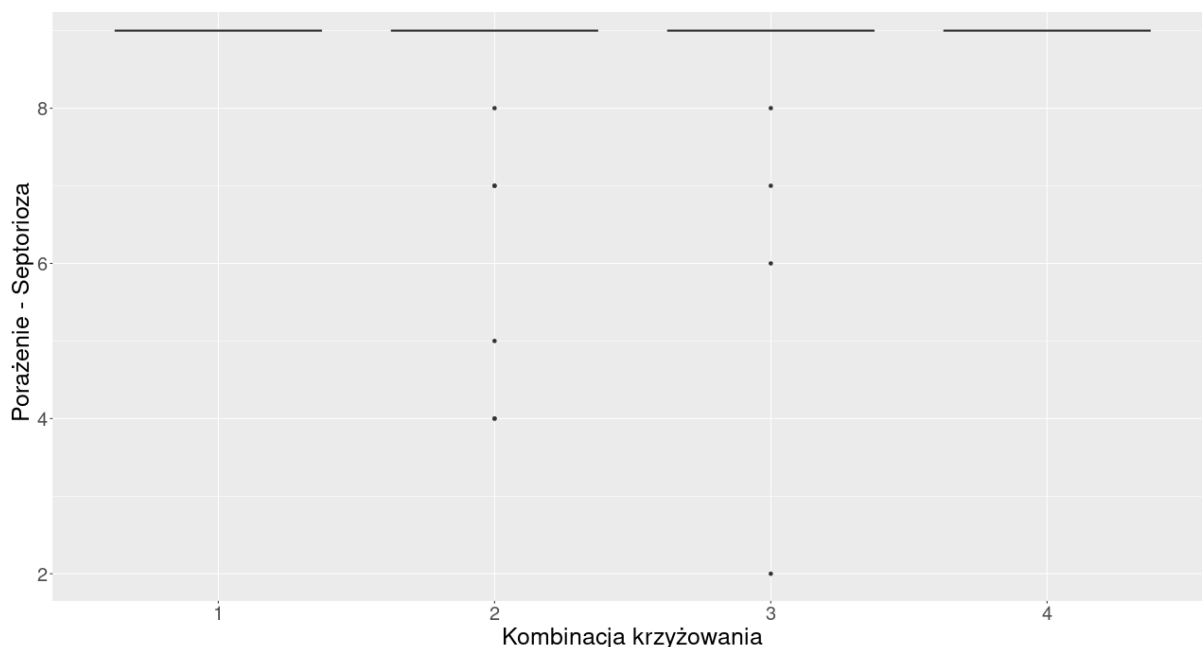
Rycina 16. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu liniowego dla porażenia przez rdzę żółtą.

Tabela 18. Wyniki analizy Levene , istotność różnic porażeniem na rdzę żółtą ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	2,6703	0,05166
Błąd	98		

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych na histogramie (ryc.16), wykresie qqPlot (ryc15) oraz testu Levenesa (tab.18) można stwierdzić, iż założenia testu ANOVA zostały spełnione.

4.1.6. Septorioza liści (Stb)



Rycina 17. Analiza porażenia przez septoriozę liści w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

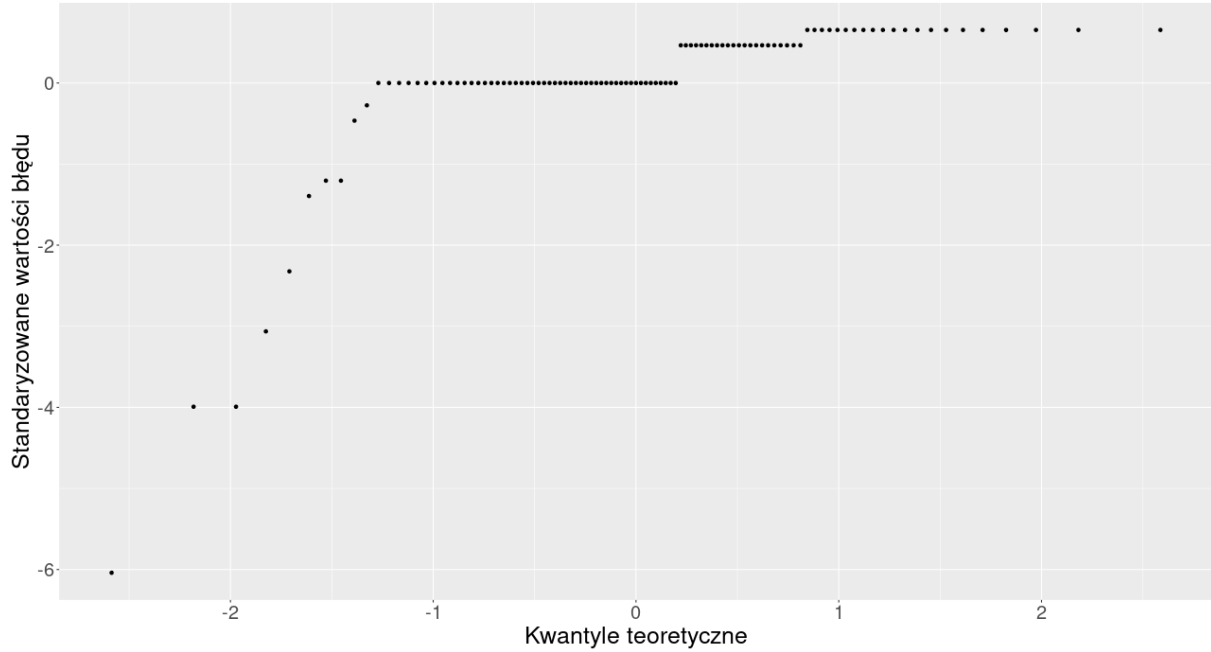
Porażenie roślin przez septoziozę liści oceniano w skali 9-cio stopniowej, gdzie 1 oznacza całkowite porażenie roślin przez patogena, natomiast 9 brak objawów porażenia. Porażenie roślin przez tego patogena wahało się od 2 do 9. W kombinacjach krzyżówkowych 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) i 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola) większość roślin została oceniona na 9, chociaż w kombinacji numer 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), występowały pojedyncze rośliny charakteryzujące się porażeniem, które zostało ocenione na 4. W przypadku roślin z kombinacji 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) zdarzały się rośliny bardziej porażone i ocenione na 2.

Analizowane rośliny z czterech kombinacji krzyżowań były zróżnicowane pod względem stopnia porażenia przez septoriozę liści (ryc.17).

Tabela 19. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem na septoriozą liści ze względu na kombinację krzyżowania

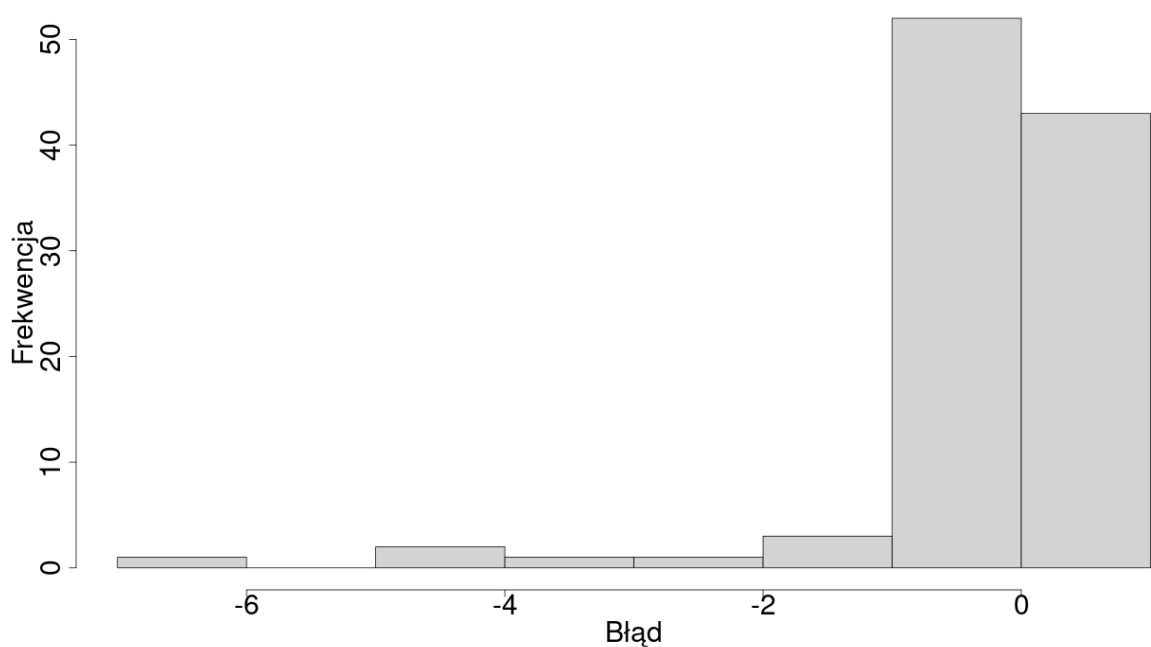
Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	9,929	3,3095	2,7736	0,04541*
Błąd	98	118,130	1,1932		

Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego - stopień porażenia Septorioza



Rycina 18. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez septoriozę liści.

Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu liniowego - stopień porażenia Septorioza



Rycina 19. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu liniowego dla porażenia przez septoriozę liści.

Tabela 20. Wyniki analizy Levene, istotność różnic porażeniem septoriozą liści ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka F	Poziom istotności
Genotyp	3	2,7736	0,04541*
Błąd	98		

Na podstawie uzyskanych wyników przedstawionych na histogramie (ryc. 19), wykresie qqPlot (ryc.18) oraz tetu Levenesa (tab. 20) można stwierdzić, iż założenia testu ANOVA nie zostały spełnione. W związku z tym do analizy wariancji i porównania średnich wykorzystane zostały testy nieparametryczne. Analizę wariancji wykonano stosując test Kruskala-Wallisa (tab. 21), natomiast do porównanie średnich wartości porażenia poszczególnych kombinacji krzyżówkowych przez septoriozę liść wykorzystano test Wilcoxona (tab. 22).

Tabela 21. Wyniki analizy Kruskala-Wallisa, istotność różnic porażeniem na septoriozę liści ze względu na kombinację krzyżowania

Źródło zmienności	Liczba stopni swobody	Statystyka χ^2	Poziom istotności
Genotyp	3	11,025	0,01159

Tabela 22 . Wyniki analizy – test Wilcoxona i porównanie średnich

	1	2	3
2	0.0035	-	-
3	0.057	0.532	-
4	-	0.035	0.057

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż kombinacja krzyżowania miała wpływ na stopień porażenia roślin przez septoriozę liści (DTR). Wyniki testu Wiloxona (tab. 18) wskazują, że istotne statystycznie różnice występowały pomiędzy kombinacją drugą - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), a kombinacją czwartą - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).

4.2. Korelacja markerów PCR z cechami odporności na choroby powodowane przez patogeny grzybowe

Dla uzyskanych wyników genotypowania wybranych linii pszenicy jarej obliczono współczynniki korelacji pomiędzy wynikami genotypowania (obecność lub brak produktu amplifikacji- 1/0), a wartością cechy, czyli stopniem porażenia roślin przez choroby. Do genotypowania wybrano markery molekularne na podstawie danych literaturowych, które są sprzężone z genami odpornością na choroby powodowane przez grzyby. Współczynniki korelacji obliczono wykorzystano algorytm Spearmana, a następnie wykonano test istotności statystycznej dla każdego obliczonego współczynnika korelacji.

Tabela 23. Zestawienie wyników korelacji między badanymi markerami, a odpornością roślin na wybrane choroby grzybowe

Cecha	Marker	Współczynnik korelacji markera z odpornością (marker cecha)	Poziom istotności
Mączniak prawdziwy (Pm)	WMC_35_205	0,06	0,7
	WMC_35_320	0,05	0,76
	XWC.m44_226	0,1	0,51
	XWC_m44_256	0,1	0,51
	STS_638_616	0,04	0,79
	STS_638_289	0,1	0,53

	S23_M41_257_276	0,06	0,7
	STS_YR5_469	0,1	0,53
	STS_YR5_460	0,1	0,53
	YWMC_44_231	0,01	0,95
	YWMC_44_259	0,23	0,13
	S23M_41_278	0,06	0,7
	Pm_3d_240	0,19	0,23
	Pm_3d_291	0,04	0,79
	Pm_3d_350	0,18	0,25
	Pm_3d_407	0,14	0,37
	Pm_3d_480	0,07	0,64
Brunatna plamistość liści zbóż (DTR)	WMC_35_205	0,32	0,04
	WMC_35_320	0,05	0,76
	XWC.m44_226	0,18	0,25
	XWC_m44_256	0,05	0,75
	STS_638_616	0,11	0,49
	STS_638_289	0,06	0,71
	S23_M41_257_276	0,08	0,6
	STS_YR5_469	0,21	0,17
	STS_YR5_460	0,25	0,1
	YWMC_44_231	0,01	0,94

	YWMC_44_259	0,11	0,46
	S23M_41_278	0,12	0,45
	"Pm_3d_240	0,25	0,1
	Pm_3d_291	0,11	0,49
	Pm_3d_350	0,19	0,22
	Pm_3d_407	0,37	0,01
	Pm_3d_480	0,35	0,02
Rdza żółta (Yr)	WMC_35_205	0,17	0,27
	WMC_35_320	0,09	0,56
	XWC.m44_226	0,07	0,64
	XWC_m44_256	0,07	0,64
	STS_638_616	0,02	0,88
	STS_638_289	0,06	0,72
	S23_M41_257_276	0,17	0,27
	STS_YR5_469	0,15	0,33
	STS_YR5_460	0,06	0,72
	YWMC_44_231	0,11	0,47
	YWMC_44_259	0,13	0,4
	S23M_41_278	0,17	0,27
	Pm_3d_240	-0,43	0
	Pm_3d_291	0,02	0,88

	Pm_3d_350	0,1	0,52
	Pm_3d_407	0,08	0,61
	Pm_3d_480	0,17	0,29
Septorioza liści (Stb)	WMC_35_205	0,17	0,27
	WMC_35_320	0,09	0,56
	XWC.m44_226	0,07	0,64
	XWC_m44_256	0,07	0,64
	STS_638_616	0,02	0,88
	STS_638_289	0,06	0,72
	S23_M41_257_276	0,17	0,27
	STS_YR5_469	0,15	0,33
	STS_YR5_460	0,06	0,72
	YWMC_44_231	0,11	0,47
	YWMC_44_259	0,13	0,4
	S23M_41_278	0,17	0,27
	Pm_3d_240	0,43	0,001
	Pm_3d_291	0,02	0,88
	Pm_3d_350	0,1	0,52
	Pm_3d_407	0,08	0,61
	Pm_3d_480	0,14	0,36

Na podstawie uzyskanych wartości współczynników korelacji (tab. 23) udało się wykazać istotną statystycznie korelację jedynie między dwoma zidentyfikowanymi markerami molekularnymi, a brunatną plamistością liści zbóż oraz septoriozą liści. Marker Pm_3d_240 był istotnie skorelowany $r = 0.43$ ($pval < 0.001$) z cechą porażenie przez septoriozę liści, natomiast marker Pm_3d_407 wykazywał istotną korelację $r = 0.37$ ($pval 0.01$) z brunatną plamistością liści zbóż.

