

Zadanie nr 96

Wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli odpornościowej pomidora na choroby powodowane przez *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* i *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Kierownik projektu: Dr Mirosława Staniaszek

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (*Pst*) i *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*) należą do patogenów pomidora, które powodują duże straty w produkcji. Pierwszy wywołuje bakteryjną cętkowatość, chorobę występującą w uprawie gruntowej i szklarniowej pomidora. Drugi patogen należy do grzybów i jest odpowiedzialny za fuzaryjne więdnienie pomidora, czyni straty w produkcji szklarniowej i tunelach foliowych.

W hodowli ukierunkowanej na uzyskanie odmian odpornych stosuje się klasyczne metody selekcji, polegające na sztucznej inokulacji roślin czynnikiem chorobotwórczym. Są to techniki czasochłonne, kosztowne i wymagające wielu powtórzeń. Alternatywą dla dotychczas stosowanych testów fitopatologicznych mogą być metody molekularne, zwłaszcza te oparte na amplifikacji DNA przy wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Celem badań była identyfikacja genu *Pto* i *I-2* w odmianach i liniach hodowlanych pomidora o różnym tle genetycznym, zróżnicowanym stopniu odporności, przy użyciu markerów: pseudoSCAR SCRP487₁₅₀₀ i TAO1₉₀₂. Zbadano obecność markera SCRP487₁₅₀₀ powielanego z zastosowaniem pary starterów RP487 i RP487GAAA i fragmentów restrykcyjnych markera TAO1₉₀₂ w 91 genotypach pochodzących z IWARZ-PNOS Sp. z o. o. Reguły. Do badań włączono także odmiany i linie hodowlane o zdefiniowanej odporności/podatności na *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*) i *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*):

- Mogeor, Motelle, A241, odporne na *Fol*
- Ontario 7710, odporna na *Pst*
- A 100, linia podatna na *Pst*.

Izolację genomowego DNA z 0.5-1.0 grama liści pomidora wykonano wg procedury opisanej dla zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Stężenie oraz czystość uzyskanego DNA określono spektrofotometrycznie oraz na 0.8% żelu agarozowym.

Marker SCRP487₁₅₀₀ był amplifikowany dla 81 genotypów, co świadczy o odporności tych pojedynków na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Analiza restrykcyjna markera TAO1₉₀₂ przy użyciu enzymów *RsaI* lub *BseGI* wykazała obecność produktów restrykcyjnych specyficznych dla allelu recesywnego co wskazuje że 91 analizowanych genotypów jest podatnych na rasę 2 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Wśród analizowanych 51 roślin reprezentujących 17 linii hodowlanych otrzymanych z PlantiCo Sp. z o. o., Gołębiew Nowy, obecność fragmentu DNA o długości 1500 par zasad świadczącego o odporności na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* stwierdzono w profilach amplifikacyjnych 29 roślin.

Kontynuowano również badania nad opracowaniem markera kodominującego do identyfikacji locus *Pto*. Marker SCRP487₁₅₀₀ został sklonowany. Na podstawie uzyskanej sekwencji opracowano warunki amplifikacji markera o długości 555 pz, który był powielany dla genotypów odpornych i podatnych. Badania form rodzicielskich Ontario (odporny) i A100 (podatny) doprowadziły do identyfikacji specyficznego markera CAPS, na podstawie trawienia amplikonu enzymem restrykcyjnym *RsaI*.

Sprawdzono obecność fragmentów restrykcyjnych markera SC487₅₅₅ dla 70 roślin pokolenia F₂. Jednak słaba detekcja markera w profilach amplifikacyjnych roślin pokolenia F₂ uniemożliwiła jednoznaczne rozróżnienie genotypów w stanie heterozygoty i homozygoty.

Badania są kontynuowane i mają na celu optymalizację warunków amplifikacji markera SC487₅₅₅.

Podjęto również badania nad wykorzystaniem markera KFG (ang. Known Function Gene) zamieszczonego w bazie Solanaceae Genomics Network. W wyniku amplifikacji ze starterami F i R otrzymano fragment DNA o długości ok 900 pz, który był powielany dla obu form rodzicielskich (odmiany Ontario, odpornej na *Pst* i linii A100, podatnej na *Pst*). W badaniach polimorfizmu powielanych fragmentów DNA stosowane będzie trawienie produktów PCR przy użyciu enzymów restrykcyjnych.