

SPRAWOZDANIE z realizacji w 2021 r. zadania badawczego nr. 27

„Identyfikacja markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi odporność na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria spp.*), z wykorzystaniem zaawansowanych technik molekularnych”

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr KS.zb.802.10.2021 z dnia 14 czerwca 2021 r., Zadanie nr 27.

Kierownik zadania – prof. UPP dr hab. Janetta Niemann, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, UP w Poznaniu

Wykonawcy: dr hab. Dorota Weigt, dr hab. Agnieszka Tomkowiak, mgr. inż. Justyna Szwarz - Katedra Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu, prof. UPP dr hab. Jan Bocianowski - Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych UP w Poznaniu, prof. UPP dr hab. Łukasz Wolko – Katedra Biochemii i Biotechnologii UP w Poznaniu, prof. dr hab. Małgorzata Jędryczka, dr Joanna Kaczmarek, dr hab. Izabela Pawłowicz, mgr. Witold Irzykowski - Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu.

Słowa kluczowe: rzepak, sucha zgnilizna kapustnych, geny odporności, markery molekularne

Wzrastające znaczenie rzepaku w gospodarce światowej stawia przed hodowcami tego gatunku coraz to nowe wyzwania. Dotyczą one nie tylko ulepszania plonowania nowych odmian, ale również podniesienia ich cech odpornościowych.

Głównym celem podejmowanego projektu badań jest opracowanie markerów DNA silnie sprzężonych/ zasocjowanych z możliwie jak najszerszym spektrum genów warunkujących odporność na suchą zgniliznę kapustnych u rzepaku występujących w obrębie badanych populacji DH oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej.

W związku z powyższym celem prowadzonych badań w roku 2021 było oszacowanie odporności na suchą zgniliznę kapustnych wybranych rodów hodowlanych i mieszańców z rodzaju *Brassica* oraz otrzymanie nasion mieszańcowych niezbędnych do wyprowadzenia populacji mapującej - linii DH, analiza ekspresji wybranych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych (gen *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7*) w genotypach o zróżnicowanym stopniu odporności oraz selekcja materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych, a także wykorzystanie sekwencji genów ortologicznych jako markerów do monitorowania potomstwa mieszańcowego z podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria spp.*

W ramach zadania 27 w roku 2021 zrealizowano 3 tematy badawcze. **Celem tematu pierwszego** było określenie odporności analizowanego materiału roślinnego na porażenie przez *Leptosphaeria maculans* (sucha zgnilizna kapustnych) oraz otrzymanie nasion mieszańcowych niezbędnych do wyprowadzenia linii podwojonych haploidów (DH) z wybranych form rzepaku o zróżnicowanej odporności.

Materiał roślinny stanowiły najbardziej zaawansowane rody hodowlane (populacyjne oraz F₁), pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce oraz Hodowli Roślin Smolice, a także wybrane potomstwa mieszańcowe pochodzące z kolekcji Katedry i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

Testy odpornościowe dla wybranych materiałów roślinnych, na porażenie przez *L. maculans* zostały przeprowadzone na polach doświadczalnych RGD Dłoni koło Rawicza oraz polach doświadczalnych należących do HR Strzelce i HR Smolice. Z roślin rzepaku z objawami suchej zgnilizny kapustnych zostały wyizolowane mikroorganizmy chorobotwórcze. Przynależność gatunkowa grzybów rodzaju *Leptosphaeria* spp. została oznaczona na podstawie cech morfologicznych kultur na pożywce mikrobiologicznej i przy zastosowaniu techniki LAMP (Jedryczka i in. 2013). Z materiałów zebranych na polach w RGD w Dłoni zostały wyprowadzone izolaty jednozarodnikowe *L. maculans*. Ponadto mieszańce i ich rodzice były badane przy zastosowaniu testu liścieniowego według procedury opisanej przez Jedryczkę (2006).

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji najmniejszy stopień porażenia stwierdzono u mieszańców rzepaku z *B. fruticulosa*. Zauważono, że odmiany wzorcowe cechowały się znaczną odpornością na suchą zgniliznę kapustnych, przy czym większość materiałów hodowlanych badanych w doświadczeniu prowadzonym w HR Smolice była silniej porażona aniżeli odmiany wzorcowe Duke, DK Excited oraz SY Ilona. Pod względem odporności na suchą zgniliznę kapustnych do najbardziej obiecujących należą linie hodowlane BRH 18012, BRH 4520/15. Ponadto, linie hodowlane poddane ocenie były silnie zróżnicowane pod względem porażenia grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* (różnica 2,7-krotna pomiędzy najmniej a najsilniej porażoną linią). Ocena porażenia grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* wykonana w tym samym czasie w HR Strzelce Oddział Borowo oraz HR Smolice wykazała silniejsze objawy materiału roślinnego w Borowie, jednak porównanie przeprowadzone jest na odmiennym materiale roślinnym, co może znacznie rzutować na wyniki oceny. Na podstawie przeprowadzonej analizy z wykorzystaniem techniki LAMP stwierdzono, że grzyb *L. biglobosa* był gatunkiem dominującym na łodygach potomstw mieszańcowych w Dłoni.

