

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 49.

Tytuł zadania: **Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia *Brassicaceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny.**

Kierownik zadania: **dr hab. M. Starzycki prof. IHAR-PIB**

Podstawowym celem przeprowadzonych badań było: wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro* oraz poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Ponadto celem było poszukiwanie DNA (amplikonów) u genotypów wykazujących wyższy poziom odporności poligenicznej.

Zakres prac realizowanych w danym roku obejmował: wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro* i poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. W pracy wykorzystano techniki klonowania *in vitro* i *in vivo*. Badano również odporność siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych oraz donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Na wybranych roślinach mieszańcowych wykonano analizy DNA.

Do krzyżowań międzygatunkowych użyto dotychczas nie stosowane nowe genotypy roślin matecznych i ojcowskich oraz gatunki pokrewne, które wstępnie preselekcjonowano na patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. 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 międzygatunkowe z cytoplazmą *B. oleracea* i *B. campestris* oraz mieszańce z cytoplazmą rzepaku *B. napus* (AACC). Po osiągnięciu przez rośliny fazy kwitnienia w większości przypadków krzyżowano je przemiennie tak, aby otrzymane potomstwo posiadało cytoplazmę genotypów wcześniej selekcjonowanych pod względem odporności na porażenie przez patogeny z rodzaju *Alternaria* i *Leptosphaeria*. Uzyskane embriony stadiów: globularnych lub sercowatych zostały nałożone na pożywki agarowe B5 z fitohormonami BAP 1mg/l (cytokinina) i 0,01mg/l IAA (auksyna), i przeniesione do warunków fitotronowych. Następnie otrzymane rośliny pokolenia F_1 mieszańców międzygatunkowych klonowano w warunkach *in vitro* celem namnożenia tego materiału do testów odpornościowych. Najlepiej rozwinięte eksplantaty skierowano do dalszych badań. W obrębie powyższych form wykonano 23 udane przekrzyżowania (łącznie ponad 60), z których wypreparowano 61 żywych embrionów. Obecnie rozklonowano 60 nowych genotypów w warunkach *in vitro*. Aby podnieść wydajność otrzymywania embrionów mieszańcowych we wniosku zwrócono uwagę na odpowiednio dobrane kombinacje temperaturowe (powinny być niższe), a długość czasu doświetlenia, podczas hodowli izolowanych zarodków *in vitro*, powinna wynosić powyżej 12h. Podane dwa parametry fizyczne mogą przyczynić się do wyższej wydajności otrzymania żywych embrionów.

Następnym zagadnieniem dotyczącym mieszańców międzygatunkowych było poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Na podstawie badania odporności, indywidualnie ocenianych pod względem chorób, form donorowych z plemienia *Brassicaceae*, zostały wykonane prace w warunkach polowych na doświadczeniach PDOiR oraz DW. Każdy obiekt oceniany był (IP) na podstawie obserwacji 40 roślin w 1 powtórzeniu (najczęściej 3 powtórzenia). Przyjęto trójstopniową skalę oceny odporności (0-brak porażenia, 1-średnie, 2-silne porażenie). Powyższe badania występowania patogenów lub określenie (IP - indeks porażenia) były prowadzone w całym okresie wegetacyjnym w warunkach polowych, w miejscowościach: Małyszyn, Borowo (HR Strzelce) i Bąków (HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR). Odporność mieszańców międzygatunkowych wyrażoną Indeksami Porażenia dla *Leptosphaeria* sp. (po analizie wariancji i testu Duncana na poziomie $\alpha=0,050$, $NIR=0,04473$) wskazały formy: 301 x Digger (Choryńska x B.n.) $IP=0,01$, 301 x 303 TP/06 p. (Choryńska x B.n.) x (Californium x B.n.) $IP=0,01$, 295 x 645 TP/06 p.(Br. X Bn) x Lisek $IP=0,01$, 297/06 p.(Jar x Bn) x B.n. $P=0,007$ oraz 38B.t. x B.n./2 $P=0,007$. Odporności mieszańców międzygatunkowych dla *Alternaria* sp. wykazały formy (z $IP=0,001$): 38B.t. x B.n./1, 301 x Digger/06 p.(Choryń x Bn)xCalif, 53 Bru, 301 x 303 TP/06

p. Choryńska. Na wybranych obiektach wykonano analizy GC dla wyeliminowania genotypów o dużym udziale związków antyżywnościowych. Na podstawie badań odporności indywidualnie ocenianych pod względem chorób (*Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.) form donorowych z plemienia *Brassicae*, wyselekcjonowano najodporniejsze w doświadczeniach PDOiR i DW w celu piramidyacji rezystencji. Genotypy te zostaną także użyte do krzyżowań międzygatunkowych, jako formy ojcowskie-zapylacze w następnym sezonie wegetacyjnym. Podczas badań odporności roślin *B. napus* odnotowano niewielką liczebność roślin chorych do fazy „po kwitnieniu”. Dopiero pod koniec okresu wegetacyjnego zaobserwowano choroby, które bonitowano. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono odmiany rzepaku oraz grupy odmian charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. co wykazano statystycznie. We wniosku wskazano, że rody i odmiany rzepaku, u których zaobserwowano wyższą rezystencję będą stanowiły dobry materiał (formy ojcowskie) do dalszych badań związanych z hodowlą odpornościową.

