

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

Okres realizacji: 2024 rok

Zespół Wykonawców Projektu:

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

prof. UPP dr hab. Janetta Niemann, (kierownik projektu, e-mail: janetta.niemann@up.poznan.pl)

dr hab. Dorota Weigt, prof. UPP dr hab. Agnieszka Tomkowiak, dr inż. Justyna Szwarc, dr inż. Tomasz Jamruszka, mgr inż. Ewa Starosta, prof. UPP dr hab. Jan Bocianowski

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

prof. dr hab. Małgorzata Jędryczka, dr Joanna Kaczmarek, dr hab. Izabela Pawłowicz

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

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

Cele projektu w 2024 roku

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo ¹)
1.	Oszacowanie odporności na suchą zgniliznę kapustnych wybranych genotypów z rodzaju <i>Brassica</i> .	Tak
2.	Selekcja materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych.	Tak
3.	Analiza ekspresji genów odporności <i>Rlm1</i> , <i>Rlm6</i> i <i>Rlm4/7/9</i> , <i>LepR1</i> , <i>LepR2</i> i <i>BLMR2</i> w warunkach kontrolnych i po inokulacji <i>Leptosphaeria maculans</i> w liniach DH rzepaku o zróżnicowanej odporności.	Częściowo
4.	Identyfikacja nowych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na <i>Leptosphaeria spp.</i> oraz zaprojektowanie starterów i ocena ich przydatności do identyfikacji wytypowanych w 2023 roku 15 markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na <i>Leptosphaeria spp.</i>	Częściowo

Materiały i metody

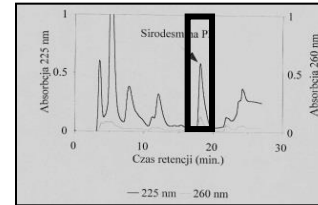
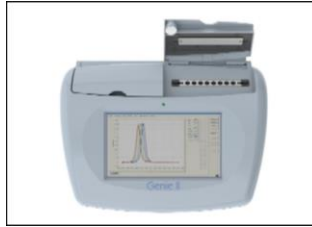
I. Materiał roślinny:

Materiał roślinny stanowiły linie DH pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce (188 genotypów) oraz najbardziej zaawansowane rody hodowlane (populacyjne oraz F1) z Hodowli Roślin Smolice (36 genotypów), a także wybrane potomstwa mieszańcowe pochodzące z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu (64 genotypy).

II. Metody badawcze

1. Testy odpornościowe:

- Ocena porażenia przez grzyby *L. maculans* i *L. biglobosa* (ocena polowa i test liścieniowy)



2. Analizy molekularne:

- Projektowanie starterów – z wykorzystaniem programu Primer 3 Plus
- Analizy PCR
- Analizy RT-qPCR
- Sekwencjonowanie – z wykorzystaniem techniki DArTseq.
- Mapowanie asocjacyjne – z wykorzystaniem analizy GWAS

3. Analizy bioinformatyczne

Temat badawczy 1

Fenotypowanie wybranych genotypów z rodzaju *Brassica* oraz populacji mapującej

CEL: Oszacowanie odporności na suchą zgniliznę kapustnych wybranych genotypów z rodzaju *Brassica*.

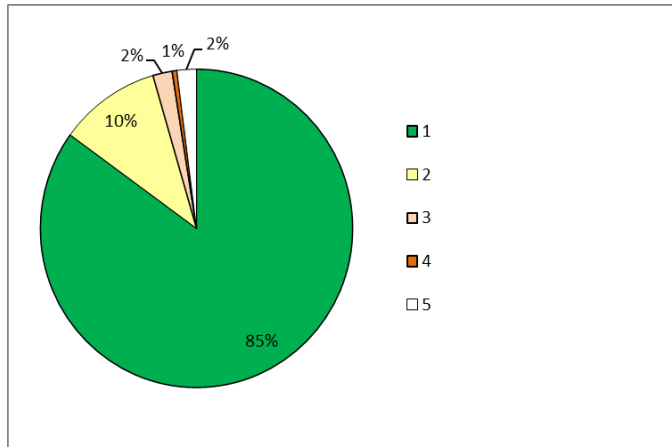
Materiał i metody

Oceny stopnia porażenia roślin przez grzyby z rodzaju *Leptosphaeria* spp. wykonane zostały w 3 lokalizacjach tj.

