

Zastosowanie konwencjonalnych i molekularnych narzędzi fitopatologicznych w poszukiwaniu źródeł odporności na kiłę kapusty oraz charakterystyka aktualnej populacji patogenu w Polsce – MRiRW zadanie badawcze 50, sprawozdanie za rok 2016

W ramach poszukiwania źródeł odporności na kiłę kapusty, wywoływaną przez pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae* w 2016 roku oceniono odporność 310 form *Brassica*, pochodzących z: Banku Genów IPK w Gatersleben, Niemcy (47 form), Brassica Database, Centre for Genetic Resources w Holandii (130), Banku Genów w Saskatoon, Kanada (109), Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (20) oraz własnej kolekcji form o znanej odporności (4). Znaleziono 20 genotypów cechujących się odpornością rasowo-specyficzną (*B. oleracea* – 12, *B. rapa* – 7, *B. napus* – 1). Materiały wykazujące odporność poddano jarowizacji i procesowi rozmnażania. Po ponownym wykazaniu ich odporności planowane jest jej przeniesienie do rzepaku i wykorzystanie w procesie hodowlanym oraz badania nad istotą tej odporności.

W celu scharakteryzowania aktualnej populacji patogenu wywołującego kiłę kapusty na rzepaku w Polsce przeprowadzono testy odpornościowe z wykorzystaniem 50 izolatów *P. brassicae*. Na ich podstawie wykazano, że 38% izolatów, w tym 22% z patotypu P1 oraz 16% z patotypu P3 przełamało odporność występującą w cv. 'Mendel' – pierwszej odmianie rzepaku odpornej na kiłę kapusty. Zsekwencjonowano fragmenty ITS1-5,8S-ITS2 22 izolatów *P. brassicae*. Nie stwierdzono żadnego polimorfizmu sekwencji w regionach rybosomalnych – całym 5,8S oraz uzyskanych fragmentach 18S i 28S. Niewielki polimorfizm występował w sekwencjach ITS1 i ITS2, lecz tylko częściowo pokrywał się z podziałem na patotypy.

W celu otrzymania pokolenia F₁ mieszańców międzygatunkowych z krzyżowań wybranych odmian rzepaku ozimego z *Brassica rapa* oraz wyprowadzenie potomstwa F₁BC₁. Materiał roślinny stanowiły 2 wybrane genotypy z gatunku *B. rapa* tj. *B. rapa* ssp. *dichotoma* CR 2301/99 i *B. rapa* ssp. *pekinensis* oraz 2 genotypy zidentyfikowane jako nosiciele odporności. Wymienione wyżej formy użyte były w krzyżowaniach z 4 odmianami *B. napus* tj: Roxete, Exocet F₁, Walery oraz Hybrirock. Pokolenie F₁ mieszańców międzygatunkowych uzyskano w warunkach szklarniowych przez kontrolowane zapylenie roślin w 16 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 opisaną przez Wojciechowskiego (1993). Wykonano 1047 krzyżowań oddalonych w 16 kombinacjach. Otrzymano 169 łuszczyzn; średnia płodność badanych form wynosiła 16,14%. W przeprowadzonych kombinacjach krzyżowań najwyższą płodność odnotowano dla form mieszańcowych *B. napus* cv. Walery × *B. rapa* ssp. *dichotoma* CR2301/99 (44,23%). Także plenność uzależniona była od kombinacji krzyżowania. Średnio zebrano 1,9 nasion/łuszczyznę. W prowadzonych kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (96), średnio 82,05% przy zakresie od 0,0% do 125%.

Dla wyprowadzenia potomstwa F₁BC₁, rośliny F₁ z 6 kombinacji mieszańcowych, otrzymane w wyniku krzyżowań prowadzonych w 2015 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 (25,51% i 16,14% odpowiednio). W tym przypadku na sześć przeprowadzonych kombinacji krzyżowań, zapyłone zostały 392 kwiaty, z czego uzyskano 156 nasiona.

Analizę jakości nasion 200 linii mieszańcowych otrzymanych z krzyżowań przeprowadzonych w obrębie 30 kombinacji zapyleń w latach 2015 i 2014 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.

Przeprowadzono cytogenetyczną charakterystykę uzyskanych form mieszańcowych *Brassica napus*, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* ze znanymi i nowymi sekwencjami markerowymi dla chromosomów *Brassica*. Metodę rDNA-FISH zastosowano do identyfikacji chromosomów u 250 genotypów mieszańców *Brassica napus* pokolenia F₉, niosących loci 5S i 35S rDNA, a także określenia zmienności w liczbie i dystrybucji loci rDNA (= wzór loci rDNA) w chromosomach markerowych. W bieżącym roku kontynuowano analizy rDNA-FISH u mieszańców *B. napus*, a dotychczas przeprowadzona analiza potwierdziła wcześniejsze wyniki analizy rDNA-FISH/BAC-FISH, uzyskiwane dla naturalnie otrzymanych i syntetycznych mieszańców *B. napus*, wykazując powtarzalną zmienność we wzorze loci rDNA pomiędzy badanymi roślinami w obrębie linii oraz pomiędzy genotypami; 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 8–11 sygnałów 5S rDNA, przy czym przeważały rośliny z 10 sygnałami 5S rDNA. Liczba loci 35S rDNA była zmienna i obserwowano 10–13 sygnałów; przeważały komórki posiadające 12 sygnałów 35S rDNA. Przeprowadzone badania wykazały, że wśród 25 badanych genotypów *B. napus* odnotowano 5 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 większości badanych allotetraploidów. Brak lub pojawienie się nowego sygnału dla loci rDNA w genomach mieszańców *B. napus* wskazują na niestabilność genomów obu gatunków ancestralnych, przy czym genom A, podobnie jak donoszą dane literaturowe i badania własne Zespołu, charakteryzuje się wyższą frekwencją przemian chromosomów markerowych, w porównaniu do genomu C. Technologia EDF umożliwiła wykorzystanie sekwencji genu *Crr1* do mapowania fizycznego, co w dalszej kolejności pozwoli na precyzyjną analizę pozostałych genów odporności wśród wybranych genotypów *Brassica* w przyszłości.