

ELŻBIETA STARZYCKA-KORBAS ¹

MICHAŁ STARZYCKI ¹

PIOTR KAMIŃSKI ²

MIROSLAWA DABERT ³

WOJCIECH RYBIŃSKI ⁴

GRZEGORZ BUDZIANOWSKI ⁵

MICHAŁ STEFANOWICZ ⁵

¹ IHAR — PIB Oddział w Poznaniu, Pracownia Metod Hodowli Odpornościowej

² Instytut Ogrodnictwa, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych w Skierniewicach

³ Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu

⁴ Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

⁵ Małyszyn, HR Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR

Badania odporności mieszańców międzygatunkowych z płemienia *Brassicaceae* na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp.*

Resistance tests of interspecific hybrids of the tribe *Brassicaceae* to infection caused by the *Leptosphaeria* sp. and *Alternaria* sp.

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące odporności mieszańców międzygatunkowych z płemienia *Brassicaceae* na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Przedstawiono problematykę dotyczącą wytwarzania mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro*. Otrzymano 159 zarodków mieszańców międzygatunkowych, z których 52 genotypy klonowano *in vitro* i *in vivo* dla otrzymania roślin w większej wydajności. Poszukiwano genotypów z płemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Przebadano 49 obiektów, z których mała część wykazywała podwyższoną odporność na oba patogeny. Wykonano także analizy DNA dziesięciu patogenów użytych do inokulacji. Badano także odporność siewek (indeks porażenia dla 12 obiektów) otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych oraz roślin kontrolnych i donorowych rzepaku, na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* oraz *Alternaria*. U wybranych genotypów odnotowano niski indeks porażenia (IP) i te formy przekazano do dalszej hodowli odpornościowej.

* Praca została wykonana w ramach programu PBwPR nr 49, Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi (PBwPR nr 49, MRiRW/2017)

Słowa kluczowe: DNA patogenów, mieszańce międzygatunkowe *Brassicaceae*, odporność na *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp.

The paper presents the results of studies on resistance of interspecies hybrids from the *Brassicaceae* caused by *Leptosphaeria* sp. and *Alternaria* sp. pathogens. 159 intercross hybrid genomes were obtained, of which 52 genotypes were cloned *in vitro* and *in vivo*. The genotypes were searched from the *Brassicaceae* less resistant to infestation by *Leptosphaeria* sp. and *Alternaria* sp. 49 oilseed rape lines were tested, of which a small proportion showed increased resistance to both pathogens. DNA analyses of ten pathogens used for inoculation were also performed. The resistance of seedlings (infection index for the 12 objects) obtained from interspecific hybrids and also control and donor plants of oilseed rape were tested for infection caused by pathogens of the genus *Leptosphaeria* and *Alternaria*. Selected genotypes with low infection indices were transferred to resistance breeding.

Key words: DNA of pathogen, interspecific cross *Brassicaceae*, resistance to *Leptosphaeria* sp. and *Alternaria* sp.

WSTĘP

Badania nad odpornością na stresy biotyczne roślin z płemienia *Brassicaceae*, także u innych gatunków roślin rolniczych oraz powstałych z krzyżowań międzygatunkowych *in vitro* zmierzają w kierunku otrzymania roślin zróżnicowanych genetycznie pod względem tolerancji lub odporności na najgroźniejsze patogeny (Boba i in., 2011; Starzycka, Starzycki, 2008, 2011; Starzycka i in., 2009; Kauszik i in., 2009; Starzycki i in., 2007; Kamiński i in., 2016).

Obecnie niewiele doniesień dotyczy markerów molekularnych skojarzonych z odpornością na porażenie powodowane przez *Alternaria brassicicola* i *Alternaria brassicae*. Wśród niektórych kapustowatych można spotkać gatunki tolerancyjne i częściowo odporne na czerń krzyżowych (Nowicki i in., 2012). Spośród gatunków uprawnych najwyższy poziom odporności na *Alternaria* sp. odnotowano u gorczycy etiopskiej (*Brassica carinata*), gorczycy białej (*Sinapis alba*) oraz lnianki (*Camelina sativa*). Według niektórych badaczy odporność na *Alternaria* sp. może być kontrolowana przez jeden lub kilka genów jądrowych w połączeniu z innymi genami modyfikatorami (Nowicki i in., 2012). Pośrednio odporność kojarzona jest także z wyższym poziomem związków polifenolowych, grubszą warstwą epikutikularną, a także większą warstwę wosków bezpośrednio na blaszce liściowej.

Na świecie większość opracowań związanych z odpornością roślin rzepaku, a także innych gatunków pokrewnych, dotyczy badań markerów molekularnych na porażenie powodowane przez chorobotwórcze dla roślin grzyby rodzaju *Leptosphaeria*, a także badań molekularnych tych patogenów (Rouxel i in., 2011; Sprague i in., 2006; Van de Wouw i in., 2014; Plissonneau i in., 2016; Balesdent i in., 2005; Delourme, i in., 2006; Fudał i in., 2007).

Celem pracy było wykazanie podwyższonej odporności na patogeny z rodzaju *Alternaria* oraz *Leptosphaeria* u nowych rodów rzepaku otrzymanych z komponentów rodzicielskich z płemienia *Brassicaceae*.

MATERIAŁ I METODY

Otrzymywanie mieszańców międzygatunkowych *in vitro*

W badaniach nad mieszańcami międzygatunkowymi *in vitro* wykorzystano następujące gatunki podstawowe, kapusty: brukselkę *Brassica oleracea* var. *gemmifera* $2n = 18$ (CC), pastewną *B. oleracea* var. *acephala* $2n = 18$ (CC), jarmuż *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *Lacinista* $2n = 18$ (CC). Aby otrzymać rzepak *Brassica napus* (AACC) z cytoplazmą kapusty, do krzyżowań wypierających został użyty *B. napus* oraz otrzymane w ubiegłych latach wybrane odporne mieszańce międzygatunkowe z cytoplazmą *B. oleracea* (podstawowym celem piramidyzacja odporności). Po osiągnięciu przez rośliny fazy kwitnienia krzyżowano je jednokierunkowo tak, aby otrzymane potomstwo posiadało cytoplazmę genotypów wcześniej selekcjonowanych pod względem odporności na porażenie przez patogeny z rodzaju *Alternaria* i *Leptosphaeria*. Uzyskane embriony stadiów: globularnych lub sercowatych zostały nałożone na pożywki agarowe B5 z fitohormonami (cytokinina BAP 1mg/l) i (auksyna 0,01 mg/l IAA). Zarodki te następnie przeniesiono do warunków fitotronowych o 12. godzinnym fotoperiodzie i termoperiodzie 15°C — dzień oraz 10°C — noc. Po okresie 4–6 tygodni uzyskane rośliny pokolenia F₁ mieszańców międzygatunkowych klonowano *in vitro* i w warunkach *in vivo* na hydroponikach. Najlepiej rozwinięte skierowano do dalszych badań.

Poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.

Do badań odporności wykorzystano także wcześniej otrzymane mieszańce z cytoplazmą rzepaku w typie *B. napus*. Na podstawie badań rezystencji indywidualnie ocenianych pod względem chorób (powodowanych przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.) form donorowych z plemienia *Brassicaceae*, zostały wykonane prace w warunkach polowych w doświadczeniach wstępnych. Każdy obiekt oceniany był indeksem porażenia (IP) na podstawie obserwacji 40 roślin na 1 powtórzenie (najczęściej 4 powtórzenia, 120 roślin). Przyjęto trójstopniową skalę oceny odporności (0 — brak porażenia, 1 — średnie, 2 — silne porażenie).

Obserwacje odporności poszczególnych rodów wykonano wielokrotnie (cztery razy) w ciągu sezonu wegetacyjnego ze względu na możliwość wystąpienia chorób od wiosny do fazy zbioru. Przed zbiorem wykonano bonitację.

Ogólny wskaźnik bonitacji np.: stopnia porażenia wyliczano ze wzoru:

$$p = \frac{\sum n \cdot v}{V \cdot N} \times 100$$

p — Indeks porażenia [%]

n — liczba roślin w poszczególnych stopniach porażenia (lub analizowanych prób)

v — stopień porażenia (skala: od „0” odporne, „1” średnio odporny, „2” brak odporności)

V — najwyższy stopień porażenia

N — całkowita liczba badanych obiektów.

Powyższe badania występowania patogenów były prowadzone w warunkach polowych w miejscowościach: Małyszyn, Borowo (HR Strzelce) i Bąków (HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR). Na wybranych obiektach wykonano analizy przy użyciu chromatografu gazowego (GC) dla wyeliminowania genotypów o zwiększonym udziale związków antyżywniowych.

Badania odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych oraz donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzajów *Leptosphaeria* oraz *Alternaria*.

Poza badaniami polowymi, dojrzałych roślin nad odpornością mieszańców międzygatunkowych analizowano je także w stadium liścieni. Dla stwierdzenia odporności wybranych genotypów w stadium siewki otrzymanych roślin mieszańcowych na porażenie powodowane przez patogeny z rodzajów *Leptosphaeria* i *Alternaria* stosowano uproszczony test Williamsa.

Do inokulacji stosowano mieszaninę patotypów *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp., których czystość gatunkową potwierdzono przy wykorzystaniu sekwencjonowania DNA ITS 1 (zapis: Finch TV, NCBI/BLAST, GenBank) (Starzycki i in., 2016). Badania te pozwalają na wybór odporniejszych genotypów, które przekazywane są do dalszych badań i hodowli. Ponadto rośliny mieszańców międzygatunkowych w stadium po kwitnieniu inokulowano metodą kaleczenia łodyg. Na wysokości 10 cm nad ziemią uszkodzono łodygę ostrym nożem kalecząc ją do głębokości 1 mm i równocześnie inokulowano skałeczone miejsce określoną koncentracją zarodników konidialnych *Leptosphaeria* sp. (107 zarodników/ml). Wystąpienie porażenia lub jego brak oceniano po 2–3 tygodniach.

WYNIKI

Otrzymywanie mieszańców międzygatunkowych *in vitro*

Wyniki dotyczące otrzymywania mieszańców międzygatunkowych zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

**Liczba otrzymanych zarodków roślin mieszańcowych oraz ilości rozklonowanych roślin w 2016 r.
Number of received plants of hybrid embryos and the number of cloned plants in 2016**

Liczba wykonanych krzyżowań Number of interspecific crosses	Genotyp mateczny (pochodzenie) Maternal genotype (origin)	Symbol krzyżowania Symbol of interspecific crosses	Genotyp ojcowski (pochodzenie) Paternal genotype (origin)	Liczba preparatów zarodków Number of embryos	Liczba rozklonowanych roślin w kulturach hydroponicznych Number of cloned plants in hydroponic culture
1	2	3	4	5	6
2	(B.o. × brukselka) × <i>B. cret.</i> × B. n 1.	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)4	0	0
2	Brukselka × <i>B. napus</i>	×	TOS 2 × B.n. restorer PN1162/2015	0	0

1	2	3	4	5	6
1	[(B.o. past × <i>B. taurica</i>) × 35TP] × <i>B.n</i>	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)3	0	0
1	(B. n. CMS × Pach-choi) ×	×	TOS 12 × B.n. restorer PN1162/2015	5	7
2	(k.biała × brukselka) × <i>B. cret</i> × <i>B.n</i> 2	×	MEN2	0	0
2	[B.n. rest. × (<i>B. cretica</i> × <i>B.n.</i>)]	×	<i>B.napus</i> restorer	37	0
2	(Kapusta biała × brukselka) × (<i>B. cretica</i> × <i>B.n</i>)	×	MEN1	0	0
1	(B. o. jar × <i>B. campestris</i>)	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)4	10	10
2	(B. n. CMS × Pach-choi) ×	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)4	4	9
1	[(B.o. past × <i>B. taurica</i>) × TP] × 34TP	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)5	0	0
1	(<i>B. n.</i> CMS × <i>B.juncea</i>) × <i>B.n</i> rest	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)3	14	5
2	(B. o. jar × <i>B. campestris</i>)	×	MEN3	0	0
2	(B. o. jar × <i>B. campestris</i>)	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)2	0	0
2	(k. biała × brukselka) × <i>B. cret.</i> × <i>B. n</i> 1.	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)5	0	0
1	[(B.o. past × <i>B. taurica</i>) × TP] × 34TP	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)1	0	
1	(B.o. pastewna × <i>B. taurica</i>)	×	TOS 5 × B.n. restorer PN1162/2015	0	0
2	[B.n. rest. × (<i>B. cretica</i> × <i>B.n.</i>)]	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)	20	8
1	(<i>B. n.</i> CMS × <i>B.juncea</i>) × <i>B.n</i> rest	×	TOS 11 × B.n. restorer PN1162/2015	19	0
2	<i>B. taurica</i> × <i>B. napus</i> (cyt. pastewnej)	×	MEN1	0	0
1	<i>B. taurica</i> × <i>B. napus</i>	×	TOS 7 × B.n. restorer PN1162/2015	1	0
2	(B. o. jar × <i>B. campestris</i>)	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)4	26	10
2	<i>B.n.</i> restorer (PN 116) × (<i>B. cretica</i> × <i>B.n.</i>)	×	<i>B. oleracea</i> (jarmuż) IHAR-PIB × <i>B. campestris</i> Y.S. I (kolekcja IHAR)	0	0
3	<i>B. taurica</i> × <i>B. napus</i> (cyt. pastewnej)	×	<i>B.n.</i> restorer PN1162/2015 (izol.)1	0	0
2	(<i>B. n.</i> CMS × <i>B.juncea</i>) × <i>B.n</i> rest	×	<i>B.n.</i> restorer PN1162/2015 (izol.)2	22	0
1	[(B.o. past × <i>B. taurica</i>) × TP] × 34TP	×	MEN1	0	0
1	B.o. jar. × <i>B. taurica</i> × B.o. (111b SŁ)	×	MEN2	1	3
1	B.o. jar. × <i>B. taurica</i> × B.o. (111b SŁ)	×	MEN3	0	0
2	(B.o. pastewna × <i>B. taurica</i>)	×	MEN3	0	0
2	Jarmuż × <i>B. taurica</i> (16)	×	MEN2	0	0
2	Brukselka × <i>B. napus</i>	×	MEN1	0	0
1	B.o. Puławska × <i>B. taurica</i> F ₁ (72/08)	×	B.n. restorer PN1162/2015 (izol.)2	0	0
Σ 50		Suma		159	52

