

SPRAWOZDANIE z realizacji w 2022 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.802.11.2022 z dnia 21 czerwca 2022 r.

**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, mgr inż. Ewa Starosta - Katedra Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu, prof. UPP dr hab. Jan Bocianowski - Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych UP w Poznaniu, prof. dr hab. Małgorzata Jędrzycka, 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 ramach zadania 27 w roku 2022 zrealizowano 3 tematy badawcze. **Celem tematu pierwszego** było określenie odporności na porażenie przez *Leptosphaeria maculans* (sucha zgnilizna kapustnych), detekcja genów awirulencji wśród populacji *L. maculans* 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. 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 (Jędrzycka 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 opisaną przez Jędrzycką (2006).

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji najmniejszy stopień porażenia roślin w Dłoni stwierdzono u odmian Anderson i Andromeda. Wśród form mieszańcowych najmniejszy odsetek roślin porażonych stwierdzono u mieszańców oznaczonych nr 37.

Ocena porażenia grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* wykonana w tym samym czasie w HR Strzelce Oddział Borowo wykazała, że linie hodowlane poddane ocenie były silnie zróżnicowane pod względem porażenia, a różnica pomiędzy najmniej a najsilniej porażoną formą była 5,7-krotna. Wśród badanych 21 form hodowlanych pięć form cechowało się znaczną odpornością, trzy formy były porażone w stopniu słabym, siedem form uległo porażeniu w stopniu pośrednim sześć w stopniu silnym. Wśród roślin na poletku zróżnicowanie stopnia porażenia było znaczne, co oznacza, iż można wybrać zdrowe lub słabo porażone pojedynki do dalszych rozmnożeń, jednak bez pewności, czy dana roślina była porażona przez inokulum występujące w naturze.

Na podstawie przeprowadzonej analizy z wykorzystaniem techniki LAMP stwierdzono, że grzyb *L. maculans* był gatunkiem dominującym na liściach potomstw mieszańcowych w Dłoni.

**Celem drugiego tematu badawczego** była analiza ekspresji wybranych trzech genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych w genotypach o zróżnicowanym stopniu odporności.

Ekspresję trzech genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych tj. *Rlm7*, *Rlm6* and *Rlm3* analizowano wśród 25 genotypów *Brassica* (genotypy rodzicielskie i mieszańcowe otrzymane z HR Smolice). 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 *Leptosphaeria maculans* obserwowano zmiany w poziomie akumulacji badanych genów odporności u większości analizowanych genotypów. W większości przypadków zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu badanych genów.

Na podstawie pozyskanych danych można wnioskować, że ekspresja analizowanych genów jest regulowana w obecności *Leptosphaeria maculans*, jednak jest ona zróżnicowana i zależna od genotypu. Poziom ekspresji genów związanych z reakcją odpornościową często jest zależny od warunków środowiskowych, a także od genotypu badanej rośliny. Zmiany mogą dotyczyć samych genów odporności oraz genów biorących udział w regulacji hormonalnej i sygnalizacji. Różnice w akumulacji ilości transkryptu poszczególnych genów mogą również wynikać z funkcjonowania regulatorów transkrypcji specyficznych dla poszczególnych genotypów. Ponadto, z danych literaturowych wynika, że również pochodzenie analizowanych genotypów oraz genów odporności i ich funkcja ma wpływ na ekspresję genów (Cao et al., 2007).

Cao, Y., Ding, X., Cai, M., Zhao, J., Lin, Y., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2007). The Expression Pattern of a Rice Disease Resistance Gene Xa3/Xa26 Is Differentially Regulated by the Genetic Backgrounds and Developmental Stages That Influence Its Function. *Genetics*, 177(1), 523–533.

**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.*

Materiał badawczy stanowiło 25 genotypów, w tym: 10 roślin powstałych ze skrzyżowania wyselekcjonowanych odmian rzepaku (*Brassica napus*), jeden mieszaniec międzygatunkowy, oraz 14 genotypów rodzicielskich.

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	Sekwencje starterów	Źródło
Bo9g117290	F: CACCAATCAACTGGAACCTTGAA R: GACGTTGACTGCGTACTCTTTG	Hossain et al. 2020
Bo9g111510	F: GTAATGATCCGGAGGTTGTTTC R: TGAGTTATTCGTCGGAGCTCTT	
Bo2g131620	F: TAGCTGACAAGTCCCTCATTCA R: CATCACAAATACCTTGCGAGTC	Ferdous et al. 2020
10BM	F: TGCAGGCAATTATTCAGTGG R: AGCTTATGTTAGGTGGAAG	Zhang et al. 2021
80E24a	A: GACAAACACAATGGACTCAA B: GAGGTAGAGAAAGACGAAGA R: A <sub>20</sub> TCGTTTAAGGAATGTGCCAA	Long et al. 2011
At1g80400	F: AGTCCTTGA-GGCCTT AGAGAAGA R: CGTTTGAGGACTGTGTTGTCC	Leflon et al. 2007
At1g80530	F: GACGTTCCCGCTTTACTCC R: CTCATAGGAAAATTCCTCATATTGGT	
Xbrms075	R: ACCTTAAATGTTAAGTAAGCTAAAC F: GTTTCACATATTTCTCTGTTTATT	Raman R. et al. 2012
BjHZ_1	R: CCAGAGACCCCAGTTAAGCA F: CCAACCCTTCGAGGTCAATA	Rashid et al. 2018
BnHZ_2	R: TTAAAGTTTGTGAATTTCTTCCTT F: TCCATGATGTGATAACTATAGACG	

Wykonane analizy molekularne pozwoliły na identyfikację wszystkich dziesięciu regionów związanych z odpornością na suchą zgniliznę kapustnych. Przy czym jeden z głównych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych, *LepR2'* został zidentyfikowany przez dwa markery molekularne Bo9g117290 oraz Bo9g111510 u wszystkich analizowanych genotypów.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na użyteczność badanych markerów, jednak konieczne są dalsze badania w tym zakresie, a w szczególności powiązanie analiz z faktyczną ekspresją wybranych genów. Niestety, ze względu na skomplikowaną strukturę genomu *Brassica*, opracowanie funkcjonalnych markerów molekularnych nadal pozostaje wyzwaniem dla naukowców (Mayerhofer i wsp., 2005). Duże podobieństwo sekwencji genów homologicznych pomiędzy genomem A i C często uniemożliwia ustalenie lokalizacji i poprawną identyfikację. Mimo trudności, właściwą drogą wydaje się być dalsze poszukiwanie i walidowanie markerów dla zróżnicowanych gatunków z rodzaju *Brassica*, gdyż selekcja

wspomagana markerami jest szybkim i jednoznacznym sposobem na określenie występowania genów odporności.

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 3 geny odporności tj. *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7* dla których zidentyfikowano 4 geny ortologiczne. 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.

Tabela 2. Zidentyfikowane sekwencje ortologiczne dla wybranych genów odporności.

<b>Gen (Pozycja na chromosomie)</b>	<b>Ortolog(TAIR10)</b>
<i>Rlm3</i> , <i>Rlm4</i> & <i>Rlm7</i> (A07 w Bna)	AT1G69160
	AT1G79090
	AT3G59700
	AT3G60600

Zastosowana metoda trawienia restrykcyjnego produktów PCR dla analizowanych ortologów genów odporności *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.