



**Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia
Brassicaceae w celu otrzymania form rzepaku
ulepszonych pod względem odporności na patogeny
nr 49
2014-2020**

Numer zadania w planach IHAR-PIB: 4-2-01-3-01

Michał Starzycki prof. IHAR-PIB

m.starzycki@ihar.edu.pl

Dr Elżbieta Starzycka-Korbas,

Inż. Renata Daleka

Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych
IHAR-PIB w Poznaniu

Cele projektu

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 *Brassiceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp.
3. Badania odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych i donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. (punkt ten dotyczy tylko roślin kontrolnych i donorowych). Analizy DNA dla roślin mieszańcowych.

Materiały i metody

Ad. 1. Do krzyżowań międzygatunkowych wykorzystano przeselekcjonowane na odporność genotypy roślin: 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). Po osiągnięciu przez rośliny fazy kwitnienia krzyżowano je tak, aby otrzymane potomstwo posiadało cytoplazmę genotypów selekcjonowanych pod względem odporności na *Alternaria* i

Leptosphaeria. Uzyskane preparowane embriony stadiów: globularnych lub sercowatych zostały nałożone na pożywki agarowe B5 z fitohormonami (cytokinina BAP 1mg/l i auksyna 0,01mg/l IAA) lub bez fitohormonów dla większych stadiów.

Ad. 2. Na podstawie badania odporności ocenianych pod względem chorób powodowanych przez: *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp., form donorowych z plemienia *Brassicae*, zostały wykonane prace w warunkach polowych na doświadczeniach DW. Bonitację odporności wykonano wielokrotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego ze względu na możliwość wystąpienia chorób od wiosny do fazy zbioru.

Ad. 3. Wybrane rośliny – siewki mieszańcowe testowano in vitro testem Williamsa na patogeny grzybowe: *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp. Dla stwierdzenia czystości gatunkowej użytych w testach grzybów stosowano metodę sekwencjonowania DNA ITS oraz NGS. Ponadto po użyciu metody kaleczenia łodyg i inokulacji patogenami wyselekcjonowano odporne starsze rośliny donorowe. Otrzymane potomstwo pochodzące z mieszańców międzygatunkowych posłużyło do badań odporności na poziomie DNA-RAPD.

WYNIKI, DYSKUSJA , WNIOSKI



Ad. 1. W obrębie mieszańców międzygatunkowych corocznie wykonano przekrzyżowania ok. 15% udanych. Z tego materiału preparowano żywe zarodki. Także, co roku klonowano 50 nowych genotypów w warunkach in vitro i in vivo w kulturach hydroponicznych oraz w glebie.

Prowadzone badania zmierzały w kierunku otrzymywania roślin rzepaku o genotypach tolerancyjnych lub odpornych na *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp. Podczas wykonywania powyższych prac, (jak co roku) zaobserwowano dwie następujące zależności. Pierwsza to stosunkowo dobra wydajność w otrzymaniu embrionów mieszańcowych, a druga związana ze zamierającymi zarodkami globularnymi. W pracy podjęto próby hodowli mieszańców międzygatunkowych stosując metodę polegającą na „przykryciu powierzchniowym – osłonięciu” zarodków (tylko małych) pożywką B5 bez antybiotyków, co pomogło w otrzymaniu wyższej wydajności. Otrzymane na drodze in vitro klonowane mieszańce międzygatunkowe, bardzo dobrze ukorzeniały się w kulturach hydroponicznych, a po przesadzeniu ich do gleby w 100% rozwijały się prawidłowo.

- 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 mogą być genotypy mateczne i ojcowskie użyte do pierwszych krzyżowań.
- Potwierdzono przydatność kultur hydroponicznych, a następnie gleby, co pozwoliło na otrzymanie wyższego procentu żywych roślin mieszańców międzygatunkowych.

WYNIKI, DYSKUSJA , WNIOSKI

Ad. 2. Wyniki indeksu porażenia przez *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. poszczególnych form *B. napus* oceniano od wiosny do końca kwitnienia i w tym okresie nie obserwowano porażen roślin. Dopiero silniejsze infekcje wystąpiły przed zbiorem dlatego w tym okresie dokonano ich bonitacji. Pod koniec badań najodporniejsze na *Leptosphaeria* spp. były formy: Oriolus38A/18295x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) x (79 bt/19)- IP= 0,038, a na *Alternaria* spp. Amazon x 78 bt-IP= 0,033.

