

Zadanie 66 Badania nad opracowaniem molekularnej metody identyfikacji genów warunkujących ważne cechy użytkowe pomidora

W roku 2014 badania prowadzono w ramach pięciu tematów badawczych

Temat badawczy 1

Ocena podatności/odporności roślin pomidora na fuzaryjne wędnięcie (*Fol*) oraz bakteryjną plamistość (*Xc*) w warunkach kontrolowanych

Celem niniejszego tematu badawczego była ocena zgromadzonej kolekcji linii pomidora pod względem odporności na: fuzaryjne wędnięcie (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), rasa 1) oraz na bakteryjną plamistość (*Xanthomonas vesticatoria* (*Xv*), rasa T2). U siedmiu z 12. ocenianych linii pomidora stwierdzono wysoką odporność na rasę 1 *Fol*. Natomiast analiza wyników z testów fitopatologicznych wykazała zróżnicowaną reakcję badanych linii na porażenie przez szczep *Xv4* (rasa 2). Najwyższym poziomem odporności wyróżniła się linia *S. lycopersicum* var. *cerasiformae* PI 114490. W następnej kolejności należy wymienić dwie populacje: PI 155372 (*S. lycopersicum* var. *cerasiformae*) oraz Fla 8517 (*S. lycopersicum*), które charakteryzowały się średnim poziomem odporności. Pozostałe linie i odmiany (73% badanych populacji) były podatne. Na podstawie wyników testów infekcyjnych wytypowano do dalszych etapów badań linie o skrajnej reakcji na porażenie przez badane patogeny. Linie te posłużyły jako materiał donorowy do analiz molekularnych DNA oraz do wygenerowania pokolenia F_1 i RF_1 niezbędnego do otrzymania F_2 lub pokoleń wstecznych, które zostaną wykorzystane w następnych latach badań do oceny sprzężenia zidentyfikowanych markerów różnicujących odporne i podatne komponenty rodzicielskie.

Temat badawczy 2

Analiza polimorfizmu DNA form rodzicielskich o skrajnej reakcji na porażenie przez odpowiednio: *Fol* oraz *Xv*

Analizy polimorfizmu prób zbiorczych DNA form o skrajnej reakcji na porażenie przez rasę 1 *Fol* (LA 4285, A 100) wykonano z wykorzystaniem 20 par starterów PCR, które zaprojektowano na podstawie sekwencji nukleotydowych o znanej lokalizacji na chromosomach 11 i 7 pomidora, na których zmapowano odpowiednio geny *I* i *I-1*. Zidentyfikowano dwa markery CAPS oraz jeden marker typu SCAR jako potencjalnie sprzężone z locus *I*. Określenie ich przydatności w hodowli wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań na podstawie reakcji roślin pokolenia F_2 oraz szerokiej puli odpornych na rasę 1 *Fol* odmian/linii o zróżnicowanym pochodzeniu. Natomiast w badaniach nad poszukiwaniem polimorfizmu między podatną linią na rasę T2 *Xv* A 100 i odporną PI 114490 analizowano 36 par starterów PCR (SNP, SSR), które zostały zaprojektowane na podstawie sekwencji nukleotydowych o znanej lokalizacji na chromosomach pomidora na podstawie dostępnych danych literaturowych. Osiem z nich, wygenerowało polimorfizm w sekwencjach DNA wyjściowych komponentów (A 100 vs PI 114490).

Temat badawczy 3

Analiza polimorfizmu DNA u linii z genem *ps-2* o różnym pochodzeniu

W ramach niniejszego tematu badawczego do identyfikacji genu *ps-2* w sześciu funkcjonalnie męskosterylnych liniach pomidora o różnym pochodzeniu wykorzystano dwa markery: Ps-2-ABL i C4-30 opracowane odpowiednio przez Gourget i in. (2009) oraz Staniaszek i in. (2012). Zastosowane w badaniach markery molekularne były wyróżnikiem allelu *ps-2* we wszystkich analizowanych męskosterylnych liniach pomidora niezależnie od

ich pochodzenia. Jednak dopiero analizy sprzężenia obu analizowanych markerów z cechą *ps-2* w pokoleniu F_2 ostatecznie określą ich przydatność do selekcji wspomaganej markerami. W związku z tym, po ocenie sterility z trzech linii *ps-2* wyselekcjonowano rośliny o całkowitej sterility kwiatów, na których metodą zapyleń ręcznych wykonano skrzyżowania z wybranymi liniami płodnymi.

Temat badawczy 4

Identyfikacja genu *ps* w liniach funkcjonalnie męskosterylnych o różnym tle genetycznym przy użyciu markera DNA C2-21

Celem tematu badawczego było sprawdzenie przydatności opracowanego dla genu *ps* markera C2-21 (Staniaszek i in. 2012) na szerokiej puli funkcjonalnie męskosterylnych linii *ps* o różnym pochodzeniu. Potrzeba przeprowadzenia analizy molekularnej wynikała z rozbieżności pomiędzy oceną fenotypową a detekcją markera C2-21 obserwowaną dotychczas w niektórych liniach *ps* o różnym pochodzeniu. Analiza uzyskanych wyników wykazała brak zgodności między oceną fenotypową (obecność lub brak cechy *ps*) a statusem loci markera DNA C2-21 u sześciu z 10. testowanych linii sterylnych oraz u 100 roślin określonych przez PlantiCo Zielonki jako genotypy homozygotyczne z cechą *ps*. Marker ten umożliwił identyfikację allelu *ps* tylko u czterech liniach, co wskazuje na jego specyficzność ograniczoną do konkretnych liniach. Ponadto, rozpoczęto badania nad identyfikacją innych markerów molekularnych sprzężonych z genem *ps*, charakteryzujących się wyższą informatywnością oraz uniwersalnością. Badania te przeprowadzone jak dotąd przy pomocy 9 markerów zlokalizowanych na chromosomie 2, nie wykazały polimorfizmu pomiędzy formami sterylnymi (*ps*) i płodnymi. Wskazuje to na potrzebę kontynuowania prac nad poszukiwaniem markerów silnie sprzężonych z genem *ps*.

Temat badawczy 5

Ocena pokolenia F_1 pochodzącego ze skrzyżowania genotypów sterylnych o różnej budowie kwiatów pod względem cech anatomicznych kwiatów oraz poziomu sterility

Badania miały na celu morfologiczno–anatomiczną ocenę kwiatów rekombinantów zidentyfikowanych w segregujących pod względem cechy *ps* (budowy kwiatu) i poziomu sterility populacjach pomidora. We wszystkich trzech badanych mieszańcach F_1 pochodzących ze skrzyżowania roślin sterylnych o różnych cechach fenotypowych kwiatu (o typowej budowie dla genu *ps* i o typowej budowie dla płodnych kwiatów) stwierdzono zróżnicowanie w morfologii kwiatów. Kwiaty typowe dla genu *ps* posiadały budowę anatomiczną typową dla kwiatów linii *ps*. Natomiast w kwiatach fenotypowo zbliżonych do kwiatów roślin płodnych w badanych mieszańcach obserwowano cechy charakterystyczne dla mutantów *ps* tj.: zrośnięcie się endotecjów dwóch sąsiadujących ze sobą komór pylnikowych, charakterystyczne drewnienie zewnętrznej części ich ściany oraz wzmocnienie części wewnętrznej komór pylnikowych licznymi włoskami. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że pojawiające się w pokoleniach segregujących sterylne rekombinanty o kwiatach fenotypowo zbliżonych do kwiatów płodnych są wynikiem zaburzeń w ekspresji genu *ps*.