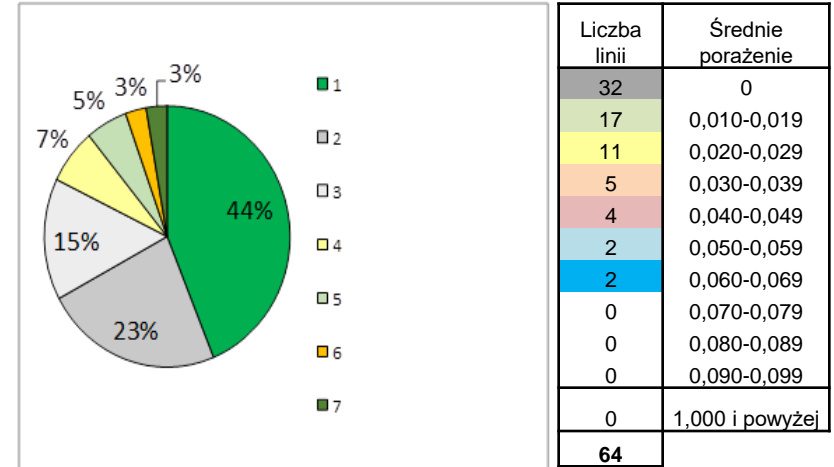
- w HR Strzelce, oddział Borowo - 188 linii DH rzepaku ozimego,
- w HR Smolice – 36 linii,
- w RGD Dłoń – 64 genotypy.

Ocenę wykonano wg skali 0-9, gdzie 0 oznaczało rośliny bez plam chorobowych, a poszczególne stopnie skali oznaczały wzrastająca liczbę plam na liściach. Obliczono średnie porażenie.

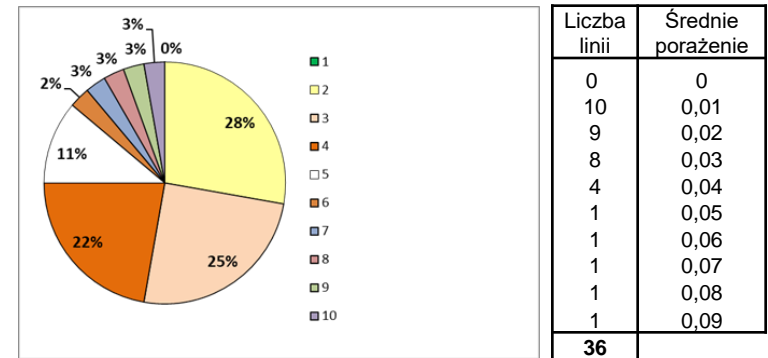
Średni stopień porażenia linii DH przez grzyby powodujące suchą zgniliznę kapustnych, HR Strzelce oddz. Borowo



Procent roślin w danej kategorii porażenia przez grzyby *Leptosphaeria* sp. w RGD Dłoń



Procent roślin w danej kategorii porażenia przez grzyby *Leptosphaeria* sp. w HR Smolice



Wnioski

- W odróżnieniu od poprzedniego roku, w którym obserwowano bardzo duże porażenie roślin przez *Leptosphaeria* spp. w obecnym roku (tzn. w 2024) porażenie było bardzo małe we wszystkich trzech obserwowanych lokalizacjach.
- Wśród form mieszańcowych największy odsetek roślin porażonych stwierdzono u mieszańców oznaczonych nr 8 i 18.
- Wśród obserwowanych linii DH w Borowie najsilniej porażona grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* była linia '58'.

Temat badawczy 2

Genotypowanie populacji mapującej.

CEL: Selekcja materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych

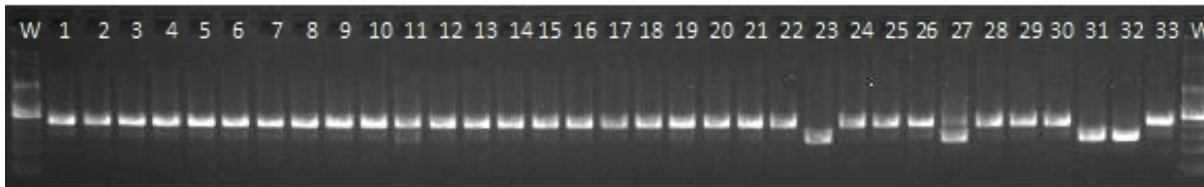
Lista markerów molekularnych, które wykorzystano w celu identyfikacji genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych, wraz z sekwencjami starterów

