

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

Okres realizacji: 2022 rok

Zespół Wykonawców Projektu:

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Prof. UPP dr hab. Janetta Niemann, (Kierownik zadania, e-mail: niemann@up.poznan.pl)

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

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Prof. dr hab. Małgorzata Jędryczka, dr Joanna Kaczmarek, mgr. Witold Irzykowski, 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 2022 roku

1. 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 - **cel osiągnięto**.
2. Analiza ekspresji wybranych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych (gen *Rlm3*, *Rlm6* i *Rlm7*) w genotypach o zróżnicowanym stopniu odporności - **cel osiągnięto**.
3. Selekcja materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych oraz wykorzystanie sekwencji genów ortologicznych jako markerów do monitorowania potomstwa mieszańcowego z podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* spp. - **cel osiągnięto**.

Materiały i metody

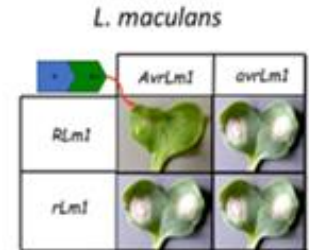
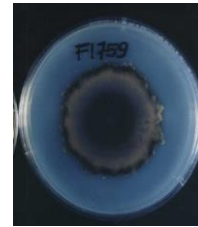
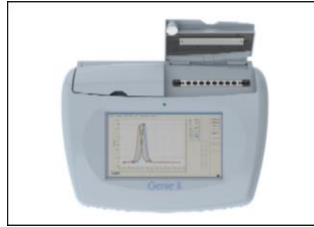
I. Materiał roślinny:

Materiał roślinny (łącznie 75 genotypów) stanowiły najbardziej zaawansowane rody hodowlane (populacyjne oraz F_1), pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce oraz Hodowli Roślin Smolice, a także wybrane potomstwa mieszańcowe pochodzące z kolekcji Katedry i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

II. Metody badawcze

1. Krzyżowanie oddalone (temat badawczy 1),
2. Kultury *in vitro* izolowanych mikrospor stosowane w celu otrzymania linii DH (temat badawczy 1),
3. Testy odpornościowe (temat badawczy 1):

- Ocena porażenia przez grzyby *L. maculans* i *L. biglobosa* (ocena polowa i test liścieniowy)
- detekcja genów awirulencji wśród populacji *L. maculans*

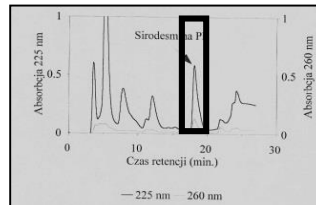


Test liścieniowy w komorze klimatycznej
20°C dzień/18°C noc

Ocena po 14 do 21 dniach
Wg skali 0-6

4. Analizy molekularne:

- Analizy PCR (temat badawczy 3)
- Analizy RT-qPCR (temat badawczy 2)



Wyniki

Temat badawczy 1

Ocena fenotypowa materiału roślinnego pod kątem odporności na *Leptosphaeria spp.* oraz wyprowadzenie populacji mapującej

Testy odpornościowe dla wybranych materiałów roślinnych, na porażenie przez *Leptosphaeria maculans* zostały przeprowadzone na polach doświadczalnych RGD Dłoń koło Rawicza oraz polach doświadczalnych należących do HR Strzelce.