Podano liczbę wypreparowanych zarodków oraz liczbę rozklonowanych roślin w kulturach hydroponicznych. W obrębie powyższych form wykonano 11 udanych przekrzyżowania (łącznie 50), z których wypreparowano 159 żywych zarodków. Najlepiej rozwinięte 52 genotypy rozklonowano w warunkach *in vitro* i *in vivo* w kulturach hydroponicznych oraz w glebie.

Poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.

Na podstawie otrzymanych wyników oceniono najodporniejsze genotypy otrzymane z mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku.

Tabela 2

Wyniki odporności mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku wyrażone indeksami porażenia (IP) przez *Leptosphaeria* sp. (w nawiasach podano pochodzenie genotypów, Małyszyn 2016 — warunki polowe)

Results of resistance of interspecies hybrids and oilseed rape expressed by the index of infection (IP) by *Leptosphaeria* sp. (in parentheses the origin of genotype is given, Małyszyn 2016 — field conditions)

L.p. No.	Symbole genotypów Symbol of genotypes	IP (śr. z 4 powt.) IP (Mean of 4 repetitions)
1	0 Monolit (<i>B. napus</i>)	0,053
2	413/08 10 Tau × B.n./10 (18A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,044
3	405/08 53 Bru × B.n./1 (12A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,041
4	413/08 10 Tau × B.n. (2A/15),	0,041
5	Insp./Men7 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,041
6	Insp./Men3 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,038
7	Insp./Men4 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,038
8	Men (<i>B. napus</i>)	0,038
9	Insp./Men5 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,033
10	Digger/06 p.(Choryń × Bn)×Calif (20A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,031
11	12. Insp./Men5 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,031
12	Insp./Men6 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,028
13	Insp./Men5 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,028
14	Insp./Men1 (<i>B. napus</i> × <i>B. napus</i>)	0,028
15	645TP/06 p.(Br. × Bn)×Lisek (16A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,025
16	301 × 303 TP/06 p. Choryńska(8A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,025
17	297/06 p.(Jar × B.n.) × Californium (6A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,025
18	420/08 38B.t. × B.n. (304 TP)/6 (4A/15) (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,025
19	18. Insp., (<i>B. napus</i>)	0,022
20	301 × 303 TP/06 p. (Choryńska × B.n.) × (Californium × B.n.) (14A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,022
21	413/08 10 Tau × B.n./10 (18A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,019
22	420/08 38B.t. × B.n./3 (10A/15), (<i>B. oleracea</i> × <i>B. napus</i>)	0,013

W badaniach prowadzonych w 4 powtórzeniach, najniższe indeksy porażenia (IP) odzwierciedlające odporność roślin zostały wyróżnione tłustą czcionką. Przeprowadzono 3 obserwacje zdrowotności. W pierwszym terminie po kwitnieniu i w dwóch kolejnych prowadzonych w odstępach tygodniowych nie obserwowano porażenia. Symptomy choroby zidentyfikowano dopiero przed zbiorem. Analiza wariancji nie wykazała różnic istotnych statystycznie co było spowodowane bardzo niskimi indeksami porażenia (IP) wahającymi się w przedziale pomiędzy 1,3 i 5,3.

For investigation run in 4 replications the lowest values of infection indices (IP) reflecting plant resistance were distinguished using the bold font. Observations of the state of plants health were done 3 times. No infestation was observed in the first term just after flowering and next two ones following the first one in one-week intervals. The symptoms of disease were identified just before the harvest. Variation analysis was unable to demonstrate statistically significant differences what was caused by very low values of infection indices (IP) varying between 1.3 and 5.3 percent.

Tabela 3

Wyniki odporności mieszańców międzygatunkowych wyrażone indeksami porażenia przez *Alternaria* sp. (pochodzenie genotypów podano w tab. 2, Małyszyn 2016 — warunki polowe)

Results of resistance testing of interspecies hybrids expressed by the index of infection (IP) by *Alternaria* sp. (in parentheses, the origin of the genotype is given, Małyszyn 2016 — field conditions)

L.p. No.	Symbole genotypów Symbol of genotypes	IP śr. Mean IP	Grupy jednorodne Homogeneous gr.
1	Insp./Men1	0,1100	A
2	0 Monolit	0,1040	AB
3	Insp./Men2	0,09700	ABC
4	Insp./Men3	0,08800	ABCD
5	Insp./Men4	0,08500	ABCD
6	18. Insp.	0,08200	ABCD
7	12. Insp./Men5	0,07800	ABCD
8	413/08 10 Tau × B.n. (2A/15)	0,07500	ABCD
9	Mean 295 × 645TP/06 p.(Br. × Bn)× Lisek (16A/15)	0,07500	ABCD
10	8. Insp./Men4	0,07200	ABCD
11	16. Insp./Men5	0,06900	ABCD
12	Man	0,06900	ABCD
13	301 × Digger/06 p.(Choryń × Bn)×Calif (20A/15)	0,06300	ABCD
14	405/08 53 Bru × B.n./1 (12A/15)	0,06300	ABCD
15	420/08 38B.t. × B.n./3 (10A/15)	0,06300	ABCD
16	5 Mean 301 × 303 TP/06 p. (Choryńska × B.n.) × (Californium × B.n.) (14A/15)	0,05000	BCD
17	301 × 303 TP/00 p. Choryńska(8A/15)	0,05000	BCD
18	14. Insp./Men6	0,04700	CD
19	10. Insp. Insp./Men7	0,04700	CD
20	420/08 38B.t. × B.n. (304 TP)/6 (4A/15)	0,04700	CD
21	413/08 10 Tau × B.n./10 (18A/15)	0,04400	CD
22	297/06 p.(Jar × B.n.) × Californium (6A/15)	0,03500	D

