



Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych
Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin
Warzywnych

Poszerzenie zmienności genetycznej pomidora o odporność na wybrane stresy biotyczne oraz ważne cechy jakościowe – raport za 2021 rok

Autor:

dr Marzena Nowakowska

Opracowanie przygotowane w ramach
Zadania 3.1.: Poszerzenie zmienności genetycznej pomidora o odporność na wybrane stresy
biotyczne oraz ważne cechy jakościowe
realizowanego w ramach dotacji celowej MRiRW na rok 2021
Obszar 3. Hodowla i nasiennictwo roślin uprawnych



Skierniewice 2021

Spis treści:

1. Wstęp
2. Cel zadania
3. Ocena kolekcji linii hodowlanych pomidora znajdujących się w kolekcji IO-PIB pod względem ważnych cech morfologiczno-użytkowych
4. Rozpoczęcie programu hodowlanego mającego na celu wyprowadzenie linii pomidora polowego przydatnych do tworzenia odmian przeznaczonych do zbioru mechanicznego.
5. Pozyskanie źródeł odporności na wirusa brązowej plamistości pomidora oraz optymalizacja metod testowania roślin na wirusa brązowej plamistości pomidora (TSWV);
6. Otrzymanie rekombinacyjnych linii wsobnych pokolenia F₆, pochodzących ze skrzyżowania odpornego na zarazę ziemniaka (*P. infestans*) akcesu *S. pimpinellifolium* LA 1604 z podatną odmianą *Solanum lycopersicum* Rumba.

1. Wstęp:

Pomidor to jedno z najpopularniejszych i najważniejszych gospodarczo warzyw, cenione przede wszystkim za wysokie walory odżywcze. Proces udoskonalania tego gatunku poprzez selekcję doprowadził w dużej mierze do uzyskania pożądaných w hodowli cech, ale jednocześnie do zawężenia różnorodności alleli w populacji. Dlatego też gatunek ten jest dość wrażliwy na czynniki chorobotwórcze czy stresy abiotyczne. Obserwowane w ostatnich latach nowe zagrożenia fitosanitarne, wynikające z intensyfikacji międzynarodowego obrotu artykułami rolnymi oraz zmian klimatycznych, wpływają negatywnie na jakość i wielkość plonowania pomidora. Jednym z największych zagrożeń dla upraw pomidora pod osłonami są choroby powodowane przez wirusy. W przypadku pomidora polowego czynnikiem w dużym stopniu ograniczającym plonowanie jest także zaraza ziemniaka wywoływana przez organizm grzybopodobny – *Phytophthora infestans*. Wychodząc naprzeciw tym zagrożeniom, niezbędne jest opracowywanie strategii hodowlanych pozwalających na wyprowadzenie materiałów wyjściowych cechujących się odpornością na najważniejsze gospodarczo choroby, z uwzględnieniem zmian w populacjach patogenów. W ramach zadania 3.1 prowadzone są prace mające na celu m.in. identyfikację odporności na wybrane patogeny u dzikich form pomidora i wprowadzenie ich do programów hodowlanych. Ponadto, podejmowane są badania polegające na opracowywaniu molekularnych metod identyfikacji regionów genomu odpowiedzialnych za odporność na dane czynniki patogenne. Jednocześnie, oprócz hodowli odpornościowej, wiele uwagi poświęconej jest poprawie jakości owoców pomidora oraz tworzeniu nowej zmienności pod względem ważnych cech (np. przydatność do zbioru mechanicznego, lepsza wczesność). Efekty badań w postaci ulepszonych materiałów wyjściowych pomidora będą następnie wykorzystywane w programach hodowli twórczej do tworzenia nowych i bardziej wydajnych odmian pomidora przystosowanych do produkcji ogrodniczej w Polsce oraz do wymagań producentów i konsumentów.