Materiał roślinny

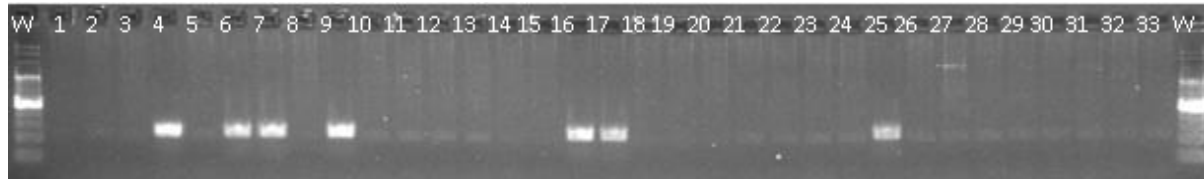
100 genotypów rzepaku (*Brassica napus* L.) pochodzących z linii podwojonych haploidów (DH) otrzymanych z Hodowli Roślin Strzelce oddział Borowo.

Marker	Identyfikowany gen	Sekwencje starterów	Źródło
Q_F19/Q_R10	<i>Rlm3</i>	F: AAATCTGTGAACCGTTAACAATGA R: TGACATGACTTCCATTTATTGTGCA	Zhang 2021
Rlm4-F2/Rlm4-7-R3	<i>Rlm4</i>	F: CACGAGATGAAAGCGCGG R: AGTAATTAGTATACTCCCTCCGT	
Rlm7-F3/Rlm4-7-R3	<i>Rlm7</i>	F: TGCACAAGATGAAAGCACAC R: AGTAATTAGTATACTCCCTCCGT	
Rlm9-F1/Rlm9-R2	<i>Rlm9</i>	F: TCGTATAGTTCTTATCGCCTGCC R: TCCGTAAGTCAGGCTATAGTGT	
BjHZ_1 ¹	<i>Rlm6</i>	R: CCAGAGACCCCAAGTAAAGCA F: CCAACCCTTCGAGGTCAATA	Rashid i in. 2018
BnHZ_2 ¹	<i>Rlm6</i>	R: TTAAAGTTTGTGAATTTCTTCCTT F: TCCATGATGTGATAACTATAGACG	
BLRC InDel ¹	<i>Rlm1</i>	F: CTATACCGAACTACACCAAGT R: CAGCTCTAGCAACACAACCTCC	Ferdous i in. 2019
Ind10-12 ¹	<i>LepR3</i>	F: GGACGGTGTGTCATGGGTGAATAACAG R: CGTTTGTAAAACCGACCTTCA	Larkan i in. 2013

Wyniki i Wnioski



Rycina 1. Przykładowy elektroforogram. Wyniki analiz molekularnych dla markera BLRC InDel (genotypy 1-33)



Rycina 2. Wyniki analiz molekularnych dla markera Rlm4-F2/Rlm4-7-R3 (genotypy 1-33)

Pięć z ośmiu przetestowanych markerów wykazuje duży potencjał użyteczny. Z tego względu badania wykonywane w ramach projektu mogą stać się kluczowym wsparciem hodowli rzepaku w Polsce. Najbardziej przydatne do selekcji okazały się markery Q_F19/Q_R10, Rlm4-F2/Rlm4-7-R3, Rlm7-F3/Rlm4-7-R3, Rlm9-F1/Rlm9-R2 i marker BLRC InDel.

Temat badawczy 3

Profilowanie ekspresji wybranych genów odporności

CEL: Analiza ekspresji genów odporności *Rlm1*, *Rlm6* i *Rlm4/7/9*, *LepR1*, *LepR2* i *BLMR2* w warunkach kontrolnych i po inokulacji *Leptosphaeria maculans* w liniach DH rzepaku o zróżnicowanej odporności.