Tabela analizy wariancji
Analysis of variance table

źródło zmienności Source of variation	stopnie swobody degrees of freedom	suma kwadratów sum of squares	średnie kwadraty mean squares	wartość F F value	prawdopodobieństwo p value
Powtórzenie Repetition	3	0,036	0,012	13,0663	0,0000**
Obiekty Object	21	0,035	0,002	1,7709	0,0425*
Błąd Error	63	0,059	0,001		

Najniższe indeksy porażenia odzwierciedlające odporność roślin mieszańców międzygatunkowych wyróżniono tłustą czcionką. Wyniki istotne statystycznie (NIR): przy $\alpha = 0,05$ i $0,0425^*$ uzyskano z zastosowaniem Testu Duncana, Małyszyn 2016

The lowest values of infection indices reflecting resistance of interspecies hybrids were distinguished with bold font. Statistically significant results (LSD) at $\alpha = 0,05$ and $0,0425^*$ were recognized using Duncan Test, Małyszyn 2016

Tabela 4

Wyniki odporności wybranych genotypów rzepaku ozimego (49 obiektów) wyrażone indeksami porażenia przez *Leptosphaeria* sp. (Różnice istotne statystycznie dla interakcji lokalizacja × obiekty, po analizie wariancji i zastosowaniu testu Duncana). Wyniki przedstawiono dla miejscowości: Malyszyn, Borowo, Bąków, 2016. Test Duncana, NIR α 0,05 = 0,0182*

Results of resistance test of selected genotypes of winter oilseed rape (49 objects) expressed by the index of infection (IP) by *Leptosphaeria* sp. (Statistically significant differences for interaction of location and objects, after analysis of variance and Duncan's test). The results were presented for places: Malyszyn, Borowo, Bąków, 2016. Duncan's test, LSD α 0.05 = 0.0182

Obiekt Object	IP śr. Mean IP	Gr. zgodności Homogeneous Gr.	Obiekt Object	IP śr. Mean IP	Gr. zgodności Homogeneous gr.	Obiekt Object	IP śr. Mean IP	Gr. zgodności Homogeneous gr.
1	2	3	4	5	6	7	8	9
BRH_603/13	0,4130	A	MA_340	0,2380	IJKLMNOP	BKH_3/15	0,1880	MNOPQR
BRH_1219/14	0,3760	AB	BRH_1938/13	0,2380	IJKLMNOP	MA_338	0,1880	MNOPQR
MA_347	0,3630	ABC	BKH_3/15	0,2380	IJKLMNOP	BRH_1049/14	0,1880	MNOPQR
MA_338	0,3630	ABC	BRH_1774/13	0,2380	IJKLMNOP	BRH_1938/13	0,1880	MNOPQR
BRH_1725/13	0,3510	BCD	BKH_2/15	0,2380	IJKLMNOP	BKH_6/15	0,1880	MNOPQR
MA_349	0,3500	BCDE	BRH_1780/13	0,2380	IJKLMNOP	BRH_921/13	0,1880	MNOPQR
BRH_991/14	0,3390	BCDEF	BKH_7/15	0,2380	IJKLMNOP	BKH_1/15	0,1880	MNOPQR
BKH_2/15	0,3380	BCDEF	ARSENAL	0,2380	IJKLMNOP	BRH_1938/13	0,1880	MNOPQR
BKH_4/15	0,3260	BCDEFG	ARSENAL	0,2260	JKLMNO	BRH_195/13	0,1880	MNOPQR
MA_348	0,3130	CDEFGH	BRH_1872/13	0,2260	JKLMNO	BKH_4/15	0,1760	NOQR
BRH_1728/13	0,3130	CDEFGH	BRH_1772/13	0,2260	JKLMNO	BRH_1054/14	0,1760	NOQR
BRH_1774/13	0,3130	CDEFGH	BRH_1935/13	0,2250	JKLMNO	BRH_1773/13	0,1760	NOQR
BKH_5/15	0,3130	CDEFGH	BRH_991/14	0,2140	KLMNOP	BKH_7/15	0,1760	NOQR
MA_344	0,3010	DEFGHI	BKH_3/15	0,2140	KLMNOP	BRH_1725/13	0,1760	NOQR
BRH_1324/14	0,3010	DEFGHI	ARSENAL	0,2140	KLMNOP	BRH_603/13	0,1760	NOQR
BRH_1152/13	0,3010	DEFGHI	BRH_216/13	0,2140	KLMNOP	BRH_1049/14	0,1760	NOQR
MA_343	0,2890	EFGHIJ	BRH_216/13	0,2130	KLMNOP	MA_349	0,1760	NOQR
BRH_1042/13	0,2890	EFGHIJ	BRH_1049/14	0,2130	KLMNOP	BRH_1728/13	0,1760	NOQR
MA_342	0,2880	FGHIJ	BRH_1054/14	0,2130	KLMNOP	ES VALEGRO	0,1760	NOQR
BRH_1872/13	0,2760	GHIJK	MA_338	0,2130	KLMNOP	BRH_1773/13	0,1750	NOQR
BRH_1240/13	0,2760	GHIJK	BRH_1324/14	0,2130	KLMNOP	BRH_1219/14	0,1750	NOQR
BKH_1/15	0,2760	GHIJK	MA_337	0,2130	KLMNOP	BKH_6/15	0,1640	OPQR
BRH_195/13	0,2750	GHIJK	BRH_603/13	0,2130	KLMNOP	BRH_1365/13	0,1630	OPQR
BRH_1879/13	0,2750	GHIJK	MA_342	0,2130	KLMNOP	MA_347	0,1630	OPQR
BRH_1154/14	0,2640	GHIJKL	BRH_1054/14	0,2130	KLMNOP	BRH_1879/13	0,1630	OPQR
BRH_1728/13	0,2640	GHIJKL	BRH_1780/13	0,2010	LMNOPQ	MA_337	0,1630	OPQR
BRH_1042/13	0,2630	GHIJKL	MA_346	0,2010	LMNOPQ	BRH_1774/13	0,1630	OPQR
MONOLIT	0,2630	GHIJKL	MA_348	0,2010	LMNOPQ	BRH_1240/13	0,1630	OPQR
MA_339	0,2630	GHIJKL	MA_336	0,2010	LMNOPQ	BRH_1042/13	0,1630	OPQR
BRH_1772/13	0,2630	GHIJKL	BKH_4/15	0,2010	LMNOPQ	MA_345	0,1630	OPQR
BKH_1/15	0,2510	HIJKLM	BRH_1872/13	0,2010	LMNOPQ	BRH_1152/13	0,1630	OPQR
ES VALEGRO	0,2510	HIJKLM	BRH_1251/13	0,2010	LMNOPQ	BKH_5/15	0,1630	OPQR
MA_348	0,2510	HIJKLM	BRH_991/14	0,2010	LMNOPQ	Mean 36	0,1630	OPQR
MA_341	0,2510	HIJKLM	MA_347	0,2010	LMNOPQ	MA_346	0,1510	PQR
MONOLIT	0,2510	HIJKLM	BRH_921/13	0,2010	LMNOPQ	BRH_1935/13	0,1510	PQR
BRH_1154/14	0,2510	HIJKLM	BRH_1324/14	0,2010	LMNOPQ	BRH_1152/13	0,1510	PQR
MA_339	0,2500	HIJKLM	MA_344	0,2010	LMNOPQ	BRH_1251/13	0,1510	PQR
BRH_1773/13	0,2500	HIJKLM	MONOLIT	0,2010	LMNOPQ	BRH_195/13	0,1510	PQR
MA_336	0,2390	IJKLMNOP	MA_339	0,2000	LMNOPQ	MA_340	0,1510	PQR
BRH_1251/13	0,2390	IJKLMNOP	BRH_1879/13	0,2000	LMNOPQ	BRH_1772/13	0,1510	PQR
MA_340	0,2390	IJKLMNOP	MA_346	0,2000	LMNOPQ	MA_343	0,1500	PQR
BKH_6/15	0,2390	IJKLMNOP	MA_349	0,2000	LMNOPQ	BKH_7/15	0,1500	PQR

