

Streszczenie prac wykonanych i wyników otrzymanych w 2020 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”

The use of conventional and molecular phytopathological tools in searching for sources of resistance to clubroot and characterisation of the current pathogen population in Poland

Małgorzata Jędrzycka*¹, Witold Irzykowski¹, Joanna Majka¹, Joanna Kaczmarek¹, Noor Ramzi¹, Janetta Niemann², Agnieszka Wolna-Maruwka², Idzi Siatkowski², Lidia Irzykowska², Marek Korbas³, Ewa Jajor³, Jakub Danielewicz³

¹Institut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań,
*e-mail: mjed@igr.poznan.pl, tel. 61 6550271, tel. kom. 693092660

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ³Instytut Ochrony Roślin - PIB w Poznaniu

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji KS.zb.802.2.2020, zadanie nr 50

Słowa kluczowe: *Brassica*, kiła kapusty, odporność rzepaku, *Plasmodiophora brassicae*

Temat badawczy 1:

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

Celem badań było oznaczenie podatności roślin kapustowatych na wybrane patotypy *P. brassicae*. Oceniono odporność 300 linii, w tym głównie *Brassica* sp., z których większość (218 linii) stanowiły formy mieszańcowe uzyskane w IHAR w wyniku krzyżowania wysokoplennych linii hodowlanych rzepaku skrzyżowanych z odmianą Tosca. Pozostałe formy pochodziły z banków genów (30), część stanowiła materiał mieszańcowy uzyskany w poprzednich latach badań w ramach niniejszego projektu (32), a 14 linii *Brassica* i *Raphanus* pochodziło z Kurdystanu (Irak). Zastosowano 6 genotypów kontrolnych, w tym: odmianę rzepaku Andromeda odporną na kiłę kapusty oraz podatne odmiany rzepaku Architekt, Graf F1 i Harry a także *B. rapa* Bristol i Granaat. Oznaczenia prowadzono w formie testów w doniczkopaletach. W celu wykonania testu odpornościowego poszczególne genotypy wysiano do gleby o pH 5.8. Po upływie 5 dni, do podłoża, w którym rosły młode rośliny w stadium wczesnego rozwoju liścieni dodano inokulum w stężeniu 1×10^7 zarodników *P. brassicae* / mL. Zastosowano 6 patotypów patogenu. Inokulacja każdym z patotypów była przeprowadzona na osobnych tacach dla uniknięcia przenoszenia się zarodników w wodzie. Mnożenie materiału trwało osiem tygodni, a testy inokulacyjne trwały sześć tygodni. Ocenę odporności wykonano w skali 0-4, gdzie 0 oznaczało rośliny zdrowe, natomiast 4 – rośliny z korzeniami całkowicie przekształconymi w wyrośla. Badania prowadzono w szklarni IGR PAN przeznaczonej do testowania odporności roślin na choroby, wyposażonej w kontrolowany komputerowo system sterujący temperaturą i oświetleniem.

Uzyskano formy odporne lub o podwyższonej odporności, jednak były one bardzo nieliczne. Pomimo tego materiał roślinny jest obiecujący; jest on na wczesnych etapach hodowli a cecha odporności rozszczepia. W badanym zestawie formy odporne występowały obok podatnych, a odporność była rasowo-specyficzna. Można ją wykorzystać do piramidyzacji genów odporności, uwzględniając nowo pojawiające się patotypy, np. P9.

Temat badawczy 2:

Identyfikacja i charakterystyka ras *Plasmodiophora brassicae* w Polsce

Celem badań była identyfikacja patotypów 50 izolatów *P. brassicae*, zebranych z terenu Polski oraz molekularna charakterystyka izolatów. Próby roślin i gleby pobrano z terenu 10 województw. Na 35 polach zaobserwowano objawy kiły kapusty na roślinach rzepaku, a na ośmiu polach obecność kiły stwierdzono na podstawie wykonanych biotestów glebowych; w tym przypadku objawy zaobserwowano na roślinach wskaźnikowych (*B. rapa* odm. Granaat). Jedynie na siedmiu polach nie stwierdzono występowania objawów ani na roślinach rosnących na polu, ani też na roślinach wskaźnikowych w bioteście glebowym.