2. Cel zadania:

Badania prowadzone w 2021 roku miały na celu:

- ocenę linii hodowlanych pomidora znajdujących się w kolekcji IO-PIB pod względem ważnych cech morfologiczno-użytkowych;
- rozpoczęcie programu hodowlanego mającego na celu wyprowadzenie linii pomidora polowego przydatnych do tworzenia odmian przeznaczonych do zbioru mechanicznego;
- pozyskanie źródeł odporności na wirusa brązowej plamistości pomidora (TSWV) oraz optymalizację metod testowania reakcji roślin pomidora na infekcje TSWV;
- otrzymanie pokolenia F₆ pochodzącego ze skrzyżowania odpornego na zarazę ziemniaka (*P. infestans*) akcesu *S. pimpinellifolium* LA 1604 z podatną odmianą *S. lycopersicum* Rumba.

3. Poszerzenie zmienności genetycznej pomidora o wartościowe cechy użytkowe

Realizacja niniejszego zadania miała charakter złożony i obejmowała kilka etapów. Badania rozpoczęto od oceny różnorodności genetycznej oraz wyrównania materiałów hodowlanych (pomidor pod osłoną, pomidor polowy) pod względem wybranych cech agromorfologicznych zgodnie z klasyfikatorem dla rodzaju *S. lycopersicum*.

Pomidor pod osłoną

W doświadczeniu szklarniowym materiał badawczy stanowiło 12 linii o zróżnicowanym stopniu zaawansowania w hodowli wsobnej. Określono zróżnicowanie międzyliniowe, jak również wyrównanie wewnątrzliniowe badanych linii. Owoce linii najbardziej zaawansowanych w hodowli wsobnej (wszystkie począwszy od F₆, w sumie 8 linii) oceniono również pod względem zawartości wybranych składników fizykochemicznych oraz jakości sensorycznej. Poziom wyrównania badanych linii był wprost proporcjonalny do ich stopnia zaawansowania w procesie homozygotyzacji. Linie najbardziej zaawansowane w procesie hodowlanym cechowały się bardzo wysokim (TG005, TG006, TG007, TG009) lub wysokim (TG012, TG014, TG015, TG020) wyrównaniem pod względem wszystkich ocenianych cech. Linie te charakteryzowały się jednocześnie znacznym, a więc pożądanym, szczególnie dla efektu heterozji badanego w mieszańcach F₁, poziomem zróżnicowania międzyliniowego pod względem większości analizowanych cech morfologicznych roślin, gron i owoców (Fot. 1). Największe różnice zaznaczyły się w wielkości i kształcie owocu. Większość linii wykształcała owoce duże w typie BB (średnica owocu: 67-82 mm; TG005, TG006, TG0012, TG020) lub bardzo duże BBB (średnica owocu 82-102 mm; TG007). Ich owoce były na ogół spłaszczone w mniejszym (TG005, TG012, TG020) lub większym (TG006, TG007) stopniu. Jedna linia (TG009) wykształcała owoce o średniej wielkości w typie B (średnica owocu 47-57 mm) i prawie kulistym kształcie. Dwie inne linie należy zaliczyć do kategorii drobnoowocowych, a ich owoce – do typu cherry (masa owocu: 10-25g), kulistego (TG025) lub wydłużonego (TG015). Inną bardzo ważną cechą jakościową owocu, która wpływa na możliwości transportowe i przechowalnicze odmian jest twardość owocu. Najwyższą twardość owocu po trzech tygodniach przechowywania (wskaźnik twardości 6,8-7,0 w skali dziewięciostopniowej), odnotowano u sześciu z 8. badanych linii. Poza tym, większość linii wykształcała owoce o bardzo wysokiej jakości, bez tendencji do splekań. Wszystkie wyżej wymienione linie wykształcały owoce o barwie czerwonej z różną jej intensywnością.