Nie było możliwości obliczenia korelacji dla rdzy brunatnej, ponieważ nie było zróżnicowania dla tej cechy w ocenie stopnia porażenia.

Brak istotnej korelacji między większością analizowanych markerów molekularnych, a fenotypem badanych linii może wynikać z tego, iż większość badanych linii wykazywała wysoką odporność na patogeny grzybowe i nie wykazywała symptomów porażenia. Wynikać to może z istnienia odporności krzyżowej, a także obecności innych genów związanych z cechami odporności (poza analizowanymi za pomocą markerów molekularnych) w badanym materiale.

4.3 Zidentyfikowane markery PCR z podziałem na rodziny.

Poniżej zestawiono liczbę linii z otrzymanymi markerami PCR oraz podano kombinację mieszańca z największą liczbą linii posiadającą dany marker (tab. 24). Linie zostały wyselekcjonowane z każdego mieszańca. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować iż markery Pm_3d_240 oraz Pm_3d_407 mogą być z powodzeniem wykorzystywane do oceny odporności roślin pszenicy na patogeny grzybowe powodujące septoriozę liści oraz brunatną plamistość liści zbóż w polskich programach hodowlanych.

Tabela 24. Zestawienie liczby linii pszenicy jarej u których zidentyfikowano badane markery molekularne wyprowadzonych z poszczególnych kombinacji krzyżówkowych (mieszańców).

Marker	Liczba linii	Numer i nazwa kombinacji z największą liczbą linii
WMC_35_205	24	3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)
WMC_35_320	11	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)

XWC.m44_226	8	2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola)
XWC_m44_256	8	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
STS_638_616	1	1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena) 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) 3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)
STS_638_289	5	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
S23_M41_257_276	24	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
STS_YR5_469	21	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
STS_YR5_460	5	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
YWMC_44_231	15	2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola)
YWMC_44_259	18	2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola)
S23M_41_278	24	3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)
Pm_3d_240	5	3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
Pm_3d_291	1	1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena) 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) 3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)
Pm_3d_350	13	4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
Pm_3d_407	9	2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) 3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)
Pm_3d_480	23	1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena) 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)

W tabeli 24 zestawiono liczbę linii pszenicy jarej wyprowadzone z poszczególnych mieszańców, u których wykazano obecność markera molekularnego dla użytych w badaniach starterów. W przypadku markera WMC_35_205 najwięcej linii posiadających ten

marker pochodziło z kombinacji (Parabola x Triso) x (Santa x Hena). Najwięcej linii zawierających marker WMC_35_320 pochodziło z krzyżowania linii w układzie (Triso x Santa) x (Henika x Parabola) . W przypadku markera XWC.m44_226 najwięcej linii posiadających ten marker pochodziło z krzyżowania (Santa x Hena) x (Hena x Parabola). Najwięcej linii posiadających marker XWC_m44_256 pochodziło z krzyżowania czterech odmian w układzie (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). W przypadku markera TS_638_616 najwięcej linii posiadających ten marker pochodziło z krzyżowań (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) oraz (Parabola x Triso) x (Santa x Hena). Najwięcej linii posiadających marker XWC_m44_256 pochodziło z krzyżowania (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). W przypadku markera STS_638_616 najwięcej linii posiadających ten marker pochodziło z krzyżowań (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) i (Parabola x Triso) x (Santa x Hena). W przypadku markera STS_638_289 najwięcej linii posiadających ten marker pochodziło z krzyżówki (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). W przypadku markera Najwięcej linii (24), u których stwierdzono występowanie markera S23_M41_257_276 pochodziło z krzyżówki (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). W przypadku markera STS_YR5_469 najwięcej linii posiadających ten marker pochodziło z krzyżowań (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). W przypadku markera STS_YR5_460 najwięcej linii posiadających ten marker także pochodziło z krzyżowania (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). Najwięcej linii (15) posiadających marker YWMC_44_231 pochodziło z krzyżowania (Santa x Hena) x (Hena x Parabola). Z tej samej kombinacji krzyżowań pochodziło najwięcej linii (18) posiadających marker YWMC_44_259. W przypadku markera S23M_41_278 najwięcej linii (24) posiadających ten marker pochodziło z krzyżowania (Parabola x Triso) x (Santa x Hena). Marker Pm_3d_240 najczęściej posiadały linie pochodzące z krzyżowań (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) i (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). W kombinacjach krzyżowań (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) oraz (Parabola x Triso) x (Santa x Hena) stwierdzono po jednej linii posiadającej marker Pm_3d_291. W przypadku markera Pm_3d_350 najwięcej linii posiadających ten marker pochodziło z krzyżowania (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). Najwięcej linii posiadających marker Pm_3d_407 pochodziło z krzyżowań (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) oraz (Parabola x Triso) x (Santa x Hena). Najwięcej linii posiadających marker Pm_3d_480 pochodziło z krzyżowań (Henika x Parabola) x (Santa x Hena) oraz (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż w każdej kombinacji krzyżowań

wykazano obecność linii z markerami genów związanych z odpornością na choroby powodowane przez patogeny grzybowe.

4.4 Analiza dystansu genetycznego

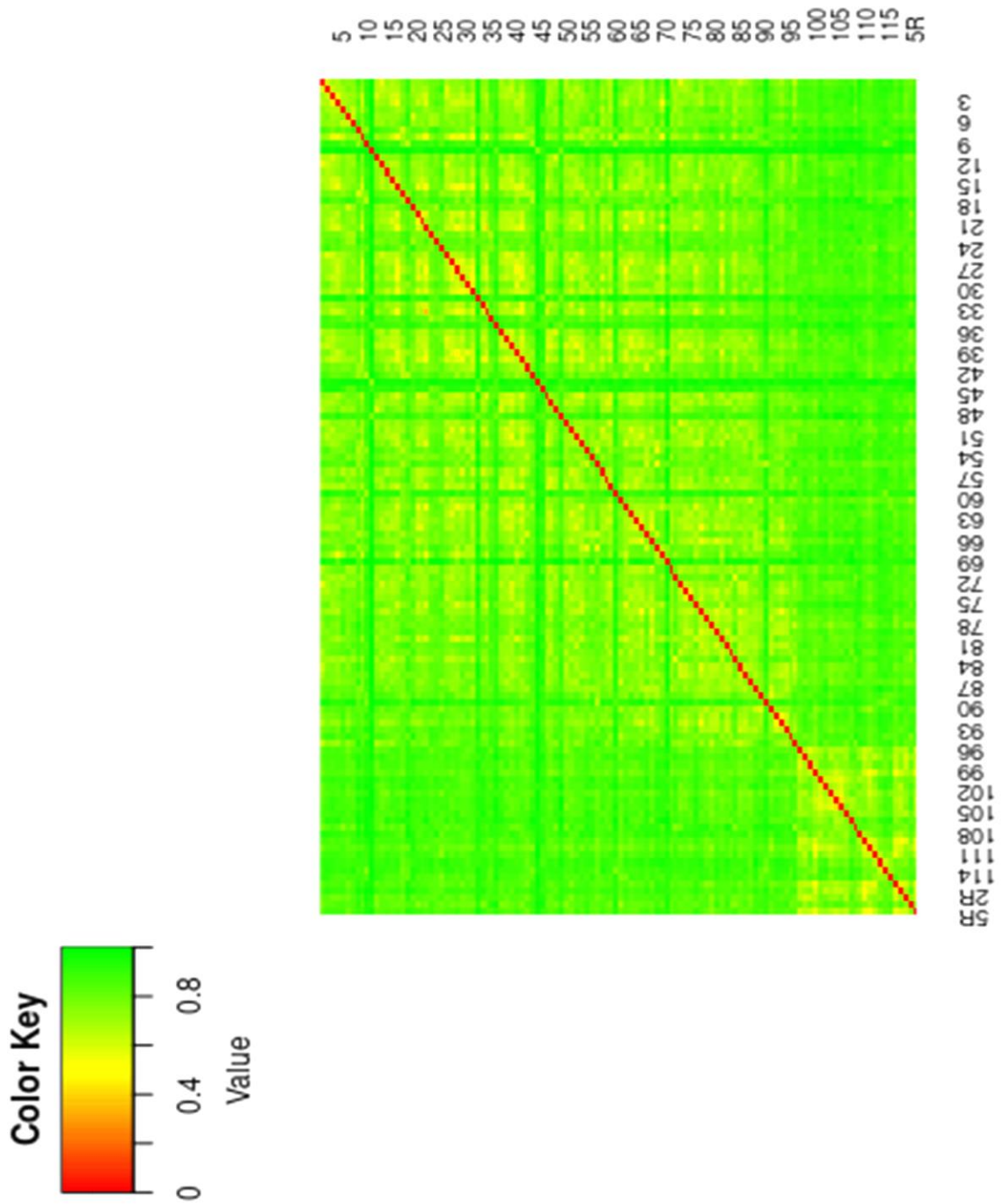
Na podstawie wyników genotypowania wykonano analizę dystansu genetycznego badanych obiektów. Do obliczeń wykorzystany został algorytm Nei (1979). Wyniki obliczeń zestawione zostały w tabeli (załączonej na końcu pracy) oraz zilustrowane graficznie na rycinie numer 20 oraz zestawione w tabeli 25.

Na podstawie analizy macierzy dystansu genetycznego zidentyfikowano 23 linie najbardziej odległe genetycznie od pozostałych analizowanych obiektów. Były to linie:

Tabela 25. Linie najbardziej odległe genetycznie na podstawie dystansu genetycznego wprowadzone z poszczególnych kombinacji krzyżowań.

	Kombinacja 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena)	Kombinacja 2 (Santa x Hena) x (Hena x Parabola)	Kombinacja 3 (Parabola x Triso) x (Santa x Hena)	Kombinacja 4 (Triso x Santa) x (Henika x Parabola)
	10,11,18,25	30,36,43,44,48,49,54,56	68,70,83,85,89	90,103,104,105,107,112

Następnie podjęto próbę wyznaczenia subpopulacji w badanym materiale na podstawie kryterium Baysianskiego - BIC (ang. *Bayesian Information Criterion*). Uzyskane wyniki przedstawia rycina numer 20. Optymalna liczba klastrów wyznaczona została jako wartość K, dla której wykres osiąga minimum (K=5). Liczba ta była zgodna, lecz nie identyczna z liczbą kombinacji krzyżowań wykorzystanych w badaniach.



Rycina 20 Macierz dystansu genetycznego - optymalna liczba klastrów.

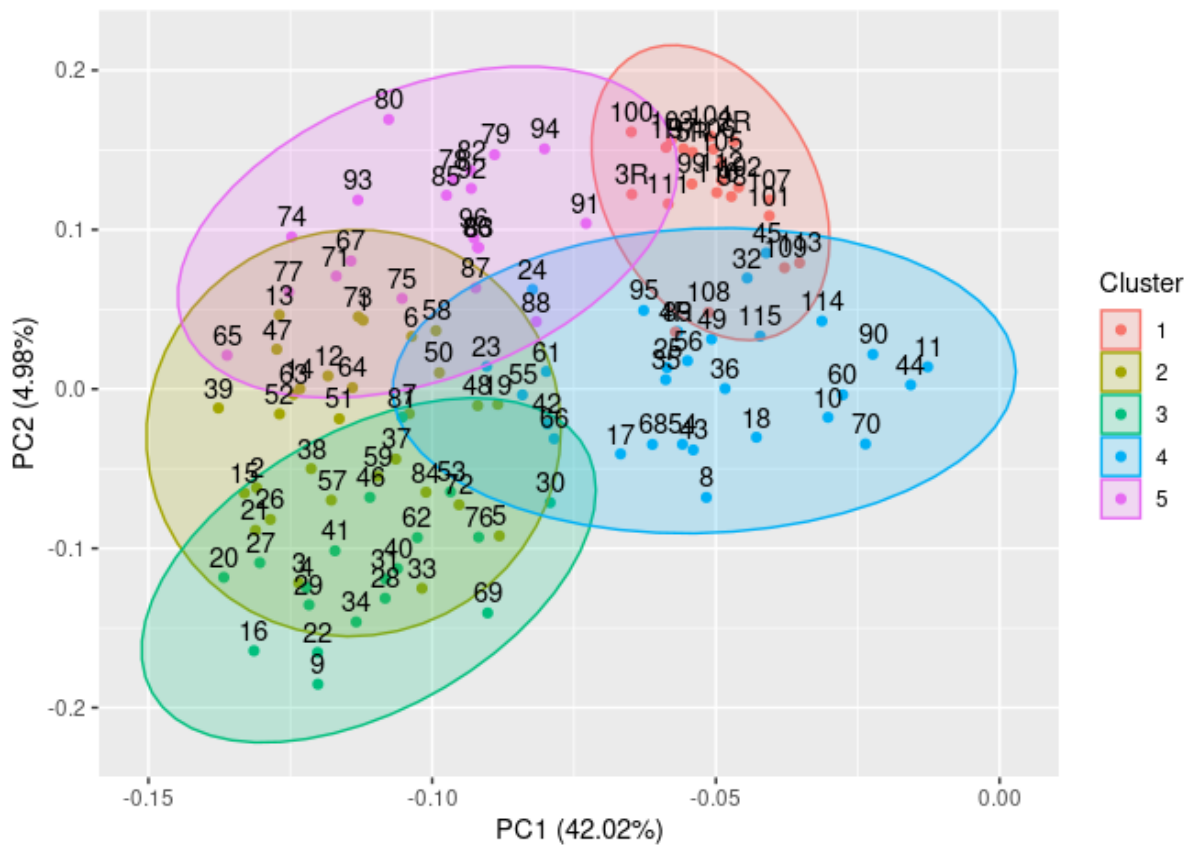
Do podziału obiektów na 5 klastrów wykorzystane zostały 3 metody: Kmeans w oparciu o analizę składowych głównych obliczonych na podstawie danych markerowych (metoda I), Kmeans w oparciu o analizę skalowania wielowymiarowego w oparciu o wartości dystansu genetycznego (metoda II) oraz Kmeans w oparciu o analizę DAPC (Discriminant Analysis of Principal Components) z wykorzystaniem danych markerowych (metoda III). Wyniki zestawiono w tabeli 26 oraz wykonano ich graficzną reprezentację.