c.d. Tabela 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
BRH_1219/14	0,2390	IJKLMN	BKH_2/15	0,1890	MNOPQR	BRH_1154/14	0,1390	QR
BRH_2016/13	0,2380	IJKLMN	BKH_5/15	0,1890	MNOPQR	BRH_1935/13	0,1390	QR
MA_341	0,2380	IJKLMN	MA_344	0,1890	MNOPQR	MA_337	0,1380	QR
MA_345	0,2380	IJKLMN	MA_336	0,1890	MNOPQR	BRH_1780/313	0,1260	R
ES VALEGRO	0,2380	IJKLMN	BRH_1365/13	0,1890	MNOPQR	MA_341	0,1260	R
BRH_1365/13	0,2380	IJKLMN	BRH_1725/13	0,1880	MNOPQR	MA_342	0,1260	R
MA_345	0,2380	IJKLMN	BRH_921/13	0,1880	MNOPQR	BRH_1240/13	0,1250	R

Tabela 5

Wyniki odporności wybranych genotypów rzepaku ozimego (49 obiektów) wyrażone indeksami porażenia przez *Alternaria* sp. Różnice istotne statystycznie dla obiektów łącznie z 3 miejscowości: Borowa, Malyszyna i Bąkowa (2016). Test Duncana NIR $\alpha_{0.05} = 4.149405E-02$
Results of resistance of selected genotypes of winter oilseed rape (49 objects) expressed by the index of infection (IP) for *Alternaria* sp. Statistically significant differences for objects including 3 places: Borowo, Malyszyn and Bąków (2016). Duncan's test, LSD $\alpha_{0.05} = 4.149405E-02$

Obiekt Object	IP śr. Mean IP	Gr. zgodności Homogeneous gr.	Obiekt Object	IP śr. Mean IP	Gr. zgodności Homogeneous gr.
BKH_2/15	0,1710	A	MA_346	0,1340	ABCDEFGF
BRH_216/13	0,1710	A	BRH_1872/13	0,1320	ABCDEFGF
BKH_4/15	0,1640	AB	BRH_1240/13	0,1290	ABCDEFGF
MA_338	0,1610	ABC	BRH_1154/14	0,1280	ABCDEFGF
BKH_5/15	0,1590	ABCD	MA_345	0,1270	ABCDEFGF
BRH_1725/13	0,1580	ABCDE	BRH_1728/13	0,1270	ABCDEFGF
MA_349	0,1570	ABCDE	BRH_1219/14	0,1250	ABCDEFGF
BKH_6/15	0,1570	ABCDE	MA_348	0,1220	ABCDEFGF
BRH_195/13	0,1540	ABCDE	MA_341	0,1210	ABCDEFGF
BRH_1935/13	0,1490	ABCDEF	BKH_3/15	0,1200	ABCDEFGF
BRH_1152/13	0,1480	ABCDEFGF	BRH_921/13	0,1200	ABCDEFGF
BRH_1879/13	0,1480	ABCDEFGF	BRH_1049/14	0,1180	ABCDEFGF
MA_339	0,1460	ABCDEFGF	MA_342	0,1180	ABCDEFGF
BRH_1042/13	0,1460	ABCDEFGF	BRH_1324/14	0,1170	BCDEFG
MA_337	0,1450	ABCDEFGF	BRH_1365/13	0,1160	BCDEFG
MA_344	0,1420	ABCDEFGF	MA_340	0,1150	BCDEFG
BKH_7/15	0,1410	ABCDEFGF	BRH_1780/13	0,1130	BCDEFG
MA_336	0,1390	ABCDEFGF	BRH_1251/13	0,1090	CDEFG
BRH_991/14	0,1390	ABCDEFGF	BRH_1938/13	0,1090	CDEFG
ES VALEGRO	0,1380	ABCDEFGF	BRH_1054/14	0,1090	CDEFG
MA_347	0,1350	ABCDEFGF	BRH_1774/13	0,1070	DEFG
MONOLIT	0,1350	ABCDEFGF	BRH_1772/13	0,1050	EFG
BKH_1/15	0,1350	ABCDEFGF	MA_343	0,1000	FG
BRH_603/13	0,1350	ABCDEFGF	BRH_1773/13	0,09500	G
ARSENAL	0,1340	ABCDEFGF		NIR $\alpha_{0.05} = 4,149405E-02$	

Najniższe indeksy porażenia odzwierciedlające odporność roślin rzepaku wyróżniono tłustą czcionką

The lowest values of infection indices reflecting resistance of winter oilseed rape plants were distinguished with bold font

Do przeprowadzenia testów odpornościowych wykorzystano czyste kultury patogenów określone na podstawie analiz DNA ITS 1.

