

Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej – Zadanie 26

Badania nad zwiększeniem zdolności do plonowania odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) poprzez wykorzystanie źródeł odporności na stresy biotyczne i abiotyczne oraz poszerzenie zmienności genetycznej

Okres realizacji: 2024 r.

Zespół wykonawców zadania (14 osób):

dr hab. Katarzyna Mikołajczyk,
dr Marcin Matuszczak,
dr hab. Stanisław Spasibionek, prof. Instytutu,
dr hab. Alina Liersch,
dr hab Marek Wójtowicz,

mgr Joanna Nowakowska,
mgr inż. Katarzyna Krzyżańska,
mgr inż. Julia Żok,
Mariola Ebertowska,
Justyna Karauda,

Katarzyna Kozłowska,
Katarzyna Śliwińska,
Jacek Kwiatek,
Sławomir Hoffa.

Przyznane środki: 427 200,00 zł

Kierownik zadania: do 30.09.2024r.: dr hab. Katarzyna Mikołajczyk (e-mail: k.mikolajczyk@ihar.edu.pl)
od 1.10.2024r.: dr Marcin Matuszczak (e-mail: m.matuszczak@ihar.edu.pl)

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB), Oddział w Poznaniu

Cele w poszczególnych tematach badawczych:

- 1. Wprowadzanie wybranych cech odpornościowych do rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) na drodze resyntezy**
(dr hab. Alina Liersch)
Cel badań: Uzyskanie nowych mieszańcowych, resyntetyzowanych roślin rzepaku (*B. napus*) poprzez krzyżowanie gatunków diploidalnych *B. rapa* i *B. oleracea* dla poszerzenia zmienności genetycznej gatunku i introgresja do genomu rzepaku korzystnych alleli związanych z odpornością/tolerancją na kiłę kapusty oraz stres abiotyczny i biotyczny. **Cel został zrealizowany w całości.**
- 2. Opracowanie metody laboratoryjnej oceny odporności genotypów rzepaku na osypywanie**
(dr hab. Marek Wójtowicz)
Cel badań: Zgromadzenie wyników do opracowania metody pozwalającej na ocenę odporności genotypów na osypywanie w warunkach kontrolowanych. Porównanie dwóch metod oceny tej odporności. **Cel został zrealizowany w całości.**
- 3. Identyfikacja markerów DNA specyficznych dla cechy odporności/tolerancji rzepaku na infekcję kiłą kapusty powodowaną przez pasożytniczego pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae* Wor.**
(dr hab. Katarzyna Mikołajczyk)
Cel badań: Kontynuacja testowania specyficzności markera DNA typu SCAR dla odporności niesionej przez genotyp odmiany 'Tosca' badanej w ramach zrealizowanego projektu badawczego Harmonia nr 2016/22/M/NZ9/00604 (2017 – 2020). Rozpoczęcie identyfikacji markerów DNA dla innych niż odmiana 'Tosca' źródeł odporności na infekcję kiłą kapusty, dla których marker dla odporności Tosca nie jest specyficzny. **Cel został zrealizowany w całości.**
- 4. Analiza genomu rzepaku ozimego dla identyfikacji rejonów sprzężonych z istotnymi cechami użytkowymi**
(dr Marcin Matuszczak)
Cel badań: Mapowanie asocjacyjne (GWAS) dla różnych cech fenotypowych rzepaku ozimego (zawartość glukozyzolanów, włókna, tłuszczu i białka w nasionach) wykonane na podstawie markerów typu SNP uzyskanych dla kolekcji 350 linii i odmian rzepaku ozimego za pomocą mikromacierzy *Brassica* 19K Illumina Infinium (TraitGenetics, Gatersleben, Niemcy). **Cel został zrealizowany w całości.**

Materiały i metody w poszczególnych tematach badawczych:

