



Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia *Brassiceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny

Sprawozdanie z realizacji zadania 49 na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2019 roku

Michał Starzycki, Elżbieta Starzycka-Korbas, Magdalena Gawłowska
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Poznaniu
Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych
e-mail: m.starzycki@ihar.edu.pl lub e.starzycka-korbas@ihar.edu.pl



Cel badań - harmonogram

- Wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką in vitro oraz wykorzystanie technik klonowania in vitro i in vivo dla otrzymania roślin mieszańców międzygatunkowych.
- Poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassiceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.
- 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. Analizy DNA dla roślin mieszańcowych.

Ad. 1. Wyniki udanych krzyżowań (wykonano 50) i otrzymanie zarodków mieszańców międzygatunkowych in vitro w 2018 r. i klonów in vivo.

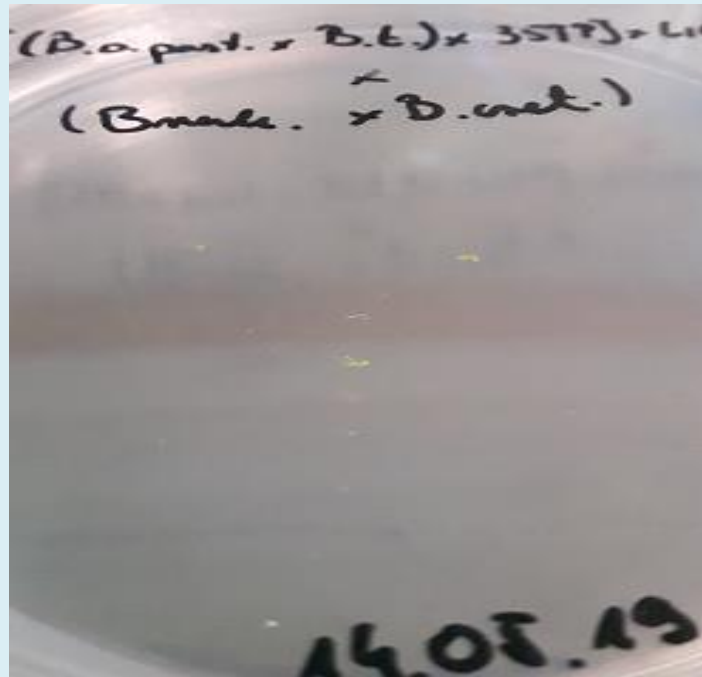
Genotyp matczyń (pochodzenie)	Genotyp ojcowski (pochodzenie)	Liczba preparowanych zarodków	Liczba rozklonowanych roślin w kulturach hydroponicznych
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	5	8
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	5	
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	0	
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	4	
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	10	
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	8	
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	4	8
Bruk. x B. n	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	4	
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	6	
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	5	
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	4	
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	4	
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	5	8
(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	2	
(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	6	
(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	5	
(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	7	
(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	4	
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	9	10
B. taur. x B.n.	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	14	
B. taur. x B.n.	[(B.o.pastewna x B. taurica) x 33TP] x 34TP/04	15	
B. cret. x B.n.	(Bo brukselka) x (B. cretica)	3	
B. cret. x B.n.	(Bo brukselka) x (B. cretica)	2	
[(B.o. past. x B. L.) x 35TP] x LiClassic	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	12	
[(B.o. past. x B. L.) x 35TP] x LiClassic	(Bo bruk) x (B. cretica) odp. na ki/110/18	17	3
(B.n.CMS x B.j.) x B.n.z	67 (Roki x 42) x (40 x Liek) xRoki	7	
SUNMA		167	
			50

Podsumowanie i wnioski do Ad. 1.