Wykonano także badania odporności rzepaku w doświadczeniach DW2 i PDO wskazując odmiany o wyższej odporności na *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. Powyższe badania IP - indeksów porażenia były prowadzone przez cały okres trwania projektu w warunkach polowych w miejscowościach: Małyszyn, Borowo i Bąków. Na podstawie badań odporności indywidualnie ocenianych pod względem chorób (*Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp.) roślin donorowych z plemienia *Brassicae*, wyselekcjonowano najodporniejsze z doświadczeń w celu sumowania rezystencji. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono: genotypy rzepaku oraz grupy odmian charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* spp.

Podczas prowadzenia badań nad odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. oraz odmian rzepaku odnotowano pewien procent roślin, u których porażenie było na niskim poziomie. Coroczna selekcja i wybór najodporniejszych form, pozwoliła na piramidyzację odporności u *B. napus*. Wyniki odporności poziomej (poligenicznej) rzepaku posiadają charakter naukowy oraz aplikacyjny dla rolnictwa, wskazują odmiany o małym stopniu porażenia na podane patogeny.



WYNIKI, DYSKUSJA , WNIOSKI

Ad. 3. Dla stwierdzenia odporności otrzymanych roślin mieszańcowych na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp. użyto testu Williamsa in vitro. Na siewkach wybranych genotypów oceniano indeksy porażenia (IP). Najodporniejsze na *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp. były kombinacje: 295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn) x Lisek (7D/16) xMEN23A/17xAmaz/18 x Ori/19 oraz Basalt/18 x 420/08 38B.t.x B.n./3 (17D/16) xMEN33A/17xAmazon.

Przeprowadzono także badania odporności roślin starszych mieszańców międzygatunkowych, donorowych. Selekcjonowano formy wykazujące maksymalną odporność na wybrane patotypy z rodzaju *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp., stosując metodę zakażania łodyg. Z wybranych obiektów: (kap.biała x bruk.) x (B.cret. x B.n.) i (Kapusta Taurica x Rzepak B.n.) odpornych mieszańców międzygatunkowych wyizolowano DNA do badań w celu wyboru fragmentów DNA, które mogły być kojarzone z odpornością roślin. Startery OPY 10 i OPW 04 amplifikowały fragmenty DNA, które okazały się dodatnio skorelowane z odpornością badanych roślin.

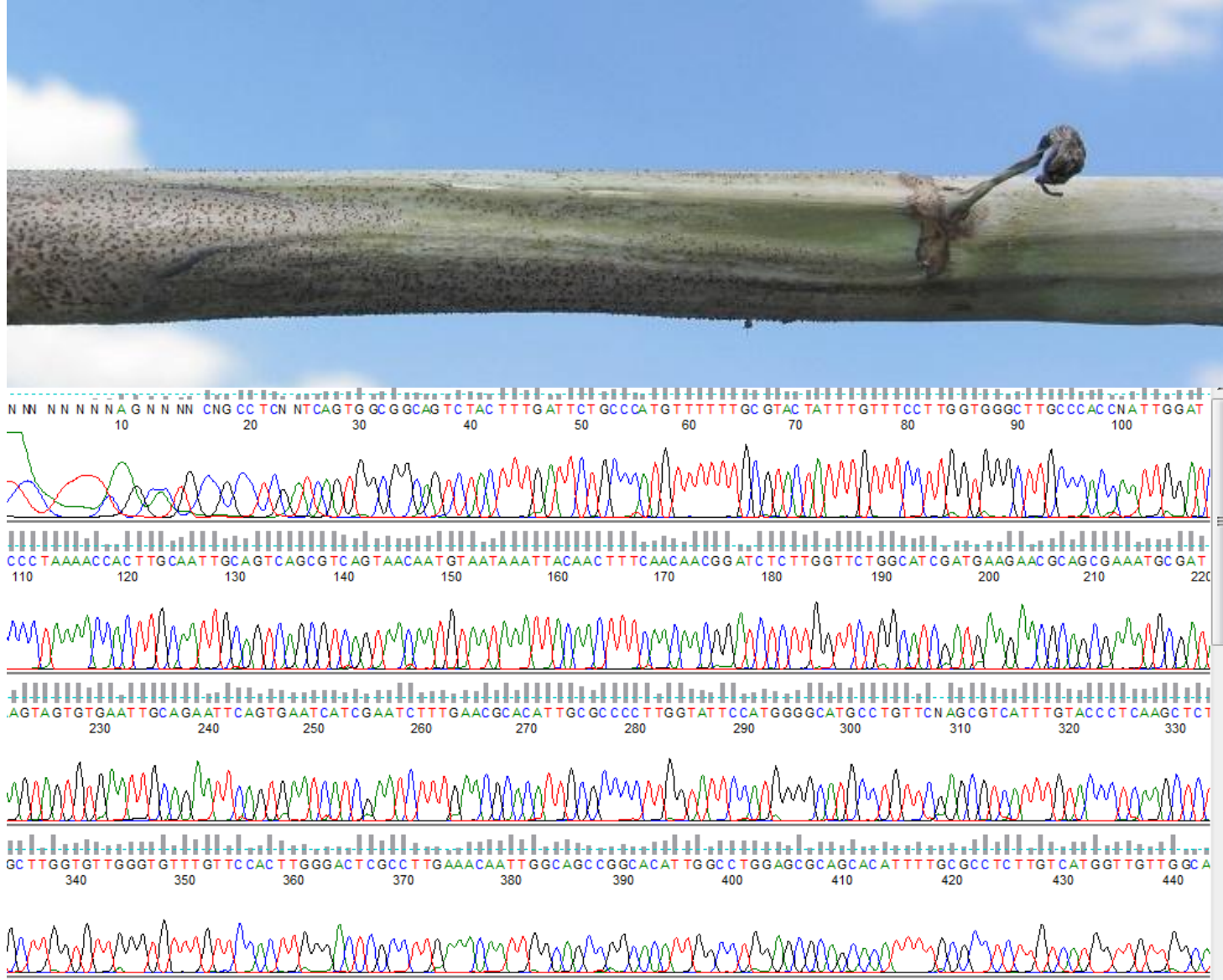
- Potwierdzono przydatność testów laboratoryjnych in vitro do oceny odporności mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku w stadium siewki.
- Metoda inokulacji patogenami *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp., polegającej na kaleczeniu i zakażaniu łodyg roślin pozwala na wyselekcjonowanie nowych genotypów odpornych.
- Stwierdzono przydatność starterów OPY10 oraz OPW 04, których amplikony mogą być kojarzone z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. Najbardziej odporne genotypy w większości przypadków posiadały DNA pochodzące od gatunku *B. oleracea*, *B. taurica* oraz innych kapust.



