

Projekt Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, zadanie 50:

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

W 2017 roku oceniono odporność 303 linii *Brassica* sp. na kiłę kapusty powodowaną przez pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae*. Spośród badanych linii część (35 genotypów) stanowiła materiał mieszańcowy *Brassica* pokolenia F3 (pochodzący z UP w Poznaniu), a część sprowadzono z banków genów, w tym: *Brassica oleracea*: 223 genotypy, *B. napus*: 34 oraz *B. villosa*: 1. Ponadto wykorzystano 6 form *Brassica* i *Raphanus* z Kurdystanu (Erbil, Irak) oraz genotypy służące jako standardy odporności (3) i podatności (1). Pierwszym etapem pracy było rozmnożenie poszczególnych patotypów patogena, służących do inokulacji. W celu wykonania testu odpornościowego poszczególne genotypy wysiano do gleby o pH 5,8, a następnie po upływie 5 dni siewki znajdujące się w stadium wczesnego rozwoju liścieni inokulowano zarodnikami poszczególnych patotypów *P. brassicae* (P1A, P1B, P2, P3, P4 oraz P5). Po upływie 6 tygodni oceniono odporność roślin. Badania prowadzono w warunkach szklarniowych. Spośród 223 badanych genotypów *B. oleracea* uzyskanych z Brassica Database, Centre for Genetic Resources for Food and Agriculture w Holandii tylko w jednym przypadku (0,45%) znaleziono formę odporną na kiłę kapusty. Był to genotyp *B. oleracea* CGR89 cechujący się odpornością na wszystkie badane patotypy *P. brassicae*, w tym na patotyp P1B, który jest najgroźniejszy dla upraw roślin kapustowatych w Polsce. Jest to pierwszy przypadek znalezienia genotypu *Brassica* odpornego na wszystkie patotypy patogena występujące w Polsce. Genotyp ten zostanie przeznaczony do dalszych badań i do hodowli odpornościowej, prowadzonej we współpracy z UP w Poznaniu.

Uzyskano 50 izolatów *Plasmodiophora brassicae* zebranych z plantacji na terenie północno-wschodniej Polski. Stwierdzono, iż wśród nich występują trzy warianty sekwencji ITS1-5.8s-ITS2, cechujące się polimorfizmem jednego nukleotydu, przy czym dwa warianty opisano we wcześniejszej literaturze zaś jeden nie był dotychczas opisany. Trzema metodami oceniono jakość mikrobiologiczną gleb na 50 polach w woj. warmińsko-mazurskim pod względem przydatności do uprawy rzepaku, w kolejności stosując następujące metody: 1) biotest glebowy, 2) metoda LAMP, 3) metoda Real-Time PCR z sondami TaqMan. Wykazano, iż na badanym terenie uprawa odmian podatnych na kiłę kapusty bez utraty plonu spowodowanego przez tę chorobę możliwa jest tylko na 4% pól, gdy tymczasem takie same warunki dla odmian odpornych spełnia 20% pól. Na 44% pól wystąpiło ryzyko strat plonu wyższych niż 10% przy uprawie odmian podatnych, a uprawa rzepaku była niewskazana na 32% pól. Ustalono, iż 60% badanych izolatów należało do patotypu P1A, podczas gdy aż 40% należało do patotypu P1B, przełamującego wszystkie geny odporności wprowadzone do odmian rzepaku uprawianych w Polsce. Przy zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS) podjęto także pilotażowe badania nad mikrobiomem glebowym towarzyszącym uprawie rzepaku. Na podstawie analizy sekwencji regionów ITS dokonano identyfikacji gatunkowej 60% grzybów mikroskopowych występujących w badanych próbach, natomiast analiza regionu 16S umożliwiła zidentyfikowanie do gatunku 5% wykrytych bakterii.

Uzyskano potomstwo F₁ mieszańców międzygatunkowych z krzyżowań wybranych odmian rzepaku ozimego z genotypami o potencjalnej odporności na kiłę oraz wyprowadzenie potomstwa F₁BC₁. Materiał roślinny stanowiły 2 wybrane genotypy z gatunku *B. rapa* tj. *B. rapa* ssp. *pekinensis* oraz *B. rapa* var. *rapa* (Fodder turnip)