W celu porównania wybranych sekwencji nukleotydów z „NCBI BLAST GenBank” poszczególnych patogenów stosowanych do inokulacji wykorzystano:

- Katalog M. Starzycki; izolaty 38,39,40,41,42 — *Leptosphaeria maculans* NCBI BLAST — identyfikacja, GenBank: JX499035.1; 99%; (Naumann i in., 2013).
Catalog of M. Starzycki; isolates 38,39,40,41,42 — *Leptosphaeria maculans* NCBI BLAST — identification, GenBank: JX499035.1; 99%; (Naumann i in., 2013),
- Katalog M. Starzycki; izolaty 16,17,18,19,20 — *Leptosphaeria biglobosa* NCBI BLAST — identyfikacja, GenBank: KT389541.1; 94%; (Cai i in. 2014, Chen i in. 2015) Catalog of M. Starzycki; isolates 16,17,18,19,20 — *Leptosphaeria biglobosa*
— NCBI BLAST — identification, GenBank: KT389541.1; 94%;(Cai i in. 2014, Chen i in. 2015),
- Katalog M. Starzycki; izolaty 51,52,53,54,56 — *Alternaria* sp. NCBI BLAST — identyfikacja, GenBank: KP099717.1; 100%; (Wei i in., 2015) Catalog of M. Starzycki; isolates 51,52,53,54,56 - *Alternaria* sp. NCBI BLAST — identyfikacja, GenBank: KP099717.1; 100%; (Wei i in., 2015).

Poniżej zestawiono wyniki dotyczące badań odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych oraz roślin kontrolnych i donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzajów *Leptosphaeria* oraz *Alternaria*. Do tego celu użyto testy odpornościowe *in vitro*. Ponadto przedstawiono badania odporności roślin mieszańcowych w stadium po kwitnieniu *in vivo*, kontrolnych-donorowych w celu wyselekcjonowania formy wykazującej maksymalną odporność na wybrane patotypy patogennych grzybów.

Tabela 6

Indeksy porażenia siewek mieszańców i odmian rzepaku na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. *in vitro* (test Wiliamsa 2016)
Indices of infection of hybrid seedlings and oilseed rape varieties caused by *Leptosphaeria* sp. and *Alternaria* sp. *in vitro* conditions (Williams test 2016)

L.p. No.	Obiekt Object	IP <i>Leptosphaeria</i> sp.	IP <i>Alternaria</i> sp.
1	301 × Digger/06 p.(Choryń × Bn)×Calif (20A/15)/16	0,63	0,23
2	295 × 645TP/06 p.(Br. × Bn)× Lisek (16A/15)/16	0,43	0,17
3	405/08 53 Bru × B.n./1 (12A/15)/16	0,5	0,23
4	301 × 303 TP/06 p. Choryńska(8A/15)/16	0,33	0,13
5	297/06 p.(Jar × B.n.) × Californium (6A/15)/16	0,17	0,33
6	420/08 38B.t. × B.n. (304 TP)/6 (4A/15)/16	0,36	0,3
7	420/08 38B.t. × B.n./3 (10A/15)/16	0,43	0,36
8	413/08 10 Tau × B.n./10 (18A/15)/16	0,17	0,3
9	Mendel/16	0,3	0,27
10	Visby/16	0,4	0,46
11	ES Vallegro/16	0,4	0,36
12	Oriolus/16	0,27	0,17

Najniższe indeksy porażenia (IP) związane z odpornością roślin mieszańców międzygatunkowych wyróżniono tłustą czcionką

The lowest values of infection indices reflecting resistance of interspecific hybrids were distinguished with bold font

Przeprowadzono także badania odporności roślin donorowych mieszańców międzygatunkowych (F₁) i gatunków podstawowych w warunkach *in vivo*. Badano formy wykazujące maksymalną odporność (wcześniej sprawdzoną) na wybrane patotypy

patogenicznych grzybów z rodzaju *Leptosphaeria*. Użyto metody zakażenia łodyg (tab. 7).



Rys. 1. Porażona roślina mieszańca międzygatunkowego po inokulacji łodyg zarodnikami konidialnymi *Leptosphaeria* sp.

Fig. 1. Infected plant of the interspecies hybrid after stems inoculation with conidia of *Leptosphaeria* sp.



Rys. 2. Roślina bez symptomów porażenia patogenicznym grzybem *Leptosphaeria* sp. po zastosowaniu inokulacji zarodnikami konidialnymi

Fig. 2. Plant without symptoms caused by *Leptosphaeria* sp. after inoculation with conidia

Tabela 7

Mieszzańce międzygatunkowe odporne na *Leptosphaeria* sp., rośliny donorowe *in vivo*
Interspecific hybrids resistant to *Leptosphaeria* sp., *in vivo* donor plants

Genotyp Genotype	Liczba roślin No. of plants		Suma badanych roślin Sum of tested plants
	odporne resistant	nieodporne not resistant	
<i>B. oleracea</i>	18	3	21
<i>B. o. jarmuż</i>	1	0	1
<i>B. cretica</i> × <i>B.napus</i>	4	2	6
(<i>B.o. × bruk.</i>) × (<i>B. cretica</i> × <i>B.n</i>)	26	6	32
<i>B.tauriaca</i> × <i>B.n.</i>	18	1	19
<i>B. o. jarmuż</i> × <i>B.tauriaca</i>	9	1	10
Brukselka × <i>B.n.</i>	10	0	10
<i>B. o. kapusta biała</i>	2	0	2
<i>B.o. Puławska</i> × <i>B.taurica</i>	1	0	1
<i>B.o. Pastewna</i> × <i>B.taurica</i>	3	0	3
(<i>B.o. Pastewna</i> × <i>B.taurica</i>) × <i>B.n.</i>	10	1	11
<i>B. o. Brukselka</i> × <i>B. cretica</i>	4	0	4
<i>B.napus</i> × <i>B. juncea</i>	0	1	1
<i>B. o. jarmuż</i> × <i>B.o.</i> (cavalo nero)	3	0	3
Rzodkiew czarna	0	1	1
(<i>B.o. Puławska</i> × <i>B. o. B.taurica</i>) × <i>B.campestris</i>	3	0	3
[(<i>B.o. Puławska</i> × <i>B.taurica</i>) × <i>B.campestris</i>] × <i>B.n.</i>	3	0	3
kapusta głowiasta × jarmuż	3	0	3
(Brukselka × <i>B.n.</i>) × <i>B. campestris</i>	2	0	2
(<i>B.o. Puławska</i> × <i>B. o. B.taurica</i>) × <i>B. o. jarmuż</i>	1	0	1
<i>B.o. × B. taurica</i>	1	0	1
<i>B.napus</i> Tos. × <i>B. napus</i> restorer	5	10	15
Σ	127	26	153

Zdecydowana większość bonitowanych roślin (ok. 80%) wykazywała podwyższoną odporność na grzyby rodzaju *Leptosphaeria*. Ponadto na powyższych genotypach w żadnym przypadku nie odnotowano występowania grzybów z rodzaju *Alternaria*.