- 1. Krzyżowane dwukierunkowo podgatunki *B. rapa* (odm. Siloga, Satogate, ECD 4), *B. oleracea* (odm. Boma) oraz mieszańce międzygatunkowe (*B. oleracea* × *B. taurica* × *B. napus*) i (*B. oleracea* × *B. cretica* × *B. napus*).
Krzyżowane jednokierunkowo [*B. rapa*, *B. oleracea* i mieszańce międzygatunkowe] × *B. napus* odm. F1 Valerian.
Resynteza: pąki kwiatowe w stadium tuż przed otwarciem kwiatu - nakładano pyłek – na pędy z zapyłonymi słupkami nakładano izolatory – izolowano powiększone zarodki i wykładano na pożywkę MS - rośliny z kultur *in vitro* przenoszono do gleby – jarowizowano – kolchicynowano – oceniano zawartość jądrowego DNA za pomocą cytometru przepływowego.**
- 2. 96 genotypów wybranych z materiałów dwóch spółek hodowli roślin: Spółki Hodowli Roślin HR Strzelce Sp. z o.o Grupa IHAR i Spółki Hodowli Roślin HR Smolice Sp. z o.o Grupa IHAR oraz 4 odmiany wzorcowe – DK Excited F1, Arnold F1, Kuba i Derrick.
Metoda laboratoryjna polegająca na ocenie siły potrzebnej do pęknięcia łuszczyzny. Siłę [N] potrzebną do pęknięcia połączeń klap z przegrodą łuszczyzny mierzono zginając szypułkę łuszczyzny. Do pomiarów wykorzystano aparat skonstruowany w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie (Rudko 2000). Metoda laboratoryjna polegająca na ocenie czasu potrzebnego do pęknięcia łuszczyzny. Odporność łuszczyzn na pęknięcie oceniono z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej wyposażonej w pojemnik z metalowymi kulkami.**
- 3. Rekombinanty uzyskane w wyniku krzyżowania genotypów podatnych z odmianami odpornymi rzepaku ozimego, z odpornością typu Tosca. Populacja 100 linii DH (HR Strzelce, Małyszyn) uzyskana z krzyżowania odpornej na infekcję kiłą kapusty odmiany rzepaku ozimego LG Anarion, oraz linii hodowlanej rzepaku 353D podatnej na infekcję. Odporność LG Anarion jest inna niż typu Tosca.
Testy fitopatologiczne: inokulum stanowiły zarodniki przetrwalnikowe patogena; ocena systemu korzeniowego badanych genotypów po upływie 7 tygodni od siewu; obliczono indeks porażenia (ID) wyrażany w %.
Analiza molekularna za pomocą markera SCAR specyficznego dla odporności typu Tosca (charakterystyczny prążek 577 pz).**
- 4. Kolekcja 350 genotypów o różnym pochodzeniu stanowiących obiekt hodowli twórczej w HR Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, o zróżnicowanej zawartości glukozyolanów w nasionach (kolekcja GLS) (350 linii i odmian rzepaku oraz 20 linii dodatkowych).
Mapowanie asocjacyjne (GWAS). Obliczenia statystyczne mające na celu identyfikację markerów SNP wykazujących asocjację z różnymi cechami (4 cechy – zawartość glukozyolanów, tłuszczu, białka i włókna w nasionach); filtrowanie i przygotowanie danych; analiza podobieństwa genotypów; usunięcie linii o odstających wartościach fenotypowych; właściwa analiza GWAS: różne modele statystyczne: BLINK, FarmCPU, MLM, GLM i MLM**

Wyniki – 2024r.