Oznaczenie patotypów wykonano na zestawie testowym wg. Somé. Ocenę stopnia porażenia przeprowadzono także za pomocą metody real time qPCR. W celu scharakteryzowania izolatów pod względem molekularnym ze świeżych wyrosły przygotowano zawiesiny zarodników, z których wyizolowano DNA. Fragmenty DNA powielone metodą PCR wyznakowano fluorescencyjnie, oczyszczono z niewłączonych fluorochromów a następnie zsekwencjonowano w serwisie zewnętrznym. Uzyskane sekwencje zestawiono przy pomocy programów MEGA i Clustal X. Kontynuowano też badania mikrobiomu glebowego w celu poznania składu zbiorowisk mikroorganizmów występujących w ryzosferze roślin rzepaku porażonych przez *P. brassicae*. W badaniach porównano 7 prób gleby ze stanowisk z naturalnym silnym porażeniem roślin rzepaku. W badaniu zastosowano metodę Shotgun w systemie MiSeq Illumina.

Nie stwierdzono polimorfizmu sekwencji w regionach rybosomalnych kodujących podjednostki 5,8S, 18S i 28S. Stwierdzono polimorfizm sekwencji ITS1 i ITS2 pomiędzy izolatami. Wykazano obecność ośmiu patotypów, przy czym przeważały patotypy P1A (32%) oraz P3A (24%). Patotypy występujące w kolejności to P1B (12%) a następnie P2A (10%) i P3B (9%). Najrzadziej występował patotyp P9 (2%); w badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu po raz pierwszy wyodrębniono go w 2020 r. Na roślinach rzepaku z silnymi objawami kiły kapusty najczęściej występował patotyp P1, przy czym 27,3% stanowiły izolaty zdolne do wywołania objawów chorobowych na kiłoodpornych odmianach rzepaku. W mykobiomie glebowym towarzyszącym stanowiskom z rzepakiem porażonym kiłą kapusty najczęściej występowały gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, w tym głównie *F. oxysporum*.

Temat badawczy 3:

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

Celem tematu było wyprowadzenie potomstwa F_1BC_1 z otrzymanych mieszańców międzygatunkowych o potencjalnej odporności na kiłę. Materiał roślinny stanowiły 4 wybrane kombinacje mieszańców, zregenerowane w kulturach *in vitro* w 2019 roku. Wymienione formy krzyżowano wstecznie z 4 odmianami rzepaku (Graf F1, Arsenal, Jet Neuf oraz Californium), które użyto do wyprowadzenia mieszańców. Kastrację poszczególnych odmian rzepaku ozimego wykonywano w stadium wyrosniętego pąka kwiatowego. Zapylenie pyłkiem komponentu ojcowskiego wykonywano bezpośrednio po kastracji. Część zapylnych słupków pozostawiono na roślinach do momentu pełnej dojrzałości łuszczyń. Z pozostałych zapylnych słupków pobierano łuszczyzny w wieku 14 – 19 dni od zapylenia celem izolacji zarodków i ich hodowli w warunkach *in vitro*. Hodowlę *in vitro* izolowanych zarodków prowadzono przy użyciu pożywek White'a, Murashige i Skoog'a bez oraz z modyfikacją Kellera oraz Nisha i Nitsha (H_3). Zregenerowane rośliny, po uprzednim ukorzenieniu na pożywce H_3 sadzono do gleby w doniczkach i przez okres 3 tygodni utrzymywano w

temperaturze 20⁰C. Następnie na 10 tygodni rośliny umieszczano w chłodni (+2⁰C) celem jaryzacji. Po tym czasie rośliny umieszczano w szklarni i doprowadzano do kwitnienia.