Fot. 1. Przykładowe fotografie ilustrujące zróżnicowanie międzyliniowe linii pomidora pod osłoną znajdujących się w kolekcji IO-PIB

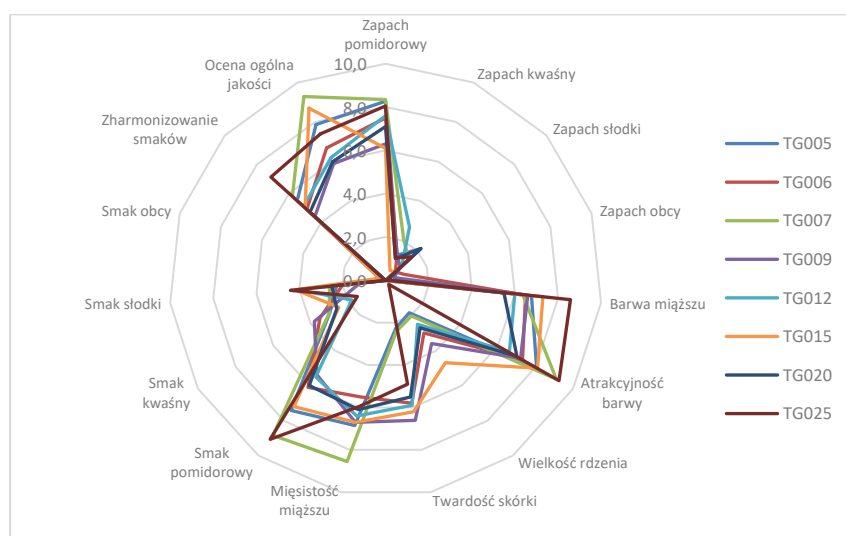
Stwierdzono także duże różnice pomiędzy badanymi liniami w zakresie zawartości analizowanych parametrów fizyko-chemicznych (Tab. 1). Spośród wszystkich badanych linii najwyższą zawartością likopenu oraz witaminy C wyróżniła się drobnoowocowa linia TG015 (typ cherry). Owoce tej linii, jak również innej linii z segmentu cherry (TG025), charakteryzowały się wysoką zawartością substancji rozpuszczalnych (ekstraktu) oraz suchej masy przewyższając pozostałe linie pod tym względem o 23-43%. Owoce badanych linii zostały ocenione bardzo wysoko zarówno pod względem zapachu, smaku, jak i cech teksturowych (Rys. 1). Oceniający przyznali najwyższe noty oceny ogólnej jakości dwóm liniom: TG007 oraz TG015. Owoce tych linii były

ocenione najwyżej pod względem intensywności smaku pomidorowego, smaku słodkiego i charakteryzowały się najwyższą atrakcyjnością barwy skórki i barwy miąższu. Szczególnie owoce linii TG015 były idealnie zharmonizowane pod względem balansu pomiędzy smakiem kwaśnym a słodkim, o czym świadczy ocena 5,0.

Celem uzyskania następnego pokolenia, rośliny wyżej opisanych ośmiu linii rozmnożono generatywnie metodą zapyleń ręcznych.

Tabela 1. Charakterystyka składu chemicznego owoców ośmiu linii pomidora pod osłoną

Linia	Sucha masa %	Ekstrakt %	Kwas askorbinowy mg/kg	Likopen mg/kg
TG005	5.66	4.84	13.05	47.09
TG006	6.58	6.43	18.91	49.20
TG007	5.14	4.68	8.51	50.70
TG009	5.75	5.08	19.27	52.32
TG012	6.36	5.86	26.72	64.49
TG015	8.99	8.28	32.88	91.59
TG020	5.17	4.79	16.04	59.57
TG025	9.67	8.13	23.07	52.83



Rys. 1. Ocena jakości sensorycznej owoców ośmiu linii pomidora pod osłoną w skali umownej od 0 do 10.

Z kolei, u linii pokolenia F₄ (TG024), wykształcającej owoce duże i spłaszczone (typ wielkoowocowy, owoce typu BB lub BBB), obserwowano niewielkie zróżnicowanie dotyczące głównie cech morfologicznych owoców. W wyniku selekcji do dalszych etapów badań wytypowano 8 pojedynków. Z kolei u linii pokolenia F₂ stwierdzono bardzo dużą zmienność fenotypową w zakresie większości analizowanych cech morfologicznych roślin, budowy gron, a szczególnie owocu (Fot. 2). Z trzech linii F₂ (TG013, TG016, TG018) do dalszych etapów badań wytypowano łącznie 17 pojedynków, które różniły się barwą owocu (czerwony i malinowy), wielkością i kształtem owocu (od owocu w typie cherry do owoców dużych o kształcie sakiewki czy bawolego serca) oraz wieloma innymi cechami. Duża zmienność wewnątrzliniowa linii pokoleń segregujących wskazuje na konieczność prowadzenia dalszej hodowli wsobnej tych linii

dla uzyskania większego wyrównania. Z drugiej strony jednak stwarza możliwości zwiększenia bioróżnorodności w dostępnej puli genowej.