Materiał i metody

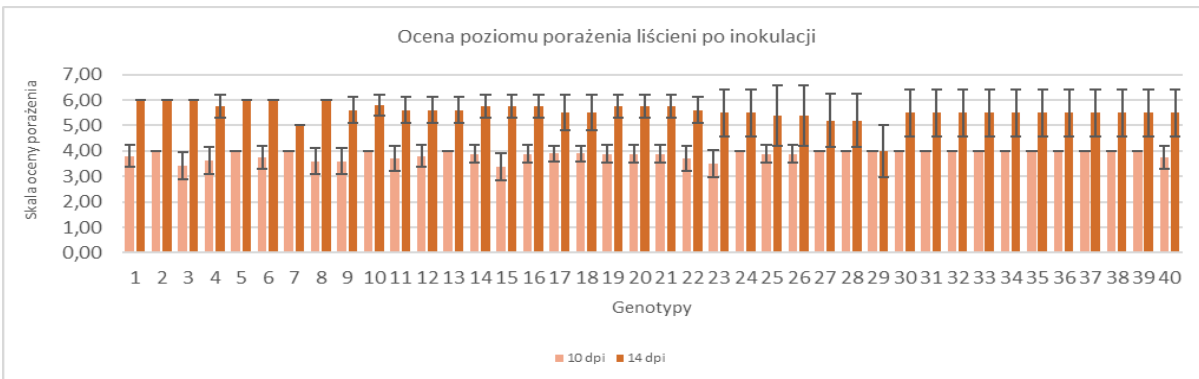
Materiał roślinny stanowiły linie DH rzepaku pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce (40 genotypów) o zróżnicowanej odporności na suchą zgniliznę kapustnych.

Tabela 1. Lista kandydujących genów referencyjnych.

Gen warunkujący odporność	Gen kandydacki
<i>Rlm1</i>	BnaA07G27460D [1]
<i>Rlm6</i>	BjuA043308 [2]
<i>Rlm4/7/9</i>	BnaA07g20220D [3]
<i>LepR1</i>	BnaA02g33310D3 [4]
<i>LepR2</i>	Bo9g126150[5]
<i>BLMR2</i>	BnaA10g11280D[6]

- Nasiona materiałów hodowlanych (40 linii DH otrzymanych z HR Strzelce) wysiewano do kuwet. Hodowlę prowadzono w komorze z kontrolowanymi warunkami temperatury i wilgotności przez 10 dni w temperaturze 22°C w dzień i 16°C w nocy przy 12-godzinnym fotoperiodzie.
- 14-dniowe siewki zostały poddane inokulacji *Leptosphaeria spp.*
- Ocenę objawów chorobowych wykonano po 14 dniach od inokulacji.
- Materiał roślinny (liścienie) zebrany został 14 dni po inokulacji i umieszczony w ciekłym azocie, a następnie był przechowywany w -80°C do dalszych analiz.
- Wyizolowano całkowite RNA za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji
- Analizy ekspresji wybranych genów odporności są prowadzone za pomocą dwuetapowej metody Real-Time qPCR (RT-qPCR).

Wykres 1. Ocena objawów chorobowych inokulowanych liścieni linii DH rzepaku 10 i 14 dni po infekcji *Leptosphaeria maculans*.



Wnioski

Ze względu na to, że badania są w toku, wnioski zostaną sformułowane po zakończeniu analiz.



Fot. 1 a-b. Linie DH rzepaku 14 dni po inokulacji izolatem *Leptosphaeria maculans* próba kontrolna (a), próba badawcza (b).

Temat badawczy 4

Identyfikacja markerów sprzężonych z genami odporności

CEL: Identyfikacja nowych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.* (a) oraz zaprojektowanie starterów i ocena ich przydatności do identyfikacji wytypowanych w 2023 roku 15 markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.* (b).

a) Identyfikacja nowych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.*

Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiły 188 genotypy, tj. linie DH oraz genotypy referencyjne pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce, oddział Borowo.

➤ Izolacja DNA

Izolację DNA z 188 genotypów, które zostały przekazane do sekwencjonowania nowej generacji przeprowadzono przy użyciu kitu firmy A&A Biotechnology.

➤ Genotypowanie

Genotypowanie wykonane zostało z wykorzystaniem technologii DArTseq, opartej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Analizy zostały wykonane w Diversity Arrays Technology, University of Canberra w Australii.

➤ Mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem analizy GWAS

Za pomocą analizy GWAS zostanie wykonane mapowanie asocjacyjne dla cech odpornościowych.

Mapowanie to zostanie wykonane na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania. Dane genotypowe otrzymane będą z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowiąc będą wyniki dotyczące odporności roślin na suchą zgniliznę kapustnych.

Wyniki

W analizowanym materiale zidentyfikowano **60 067 markerów silicoDArT** i **43 831 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP)**.