Tabela 26. Podział wyprowadzonych linii pszenicy jarej na 5 klastrów metodą Kmeans'a w oparciu o dane markerowe z zastosowaniem różnych metod.

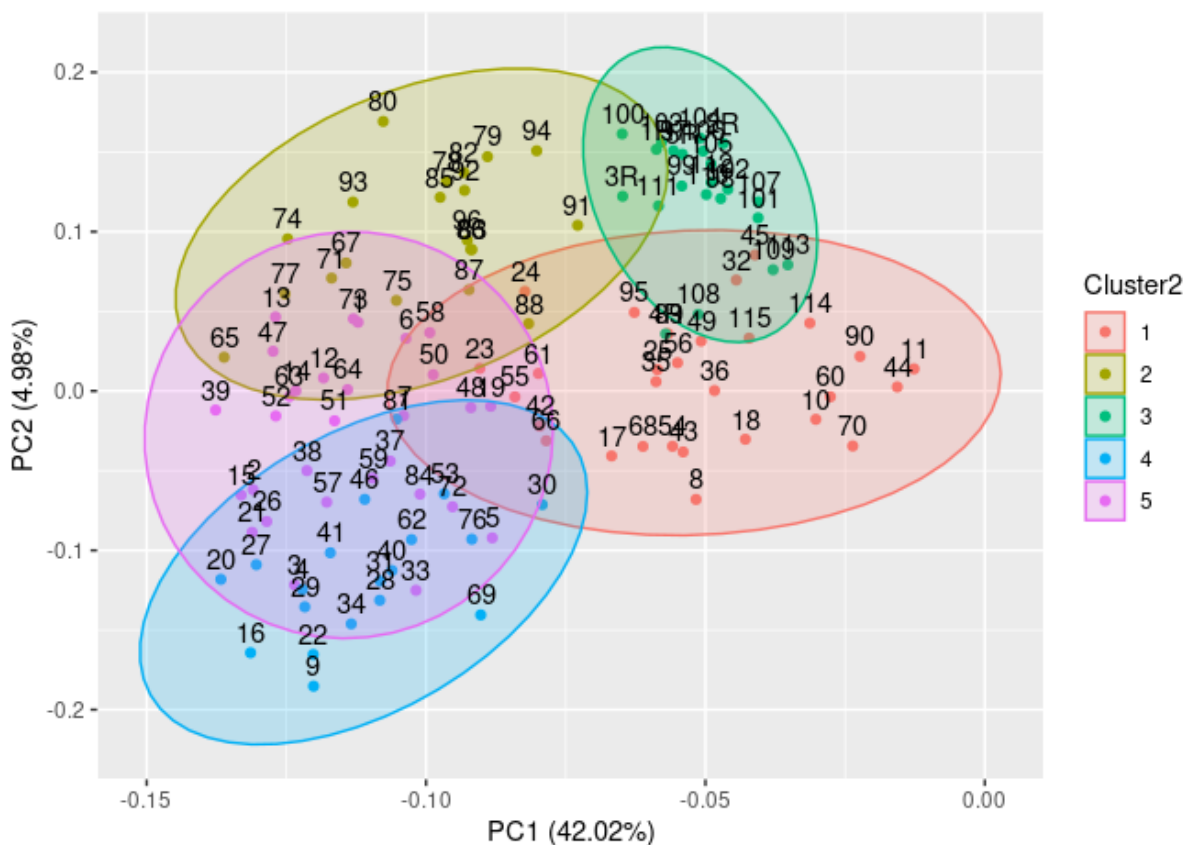
lInie	Metoda I	Metoda II	Metoda III
1	2	5	5
2	2	5	5
3	2	3	5
4	3	3	4
5	2	3	5
6	2	5	5
7	2	5	5
8	4	2	1
9	3	3	4
10	4	2	1
11	4	1	1
12	2	5	5
13	2	5	5
14	2	5	5
15	2	3	5
16	3	3	4
17	4	2	1
18	4	2	1
19	2	5	5
20	3	3	4
21	2	3	5
22	3	3	4
23	4	5	1
24	4	5	1
25	4	1	1
26	2	3	5
27	3	3	4
28	3	3	4
29	3	3	4
30	3	2	4
31	3	3	4
32	4	1	1

33	2	3	5
34	3	3	4
35	4	1	1
36	4	1	1
37	2	5	5
38	2	3	5
39	2	5	5
40	3	3	4
41	3	3	4
42	4	2	1
43	4	2	1
44	4	1	1
45	4	1	1
46	3	3	4
47	2	5	5
48	2	5	5
49	4	1	1
50	2	5	5
51	2	3	5
52	2	5	5
53	3	3	4
54	4	2	1
55	4	3	1
56	4	2	1
57	2	3	5
58	2	5	5
59	2	3	5
60	4	2	1
61	4	1	1
62	3	3	4
63	2	5	5
64	2	5	5
65	5	5	2
66	4	3	1
67	5	5	2
68	4	2	1
69	3	3	4
70	4	2	1
71	5	5	2
72	2	3	5
73	2	5	5
74	5	5	2
75	5	5	2
76	3	3	4
77	5	5	2

78	5	5	2
79	5	5	2
80	5	5	2
81	3	3	4
82	5	5	2
83	5	5	2
84	2	3	5
85	5	5	2
86	5	5	2
87	5	5	2
88	5	5	2
89	4	1	1
90	4	1	1
91	5	5	2
92	5	5	2
93	5	5	2
94	5	5	2
95	4	1	1
96	5	5	2
97	1	4	3
98	1	4	3
99	1	4	3
100	1	4	3
101	1	4	3
102	1	4	3
103	1	4	3
104	1	4	3
105	1	4	3
106	1	4	3
107	1	4	3
108	1	1	3
109	1	4	3
110	1	4	3
111	1	4	3
112	1	4	3
113	1	1	3
114	4	1	1
115	4	1	1
1R	1	4	3
2R	1	4	3
3R	1	4	3
4R	1	1	3
5R	1	4	3



Rycina 21 Linie pszenicy jarej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych na podstawie analizy (PCA) pogrupowane zgodnie z metodą Kmeans'a w oparciu o dane markerowe.



Rycina. 23 Linie pszenicy jarej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych na podstawie analizy (PCA) pogrupowane zgodnie z metodą Kmeans'a w oparciu o o analizę DAPC (Discriminant Analysis of Principal Components) z wykorzystaniem danych markerowych.

Do porównania otrzymanych struktur wykorzystana została wielowymiarowa analiza wariancji MANOVA z wykorzystaniem uzyskanych danych molekularnych.

Tabela. 27 Wyniki wielowymiarowej molekularnej analizy wariancji MANOVA dla metody I

Zmienność	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat
Pomiędzy obiektami	4	636.54	159.14
Wewnątrz obiektowa	115	2224.78	19.35
Całkowita	119	2861.33	24.04

Tabela 28. Komponenty wariancji z analizy MANOVA – Metoda I.

Zmienność	Sigma	%
Wariancja między grupami	5.88	23.31
Wariancja wewnątrz grupowa	19.35	76.69
Całkowita wariancja	25.22	100.00

W tabeli 27 zestawiono wyniki z wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA przeprowadzonej w oparciu o dane markerowe (Metoda I Kmeans'a), które wykazały istotne różnice pomiędzy pięcioma wydzielonymi klastrami. Na podstawie symulacji Monte Carlo $p=0.01$ wykazano, że struktura populacji otrzymana za pomocą metody I jest istotna statystycznie (tab. 28).

Tabela. 29 Wyniki wielowymiarowej molekularnej analizy wariancji MANOVA dla metody II

	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat
Pomiędzy obiektami	4	4 558.8789	139.71973
Wewnątrz obiektowa	115	2302.4461	20.02127
Całkowita	119	2861.3250	24.04475

Tabela 30. Komponenty wariancji z analizy MANOVA – Metoda II.

	Sigma	%
Wariancja między grupami	5.231766	20.72
Wariancja wewnątrz grupowa	20.021270	79.28
Całkowita wariancja	25.253037	100.00

W tabeli 29 zestawiono wyniki z wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA przeprowadzonej w oparciu o analizę skalowania wielowymiarowego w oparciu o wartości dystansu genetycznego (Metoda II Kmeans'a), które wykazały istotne różnice pomiędzy pięcioma wydzielonymi klastrami. Na podstawie symulacji Monte Carlo $p=0.01$ wykazano, że struktura populacji otrzymana za pomocą metody II jest istotna statystycznie (tab. 30).

Tabela. 31 Wyniki wielowymiarowej molekularnej analizy wariancji MANOVA dla metody III.

	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Średni kwadrat
Pomiędzy obiektami	4	636.542	159.13551
Wewnątrz obiektowa	115	2224.783	19.34594
Całkowita	119	2861.325	24.04475

Tabela 32. Komponenty wariancji z analizy MANOVA – Metoda III.

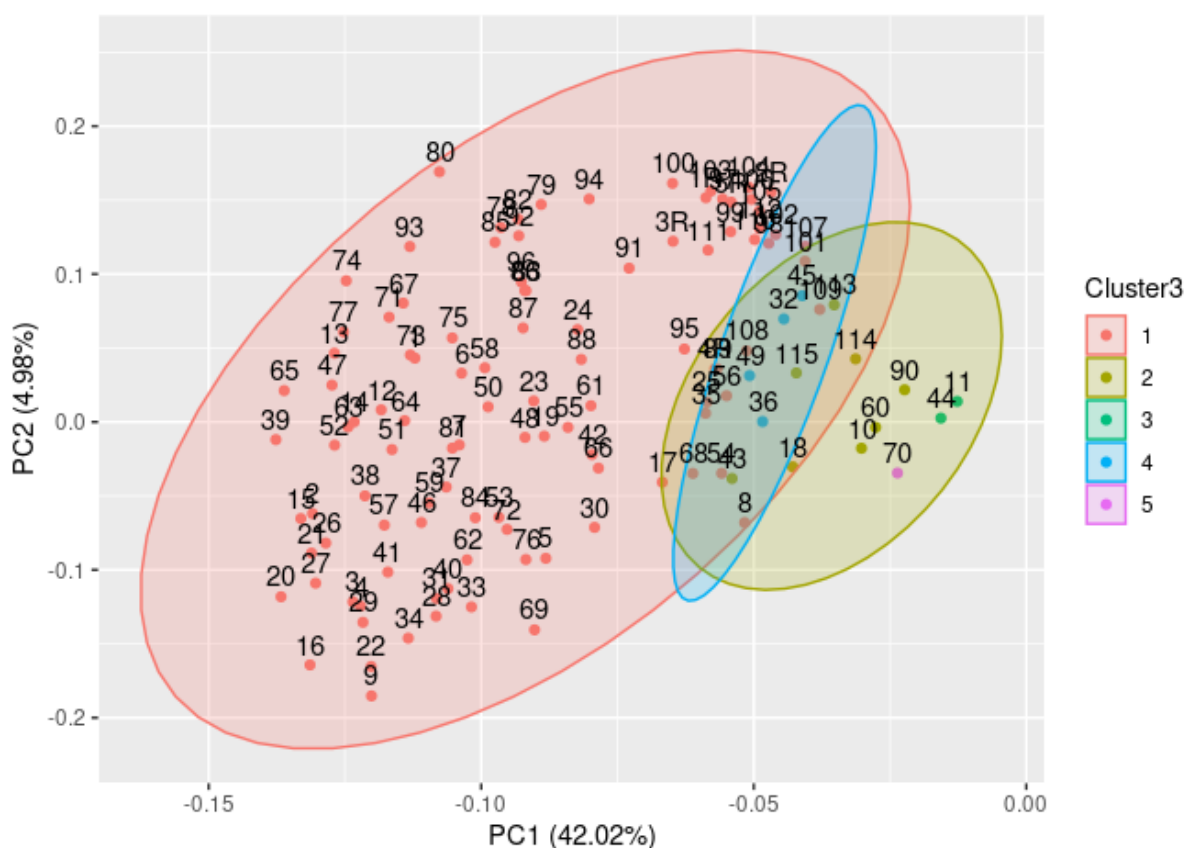
	Sigma	%
Wariancja między grupami	5.878657	23.31
Wariancja wewnątrz grupowa	19.345939	76.69
Całkowita wariancja	25.224596	100.00

Na podstawie symulacji Monte Carlo $p=0.01$ struktura populacji otrzymana za pomocą metody 3 jest istotna statystycznie.

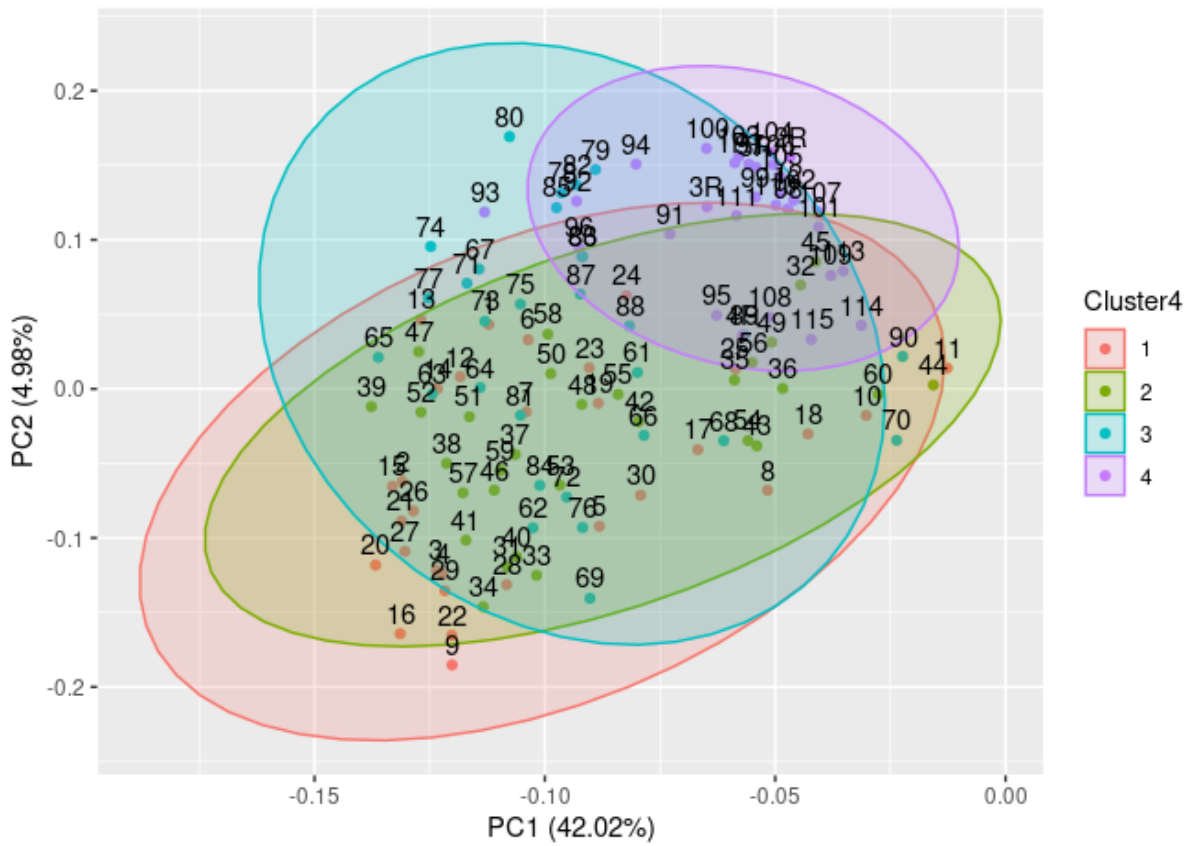
W tabeli 31 zestawiono wyniki z wielowymiarowej analizy wariancji MANOVA przeprowadzonej w oparciu o analizę DAPC z wykorzystaniem danych markerowych

(Metoda III Kmeans'a), które wykazały istotne różnice pomiędzy pięcioma wydzielonymi klastrami. Na podstawie symulacji Monte Carlo $p=0.01$ wykazano, że struktura populacji otrzymana za pomocą metody III jest istotna statystycznie (tab. 32).