Fot. 2. Przykładowe fotografie ilustrujące zmienność fenotypową segregujących linii F₂ pomidora pod osłony

Pomidor polowy

Materiałem wyjściowym do badań było 8 linii o zróżnicowanym stopniu zaawansowania w hodowli. Badania realizowano dwuetapowo. Celem pierwszego doświadczenia, założonego w szklarni, było scharakteryzowanie materiałów hodowlanych pod względem cech agromorfologicznych, dokonanie selekcji najbardziej wartościowych genotypów, a następnie ich rozmnożenie generatywne. Natomiast w doświadczeniu drugim, założonym w warunkach polowych, dokonano oceny wczesności oraz stopnia podatności na zarazę ziemniaka w warunkach naturalnej infekcji *P. infestans*. Ze względu na wysoką podatność dwóch linii F₂ (TF007, TF008), linie te zostały uwzględnione jedynie w doświadczeniu szklarniowym. Z kolei linie TF011 (F₂) oraz TF012 (F₃) segregujące pod względem odporności na zarazę ziemniaka, zostały wysadzone tylko w polu. Pozostałe cztery linie były przedmiotem badań zarówno w warunkach szklarniowych, jak i polowych.

Podobnie jak w przypadku linii pomidora pod osłony, scharakteryzowano rośliny linii pomidora polowego pod względem cech morfologicznych roślin, gron i owocu. Zgodnie z oczekiwaniami, linie najbardziej zaawansowane w hodowli cechowały się bardzo dobrym wyrównaniem. U linii tych obserwowano także zmienność w zakresie ocenianych cech, która w największym stopniu uwidoczniła się w kształcie owocu, jego wielkości oraz typie wzrostu (Fot. 3). Trzy linie (TF004, TF009, TF010) wykształcały średniej wielkości owoce wydłużone (kuliste lub cylindryczne), natomiast ostatnia z linii (TF006) – owoce duże, lekko spłaszczone i delikatnie żebrowane. Natomiast w przypadku obu linii F₂ (TF007, TF008), segregujących pod względem cech związanych z pokrojem i wigorem roślin oraz cech gron i owocu, do rozmnożenia generatywnego wytypowano łącznie 11 roślin cechujących się najbardziej korzystnymi cechami.

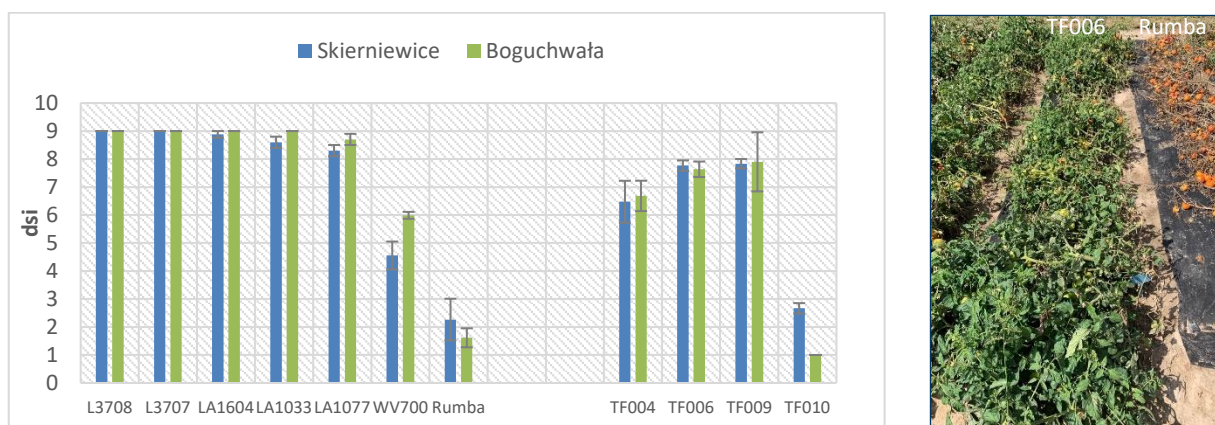
W ramach drugiej części badań, w warunkach polowych założono doświadczenie porównawcze w dwóch lokalizacjach, tj.: na polu Instytutu Ogrodnictwa – PIB oraz na polu Podkarpackiego Ośrodka Doradztwa Rolniczego w Boguchwale (rejon, w którym zaraza ziemniaka występuje corocznie w dużym nasileniu). Celem monitorowania zmian w populacji *P. infestans* występujących w obu lokalizacjach uwzględniono populacje testowe obejmujące akcesy dzikich gatunków z rodzaju *Solanum* o udokumentowanej i zróżnicowanej genetycznie odporności na *P. infestans*. Odmiana Rumba stanowiła kontrolę wrażliwości. W trakcie sezonu wegetacyjnego nie stosowano żadnych zabiegów ochrony chemicznej przeciwko chorobom grzybowym i bakteryjnym. Obserwacje podatności roślin pomidora na *P. infestans* przeprowadzono dwukrotnie na podstawie procentowego porażenia powierzchni liści, łodyg oraz owoców według dziewięciostopniowej skali bonitacji (1-brak objawów, 9-porażenie w 100%).

