

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

Okres realizacji: 2023 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, dr 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, 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 2023 roku

1. Oszacowanie odporności na suchą zgniliznę kapustnych wybranych genotypów z rodzaju *Brassica*, a także otrzymanie nasion mieszańcowych niezbędnych do wyprowadzenia populacji mapującej, tj. linii DH - **cel osiągnięto**.
2. Selekcja materiału roślinnego przy użyciu markerów DNA typu PCR wybranych na podstawie danych literaturowych - **cel osiągnięto**.
3. Analiza ekspresji wybranych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych (gen *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7*) w genotypach o zróżnicowanym stopniu odporności - **cel osiągnięto częściowo**.
4. Identyfikacja nowych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.* – **cel osiągnięto częściowo**.

Materiały i metody

I. Materiał roślinny:

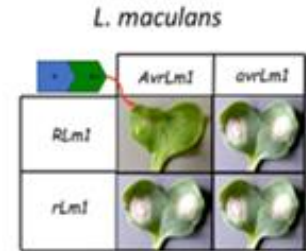
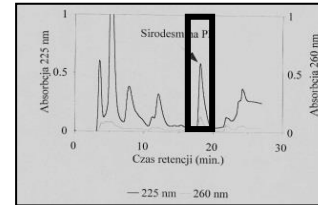
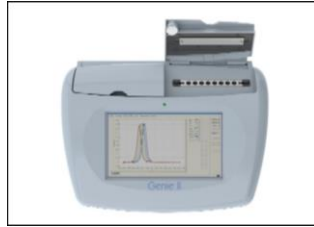
Materiał roślinny stanowiły linie DH pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce (192 genotypy) oraz najbardziej zaawansowane rody hodowlane (populacyjne oraz F1) z Hodowli Roślin Smolice, a także wybrane potomstwa mieszańcowe pochodzące z kolekcji Katedry i Hodowli Roślin UP w Poznaniu.

II. Metody badawcze

1. Testy odpornościowe:

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

2. Krzyżowanie oddalone,



Test liścienny w komorze klimatycznej
20°C dzień/18°C noc.

Ocena po 14 do 21 dniach
Wg skali 0-6

3. Analizy molekularne:

- Analizy PCR
- Analizy RT-qPCR
- sekwencjonowanie

Temat badawczy 1

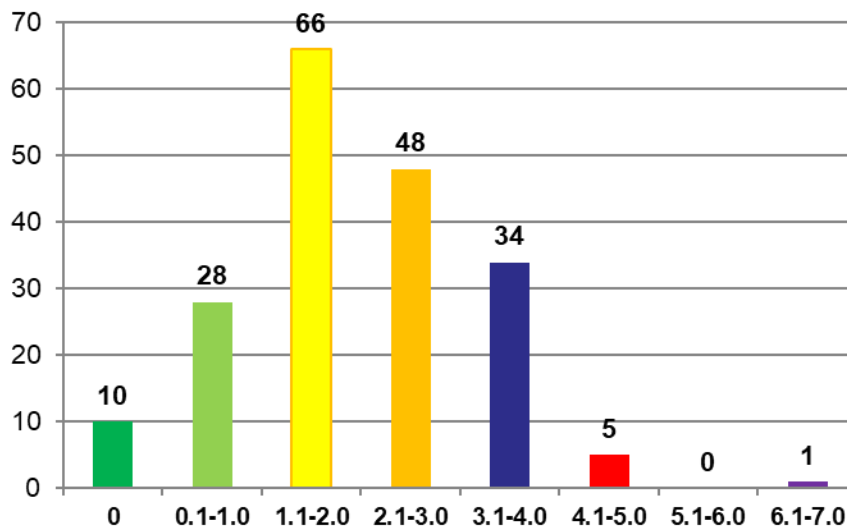
Fenotypowanie wybranych genotypów z rodzaju *Brassica* oraz populacji mapującej

CEL: Oszacowanie odporności na suchą zgniliznę kapustnych wybranych genotypów z rodzaju *Brassica*, a także otrzymanie nasion mieszańcowych niezbędnych do wyprowadzenia populacji mapującej, tj. linii DH