Coroczny schemat hodowli in vitro. Hodowla w warunkach fitotronowych mieszańców międzygatunkowych z plemienia *Brassicaceae* pokolenia F1, otrzymanych na drodze izolowanych zarodków.



Rozklonowany mieszaniec międzygatunkowy w pożywce płynnej - kultura hydroponiczna



Sekwencja badanego gatunku *Leptosphaeria maculans* (Informacja o przynależności gatunkowej (NCBI / BLAST). Patotyp przeznaczony do inokulacji mieszańców międzygatunkowych. Katalog M. Starzycki 2020, Analizy ITS i NGS.

Najważniejsze osiągnięcia projektu

- Zastosowanie do hodowli in vitro pożywek pozbawionych antybiotyków oraz użycie powierzchniowej osłony medium dla zarodków globularnych mieszańców międzygatunkowych, pozwoliło na ich wzrost oraz mniejszy procent ich zamierania.
- Podczas prowadzenia badań nad odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. oraz odmian rzepaku odnotowano pewien procent roślin, u których porażenie było na niskim poziomie. Coroczna selekcja i wybór najodporniejszych form, pozwoliła na sumowanie efektu odporności u *B. napus*. Wyniki odporności poziomej (poligenicznej) rzepaku posiadają charakter naukowy oraz aplikacyjny dla rolnictwa, wskazują odmiany o małym stopniu porażenia na badane patogeny.
- Potwierdzono przydatność testów laboratoryjnych in vitro do oceny odporności mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku w stadium siewki.
- Metoda in vivo, inokulacji patogenami *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp., polegającej na kaleczeniu i zakażaniu łodyg roślin pozwala na wyselekcjonowanie nowych odpornych genotypów.
- Stwierdzono przydatność starterów OPY 10 oraz OPW 04, których amplikony mogą być kojarzony z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. Najbardziej odporne genotypy w większości przypadków posiadały DNA pochodzące od gatunku *B. taurica* oraz innych kapust *B. oleracea*.

Najważniejsze osiągnięcia projektu cd.

Spis publikacji: 1. *Starzycka Elżbieta, Starzycki Michał, Wojciech Rybiński, Mirosława Dabert*. 2014. Identification of rape pathogens' on interspecific crosses by DNA sequencing ITS. Conference of the European Foundation for Plant Pathology, Healthy plants—healthy people 8–13 September 2014, Krakow, Poland, Plakat, Book of abstracts: 218.