Użycie do hodowli in vitro pożywek pozbawionych antybiotyków oraz zastosowanie powierzchniowej osłony medium dla zarodków, pozwoliło na zachowanie ich możliwości wzrostowych i mniejszego procentu ich zamierania. Najbardziej prawdopodobną przyczyną zamierania bardzo małych zarodków mieszańców międzygatunkowych mogą być genotypy mateczne i ojcowskie użyte do pierwszych krzyżowań.

Potwierdzono przydatność kultur hydroponicznych oraz użytej po nich gleby pozwoliło na otrzymanie wyższego procentu żywych roślin mieszańców międzygatunkowych.

Lp.	Mierniki do Ad. 1.	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.1	- Liczba krzyżowań wybranych gatunków z plemienia <i>Brassicae</i>	50	50
1.2.	Liczba otrzymanych roślin mieszańcowych po rozklonowaniu materiału tylko z udanych krzyżowań	50	50



Lp.	Tab. 6. Indeksy Porażenia siewek mieszańców i odmian na porażenie powodowane przez <i>Leptosphaeria</i> sp. i <i>Alternaria</i> sp. in vitro 2 testy (Williamsa 2019) (miernik 2 testy).	IP Porażenie przez <i>Leptosphaeria</i> sp.	IP Porażenie przez <i>Alternaria</i> sp.
21A	70 Amazon x295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek Mon x MEN/19	0,383	0,350
22A	87 Monoli/18 x ORIOLUS (26C/16) xMEN37A/17 x (77 jar)	0,083	0,200
23A	85 Oriolus38A/18295x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) x (79 bc/19)	0,200	0,217
24A	85 xOriolus38A/18 MENDEL (10D/16) x 79b	0,150	0,433
25A	71 295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) xMEN23A/17xAmaz/18 x On/19	0,100	0,167
26A	69 301 x Digo/06 p.(Choryśka x Bn)xCalif (3D/16)xMEN21A/17x Amazon/18 xMen	0,300	0,200
27A	78 Bazali/18 x 297/06 p.(Jar x B.n.) x Calif (13D/16) xAmazon	0,250	0,567
28A	70 Amazon x 78 bt	0,683	0,800
29A	70 Amazon x 82 bt	0,433	0,717
30A	82 Basali/18 x 420/08 38B.t. x B.n./3 (17D/16) xMEN33A/17 x Amazon	0,067	0,283
31A	70 Amazon x295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek Mon x MEN/19	0,400	0,317
32A	87 Monoli/18 x ORIOLUS (26C/16) xMEN37A/17 x (77 jar)	0,250	0,133
33A	85 Oriolus38A/18295x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) x (79 bc/19)	0,250	0,217
34A	85 xOriolus38A/18 MENDEL (10D/16) x 79bt	0,200	0,717
35A	71 295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) xMEN23A/17xAmaz/18 x On/19	0,200	0,567
36A	69 301 x Digo/06 p.(Choryśka x Bn)xCalif (3D/16)xMEN21A/17x Amazon/18 xMen	0,100	0,050
37A	78 Bazali/18 x 297/06 p.(Jar x B.n.) x Calif (13D/16) xAmazon	0,117	0,100
38A	70 Amazon x 78 bt	0,533	0,633
39A	70 Amazon x 82 bt	0,533	0,617
40A	82 Basali/18 x 420/08 38B.t. x B.n./3 (17D/16) xMEN33A/17 x Amazon	0,333	0,483

Leptosphaeria maculans (Desm.) Ces. et de Not., i *Alternaria* sp. Przynależność gatunkową określano z banku genów przy pomocy programu NCBI/BLAST. (katalog M. Starzycki 2019 r.)

Ad. 2. Poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassiceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Małyszyn 2019.

Tab. 2.