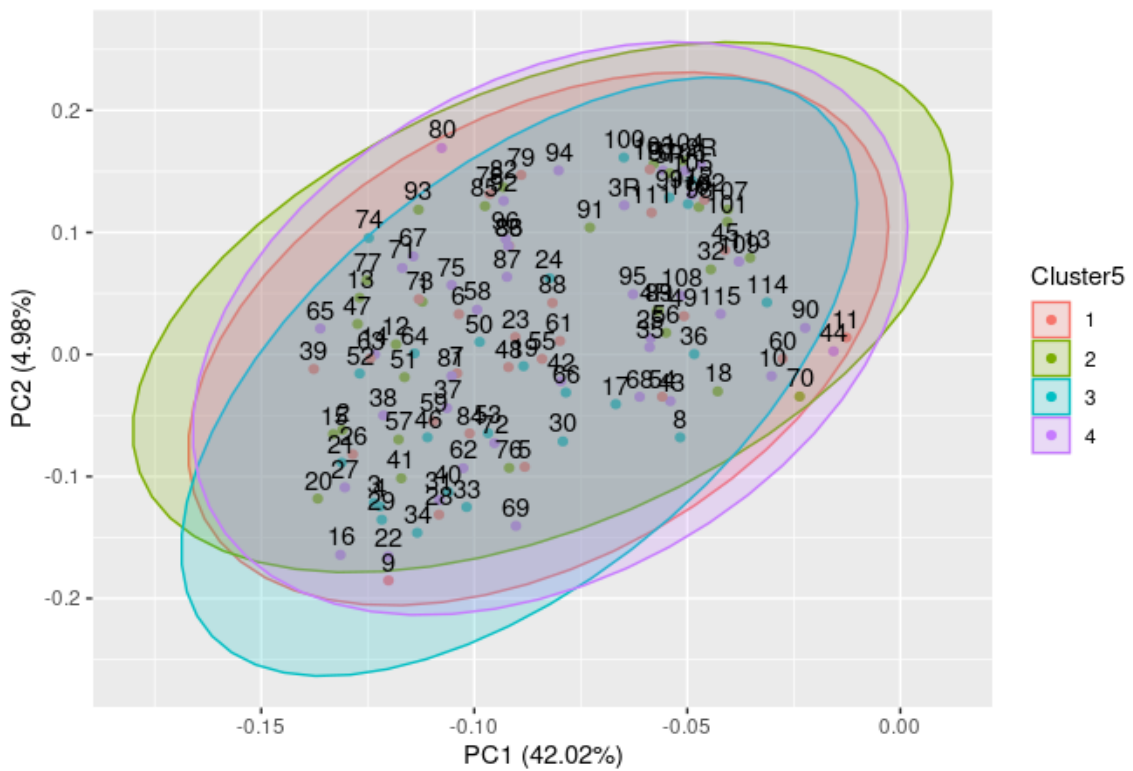
Wyniki uzyskane z zastosowaniem metody I i III Kmeans'a były identyczne. Grupowanie uzyskane za pomocą tych metod wyjaśniało 23,3 % obserwowanej zmienności wobec 20,7% wyjaśnianej przez grupowanie uzyskane za pomocą metody II. Następnie każdy z opracowanych modeli grupowania obiektów przetestowano za pomocą funkcji 'randtest' i symulacji MonteCarlo. Wszystkie trzy zastosowane modele grupowania linii w populacji wydzielają podgrupy linii, które istotnie różniły się statystycznie na poziomie 0.01 (ryc. 24, 25, 26).



Rycina 24 Grupowanie linii w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (PCA).



Rycina 25 Grupowanie linii w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (PCA).



Rycina. 26 Grupowanie linii w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (PCA).

Dodatkowo dla porównania uzyskanych wyników badane obiekty podzielono na 5 klastrow na podstawie podziału drzewa dystansu genetycznego, przynależności każdego z badanych genotypów (linii) do jednej z 4 rodzin (kombinacji krzyżówkowej) oraz losowego podziału badanych linii na 5 równo licznych klastrow. Wyniki tego grupowania zamieszczono w tabeli 26. Analizując molekularną analizę wariancji dla badanych grupowań otrzymano następujące wyniki: grupowanie na podstawie podziału drzewa wyjaśniało 15,4% obserwowanej zmienności, podział na podstawie przynależności do określonej rodziny wyjaśniał 11,6% obserwowanej zmienności i na końcu losowy podział wyjaśniał 0.03% obserwowanej zmienności. Dwa pierwsze grupowania w teście 'randtest' i symulacji MonteCarlo wykazały istotność statystyczną na poziomie 0.01, natomiast losowy podział zgodnie z oczekiwaniem nie wykazał statystycznej istotności. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż każdy z zaproponowanych podziałów (poza losowym) było nie przypadkowe i w jakimś stopniu wyjaśniało istniejącą strukturę populacji badanego materiału. Najlepsze wyniki (najwyższa wartość wyjaśnianej wariancji) została zanotowana dla wyników uzyskanych za pomocą metody Kmeans'a w oparciu o analizę składowych głównych w oparciu o dane markerowe oraz Kmeans'a w oparciu o analizę DAPC w oparciu o dane markerowe.

5 . Dyskusja

Zboża są jednymi z najważniejszych roślin uprawnych nie tylko w Polsce, ale też na świecie. Wynika to między innymi z tego, że ich ziarno jest ważnym surowcem dla przemysłu chemicznego i spożywczego. (Augustyńska i Czulowska 2021). Pszenica stanowi odpowiednio 50 % i 30 % światowego handlu i produkcji zbóż (Akter. i Islam 2017). Odgrywa kluczową rolę w żywieniu człowieka, jest głównym źródłem kalorii i białka na świecie, znana jako podstawowe pożywienie w ponad 40 krajach świata (Sharma i in. 2019). Żywność na bazie pszenicy jest bogatsza w błonnik niż żywność na bazie mięsa. Ciasto wyprodukowane z mąki pszennej ma inne lepkością właściwości niż inne zboża. Jest uważana za pokarm o wyższej zawartości błonnika i właśnie dlatego zaobserwowano jego pozytywny wpływ na kontrolowanie cholesterolu, glukozy i funkcji jelitowych w organizmie. (Giraldo i in. 2019). Przede wszystkim pszenica jest wykorzystywana do produkcji chleba. Użyteczność pszenicy i wysoka wartość odżywcza sprawiły, że stała się podstawowym pożywieniem dla ponad 1/3 populacji świata. Ziarno pszenicy oddziela się

od plew i słomy po zbiorze pszenicy. Słoma pszenicy jest dalej stosowana w ściółce dla zwierząt i materiałach budowlanych. Globalne zapotrzebowanie na produkcję pszenicy wzrasta nawet w krajach o niekorzystnym klimacie dla jej produkcji. Powszechne zmiany klimatyczne źle wpływają na produkcję pszenicy i wzbudzają obawy o bezpieczeństwo żywnościowe (Mahmood-ur-Rahman Ansari. 2022).

Szacuje się, że roczna produkcja zbóż powinna zostać zwiększona o 1 mld ton, aby wyżywić spodziewaną populację 9,1 mld do 2050 r. (FAO, 2015). Obecny scenariusz demograficzny wymaga zwiększenia wydajności upraw w celu zaspokojenia zwiększonego zapotrzebowania na żywność (Iqbal i in. 2017). Pszenica, oprócz strefy klimatu umiarkowanego, jest uprawiana w regionach tropikalnych i subtropikalnych, które doświadczają dużego stresu (Rahaie. i in. 2013). Główne zagrożenia środowiskowe obejmują zimno, zasolenie, ciepło i suszę, które drastycznie wpływają na plon. Wodę i ciepło uważa się jednak za kluczowe obciążenia środowiskowe, które spowodowały zmniejszenie plonów pszenicy na całym świecie (Lesk i in. 2016; Liu i in. 2016). Tak, więc postęp genetyczny będzie miał bezpośredni związek ze wzrostem plonowania i tolerancji na stresy bez którego niemożliwe będzie zwiększenie produkcji pszenicy (Tester 2010; He 2013). Prognozy dotyczące zmian klimatu sugerują, że tendencja wzrostu temperatury na świecie będzie się utrzymywać, chociaż jej skala będzie zależeć od przyszłego poziomu emisji dwutlenku węgla i innych gazów cieplarnianych, przy czym skuteczne działania redukcyjne złagodzą tendencję ocieplenia. W przypadku Europy prognozy dotyczące zmian klimatu sugerują, że do końca stulecia średnia roczna temperatura powietrza może wzrosnąć w zakresie od 1,0 do 4,5 °C w porównaniu z latami 1971-2000. Średnie roczne opady będą niższe w Europie południowej, na podobnym poziomie w Europie środkowej i wyższe w Europie północnej. Ogólnie rzecz biorąc w większości terenów Europy południowej i środkowej będzie bardziej sucho i cieplej w głównym okresie uprawy roślin, w tym wiosną i latem. Zwiększy to ryzyko ekstremalnych zjawisk pogodowych, takich jak upały i okresy suszy (Jacob i in. 2014). Chociaż problemy związane z chorobami upraw zasadniczo nie wzrosną do końca tego stulecia (Juroszek i von Tiedemann 2015), plon upraw musi być zabezpieczony poprzez zwiększenie uwagi w hodowli nowych odmian na ich stabilność plonowania (Miedaner, 2018). Hodowla pod kątem odporności o szerokim spektrum działania przeciwko już istniejącym i pojawiającym się chorobom jest ważnym elementem każdego realizowanego programu hodowlanego (Li i in. 2020). Dlatego hodowla roślin musi uwzględniać zarówno stresy abiotyczne (np. upał, susza, zalanie, zasolenie), jak i biotyczne (Ceccarelli i in. 2010), w tym na szkodniki i patogeny, takie jak bakterie,

fitoplazmy, wirusy, grzyby i nicienie. Szkodniki i patogeny powodują straty w plonach pszenicy do 21,5% i mogą w wyjątkowym latach powodować straty sięgające nawet 28,1% (Savary i in. 2019). Stosowanie odpornych lub tolerancyjnych odmian jest tanie, przyjazne dla środowiska i skuteczne, chyba, że patogeny szybko pokonają oporność. W związku z tym stabilność środowiskowa i trwałość odporności mają kluczowe znaczenie (Juroszek i von Tiedemann 2011).

Najbardziej rozpowszechnionymi, występującymi we wszystkich rejonach uprawy pszenicy ozimej i jarej chorobami powodowanymi przez grzyby są: rdza brunatna wywoływana przez *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Abdelbacki i in. 2013) rdza żółta powodowana przez grzyb *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks (Chen, 2014). oraz mączniak prawdziwy powodowany przez patogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Pietrusińska i Czembor 2014). Rdza brunatna powoduje straty plonów szacowane na około 10%, które w przypadku ciężkiej infekcji mogą sięgać nawet ponad 40% (Kassem i in. 2011). W warunkach Polski straty sięgają średnio 9,1% rocznie (Trawal i Walczak 2012). Obecnie ponad 35% powierzchni pod uprawą pszenicy na świecie jest dotknięte chorobą rdzy żółtej (Singh i in., 2004). Natomiast mączniak prawdziwy, przy warunkach sprzyjających rozwojowi patogena, może powodować straty sięgające nawet do 50% (Mwale i in. 2014). Powyższe fakty sprawiają, że wymienione choroby mają duże znaczenie ekonomiczne dla rolników.

Odmiany roślin uprawnych, w tym pszenicy, poddane są nieustannie stresom biotycznym i abiotycznym, dlatego współczesna hodowla musi sprostać wyzwaniom jakie stawia przed nią natura.

W niniejszej pracy zostały przeprowadzone krzyżowania mające na celu otrzymanie linii z najlepszą odpornością na choroby powodowane przez grzyby. Wybrane zostały odmiany takie jak Henika, Parabola, Santa, Hena i Triso, które posiadały geny odporności na rdzę brunatną (Lr1, Lr,11, Lr18, Lr20, Lr46), mączniaka prawdziwego (Pm3d, Pm5) i rdzę żółtą (Yr5, Yr29).

Proste krzyżowania dwukomponentowe A x B uzupełniono o kombinacje złożone (A x B) x (C x D). W ten sposób kombinacje czteroliniowe niosą ze sobą większe prawdopodobieństwo otrzymania z nich linii z jak największą liczbą genów odporności.

Z oceny w skali 9-stopniowej wykonanej w 2017 roku można było przypuszczać, że kombinacja (Santa x Hena) x (Hena x Parabola) zawiera pewne geny odporności i jest szansa na powodzenie przeniesienia tych genów lub ich połączenia w uzyskanym mieszańcu.. Analiza wyników z 2020 roku wykazała, że analizowane rośliny z czterech kombinacji

krzyżowań były zróżnicowane pod względem stopnia porażenia przez rdzę brunatną, rdzę żółtą, septoriozę liści oraz brunatną plamistość liści zbóż.