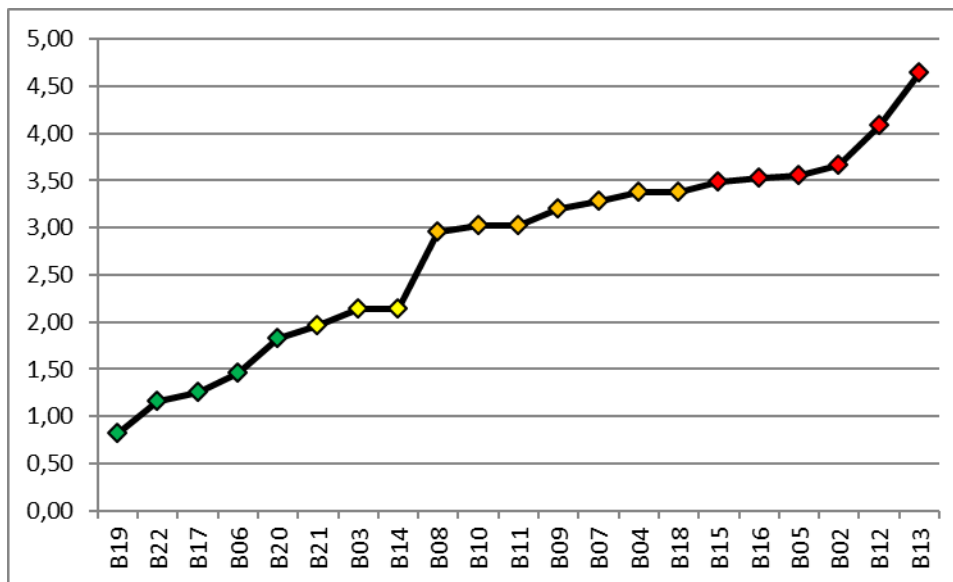
Tabela 1. Średni stopień porażenia odmian rzepaku przez grzyby powodujące suchą zgniliznę kapustnych, jesień 2022, Dłoń

Odmiana	Średni stopień porażenia	
Anderson	0,17	a
Andromeda	0,33	ab
Jet Neuf	1,17	abc
Darmor	1,33	bc
Kabriolet	1,33	bc
Amir	1,33	bc
Rubin	1,50	c
Californium	1,67	cd
Bufalo	1,78	cd
Graf F1	1,83	cd
Arsenal	1,83	cd
Hary	2,00	cd
Sofia	2,17	cd
Prince	2,17	cd
Hybrirock	2,67	d

te same litery oznaczają brak różnic statystycznych przy poziomie $P > 0,05$

Najsłabiej były porażone odmiany Anderson i Andromeda.

Rysunek 1. Średni stopień porażenia form hodowlanych rzepaku HR Strzelce, Oddział Borowo badanych w 2022 roku (porażenie naturalne grzybami rodzaju *Leptosphaeria sp.* (*Plenodomus sp.*))



Do najbardziej odpornych należały linie 'Borowo 19', 'Borowo 22', 'Borowo 17', 'Borowo 06' i 'Borowo 20'.

Najsilniej porażone grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* były linie 'Borowo 13', 'Borowo 12'.

Wyniki

Wnioski:

1. Grzyb. *L. maculans* był gatunkiem dominującym na liściach potomstw mieszańcowych w Dłoni.
2. W Dłoni najslabiej były porażone odmiany rzepaku Anderson i Andromeda, natomiast wśród form mieszańcowych najmniejszy odsetek roślin porażonych stwierdzono na u mieszańców oznaczonych nr 37.
3. W HR Strzelce, o. Borowo linie hodowlane poddane ocenie były silnie zróżnicowane pod względem porażenia grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* (*Plenodomus* sp.); różnica pomiędzy najmniej a najsilniej porażoną formą była 5,7-krotna.
4. 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.
5. 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.

Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów ocenianych na <i>Leptosphaeria</i> spp. w warunkach polowych	75	75
2.	Liczba genotypów mieszańcowych ocenianych pod kątem odporności na patogeny grzybowe w doświadczeniu w komorze fitotronowej	25	25
3.	Liczba kombinacji krzyżowania	30	30

Wyniki

Temat badawczy 2

Profilowanie ekspresji wybranych genów odporności

Sekwencje starterów genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych *Rlm 3*, *Rlm 4*, *Rlm 7* i genu referencyjnego – aktywny

Gen	Forward	Reverse	Długość amplikonu
<i>Rlm 3</i>	CCATCACGTCTCCCTCAAGT	ACAAGCTCGTTCAAGCACCT	242
<i>Rlm 4</i>	ACCTTTGATCGTCGTTGAGG	GGACAAGAGACGCCCAATA	218
<i>Rlm 7</i>	TCTTCACCAAGGGCTTCTGT	TTGCTGTCACGCCTTAACTG	206
Aktywny	GCCATTCAAGCTGTCCTCTC	CTCTGACGATTTACGCTCA	229