Kolejnym zadaniem w temacie było wykorzystanie w badaniach technik klonowania *in vitro* i *in vivo* dla otrzymania roślin mieszańców międzygatunkowych. Po wykonanych doświadczeniach stwierdzono, że do klonowania otrzymanych mieszańców międzygatunkowych niezbędne są dobrze wykształcone zarodki, które po fragmentowaniu roją dobry ich rozwój. Ważny jest także czas, w którym czynności te należy wykonać. Jeżeli tkanki zostaną pocięte zbyt wcześnie, często dochodzi do ich zamierania, późniejsze z reguły przeżywają. Następną czynnością związaną z klonowaniem jest użycie kultur hydroponicznych w celu ukorzenia eksplantatów lub ich oczyszczenie z podłoża agarowego zawierającego związki organiczne. Hodowla ta pozwala na pozbycie się resztek pożywki agarowej, która bardzo często wpływa na silne infekcje eksplantatów po przesadzeniu roślin do warunków glebowych. Należy podkreślić, że po użyciu kultur hydroponicznych, procent ukorzenionych roślin w glebie jest bliski 100%. Powyższe badania stanowią ważną informację dotyczącą optymalizacji otrzymywania rozklonowanych żyjących eksplantatów mieszańców międzygatunkowych, które następnie wykorzystywane są do testów odpornościowych. Wykonane badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1./ Aby zwiększyć wydajność klonowanych mieszańców międzygatunkowych otrzymanych *in vitro* należy zwrócić uwagę na ich stan fizjologiczny, a szczególnie ich wielkość (powyżej stadium torpedalnego), a następnie po wyrośnięciu eksplantatów do większych struktur można je pofragmentować – klonować.

2./ Użyte w badaniach kultury hydroponiczne pozwalają na otrzymanie wysokiego procentu żywych roślin mieszańców międzygatunkowych, które po ich przesadzeniu do warunków glebowych nie stwarzają problemów z ich dalszym rozwojem.

Następne badania dotyczyły prac związanych z odpornością siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.. Celem tematu badawczego było stwierdzenie odporności otrzymanych roślin (siewek) mieszańcowych na porażenie powodowane przez powyższe patogeny. Czystość gatunkową użytego inokulum potwierdzano za pomocą analizy DNA ITS1 (NCBI/BLAST), a koncentrację zarodników konidialnych stosowanych do testów oceniano nefelometrycznie. Badania prowadzono w taki sposób, aby wyselekcjonować formy wykazujące maksymalną odporność na wybrane patotypy chorobotwórczych grzybów. Ponadto wykonano wstępne badania DNA mieszańców międzygatunkowych w celu wyboru fragmentów DNA, które będą kojarzone z odpornością roślin. Po przeprowadzonych badaniach odporności siewek przy użyciu uproszczonego testu Williama można było wskazać genotypy odporniejsze na porażenie powodowane przez:

Leptosphaeria sp. oraz *Alternaria* sp. Na *Leptosphaeria* sp. odporniejsze były mieszańce: 15.301 x Digger (Choryń x Bn)xCalif (ACC), 18. *B. taurica* x B.n. (ACC). Na *Alternaria* sp. odporniejsze były mieszańce: 15. 301 x Digger/06 p.(Choryń x Bn)xCalif (ACC), 18. *B. taurica* x B. n (ACC).

Powyższe analizy mogą być obarczone pewnymi błędami, ponieważ nie weryfikowano ich w warunkach polowych. Warunki naturalne stymulują w wielu przypadkach elicitory, których brak jest w tzw. hodowlach kontrolowanych, nawet w fitotronie. Wykonano wstępne 30 analiz DNA, form wyjściowych oraz mieszańców międzygatunkowych. Do tego zadania wykorzystano 6 wybranych starterów RAPD, które wykazały duży polimorfizm badanych obiektów. Po badaniach DNA

i analizach fitopatologicznych rzepaku na porażenie powodowane przez chorobotwórcze grzyby: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., we wniosku wskazano, że najbardziej obiecującym gatunkiem donorowym genów odporności była kapusta - *Brassica taurica*.