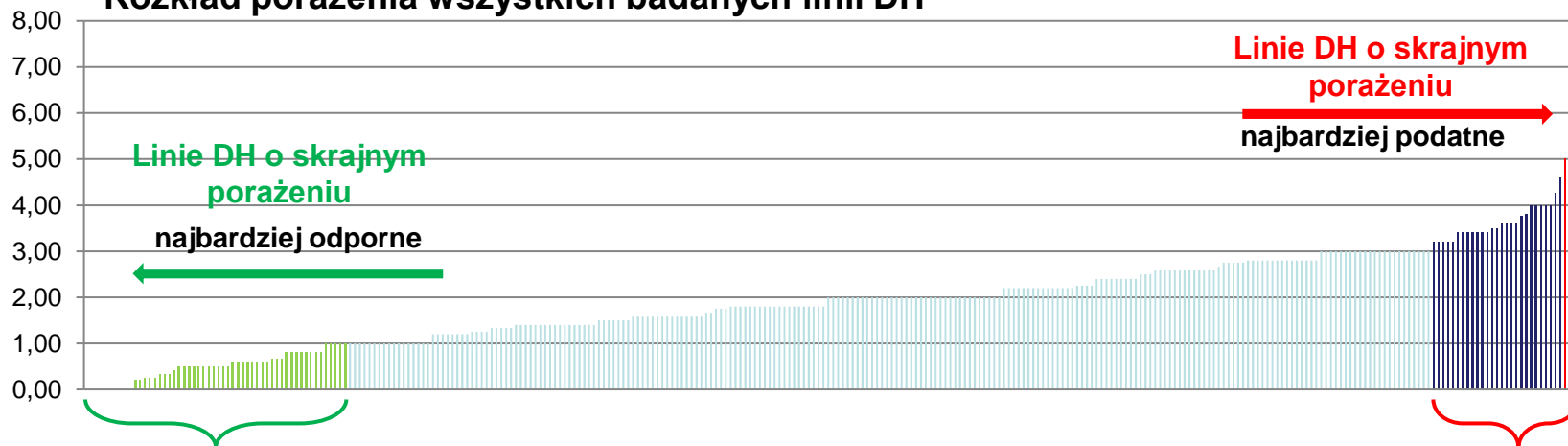
Ocena porażenia linii DH rzepaku, HR Strzelce Oddz. Borowo - Wyniki

Materiał i metody

Oceniono stopień porażenia suchą zgnilizną kapustnych (stadium plam na liściach) 192 linii DH rzepaku ozimego. Ocenę wykonano w dniach 5-7 listopada 2023 wg skali 0-9, gdzie 0 oznaczało rośliny bez plam chorobowych a poszczególne stopnie skali oznaczały wzrastającą liczbę plam na liściach. Obliczono średnie porażenie. Na roślinie stwierdzano od 0 do 8 plam.



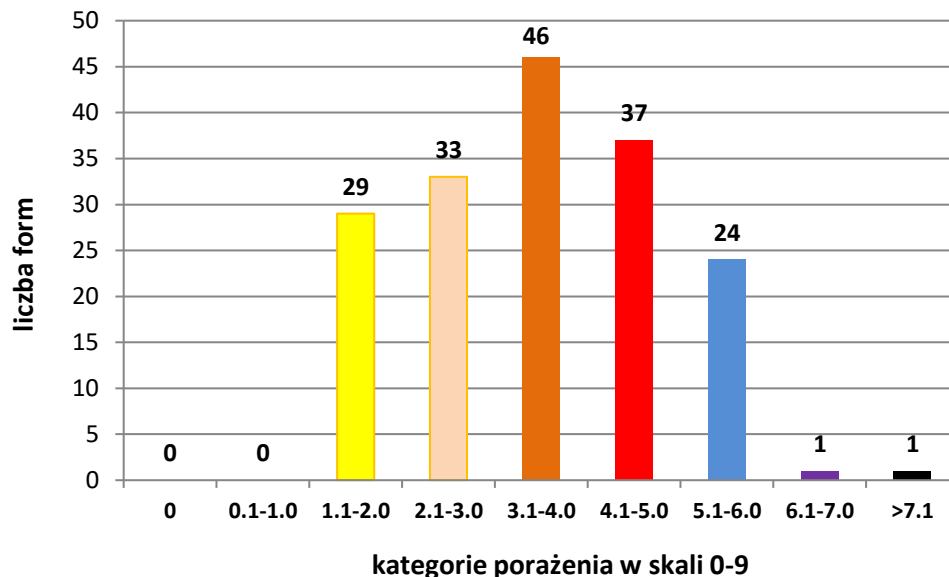
Rozkład porażenia wszystkich badanych linii DH



