

SPRAWOZDANIE z realizacji w 2023 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 DHR.hn.802.12.2023 z dnia 16 września 2023 r.

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

Wykonawcy:

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin:

prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak, dr hab. Dorota Weigt, dr inż. Justyna Szwarz, mgr inż. Ewa Starosta

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych:
prof. UPP dr hab. Jan Bocianowski,

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu: prof. dr hab. Małgorzata Jędryczka, dr hab. Izabela Pawłowicz, dr Joanna Kaczmarek,

Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR

Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR

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 ramach zadania 27 w roku 2023 zrealizowano 4 tematy badawcze. **Celem tematu pierwszego** było oszacowanie odporności na suchą zgniliznę kapustnych wybranych genotypów z rodzaju *Brassica*, a także otrzymanie nasion mieszańcowych niezbędnych do wyprowadzenia populacji mapującej tj. linii DH.

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 Dłóż koło Rawicza oraz polach doświadczalnych należących do HR Strzelce. 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 technik molekularnych zgodnie z metodyką opisaną w literaturze naukowej (Mendes-Pereira i in. 2003).

Linie, które w warunkach polowych charakteryzowały się najmniejszym porażeniem oraz linie DH przebadane zostały przy zastosowaniu testu liścieniowego według procedury opisanej przez Jędryczkę (2006).

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji najmniejszy stopień porażenia roślin mieszańcowych stwierdzono u mieszańców nr 25 i 88. Wśród analizowanych linii DH najwyższą odpornością charakteryzowały się linie DH o numerach '6, 23, 50, 63, 135 i 158'. Natomiast najsilniej porażona grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* była linia '146'.

Celem drugiego tematu badawczego była selekcja materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych.

Identyfikacja genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych została wykonana u 25 genotypów rzepaku (*Brassica napus*), tj. linii podwojonych haploidów (DH) otrzymanych z Hodowli Roślin Strzelce oddział Borowo. Na podstawie danych literaturowych wybranych zostało 10 markerów typu PCR, które zostały użyte do selekcji analizowanego materiału roślinnego (Tabela 1).

Tabela 1. Markery molekularne wykorzystane w celu identyfikacji genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych

Marker	Gen	Sekwencje starterów	Źródło
LepR3	<i>LepR3</i>	F: ACTTTCCTGTTACGACGCTA R: AGTTTATCCAGCCACTTGTA	Van de Wouw i in. 2022
Rlm2	<i>Rlm2</i>	F: CGAGCTGAACCTAAGTGACAA R: CCAGTAAGCTTGTTTTCTCCA	
At1g80400	Rejon zawierający geny	F: AGTCCTTGA-GGCCTT AGAGAAGA R: CGTTTGAGGACTGTGTTGTCC	Leflon i in. 2007
At1g80530	<i>Rlm1, Rlm3, Rlm4, Rlm7, Rlm9</i>	F: GACGTTCCCGCTTTACTCC R: CTCATAGGAAAATTCCTCATATTGGT	
Xbrms075	<i>Rlm4</i>	R: ACCTTAAATGTTAAGTAAGCTAAAC F: GTTTCACATATTTCTCTGTTTATT	Raman i in. 2012
BjHZ_1	<i>Rlm6</i>	R: CCAGAGACCCCAGTTAAGCA F: CCAACCCCTCGAGGTCAATA	Rashid i in. 2018
BnHZ_2		R: TTAAAGTTTGTGAATTTCTTCTT F: TCCATGATGTGATAACTATAGACG	
Xol12-e03	<i>Rlm1</i>	F: CTTGAAGAGCTTCCGACACC R: GACGGCTAACAGTGGTGGAC	Raman i in. 2012a
Xna12-a02a		F: AGCCTTGTTGCTTTTCAACG R: AGTGAATCGATGATCTCGCC	Raman i in. 2012a
Ind10-12	<i>LepR3</i>	F: GGACGGTGTATGGGTGAATAACAG R: CGTTTGTAACCGACCTTCA	Larkan i in. 2013

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że markery związane z odpornością na *L. maculans* można potencjalnie wykorzystać w selekcji materiału hodowlanego. Szczególnie przydatne mogą okazać się markery BjHZ_1, BnHZ_2, oraz Ind10-12, których wykorzystanie umożliwiło otrzymanie oczekiwanych produktów reakcji i identyfikację genotypów odpornych. Wiadomym jest, iż zastosowanie zweryfikowanych markerów powiązanych z pożądanymi genami pomaga przyspieszyć i ułatwić selekcję cennych genotypów bez czasochłonnych ocen

fenotypowych. W związku z tym, znaczenie użytkowe badań wykonanych w ramach projektu jest bardzo wysokie, gdyż wyselekcjonowane markery mogą wspomóc procesy hodowli rzepaku w Polsce.