Celem drugiego tematu badawczego była Analiza ekspresji wybranych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych (gen *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7*) w genotypach o zróżnicowanym stopniu odporności.

Ekspresję trzech genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych tj. *Rlm7*, *Rlm4* and *Rlm3* analizowano wśród 50 genotypów z rodzaju *Brassica*. W tym celu zastosowano technikę RT-qPCR [Pawłowicz i in. 2017]. Ekspresja analizowanych genów odporności *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7* utrzymywała się na niskim poziomie wśród większości badanych genotypów, zarówno w przypadku linii rodzicielskich jak i mieszańców oddalonych. Jednak można wyróżnić genotypy, które znacznie odbiegają od ogólnej tendencji. Należą do nich mieszańce oddalone *B. napus* cv. Lisek x *B. tournefortii* oraz *B. napus* cv. Górczański x *B. rapa* ssp. *chinensis*, które wykazują się bardzo wysoką ekspresją genów *Rlm3* i *Rlm4* – kolejno 48.41, 13.93 i 60.39, 9.25. Gen *Rlm7* podlegał wysokiej ekspresji u genotypów: *B. napus* cv. Jet Neuf x *B. carinata* - PI 649096 – 9.59 oraz *B. napus* cv. Górczański x *B. rapa* ssp. *pekinensis* 08.007569 – 12.19 odpowiednio.

Należy zauważyć, że żadna analizowana roślina z linii rodzicielskiej nie odznaczyła się tak wysokim poziomem ekspresji genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych jak niektóre z mieszańców oddalonych. Może to wskazywać na fakt, że krzyżowanie ze sobą roślin spokrewnionych, posiadających pożądane geny odporności może prowadzić do stworzenia roślin wysokoodpornych. Jednakże w niniejszej analizie nie zauważono żadnych zależności pomiędzy poziomem ekspresji genów odporności pomiędzy liniami rodzicielskimi a mieszańcami oddalonymi. Można się domyślać, że jest to spowodowane zjawiskiem szoku genomowego, które często występuje w wyniku hybrydyzacji interspecyficzej [Abbott i in. 2013]. Potwierdzenie tej tezy wymaga jednak dalszej analizy ekspresji genów i korelacji jej poziomu z odpornością na chorobę.

Temat badawczy nr 3 dotyczył selekcji materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych oraz wykorzystania sekwencji genów ortologicznych jako markerów do monitorowania potomstwa mieszańcowego z podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* spp.

Na podstawie danych literaturowych wybranych zostało 19 markerów typu PCR, które zostały użyte do selekcji analizowanego materiału roślinnego.

Zastosowanie 12 z 19 analizowanych par starterów pozwoliło na uzyskanie spodziewanych produktów reakcji PCR, co umożliwiło określenie obecności lub braku fragmentów genomu związanych z odpornością na *L. maculans*. Natomiast markery Xbrms075, Fad8, B5-1520,

B5Rlm6_1, Bol021435 oraz BjHZ_1 i BnHZ_2 wymagają przeprowadzenia dodatkowych analiz.

Ponadto, w oparciu o dostępne dane literaturowe, zdefiniowany został zestaw genów ortologicznych, których funkcja jest związana z procesami odporności roślin na suchą zgniliznę kapustnych.

W bieżącym roku wybrano 4 geny odporności tj. *Rlm1*, *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7* dla których zidentyfikowano 15 genów ortologicznych. Geny te stanowiły punkt wyjścia do identyfikacji odpowiadającym im genom homologicznym lub genom najbardziej do nich zbliżonym pod względem podobieństwa sekwencji i/lub kompozycji i struktury domen białkowych.

Zastosowana metoda trawienia restrykcyjnego produktów PCR dla analizowanych ortologów genów odporności *Rlm1*, *Rlm3*, *Rlm4* oraz *Rlm7* umożliwiła rozróżnienie *B. napus* oraz jego mieszańców ze wszystkim badanymi *B. rapa*. Ma to bardzo praktyczne znaczenie podczas prowadzenia programów krzyżowań w celu odróżnienia mieszańców od roślin, które przypadkowo uległy samozapyleniu. W wyniku przeprowadzonych analiz molekularnych wykryto użyteczny polimorfizm restrykcyjny dla 10 spośród 15 analizowanych ortologów.