o podwyższonej odporności na kiłę oraz 5 odmian rzepaku ozimego (*B. napus* L.) tj. Anderson, Arsenal, Andromeda, Californium oraz Monolit. W celu otrzymania pokolenia F₁ mieszańców międzygatunkowych w warunkach szklarniowych przeprowadzono kontrolowane zapylenie roślin w 10 kombinacjach krzyżowania, przy czym każdorazowo formy mateczne stanowiły wybrane odmiany rzepaku. Po 14 – 19 dniach od zapylenia pobierano łuszczyzny celem izolacji zarodków i ich hodowli w warunkach *in vitro*. Hodowlę *in vitro* izolowanych zarodków prowadzono zgodnie z metodyką ustaloną przez Wojciechowskiego (1993). Łącznie wykonano 278 zapyleń w 10 kombinacjach. W wyniku tego otrzymano 111 łuszczyzn (płodność 31,6%). Przy czym zaznaczyć należy, że wśród przeprowadzonych kombinacji krzyżowań najwyższą płodność odnotowano w krzyżowaniu *B. napus* cv. Monolit x *B. rapa* var. *rapa* 'Fodder turnip' (88,9%), a najniższą w kombinacjach *B. napus* cv. Arsenal x *B. rapa* var. *rapa* 'Fodder turnip' (0%) dla której nie otrzymano żadnych łuszczyzn. Podobnie jak płodność, tak i plenność była różna w zależności od kombinacji krzyżowania. Średnio ze wszystkich kombinacji krzyżowania zebrano 0,8 nasiona/łuszczyznę. W prowadzonych kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (67), średnio 31,4% przy zakresie od 0,0% do 60,0%. W celu wyprowadzenia potomstwa F₁BC₁, rośliny F₁ z 9 kombinacji mieszańcowych, otrzymane w wyniku krzyżowań prowadzonych w 2016 roku zapylano pyłkiem *B. napus* (odpowiednim dla komponentów matecznych, służących do wyprowadzenia mieszańców). Efektywność przeprowadzonych krzyżowań wstecznych wyrażona płodnością w przypadku krzyżowanych genotypów była wyższa niż efektywność krzyżowań międzygatunkowych (51,8% i 31,6% odpowiednio). W tym przypadku na dziewięć przeprowadzonych kombinacji krzyżowań, zapylnych zostało 191 kwiatów, z czego uzyskano 68 nasion.

Analizę jakości nasion 120 linii mieszańcowych otrzymanych z krzyżowań przeprowadzonych w obrębie 5 kombinacji zapyleń wykonano metodą NIRS (laboratorium Hodowli Roślin Strzelce w Małyszynie). Wykonane analizy form mieszańcowych odnośnie zawartości tłuszczu, białka, glukozyolanów i włókna wykazały wyraźne różnice i duży zakres zmienności w zawartości analizowanych składników. Stwarza to więc szansę wyselekcjonowania nowych, bardziej wartościowych linii, które w przyszłości przyczynić się mogą do powstania dobrych jakościowo odmian, o podwyższonej odporności na kiłę kapusty.

Technikę FISH wykorzystano do identyfikacji chromosomów markerowych (rDNA-FISH) u roślin: *Brassica napus* (2n=4x=38; formuła genomowa AACC), *B. rapa* (2n=2x=20; formuła genomowa AA), *B. oleracea* (2n=2x=18; formuła genomowa CC), *Raphanus sativus* (2n=2x=18; formuła genomowa RR), jak również u form mieszańcowych *B. napus* × *B. rapa*, *B. rapa* × *B. napus* oraz *B. napus* × *B. oleracea*. Zastosowanie sekwencji 5S i 35S rDNA, jako sondy w technice FISH, pozwoliło na rozpoznanie wybranych par chromosomów, tj. chromosomów pary A1, A3 oraz A10 w genomie A oraz chromosomów pary C4, C7 i C8 w genomie C. Na podstawie wyników analizy rDNA-FISH dla wszystkich analizowanych roślin określono liczbę i rozmieszczenie loci rDNA. Wśród analizowanych genotypów *B. rapa* obserwowano cztery wzory rDNA, przy czym jeden z wzorów dominował - 6 loci 5S i 6 loci 35S rDNA. Dla analizowanych form *B. oleracea* otrzymano stałą liczbę loci rDNA – 2 loci 5S rDNA oraz 4 loci 35S rDNA. Natomiast dla trzech analizowanych genotypów *R. sativus* otrzymano stałą liczbę 5S rDNA (4 loci) oraz zmienną liczbę 35S rDNA (4-6 loci). W zestawach chromosomów *B. napus* obserwowano zmienną liczbę zarówno 5S rDNA, jak też 35S rDNA. Najczęściej obserwowany wzór w kariotypie *B. napus* to: 10 loci 5S i 12 loci 35S rDNA. Wśród analizowanych mieszańców *Brassica* zanotowano również zmienną liczbę loci 5S rDNA (8-12 loci) i 35S rDNA (10-14 loci).

Utrata lub uzyskanie dodatkowych loci 5S i 35S rDNA w genomie *B. napus* lub form mieszańcowych *B. napus* × *B. rapa*, *B. rapa* × *B. napus* oraz *B. napus* × *B. oleracea* może wynikać, między innymi, z rearanżacji chromosomowych lub transpozycji w obrębie chromatyny zawierającej sekwencje rDNA. Na podstawie wyników analizy GISH nie stwierdzono rearanżacji międzygenomowych u badanych roślin.