

Zadanie badawcze nr 50

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

W ramach zadania badawczego 50 realizowano następujące cztery tematy: 1) Identyfikacja źródeł odporności na kiłę kapusty w polskich i światowych zasobach genowych. 2) Identyfikacja i charakterystyka ras *Plasmodiophora brassicae* w Polsce. 3) Przeniesienie odporności na kiłę kapusty z odpornych form *Brassica* do rzepaku i charakterystyka jakości nasion wybranych form mieszańcowych. 4) Cytogenetyczna analiza mieszańców *Brassica* odpornych na kiłę kapusty.

Celem prac prowadzonych na wstępie projektu było znalezienie źródła odporności na kiłę kapusty w materiałach w obrębie rodzaju *Brassica*. W 2014 roku – zgodnie z harmonogramem – oceniono odporność 300 genotypów *Brassica* sp. na rasy P1A, P1B, P2-P5. Znaczną część pracy poświęcono namnożeniu materiału inokulacyjnego, z podziałem na poszczególne rasy patogenu. Badania prowadzono w specjalistycznych szklarniach i komorach fitotronowych do pracy z patogenami, znajdujących się w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii (WCZT). Badany materiał stanowiły głównie materiały uzyskane z Krajowych Roślinnych Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie (łącznie 295 genotypów), w tym *B. rapa*, *B. juncea* oraz licznie reprezentowana kolekcja *B. oleracea*. Ponadto w badaniach uwzględniono trzy zagraniczne ekotypy *B. rapa* oraz dwa wzorce odporności: odmiany ‘Mendel’ i ‘Tosca’. W ramach niniejszego doświadczenia każdy genotyp *Brassica* wysiano do gleby w sześciu osobnych pojemnikach, z których każdy przeznaczono do badania oddzielnej rasy patogenu. Po upływie 5 dni od wysiewu, nowo rozwijające się siewki w stadium BBCH09, zainokulowano zarodnikami poszczególnych ras *P. brassicae*. Każda tura namnażania materiału standardowo trwała przez okres 8 tygodni, a test inokulacyjny prowadzono przez 6 tygodni. Po upływie tego czasu wykonywano ocenę odporności badanego materiału w skali 0-4. Uzyskane wyniki sumowano a następnie obliczano średnią w stosunku do skiełkowanych roślin, a finalnie – średnią odporność danego genotypu. Badany materiał był w przeważającej większości podatny lub bardzo podatny na porażenie przez *P. brassicae*, bez wyraźnego zróżnicowania reakcji na poszczególne rasy patogenu. Szczególnie podatne okazały się genotypy *B. oleracea* oraz *B. juncea*, mniej podatne, pośrednie lub odporne były genotypy *B. rapa*. Odmiany wzorcowe cechowała odporność na rasy P1A, P2-P5 i podatność na rasę P2B. na podobnym poziomie kształtowała się odporność ekotypów *B. rapa* j-1, *B. rapa* j-2 oraz *B. rapa* ekotyp 08.006169.

Kolejnym celem badań było oznaczenie przynależności do ras *P. brassicae* prób pochodzących z naturalnego porażenia roślin w warunkach polowych. Próby te zbierano samodzielnie z losowo wybranych pól rzepaki lub pozyskiwano od rolników uprawiających rzepak. W 2014 roku z terenu Polski uzyskano 55 izolatów *P. brassicae*, po czym oceniono porażenie wywoływane przez te izolaty na roślinach testowych i oznaczono ich przynależność do ras patogenu. Izolaty pochodziły z porażonych roślin rzepaku (30) oraz prób gleby (25). W celu pobrania materiału roślinnego oraz prób gleby wykonano pięć ekspedycji terenowych. Objęły one tereny województw: dolnośląskiego, kujawsko-pomorskiego, małopolskiego, pomorskiego, śląskiego, warmińsko-mazurskiego, wielkopolskiego i zachodniopomorskiego.

