

Zadanie nr 95

Poszukiwanie nowych źródeł odporności na zarazę ziemniaka u pomidora z uwzględnieniem zmian patogeniczności w populacjach *Phytophthora infestans* oraz próby identyfikacji markerów sprzężonych z genami odporności

Kierownik tematu: dr hab. Elżbieta U. Kozik, prof. nadzw.

Celem badań jest poszukiwanie źródeł odporności na polskie izolaty *Phytophthora infestans*, scharakteryzowanie izolatów patogena i podjęcie prób identyfikacji markerów sprzężonych z genami odporności u pomidora.

Badania w 2011 roku prowadzono zarówno w warunkach polowych, jak i laboratoryjnych. W pierwszej części zadania oceniono podatność zgromadzonego materiału roślinnego (22 linie uprawne i 16 linii dzikich gatunków) pomidora na zarazę ziemniaka w warunkach naturalnej infekcji na polach doświadczalnych Instytutu Ogrodnictwa (IO) w Skierniewicach oraz Ośrodka Doradztwa Rolniczego (ODR) w Boguchwale, k/Rzeszowa. Ponadto obiektem badań były 3 populacje F2 i 9 populacji F3, które mają posłużyć poszerzeniu dostępnej puli genowej pomidora polowego z odpornością na zarazę ziemniaka o nowe, korzystne cechy użytkowe. Linie pokolenia F3 pochodzą z rozmnożenia wyselekcjonowanych w ubiegłym roku najbardziej odpornych na zarazę ziemniaka roślin pokolenia F2. Natomiast badane w bieżącym roku 3 populacje mieszańcowe F2 zostały otrzymane w wyniku rozmnożenia wsobnego skrzyżowań komponentów rodzicielskich zarówno zróżnicowanych pod względem najważniejszych cech użytkowych, jak i o najwyższym poziomie odporności na chorobę.

Bardzo korzystne warunki atmosferyczne dla rozwoju *P. infestans* (okresy długo utrzymującej się wysokiej wilgotności, spowodowane długotrwałymi i nawracającymi deszczami przy umiarkowanych temperaturach) w czasie wegetacji w bieżącym roku sprzyjały szybkiemu szerzeniu się patogena na roślinach pomidora. Już na początku lipca na polu doświadczalnym IO na liściach i łodygach odmian podatnych pomidora zaobserwowano pierwsze objawy choroby w postaci wodnistych, szarozielonych plam. Od tego momentu objawy chorobowe intensywnie nasilały się, szczególnie na odmianach podatnych. Podatność na zarazę ziemniaka określono według dziewięciostopniowej skali bonitacyjnej uwzględniającej procentowe porażenie powierzchni liści, łodyg oraz owoców przez *P. infestans* (9 - brak objawów, 1 – porażenie powyżej 90%). O wyjątkowo wysokiej w bieżącym roku ekspansji choroby świadczy fakt, że już 4 sierpnia rośliny odmiany podatnej Rumba oraz NY (*Ph-1*) były porażone prawie w 100%. W przeciwieństwie do odmian podatnych, na roślinach odmian/linii odpornych obserwowano najslabszy rozwój choroby. Wprawdzie ich podatność zwiększyła się nieznacznie w ciągu okresu wegetacji, ale ostatecznie intensywność objawów porażenia była niewielka i nie przekraczała w połowie września 10% powierzchni wszystkich ocenianych części roślin. Na podstawie różnic w odporności na porażenie przez *P. infestans* stwierdzonych na początku września na polu doświadczalnym IO badane populacje (z wyjątkiem F2 oraz F3) podzielono na cztery grupy: I – odporne (DSI=8.0-9.0), II - średnio odporne (DSI=6.0-7.9), III - średnio podatne (DSI=3.1–5.9) i IV – podatne (DSI=1.0-3.0). Do grupy I zaklasyfikowano 14 populacji, w tym jedną *L. hirsutum*, dwie *L. pimpinellifolium*, oraz 11 linii *L. esculentum* hodowli IO, u których objawy zarazy stanowiły zaledwie do 10% powierzchni liści, pędów oraz owoców w momencie największego nasilenia choroby. Do grupy II zaliczono siedem populacji, w tym: 2 linie *L. esculentum* hodowli IO oraz 5 linii dzikich gatunków *Lycopersicon*. W porównaniu z liniami z pierwszej grupy populacje te były wprawdzie porażane przez *P. infestans* w większym stopniu, jednak ich poziom odporności był wysoki (DSI= 6.9–7.5). Grupa III obejmowała

cztery średnio podatne linie, w tym populację WV700 (*Ph-2*), która zareagowała na porażenie przez patogena znacznie intensywniejszym nasileniem objawów chorobowych na całej roślinie (DSI=4.9) w bieżącym roku w porównaniu z poprzednimi sezonami wegetacyjnymi. Do grupy IV zaklasyfikowano 16 najbardziej podatnych populacji, wśród których znalazły się między innymi podatna odmiana kontrolna Rumba oraz odmiany testowe NY (*Ph-1*) i Pieraline (*Ph-2*). Odmiana Pieraline, do której gen *Ph-2* został wprowadzony z WV700, wykazywała zatem silniejsze porażenie aniżeli wspomniana wyżej linia WV700 (grupa III). Różnice w nasileniu objawów chorobowych wywołanych przez *P. infestans* pomiędzy tymi genotypami mogą sugerować, że tło genetyczne cechy odporności w linii WV700 jest bardziej kompleksowe niż wynika to z danych literaturowych. Analiza porównawcza porażenia populacji testowych przez *P. infestans* na polach doświadczalnych IO w Skierniewicach oraz ODR w Boguchwale nie wykazała w bieżącym roku wyraźnych różnic w podatności badanych obiektów w zależności od lokalizacji doświadczenia.

