

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

W 2018 roku badania były prowadzone w ramach trzech tematów badawczych.

Temat badawczy 1

Poszukiwanie markerów sprzężonych z regionami genomu warunkującymi odporność pomidora na bakteryjną plamistość, wywoływaną przez *X. vesicatoria* (Xv, rasaT2)

Kontynuując poszukiwania polimorfizmu pomiędzy formą odporną (*S. lycopersicum* var. *cerasiformae* PI 114490) i podatną (*S. lycopersicum* 'Rumba') testowano markery o określonej lokalizacji chromosomowej (250 markerów SSR, 30 markerów COSII/In-Del) oraz markery niezdefiniowane sekwencyjnie (20 serii starterów RAPD, 20 markerów ISSR, AFLP), a ponadto weryfikowano przydatność 41 markerów różnicujących linie A 100 i PI 114490, uzyskanych w poprzednich latach badań. Polimorfizm DNA pomiędzy liniami PI 114490 oraz 'Rumba' wykazało 28 par starterów SSR oraz 22 startery RAPD, natomiast żaden z 30 markerów zaprojektowanych do sekwencji COS II nie wygenerował polimorfizmu. Spośród markerów różnicujących linie A 100 i PI 114490 w poprzednich latach badań, polimorfizm komponentów rodzicielskich populacji F₂ 'Rumba' x PI 114490 potwierdzono dla 13 markerów SSR, 3 CAPS i 4 In-Del.

W poszukiwaniu czynników genetycznych, warunkujących odporność linii PI 114490 na Xv prowadzono ocenę reakcji roślin poszczególnych populacji mieszańcowych oraz komponentów rodzicielskich w testach patogeniczności. Przeprowadzona klasyczna analiza genetyczna sposobu dziedziczenia odporności wykazała, że segregacja roślin w F₂ znacznie odbiegała od założeń teoretycznych dla modelu dziedziczenia jedno-, dwu-, oraz trzy-genowego, co zostało potwierdzone testem χ^2 . Nie stwierdzono również nieallelicznych interakcji dla dwóch genów.

Do konstrukcji szkieletowej mapy genetycznej populacji mapującej F₂ ('Rumba' x PI 114490) liczącej 114 roślin wykorzystano 41 markerów SSR, 22 markery RAPD i 4 markery CAPS, dzięki którym wyodrębniono jedną grupę sprzężeń. Grupa ta o łącznej długości 475,2 cM, przypisana została do chromosomu 11, zawierała 35 loci, a średnia odległość między markerami wynosiła 14 cM. 9 markerów nie zostało zakwalifikowanych do żadnej grupy sprzężeń. Nie zidentyfikowano żadnego regionu odpowiedzialnego za odporność linii PI 114490 na *X. vesicatoria*, co wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań.

Temat badawczy 2

Poszukiwanie markerów sprzężonych z genem *I* warunkującym odporność pomidora na fuzaryjne więdnienie, wywoływane przez *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol, rasa1)

Do identyfikacji markerów wykorzystano w br. 50 par starterów zaprojektowanych do genów zlokalizowanych na krótkim ramieniu chromosomu 11, na którym zmapowano gen *I*, w oparciu o lokalizację markerów polimorficznych, pozyskanych w poprzednich latach badań. Analizy polimorfizmu DNA prowadzono na liniach o skrajnej reakcji na porażenie przez rasę 1 *Fol*: A 100 (podatna) i LA 3475 (odporna). Dla czterech par starterów zidentyfikowano polimorfizm miejsc restrykcyjnych. Z uzyskanych do tej pory 19 przeanalizowanych markerów, do dalszych etapów zaklasyfikowano 9 markerów CAPS. Na podstawie danych uzyskanych w wyniku genotypowania ww. markerami poszczególnych roślin populacji F_{2:3} wyodrębniono jedną grupę sprzężeń, którą przypisano do chromosomu 11. Grupa ta obejmowała wszystkie ww markery przy czym, 7 z nich lokowało się w stosunkowo bliskim sąsiedztwie (pozycja na mapie między 6 a 8 cM). Analiza QTL (MapQTL6) pozwoliła na wykrycie regionu odpowiedzialnego za odporność roślin pomidora na rasę 1 *Fol*.

Celem oceny weryfikacji przydatności zidentyfikowanych markerów do selekcji roślin z genem *I*, przeprowadzono dodatkową analizę z wykorzystaniem 35 linii i odmian referencyjnych z genem *I* pochodzących z zasobów genowych TGRC.

Temat badawczy 3

Określenie przydatności markerów molekularnych do selekcji roślin pomidora z funkcjonalną męską sterylnością

Na potrzeby selekcji wspieranej markerami prowadzone były poszukiwania i testowanie przydatności markerów sprzężonych z genami warunkującymi funkcjonalną męską sterylność pomidora: markery T 1535, CER6_3 i CER6_6 (gen *ps*) oraz marker *ps*-2ABL (gen *ps*-2).

Na podstawie sekwencji genu *CER6* opracowano 3 markery CAPS (T 1535, CER6_3 i CER6_6).

Celem zweryfikowania przydatności wyróżnionych markerów do selekcji roślin *ps* przeprowadzono analizę porównawczą wyników genotypowania i oceny fenotypowej: (i) 21 linii *ps* o zróżnicowanym pochodzeniu, (ii) dwóch populacji F_2 (segregujących pod względem genu *ps*) oraz (iii) 84 roślin z cechą markerową kwiatu *ps* wyselekcjonowanych z kolekcji PlantiCo Zielonki. Niezależnie od użytego markera, analiza produktów restrykcyjnych wykazała obecność produktów charakterystycznych dla allelu *ps* u 19 spośród 21 badanych funkcjonalnie męskosterylnych linii. W profilach pozostałych dwóch linii *ps* stwierdzono obecność produktów specyficznych dla roślin płodnych, pomimo, iż u wszystkich roślin tych linii obserwowano charakterystyczną dla genu *ps* budowę kwiatu. Całkowitą zgodność oceny fenotypowej i molekularnej uzyskano dla wszystkich 84 roślin, określonych przez PlantiCo Zielonki jako genotypy homozygotycznie sterylne (*ps*), poprzez wynik analizy restrykcyjnej zastosowanej dla 3 badanych markerów. Również w przypadku analizy dwóch populacji F_2 odnotowano wysoką zgodność ocen fenotypowej i molekularnej w identyfikacji genu *ps* (współczynnik korelacji – 96 do 98%, w zależności od pochodzenia F_2), co świadczy o wysokiej wartości diagnostycznej testowanych markerów w identyfikacji genu *ps* i ich przydatności do identyfikacji roślin *ps*.

W przypadku genu *ps-2* weryfikowano użyteczność markera CAPS (*ps-2*ABL), opracowanego przez Gourget i in. (2009) na zróżnicowanym materiale: 6 linii pomidora *ps-2* o różnym pochodzeniu, 2 liniach cechujących się sterylnością, ale o kwiatach typowych dla roślin płodnych, 2 komercyjnie dostępnych odmiana heterozyjnych z genem *ps-2*, 10 liniach płodnych i 2 populacjach F_2 segregujących pod względem homo/heterozygotyczności locus genu *ps-2*. Uzyskane wyniki wskazują na jego wysoką wartość diagnostyczną. Marker ten może być wykorzystywany do wprowadzenia genu *ps-2* do komponentów matecznych wykorzystywanych do hodowli pomidora.