Pobrano materiał roślinny zastosowano do inokulacji na podatnych roślinach testowych. Rasy patogenu identyfikowano wyłącznie z izolatów uzyskanych z pojedynczych wyrosli korzeniowych. Badania te prowadzono na standardowych genotypach testowych, w tym 15 genotypach ECD, 3 genotypach wzorcowych INRA, 2 genotypach wzorcowych z Niemiec oraz 10 odmianach rzepaku. W wyniku procedury badawczej polegającej na namnażaniu badanego materiału wyłącznie z niewielkich fragmentów pojedynczych wyrosli na korzeniach rzepaku uzyskano izolaty reprezentujące poszczególne rasy patogenu. Ich przynależność do poszczególnych ras kształtowała się następująco: rasa P1 – 29 izolatów (52,7%) , P2 – 2 (3,6%), P3 – 20 (36,4%), P5 – 4 izolaty (7,3%).

W 2014 roku zespół badawczy z IGR PAN opanował także metodę ilościowego PCR zgodnie z opisem podanym przez Wallenhammar i in. (2012). Metodą tą oceniono 50 prób gleby, w tym 35 prób pochodzących z różnych lokalizacji w Polsce oraz 15 prób zawierających różne stężenia zarodników patogenu, które posłużyły do wyznaczenia krzywej wzorcowej. Przy zastosowaniu metody qPCR oceniono 50 prób gleby, w tym 35 prób pochodzących z różnych lokalizacji w Polsce oraz 15 prób zawierających różne stężenia zarodników patogenu, które posłużyły do wyznaczenia krzywej wzorcowej. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono rekomendacje dla poszczególnych typów gleb, zgodnie z metodą skandynawską. Większość testowanych gleb pochodzących głównie z południa Polski była bezpieczna dla uprawy odmian rzepaku cechujących się odpornością na kiłę kapusty. Na 9,7% gleb przy uprawie odmian podatnych ryzyko strat plonu przewyższało 10%. W przypadku 3,2% gleb zalecono rezygnację z uprawy rzepaku ze względu na bardzo wysokie stężenie zarodników patogenu.

Na podstawie metodyki własnej przy współpracy z firmą Novazym, która dysponuje specjalistyczną aparaturą oraz programem do projektowania starterów, opracowano unikalną metodę detekcji zarodników *P. brassicae*, przy zastosowaniu amplifikacji DNA w warunkach izotermicznych z wykorzystaniem starterów zapętlających (LAMP). Celem badań było opracowanie szybkiego, taniego i niezawodnego sposobu wykrywania patogenu w materiale roślinnym, glebie i wodzie. Do detekcji wykorzystano polimerazę GspSSD, wyodrębnioną z bakterii *Geobacillus* sp., umożliwiającą zastępowanie nici DNA bez potrzeby zmiany profilu temperatury. Na obecnym etapie rozpracowano metodę detekcji zawiesiny zarodników *P. brassicae*. Ekstrakcję DNA z wyrosli na korzeniach wykonano z zastosowaniem zmodyfikowanej metody CTAB. Reakcję prowadzono przez 60 minut w temperaturze 62°C. Wyniki zbierano przy zastosowaniu systemu CFX96 Real Time PCR Detection System (BioRad) oraz amplifikatora Genie II użyczonego przez firmę Novazym. Opracowana metoda LAMP była łatwa do wykonania, szybka, dokładna i niezależna od wieku badanej rośliny. Opracowany test był mniej czuły aniżeli metoda ilościowego PCR; umożliwił wykrywanie 5 zarodników w 1 µL zawiesiny. W zależności od wielkości pobranej próby i stopnia jej zanieczyszczenia sygnał w detekcji metodą LAMP miał zróżnicowaną siłę, lecz zawsze detekcja do oznaczonego progu dawała wynik pozytywny. Pomimo mniejszej czułości metoda LAMP była znacznie łatwiejsza do wykonania i zdecydowanie tańsza, co czyni ją przydatną do detekcji *P. brassicae* w przypadku konieczności oceny jego obecności w licznych próbach polowych (rośliny, gleba, woda).

