

### **Zadanie 3.1. Poszerzenie zmienności genetycznej pomidora o odporność na wybrane stresy biotyczne oraz ważne cechy jakościowe.**

#### **Cele zadania w 2023 r.:**

- kontynuowanie badań nad poszerzeniem zmienności genetycznej pomidora pod osłony i pomidora polowego o wartościowe cechy użytkowe;
- wygenerowanie populacji mapującej do analiz genetyczno-molekularnych niezbędnych do opracowania metody identyfikacji genów warunkujących odporność pomidora na wirusa brązowej plamistości pomidora (TSWV);
- ocena fenotypowa rekombinacyjnych linii wsobnych pokolenia F<sub>8</sub>, pochodzących z międzygatunkowego skrzyżowania odpornego na zarazę ziemniaka obiektu *S. pimpinellifolium* LA 1604 z podatną odmianą *S. lycopersicum* (Rumba), pod względem reakcji na porażenie przez *P. infestans*;
- przygotowanie genomowego DNA (linie rodzicielskie, RIL) zgodnie z wymogami wysokoprzepustowego sekwencjonowania DArTseq.

#### **Opis zadania:**

##### **1. poszerzenie zmienności genetycznej pomidora o wartościowe cechy użytkowe:**

Badania w tym zakresie prowadzone były wielotorowo. W pierwszym etapie scharakteryzowano kolekcję linii pomidora (8 linii pomidora pod osłony, 9 linii pomidora polowego) pod względem wybranych cech agromorfologicznych według zmodyfikowanego klasyfikatora dla rodzaju *S. lycopersicum*. Uwzględniając badane cechy określono następnie zróżnicowanie międzyliniowe oraz wyrównanie wewnątrzliniowe ocenianych linii. W przypadku linii mniej zaawansowanych w hodowli, wyselekcjonowane genotypy analizowano dodatkowo przy pomocy markerów molekularnych umożliwiających detekcję alleli warunkujących odporność na: wirusa mozaiki pomidora (ToMV), dwie rasy *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol, rasa 1 i 2; fuzaryjne wędnięcie) oraz nicienie. A w przypadku pomidora polowego, wybrane linie oceniono również pod kątem odporności na zarazę ziemniaka w warunkach naturalnej infekcji *Phytophthora infestans* na polu Instytutu Ogrodnictwa - PIB. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że linie te wykazywały znaczną różnorodność genetyczną w zakresie większości parametrów morfologicznych roślin i owocu oraz podatności na przedmiotowe agrofagi. Na podstawie przeprowadzonej oceny dokonano selekcji najbardziej wartościowych genotypów, które poddano rozmnożeniu wsobnemu. Otrzymano 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 wyrównane wykorzystano także w programie zapyleń krzyżowych, w wyniku czego otrzymano nasiona 14 nowych eksperymentalnych mieszańców F<sub>1</sub> (8 - pomidor pod osłony, 6 - pomidor polowy). W następnej części zadania, przeprowadzono ocenę zdolności kojarzeniowej najbardziej zaawansowanych w hodowli linii pomidora polowego poprzez ocenę wartości użytkowej mieszańców F<sub>1</sub> otrzymanych na bazie tych linii. Wartość użytkową tych mieszańców F<sub>1</sub> określono na podstawie wysokości ogólnego i handlowego, struktury plonowania, cech morfologicznych owoców oraz podatności na zarazę ziemniaka. Odmianami kontrolnym były trzy odmiany: Bobcat F<sub>1</sub> (Syngenta), Chelse F<sub>1</sub> (Seminis) oraz Ifox F<sub>1</sub> (Syngenta). Jakość plonu oraz jego wysokość była silnie powiązana z podatnością badanych mieszańców F<sub>1</sub> na zarazę ziemniaka. Najintensywniejsze objawy zarazy ziemniaka wykazywały odmiany kontrolne, których rośliny wykazywały 50% porażenia przez *P. infestans*, jeszcze przed rozpoczęciem zbiorów owoców. Rośliny mieszańców eksperymentalnych cechowały się niższym stopniem porażenia, czego odzwierciedleniem jest znacznie wyższa wysokość oraz jakość plonu w porównaniu do odmian kontrolnych. Najwyższym potencjałem plonotwórczym wyróżniły się trzy mieszańce E1645, E1654 i E1655, które wysokością plonu handlowego zdecydowanie przewyższyły odmiany kontrolne. Mieszańce te odznaczyły się także najniższym udziałem owoców chorych (17,3-22,4) spośród wszystkich badanych obiektów. Dla porównania odmiany kontrolne wykazywały bardzo wysoki udział owoców chorych (głównie porażonych przez zarazę ziemniaka): 62,8% (Ifox F<sub>1</sub>), 80,2% (Chelse F<sub>1</sub>)

oraz 92,2% (Bobcat F<sub>1</sub>). Niemniej jednak należy pamiętać o tym, że są to jednoroczne wyniki i wymagają one weryfikacji w następnych sezonach wegetacyjnych, najlepiej w różnych lokalizacjach.