DYSKUSJA

Badania nad odpornością na stresy biotyczne roślin z plemienia *Brassicaceae* otrzymanych z krzyżowań międzygatunkowych *in vitro* zmierzają w kierunku otrzymywania roślin rzepaku o zróżnicowanych genotypach pod względem tolerancji lub odporności na najgroźniejsze patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* i *Alternaria*. Są one prowadzone na całym świecie (Yuko Kaneko, 2014; Degenhardt, 1982; Douglas, 1994) z uwagi na brak naturalnych genotypów *B. napus* wykazujących całkowitą genetyczną odporność roślin. Podczas prowadzenia prac ważny jest dobór komponentów rodzicielskich, które charakteryzują się sprawdzoną wcześniej podwyższoną odpornością. Genotypy takie spotykane są jednak rzadko, a nieliczne poddaje się klonowaniu i powtórnemu sprawdzaniu odporności. Podany kierunek badań jest ważny, ponieważ pozwala na wyeliminowanie komponentów o słabszej odporności. Otrzymywanie zarodków mieszańcowych, przy wykorzystaniu preselekcjonowanych wcześniej pod względem odporności roślin donorowych jest zadaniem niełatwym, ponieważ wymaga

dużej znajomości wiedzy fitopatologicznej i embriologicznej. Trudność polega na tym, że wszystkie tego typu manipulacje (manualne) wykonywane są przy użyciu mikroskopu i sterylnych narzędzi do preparowania zarodków. Powyższa wiedza powinna być wykorzystana praktycznie, tak, aby można było podczas pracy odseparować tkankę bielkową, która zostaje usunięta, a następnie wydzielić izolowany zarodek (duża trudność w przypadku stadiów globularnych). Podczas wykonywania powyższych prac zaobserwowano następujące zależności. Pierwszą była stosunkowo dobra wydajność otrzymanych embrionów mieszańcowych (tab. 1), a druga związana była z małymi preparowanymi stadiami embrionalnymi, bardzo często globularnymi – białymi, które nie podjęły wzrostu na pożywkach agarowych i zamierały, początkowo przypuszczano, że mogło mieć to związek z podwyższoną temperaturą. Kiedy zastosowano niższe temperatury 10°C wydajność w otrzymywaniu zarodków pozostała na podobnym poziomie (dane nie publikowane). Należy przypuszczać, że najbardziej prawdopodobną przyczyną zamierania małych zarodków mieszańców międzygatunkowych mogły być genotypy mateczne i ojcowskie (tak zwane genotypy odporne), których użyto do krzyżowań (Niemann i in., 2015).

Aby poszerzyć pulę genetyczną o formy wykazujące podwyższoną odporność na patogeny *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. prowadzono badania ukierunkowane na poszukiwanie tego typu form w warunkach naturalnych (CETIOM 1990). Badania te (IP — indeks porażenia) były prowadzone w miejscowościach: Małyszyn, Borowo (HR Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR) i Bąków (HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR). Na podstawie badań odporności indywidualnie ocenianych pod względem chorób (*Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.) roślin donorowych z plemienia *Brassicae*, wyselekcjonowano najodporniejsze z doświadczeń w celu piramidyzacji rezystencji. Końcową ocenę odporności dokonano przed zbiorem, ponieważ podczas wcześniejszych bonitacji nie stwierdzono porażen. Sprawdzone odporne genotypy każdorazowo stosowane są do krzyżowań międzygatunkowych, jako formy ojcowskie-zapylacze w następnym sezonie wegetacyjnym. Ponadto wyniki podane w tabelach: 4 i 5 mają charakter aplikacyjny dla hodowców rzepaku i stanowią informację o odporności badanych form *B. napus* na porażenie powodowane przez patogeny: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.

Poza badaniami polowymi rzepaku przeprowadzono badania odporności siewek przy użyciu testu Williama (Winter, 2000), co pozwoliło na wskazanie genotypów odporniejszych (w stadium liścieni) zarówno na porażenie powodowane przez: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. (tab. 5). Przedstawiona metoda jest mało skomplikowana, może być stosowana na dużą skalę zarówno w badaniach genetycznych oraz w hodowli form odpornych rzepaku, ale tylko dla stadium siewki. Niestety większość opracowań dotyczących odporności roślin rzepaku oparta jest o analizę rezystencji młodocianych stadiów (Hammond i in., 1987; Pang i in., 1996; Plieske i in., 1998; Rimmer i in., 1992). Na podstawie przeprowadzonych autorskich badań (PBwPR-49, sprawozdanie, str. 11, 2015) nie stwierdzono dodatniej korelacji pomiędzy odpornością badanych roślin w stadium siewki i roślin starszych. Ze względu na występowanie suchej zgnilizny kapustnych na rzepaku podczas cieplejszej jesieni

(ostatnio obserwowane), prace selekcyjne powinny być prowadzone zarówno w stadium liścieni oraz 2 tygodnie po kwitnieniu roślin. Połączenie obu odporności jest ważne z punktu widzenia późniejszych wyższych plonów *B. napus*.

Odrębne badania odporności dotyczyły roślin, które rosły w zbliżonych warunkach do naturalnych *in vivo*. Warunki naturalne stymulują w wielu przypadkach elicitory, których brak w tzw. hodowlach kontrolowanych, nawet w fitotronie. Po zastosowaniu nowej autorskiej metody „kaleczenia łodyg” i inokulacji wybranymi patogenami, wyselekcjonowano odporne rośliny donorowe do dalszych badań nad odpornością poligeniczną. Tego typu rośliny stanowią najlepszy materiał odporności genetycznej (tab. 6).

WNIOSKI

1. Aby otrzymać nowe formy rzepaku ozimego bardziej odporne na porażenie powodowane przez najgroźniejsze patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* i *Alternaria* ważna jest preselekcja i wybór genotypów donorowych o podwyższonej odporności.
2. Nieznana jest do obecnego czasu przyczyna niskiej wydajności w otrzymywaniu embryonów międzygatunkowych dla preselekcjonowanych genotypów. Najbardziej prawdopodobnym czynnikiem związanym z zamieraniem małych zarodków mieszańców międzygatunkowych mogą być genotypy mateczne i ojcowskie, tzw. odporne użyte do krzyżowań.
3. Podczas prowadzenia badań nad odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. w warunkach polowych odnotowano pewien procent roślin, u których porażenie było na niskim poziomie, co związane było z osiągnięciem zamierzonego celu, ale stanowiło przeszkodę w uzyskaniu istotnych statystycznych różnic (małe różnice odporności pomiędzy obiektami).
4. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono: genotypy rzepaku oraz grupy odmian charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., co wykazano statystycznie. Rody i odmiany rzepaku, u których zaobserwowano wyższą rezystencję stanowią potencjalny materiał (donorowy) do dalszej hodowli odpornościowej na choroby: czerń krzyżowych oraz suchą zgniliznę kapustnych. Wyniki mają charakter aplikacyjny.
5. Po przeprowadzonych badaniach na siewkach stwierdzono przydatność testów laboratoryjnych do oceny odporności mieszańców międzygatunkowych. Testy te mogą być stosowane zarówno do analizy patogeniczności izolatów *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. oraz odporności mieszańców międzygatunkowych w stadium liścieni.
6. Potwierdzono skuteczność nowej metody inokulacji patogenami *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., polegającej na zakażaniu łodyg roślin. Metoda ta skutecznie pozwoliła na wyselekcjonowanie odpornych genotypów roślin z rodziny *Brassicaceae*.