Temat 1 – resynteza



Krzyżowanie (24 kombinacje krzyżówkowe, 7 genotypów)
 Obukierunkowe – między *B. rapa*, *B. oleracea* i mieszańcami międzygatunkowymi z odpornością na choroby (18)
 Jednokierunkowe – powyższych form z rzepakiem Valerian F1 (6)



25 mieszaneńców:

- B. rapa* (ECD 4) × *B. oleracea* (Boma)
- B. rapa* (Siloga) × rzepak Valerian F1

Mieszaneńce Analiza cytometryczna

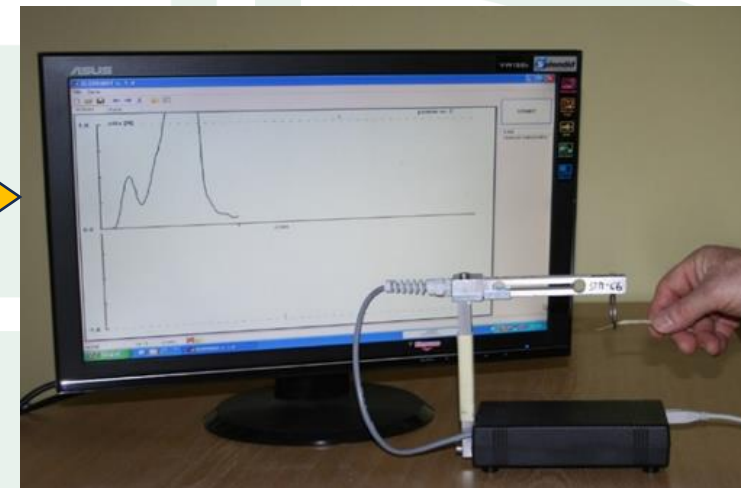
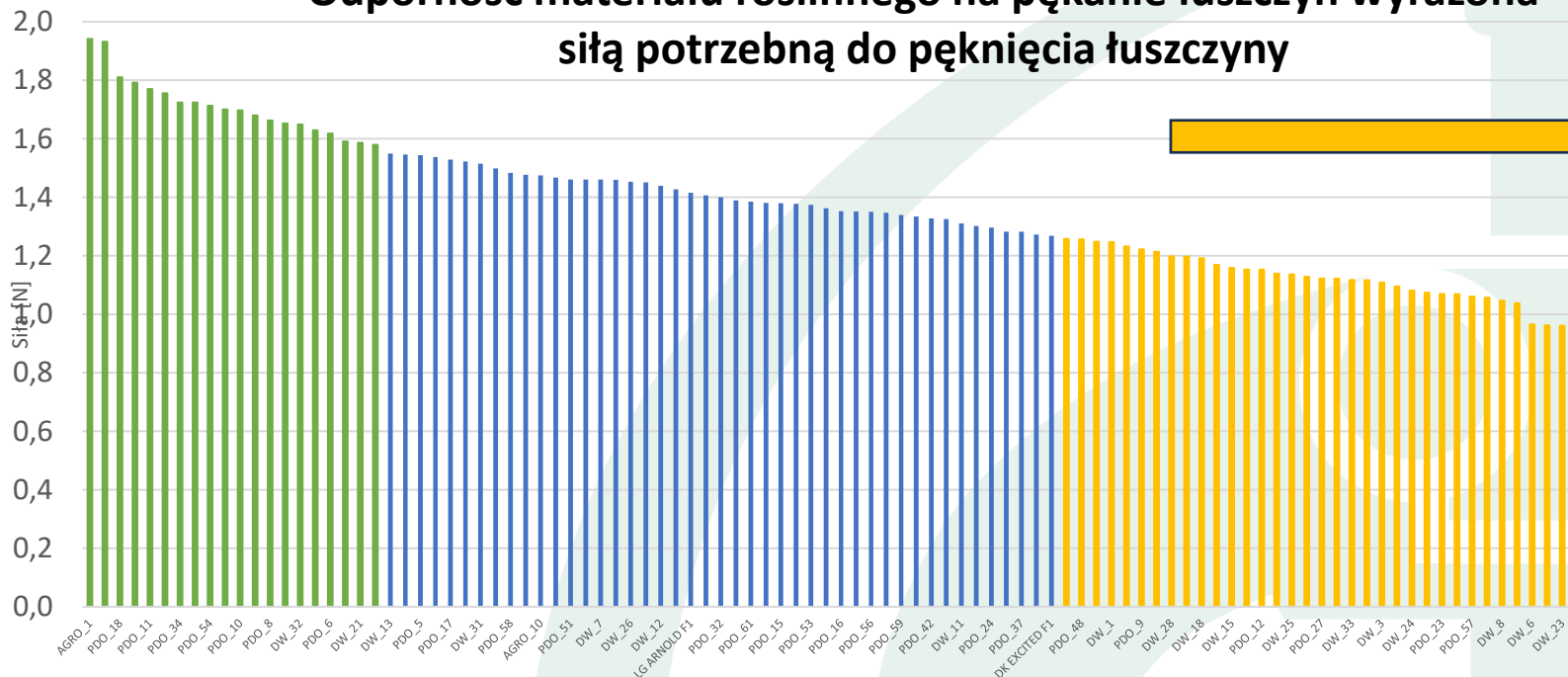