Celem tematu 3 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*, *Rlm6* and *Rlm3* analizowano wśród 25 genotypów *Brassica* (linii podwojonych haploidów (DH) otrzymanych z HR Strzelce). Analizy prowadzone były na materiale roślinnym w warunkach kontrolnych oraz po inokulacji patogenem *Leptosphaeria maculans* z odpowiadającymi genami awirulencji. W tym celu zastosowano technikę RT-qPCR [Pawłowicz i in. 2017].

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowany poziom ekspresji analizowanych genów odporności na patogen *Leptosphaeria maculans* wśród 25 badanych genotypów.

Po inokulacji *L. maculans* obserwowano zmiany w poziomie akumulacji badanych genów odporności u większości analizowanych genotypów. W większości przypadków zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu badanych genów. Jednakże różnice te w przeważnie okazywały się niewielkie i nieistotne statystycznie.

W przypadku genu odporności na suchą zgniliznę kapustnych *Rlm3* krotność zmiany w poziomie ekspresji genu okazała się istotna statystycznie jedynie w przypadku dwóch analizowanych linii DH. Dodatkowo, zaobserwowano małą ilość transkryptu, co może wskazywać na fakt, iż w badanych materiale omawiany gen jest nieobecny. Geny *Rlm4* oraz *Rlm7* również charakteryzowały się niewielkimi zmianami w poziomie ekspresji po inokulacji *Leptosphaeria maculans*. Jedynie u czterech linii DH rzepaku zmiana w ekspresji genu *Rlm4* okazała się istotna statystycznie. W przypadku genu *Rlm7* krotność zmiany w poziomie ekspresji genu była istotna statystycznie u 11 spośród 25 analizowanych linii DH rzepaku. Zaobserwowano zróżnicowaną regulację ekspresji genu *Rlm7*. Biorąc pod uwagę powyższe, aby precyzyjnie wytłumaczyć zależność między porażeniem a poziomem ekspresji analizowanych genów niezbędne są dalsze badania z udziałem kompleksu *Brassica napus*-*Leptosphaeria maculans*. Przeprowadzenie bardziej złożonych analiz genomicznych, pozwoliłoby na zrozumienie w jaki sposób zmieniają się drogi transportu błonowego roślin, a także mechanizmów i białek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej rośliny na patogen.

Kolejnym tematem realizowanym w bieżącym roku w ramach zadania 27 była identyfikacja markerów sprzężonych z genami odporności. W związku z tym **celem tematu badawczego 4** była identyfikacja nowych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.* Materiał roślinny stanowiły 192 genotypy, tj. linie DH oraz genotypy referencyjne pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce, oddział Borowo. Genotypowanie wykonane zostało z wykorzystaniem technologii DArTseq, opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Za pomocą analizy GWAS zostało wykonane mapowanie asocjacyjne dla porażenia wybranych linii DH przez *Leptosphaeria spp.* Mapowanie to zostało wykonane na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania. Dane genotypowe otrzymano z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiły wyniki dotyczące odporności roślin na suchą zgniliznę kapustnych (Temat badawczy 1). Na podstawie

wykonanej analizy GWAS do dalszych badań wybrane zostały markery silicoDArT i SNP o największym poziomie istotności, czyli te, które były najsilniej zasocjowane z odpornością.

W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano 1391 markery molekularne, w tym odpowiednio 381 SNP i 1010 Silico DArT, które były statystycznie istotnie związane z odpornością na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria spp.*). W celu zawężenia liczby markerów do najbardziej istotnie związanych z odpornością roślin na suchą zgniliznę kapustnych spośród wszystkich wybrano 15 (9 DArT i 6 SNP), które były istotne na poziomie 0.001. Podjęto również próbę określenia położenia wyselekcjonowanych markerów.

Tabela 2. Charakterystyka i położenie markerów istotnie związanych z odpornością roślin rzepaku na suchą zgniliznę kapustnych

Marker	Typ markera	Położenie na chromosomie
4899	DArT	A07
5425	DArT	C03
5564	DArT	C02_random
5781	DArT	C02
6134	DArT	A07
6776	DArT	A07
7853	DArT	A06
7889	DArT	C06
9070	DArT	C06
10058	SNP	A07
11667	SNP	A08
11720	SNP	C06
12134	SNP	C06_random
12232	SNP	C03
12456	SNP	A08