Nie stwierdzono większych różnic w poziomie porażenia testerów w zależności od lokalizacji doświadczenia (Boguchwała, Skierniewice). Akcesy *S. pimpinellifolium* (L 3707, L 3708, LA 1604) i *S. habrochaites* (LA 1033, LA 1777) charakteryzowały się wysoką odpornością na zarazę ziemniaka, o czym świadczą wysokie wartości wskaźnika DSI mieszczące się przedziale od 8.6 do 9.0 w skali dziewięciostopniowej. W przeciwieństwie do ww. akcesów, odporność WV 700 została przełamana zarówno w Skierniewicach, jak i Boguchwale. W przeciwieństwie do populacji testowych, linie *S. lycopersicum* były silniej porażane przez *P. infestans* i bardziej zróżnicowane w poziomie odporności, o czym świadczą bardziej zróżnicowane wartości wskaźnika DSI mieszczące się w przedziale od 1,0 do 7,9 (Rys. 2). Niezależnie od lokalizacji badań, najwyższym poziomem odporności charakteryzowały się dwie linie TF006 i TF009, u których nie obserwowano intensywnych objawów chorobowych na łodydze i liściach, a jedynie na owocach odnotowano nieco większe porażenie. Natomiast linia TF010 cechowała się wysoką podatnością na poziomie kontrolnej odmiany Rumba. Rośliny linii F₂ i F₃ segregowały pod względem odporności na zarazę ziemniaka oraz innych cech agromorfologicznych (wczesność, pokrój, cechy morfologiczne owocu). W wyniku przeprowadzonej selekcji wyłoniono łącznie 9 pojedynków (4 - TF011, 5 - TF012) o stosunkowo wysokiej odporności na zarazę ziemniaka (części wegetatywnej, a także owoców). Należy również podkreślić, że wyselekcjonowane genotypy wyróżniły się bardzo dobrą jakością owoców (brak tendencji do spękań, bardzo ładne, jednolite wybarwienie owocu oraz jego wnętrza, rewelacyjny smak, mięsistość), jednakże u żadnego z nich nie osiągnięto postępu pod względem wczesności oraz typu wzrostu. Oznacza to, że w programie hodowli odpornościowej należy kontynuować badania nad poprawą tych cech.



Fot. 3. Przykładowe fotografie ilustrujące zróżnicowanie międzyliniowe linii pomidora polowego znajdujących się w kolekcji IO-PIB

W ostatnim etapie badań celem zwiększenia istniejącej zmienności genetycznej pod względem wybranych cech fenotypowych (np. wczesność, odporność na patogeny, cechy umożliwiające przystosowanie do zbioru mechanicznego, malinowy kolor owocu) w dostępnej puli genowej, przeprowadzono krzyżowania międzyodmianowe i międzyliniowe (łącznie wykonano 6 skrzyżowań) oraz rozmnożono wsobnie mieszańce własnej hodowli (4 mieszańce F₁ będące efektem krzyżowań odpornych na zarazę ziemniaka linii cechujących się silnym wzrostem oraz późnym terminem dojrzewania z liniami wczesnymi o bardziej kompaktowym wzroście).