Obowiązujące prawo Unii Europejskiej o przestrzeganiu zasad integrowanej ochrony roślin (od 2014 roku) spowodowało, że coraz większą uwagę zwraca się na hodowlę odpornościową. Integrowana ochrona roślin (z ang. Integrated Pest Management – IPM) polega na zwalczaniu organizmów szkodliwych dla upraw, z zastosowaniem wszystkich dostępnych metod, a w szczególności metod nie chemicznych. Minimalizuje to zagrożenie dla ludzi, zwierząt, a także środowiska. Ograniczenie liczebności populacji organizmów poniżej progu szkodliwości tak, aby nie powodowały one istotnych strat zarówno ekonomicznych, gospodarczych jak i środowiskowych (Horoszkiewicz-Janka i in. 2013). W środowisku pojawiają się coraz to nowe mutacje patogenów, a co za tym idzie większa ilość wirulentnych szczepów stąd hodowla odpornościowa jest jedyną efektywną drogą w przeciwdziałaniu i walce z nowymi chorobami.

Geny odporności najczęściej wprowadzane są do pszenicy z pokrewnych dzikich gatunków, co często prowadzi do wprowadzania w mieszańcu niekorzystnych cech agronomicznych, a to z kolei prowadzi do obniżenia poziomu plonowania oraz pogorszenia jakości ziarna. Kluczem do zapobiegania tego problemu jest przeprowadzenie kilku cykli krzyżowań wstecznych, które pozwalają na wyparcie niekorzystnych cech w kolejnych pokoleniach. Istotnym wsparciem tego procesu jest selekcja uzyskanych mieszańców z wykorzystaniem markerów molekularnych (Ma i in. 2015).

Na podstawie przeprowadzonych badań i obliczeniu współczynników korelacji pomiędzy markerami PCR a cechami odporności na choroby powodowane przez grzyby można wnioskować, że dla brunatnej plamistości liście oraz dla rdzy żółtej udało się wykazać istotną statystycznie zależność między dwoma zidentyfikowanymi markerami. Były to markery Pm_3d_240 wykazujący korelację z odpornością na rdzę żółtą (Yr) oraz Pm_3d_407 wykazujący korelację z odpornością na brunatną plamistość liści. W każdej uzyskanej kombinacji krzyżowań wykazano obecność markerów genów związanych z odpornością na choroby powodowane przez grzyby. Markery te można z powodzeniem wykorzystać w pracach hodowlanych w celu przyspieszenia i ułatwienia selekcji form wykazujących tolerancję lub odporność na analizowane patogeny.

Dla zapewnienia długotrwałej, silnej odporności roślin na choroby grzybowe, zaleca się piramidyzację genów odporności, czyli ich skoncentrowanie w jednym genotypie. Piramidyzacja genów w linii hodowlanej może znacznie zwiększyć zakres odporności

na różne rasy (patotypy) tego samego patogena, a także na rozszerzenie zakresu odporności na różne patogeny czy szkodniki. Kumulacja różnorodnych kombinacji genów warunkujących odporność na istotne z punktu widzenia rolniczego choroby, w tym również genów o charakterze ilościowym, przyczynia się do zmniejszenia presji selekcyjnej na patogena. Daje to możliwość uzyskania kompleksowej i trwalszej w czasie odporności odmian. W tej kwestii istotne wsparcie dla hodowli odpornościowej stanowi genetyka molekularna, dostarczając narzędzi pozwalających na przeprowadzenie odpowiedniej selekcji materiałów hodowlanych (Pietrusińska i Czembor 2015). Selekcja jest istotnym etapem hodowli odpornościowej, dotyczy zarówno materiałów wyjściowych do hodowli, jak i późniejszych pokoleń. Selekcja za pomocą markerów może być stosowana we wczesnych etapach hodowli, z wykorzystaniem niewielkiej ilości materiału roślinnego. Umożliwia ona również ocenę roślin na podstawie genotypu (Święcicki i in. 2011). Metody fitopatologiczne oparte na symptomologii nie zawsze są skuteczne w identyfikacji genów oporności. Ocena w terenie jest kosztowna, czasochłonna i w dużym stopniu uzależniona od warunków środowiskowych. Włączenie genów oporności jest przyjaznym dla środowiska systemem, który nie obciąża hodowców żadnymi kosztami. Obecnie różne markery molekularne są szeroko stosowane w mapowaniu genetycznym roślin i selekcji wspomaganym markerami (MAS). Markery molekularne związane z odpornością na choroby będą skutecznym sposobem identyfikacji czynników odporności na choroby. Pojawienie się stosunkowo niedrogich, wysokowydajnych platform markerów molekularnych powoduje, że selekcja wspomaganym markerami (MAS) staje się realnym podejściem do śledzenia genów odporności (Sharma-Poudyal, 2013). Ze względu na dużą liczbę markerów warunkujących odporność na choroby, istotna jest weryfikacja ich przydatności do wczesnej selekcji. Użyteczny marker powinien dawać wysoce powtarzalne wyniki analiz molekularnych w różnych pulach genowych.

W ciągu ostatnich lat wprowadzanie genów odporności było wykorzystywane w programach hodowlanych w celu zmniejszenia wpływu spowodowanego wystąpieniem poważnych chorób roślin. Jednakże, gdy w hodowli odpornościowej zastosujemy konwencjonalne podejście to potrzebne są kolejne cykle samozapylenia, aż jakość odporności zostanie całkowicie zintegrowana z nowym genotypem, co zajmuje bardzo dużo czasu. W przeciwieństwie do konwencjonalnej metody, w pełni homozygotyczne linie mogą być wytwarzane w jednym pokoleniu poprzez produkcję haploidów, a następnie podwojenie liczby chromosomów. Daje to możliwość szybkiej selekcji pożądanego genotypu i uzyskanie nowych odmian (Coelho i in. 2018, Lantos C. 2013).

Połączenie technik haploidyzacji z analizą z wykorzystaniem markerów molekularnych jest ważnym aspektem współczesnej hodowli odpornościowej. Takie podejście skraca cykl hodowlany o kilka lat, przy jednoczesnej intensyfikacji efektywności selekcji. Markery molekularne są niezbędne do przeprowadzenia szybkiej i skutecznej piramidyzacji genów, która w sposób bezpośredni wpływa na skuteczność hodowli odpornościowej. Integrowana hodowla roślin wprowadzona przez Unię Europejską oraz związane z nią ograniczenia ilości dostępnych substancji czynnych środków ochrony roślin sprawia, że wybór do uprawy odmian odpornych między innymi na choroby powodowane przez grzyby ma szczególne znaczenie. Piramidyzacja genów odporności na rdzę brunatną, rdzę żółtą czy też mączniaka prawdziwego oraz inne choroby wywoływane przez grzyby w jednej odmianie stanowi skuteczny sposób na ich zwalczanie. Kumulacja genów jest przydatna zwłaszcza w sytuacjach, gdy pojedyncze geny główne nie zapewniają długotrwałej odporności na patogena. Ze względu na ciągłe zmiany wirulencji patogenów, hodowla odpornościowa jest procesem stale zachodzącym. Bardzo dynamiczna natura patogenów powoduje, że pojedyncze geny główne często są przełamywane przez nowe patotypy w krótkim czasie od ich zastosowania w hodowli. W związku z tym kombinacje dwóch lub więcej genów odporności w jednej odmianie są bardzo poszukiwane. Wykorzystanie markerów molekularnych w początkowych etapach hodowli odpornościowej umożliwia właściwy dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań. Poszerzanie i urozmaicanie pul genowych poprzez wkrzyżowywania stanowi zabieg hodowlany, który pozwala na połączenie efektywnych genów odporności i uzyskanie genotypów o szerokim zakresie odporności na jednego czy też kilka patogenów. Zastosowanie selekcji wspartej markerami molekularnymi (MAS) w dalszych pracach nad kumulowaniem genów odporności pozwala na szybką identyfikację genów wprowadzanych do danej piramidy. Ponadto selekcja na poziomie molekularnym nierzadko okazuje się konieczna, zwłaszcza w sytuacjach, gdy nie ma możliwości weryfikacji obecności genów odporności z wykorzystaniem testów fitopatologicznych. Zwłaszcza dotyczy to tych genów, dla których nie zidentyfikowano jeszcze wirulentnych izolatów patogena. W literaturze istnieje wiele przykładów piramid genowych do materiałów hodowlanych, w celu zwiększenia ich odporności na mączniaka prawdziwego i/lub rdzę brunatną. Są to piramidy typu Lr+Lr, Pm+Pm, a także Lr+Pm. Z powodzeniem można wykorzystywać w programach hodowlanych następujące piramidy genowe: Lr9+Lr24, Lr19+Lr24, Lr19+Lr28 i Lr9+Lr24+Lr28 (Prabhu K. 2009). Huerta-Espino i in. (2009) w odmianie Chinese Spring wykazali obecność genów Lr27+Lr31, a Hovhannisyany i in. (2011) zidentyfikowali

Lr10+Lr47+Lr28 w linii *T. boeoticum* / IG 44941. Vanzetti i in. (2011) wykazali w odmianie Buck Guapo obecność genów Lr3a+Lr16+Lr26+Lr nieokreślony, a Leśniowska-Nowak i in. (2013) wykryła geny Lr10+Lr19 w odmianie Angelina. Piramidy zawierające geny Pm wykazali m. in. Liu i in. (2002) – Pm4a+Pm21 w odmianie Yang1583, Hysing i in. (2007) - piramida Pm1a+Pm9 zidentyfikowana w odmianie Ring, Pm4b+Pm6+Pm nieokreślony w odmianie Tjalve, Pm6+Pm8+Pm nieokreślony w odmianie Tjelvar oraz Pietrusińska (2010) – Pm2+Pm6 (Olcha, Roma, Rada, Weneda, Sakwa), Pm3d+Pm8 (Turnia), Pm4b+Pm8 (Divio, Wilga), Pm1+Pm3d+Pm4b (Omega, Hesja), Pm1+Pm2+Pm9+Pm4b (Helia).

Jednoczesna piramidyzacja genów Lr i Pm występuje rzadziej. W powyższej pracy otrzymano kilka piramid genowych, które pozwalają zredukować szkody wywoływane przez najczęściej występujące choroby. Podjęto próbę uzyskania piramid z użyciem genów Lr1, Lr,11, Lr18, Lr20, Lr46, Pm3d, Pm5, Yr5 oraz Yr29. . Otrzymano 4 linie (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), (Parabola x Triso) x(Santa x Hena) oraz (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). Układ krzyżówkowy nie był losowy wybór miał na celu otrzymania docelowej linii z największą ilością genów odporności na choroby grzybowe.

Hovhannisyán i in. (2011) analizowali efektywne piramidy genowe Lr+Pm: Lr25+Pm1+Pm2, Lr25+Pm1+Pm2+Pm3, Lr28+Lr47+Pm1+Pm2, Lr28+Lr47+Pm3+Pm10 oraz Lr10+Lr25+Lr28+Lr47+Pm1+Pm2+Pm3. Natomiast do polskiej odmiany Nadobna i niemieckiej odmiany Lexus została wprowadzona piramida genów Lr41=Lr39+Pm21 (Pietrusińska i in. 2011).

Markery molekularne są narzędziem niezbędnym do przeprowadzenia skutecznej i szybkiej piramidyzacji genów, która w sposób bezpośredni wpływa na skuteczność wprowadzania na rynek odmian odpornych. Wykonane badania dają potwierdzenie możliwości efektywnego wykorzystania markerów Pm_3d_240 oraz Pm_3d_480. Podejście takie jest bardziej przyjazne dla środowiska w celu zmniejszenia strat plonów w wyniku zmniejszenia porażenia przez choroby oraz niweluje koszty na środki ochrony roślin. Technika ta przynosi wymierne korzyści dla rolnika i środowiska.

6 . Wnioski

1. Linie pszenicy wyprowadzone z poszczególnych kombinacji krzyżowań różniły się stopniem porażenia przez rdzę brunatną, septoriozę liści oraz brunatną plamistości

liści zbóż natomiast kombinacja krzyżowań nie miała wpływu porażenie linii (roślin) przez rdzę żółtą. Linie wyprowadzone z każdej kombinacji krzyżowań posiadały wysoką odporność na tego patogena.

2. Grupowanie linii pszenicy na podstawie wyników genotypowania z zastosowaniem różnych algorytmów pozwoliło na wydzielenie pięciu subpopulacji o statystycznie istotnej strukturze.
3. Uzyskane wyniki grupowania obiektów za pomocą trzech różnych algorytmów pozwoliły na wskazanie istotnej statystycznie struktury populacji.
4. Wykazano statystycznie istotną korelację między markerem Pm_3d_240 a odpornością na septorię liści oraz markerem Pm_3d_407 a odpornością na brunatną plamistość liści zbóż.
5. Markery Pm_3d_240 oraz Pm_3d_407 mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych do oceny odporności roślin pszenicy na patogeny grzybowe powodujące septoriozę liści oraz brunatną plamistość liści zbóż.
6. W każdej kombinacji krzyżowań wykazano obecność markerów genów związanych z odpornością na choroby powodowane przez patogeny grzybowe.
7. Pirymidyzacja genów związanych z odpornością na choroby powodowane przez patogeny grzybowe pozwala na uzyskanie genotypów pszenicy bardziej odpornych na ich presję środowiskową i przyczynia się do lepszej zdrowotności roślin, a markery molekularne są narzędziem ułatwiającym skuteczną i szybką piramidyzację genów.
8. Otrzymane, w wyniku krzyżowań linii pszenicy z różnymi genami odporności na patogeny grzybowe, piramidy genowe pozwoliły zredukować stopień porażenia roślin przez najczęściej występujące choroby.

7. Streszczenie

Pszenica jest gatunkiem dominującym w strukturze zasiewów zbóż w Polsce. Charakteryzuje ją najwyższe spośród zbóż plonowanie jak również i największa wrażliwość na działanie agrofagów, do których zalicza się choroby grzybowe. Do najczęściej występujących, najgroźniejszych chorób grzybowych pszenicy należą rdza brunatna, powodowana przez patogen *Puccinia triticina* oraz rdza żółta powodowana przez grzyb *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks. Powodują one straty plonów sięgające nawet do 100% w zależności od czasu infekcji oraz poziomu odporności roślin. Narastający problem występowania chorób grzybowych, a także wprowadzenie obowiązku przestrzegania zasad integrowanej ochrony roślin na terenie Unii Europejskiej spowodowały, iż w ostatnich latach znacznie wzrosło zainteresowanie hodowlą odpornościową roślin. Wprowadzanie genów odporności do nowych odmian stanowi nieodłączny element hodowli roślin. Selekcja roślin z wykorzystaniem markerów molekularnych pozwalają zintensyfikować i przyspieszyć proces uzyskiwania nowych odmian.

