

## Zadanie 49

### **„Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia *Brassicaceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny”**

(prof. nadzw. dr hab. inż. Michał Starzycki)

Celem zadania było wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro*, poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez groźne dla rzepaku patogeny: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Temat realizowano w trzech zadaniach: 1/ Wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro* oraz wykorzystanie technik klonowania *in vitro* i *in vivo* dla otrzymania roślin mieszańców międzygatunkowych. 2/ Poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. 3/ Badania odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych i donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., a także analizy DNA dla roślin mieszańcowych.

Do krzyżowań międzygatunkowych (1) wykorzystano preselekcjonowane na odporność dotychczas nie stosowane genotypy roślin matecznych i ojcowskich (opis gatunków poniżej) oraz gatunki pokrewne o zróżnicowanych genotypach, które były już stosowane w pracy (różne odmiany botaniczne). W badaniach wykorzystano następujące gatunki podstawowe: kapustę brukselską *B. oleracea* var. *gemmifera*  $2n = 18$  (CC), kapustę pastewną *B. oleracea* var. *acephala*  $2n = 18$  (CC), kapustę jarmuż *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *Lacinista*  $2n = 18$  (CC), oraz *B. campestris* o liczbie chromosomów  $2n = 20$  (AA), *B. carinata*  $2n = 34$  (BBCC), *B. nigra*  $2n = 16$  (BB), *B. juncea*  $2n = 36$  (AABB). Do krzyżowań wypierających zostały użyte otrzymane w ubiegłych latach mieszańce alloplazmatyczne - międzygatunkowe z cytoplazmą *B. oleracea* i *B. campestris* oraz mieszańce z cytoplazmą rzepaku *B. napus* (AACC). Po osiągnięciu przez rośliny fazy kwitnienia krzyżowano je tak, aby otrzymane potomstwo posiadało cytoplazmę genotypów wcześniej selekcjonowanych pod względem odporności na porażenie przez patogeny z rodzaju *Alternaria* i *Leptosphaeria*. W obrębie powyższych form wykonano 21 udanych przekrzyżowań łącznie 50, z których wypreparowano 178 żywych zarodków. Obecnie rozklonowano 50 nowych genotypów w warunkach *in vitro* i *in vivo* w kulturach hydroponicznych oraz w glebie.

Podczas wykonywania powyższych prac zaobserwowano następujące zależności. Pierwszą była stosunkowo dobra wydajność otrzymanych embrionów mieszańcowych, a druga związana była z małymi preparowanymi stadiami embrionalnymi, bardzo często globularnymi – białymi, które nie podjęły wzrostu na pożywkach agarowych. Kolejny raz stwierdzono, że najbardziej prawdopodobną przyczyną zamierania małych zarodków mieszańców międzygatunkowych mogły być genotypy mateczne i ojcowskie (tzw. genotypy odporne) użyte do krzyżowań. Klonowane otrzymane mieszańce międzygatunkowe bardzo dobrze ukorzeniają się w kulturach hydroponicznych, a następnie bez strat (zamierania) przyjmują się w warunkach glebowych.

Celem zadania badawczego 2/ było poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* (*B. oleracea*, *B. campestris*, *B. napus*), odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Prace wykonano w warunkach polowych. Każdy obiekt oceniany był (IP, indeks porażenia) na podstawie obserwacji 40 roślin w 3 lub 4 powtórzeniach (120 roślin). Wyniki indeksu porażenia przez *Leptosphaeria* sp. oraz

*Alternaria* sp. poszczególnych form zapisano tabelarycznie w taki sposób aby formy odporne w rankingu występowały pod koniec zapisu. Badania odporności rzepaku były prowadzone w warunkach polowych w miejscowościach: Małyszyn, Borowo (HR Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR) i Bąków (HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR). Na podstawie badań odporności indywidualnie ocenianych pod względem chorób (*Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.) roślin donorowych z plemienia *Brassicae*, wyselekcjonowano najodporniejsze z doświadczeń w celu piramidyzacji rezystencji. Końcową ocenę odporności dokonano przed zbiorem ponieważ wcześniejsze bonitacje nie wykazały porażeń. Sprawdzone odporne genotypy zostaną użyte do krzyżowań międzygatunkowych jako formy ojcowskie. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono: genotypy rzepaku oraz grupy odmian charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Rody i odmiany rzepaku, u których zaobserwowano wyższą rezystencję stanowią potencjalny materiał do dalszych badań związanych z hodowlą mieszańców międzygatunkowych odpornych na alternariozę oraz i suchą zgniliznę kapustnych.

Celem zadania badawczego 3/ było badanie odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych oraz donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Wykonano analizy DNA dla roślin mieszańcowych. Rośliny – (wybrane) siewki mieszańcowe testowano in vitro testem Williamsa na porażenie powodowane przez najgroźniejsze patogeny grzybowe: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., stadium konidialne *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. Dla stwierdzenia czystości gatunkowej użytych w testach grzybów stosowano metodę sekwencjonowania DNA ITS1 oraz NGS, a przynależność gatunkową określano z banku genów przy pomocy programu NCBI/BLAST. Siewki mieszańców międzygatunkowych przebadano również pod względem odporności na *Alternaria* sp. tą samą metodą z użyciem kultur in vitro. Po zastosowaniu metody kaleczenia łodyg i inokulacji patogenami wyselekcjonowano odporne rośliny donorowe do dalszych badań nad odpornością poligeniczną. Ponadto otrzymane potomstwo pochodzące z mieszańców międzygatunkowych posłużyło do badań mechanizmów odporności wybranych roślin na poziomie DNA wspólnie z gatunkami podstawowymi stosowanymi do krzyżowań. Do powyższych badań użyto sprawdzonych markerów molekularnych typu RAPD (OPW 04 oraz PO7). Wybrany starter (P07-A) amplifikujący fragment DNA 2500 pz okazał się korelacyjnie (dodatkowo) związany z odpornością badanych roślin. Najbardziej obiecującym gatunkiem, który może być donorem genów „R” na chorobotwórcze grzyby *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. jest *B. taurica* oraz *B. oleracea* jarmuż. Po przeprowadzonych badaniach odporności siewek przy użyciu testu Williamsa można było wskazać genotypy odporniejsze zarówno na porażenie powodowane przez: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Przedstawiona metoda jest nieskomplikowana, może być stosowana na dużą skalę zarówno w badaniach genetycznych oraz w hodowli form odpornych rzepaku. Odrębne badania odporności dotyczyły roślin, które rosły w zbliżonych warunkach do naturalnych. Warunki naturalne stymulują w wielu przypadkach elicytory. Po zastosowaniu nowej metody „kaleczenia łodyg” i inokulacji wybranymi patogenami, wyselekcjonowano odporne rośliny donorowe do dalszych badań nad odpornością poligeniczną. Tego typu rośliny stanowią najlepszy materiał genetycznej odporności do dalszych prac nad odpornością rzepaku na groźne patogeny.