L.p.	Obiekty badane na <i>Leptosphaeria</i> sp.	IP sr. z 3 powt.	Gr. jed.
6	77 297/06 p.(Jar x MEN31A/18	0,03800	A
14	69 301 x(Choryśka x Bn)xMEN21A/17x Amazon/18	0,02600	AB
8	79 420/08 38B.t. x Bazali/18	0,02500	AB
5	87 Mon/18 x OR xMEN/18	0,02500	AB
19	70 Amazon	0,01900	ABC
16	78 Bazali/18 x (Jar x B.n.) xMEN31A/18	0,01300	BC
3	68 Men/18	0,01300	BC
17	70 Amazon x B.n.	0,007000	BC
22	Monoli Wz	0,007000	BC
10	81 420/08 38B.t. x B.n.xMEN31A/17 x Bazali/18	0,007000	BC
1	67 Men x sMEN/18	0,007000	BC
4	68 MEN x Or 38A/18	0,007000	BC
11	85 Oriolus38A/18	0,007000	BC
13	86 MEN/18 x Tau x B.n./10xMEN35A/17	0,0000	C
15	86 MEN/18 x (10D/16) xOriolus38A/18	0,0000	C
2	70 Amazon x (Br. X Bn)	0,0000	C
7	85 Oriolus38A/18 x (Br. X Bn) xMEN23A/18	0,0000	C
18	78 Bazali/18 x 38B.t. x B.n. xMEN31A/18	0,0000	C
9	85 B.n.x Oriolus 38A/18 x MEN (10D/16)	0,0000	C
20	82 Basali/18 x 38B.t. x B.n. xMEN33A/18	0,0000	C
21	Monoli Wz	0,0000	C
12	71 295 x 645TP/06 x Bc xMEN23A/17xAmazon/18	0,0000	C

Tab. 3.

L.p.	Obiekty badane na <i>Alternaria</i> sp.	Wyniki sr. z 3 powt.
OB	70 Amazon x B.n.	0,038
21A	85 Oriolus38A/18	0,044
24A	70 Amazon	0,050
35A	67 Mon x 68MEN/18	0,056
36A	81 420/08 38B.t. x B.n.xMEN31A/17 x Bazali/18	0,056
39A	77 297/06 p.(Jar x MEN31A/18	0,056
29A	78 Bazali/18 x (Jar x B.n) xMEN31A/18	0,056
33A	85 Oriolus38A/18 x (Br. X Bn) xMEN23A/18	0,063
34A	78 Bazali/18 x 38B.t. x B.n. xMEN31A/18	0,063
38A	70 Amazon x (Br. X Bn)	0,069
40A	68 Men/18	0,069
OB	69 301 x (Choryśka x Bn)xMEN21A/17x Amazon/18	0,069
26A	87 Mon/18 x OR xMEN/18	0,075
31A	79 420/08 38B.t. x Bazali/18	0,075
32A	82 Basali/18 x 38B.t. x B.n. xMEN33A/18	0,075
37A	Monoli	0,075
22A	71 295 x 645TP/06 x Br. xMEN23A/17xAmazon/18	0,075
23A	86 MEN/18 x Tau x B.n./10xMEN35A/17	0,081
25A	Monoli	0,081
27A	68 MEN x Or 38A/18	0,088
28A	85 B.n.x Oriolus 38A/18 x MEN (10D/16)	0,088
30A	86 MEN/18 x (10D/16) xOriolus38A/18	0,088