Rys. 2. Średnia wartość porażenia roślin pomidora w warunkach naturalnej infekcji *P. infestans* na polu doświadczalnym IO-PIB w Skjerniewicach oraz ODR w Boguchwale

DSI określono na podstawie wyników drugiej obserwacji przeprowadzonej w pierwszym tygodniu sierpnia (4.08 – Skjerniewice; 6.08 – Boguchwała)

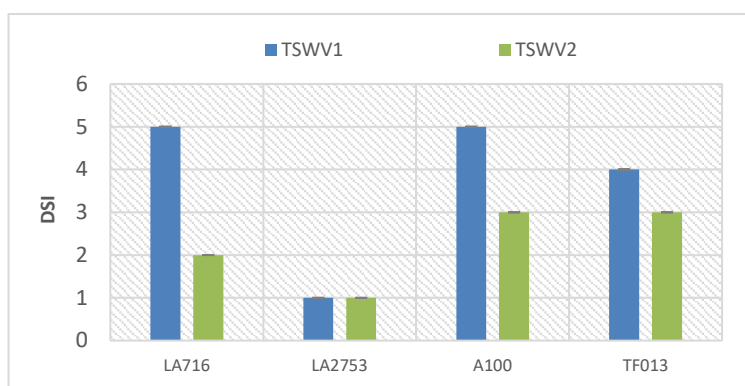
Skala: 1 – roślina zamarała; 9 – brak objawów chorobowych lub nieliczne nekrozy

Słupki błędów pokazują odchylenie standardowe

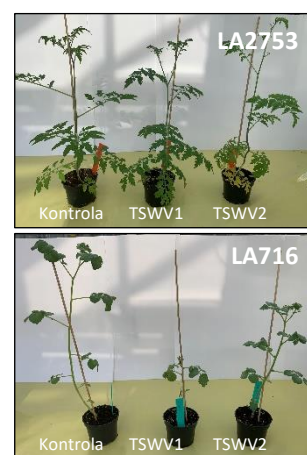
4. Opracowanie metody testowania odporności roślin pomidora na TSWV

Na potrzeby realizacji zadania z zasobów genowych TGRC (Tomato Genetics Resource Center, Davis, USA) pozyskano 7 akcesów należących do dwóch dzikich gatunków z rodzaju *Solanum*: *S. habrochaites* (LA 2156, LA 2167) oraz *S. chilense* (LA 0130, LA 1932, LA 1938, LA 2753, LA 2748) o udokumentowanej w literaturze podatności/odporności na TSWV. W ramach zadania optymalizowano również metodykę testowania roślin pomidora pod względem porażenia przez TSWV, umożliwiającą rozróżnienie genotypów odpornych i podatnych. Tę część badań przeprowadzono we współpracy z Zakładem Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – PIB (IOR-PIB). Do przeprowadzenia doświadczeń wykorzystano dwa izolaty TSWV (TSWV1, TSWV2), namnożone wcześniej na roślinach tytoniu (*N. tabacum* cv. *Xanthi*). Materiał roślinny stanowiły rośliny dwóch linii *S. lycopersicum* (A 100, TF013) oraz dwóch akcesów dzikich gatunków tj.: LA716 (*S. pennelli*) i LA 2753 (*S. chilense*). Testy przeprowadzono w szklarni poprzez inokulację mechaniczną roślin w fazie około 3 liści (6 roślin/obiekt). Filtrat przygotowywano poprzez roztarcie 500 mg liści szczytowych tytoniu porażonych danym izolatem w 2 ml buforu fosforanowego (0,05 M; pH 7,2). Następnie uzyskany sok nanoszono na rośliny oprószone karborundem. Kontrolne rośliny niezakażone (6 roślin/obiekt) były inokulowane wyłącznie buforem fosforanowym z karborundem. Rośliny utrzymywano w warunkach szklarniowych przez 21 dni i obserwowano objawy chorobowe. Do oceny objawów chorobowych opracowano sześciostopniową skalę (1–6), gdzie: 1 oznacza brak objawów, natomiast 6 – silne nekrozy i silną redukcję wzrostu. Obecność wirusa sprawdzano również za pomocą reakcji qRT-PCR ze starterami literaturowymi.