Cztery z dziewięciu ocenianych linii F3 wyraźnie segregowały pod względem odporności na zarazę ziemniaka, czego przejawem jest szeroki zakres zmienności obejmujący wszystkie klasy porażenia (1-9). U pozostałych pięciu ocenianych linii F3 rozrzut roślin był zawężony do klas 6-9, co świadczy o ich wysokim poziomie odporności. W przypadku trzech populacji F3 testowanych jednocześnie w IO Skierniewice i w Boguchwale odnotowano wpływ lokalizacji doświadczenia na odporność roślin na zarazę ziemniaka. W ODR Boguchwała wszystkie trzy populacje były intensywniej porażane przez *P. infestans* niż w IO Skierniewice. Linie pokolenia F2 również charakteryzowały się dużym zróżnicowaniem podatności/odporności na zarazę ziemniaka, co wykazuje szeroki rozrzut roślin we wszystkich klasach porażenia. W populacjach tych przeprowadzono selekcję wybierając do następnych etapów hodowli pojedyncze genotypy o dobrej wczesności, korzystnych cechach użytkowych owocu, a także wysokiej zdrowotności wszystkich organów roślin (liści, pędów i owoców). Podobne kryteria zastosowano przy selekcji wewnątrz- oraz międzyliniowej populacji F3 i F7. Ponadto z każdego wyselekcjonowanego genotypu zebrano zielone owoce, które były przetrzymywane przez okres 7 dni w temperaturze około 16°C. Po tym czasie dla każdej rośliny indywidualnie obliczono procentowy udział owoców bez objawów zarazy ziemniaka. Wyniki tego testu stanowiły dodatkowe kryterium selekcji pod względem odporności na zarazę ziemniaka.

W czasie wegetacji w bieżącym roku zebrano 18 izolatów *P. infestans* z różnych rejonów Polski. W sumie kolekcja izolatów *P. infestans* wyizolowanych z porażonych roślin pomidora w 2011 powiększyła się do 91 obiektów. W ramach realizowanego zadania prowadzone są badania dotyczące charakterystyki fenotypowej i genotypowej izolatów *P. infestans* mające na celu ocenę zróżnicowania izolatów występujących w różnych rejonach Polski, a szczególnie określenia ich profilu wirulencyjnego względem linii testowych pomidora. Przeprowadzona w bieżącym roku analiza wykazała, że badane izolaty zróżnicowane są pod względem wszystkich badanych cech: typu kojarzeniowego, odporności na metalaksyl, wirulencji na standardach ziemniaka i pomidora, z wyjątkiem haplotypu mitochondrialnego. Charakteryzując poszczególne izolaty stwierdzono również, iż izolaty wyizolowane z porażonych roślin pomidora z tego samego pola, a nawet zebrane tego samego dnia, różnią się między sobą wyżej wymienionymi cechami.

Ubiegłoroczne badania pozwoliły na identyfikację siedmiu markerów DNA zlokalizowanych w regionie odpowiadającym zmapowanemu na chromosomie 9 genowi *Ph-3*. Stworzyło to podstawę do kontynuowania prac polegających na ocenie polimorfizmu DNA populacji pomidora o zróżnicowanym poziomie odporności na zarazę ziemniaka przy użyciu specyficznych starterów w bieżącym roku. Zsekwencjonowanie amplikonów uzyskanych przy użyciu starterów specyficznych na matrycy gDNA wyizolowanego z roślin odmiany podatnej

Rumba oraz odpornych dwóch linii *L. pimpinellifolium* przyczyniło się do zidentyfikowania polimorfizmów sekwencji, umożliwiających przeprowadzenie analiz restrykcyjnych. Trawienie enzymem *DraI* amplikonów uzyskanych w wyniku reakcji PCR przy użyciu starterów specyficznych dla markera M_4 , umożliwiło jednoznaczne odróżnienie profili restrykcyjnych roślin odpornych (*L. pimpinellifolium*) od podatnych (odmiana Rumba), co potwierdza skuteczność obranej metodyki. Obecność charakterystycznego produktu trawienia enzymem *DraI* o wielkości 1035 pz stwierdzono tylko w odpornych dwóch liniach *L. pimpinellifolium*. Analizy innych genotypów pomidora o wysokim tle odporności na zarazę ziemniaka za pomocą markera M_4 potwierdzają jego przydatność w badaniach molekularnych pomidora na obecność locus *Ph-3*. Z kolei trawienie amplikonów uzyskanych w wyniku reakcji PCR przy użyciu starterów specyficznych dla markera M_{14} restryktazą *MseI* skutkowało obecnością produktu odróżniającego dwie odporne linie *L. pimpinellifolium* od podatnej odmiany Rumba oraz od innych populacji pomidora o wysokim poziomie odporności na zarazę ziemniaka (charakterystyczny produkt trawienia ok. 300 pz). Sprzężenie wyżej wymienionych markerów z *Ph-3* zostanie zweryfikowane na podstawie analiz DNA wyizolowanego z roślin pokolenia F1 oraz F2 pochodzących ze skrzyżowań Rumba z dwoma odpornymi liniami *L. pimpinellifolium*. W przypadku pozostałych markerów nie udało się stwierdzić polimorfizmu między genotypami podatnymi a genotypami *Ph-3* po trawieniu restrykcyjnym produktów amplifikacji.