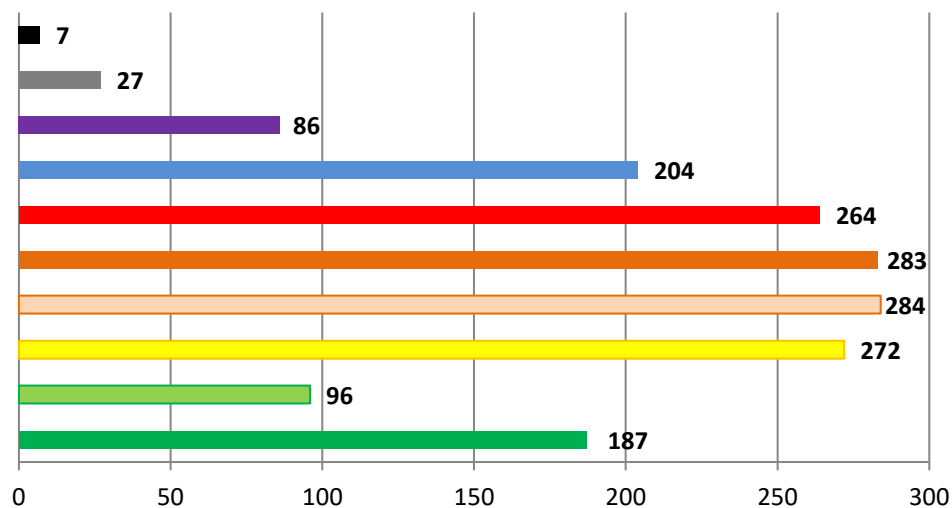
Ocena porażenia form mieszańcowych rzepaku, RGD Dłoń



Podsumowanie wyników



Liczba roślin porażonych w danej kategorii

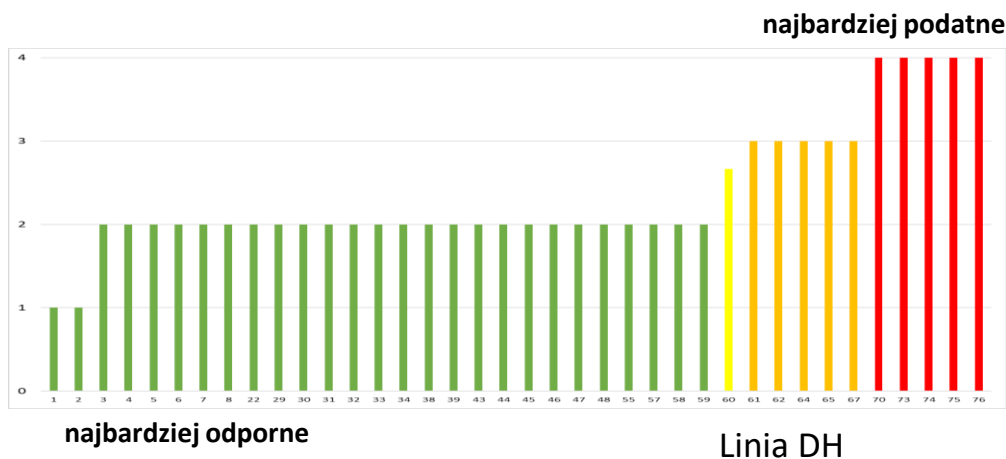
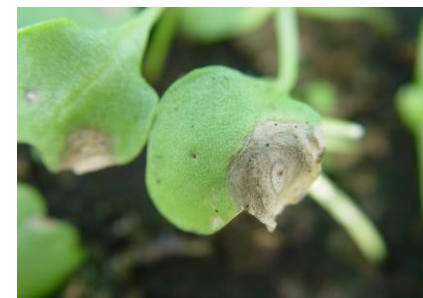