Badania prowadzone na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu poświęcono przeniesieniu genów odporności na kiłę z genotypów posiadających te geny do rzepaku. Materiał roślinny stanowiły 3 genotypy diploidalnego gatunku *B. rapa* ssp. *pekinensis* ($2n=AA=20$ chromosomów) tj. dwa genotypy zidentyfikowane jako nosiciele odporności, tj. j-1 i j-2 i ekotyp 08.006169 sprowadzony z Banku Genów w Wellesbourne, Anglia oraz 3 genotypy allopoloidalnego *B. napus* tj. odmiany 'Californium' i 'Monolit' oraz męskosterylna linia MS-8 ($2n=AACC=38$ chromosomów). Pomędzy wyżej wymienionymi formami wykonano krzyżowania zwrotne w warunkach szklarniowych. Po 12 – 17 dniach od zapylenia pobierano łuszczyzny celem izolacji zarodków i ich hodowli w warunkach *in vitro*. Hodowlę *in vitro* izolowanych zarodków prowadzono przy użyciu czterech pożywek tj. White'a (W), Murashige i Skoog'a (MS), MS w modyfikacji Kellera (MS_k) oraz Nisha i Nitsha (H_3) zgodnie z metodyką opracowaną przez Wojciechowskiego (1993). Ogółem wykonano 1228 krzyżowań w 12 kombinacjach. W wyniku tego otrzymano 660 łuszczyzn (płodność 53,7%). Przy czym zaznaczyć należy, że wśród tych 12 kombinacji krzyżowań najwyższą płodność odnotowano w krzyżowaniu *B. rapa* ssp. *pekinensis*, ekotyp 08.006169 x *B. napus* 'Monolit'(68,1%), a najniższą w kombinacji *B. napus* 'Monolit' x *B. rapa* ssp. *pekinensis*, ekotyp 08.006169 (28,6%). Podobnie jak płodność, tak i plenność była różna w zależności od kombinacji krzyżowania. Średnio dla wszystkich kombinacji krzyżowania obserwowano 3,1 nasion/łuszczyne. W prowadzonych kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (708), średnio 87,2% przy zakresie od 75,0% do 123,8%.

Celem badań, była także cytogenetyczna charakterystyka uzyskanych form mieszańcowych *Brassica*, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* ze znanymi i nowymi sekwencjami markerowymi dla chromosomów *Brassica*. Metoda rDNA-FISH została użyta do identyfikacji chromosomów u 250 genotypów mieszańców *Brassica napus* i form rodzicielskich, niosących loci 5S i 35S rDNA, a także określenia zmienności w liczbie i dystrybucji loci rDNA (= wzór loci rDNA) w chromosomach markerowych. Przy użyciu metody FISH, dla każdego badanego genotypu określano liczbę chromosomów, liczbę chromosomów kompletnych i zrekombinowanych – jeśli występowały – oraz liczbę chromosomów markerowych. Przeprowadzona analiza potwierdziła wcześniejsze wyniki analizy rDNA-FISH/BAC-FISH, uzyskiwane dla naturalnie otrzymanych i syntetycznych mieszańców *B. napus*, wykazując zmienność we wzorze loci rDNA pomiędzy badanymi roślinami w obrębie odmian oraz pomiędzy mieszańcami; chromosomy jednego z genomów rodzicielskich u mieszańców *B. napus* śledzono przy wykorzystaniu sekwencji genomowo specyficznej (BAC-FISH). Analiza rDNA-FISH/BAC-FISH umożliwiła identyfikację homologów chromosomów niosących podstawowe, proksymalne i przytelomerowe loci 5S rDNA (chromosomy typu I, II i V - genom A oraz typu IV - genom C) oraz homologów chromosomów niosących loci 35S rDNA, zlokalizowane w przewężeniu wtórnym, proksymalnym i przytelomerowym (chromosomy typu I, II i VIII - genom A oraz typu VI i VII - genom C). W jądrach komórek syntetycznych mieszańców *B. napus* obserwowano 10–12 sygnałów 5S rDNA, przy czym przeważały rośliny z 10 sygnałami 5S rDNA. Liczba loci 35S rDNA była zmienna i obserwowano 12–14 sygnałów; przeważały komórki posiadające 12 sygnałów 35S rDNA.