Tylko rośliny jednego akcesu (LA 2753) nie wykazały objawów chorobowych (Rys. 3). Pozostałe trzy linie w mniejszym lub większym stopniu, w zależności od użytego izolatu TSWV, ulegały porażeniu wirusem. Ocena fenotypowa została potwierdzona za pomocą reakcji qRT-PCR: obecność wirusa wykryto w trzech spośród czterech badanych obiektów pomidora: LA 716, A 100 oraz LA 4285. Nie stwierdzono obecności wirusa w próbkach pochodzących z roślin stanowiących kontrolę oraz roślin LA 2753 inokulowanych patogenem.



Rys. 3. Stopień porażenia badanych linii/akcesów z rodzaju *Solanum* przez dwa izolaty TSWV.



5. Otrzymanie rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) pokolenia F₆ do badań nad odpornością pomidora na *P. infestans*

Materiał badawczy stanowiły linie pokolenia F₄ pochodzące z międzygatunkowego skrzyżowania podatnej na *P. infestans* odmiany Rumba (*S. lycopersicum*) i odpornego akcesu *S. pimpinellifolium* (LA 1604). Linie te wyprowadzane są metodą pojedynczych nasion w kierunku uzyskania rekombinacyjnych linii wsobnych. W sumie, w ciągu roku przeprowadzono dwa cykle reprodukcyjne, w których 100 linii rozmnożono metodą samozapylenia ręcznych, czego efektem końcowym było otrzymanie nasion pokolenia F₆.

6. Podsumowanie:

W wyniku przeprowadzonych prac scharakteryzowano zgromadzoną kolekcję linii pomidora pod względem wybranych cech agromorfologicznych, a następnie na podstawie uzyskanych wyników dokonano oceny zmienności międzyliniowej oraz stopnia homozygotyczności. W kolejnym etapie zaś przeprowadzono selekcję oraz rozmnożenie generatywne wytypowanych roślin, otrzymując w ten sposób nasiona kolejnego pokolenia dla materiałów hodowlanych przeznaczonych do realizacji projektu w następnych latach badań. Ze względu na korzystne cechy użytkowe oraz wysokie wyrównanie wewnątrzliniowe, linie najbardziej zaawansowane w hodowli wykorzystano także w programie zapylenia krzyżowych, w wyniku czego otrzymano nasiona nowych eksperymentalnych mieszańców F₁. Na podstawie oceny wartości użytkowej nowo wytworzonych mieszańców F₁ będzie badana zdolność kojarzeniowa linii rodzicielskich w następnych latach badań. Uzyskano również populacje segregujące o bardzo zróżnicowanych cechach fenotypowych, dzięki czemu możliwe będzie poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej pomidora.

Pozyskano źródła odporności dostępne w puli dzikich gatunków z rodzaju *Solanum*, a także zoptymalizowano metodyczne podstawy testowania reakcji roślin pomidora na porażenie TSWV. Metodyka ta zostanie wykorzystana w przyszłym roku do ewaluacji wybranych materiałów pomidora pod względem odporności na TSWV.

Otrzymano nasiona dwóch kolejnych pokoleń (F₅ i F₆) pochodzących z międzygatunkowego skrzyżowania podatnej na *P. infestans* odmiany Rumba (*S. lycopersicum*) i odpornego akcesu *S. pimpinellifolium* (LA 1604). Rozmnożenie wsobne będzie kontynuowane w przyszłym roku celem uzyskania rekombinacyjnych linii na poziomie F₈, czyli populacji mapującej dla identyfikacji regionów genomu zaangażowanych w odporność pomidora na *P. infestans*.