Jako genom referencyjny wykorzystano genom Brassica_v41_napus, gdzie parametry dopasowania sekwencji (BLAST - Basic Local Alignment Search Tool) stanowiły: minimalny procent podobieństwa: 80% i E-value: 5e-7. Aktualnie przeprowadzany jest ostatni etap analiz tj. mapowanie asocjacyjne dla cech odpornościowych. Mapowanie to wykonywane jest na podstawie wyników uzyskanych z genotypowania oraz fenotypowania.

Wnioski

Ze względu na to, że badania są w toku - aktualnie przeprowadzana jest korelacja cech odpornościowych z wynikami otrzymanymi z sekwencjonowania, wnioski zostaną sformułowane po zakończeniu analiz, tj. do końca grudnia 2024.

b) zaprojektowanie starterów i ocena ich przydatności do identyfikacji wytypowanych w 2023 roku 15 markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.*

Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiło 20 linii podwojonych haploidów (DH) rzepaku, w tym 10 linii o podwyższonej odporności i 10 o niskiej odporności na *Leptosphaeria spp.*, pochodzących z Hodowli Roślin Strzelce, oddział Borowo.

➤ Ocena porażenia w warunkach polowych

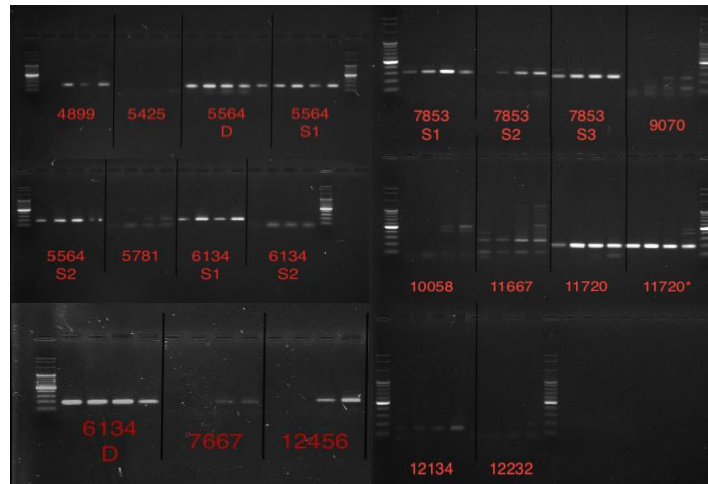
Linie te zostały ocenione w dziesięciostopniowej skali (0-9, gdzie: 0 – brak objawów, 9 - cała roślina obumarła, brak łuszczyń, liczne piknidia na pędzie głównym i pędach bocznych) wg metodyki Jędryczki (2006) pod względem stopnia porażenia *Leptosphaeria spp.* w warunkach polowych.

➤ Zaprojektowanie starterów do reakcji PCR

Dla każdego z 15 markerów związanych z odpornością na suchą zgniliznę kapustnych wytypowanych w 2023 roku (9 DArT i 6 SNP) zaprojektowano przynajmniej jedną parę starterów.

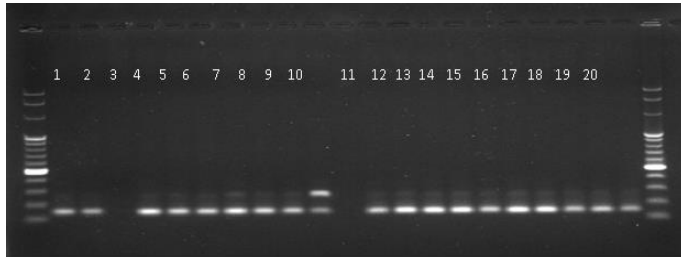
➤ Analizy PCR

Fig.1 Gradient temperaturowy wykonany dla 21 par starterów w zakresie temperatur kolejno: 59,2 - 57,5 - 53,2 - 50°C



Tab. 1. Lista markerów i par starterów oraz spodziewane wielkości produktów reakcji PCR.