## **2. opracowanie molekularnej identyfikacji genów warunkujących odporność pomidora na TSWV:**

W ramach współpracy z Zakładem Wirusologii i Bakteriologii Instytutu Ochrony Roślin – PIB (IOR-PIB) przeprowadzono testy infekcyjne z wykorzystaniem wysoce agresywnego izolatu TSWV (kolekcja własna IOR-PIB). Testami objęto 18 linii RIL (LA 1604 x 'Rumba') oraz 7 odmian heterozygotycznych, komercyjnie dostępnych i posiadających informację o odporności na TSWV (rasa T0). Reakcję roślin na infekcję TSWV określano na podstawie fenotypowej oceny nasilenia objawów chorobowych oraz poprzez sprawdzenie obecności wirusa za pomocą qRT-PCR. Fenotypowa ocena stopnia porażenia roślin wykazała, że 12 z 18 badanych linii RIL cechowało się wysoką podatnością, jedna linia wykazywała zmienność w porażeniu, a pięć pozostałych linii charakteryzowało się brakiem objawów. Zgodnie z oceną fenotypową objawów chorobowych, jego obecność potwierdzono u wszystkich 12 linii RIL ocenionych jako najbardziej wrażliwe, a także u linii o zróżnicowanej reakcji na infekcję TSWV. Spośród pięciu linii ocenionych jako odporne na infekcję TSWV tylko w przypadku trzech z nich nie wykryto obecności wirusa (qRT-PCR) nawet po upływie 28 dni od inokulacji. Brak obecności wirusa, w połączeniu z brakiem objawów porażenia, wskazuje na ich wysoką odporność. Natomiast u dwóch pozostałych linii, pomimo braku objawów chorobowych na koniec inkubacji, u części roślin wykazano obecność TSWV po 28 dniach od inokulacji. U wszystkich z siedmiu odmian heterozygotycznych natomiast nie obserwowano ani objawów chorobowych ani nie stwierdzono obecności TSWV w obu punktach czasowych (14 i 28 dpi). W ramach niniejszego zadania otrzymano również nasiona populacji F<sub>2</sub> (LA 1604 x 'Rumba') kluczowej do przeprowadzenia analiz genetyczno-molekularnych oraz weryfikacji badań przeprowadzanych w oparciu o populację mapującą RIL w kontekście charakterystyki determinant genetycznych odporności pomidora na TSWV.

## **3. mapowanie QTL warunkujących odporność pomidora na *P. infestans*:**

W br. skoncentrowano się na ocenie fenotypowej 92 linii RIL pokolenia F<sub>8</sub>, pochodzących z międzygatunkowego skrzyżowania odpornego na zarazę ziemniaka *S. pimpinellifolium* LA 1604 z podatną odmianą *S. lycopersicum* (Rumba). Linie te były analizowane pod kątem reakcji na porażenie przez *P. infestans* w różnych warunkach eksperymentalnych: naturalnej infekcji na polu doświadczalnym w Skierniewicach oraz w Boguchwale, a także w teście infekcyjnym (test na całych roślinach w warunkach kontrolowanych). Stwierdzono istotny wpływ ( $p < 0,001$ ) związany z genotypem badanych linii, środowiskiem (różne doświadczenia) i interakcją genotypowo-środowiskową na średni stopień porażenia poszczególnych obiektów. W badanej populacji mapującej RIL odnotowano segregację fenotypów we wszystkich lub prawie wszystkich klasach porażenia, co wskazuje na zróżnicowaną reakcję badanych linii RIL na porażenie przez *P. infestans*, niezależnie od rodzaju eksperymentu. Potwierdziły to też dość wysokie wartości współczynnika zmienności. Należy jednak podkreślić, że we wszystkich doświadczeniach rozkład roślin w poszczególnych klasach wyraźnie odbiegał od rozkładu normalnego. Średni stopień porażenia wynosił od 2,1 do 4,5, z najniższą wartością odnotowaną w warunkach naturalnej infekcji w Boguchwale. W tym przypadku, 72,3% linii RIL było wysoce podatnych. W doświadczeniach w Skierniewicach i teście infekcyjnym odsetek roślin wysoce podatnych był mniejszy i wynosił 41,5%-48,9%. Różnice w rozkładzie fenotypów w populacji mapującej i niskie wartości współczynniki rang Spearmana pomiędzy poszczególnymi doświadczeniami sugerują skomplikowane podłoże genetyczne dla cechy odporności, wymagające dalszych badań i weryfikacji uzyskanych wyników. Wytypowano 92 RIL-e, które wraz z komponentami rodzicielskimi zostaną poddane wysokoprzepustowemu genotypowaniu metodą sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS) na platformie DArTseq (Diversity Arrays Technologies, Australia). W tym celu, zgodnie z metodyką zalecaną przez Diversity Arrays Technology, z każdego obiektu wyekstrahowano genomowe DNA, a następnie przesłano je do firmy Diversity Array Technology Ltd. (Canberra) w celu wykonania genotypowania (usługa obca). Uzyskane wyniki genotypowania umożliwią realizację badań dotyczących konstrukcji mapy genetycznej oraz mapowania *loci* warunkujących odporność pomidora na zarazę ziemniaka w następnych latach realizacji projektu.