

Sprawozdanie z realizacji projektu HOR hn-801-8/14 - zadanie badawcze nr 50

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

Celem badań jest identyfikacja źródeł odporności na kiłę kapusty powodowaną przez pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae* i przeniesienie jej z odpornych form do rzepaku, a następnie charakterystyka jakości nasion wybranych form mieszańcowych oraz ich stabilności genetycznej. Ponadto badania zmierzają do scharakteryzowania patotypów patogenu, występujących na terenie Polski.

W 2015 roku wykonano 1800 analiz, dzięki którym oceniono odporność 300 genotypów *Brassica* sp. na sześć patotypów patogena (P_{1A} , P_{1B} , P_2 , P_3 , P_4 , P_5). Materiał stanowiły głównie materiały uzyskane z Centralnej Kolekcji Roślinnych Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie (130 genotypów, numery kolekcyjne z zakresu 162001 do 174985), formy *Brassica* sprowadzone z firmy AGRIPOLIS (100, głównie *B. oleracea*) oraz genotypy rzepaku *B. napus* z kolekcji Stacji Hodowli Roślin Strzelce Oddział w Borowie (HWGJ01-HWGJ50). Wzorem ubiegłego roku w badaniach uwzględniono trzy zagraniczne ekotypy *B. rapa* oraz dwa wzorce odporności: odmiany ‘Mendel’ i ‘Tosca’. Badania prowadzono w szklarni IGR PAN oraz w Centrum Uprawy Roślin IGR PAN (warunki kontrolowane). Zastosowano metodykę opracowaną w poprzednim roku sprawozdawczym. Polegała ona na tym, iż każdy genotyp *Brassica* wysiewano do gleby w osobnych pojemnikach, z których każdy przeznaczono do badania oddzielnej rasy patogenu. Po upływie 5 dni od wysiewu nasion, nowo rozwijające się siewki w stadium BBCH09 inokulowano przy zastosowaniu zawiesiny zarodników poszczególnych ras *P. brassicae*. Każda tura namnażania materiału standardowo trwała przez okres ośmiu tygodni, a test inokulacyjny przez okres sześciu tygodni. Po upływie tego czasu wykonywano ocenę odporności badanego materiału. Uzyskane wyniki sumowano a następnie obliczano średnią w stosunku do skiełkowanych roślin, a finalnie – średni stopień podatności danego genotypu.

Uzyskane wyniki wskazują na większą podatność badanych genotypów w stosunku do form testowanych w ubiegłym roku sprawozdawczym. W 2015 roku wzorce (odmiany ‘Mendel’ i ‘Tosca’, a także genotypy B j-1, Bj-2 oraz Br 09.006.169) były bardziej odporne od większości form sprowadzonych z CKRZG. Niektóre genotypy dostarczone do badań z HR Strzelce wykazały znaczny stopień odporności na porażenie przez *P. brassicae*, przy czym odporność ta dotyczyła określonych patotypów. Genotypy WHGJ 42 oraz WHGJ 45 były odporne na trzy patotypy jednocześnie (P_1 , P_2 oraz P_5). Genotyp WHGJ 44 był odporny na patotypy P_1 oraz P_5 , genotyp WHGJ 41 był odporny na patotypy P_3 i P_5 , natomiast genotyp WHGJ 43 był odporny na patotypy P_4 oraz P_5 . Ponadto trzy genotypy WHGJ 25, 27 oraz 42 były odporne na jeden patotyp, odpowiednio P_1 , P_2 oraz P_5 . A zatem, spośród 50 genotypów przekazanych do badań osiem (16%) charakteryzowało się odpornością, w tym 4% na 3 patotypy, a po 6% na dwa patotypy lub jeden patotyp. Tylko nieliczne materiały z CKRZG były mniej podatne na *P. brassicae*. Odporność znajdowana w materiałach kolekcyjnych *Brassica* najczęściej miała charakter rasowo-specyficzny (odporność na jedną lub kilka ras łącznie).