Poszukiwano odmian komercyjnych,
 ale nie udało się uzyskać nasion

Wyniki – 2024r.

Temat 2 – osypywanie

Odporność materiału roślinnego na pęknięcie tłuszczyn wyrażona siłą potrzebną do pęknięcia tłuszczyny



96 badanych genotypów
4 odmiany wzorcowe
 Wykonano **6000** testów

Metoda	Metoda polegająca na ocenie siły potrzebnej do pęknięcia tłuszczyny	Metoda polegająca na ocenie czasu potrzebnego do pęknięcia tłuszczyny
Metoda polegająca na ocenie siły potrzebnej do pęknięcia tłuszczyny	1	
Metoda polegająca na ocenie czasu potrzebnego do pęknięcia tłuszczyny	0,27**	1

** Istotne na poziomie $\alpha=0,01$

Dokonano porównania dwóch metod oceny odporności materiału roślinnego na pęknięcie tłuszczyn

Wyniki – 2024r.

Temat 1 – resynteza

Wnioski:

1. Diploidalne formy rodzicielskie użyte do resyntezy rzepaku *de novo* stwarzają możliwości zwiększenia różnicowania genetycznego oraz stanowią źródło poszukiwania odporności na choroby i stres abiotyczny tak pożądane w hodowli twórczej rzepaku.
2. W wyniku krzyżowego dwukierunkowego polimorficznych gatunków rodzicielskich *B. rapa* (3) i *B. oleracea* (3) uzyskano zarodki mieszańcowe z których rozwinęło się 9 roślin mieszańcowych. W krzyżowaniu jednokierunkowym *B. rapa* i *B. oleracea* z rzepakiem ozimym podwójnie ulepszonym odmiany Valerian F1 otrzymano 16 mieszańców międzygatunkowych.
3. Podjęto kolejną próbę sprowadzenia odmian komercyjnych *B. rapa* i *B. oleracea* charakteryzujących się odpornością na choroby i stres abiotyczny. Na wysłane mailem zapytania o możliwość sprzedaży nasion warzyw z rodzaju *Brassica* do firm na rynku amerykańskim, w Wielkiej Brytanii, Australii i Nowej Zelandii nie otrzymano żadnej odpowiedzi.