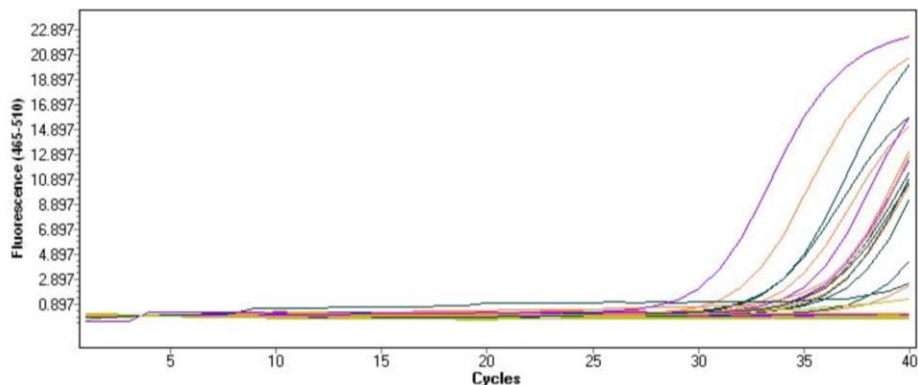
Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiło 25 genotypów, w tym genotypy rodzicielskie i mieszańcowe otrzymane z HR Smolice. Analizy prowadzone były na materiale roślinnym nieinokulowanym oraz po inokulacji patogenem *Leptosphaeria maculans*.

Tabela 1. Badane genotypy

Lp.	Genotyp	13	AKILAH
1	ABSOLUT x GEMINI	14	DOMINATOR
2	AKILAH x SY ILONA	15	GEMINI
3	AKILAH x BONO	16	SY ILONA
4	DOMINATOR x GEMINI	17	LG ARETI
5	LG AVIRON x GEMINI	18	ABSOLUT
6	KICKER x BONO	19	LUCIANO KWS
7	LG ANARION x GEMINI	20	BIRDY
8	LUCIANO KWS x SY ILONA	21	LG ANARION
9	LG ARETI x GEMINI	22	KICKER
10	BIRDY x KICKER	23	KW 65
11	LG AVIRON	24	MS8 x B. carinata
12	BONO	25	MS8 (KW 81)

