

## Streszczenie prac wykonanych i wyników otrzymanych w 2019 roku

Projekt Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, „Postęp biologiczny” zadanie 50:

**„Zastosowanie konwencjonalnych i molekularnych narzędzi fitopatologicznych w poszukiwaniu źródeł odporności na kiłę kapusty oraz charakterystyka aktualnej populacji patogenu w Polsce”**

### Temat badawczy 1:

#### **Identyfikacja źródeł odporności na kiłę kapusty w polskich i światowych zasobach genowych**

Celem tematu było oznaczenie podatności 200 genotypów na 6 patotypów *Plasmodiophora brassicae*. Oceniono odporność 192 form mieszańcowych rzepaku linii HOLL (IHAR, Oddział Roślin Oleistych w Poznaniu) oraz 8 standardów. Metodyka badań była podobna do opisanej w latach poprzednich, ale testy prowadzono w dwóch powtórzeniach biologicznych, z podziałem na okres wiosenno-letni i okres jesienno-zimowy, w celu porównania wyników otrzymywanych w obu sezonach. W przypadku wszystkich badanych izolatów stwierdzono rozszczepianie się cechy odporności i występowanie form wysoce podatnych, pośrednich i nieporażonych. Liczba poszczególnych form zmieniała się w zależności od genotypu HOLL. Proporcja form odpornych do podatnych wynosi zarówno 1:1, jak również spotykane są wszystkie formy pośrednie, a także formy całkowicie odporne i w pełni podatne.

### Temat badawczy 2:

#### **Identyfikacja i charakterystyka ras *Plasmodiophora brassicae* w Polsce**

W 2019 w wielu rejonach Polski prowadzono monitoring związany z analizą zagrożenia przez *Plasmodiophora brassicae*. Głównie dotyczył on obszarów związanych z intensywną uprawą rzepaku, w tym wybranych rejonów województwa pomorskiego, zachodniopomorskiego, dolnośląskiego, śląskiego, opolskiego, kujawsko-pomorskiego a także lubuskiego. Rejony te, jak ustalono w poprzednich latach, należą do obszarów silnie zagrożonych wystąpieniem kiły kapusty. Identyfikacja patotypów dotyczyła izolatów *P. brassicae* zebranych na terenie Polski w ramach ekspedycji na tereny zgłaszane przez rolników uprawiających rzepak. Wyrósła suszono w temperaturze pokojowej i/lub mrożono. Badania wykonano w komorach szklarniowych z regulacją temperatury, wilgotności i fotoperiodu. Doświadczenie prowadzono w doniczekopaletach na tackach w substracie z dodatkiem kwaśnego torfu. Oznaczenie ras wykonano na standardowym zestawie testowym wg. Somé i in. (2013). Ocenę stopnia porażenia przeprowadzono za pomocą metody LAMP. Badania wykonano także za pomocą biotestów glebowych oraz sekwencjonowania DNA. Wykazano obecność pięciu patotypów, przy czym przeważały i występowały w podobnej proporcji patotypy P1B oraz P3B (po 27%). Patotypy występujące w kolejności to P3A (23%) i P1A (20%). Najrzadziej występował patotyp P2A (3%). Nie stwierdzono polimorfizmu sekwencji w regionach rybosomalnych lecz stwierdzono polimorfizm sekwencji ITS1 i ITS2.

Analiza genetyczna mikrobiomu zawartego w próbkach gleby wykazała ich duże podobieństwo. Stwierdzono, że 97% z 10 milionów odczytów stanowiły bakterie. Najliczniejszą grupę stanowiły *Proteobacteria* (44%), z nich zaś 31% należało do klasy *Alphaproteobacteria*, do rzędu *Rhizobiales*. W obrębie gromady stwierdzono 257 identycznych jednostek taksonomicznych (OTU), w obrębie klasy 356, rzędu 1177, rodziny 945, rodzaju 1260, natomiast identycznych gatunków było aż 3414. Wykazano, że w badanych glebach pojawiały się sekwencje należące między innymi do rodzajów *Bacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, oraz *Arthrobacter*.