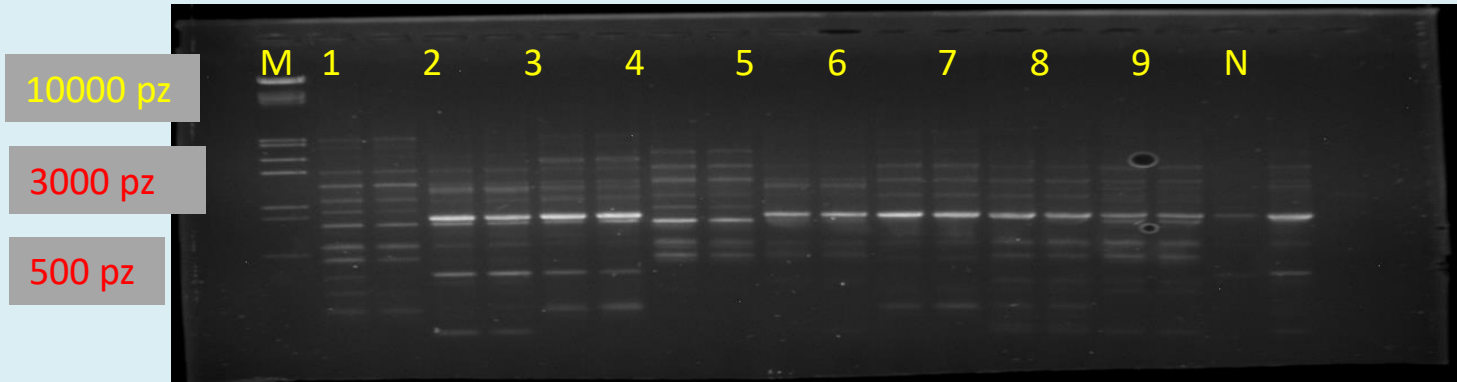
Tab. 2. i 3. Wyniki odporności mieszańców międzygatunkowych wyrażone Indeksami Porażenia dla *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. Wykonano bonitację dla 3 powtórzeń. W pierwszym terminie po kwitnieniu i następnie po 2 tygodniach nie obserwowano porażen. Porażenia zidentyfikowano dopiero przed zbiorem. 4 obserwacje i **4 ekspedycje**. Tab. 4. i 5. Wybrane najbardziej odporne genotypy rzepaku ozimego (doświadczenie DW2) oceniane Indeksami Porażenia dla *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. Wysoce istotne statystycznie różnice pomiędzy obiektami, średnia z trzech miejscowości: Małyszyn, Borowo i Bąków, po analizie wariancji i zastosowaniu testu Duncana) w 2019 r. 4 obserwacje odporności w 3 miejscowościach - **4 ekspedycje**. 1 do Małyszyna, 1 do Borowa, 2 ekspedycje do Bąkowa ze względu na możliwość wcześniejszego pojawu chorób.

Wnioski do Ad. 2.

Podczas prowadzenia badań nad odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. oraz odmian rzepaku odnotowano pewien procent roślin, u których porażenie było na niskim poziomie. Coroczna selekcja i wybór najodporniejszych form, pozwoli na piramidację odporności u *B. napus*. Wyniki odporności poziomej (poligenicznej) rzepaku posiadają charakter naukowy oraz aplikacyjny dla rolnictwa wskazując, które odmiany lub rody, najważniejszej rośliny olejistej Polski, są odporniejsze na groźne patogeny grzybowe do których zaliczamy *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp.

Ad. 3. Do badań wykorzystano siewki mieszańców międzygatunkowych, które testowano in vitro testem Williamsa na porażenie powodowane przez najgroźniejsze dla rzepaku patogeny grzybowe: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., i *Alternaria* sp. Mieszańce w stadium przed jaryzacją inokulowano metodą zakażenia łodyg. Dla stwierdzenia czystości gatunkowej użytych w testach grzybów stosowano metodę sekwencjonowania DNA ITS1, a przynależność gatunkową określano z banku genów przy pomocy programu NCBI/BLAST.