Numer markera	Typ markera	Pary starterów	Wielkość produktu PCR (pz)
m[4899]	SilicoDArT	4899D	216
m[5425]	SilicoDArT	5424S	198
m[5564]	SilicoDArT	5564D	188
		5564S1	199
		5564S2	191
m[5781]	SilicoDArT	5781S	203
m[6134]	SilicoDArT	6134S1	186
		6134S2	183
		6134D	196
m[7667]	SilicoDArT	7667S	185
m[7853]	SilicoDArT	7853S1	324
		7853S2	316
		7853S3	284
m[9070]	SilicoDArT	9070S	268
m[10058]	SNP	10058S	361
m[11667]	SNP	11667S	273
m[11720]	SNP	11720S	209
m[7889]	SilicoDArT		
m[12134]	SNP	12134S	153
m[12232]	SNP	12232S	202
m[12456]	SNP	12456S	215

b) zaprojektowanie starterów i ocena ich przydatności do identyfikacji wytypowanych w 2023 roku 15 markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.***Wyniki i wnioski**

Fot. 11. Marker 9070S.



Fot. 12. Marker 7853S1.

W sumie przeanalizowano 17 par starterów. W wyniku reakcji PCR otrzymano wzory prążkowe dla wszystkich analizowanych par starterów. Rozmiary produktów były zgodne z przewidywanymi. Wyjątek stanowił marker 6134D oraz 9070S, dla których otrzymano niespecyficzny produkt o rozmiarze kolejno ok 510 pz i 150 pz.

Dla markera 9070S otrzymano produkt o przewidywanym rozmiarze 268 pz jedynie u jednego genotypu (Fot.11).

Dla markera typu silicoDArT m[5564] zaprojektowano trzy pary starterów (5564S1, 5564S2 i 5564D). Dla dwóch z nich w reakcji PCR otrzymano takie same wzory prążkowe wśród wszystkich badanych genotypów. Podobnie marker m[7853] charakteryzował się takim samym wzorem prążkowym produktów reakcji PCR z wykorzystaniem trzech par starterów (7852S1, 7853S2 oraz 7853S3).

Ponadto, markery 4899D, 5564S2, 6134S1, 5564D, 5781S, 12456S, 122232S skutecznie różnicowały genotypy o podwyższonej odporności od genotypów o niskiej odporności na suchą zgniliznę kapustnych. Produkty reakcji PCR otrzymano dla markerów 5564D, 6134S1, 5781S 12456S jedynie wśród linii DH sklasyfikowanych jako linie o podwyższonej odporności na suchą zgniliznę kapustnych

Zaprojektowane i analizowane pary starterów pozwalają na skuteczną identyfikację markerów typu silicoDArT i SNP związanych z odpornością na suchą zgniliznę kapustnych wytypowanych w 2023 roku.

Miernik zadania – stopień realizacji

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1.	2	3	4	5
Temat badawczy 1				
1.1	Liczba genotypów ocenianych na <i>Leptosphaeria</i> spp. w warunkach polowych	288	288	1
1.2	Liczba genotypów ocenianych pod kątem odporności na patogeny grzybowe w doświadczeniu w komorze fitotronowej	40	40	1
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba analizowanych markerów	8	8	1
2.2	Liczba analizowanych genotypów	100	100	1
Temat badawczy 3				
3.1	Liczba analizowanych genów odporności	6	6	0,5
3.2	Liczba analizowanych genotypów	40	40	1
Temat badawczy 4				
4.1	Liczba genotypów poddanych sekwencjonowaniu nowej generacji, z którego wyniki zostaną wykorzystane do mapowania asocjacyjnego	188	188	0,5
4.2	Liczba genotypów testowanych w ramach oceny przydatności zaprojektowanych starterów do identyfikacji techniką PCR 15 markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na <i>Leptosphaeria</i> spp.	20	20	1
ŚREDNIA				0,9
% REALIZACJI ZADANIA				87,5%

I. Wykład konferencyjny

- Niemann J., Szwarz J., Starosta E., Jamruszka T., Kaczmarek J., Jędrzycka M. High-throughput identification of novel molecular markers for the detection of blackleg (*Leptosphaeria* spp.) resistance in rapeseed. 19th IOBC –WPRS Working Group meeting on: “Integrated Control in Oilseed Crops. Are we nearly there yet?”. Dresden, Germany, 10-11.09.2024

II. Publikacja

- Starosta E., Jamruszka T., Szwarz J., Bocianowski J., Jędrzycka M., Grynja M., Niemann J. DArTseq-Based, High-Throughput Identification of Novel Molecular Markers for the Detection of Blackleg (*Leptosphaeria* Spp.) Resistance in Rapeseed. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 8415. <https://doi.org/10.3390/ijms25158415>