Celem pracy jest zbudowanie bazy w postaci linii, które umożliwią tworzenia nowych odmian odpornych na rdzę brunatną, rdzę żółta oraz mączniak, którą będzie można wykorzystać do tworzenia nowych odmian odpornych na wymienione patogeny. Selekcja z wykorzystaniem markerów molekularnych umożliwi skrócenie cyklu hodowlanego oraz zwiększenie efektywności selekcji materiałów hodowlanych.

Nowe wyzwania, które stawiają nam gospodarstwa ekologiczne będą do osiągnięcia dzięki odpornym odmianom, zwiększa ich potencjał plonowania nie stosując środków fungicydowych, przyczynia się to do obniżenia kosztów produkcji oraz będzie miało bezpośredni wpływ na ochronę środowiska i zachowanie równowagi w biocenozie (uniknięcie zatrucia płodów rolnych), co w rezultacie przekłada się na bezpośredni wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt.

8. Abstract

Wheat is the dominant species in the structure of cereal crops in Poland. It is characterized by the highest yield among cereals as well as the greatest sensitivity to the effects of agrophages, which include fungal diseases. The most common and most dangerous fungal diseases of wheat include brown rust caused by the pathogen *Puccinia triticina* and yellow rust caused by the fungus *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Eriks. They cause yield losses of up to 100% depending on the time of infection and the level of plant resistance. The growing problem of the occurrence of fungal diseases, as well as the introduction of the obligation to comply with the principles of integrated pest management in the European Union, have resulted in a significant increase in interest in plant resistance breeding in recent years. The introduction of resistance genes into new varieties is an integral part of plant breeding. Selection of plants using molecular markers allows to intensify and accelerate the process of obtaining new varieties.

The aim of the work is to build a base in the form of lines that will enable the creation of new varieties resistant to brown rust, yellow rust and mildew, which can be used to create new varieties resistant to these pathogens. Selection using molecular markers makes it possible to shorten the breeding cycle and increase the efficiency of selection of breeding materials.

The new challenges that organic farms pose to us will be achieved thanks to resistant varieties, it increases their yield potential without using fungicides, this contributes to reducing production costs and will have a direct impact on environmental protection and maintaining balance in the biocenosis (avoiding crop poisoning) , which in turn translates into a direct impact on human and animal health.

9. Literatura

1. Abdelbacki A., Soliman N., Najeeb M., Omara R. (2013) Postulation and identification of resistance genes against *Puccinia triticina* in new wheat cultivars in Egypt using molecular markers. *International Journal of Chemical Environmental and Biological Sciences* 1(1): 2320 – 4087
2. Agrios, G. N. (ed.) (1997). "Control of plant diseases M. Grossman, H. F. Linskens, P. Maliga, and R. Riley (Berlin: Springer-Verlag), 12
3. Akter N, Islam MR. (2017) Heat stress effects and management in wheat: A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 37(5):1-17
4. Alam M. A., Xue F., Wang C., Ji W. (2011) Powdery mildew resistance genes in wheat: identification and genetic analysis. *Journal of Molecular Biology Research* 1(1): 20 – 39 7.
5. Augustyńska I. i Czułowska M. (2021) Efektywność produkcji wybranych zbóż w Polsce w latach 2018-2020. *Zagadnienia doradztwa rolniczego*. Nr 1 2021(103) 5-22
6. Austin C. N. , Grove G. G. , Meyers J. M. (2011). Powdery mildew severity as a function of canopy density: associated impacts on sunlight penetration and spray coverage. *American Journal of Enology & Viticulture*, 62 (1): 23-31
7. Ayliffe M. A., Lagudah E. S. (2004) Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Annals of Botany* 94: 765 – 773
8. Beddow JM, Pardey PG, Chai Y, Hurley TM, Kriticos DJ, Braun H-J (2015) Research investment implications of shifts in the global geography of wheat stripe rust. *Nat Plants*. 1:1–5
9. Bennett, F. G. A. (1984). Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathol*, 33, 279-300
10. Boshoff W, Visser B, Lewis C, Adams T, Saunders D, Terefe T (2020) First report of *Puccinia striiformis* f. sp *tritici*, causing stripe rust of wheat. *Zimbabwe Plant Dis*.104:290
11. Brown, M. B., & Forsythe, A. B. (1974). Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American statistical association*, 69(346), 364-367

12. Braun, H. J., Atlin, G., Payne, T. (2010). "Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change," in *Climate change and Crop Production*, ed. C. R. P. Reynolds (London: CABI).
13. Bremenkamp-Barrett B, Faris JD, Fellers JP (2008). Molecular Mapping of the Leaf Rust Resistance Gene Lr17a in Wheat. *Crop Sci.* 48: 1124-1128
14. Budzyński W., Szempliński W. (1999) Pochodzenie i historia uprawy [w: *Szczegółowa uprawa roślin*]. Red. Z. Jasińska, A. Kotecki. AR, Wrocław
15. Budzyński W., Szempliński W. (2003) 2. Pszenica. W: Jasińska Z., Kotecki A. (red.) *Szczegółowa uprawa roślin*. Tom 1. Wyd. II. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, s. 78
16. Carleton, M. A. (1915). A serious new wheat rust in this country. *Science* 42, 58–59
17. Castro A. J., Capettini F., Corey A. E., Filichkina T., Hayes P. M., Kleinhofs A., Kudrna D., Richardson K., Sandoval-Islas S., Rossi C., Vivar H. (2003) Mapping and pyramiding of qualitative and quantitative resistance to stripe rust in barley. *Theor. Appl. Genet.* 107: 922 - 930
18. Ceccarelli S, Grando S, Maatougui M, Michael M, Slash M, Haghparast R, Rahmanian M, Taheri A, Al-Yassin A, Benbelkacem A, Labdi M, Mimoun H, Nachit M (2010) Plant breeding and climate changes. *J Agric Sci* 148:627–637
19. Chelkowski J. (1999) Pszenice jakościowe o wysokiej wartości wypiekowej w Wielkiej Brytanii. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 1: 53-54
20. Chelkowski J., Koczyka G. (2005a) Genomika i bioinformatyka roślin. *Rozprawy i Monografie. IGR PAN*, Poznań: 139 - 15
21. Chelkowski J., Stępień Ł., Strzembicka A. (2005b). Ocena podatności pszenicy ozimej na rdzę brunatną oraz poszukiwanie źródeł odporności. *Acta Agrobotanica* 58 (1): 143 - 152
22. Chen W, Wellings C, Chen X, Kang Z, Liu T. (2014) Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Pathol.* 15:433–46
23. Chen X. (2020) Pathogens which threaten food security: *Puccinia striiformis*, the wheat stripe rust pathogen. *Food Security* 12:239–51

24. Chen X. M., Luo Y. H., Xia X. C., Xia L. Q., Chen X., Ren Z. L., He Z. H., Jia J. Z. (2005) Chromosomal location of powdery mildew resistance gene Pm16 in wheat using SSR marker analysis. *Plant Breed.* 124: 225 - 228
25. Chen, X. M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27, 314–337
26. Coelho M. B., Scagliusi S. M. M., Lima M. I. P. M., Consoli L., Grando M. F. (2018) Androgenic response of wheat genotypes resistant to fusariosis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 53(5): 575 – 582
27. Czajowski G., Czembor P. (2016) Chorobotwórczość *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* i *Blumeria graminis* f. sp. *triticales* sprawców mączniaka prawdziwego zbóż i traw na pszenicy i pszenżycie. *Progress in Plant Protection* 56 (3): 360–365
28. Czembor H. J., Wiewióra M. (2001) Dziedziczenie tolerancji na toksyczne działanie glinu u wybranych odmian pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.). 220: 45 — 52
29. Dilbirligi M., Erayman M., Sandhu D., Sidhu D., Gill K. S. (2004) Identification of wheat chromosomal region containing expressed resistance genes. *Genetics* 166: 461-481
30. Dimmock JPRE, Gooding MJ.(2002)The influence of foliar diseases, and their control by fungicides, on the protein concentration in wheat grain: a review. *J Agric Sci.*;138:349–66.
31. Dubas A., Gładysiak S. (1997) Rośliny zbożowe – Pszenica. W: Szczegółowa uprawa roślin rolniczych. Wyd. III. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, 35 – 45
32. E. Ehler, L.(2006) Integrated pest management (IPM): Definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Manag. Sci.* 62, 787–789
33. Ellis J. G., Lagudah E. S., Spielmeier W., Dodda P. (2014) The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front. Plant Sci.*, 24 November 2014
34. FAO.(2015) World Food and Agriculture-FAO Statistical Pocketbook. Rome, Italy: FAO
35. Flor H. H. (1955) Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology* 45: 680 - 685
36. Fones Helen, Gurr Sarah (2015) The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective.79, 3-7

37. Fuchs M.(2017). Pyramiding resistance-conferring gene sequences in crops.Current Opinion in Virology. Volume 26, 36-42
38. Gao H., Niu J., Li S. (2018) Impacts of wheat powdery mildew on grain yield & quality and its prevention and control methods. Am. J. Agric. For. 6: 141–147
39. Gąsiorowski H., Klockiewicz-Kamińska E.: (2004) Polskie odmiany pszenicy. W: Pszenica: Chemia i Technologia, PWRiL, Poznań, 113-12
40. Gebrewahid T. W., Yao Z. J., Yan X. C., Gao P., Li Z. F. (2017) Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Chinese Common Wheat Cultivar. Plant Disease. 101:1729-1737
41. Ginter A., Szarek S. (2010) Sytuacja dochodowa producentów zbóż na przykładzie uprawy pszenicy. Journal of Agribusiness and Rural Development 4(18): 29 – 39
42. Giraldo P, Benavente E, Manzano-Agugliaro F, Gimenez E. (2019) Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. Agronomie. 9(7) 352
43. Górny, A.G. (2004) Zarys Genetyki Zbóż. Tom 1. Jęczmień, pszenica i żyto. Wyd. Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań, 181 — 327
44. Goutam Umesh, Kukreja Sarvjeet, Yadav Rekesh, Salaria Neha, Thakur Kajal, Goyal Aakash (2015) Recent trends and perspectives of molecular markers against fungal diseases in wheat. Front. Microbiology
45. Goyal, A., and Prasad, R. (2010). Some important fungal diseases and their impact on wheat production. Management of Fungal Plant Pathogens, Vol. 11, eds A. Arya and A. E. V. Perelló (London: CABI), 362
46. Goyeau H., Park R., Scheffer B., Lannocu C. (2006) Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in french wheat leaf rust populations. Phytopathology 96 (3): 264–273
47. Griffey, C. A. Das M. K. & Stromberg E. L. (1993). Effectiveness of adult-plant resistance in reducing grain yield loss to powdery mildew in winter wheat. Plant Dis, 77, 618-622
48. Gupta, P. K., Landridge, P., and Mir, R. R. (2010). Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Mol. Breed.* 26, 145–161
49. Gupta, P. K., Mir, R. R., Mohan, A., and Kumar, J. (2008). Wheat genomics: present status and future prospects. *Int. J. Plant Genome* 2008

50. Hanczakowski P., (2001) Rośliny jako źródło węglowodanów [w: Składniki pokarmowe i antyodżywcze występujące w roślinach]. Red. P. Hanczakowski, J. Koreleski, T. Wolski. IZ, Kraków, 5–10
51. Hautea, R. A. Coffman, W. R. Sorrells, M. E. & Bergstrom, G. C. (1987). Inheritance of partial resistance to powdery mildew in spring wheat. *Theor. Appl. Genet*, 73, 609-615
52. He Z, Joshi AK, Zhang W. (2013) Climate vulnerabilities and wheat production. In: Pielke RA, editor. *Climate Vulnerability: Understanding and Addressing Threats to Essential Resources*. Waltham: Academic Press. 57-67
53. Hittalmani S., Parco A., Mew T. V., Zeigler R. S., Huang N. (2000) Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1121 — 112
54. Horoszkiewicz-Janka J., Korbas M., Mrówczyński M. (2013) *Metodyka integrowanej ochrony pszenicy ozimej i jarej dla producentów*. Instytut Ochrony Roślin – PIB, Poznań
55. Hovhannisyan N. A., Dulloo M. E., Yesayan A. H., Knüpffer H., Amri A. (2011) Tracking of powdery mildew and leaf rust resistance genes in *Triticum boeoticum* and *T. Urartu*, wild relatives of common wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 47(2): 45 - 57
56. Hovhannisyan N. A., Dulloo M. E., Yesayan A. H., Knüpffer H., Amri A. (2011) Tracking of powdery mildew and leaf rust resistance genes in *Triticum boeoticum* and *T. Urartu*, wild relatives of common wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 47(2): 45 – 57
57. Hovmoller MS, Walter S, Justesen AF.(2010) Escalating threat of wheat rusts. *Science*.;329-369
58. Hsam, S. L. K. , Zeller, F. J. (2002). Breeding for powdery mildew resistance in common wheat (*T. aestivum* L. em Thell.). In: R.R. B' elanger, W.R. Bushnell, A.J. Dik & T.L.W. Carver (Eds.), *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*, APS Press, St. Paul, U.S.A., 219-238
59. Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P. (2002) Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate

- kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 8133–8138
60. Huang X. Q., Röder M. S. (2004) Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat. *Euphytica* 137: 203 - 223
 61. Huerta-Espino J, Singh RP, German S, McCallum BD, Park RF. (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179:143–60
 62. Huerta-Espino J., Singh R. P., Pérez-López J. B. (2009) Phenotypic variation among leaf rust isolates from durum wheat in northwestern Mexico. 12 th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference, October 13-16, Antalya – Turcja. Abstract Book, s. 29
 63. Hýsek J., Vavera R., Růžek P. (2017) Influence of temperature, precipitation, and cultivar characteristics on changes in the spectrum of pathogenic fungi in winter wheat. *Int. J. Biometeorol.* 61
 64. Hysing S. C., Merker A., Liljeroth E., Koebner R. M. D., Zeller F. J., Hsam S. L. K. (2007) Powdery mildew resistance in 155 Nordic bread wheat cultivars and landraces. *Hereditas* 144: 102 – 119
 65. Iqbal M, Raja NI, Yasmeen F, Hussain M, Ejaz M, Shah MA.(2017) Impacts of heat stress on wheat: A critical review. *Advances in Crop Science and Technology.* 5(1):01-09
 66. Jacob D, Petersen J, Eggert B et al (2014) EURO-CORDEX: new high-resolution climate change projections for European impact research. *Reg Environ Zmiana* 14: 562–578
 67. Jańczak C., Pawlak A. (2006) Występowanie i szkodliwość mącznika prawdziwego (*Blumeria graminis*) w pszenicy ozimej w latach 2003–2005. *Postępy w Ochronie Roślin* 46 (2): 538 - 542
 68. Jasińska Z., Kotecki A., (2003) Szczegółowa uprawa roślin tom I i II, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław
 69. Jeffrey G. Ellis, Evans S. Lagudah, Wolfgang Spielmeyer and Peter N. Dodds.(2014) The past, present and future of breeding rust resistant wheat.*Frontiers in Plant Science.*5:1-13
 70. Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405

