

MARZENA NOWAKOWSKA

URSZULA KŁOSIŃSKA

KATARZYNA NOWAK

WOJCIECH SZCZETCHURA

Instytut Ogrodnictwa

Kierownik Tematu: dr inż. Marzena Nowakowska Instytut Ogrodnictwa, Pracownia Genetyki i Hodowli

Roślin Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, tel. 46 834-67-18,

e-mail: marzena.nowakowska@inhort.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.20.2018, Zadanie 66.

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

Studies on the development of molecular methods for identifying genes responsible for important traits of tomato

Słowa kluczowe: bakteryjna plamistość, funkcjonalna męska sterylność, fuzaryjne więdnienie, selekcja wspomagana markerami

Celem badań było opracowanie molekularnej procedury umożliwiającej identyfikację genów warunkujących następujące cechy użytkowe pomidora: odporność na bakteryjną plamistość pomidora [*Xanthomonas vesicatoria*; (Xv), rasa T2] oraz fuzaryjne więdnienie [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), rasa 1], a także funkcjonalną męską sterylność uwarunkowaną zarówno genem *ps* (ang. *positional sterility*), jak i *ps-2* (ang. *positional sterility 2*).

WYNIKI

W przypadku bakteryjnej plamistości badania rozpoczęto od określenia czynników genetycznych warunkujących odporność linii PI 114490 (*S. lycopersicum* var. *cerasiformae*) na Xv. Mechanizm dziedziczenia opracowano na podstawie populacji mieszańcowych: F₁, RF₁, F₂, Bc₁P₁, Bc₁P₂ pochodzących ze

skrzyżowania linii PI 114490 (P_1) z podatną odmianą Rumba (P_2). Analiza uzyskanych wyników wykazała, iż linia PI 114490 (P_1) charakteryzowała się wysokim poziomem odporności na rasę T2 (DSI = 1,6). Wszystkie rośliny drugiego komponenta rodzicielskiego ('Rumba') zaklasyfikowano jako podatne (klasy 6 do 8), a wartość wskaźnika porażenia wynosiła 7,5. Pokolenie F_1 i RF_1 wykazało średni poziom odporności (DSI odpowiednio 5,2 i 5,4) z zakresem zmienności w trzech klasach porażenia (5 do 7). Zbliżone wartości DSI oraz podobny rozkład roślin w klasach porażenia dla populacji F_1 oraz RF_1 świadczą o tym, że cecha odporności na Xv nie jest uwarunkowana czynnikiem maticznym. Pokolenie F_2 (DSI = 5,4) pod względem porażenia było zbliżone do populacji F_1/RF_1 , ale charakteryzowało się większym rozrzutem roślin w klasach porażenia (1 do 8). Należy jednak podkreślić, że rozkład roślin w poszczególnych klasach wyraźnie odbiegał od rozkładu normalnego, a najliczniejszą grupę w pokoleniu F_2 stanowiły rośliny o najwyższym stopniu podatności (59%). Przeprowadzona klasyczna analiza genetyczna wykazała, że segregacja roślin w pokoleniu F_2 we wszystkich testach 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. W związku z powyższym, analizę cechy odporności na Xv u PI 114490, rozpoczęto od zbadania modelu dziedziczenia addytywno-dominującego testami skali Mathera parametrów A, B, C. Na podstawie otrzymanych wyników odrzucono model addytywno-dominujący dziedziczenia cechy odporności, ponieważ wartość przynajmniej jednego parametru C była istotnie różna od zera. Analiza według sześcioparametrowego modelu dziedziczenia Jinksa i Jonesa (1958) wykazała istotność efektu addytywnego (d). O addytywnym współdziałaniu genów świadczą również wysokie wartości współczynnika aA (efekt addytywny = 3,0), przewyższające wartość współczynnika dA (efekt dominacji = 0,9). W następnym etapie poszukiwano polimorfizmu DNA formy odpornej (PI 114490) i podatnej ('Rumba') na Xv wykorzystując do tego celu zarówno markery o określonej lokalizacji chromosomowej (650 markerów SSR, 50 COSII), jak i systemy markerów niezdefiniowanych sekwencyjnie (20 serii starterów RAPD). Markery różnicujące linie rodzicielskie (41 markerów SSR, 22 markery RAPD, 4 markery CAPS) posłużyły do konstrukcji szkieletowej mapy genetycznej populacji mapującej F_2 ('Rumba' x PI 114490) liczącej 114 roślin. Wyodrębniono jedną grupę sprzężeń, którą następnie przypisano do chromosomu 11. Jednak w jej obrębie nie udało się zidentyfikować regionów odpowiedzialnych za odporność linii PI 114490 na *X. vesicatoria*.

W badaniach nad poszukiwaniem markerów sprzężonych z genem *I*, warunkującym odporność pomidora na fuzaryjne więdnienie wywołane przez rasę 1 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Scott i in., 2004) zidentyfikowano 19 markerów CAPS, dla których obserwowano różnice w wielkościach produktów trawienia analitycznego między odporną na *Fol* linią LA 3475 i podatną A 100. Sprzężenie wyróżnionych markerów polimorficznych z genem *I* oceniano na podstawie porównania oceny fenotypowej i molekularnej populacji $F_{2:3}$ przy pomocy metody BSA. Wykorzystanie populacji F_2 , której poziom odporności/podatności oceniano na podstawie reakcji roślin F_3 , miało