W 2015 roku, zespół IOR-PIB w Poznaniu prowadził obserwacje porażenia roślin rzepaku przez *P. brassicae* i pobierał próby gleby do dalszych badań szklarniowych (biotest). Słabe uwilgotnienie gleby, pomimo sprzyjających dla infekcji wartości temperatur, było przyczyną zahamowania rozwoju sprawcy kiły kapusty. W związku z tym nie obserwowano, tak licznych infekcji, jak w latach poprzednich. Rośliny rzepaku z objawami kiły kapusty znaleziono na 6 spośród 17 wizytowanych plantacji (35,3%). Łącznie pobrano 16 prób roślin i 28 prób gleby. W szklarniach IOR-PIB wykonano test biologiczny wg standardowej metodyki, opisanej w poprzednim sprawozdaniu. Dodatkowe 6 prób porażonych roślin pochodziło z kilku plantacji w województwie dolnośląskim (wyjątkowo silne porażenie rzepaku na trzech sąsiadujących ze sobą polach uprawnych). W tym przypadku biotest prowadzono w komorach CUR, według identycznej metodyki. Łącznie oceniono porażenie 22 prób roślin oraz 28 prób gleby. Obecność patogenu stwierdzono w 17 spośród 28 badanych gleb (61%) Z porażonych roślin wyprowadzono po 2 izolaty patogenu. Każdorazowo reprezentowały one tę samą rasę. Łącznie przetestowano 48 prób. Wykazano, że patotyp P₁ dominował na północy Polski, natomiast patotyp P₃ – na południu Polski (klasyfikacja wg Somé).

Gleby do analiz zbierane wiosną przez zespół z IGR PAN pochodziły z plantacji rzepaku na północy Polski (województwo zachodnio-pomorskie i pomorskie) a następnie późnym latem i wczesną jesienią próby dwukrotnie pobrano w województwie warmińsko-mazurskim. Rejony te należą do najbardziej zagrożonych kiłą kapusty. W tym przypadku testowanie na obecność *P. brassicae* wykonano przy zastosowaniu metod molekularnych (qPCR oraz LAMP), zgodnie z metodyką szczegółowo opisaną w poprzednim sprawozdaniu. Wyniki qPCR zbierano przy zastosowaniu systemu CFX96 Real Time PCR Detection System (BioRad), natomiast wyniki LAMP odczytywano na amplifikatorze Genie II używanym przez firmę Novazym.

Pierwotniak *P. brassicae* występował w glebach pobranych ze wszystkich regionów Polski. Na podstawie analizy z wykorzystaniem metod LAMP i qPCR stwierdzono, iż 40% gleb jest bezpiecznych dla uprawy rzepaku lub bezpiecznych dla uprawy form odpornych na kiłę kapusty, natomiast pozostałe 60% gleb to tereny, na których uprawa rzepaku jest ryzykowna, ze względu na straty plonu nasion. Przy pomocy metod molekularnych stwierdzono zatem, że pierwotniak *P. brassicae* jest obecny w 80% gleb, na których uprawiany jest rzepak. Na 30% gleb ryzyko silnego porażenia roślin rzepaku uznano za tak znaczne, iż powinny być tam uprawiane jedynie odmiany odporne na kiłę kapusty. Metodami molekularnymi wykazano obecność materiału genetycznego *P. brassicae* w naturalnym stawie śródpolnym oraz w rowie melioracyjnym w okolicy pola, na którym występowały rośliny rzepaku z silnymi objawami porażenia przez *P. brassicae*.

Celem trzeciego tematu badawczego było przeniesienie genów odporności na kiłę z genotypów odpornych do rzepaku. Materiał roślinny stanowiły trzy genotypy *B. rapa* ssp. *pekinensis*, w tym dwa zidentyfikowane jako nosiciele odporności oraz wybrane genotypy z *B. rapa* i *B. oleracea*, które wg. systemu ECD wykazywały podwyższoną odporność na porażenie przez *P. brassicae*. Wymienione wyżej formy użyte były w krzyżowaniach zwrotnych z pięcioma odmianami *B. napus* (Jet Neuf, Lisek, Californium, Hybrirock i Graff F₁).

Pomiędzy 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 zgodnie z metodyką ustaloną przez Wojciechowskiego (1993). Ogółem wykonano 1035 krzyżowań w 30 kombinacjach. W wyniku tego otrzymano 486 łuszczyzn. Wśród tych 30 kombinacji krzyżowań najwyższą płodność odnotowano w krzyżowaniu *B. napus* cv. Hybrirock × *B. rapa* ssp. *pekinensis*, ekotyp 08.006169 (83,3%), a najniższą w kombinacji *B. napus* cv. Hybrirock × *B. oleracea* ssp. *alboglabra* (13,6%). Podobnie jak płodność, tak i plenność była różna w zależności od kombinacji krzyżowania. Średnio ze wszystkich kombinacji krzyżowania obserwowano 1,8 nasion/łuszczyznę. W prowadzonych kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (311), średnio 47,4% przy zakresie od 0,0% do 133,3%.