71. Juroszek P, von Tiedemann A (2011) Potential strategies and future requirements for plant disease management under a changing climate. *Plant Pathol* 60:100–112
72. Juroszek P, von Tiedemann A (2015) Linking plant disease models to climate change scenarios to project, future risks of crop diseases: a review. *J Plant Dis Prot* 122:3–15
73. Kassem M., El-Ahmed A., Hakim M. S., Al-Saleh A., El-Khalifeh M., Nachit M. (2011) Identifying leaf rust resistance gene Lr19 in durum wheat using simple sequence repeat (SSR) marker. *African Journal of Biotechnology* 10(44): 8716 - 8719
74. Keller B., Feuillet C., Messmer M., (2000) Genetics of disease resistance. In *Mechanism of Resistance to Plant Diseases*. Eds: A. Slusarenko, R, S, S, Froser, L.C. Van Loon. Kluwer Academic Publ.: 101 -160
75. Kiel A.(2019). Identyfikacja markerów molekularnych funkcjonalnych do genów odporności na choroby grzybowe pszenicy (*Triticum aestivum* L.) przydatnych do selekcji linii podwojonych haploidów otrzymanych na drodze androgenezy. Praca doktorska.
76. Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Pakholkova E.V., Zhemchuzhina N.S., Lubich V.V. (2016) The differentiation of winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars for resistance to the most harmful fungal pathogens. *Agric. Biology* 51(3): 299–309
77. Kolmer J.A., Long D.L., Hughes M.E. (2007) Physiological specialization of *Puccinia triticina* on wheat in the United States in 2005. *Plant Disease* 91 (8): 979–984
78. Kolmer, J.A. (2005) Śledzenie rdzy pszenicy w skali kontynentalnej. *Curr. Opin. Roślina Biol.* 8, 441–449
79. Korbas M., (1998) *Choroby i szkodniki zbóż*. Wydaw. Multum, Poznań, 116
80. Kowalczyk K., Gruszecka D., Nowak M., Leśniowska-Nowak J. (2011) Resistance of Triticale hybrids with Pm4b and Pm6 genes to powdery mildew. *Acta Biologica Cracoviensia – Series Botanica* 53 (1): 57–62
81. Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621
82. Landjeva, S., Korzun, V., and Borner, A. (2007). Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 15, 271–296

83. Lantos C, Weyen J, Orsini J. M., Gnad H., Schlieter B., Lein V., Kontowski S., Jacobi A., Mihaly R., Broughton S., Pauk J., (2013) Efficient application of in vitro anther culture for different European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding programmes. *Plant Breeding*, v.132.149-154
84. Leath, S., Heun, M. (1990). Identification of powdery mildew resistance genes in cultivars of soft red winter wheat. *Plant Dis*, 74, 747-752
85. Leath, S., Murphy, J. P. (1985). Virulence genes of the wheat powdery mildew fungus, *Erysiphe graminis* f. sp. *Tritici* in North Carolina. *Plant Dis*, 69, 905
86. Leonard, K.J. i Szabo, L.J. (2005) Rdzy łądygi małych ziaren i traw spowodowanych przez *Puccinia graminis*. *Mol. Roślina Patol.* 6, 99–111
87. Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N. (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*. 529(7584):84-87
88. Leśniowska–Nowak J., Grądzielewska A., Majek M. (2013) Identyfikacja genów odporności na rdzę brunatną w wybranych europejskich odmianach pszenicy zwyczajnej oraz opracowanie warunków Multiplex PCR. *Annales Universitatis Mariae Curie – Skłodowska, Sectio E. Agricultura* 68(3): 20 – 28
89. Li W, Deng Y, Ning Y, He Z, Wang GL (2020) Exploiting broad-spectrum disease resistance in crops: from molecular dissection to breeding. *Annual Rev Plant Biol* 71:575–603
90. Limpert, E. Felsenstein, F. G. & Andrivon, D. (1987). Analysis of virulence in populations of wheat powdery mildew in Europe. *J. Phytopathol*, 120, 1-8
91. Liu B, Asseng S, Müller C, Ewert F, Elliott J, Lobell DB, et al. (2016) Similar estimates of temperature impacts on global wheat yield by three independent methods. *Nature Climate Change*. 6(12):1130-1136
92. Liu N, Bai G., Lin M., Xu X., Zheng W. (2017) Genome-wide Association Analysis of Powdery Mildew Resistance in U.S. *Scientific Reports* 7(1):11743
93. Liu R., Lu J., Zhou M., Zheng S., Liu Z., Zhang C., Du M., Wang M., Li Y., Wu Y., Zhang L. (2020) Developing stripe rust resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) lines with gene pyramiding strategy and marker-assisted selection. *Genetic Resources and Crop Evolution* volume 67, 381–391

94. Liu Z., Sun Q., Ni Z., Nevo E., Yang T. (2002) Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene Pm30 in wheat originating from wild emmer. *Euphytica* 123: 21 – 29
95. Liu, Y., He, Z., Apples, R., and Xia, X. (2012). Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor. Appl. Genet.* 1, 1–10
96. Łubkowski Z. (1968) *Pszenica*. PWRiL, Warszawa
97. Ma P. T., Xu H. X., Zhang H. X., Li L. H., Xu Y. F., Zhang X. T. (2015) The gene PmWFJ is a new member of complex Pm2 locus conferring unique powdery mildew resistance in wheat breeding line Wanfengjian 34. *Molecular Breeding* 35: 210
98. Ma P., Xu H., Luo Q., Qie Y., Zhou Y., Xu Y., Han H., Li L., An D. (2014) Inheritance and genetic mapping of a gene for seedling resistance to powdery mildew in wheat line X3986-2. *Euphytica* 200: 149 – 157
99. Mahmood-ur-Rahman Ansari. (2022) Current trends in wheat reasearch.
100. Mains E.B., Dietz S.M. (1930) Physiologic forms of barley mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. *Phytopathol.* 20: 229-239
101. Marasas C. N., Smale M., Singj R. P. (2003) The economic impact of productivity maintenance research: breeding for leaf rust resistance in modern wheat. *Agricultural Economics* 29: 253-263
102. McCallum B, Hiebert C, Huerta-Espino J, Cloutier S. (2012)Wheat leaf rust. See Ref. 85, pp. 33–62
103. McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R. W. (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* 7: 212
104. McIntosh R.A., Devos K.M., Dubovsky J., Rogers W.J. (2004) Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2004 Supplement. W GrainGenes
105. McIntosh R. A., Appels R., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J., Yamazaki Y. (2003) Catalogue of gene symbols for wheat. *Proc. 10th Intern. Wheat Genet. Symp., Paestum, Italy* Vol. 4
106. McIntosh R. A., Hart G. E., Devos K. M., Gale M. D., Rogers W. J. (1998) Catalogue of gene symbols for wheat. In: Slinkard A. E. (ed.). *Proc. 9th Int. Wheat Genet Symp.* 5: 13 — 72. Univ. Extension Press. University of Saskatchewan Saskatoon.

107. McIntosh R. A., Wellings C. R., Park R. F. (1995) Wheat Rust: an atlas of resistance genes. CSIRO, Australia, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
108. McIntosh, R. A., Hart, G. E., Devos, K. M., Gale, M. D., and Rogers, W. J. (1998). "Catalog of gene symbols for wheat," in Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium, (Saskatoon, SK), 1–235
109. McIntosh, R. A., Wellings, C. R., and Park, R. F. "Our daily bread," in Genomics of Tropical Plants, Vol. 15, eds P. H. Moore and R. Ming (New York, NY: Springer-Verlag), 515–548
110. Menzies, J. G. & MacNeil, B. H. (1986). Virulence of *Erysiphe graminis* f. sp. *Tritici* in southern Ontario in 1983, 1984, and 1985. *Can. J. Plant Pathol*, 8, 338-341
111. Miedaner T (2018) Wo hat der Anbau seine Grenzen? [Maize – Where are the limits of cultivation? in German]. *Innovations-Magazin Mais* 3:22–25
112. Moaine El Baldouri, Florent, Murant, Maeva Veysiere, Melanie Molinier, Rafał Flores, Laura Burlot, Michał Aluux, Hadi, Quesneville, Caroline Pont, Jerome Salse. (2016) Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*. 213:1477-1486
113. Mondal S., Rutkowski J., Velu G., Singh P., Crespo-Herrera L., Guzman C., Bhavani S., Lan C., He X., Singh R. (2016) Harnessing Diversity in Wheat to Enhance Grain Yield, Climate Resilience, Disease and Insect Pest Resistance and Nutrition Through Conventional and Modern Breeding Approaches. *Front. Plant Sci.*
114. Mukhtar S., Khan M. A. Paddar B. A., Anjum A., Zaffar G., Mir S. A., Naseer S., Bhat M. A. and Kamaluddin (2015) Molecular characterization of wheat germplasm for stripe rust resistance genes (Yr5, Yr10, Yr15 & Yr18) and identification of candidate lines for stripe rust breeding in Kashmir. *Indian Journal of Biotechnology* Vol 14, April 2015, 241-248
115. Mundt C. C. (1991) Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids: further comments. *Phytopathology* 81: 240 - 242
116. Mwale V. M., Chilembwe E. H. C., Uluko H. C. (2014) Wheat powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*): damage effects and genetic resistance

- developed in wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Research Journal of Plant Science* 5(1): 1 – 16
117. Naik S., Gill K. S., Prakasa R. V. S., Gupta V. S., Tamhankar S. A., Pujar S., Gill B. S., Ranjekar P. K. (1998) Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides* – derived leaf rust resistance gene Lr28 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 535 – 540
 118. Namuco, L. O. Coffman, W. R., Bergstrom, G. C. & Sorrells, M. E. (1987). Virulence spectrum of the *Erysiphe graminis* f. sp. *Tritici* population in New York. *Plant disease* 71, Num 6,539-541
 119. Nawracała J. (2004) Genetyczne podstawy hodowli pszenicy (*Triticum aestivum* L.). W: Górny A. G. (red.). *Zarys genetyki zbóż. Tom 1. Jęczmień, pszenica i żyto*. Wyd. IGR PAN Poznań: 264 – 277
 120. Nocente F., Gazza L., Pasquini M. (2007). Evaluation of leaf rust resistance genes Lr1, Lr9, Lr24, Lr47 and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection. *Euphytica* 55:329–336
 121. Oerke E-C. (2006) Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144:31–43
 122. Oliver R. (2014) A reassessment of the risk of rust fungi developing resistance to fungicides. *Pest Management Science*
 123. Paradis E., Claude J. & Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290
 124. Pardey, P., Beddow, J., Kriticos, D., Hurley, T., Park, R., Duveiller, E., Sutherst, R., Burdon, J. i Hodson, D. (2013) Prawo-wielkości badania rdzy łądygi. *Nauka*, 340, 147–148
 125. Perugini L. D., Murphy J. P., Marshall D., Brown-Guedira G. (2008) Pm37, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 417 - 425
 126. Pietrusińska A. (2010) Wykorzystanie markerów molekularnych do wprowadzania genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) i mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) do pszenicy ozimej. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 256: 31 – 54

127. Pietrusińska A., Czembor J. H. (2014) Struktura wirulencji populacji *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* występującej na terenie Polski w latach 2012-2013. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 274: 15 – 25
128. Pietrusińska A., Czembor J. H. (2015) Piramidyżacja genów – powszechne narzędzie używane w programach hodowlanych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 278: 3 – 16
129. Pietrusińska A., Czembor J. H., Czembor P. Cz. (2011) Pyramiding of two resistance genes for leaf rust and powdery mildew resistance in common wheat. *Cereal Research Communications* 39(4): 577 – 588
130. Pink A. C. D. (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* 124: 227 - 236
131. Pooja, Dhanda Ss., Yadav Nr. (2019). Molecular analysis of Yr genes for yellow rust resistance in bred wheat (*Triticum aestivum* L. em thell). *Bangladesh J. Bot.* 48 (4): 1199 - 1206
132. Prabhu K. V., Singh A. K., Basavaraj S. H., Cherukuri D. P., Charpe A., Gopala Krishnan S., Gupta S. K., Joseph M., Koul S., Mohapatra T., Pallavi J. K., Samsampour D., Singh A., Singh V. K., Singh A., Singh V. P. (2009) Marker assisted selection for biotic stress resistance in wheat and rice. *Indian Journal of Genetics* 69(4): 305 – 314
133. Rachoń L., Szumiło G., Bobryk-Mamczarz A. (2017) Ocena porażenia przez choroby grzybowe wybranych gatunków pszenicy jarej w zależności od intensyfikacji technologii uprawy. *Fragmenta Agronomica* 34(2): 75 – 83
134. Rahaie M, Xue GP, Schenk PM.(2013) The role of transcription factors in wheat under different abiotic stresses. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture.* 2:367-385
135. Rajaram, S., and Van Ginkel, M. (1996). A Guide to the CIMMYT Bread Wheat Section. In wheat special Report, No. 5. Mexico: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT)
136. Ravi P. Singh, Pawan K. Singh, Jessica Rutkoski, David P. Hodson, Xinyao He, Lise N. Jorgensen, Mogens S. Hovmoller., Julio Huerta-Espino (2016) Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. Review in Advance first posted online on June 8

137. Richards R.A.(1984) Glaucouness in wheat, its effect on yield and ralated characteristic in dryland environments and its control by minor genes. In: Sakanoko S. (ed)Proccesings of the 6th Int. Wheat Genetics Symp. Tokyo, Japan: 447-451
138. Richardson K. L., Vales M. I., Kling J. G., Mundt C. C., Hayes P. M. (2006) Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. *Theor. Appl. Genet.* 113: 485 - 495
139. Roelfs, A.P., Singh, R.P. and Saari, E.E. (1992) *Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management.* Mexico, DF: CIMMYT.
140. Ruebenbauer T. (1976) Pochodzenie i użytkowanie pszenicy w ujęciu historycznym. W „*Biologia pszenicy*” red. Strebeyko. PWN, Warszawa
141. Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution.* 3(3):430-439
142. Sayre K.D., Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S. (1998) Genetic progres in reducing losses to leaf rust in CIMMYT- derived Mexican spring wheat cultivars. *Crop Sci.* 38:654-659
143. Schliep K.P. 2011. phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics,* 27(4) 592-593
144. Sehgal S. A., Tahir R. A., Nawaz M. (2012) Molecular Characterization of Wheat Genotypes Using SSR Marker. *International Journal of Bioautomation* 16(2): 119 – 128
145. Shah M. M., Khalid Q., Khan U. W., Shah S. A. H., Shah S. H., Hassan A., Pervez A. (2009) Variation in genotypic responses and biochemical analysis of callus induction in cultivated wheat. *Genetics and Molecular Research* 8(3): 783 – 793
146. Shakra J., Shahzad R., Ahmad S., Fatima R., Zahid R., Anwar M., Zaffar Iqbal M., Wang X.(2020) Role of Genetics, Genomics, and Breeding Approaches to Combat Stripe Rust of Wheat. *Frontiers in Nutrition.*
147. Shao, H. B., Liang, Z. S. & Shao, M. A. (2005) Changes of anti-oxidative enzymes and MDA content under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at maturation stage. *Colloid. Surf. B.* 45, 7–13