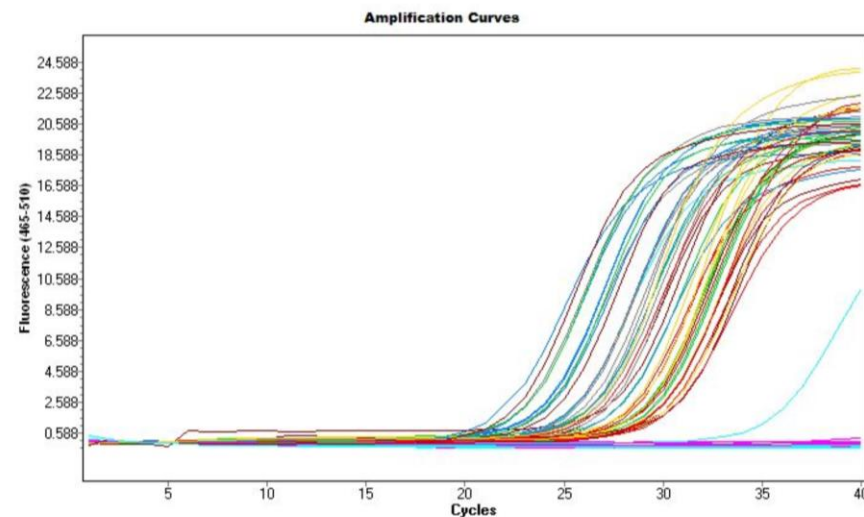
Wyniki



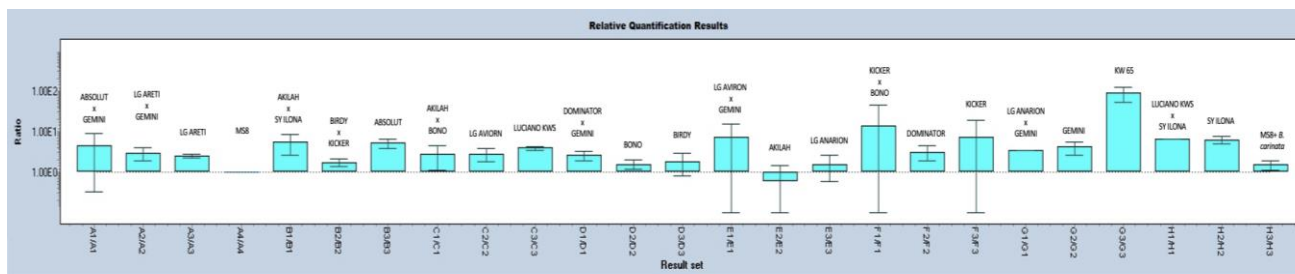
Rysunek 3. Pomiar fluorescencji genu *Rlm 3*

Wyniki analizy ekspresji genów (RT-qPCR) w przypadku prób nie poddanych inokulacji patogenem może wskazywać na fakt, że geny *Rlm 3* oraz *Rlm 7* nie podlegają ciągłej ekspresji, a są jedynie indukowane pod wpływem obecności patogenu.

Ponadto zauważono, że poziom ekspresji genu *Rlm 7* jest zróżnicowany pomiędzy badanymi genotypami.



Rysunek 4. pomiar fluorescencji genu *Rlm 7*



Rysunek 5. Wykres stosunku ekspresji genu *Rlm 7* do genu referencyjnego aktywny u badanych genotypów.

Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba analizowanych genów odporności	3	3
2.	Liczba analizowanych genotypów	25	25

Wyniki

Temat badawczy 3

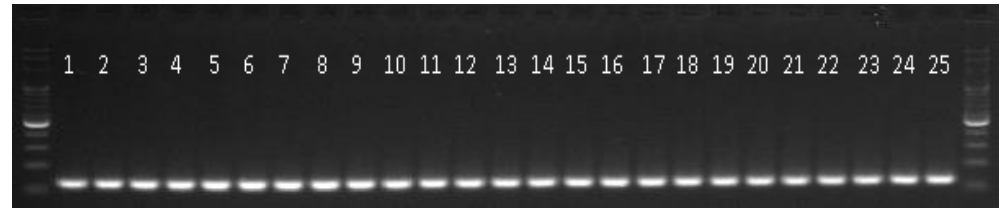
Identyfikacja markerów sprzężonych z genami odporności

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

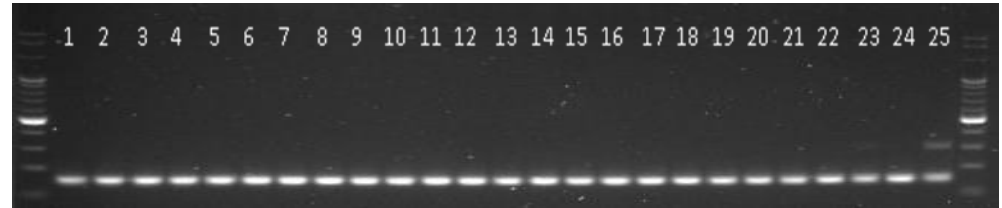
Lista markerów molekularnych wykorzystanych w celu detekcji genów R / QTL związanych z suchą zgnilizną kapustnych