Przeprowadzone badania wykazały, że wśród 15 badanych mieszańców *B. napus* odnotowano 6 różnych wzorów loci rDNA, a oczekiwany wzór liczby i dystrybucji sygnałów rDNA (10 loci 5S rDNA, 12 loci 35S rDNA, w tym 6 chromosomów z kolokalizacją obu rodzajów rDNA; w skrócie 10/12) obserwowano u 66,5% badanych allotetraploidów. 11 sygnałów 5S rDNA i 13 sygnałów 35S rDNA obserwowano u 6,7% mieszańców *B. napus*, podobnie jak wzory: 12/14, 10/14, 10/13 i 11/13. Zmienione wzory loci rDNA występowały z częstotliwością 6,7%, ale razem stanowiły 33,5% obserwowanych wzorów loci rDNA, u których odnotowano 7 przemian typów chromosomów. Zmiana jednego typu chromosomu występowała u wszystkich badanych mieszańców *B. napus*. Spośród obserwowanych typów chromosomów *Brassica*, to pochodzące z genomu A chromosomy typu II (40%) ulegały najczęstszym przekształceniom strukturalnym (addycje loci rDNA), w tym 100% przekształceń dotyczyło jednoczesnej amplifikacji sygnałów 5S i 35S rDNA. Pozostałe przekształcenia stanowiły 60% i dotyczyły chromosomów genomu C (chromosomy typu IV i VII - 66,6%) oraz chromosomów genomu A (chromosomy typu VIII - 33,4%). Wykorzystanie techniki rDNA-FISH/BAC-FISH do monitorowania chromosomów markerowych w genomach mieszańców *B. napus* pozwoliło ustalić, że allotetraploidalne mieszańce *B. napus* o podobnych wzorach loci rDNA i stabilnej liczbie chromosomów genomu C (18 sygnałów) charakteryzowały się różną odpornością na *P. brassicae*. Potwierdzono występowanie zmienności w liczbie i dystrybucji loci 5S i 35S rDNA pomiędzy badanymi genotypami allotetraploidalnych mieszańców *B. napus*; wzór loci rDNA u mieszańców międzyrodzajowych *B. napus* nie zawsze wynikał bezpośrednio z wzoru obecnego w genomach roślin ancestralnych. Brak lub pojawienie się nowego sygnału dla loci rDNA w genomach mieszańców *B. napus* może wynikać z rearanżacji chromosomowych lub transpozycji w obrębie chromatyny zawierającej sekwencje rDNA. Na tym etapie badań nie wykazano zależności pomiędzy zwiększoną liczbą homologów chromosomu typu II (formy *B. napus* 'ECD06' i 'ECD09'), a podwyższoną odpornością roślin na kiłę kapusty. Brak też wystarczających dowodów na potwierdzenie zależności pomiędzy trisomią homologów chromosomu typu IV lub VII (genom C), stabilną liczbą homologów chromosomu typu II (4), a podwyższoną odpornością roślin na kiłę kapusty. Obserwowane u badanych roślin *B. napus* przemiany liczbowe i strukturalne chromosomów wskazują na niestabilność genomów obu gatunków ancestralnych, przy czym genom A charakteryzował się znacznie wyższą frekwencją przemian chromosomów markerowych.

Badania objęte niniejszym projektem prowadzone są w Instytucie Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, Instytucie Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu oraz w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Publikacje:

Kaczmarek J., Irzykowski W., Burzyński A., Jędrzycka M., 2014. The detection of *Plasmodiophora brassicae* using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification. Acta Agrobotanica 67 (4): 59-66.