Wykonano 200 krzyżowań wstecznych w 4 kombinacjach. W wyniku tego otrzymano 63 łuszczyny. Należy zaznaczyć, że wśród tych 4 kombinacji krzyżowań najwyższą płodność odnotowano w krzyżowaniu wstecznym mieszańca F1 *B. napus* odm. Jet Neuf x *B. rapa* ssp. *pekinensis* x *B. napus* cv. Jet Neuf (44%), a najniższą w kombinacji mieszańca F1 *B. napus* cv. Arsenal x *B. rapa* ssp. *pekinensis* x *B. napus* odm. Jet Neuf (18%), dla której otrzymano tylko 9 łuszczyn. Efektywność przeprowadzonych krzyżowań wstecznych wyrażona płodnością w przypadku krzyżowanych genotypów wyniosła 31,5%. Łącznie na cztery przeprowadzone kombinacje krzyżowania, zapylnych zostało 200 kwiatów, z czego uzyskano 14 nasion. Ze względu na niski procent wiązania łuszczyn lub pojawianie się łuszczyn pustych w czterech kombinacjach krzyżowania wstecznego otrzymano niewielką liczbę prawidłowo rozwiniętych nasion (56).

Analizę jakości nasion wybranych linii mieszańcowych otrzymanych z krzyżowań oddalonych wykonano metodą NIRS. Z czterech kombinacji otrzymanych z krzyżowań pomiędzy *B. napus* i *B. rapa* analizie jakości poddano średnio po 15 linii, dla których analizowano nasiona z 3 pojedynków odnośnie zawartości tłuszczu, białka, glukozynolanów oraz włókna (ADF i NDF). W nasionach potomstw mieszańcowych średnia zawartość tłuszczu wyniosła 36,0%, przy czym najniższą zawartość obserwowano u mieszańców *B. napus* x *B. rapa* 1 (35,63%), a najwyższą (36,85%) odnotowano dla *B. napus* x *B. rapa* 3. Wśród analizowanych roślin mieszańcowych zawartość białka w nasionach wyniosła średnio 24,61%. W obrębie potomstw, które powstały po zapyleniu rzepaku pyłkiem *B. rapa* 2 wystąpiły rośliny, w nasionach których zawartość białka wynosiła 27,45%. Średnia zawartość włókna w nasionach analizowanych potomstw wykazywała zróżnicowanie i skrajne, odnotowane wartości wyniosły od 2,37 (ADF) do 24,75 (NDF). Najniższą średnią zawartość glukozynolanów stwierdzono w nasionach mieszańców *B. napus* x *B. rapa* 3 (18,01 μmol/g s. m. nasion), przy zakresie zmienności tej cechy wśród analizowanych linii wynoszącej odpowiednio 12,93-23,10 μmol/g s. m. nasion. Na podstawie otrzymanych wyników dotyczących jakości nasion można stwierdzić, że badane mieszańce wykazywały duże zróżnicowanie odnośnie analizowanych cech. Stwarza to szansę na możliwość wyselekcjonowania nowych, bardziej wartościowych linii, które w przyszłości przyczynić się mogą do powstania dobrych jakościowo odmian, o podwyższonej odporności na kiłę kapusty.

Temat badawczy 4:

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

Celem badań była identyfikacja chromosomów u gatunków i form mieszańcowych *Brassicaceae*, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sekwencjami chromosomowo i genomowo specyficznymi. Przeprowadzono mapowanie fizyczne sekwencji 5S i 35S rDNA w chromosomach *B. napus*, *B. oleracea* i *B. rapa*. Zastosowane sondy w metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* pozwoliły na określenie całkowitej liczby loci 5S i 35S rDNA. U *B. napus* zaobserwowano od 8 do 12 loci 5S rDNA oraz od 10 do 15 loci 35S rDNA. Najczęściej występującym wzorem było 10 loci 5S rDNA oraz 35S rDNA. Ponadto, na podstawie rozmieszczenia loci rDNA określono liczbę poszczególnych par chromosomów niosących geny rybosomalnego RNA, tj.: A1, A10, A3, A5/A6/A9 (pochodzące z genomu *B. rapa*) oraz C4, C7 i C8 (pochodzące z genomu *B. oleracea*). Największe zróżnicowanie (0-6) obserwowano dla chromosomów typu A1. Całkowity brak zróżnicowania w liczbie chromosomów obserwowano dla chromosomów typu C8. Można przypuszczać, że zmiany w liczbie loci rDNA oraz różnice w liczbie poszczególnych par chromosomowych wynikają z różnego pochodzenia otrzymanych linii – zróżnicowanie form rodzicielskich lub też rearanżacji oddziałujących na siebie genomów