

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 300 genotypów na 6 patotypów *Plasmodiophora brassicae*.

Oceniono odporność 305 form, w tym 302 form *Raphanus* sp. i 3 odmian wzorcowych *Brassica napus* i *B. rapa*. Badania prowadzono w formie testów w doniczkopaletach. Pierwszym etapem testów było rozmnożenie poszczególnych ras patogenu, służących do inokulacji. W celu wykonania testu odpornościowego poszczególne genotypy wysiano do gleby o pH 5.8 a rośliny inokulowano zarodnikami ras P1A, P1B, P2A, P3A, P4A oraz P5A. Ocenę odporności wykonano w skali 0-4. Uzyskane wyniki sumowano a następnie obliczano średnią w stosunku do skielkowanych roślin, a finalnie – średnią odporność danego genotypu. Przeważająca część form *Raphanus* cechowała się odpornością na kiłę kapusty, niemniej jednak zaobserwowano bardzo duże zróżnicowanie rozpiętości średniej skali ocen od całkowitej odporności do całkowitego porażenia przez dany patotyp. Najmniej form wykazało się odpornością w przypadku patotypu P1B (159 form), a najwięcej w przypadku patotypu P5A (285 form). Odporność na patotyp P3A wykazało 267 for *Raphanus* a na patotyp P4A odpornych było 258 form.

Temat badawczy 2:

Identyfikacja i charakterystyka ras *Plasmodiophora brassicae* w Polsce

Dokonano analizy stanu zagrożenia plantacji rzepaku w Polsce kiłą kapusty i stwierdzono, że wiosną 2018 kiła kapusty wystąpiła na licznych stanowiskach. Ta sytuacja była spowodowana korzystnymi dla rozwoju choroby warunkami wilgotnościowymi oraz temperaturowymi występującymi jesienią 2017 roku podczas wzrostu i rozwoju siewek i młodych roślin rzepaku. W wielu rejonach wilgotność gleby była w tym czasie wysoka, co sprzyjało znacznemu porażeniu roślin. Warunki agroklimatyczne panujące jesienią 2018, w tym głównie susza trwająca przez cały okres letni, nie sprzyjały terminowym zasiewom i równym wschodom rzepaku. Podczas monitoringu upraw pierwsze objawy infekcji przez *P. brassicae* obserwowano dopiero pod koniec października i dotyczyły one w pierwszej kolejności samosiewów odmian pozbawionych genów odporności na kiłę kapusty. Na stanowiskach, gdzie nie wysiewano odmian rzepaku o podwyższonej odporności kiła kapusty wystąpiła później niż w poprzednich latach i w znacznie niższym nasileniu.

W 2018 roku pobrano z terenu Polski 54 próby roślin i gleby. Badania dotyczyły głównie obszarów północnej i południowej Polski, tj. województwa zachodniopomorskiego, warmińsko-mazurskiego, pomorskiego oraz dolnośląskiego i opolskiego. Rejony te należą do obszarów intensywnej uprawy rzepaku i jednocześnie silnie zagrożonych wystąpieniem kiły kapusty. Badaniem objęto także część Wielkopolski i Polski centralnej (woj. łódzkie). Zastosowano metodyki badawcze podobnie jak w latach ubiegłych tj. próby ziemi (2 kg

z każdego pola) pobierano próbnikiem glebowym Kosiady-Spychalskiego, stosując 10 nakłuć na pole. W badanych próbach wykazano obecność siedmiu patotypów *P. brassicae*, przy czym przeważały i występowały w podobnej proporcji patotypy P1A (24%) oraz P3A (25%). Patotypy występujące w kolejności to P1B (13%) i P4A (12%). Najrzadziej stwierdzano występowanie patotypu P5A. Podobnie jak w roku ubiegłym na najsilniej porażonych polach przeważał patotyp P1. Obecność *P. brassicae* w badanych próbach potwierdzono analizą Real time PCR. Około jedna piąta izolatów (22%) *P. brassicae* przełamywało odporność występującą w odmianie 'Mendel'. Geny odporności obecne w tej odmianie są więc umiarkowanie przydatne w hodowli odpornościowej rzepaku w Polsce.