### **Temat badawczy 3:**

#### **Przeniesienie odporności na kiłę kapusty z odpornych form *Brassica* do rzepaku i charakterystyka jakości nasion wybranych form mieszańcowych**

Celem tematu było otrzymanie potomstwa F<sub>1</sub> mieszańców międzygatunkowych z krzyżowań wybranych odmian rzepaku ozimego z genotypami o potencjalnej odporności na kiłę oraz wyprowadzenie potomstwa F<sub>1</sub>BC<sub>1</sub>.

Materiał roślinny stanowiły 2 wybrane genotypy z rodziny *Brassicaceae*, tj. *Raphanus sativus* oraz *B. rapa* o podwyższonej odporności na kiłę oraz 4 odmiany rzepaku ozimego (*B. napus* L.) tj. Graf F1, Arsenal, Jet Neuf oraz Californium. Ogółem wykonano 778 krzyżowań oddalonych w 8 kombinacjach. W wyniku tego otrzymano 162 łuszczyny (płodność 21,0%). Przy czym zaznaczyć należy, że wśród tych 8 kombinacji krzyżowań najwyższą płodność odnotowano w krzyżowaniu *B. napus* cv. *Californium* x *B. rapa* (32,4%), a najniższą w kombinacji *B. napus* cv. Arsenal x *Raphanus sativus* (12,8%), dla której otrzymano tylko 11 łuszczyn. W prowadzonych kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (71), średnio 42,2% przy zakresie od 0,0% do 66,6% (Tab. 2). Warto zaznaczyć również, że średnia liczba zarodków izolowanych z 1 łuszczyny była stosunkowo niska i wynosiła 1,0. Efektywność przeprowadzonych krzyżowań wstecznych wyrażona płodnością w przypadku krzyżowanych genotypów była znacznie niższa niż efektywność krzyżowań międzygatunkowych (10,7% i 21,0% odpowiednio). W tym przypadku na cztery przeprowadzone kombinacje krzyżowania, zapylone zostały 272 kwiaty, z czego uzyskano 29 nasion. Oznaczono zawartość włókna, glukozyolanów, tłuszczu i białka w nasionach międzygatunkowych mieszańców pokolenia F<sub>2</sub> otrzymanych z wybranych kombinacji krzyżowań pomiędzy *B. napus* i *B. rapa* oraz *B. oleracea*.

### **Temat badawczy 4:**

#### **Cytogenetyczna analiza mieszańców *Brassica* odpornych na kiłę kapusty (*P. brassicae*)**

Celem prowadzonych badań była identyfikacja chromosomów u gatunków i form mieszańcowych *Brassicaceae*, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sekwencjami chromosomowo i genomowo specyficznymi

W analizach FISH, z wykorzystaniem sekwencji rDNA (5S i 35S rDNA) jako sondy, materiał roślinny stanowiły gatunki: *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus* oraz *Brassica napus*. Wśród analizowanych roślin zidentyfikowano odpowiednio 18, 20, 18 i 38 chromosomów. Zastosowane sondy rDNA pozwoliły na identyfikację wybranych par chromosomów w kariotypie – A1, A10, A3, A5/A6/A9 (pochodzące z genomu *B. rapa*) oraz C4, C7 i C8 (pochodzące z genomu *B. oleracea*). Mapowanie fizyczne sekwencji rDNA wykazało zmienność w liczbie loci sekwencji 5S i 35S rDNA. W obrębie linii *B. napus* obserwowano od 8 do 14 loci 5S rDNA oraz od 9 do 15 loci 35S rDNA. Wśród analizowanych genotypów najczęstszym wzorem był układ 10 loci 5S i 12 loci 35S rDNA. Zmiany w liczbie genów kodujących rybosomalny RNA wynikają najprawdopodobniej z delecji i/lub amplifikacji sekwencji i przeniesienia jej do chromosomów, które nie niosły wcześniej sekwencji rDNA (większa liczba loci niż spodziewana) lub też powstały na skutek delecji locus rDNA w obrębie chromosomu (mniejsza liczba loci niż spodziewana).