148. Sharma P. N., Torii A., Takumi S., Mori N., Nakamura C. (2004) Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. *Hereditas* 140: 61- 69
149. Sharma D, Singh R, Tiwari R, Kumar R, Gupta VK.(2019) Wheat responses and tolerance to terminal heat stress: A review. In: Hasanuzzaman M, Nahar K, Hossain M, editors. *Wheat Production in Changing Environments*. Singapore: Springer; pp. 149-173
150. Sharma-Poudyal, D.; Chen, X.M.; Wan, A.M.; Zhan, G.M.; Kang, Z.S.; Cao, S.Q.; Jin, SL; Morgounov, A.; Akin, B.; Mert, Z.; et al. (2013) Virulence Characterization of International Collections of the Wheat Stripe Rust Pathogen, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Roślina Dis.* 97, 379–386
151. Singh R. P., Huerta-Espino J., Roelfs A. (2002) The wheat rust. In B. C. Cutis, S. Rajarm H., Macherson Bread wheat improvement and production vol. 30 Rome: Plant Production and Protection Series. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Retrieved October 30 2019 from www.fao.org
152. Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Pfeiffer, W., and Figueroa-Lopez, P. (2004). Occurrence and impact of a new leaf rust race on durum wheat in northwestern Mexico from 2001 to 2003. *Plant Dis.* 88, 703–708
153. Stadlmeier M., Nistrup Jørgensen L., Corsi B., Cockram J., Hartl L., Mohler V.(2019) Genetic Dissection of Resistance to the Three Fungal Plant Pathogens *Blumeria graminis*, *Zymoseptoria tritici*, and *Pyrenophora tritici-repentis* Using a Multiparental Winter Wheat Population Genes, Genomes, Genetics.vol. 9 no. 5 1745-1757
154. Stankowski S., Podolska G., Stypuła G. (2001) Wpływ wybranych sposobów ochrony roślin na plon i jakość ziarna odmian pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 218/219: 155–159
155. Swarc J., Kurasiak-Popowska D., Tomkowiak A., Skowrońska R., (2019) Molecular analysis of resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) of selected winter wheat genotypes analyzed in post-registration variety testing. *Progress in Plant Protection* 59 (1): 46-52
156. Świąćicki. W., K., Surma M., Koziara W., Skrzypczak G., Szukała J., Bartkowiak Broda I., Zimny J., Banaszak Z., Marciniak K. (2011) Nowoczesne

Technologie w produkcji roślinnej – przyjazne dla człowieka i środowiska. Polish Journal of Agronomy 7: 102 – 112

157. Szempliński W. (red.), 2012, *Rośliny rolnicze*, Wydawnictwo UWM, Olsztyn
158. Talha M. , Swati , Harsha , Jaiswal, J. P. (2016) Marker assisted detection of underutilized potential *Yr* genes in elite wheat breeding lines. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 48 (3) 309 -317
159. Tan M. Y. A., Hutten R. C. B., Visser R. G. F., van Eck H. J. (2010) The effect of pyramiding Phytophthorainfestans resistance genes *Rpi-mcd1* and *Rpi-ber* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 121: 117 -125
160. Tester M, Langridge P. (2010) Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science.* 327(5967):818-822
161. Tigerstedt, P.M.A (ed.). (1997) *Adaption in plant breeding. Developments in Plant Breeding.* Kluwer Academic Publishers
162. Todorovska, E., Christov, N., Slavov, S., Christova, P., and Vassilev, D. (2009). Biotic stress resistance in wheat-Breeding and Genomic selection implications. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 23, 1417–1426
163. Tomczyńska I., Śliwka J. (2011) Piramidyżacja genów odporności w roślinach uprawnych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 262: 77 – 88
164. Tomkowiak A., Kurasiak-Popowska D., Weigt D., Mikołajczyk S., Nawracała J., Grynia J. (2017) *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* nr 591, 2017, 43–51
165. Trawal A., Walczak F. (2012) Occurrence of more important diseases on winter wheat in Poland 2006–2010. *Annals Universitatis Mariae Curie Skłodowska, Sectio E*, 57 (2): 28–41
166. Trnka M., Rötter R. P., Ruiz-Ramos M., Kersebaum K. C., Olesen J. E., (2014) Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. *Nat. Clim. Chang.* 4: 637–643
167. Tuzun S. (2001) The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 85 - 93

168. Tyrka M., Chełkowski J. (2003) Enhancing the resistance of triticale by using genes from wheat and rye. *J. Appl. Genet.* 45 (3): 283 - 295
169. Uloth, M. B., You, M. P. & Barbetti, M. J. (2016) Cultivar resistance offers the first opportunity for effective management of the emerging powdery mildew (*Erysiphe cruciferarum*) threat to oilseed brassicas in Australia. *Crop Pasture Sci.* 67, 1179–1187
170. Urban S. (2007) Zmiany na polskim rynku zbóż i ich przyczyny. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu* 9(4): 208 – 211
171. Van der Bom F., Magid J., Jensen L. S., (2017) Long-term P and K fertilisation strategies and balances affect soil availability indices, crop yield depression risk and N use. *Eur. J. Agron.* 86:12-23
172. Vanzetti L. S., Campos P., Demichelis M., Lombardo L. A., Aurelia P. R., Vaschetto L. M., Bainotti C. T., Helguera M. (2011) Identification of leaf rust resistance genes in selected Argentinean bread wheat cultivars by gene postulation and molecular markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 14(3): 1 – 14
173. Varshney, R. K., Manhendar, T., Aggarwal, R. K., and Borner, A. (2007). “Genetic molecular markers in plants: development and applications,” in *Genomics-Assisted Crop Improvement: Genomics Approaches and Platforms* Varshney, 1, eds R. K. Varshney and R. Tuberosa (Berlin: Springer), 13–29
174. Wang M, Chen X. Stripe rust resistance. In: Chen X and Kang Z, editors. *Stripe Rust*. Dordrecht: Springer (2017). 353–558
175. Weber R., Zalewski D., Bujak H., Kotowicz L. (2012) Zmienność porażenia odmian pszenicy ozimej na Dolnym Śląsku przez grzyb *Puccinia triticina*. *Progress in Plant Protection* 52(2): 401 – 405
176. Weiss M V. (1987) *Compendium of Wheat Diseases*. St. Paul, MN: APS Press. 2nd ed
177. Wellings, C. R. (2011). Global status of stripe rust: a review of historical and current threats. *Euphytica* 179, 129–141
178. Williams R. M. , O'Brien L. , Eagles H. A. , Solah V. A., Jayasena V. (2008) The influences of genotype, environment, and genotype x environment interaction of wheat quality. *Australian Journal of Agricultural Research* 59(2) 95-111

179. Witkowska K., Śmiałowski T., Witkowski E. (2011) Zależność plonu odmian pszenicy ozimej od stopnia porażenia przez *Stagonospora nodorum* i *Puccinia triticina* w zróżnicowanych warunkach polowych. *Biul. IHAR* 262: 47 - 58
180. Wolf, M. S. (1984). Trying to understand and control powdery mildew. *Plant Pathol*, 33, 451-466
181. Wulff, B.B. H., i Moscou, M. J. (2014). Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes *Front. Plant Sci.* 5:692
182. Zaho J., Fang Y., Chu G., Yan H., Hu L., Huang L. (2020) Identification of Leaf-Scale Wheat Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*) Combining Hyperspectral Imaging and an SVM Classifier. *Plants*, 9(8), 936
183. Zhao J, Wang M, Chen X, Kang Z. Role of alternate hosts in epidemiology and pathogen variation of cereal rusts. *Ann Rev Phytopathol.* (2016) 54:207– 28
184. Zhu, X., Li, Z., Xu, H., Zhou, M., Du, L., and Zhang, Z. (2012) Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Funct. Integr. Genomics* 12, 481–488

10. Spis źródeł internetowych

1. <http://www.stat.gov.pl/>
2. <https://www.cimmyt.org/>
3. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
4. <https://cran.r-project.org/web/packages/gplots/>

11. Spis rysunków

1. Powierzchnia plantacji nasiennych pszenicy w Polsce w latach 2009 – 2021 (wg PIORIN).
2. Prognozowany popyt i tendencje wzrostu plonów pszenicy w kilku scenariuszach.
Źródło www.cimmyt.org

12. Spis rycin

1. Analiza wysokości roślin w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 - (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola). Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego – wysokość roślin
2. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego – wysokość roślin.
3. Histogram rozkładu wartości błędu dla modelu nikowego dla wysokości roślin.
4. Wykres dla porównania średnich wysokości roślin dla uzyskanych mieszańców (kombinacji krzyżówkowych)
5. Analiza porażenia roślin przez mącznika prawdziwego w poszczególnych kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 - (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).
6. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez mącznika prawdziwego.
7. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu nitkowego dla porażenia przez mącznika prawdziwego.
8. Analiza porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 - (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).
9. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż.
10. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu nikowego dla porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż.
11. Analiza porażenia przez rdzę brunatną w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 - (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).
12. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez rdzę brunatną.
13. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu nikowego dla porażenia przez rdzę brunatną.

14. Analiza porażenia przez rdzę żółtą w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).
15. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez rdzę żółtą.
16. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu nikowego dla porażenia przez rdzę żółtą.
17. Analiza porażenia przez septoriozę liści w kombinacjach krzyżówkowych, gdzie: 1 (Henika x Parabola) x (Santa x Hena), 2 - (Santa x Hena) x (Hena x Parabola), 3 – (Parabola x Triso) x (Santa x Hena), 4 - (Triso x Santa) x (Henika x Parabola).
18. Wykres qqPlot dla błędów modelu liniowego dla porażenia przez septoriozę liści.
19. Histogram rozkładu wartości błędów dla modelu nikowego dla porażenia przez septoriozę liści.
20. Macierz dystansu - optymalna liczba klastrów
21. Linie pszenicy jarej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych na podstawie analizy (PCA) pogrupowane zgodnie z metodą Kmeans'a w oparciu o dane markerowe.
22. Linie pszenicy jarej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych na podstawie analizy (PCA) pogrupowane zgodnie z metodą Kmeans'a oparciu o analizę skalowania wielowymiarowego w oparciu o wartości dystansu genetycznego.
23. Linie pszenicy jarej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych na podstawie analizy (PCA) pogrupowane zgodnie z metodą Kmeans'a w oparciu o o analizę DAPC (Discriminant Analysis of Principal Components) z wykorzystaniem danych markerowych. PCA
24. Grupowanie linii w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (PCA)
25. Grupowanie linii w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (PCA)
26. Grupowanie linii w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (PCA).

13. Spis tabel

1. Powierzchnia uprawy, średni plon oraz produkcja pszenicy w Polsce w latach 2009-2018 (wg FAO Statistical Databases, 2020)
2. Komponenty rodzicielskie pszenicy jarej wybrane do krzyżowań w celu otrzymania roślin pokolenia F₁ do dalszych badań.
3. Komponenty rodzicielskie krzyżowane w 2015 roku w celu otrzymania roślin pokolenia F₁ do dalszych badań.
4. Kombinacje złożone wykonane w 2016 roku w celu otrzymania roślin pokolenia F₁ do dalszych badań.
5. Sekwencje starterów użytych w pracy.
6. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic wysokości roślin ze względu na kombinację krzyżowania
7. Wyniki analizy Leven, istotność różnic wysokości roślin ze względu na kombinację krzyżowania
8. Porównanie średnich wysokości roślin dla uzyskanych mieszańców (kombinacji krzyżówkowych).
9. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem mączniakiem prawdziwym ze względu na kombinację krzyżowania.
10. Wyniki analizy Leven, istotność różnic porażeniem mączniakiem prawdziwym ze względu na kombinację krzyżowania.
11. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażenia na brunatną plamistość liści zbóż ze względu na kombinację krzyżowania.
12. Wyniki analizy Leven, istotność różnic porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż ze względu na kombinację krzyżowania.

13. Wyniki analizy Kruskala-Wallisa, istotność różnic porażenia przez brunatną plamistość liści zbóż ze względu na kombinację krzyżowania.
14. Wyniki analizy – test Wilcoxon i porównanie średnich - test Wilcoxon.
15. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem na rdzę brunatną ze względu na kombinację krzyżowania.
16. Wyniki analizy Leven, istotność różnic porażeniem na rdzę brunatną ze względu na kombinację krzyżowania.
17. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem na rdzę żółtą ze względu na kombinację krzyżowania.
18. Wyniki analizy Levene , istotność różnic porażeniem na rdzę żółtą ze względu na kombinację krzyżowania.
19. Wyniki analizy ANOVA, istotność różnic porażeniem na septoriozę liści ze względu na kombinację krzyżowania.
20. Wyniki analizy Levene, istotność różnic porażeniem septoriozą liści ze względu na kombinację krzyżowania.
21. Wyniki analizy Kruskala-Wallisa, istotność różnic porażeniem na septoriozę liści ze względu na kombinację krzyżowania.
22. Wyniki analizy – test Wilcoxon i porównanie średnich.
23. Zestawienie wyników korelacji między badanymi markerami, a odpornością roślin na wybrane choroby grzybowe.
24. Zestawienie liczby linii pszenicy jarej u których zidentyfikowano badane markery molekularne wyprowadzonych z poszczególnych kombinacji krzyżówkowych (mieszkańców).
25. Linie najbardziej odległe genetycznie na podstawie dystansu genetycznego wyprowadzone z poszczególnych kombinacji krzyżowań.
26. Podział wyprowadzonych linii pszenicy jarej na 5 klastrow metodą Kmeans'a w oparciu o dane markerowe z zastosowaniem różnych metod.
27. Wyniki wielowymiarowej molekularnej analizy wariancji MANOVA dla metody I.
28. Komponenty wariancji z analizy MANOVA – Metoda I.
29. Wyniki wielowymiarowej molekularnej analizy wariancji MANOVA dla metody II
30. Komponenty wariancji z analizy MANOVA – Metoda II.
31. Wyniki wielowymiarowej molekularnej analizy wariancji MANOVA dla metody III
32. Komponenty wariancji z analizy MANOVA – Metoda III.