Temat 2 – osypywanie

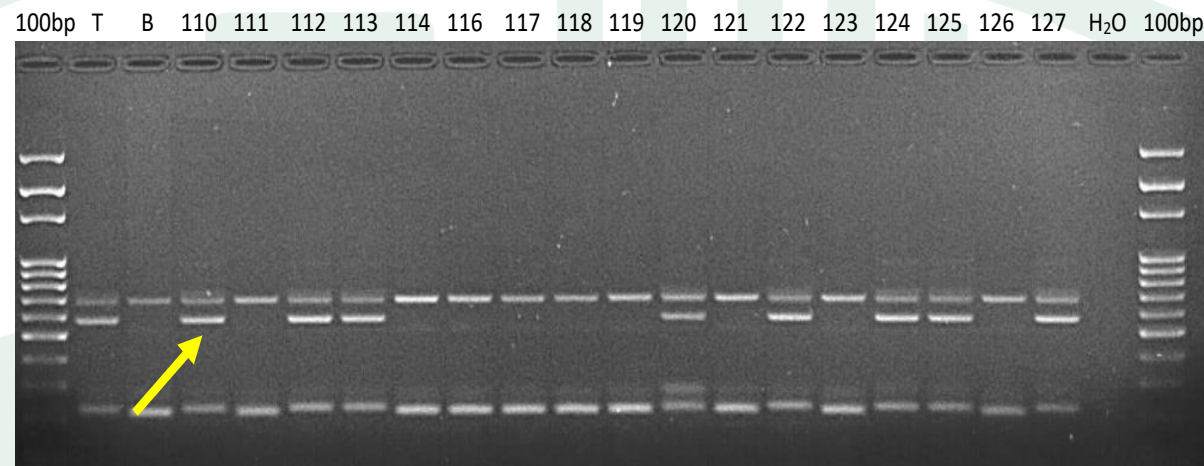
Wnioski:

1. Poddany ocenie materiał roślinny charakteryzował się wysoką odpornością na pęknięcie łuszczyn co wskazuje na możliwość jego wykorzystania w pracach stawiających sobie za cel poprawę tej tak istotnej cechy dla ograniczenia strat plonowania nowych kreacji hodowlanych oraz zmniejszenia ryzyka zanieczyszczenia samosiewami rzepaku upraw następczych w płodozmianie.
2. Małe rozproszenie badanej cechy najbardziej odpornych na pęknięcie genotypów wskazuje, że w dalszej selekcji ocenianego materiału decydujące znaczenie ogrywać będą najważniejsze cechy agronomiczne - plon, zimotrwałość, czy odporność na patogeny.
3. Większą odpornością odznaczały się odmiany mieszańcowe – LG Arnold, DK Excited, niż odmiany populacyjne – Kuba i Derrick.
4. Wykazano wysoce istotny ale niski - 0,27** związek korelacyjny wyników uzyskanych metodą polegającą na ocenie siły potrzebnej do pęknięcia łuszczyny z wynikami uzyskanymi metodą opartą na ocenie czasu potrzebnego do pęknięcia łuszczyny. Wskazuje to na potrzebę kontynuowania badań nad optymalizacją metody oceny wytrzymałości łuszczyn na pęknięcie.

Wyniki – 2024r.

Temat 3 – kiła kapusty

Analiza specyficzności markera SCAR ‘Tosca’.
 Badano **150 rekombinantów** po krzyżowaniu
 form podatnych i odpornych typu Tosca
 (HR Strzelce, Borowo)



Wśród badanych linii znaleziono **54 linie** z markerem **577 pz**,
 specyficznym dla form **odpornych**

Populacja 100 linii DH (HR Strzelce, Małyszyn)
 [LG Anarion (ID=0%) x 353D (ID=42,6%)]
 Odporność LG Anarion inna niż typu Tosca
Fenotypowanie: testy fitopatologiczne