LITERATURA

- Balesdent M. H., Barbetti M., Li Hua, Sivasithamparam K., Gout L., Rouxel T. 2005. Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology* 95: 1061 — 1071.
- Boba A., Kulma, Kostyn K., Starzycki M., Starzycka E., Szopa J. 2011. The influence of carotenoid biosynthesis modification on the *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum* resistance in flax. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76: 39 — 47.
- Cai X., Yang L., Zhang J., Li G. Q. 2014. First Report of *Leptosphaeria biglobosa* Causing Black Leg on *Raphanus sativus* in Central China. *Plant Disease* 98(7): 993 — 993.
- Chen Q., Jiang J. R., Zhang G. Z., Cai L., Crous P. W. 2015. Resolving the *Phoma enigma*. 2015. *Studies in Mycology* 82: 137 — 217.
- CETIOM, 1990. Techniques for the artificial contamination of oilseed rape in trial plots. *Les Points Methodes du CETIOM*: 20 — 25.
- Degenhardt K. J., Petrie G. A., Morrall R. A. A. 1982. Effects of temperature on spore germination and infection of rapeseed by *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* and *A. raphani*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 115 — 118.
- Delourme R., Chevre A. M., Brun H., Rouxel T., Balesdent M. H., Dias J., Salisbury P., Renard M., Rimmer S. R. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* 114: 41 — 52.
- Douglas W. Heath, Elizabeth D. Earle, Michael H. Dickson. 1994. Introgressing Coldtolerant Ogura Cytoplasm from Rapeseed Choi and Chinese Cabbage. *HortScience* 29 (3): 202 — 203.
- Fudal I., Ross S., Gout L., Blaise F., Kuhn M. L., Eckert M. R., Cattolico L., Bernard-Samain S., Balesdent M. H., Rouxel T. 2007. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of AvrLm6. *Molecular Plant — Microbe Interactions* 20: 459 — 470.
- Kamiński P., Podwyszyńska M., Starzycki M., Starzycka-Korbas E. 2016. Interspecific hybridisation of cytoplasmic male-sterile rapeseed with Ogura cytoplasm and *Brassica rapa* var. *pekinensis* as a method to obtain male-sterile Chinese cabbage inbred lines. *Euphytica*, Volume 208: 519 — 534.
- Naumann T. A., Wicklow D. T. 2013. Chitinase modifying proteins from phylogenetically distinct lineages of Brassica pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 82: 1 — 9.
- Niemann J., Olender M., Wojciechowski A., Tomkowiak A. 2015. Interspecific hybridization between *Brassica napus* and *Brassica rapa* ssp. *chinensis* genotypes through embryo rescue and their evaluation for crossability. *BioTechnologia* vol. 96 (2): 184 — 191.
- Plissonneau C., Daverdin G., Ollivier B., Blaise F., Degrave A., Fudal I., Rouxel T., Balesdent M. H. 2016. A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* 209: 1613 — 1624.
- Nowicki M., Nowakowska M., Niezgoda A., Kozik E. U. 2012. *Alternaria* black spot of crucifers symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Vegetable Crops Research, Bulletin Research Institute of Horticulture* 76: 5 — 19.
- Rouxel T., Grandaubert J., Hane J.K., Hoede C., van de Wouw A.P., Couloux A., Dominguez V., Anthouard V., Bally P., Bourras S., Cozijnsen A.J., Ciuffetti L.M., Degrave A., Dilmaghani A., Duret L., Fudal I., Goodwin S.B., Gout L., Glaser N., Linglin J., Kema G.H., Lapalu N., Lawrence C.B., May K., Meyer M., Ollivier B., Poulain J., Schoch C.L., Simon A., Spatafora J.W., Stachowiak A., Turgeon B.G., Tyler B.M., Vincent D., Weissenbach J., Amselem J., Quesneville H., Oliver R.P., Wincker P., Balesdent M.H., Howlett B.J. 2011. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* 2: 202.
- Sprague S. J., Balesdent M.H., Brun H., Hayden H. L., Marcroft S. J., Pinochet X., Rouxel T., Howlett B. J. 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* 114: 33 — 40.

- Starzycki M., Starzycka E., Pszczoła J. 2007. Development of Alloplasmic Rape. *Advances in Botanical Research*, Elsevier Ltd. Vol. 45: 313 — 335.
- Starzycka E., Starzycki M. 2008. Najważniejsze wyniki badań nad zgnilizną twardzikową w rzepaku przedstawione na XII Międzynarodowym Kongresie Rzepakowym w Wuhan. *Rośliny Oleiste. Oilseed Crops* t. XXIX: 281 — 290.
- Starzycka E., Kuzik M., Starzycki M., Cichy H., Budzianowski G., Woś H. 2009. Odporność rzepaku na porażenie przez *Leptosphaeria* sp. i *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary oceniana w doświadczeniach PDO w dwóch miejscowościach: Małyszynie i Borowie, w latach 2008 i 2009. *Rośliny Oleiste. Oilseed Crops* t. XXX: 207 — 222.
- Starzycka E., Starzycki M. 2011. In vivo and in vitro investigations on changes taking place under the influence of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary fungus mycotoxin. *Phytopathologia* 61: 43 — 49.
- Van de Wouw A. P., Lowe R. G. T., Elliott C. E., Dubois D. J., Howlett B. J. 2014. An avirulence gene, AvrLmJ1, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology* 15: 523 — 530.
- Wei J., Lin Z., Zhang M., Qin L., Bao Y., Wang J., Rao G. P. 2015. First Report of *Alternaria* sp. causing Brown Leaf Streak on Sugarcane in China. *Plant Disease* 99 (8): 1176.
- Winter H. 1999. Blackleg resistance of different origin transferred into *Brassica napus*. www.regional.org.au/au/gcirc/4/593.htm.
- Yuko Kaneko and Sang Woo Bang. 2014. Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of *Brassicaceae* Crops. *Breeding Science* 64 (1): 14 — 22.