Nie stwierdzono żadnego polimorfizmu sekwencji w regionach rybosomalnych, w regionach kodujących 5,8S, 18S i 28S. Stwierdzono polimorfizm sekwencji ITS1 i ITS2 pomiędzy izolatami, nie przystający do podziału na patotypy, w oznaczeniach prowadzonych metodą Somé. Polimorfizm w badanych 50 izolatach polegał na delecji/insercji pojedynczych nukleotydów. Jeden z wariantów sekwencji zdecydowanie dominował obejmując 54% izolatów podczas gdy drugi wariant obejmował 39% izolatów, a trzeci jedynie 7% izolatów. W mikrobiomie glebowym stwierdzono występowanie gatunków grzybów i bakterii stosowanych w kontroli biologicznej patogenów roślin, a także liczne inne niż *P. brassicae* patogeny, np. grzyby rodzaju *Fusarium*.

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 F₁ mieszańców międzygatunkowych z krzyżowań wybranych odmian rzepaku ozimego z genotypami o potencjalnej odporności na kiłę oraz wprowadzenie potomstwa F₁BC₁.

Materiał roślinny stanowiły 3 wybrane genotypy z gatunku *B. rapa* o podwyższonej odporności na kiłę oraz 4 odmiany rzepaku ozimego (*B. napus* L.) tj. Anderson, Arsenal, Californium oraz Jet Neuf. Wykonano 421 krzyżowań oddalonych w 12 kombinacjach. Otrzymano 139 łuszczyń (płodność 33,0%). Najwyższą płodność odnotowano w krzyżowaniu *B. napus* cv. *Californium* x *B. rapa* var. *rapa* fodder turnip Jobe (86,9%), a najniższą w kombinacji *B. napus* cv. Jet Neuf x *B. rapa* ssp. *trilocularis* (0%), dla której nie otrzymano żadnych łuszczyń. Podobnie jak płodność, tak i plenność była różna w zależności od kombinacji krzyżowania. W prowadzonych kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (90), średnio 41,8% przy zakresie od 0,0% do 94,1%. Efektywność przeprowadzonych krzyżowań wstecznych wyrażona płodnością w przypadku krzyżowanych genotypów była wyższa niż efektywność krzyżowań międzygatunkowych (40,1% i 33% odpowiednio). W tym przypadku na sześć przeprowadzonych kombinacji krzyżowań, zapylnych zostało 132 kwiaty, z czego uzyskano 45 nasion. Analizę jakości nasion 100 linii mieszańcowych otrzymanych z krzyżowań oddalonych pod względem zawartości tłuszczu prowadzono metoda Soxhleta i NIRS. Analizę zawartości białka, glukozyolanów i włókna wykonano metodą NIRS. W nasionach analizowanych potomstw mieszańcowych zakres zmienności badanych cech był duży, a średnia zawartość tłuszczu, białka, włókna i glukozyolanów różniła się pomiędzy liniami.

Temat badawczy 4:

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

Celem prowadzonych badań była identyfikacja chromosomów markerowych u form mieszańcowych *Brassica*, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sekwencjami markerowymi dla chromosomów *Brassica*.

W analizach FISH, z wykorzystaniem sekwencji rDNA (5S i 35S rDNA) jako sondy, materiał roślinny stanowiły różne odmiany *B. oleracea*. Wśród analizowanych 120 genotypów, u 119 roślin potwierdzono obecność 18 chromosomów w komórkach somatycznych, tylko u jednej linii obserwowano wyższą liczbę chromosomów. Zastosowane sondy rDNA pozwoliły na identyfikację wybranych par chromosomów w kariotypie – C4 (niosący locus 5S rDNA), C7 i C8 (niosące loci 35S rDNA). Mapowanie fizyczne sekwencji rDNA wykazało zmienność w liczbie loci tych sekwencji. Wśród analizowanych genotypów obserwowano pięć różnych wzorów rDNA: 2 loci 5S rDNA i 4 loci 35S rDNA (najczęstszy wzór), 2 loci 5S rDNA i 5 loci 35S rDNA; 2 loci 5S rDNA i 6 loci 35S rDNA, 2 loci 5S rDNA i 3 loci 35S rDNA oraz 3 loci 5S rDNA i 3 loci 35S rDNA. Zmiany w liczbie sekwencji 35S rDNA wynikają najprawdopodobniej z amplifikacji sekwencji i przeniesienia jej do chromosomów, które nie niosły wcześniej sekwencji rDNA (większa liczba loci niż spodziewana) lub też powstały na skutek delekcji locus rDNA w obrębie chromosomu (mniejsza liczba loci niż spodziewana).