W celu otrzymania pokolenia BC₁, rośliny F₁ z 12 kombinacji mieszańcowych, uzyskane w wyniku krzyżowań prowadzonych w 2014 zapylano pyłkiem *B. napus* (odpowiednim dla komponentów matecznych, służących do wyprowadzenia mieszańców). Efektywność przeprowadzonych krzyżowań wstecznych wyrażona płodnością była niższa niż efektywność krzyżowań zwrotnych (16,9% i 46,9 % odpowiednio). W tym przypadku na dwanaście przeprowadzonych kombinacji krzyżowań, zapylnych zostało 1505 kwiatów, z czego uzyskano 339 nasion.

Analizę jakości nasion z roślin potomnych pokolenia F₂ otrzymanych z międzygatunkowych krzyżowań *B. napus* z *B. carinata* i *B. rapa* ssp. *pekinensis* odnośnie zawartości tłuszczu, białka, glukozyolanów i włókna wykonano metodą NIRS. W nasionach analizowanych mieszańcowych roślin z kombinacji krzyżowania *B. napus* × *B. carinata* i *B. napus* × *B. rapa* ssp. *pekinensis*, średnia zawartość tłuszczu wyniosła od 35,1% (mieszańce z *B. carinata*) do 44,2% (mieszańce z *B. rapa* ssp. *pekinensis*). Najwyższy procent tłuszczu, wynoszący 45,3% stwierdzono u mieszańca pochodzącego z kombinacji krzyżowania *B. napus* × *B. carinata*. Wśród analizowanych roślin mieszańcowych zawartość białka w nasionach wyniosła średnio od 20,7% do 23,8%. W obrębie potomstw, które powstały po zapyleniu rzepaku pyłkiem gorczycy wystąpiły rośliny, w nasionach których zawartość białka przekraczała 24%. Zawartość dwóch typów włókna tj. ADF i NDF w nasionach analizowanych potomstw wykazywała duże zróżnicowanie, wahające się od 17,3 do 31,5% (odpowiednio ADF i NDF). Najniższą zawartość glukozyolanów stwierdzono w nasionach mieszańców *B. napus* × *B. rapa* ssp. *pekinensis* (nr. polowy 128 – średnio 16,11 μmol/g s. m. nasion), przy zakresie zmienności tej cechy wśród analizowanych linii wynoszącej odpowiednio 9,15-76,36 μmol/g s. m. nasion.

Uzyskane formy mieszańcowe *Brassica napus* scharakteryzowano pod względem cytogenetycznym przy wykorzystaniu metody FISH 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. W bieżącym roku kontynuowano analizy rDNA-FISH u mieszańców *B. napus*, a dotychczas przeprowadzona analiza potwierdziła wcześniejsze wyniki analiz rDNA-FISH/BAC-FISH,

uzyskiwane dla naturalnie otrzymanych i syntetycznych mieszańców *B. napus*. Badania wskazały na dalszą 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, obserwowano 12–14 sygnałów; przeważały komórki posiadające 12 sygnałów 35S rDNA. Przeprowadzone badania wykazały, że wśród 25 badanych mieszańców *B. napus* odnotowano 3 różne wzory 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, podobnie jak 11 sygnałów 5S rDNA i 13 sygnałów 35S rDNA. Wzór 12/14 (5S rDNA/35S rDNA) występował u kilku 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 tych obserwowanych w genomie C.

Artykuły w prasie branżowej

Jedryczka M., Kaczmarek J. 2015. Kiła kapusty pod LAMPami. Top Agrar 2: 120–123.

Kaczmarek J., Jedryczka M. 2015. Epidemia kiły kapusty. Rzepak w opałach. Przedsiębiorca rolny. Agrotechnika, czerwiec 2015.

Streszczenia

Jedryczka M., Kaczmarek J., Czubatka A., Marzec-Schmidt K. (2015). Sondy Taqman, LAMP, biotesty – wysokoczuła detekcja, badania przesiewowe i testy przydatne rolnikom do wykrywania *Plasmodiophora brassicae* w glebie. XXI Konferencja krajowa „Grzyby mikroskopowe i ich metabolity”, Poznań, 15-16 kwietnia 2015. Streszczenia: 26. *Prezentacja ustna (M. Jedryczka)*

Kaczmarek J., Burzyński A., Jedryczka M. (2015). Zastosowanie metody LAMP do oceny występowania pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae* w glebach rolniczych. 55 Sesja Naukowa IOR-PIB, Poznań, 12-13 lutego 2015. Streszczenia: 81. *Plakat*

Kaczmarek J., Jedryczka M. (2015). Incidence of *Plasmodiophora brassicae* and the composition of its races in soils in Poland. Microbial diversity 2015. The challenge of complexity. Abstract book: 258. *Plakat*