2. *Elisabeth Starzycka-Korbas, Michał Starzycki, Wojciech Rybinski, and Lidia Lyczko*. 2015. Reducing plant infection caused by *Alternaria* spp., *Leptosphaeria* spp. after using EM preparation on yellowseed forms of *B. napus* obtained in vitro "interspecific hybrids". Book of abstracts: Bari Italy 07-11 czerwca 2015. Book of abstracts: 162.

3. *Starzycka-Korbas E., Starzycki M., Rybiński W.* 2016. Test Williamsa i jego modyfikacja w badaniach nad odpornością rzepaku *Brassica napus* L. na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* spp. - poster i streszczenie w wydawnictwie konferencyjnym RO str. 93-94.

4. *Starzycki M, Starzycka-Korbas E., Kamiński P., Rybiński W.* 2016. Porównanie odporności siewek in vitro oraz roślin in vivo mieszańców międzygatunkowych po inokulacji patogenami *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp. – poster i streszczenie w wydawnictwie konferencyjnym RO str. 94-96.

5. *Michał Starzycki¹, Elżbieta Starzycka-Korbas¹, Piotr Kamiński²*. Badanie odporności mieszańców międzygatunkowych przy pomocy metod inokulacyjnych oraz analiz DNA na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. Biuletyn IHAR 2017, str. 123-138 „13 Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane w dniach od 30.01.17. - 03.02.17.

6. *Michał Starzycki¹, Elżbieta Starzycka-Korbas¹, Piotr Kamiński², Wojciech Rybiński*. 2018. Mieszańce międzygatunkowe z płemienia *Brassicaceae* DC. i ich odporność na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. w 2017 roku, XXXIV Konferencja Naukowa ROŚLINY OLEISTE – POSTĘPY W GENETYCE, HODOWLI, TECHNOLOGII I ANALITYCE LIPIDÓW, 10–11.04. 2018 Poznań, Str. 79-81.

7. *Michał Starzycki, Elżbieta Starzycka-Korbas, Piotr Kamiński, Wojciech Rybiński* 2019. Plonowanie mieszańców międzygatunkowych z płemienia *Brassicaceae* DC. i ich odporność na porażenie powodowane przez najgroźniejsze patogeny w 2018 roku. Biuletyn IHAR nr 285. Str. 331-332. Konferencja Zakopane 2019.

8. *Dr Elżbieta Starzycka-Korbas, Michał Starzycki prof. IHAR-PIB, dr Grzegorz Budzianowski, mgr inż. Michał Stefanowicz*
Materiał informacyjny dla hodowców i plantatorów rzepaku dotyczący chorób: *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. występujących na odmianach *B. napus* Zachodniej Polski (wyniki z 3 doświadczeń PDO, 2020, spr. PBwPR zad. 49).



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE NATIONAL RESEARCH INSTITUTE

REGON 000079480-00080, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008
Oddział Poznań, ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań,
tel. + (48 61) 823 37 21; fax + (48 61) 823 38 71; postbox@nico.ihar.poznan.pl
Nr konta: 48 1160 2202 0000 0000 5809 8187, Bank Millennium S.A. Poznań

IHAR PIB w Poznaniu,

Poznań, 19.09.2020 r.

Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych
Independent Laboratory of Environmental Stress in Oilseed Plants

Sz. Pan

Dr Grzegorz Budzianowski

Zgodnie z harmonogramem realizacji tematu Ip. 49 PBwPR: „Badanie bioróżnorodności gatunków z płemienia *Brassicaceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny”, Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych, IHAR-PIB w Poznaniu, przekazujemy do Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o., Grupa IHAR, Oddział Małyszynie 5 rodów rzepaku ozimego, otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych. Przekazane linie charakteryzują się podwyższoną odpornością na patogeny pochodzenia grzybowego.

L.p	Pochodzenie mieszańców międzygatunkowych	Cytoplazma kapusty	Data zbioru
1.	85 Oriolus38A/18295x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) x (79 bt/19)	Kapusta Brukselska	2020
2.	71 295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) xMEN23A/17xAmaz/18 x Ori/19	Kapusta Brukselska	2020
3.	69 301 x Digr/06 p.(Choryń x Bn)xCalif (3D/16)xMEN21A/17x Amazon/18 xMen	Kapusta Pastewna	2020
4.	Mendel /18x 10 Tau x Bn/10 (18A/15) xM	Kapusta Taurica	2020
5.	Mieszanina pojedynczych z 3 linii złoty 5, 13, 20, z 2019 r.	Kapusta Jarmuż	2020

Z poważaniem,

Kierownik Samodzielnej Pracowni Stresów
Środowiskowych Roślin Oleistych IHAR PIB w Poznaniu

M. Starzycki
Prof. nadzw. dr hab. inż. Michał Starzycki