Oceniono stopień porażenia suchą zgnilizną kapustnych (stadium plam na liściach) 171 form mieszańcowych. Ocenę wykonano w dniach 16-19 listopada 2023 wg skali 0-9, gdzie 0 oznaczało rośliny bez plam chorobowych a poszczególne stopnie skali oznaczały wzrastająca liczbę plam na liściach. Obliczono średnie porażenie. Na roślinie stwierdzano od 0 do 9 plam. Rośliny z pokrojem 'siedzącym' były mniej porażone od roślin z pokrojem wzniesionym. W przypadku 21 form nie stwierdzono roślin.

Ocena odporności linii DH rzepaku – test Williamsa

Materiał i metody

Nasiona materiałów hodowlanych 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. Siewki rzepaku inokulowano przy pomocy zawiesiny zarodników konidialnych w stężeniu 1×10^6 zarodników/mL wody sterylnej. Inokulum наносило на листья раненые при помощи иглы. Ocenę objawów chorobowych wykonywano po 14 dniach od inokulacji



Wnioski

1. Linie hodowlane poddane ocenie były silnie zróżnicowane pod względem porażenia grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* (*Plenodomus* sp.); różnica pomiędzy najmniej a najsilnie porażoną formą była 7-krotna.
2. Wśród form mieszańcowych najmniejszy odsetek roślin porażonych stwierdzono na u mieszańców oznaczonych nr 25 i 88.
3. Najwyższą odpornością charakteryzowały się linie DH o numerach '6, 23, 50, 63, 135 i 158'. Najsilnie porażona grzybami z rodzaju *Leptosphaeria* była linia '146'.

Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów ocenianych na <i>Leptosphaeria spp.</i> w warunkach polowych	192	192
2.	Liczba genotypów ocenianych pod kątem odporności na patogeny grzybowe w doświadczeniu w komorze fitotronowej	75	75
3.	Liczba kombinacji krzyżowania	30	30

Temat badawczy 2

Genotypowanie populacji mapującej.

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

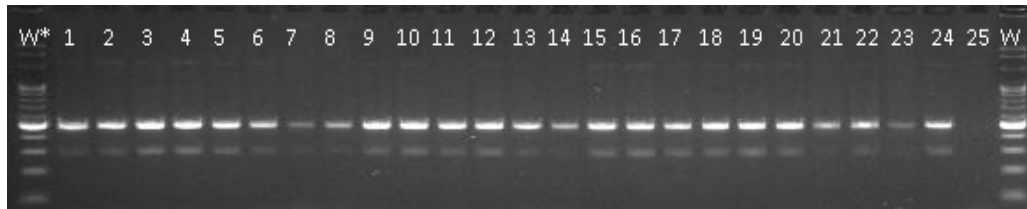
Lista markerów molekularnych, które wykorzystano w celu identyfikacji genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych, wraz z sekwencjami starterów

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

Materiał roślinny

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

Przykładowy elektroforogram przedstawiający wynik analiz dla markera LepR3, próby 1-25



Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba analizowanych markerów	10	10
2.	Liczba analizowanych genotypów	25	25

Wyniki i Wnioski

Zastosowanie starterów zaprojektowanych dla markera LepR3 pozwala na detekcję genu odporności (500pz). W ten sposób wśród badanych genotypów zidentyfikowano 24 genotypy odporne.

Zastosowanie 7 z 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. Markery At1g80400, At1g80530 oraz Xbrms075 wymagają przeprowadzenia dodatkowych analiz.