Marker	Sekwencje starterów
Bo9g117290	F: CACCAATCAACTGGAACCTTGAA R: GACGTTGACTGCGTACTCTTTG
Bo9g111510	F: GTAATGATCCGGAGGTTGTTTC R: TGAGTTATTCGTGGAGCTCTT
Bo2g131620	F: TAGCTGACAAGTCCCTCATTCA R: CATCACAAAATACCTTGCGAGTC
10BM	F: TGCAGGCAATTATTTTCAGTGG R: AGCTTATGTTAGGTGGAAG
80E24a	A: GACAAACACAATGGACTCAA B: GAGGTAGAGAAAGACGAAGA R: A ₂₀ TCGTTTAAGGAATGTGCCAA
At1g80400	F: AGTCCTTGA-GGCCTT AGAGAAGA R: CGTTTGAGGACTGTGTTGTCC
At1g80530	F: GACGTTCCCGCTTTACTCC R: CTCATAGGAAAATTCCTCATATTGGT
Xbrms075	R: ACCTTAAATGTTAAGTAAGCTAAAC F: GTTTCACATATTTTCTCTGTTTATT
BjHZ_1	R: CCAGAGACCCCAGTTAAGCA F: CCAACCTTCGAGGTCAATA
BnHZ_2	R: TTAAAGTTTGTGAATTTCTTCTT F: TCCATGATGTGATAACTATAGACG

Markery Bo9g117290 oraz Bo9g111510 są związane z genem *LepR2* położonym na chromosomie A10. Specyficzny produkt reakcji PCR o wielkości 128pz oraz 152pz (odpowiednio dla pierwszego i drugiego markera) został uzyskany dla wszystkich analizowanych prób (Ryc. 1-2).



Rycina 1. Wyniki analiz molekularnych dla markera Bo9g117290 (genotypy 1-25)



Rycina 2. Wyniki analiz molekularnych dla markera Bo9g111510 (genotypy 1-25)

Wnioski

Zastosowanie 10 analizowanych par starterów pozwoliło na uzyskanie spodziewanych produktów reakcji PCR, co umożliwiło określenie obecności lub braku fragmentów genomu związanych z odpornością na *L. maculans*.

Uzyskane wyniki w przypadku większości markerów pozwalają na potwierdzenie ich skuteczności do identyfikacji genotypów zawierających wybrane geny odporności lub QTL.

Wyniki

Wykorzystanie sekwencji genów ortologicznych jako markerów do monitorowania potomstwa mieszańcowego z podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* spp.

Zidentyfikowane sekwencje ortologiczne dla wybranych genów odporności.

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

AT1G69160

W kombinacji krzyżówkowej 224 uzyskano pojedyncze formy mieszańcowe, natomiast w pozostałych analizowanych kombinacjach znajdowały się tylko allele *B. napus*

50 <i>B. napus</i> cv. Lisek x <i>B. rapa</i> Pak Choi (98CI)								M	224 <i>B. napus</i> cv. Zhouzhuang 9 x <i>B. rapa</i> ssp. pekinensis (08006169)								M	228 <i>B. napus</i> cv. Zhouzhuang 9 x <i>B. rapa</i> ssp. chinensis (08007574)							
1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>		<i>snps</i>	heterozygota	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	heterozygota	<i>snps</i>		<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>	<i>snps</i>

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba analizowanych markerów	10	10
2	Liczba genów dla których poszukiwane będą sekwencje związane z odpornością na <i>Leptosphaeria</i> spp.	3	3

Wykaz publikacji wyników projektu w 2022 roku

I. Doniesienia konferencyjne

1. Niemann J., Szwarc J., Starosta E., Irzykowski W., Kaczmarek J., Jędrzycka M. Marker assisted selection in *Brassica napus* breeding for stem canker (*Leptosphaeria ssp.*) resistance. IOBC-WPRS Working Group "Integrated Control in Oilseed Crops", Rennes, France, 17-18.05.2022.
2. Szwarc J., Starosta E., Kaczmarek J., Jędrzycka M., Irzykowski W., Niemann J. Identification of orthologous sequences suitable for Marker Assisted Selection. Polski Kongres Genetyki, Kraków

II. Publikacja

1. Szwarc, J.; Niemann, J.; Kaczmarek, J.; Bocianowski, J.; Weigt, D. 2022. Genetic Relationship of Brassicaceae Hybrids with Various Resistance to Blackleg Is Disclosed by the Use of Molecular Markers. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44, 4290-4302.
<https://doi.org/10.3390/cimb44090295>
(70 pkt MNiSW, IF= 2,976)