Tab. 7. Mieszańce międzygatunkowe odporne na <i>Leptosphaeria</i> sp. i <i>Alternaria</i> sp. inokulowane metodą zakażenia łodyg (rośliny donorowe 2 testy in vivo – mierniki)	Liczba roślin	<i>Leptosphaeria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
[(B.o. past. x B. L.) x 33TP] x 34TP	13	0	1 roś. – 1
B. taur. x B.n.	18	0	1 roś. – 1
B. cret. x B.n.	10	0	0
(Bruk. x B. n.) x B. cret.	1	0	0
(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)	15	1 roś. – 2	2 roś. – 1
Bruk. x B. n	27	0	0
[(B.o.jar. x B.L.) x B.o. SL.]	11	3 roś. – 1	1 roś. – 1
Bruk. x B. cret.	12	0	0
[(B.o. past. x B. L.) x 35TP] x LiClassic	11	1 roś. – 1	0
(Bruk. x B. n.) x (B.n.CMS x B.j.)	1	0	0
B. o. jar. x B. campestris	1	0	0
(Choryńska x B.n.)	6	3 roś. – 2	0
(Choryńska x B.n.) x [(B.n.CMS x B.j.) x B.n.z]	4	1 roś. – 2	0
(kap.biała x bruk.) x B. campestris	3	2 roś. – 2 , 1 roś. – 1	0
Rzodkiew czarna	3	0	0
[(kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.)] x C. nero	5	0	0
[(B.n. CMS x B.n.) x B.n.z] x (B.o.jar. x B. camp.)	16	5 roś. – 2 , 5 roś. – 1	0
(B.n.CMS x B.j.) x B.n.z	3	1 roś. – 2 , 1 roś. – 1	1 roś. – 1
B.o. jar. x Cavalo nero	4	0	0
[(B.o.jar. x B.L.) x B.o. SL.] x Men	2	1 roś. – 2	0
[(kap.biała x bruk.) x B.o. SL.] x (B.o.jar. x B.L.) x Men	1	1 roś. – 2	0
B. o. jar. x B.L.	1	1 roś. – 1	0
Kap. Glowasta KG01/15	3	1 roś. – 1	0
Σ roślin badanych	171	15 roślin porażonych 15 roślin porażone w skali max = 2	1 roślin porażona w skali max = 2



Rys. 1. Wynik na żelu agarozowym otrzymany po elektroforezie form odpornych rzepaku z cytoplazmą *B. oleracea* (1100 bp). Starter OPY 10

Podsumowanie i wnioski do Ad. 3.
Starter OPY 10 amplifikujący fragment DNA 1100pz okazał się dodatnio skorelowany z brakiem odporności badanych roślin. Najbardziej obiecującym gatunkiem, który może być donorem genów „R” na chorobotwórcze grzyby *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. jest *B. taurica* oraz brukselka. U innych badanych gatunków zidentyfikowano także fragmenty DNA, które można kojarzyć z odpornością na patogeny *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. (miernik 36 analiz, jeden żel 18 ścieżek analitycznych, 18 prób podwójnie x 2 startery OPW04 i OPY10). (miernik 36 analiz, jeden żel 18 ścieżek analitycznych, 18 prób podwójnie x 2 startery OPW04 i OPY10 = 36 analiz).

Lp.	Mierniki dla Ad.3.	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
3.1	-Liczba testów odpornościowych na porażenie powodowane przez: <i>Alternaria</i> sp. – (1 test in vitro, 1 test in vivo) 20 obiektów x 10 roślin, <i>Leptosphaeria</i> sp. – (1 test in vitro, 1 test in vivo) 20 obiektów x 10 roślin	4	4
3.2	Analizy DNA	36	36

Prezentacja wyników na konferencjach			
lp.	konferencja	prezentacja	
	Mieszańce międzygatunkowe z plemienia Brassicace DC. i ich odporność na porażenie powodowane przez patogeny <i>Leptosphaeria</i> sp. oraz <i>Alternaria</i> sp. w 2017 roku. Michał Starzycki, Elżbieta Starzycka-Korbas ¹ , Piotr Kaminski ² , Wojciech Rybiński ³ , XXXIV Konferencja Naukowa ROŚLINY OLEISTE – POSTĘPY W GENETYCE, HODOWLI, TECHNOLOGII I ANALITYCE LIPIDÓW, 10–11.04.2018 Poznań, Str. 79–81.	Plakat	1