Temat badawczy 3

Profilowanie ekspresji wybranych genów odporności

CEL: Analiza ekspresji wybranych genów odporności na suchą zgniliznę kapustnych (gen *Rlm3*, *Rlm6* i *Rlm7*) w genotypach o zróżnicowanym stopniu odporności

Materiał

Materiał roślinny stanowiły linie DH rzepaku pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce (25 genotypów) o zróżnicowanej odporności na suchą zgniliznę kapustnych posiadających geny odporności *Rlm3*, *Rlm4* i *Rlm7*.

Metody

- Analizy ekspresji wybranych genów odporności (*Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7*) są prowadzone za pomocą dwuetapowej metody Real-Time qPCR (RT-qPCR).
- 14-dniowe siewki zostały poddane inokulacji *Leptosphaeria spp.*
- 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 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).
- Spośród 10 kandydujących genów referencyjnych wybrane zostaną dwa geny charakteryzujące się najbardziej stabilną ekspresją w warunkach badawczych.

Tabela 1. Lista kandydujących genów referencyjnych.

Nr	Nazwa genu referencyjnego	Opis
1	TIP41	TIP41-like protein
2	PP2A	Protein Phosphatase 2A
3	PPR	Postsynaptic protein-related
4	ENTH	ENTH/ANTH/VHS superfamily protein
5	SAND	SAND family protein
6	UBC21	Ubiquitin-conjugating enzyme
7	ACT7	Actin7
8	GDI1	Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 1
9	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphatase Dehydrogenase
10	RPL	60S Ribosomal protein L8

Wnioski

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



Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba analizowanych genów odporności	3	0
2.	Liczba analizowanych genotypów	25	25

Temat badawczy 4

Identyfikacja markerów sprzężonych z genami odporności

CEL: Identyfikacja nowych markerów SilicoDArT i SNP związanych z odpornością roślin na *Leptosphaeria spp.*

Materiały i metody

Materiał roślinny stanowić będą 192 genotypy, tj. linie DH oraz genotypy referencyjne pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce, oddział Borowo.

➤ Izolacja DNA

Izolację DNA z 192 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 stanowić będą wyniki dotyczące odporności roślin na suchą zgniliznę kapustnych.

Wyniki

W analizowanym materiale zidentyfikowano 96 121 markerów silicoDArT i 37 643 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z 18,84% brakujących danych (NA). 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. Dane genotypowe otrzymane zostały z analizy DArTseq, natomiast dane fenotypowe stanowią wyniki dotyczące odporności roślin na suchą zgniliznę kapustnych.

Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1.	Liczba genotypów poddanych sekwencjonowaniu nowej generacji, z którego wyniki zostaną wykorzystane do mapowania asocjacyjnego	192	192

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 2023.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2023 roku

I. Doniesienia i wykłady konferencyjne

1. Niemann J., Szwarc J., Starosta E., Kaczmarek J., Jędryczka M. Zastosowanie metod molekularnych i fitopatologicznych w hodowli rzepaku o podwyższonej odporności na suchą zgniliznę kapustnych. Genetyka ilościowa i hodowla roślin uprawnych: XII Sympozjum, Karpacz, 28 luty-3 marca 2023
2. Szwarc J., Starosta E., Niemann J. From genes to field: advances in breeding and management of blackleg disease in Poland. 16th International Rapeseed Congress, 24-27.09.2023, Sydney/Australia
3. Szwarc J., Starosta E., Kaczmarek J., Irzykowski W. Accelerating the selection efficiency of breeding material within interspecific *Brassicaceae* hybrids with molecular marker. 16th International Rapeseed Congress, 24-27.09.2023, Sydney/Australia

II. Publikacja

1. Szwarc, J.; Niemann, J.; Bocianowski, J.; Kaczmarek, J.; Dogu, M.Z.; Nowicka, A. 2023. Improving the Selection Efficiency of Breeding Material within Interspecific Brassicaceae Hybrids with Genomic Prediction and Phenotyping. *Agriculture* 2023, 13, 962.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13050962>
(140 pkt MNiSW, IF=3,6)