zakres wartości indeksu
 porażenia (ID) wyniósł
od 0 do 93,8%

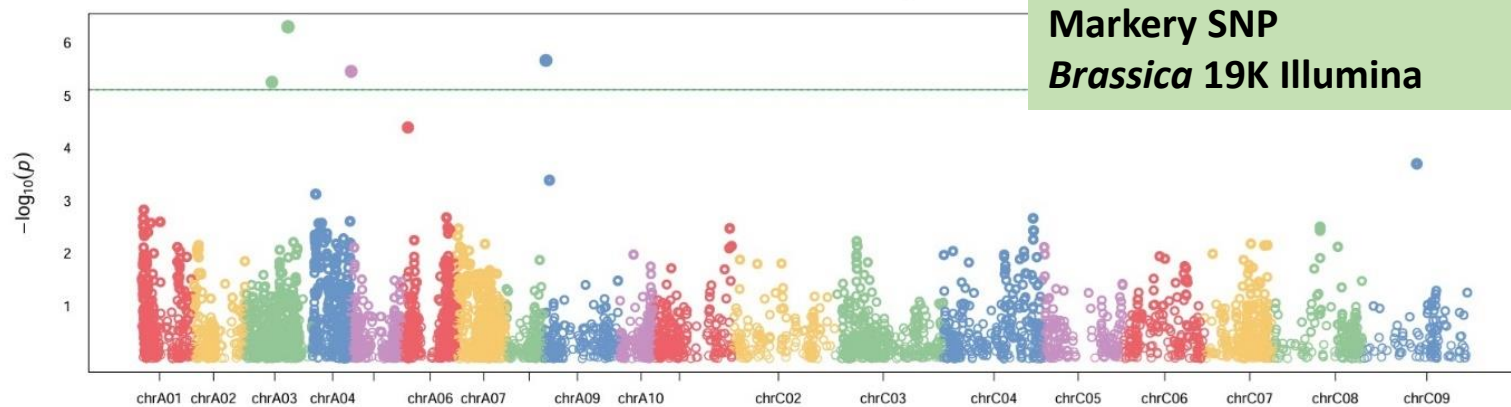
Wyniki – 2024r.

Temat 4 – analiza genomu

GWAS – kolekcja: 370 genotypów – fenotyp: NIRS z 2023r.

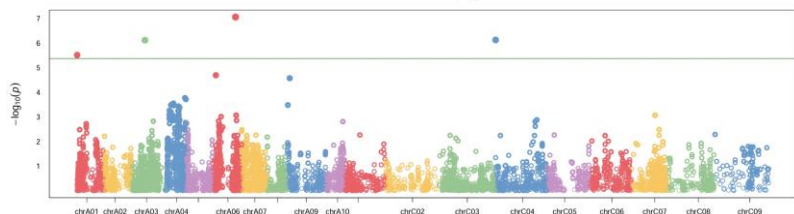
Glukozynolany • Tłuszcz • Białko • Włókno (ADF+NDF)

BLINK.sma.g



Nazwa markera SNP	Chromosom	Pozycja na chromosomie
Bn-A03-p14473296	A03	14979384
Bn-A03-p23609934	A03	24170605
Bn-scaff_26877_1-p5835	A05	450831
Bn-A01-p26767819	A09	1361662

BLINK.sma.g



Porównanie z wynikiem dla danych bez filtrowania

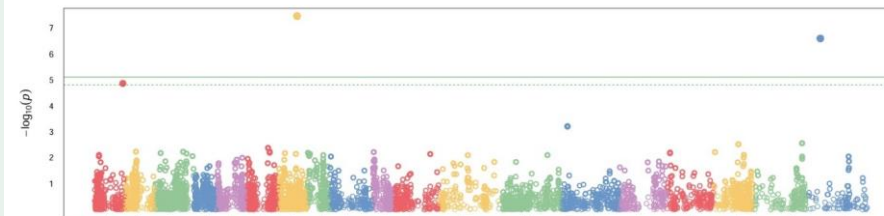
Bn-A01-p88608:chrA01:110037

Bn-A03-p14473296:chrA03:14979384

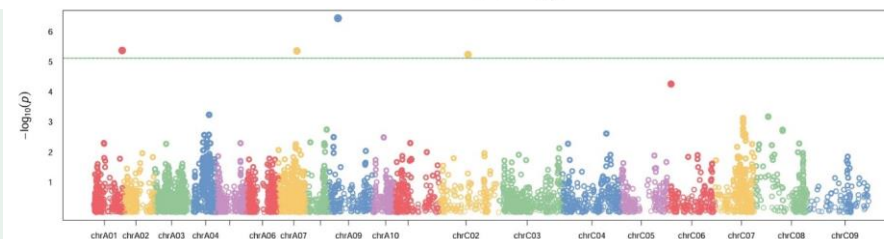
Bn-A06-p17790290:chrA06:25211760

Bn-scaff_26877_1-p5985:chrC04:265464

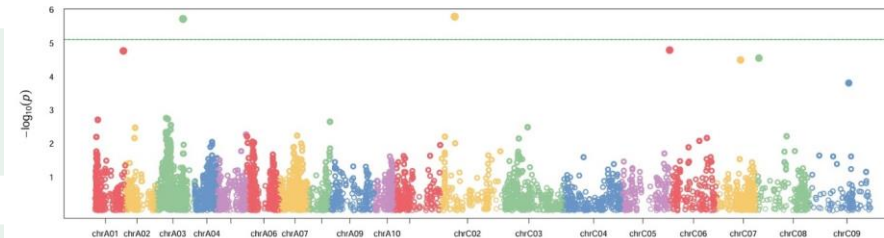
BLINK.tluszcz_jj



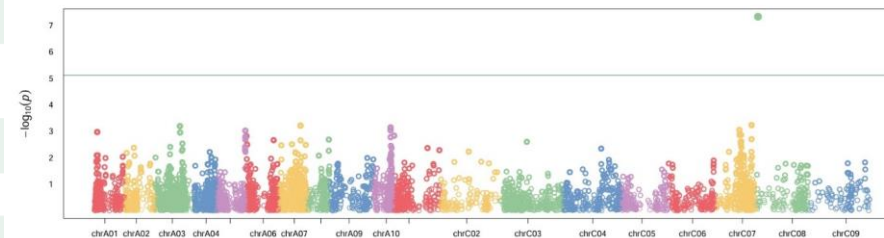
BLINK.bialko_jj



BLINK.ADF_jj



BLINK.NDF_jj



Wyniki – 2024r.

Temat 1 – kiła kapusty

Wnioski:

1. W celu potwierdzenia skuteczności markera SCAR ‘Tosca’ do identyfikacji genotypów odpornych na infekcję kiłą kapustnych należałoby przeanalizować genotypy przebadane przy pomocy tego markera DNA - z zastosowaniem testów fitopatologicznych.
2. Dalsza ocena fenotypowa przy użyciu testów biologicznych pozwoli potwierdzić uzyskane wyniki i wytypować genotypy o bardzo wysokiej odporności. Będą one przydatne w uzyskaniu nowych odmian rzepaku odpornych na infekcję kiłą kapustnych. Natomiast genotypy, które wykazały wyższy indeks porażenia, ID powyżej 25%, można wyeliminować z dalszych prac hodowlanych, skupiając się na liniach rokujących postęp hodowlany w odniesieniu do odporności na porażenie przez *P. brassicae*.
3. Należałoby przeprowadzić analizę genetyczną przebadanych fenotypowo 100 linii DH badanej populacji mapującej, w celu zainicjowania badań determinacji genetycznej odporności na infekcję kiłą kapusty innego typu niż ‘Tosca’.

Temat 2 – analiza genomu

Wnioski:

1. Przeprowadzona analiza GWAS pozwoliła na zidentyfikowanie 120 unikalnych markerów, które były istotnie powiązane z analizowanymi cechami w przynajmniej jednym modelu.
2. Dla cechy sumy zawartości glukozyolanów w nasionach, wykorzystując model BLINK, zidentyfikowano 4 markery wykazujące istotną asocjację z tą cechą dla badanej kolekcji.
3. Dla uzyskania markerów wiarygodnych, przydatnych dla dalszych badań i konwersji do markerów funkcjonalnych wskazane jest wykonywanie filtracji danych oraz wykonanie dla tych samych linii z kolekcji kolejnych analiz z wykorzystaniem danych fenotypowych z wielu sezonów wegetacyjnych.

Dziękuję za uwagę

Radzików
05-870 Błonie
tel. +48 22 733 45 00
NIP: 5290007029
REGON: 000079480
e-mail: postbox@ihar.edu.pl
www.ihar.edu.pl

Dr Marcin Matuszczak
IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu
ul. Strzeszyńska 36
60-479 Poznań
tel. +48 61 8464226, +48 61 8464222
e-mail: m.matuszczak@ihar.edu.pl