na celu uwiarygodnienie oceny fenotypowej pojedynków F_2 , umożliwiając jednocześnie dokładniejszą weryfikację markerów polimorficznych. Przeprowadzono trzy niezależne testy fitopatologiczne, w których oceniano stopień porażenia roślin 100 linii F_3 . Testy infekcyjne przeprowadzono zgodnie z wytycznymi CPVO-TP/0044/3 wykorzystując do inokulacji izolat PRI 20698 charakteryzujący się wysoką agresywnością oraz stabilnością i powtarzalnością w wywoływaniu objawów chorobowych. Uwzględniając reakcję roślin linii F_3 na porażenie przez rasę 1 *Fol*, dokonano następnie oceny poziomu odporności/podatności poszczególnych pojedynków F_2 . Zidentyfikowano 92 rośliny odporne (w tym 30 homozygoty dominujące i 62 heterozygoty pod względem *locus I*), oraz 8 roślin podatnych (homozygoty recesywne). Analizy z użyciem markerów różnicujących formy rodzicielskie na wyselekcjonowanych próbach DNA z pojedynków populacji mapującej F_2 o skrajnych fenotypach, umożliwiły wytypowanie markerów potencjalnie sprzężonych z genem *I*. Z 19 przeanalizowanych markerów do dalszych etapów badań zaklasyfikowano 10 markerów. Porównując dane fenotypowe (klasyfikacja roślin na odporne i podatne, niezależnie od statusu homozygotyczności *locus*) oraz wyniki genotypowania pojedynków populacji F_2 , dla siedmiu markerów stwierdzono całkowitą zgodność oceny poziomu odporności/podatności z oceną molekularną (współczynnik korelacji — 100%). W przypadku analizy zgodności oceny fenotypowej i molekularnej w zakresie statusu *locus I*, współczynniki korelacji były nieco niższe (85% do 87%, w zależności od użytego markera), co wynikało z różnic w klasyfikowaniu roślin jako homozygoty dominujące (odporne) lub heterozygoty (odporne) w teście fitopatologicznym i analizie molekularnej. Celem weryfikacji przydatności zidentyfikowanych 7 markerów do selekcji roślin odpornych na rasę 1 *Fol*, przeprowadzono dodatkową analizę z wykorzystaniem 35 linii/odmian referencyjnych z genem *I* pochodzących z zasobów genowych TGRC (University of California, Davis, USA). Niezależnie od zastosowanego markera, u wszystkich linii za wyjątkiem jednej LA 0276, uzyskano profil charakterystyczny dla allelu *I*. Warto jednak dodać, że pomimo informacji z banku genów o immunnej odporności na rasę 1 *Fol* linii LA 0276, rośliny tej linii w przeprowadzonym teście fitopatologicznym były podatne.

W ramach realizacji niniejszego projektu opracowywano również molekularną metodę identyfikacji genów warunkujących funkcjonalną męską sterylność (*ps*, *ps-2*) pomidora na potrzeby selekcji wspieranej markerami. Biorąc pod uwagę to, że mutanty *ps* wykazują fenotypowe podobieństwo zarówno pod względem budowy kwiatu, jak i sterylności do mutantów *slcer6* (Smirnova i in., 2013), na podstawie sekwencji genu *CER6* opracowano dwa markery CAPS (T1535/*MboI*, Cer6-3/*TaqI*). 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* (W-1.10, 2-303) stwierdzono obecność produktów

specyficznych dla roślin płodnych, pomimo, iż u wszystkich roślin tych linii obserwowano charakterystyczną dla genu *ps* budowę kwiatu. U wszystkich 84 roślin określonych przez PlantiCo Zielonki jako genotypy homozygotycznie sterylne (*ps*), uzyskano profil restrykcyjny amplikonu (dla obu markerów) charakterystyczny dla genotypu *ps/ps*, co oznacza całkowitą zgodność oceny fenotypowej i molekularnej. 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 wyróżnionych markerów w identyfikacji genu *ps*. Uzyskane wyniki genotypowania dla wybranych do badań linii męskosterylnych o różnym pochodzeniu oraz dwóch różnych populacji F_2 , pozostają jednak w sprzeczności z konkluzją Leide i in. (2011) według której mutacja *ps* nie jest tożsama z mutacją *slcer6*. Wniosek nasz znajduje również potwierdzenie w wynikach analiz względnej ekspresji genu *SICER6*, wskazujących na obniżony poziom jego ekspresji u linii *ps* w porównaniu z liniami płodnymi, niezależnie od badanego organu (liście, łodyga, działki kielicha, płatki, słupek, pylnik, skórka owocu czerwonego w pełni dojrzałego, skórka i miąższ w pełni wykształconego owocu zielonego). W przypadku genu *ps-2* weryfikowano użyteczność dwóch markerów: ps-2ABL (Gourget i in., 2009) i C4-30 (Staniaszek i in., 2012) na zróżnicowanym materiale (6 linii pomidora *ps-2* o różnym pochodzeniu, 2 linie cechujące się sterylnością, ale o kwiatach typowych dla roślin płodnych, 2 komercyjnie dostępne odmiany heterozyjne z genem *ps-2*, 10 linii płodnych, 2 populacje F_2 segregujące pod względem genu *ps-2*). Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na wyższą informatywność markera ps-2ABL opracowanego na podstawie sekwencji sklonowanego genu *ps-2* w porównaniu z markerem C4-30.

WNIOSKI

1. Odporność PI 114490 na *X. vesicatoria* uwarunkowana jest poligenicznie. Zbyt mała liczba markerów generujących polimorfizm DNA odpornej linii PI 114490 i podatnej 'Rumba' wskazują na potrzebę kontynuowania badań nad poszukiwaniem nowych markerów, które pozwoliłyby na identyfikację *loci* odpowiedzialnych za odporność roślin pomidora na rasę T2. Niezwykle pomocne w przypadku badanej cechy byłoby wykorzystanie wysokoprzepustowych metod genotypowania generujących mapy o wysokim zagęszczeniu na skutek detekcji wielu tysięcy SNP-ów.
2. Markery o wysokim sprzężeniu z genem *I* zidentyfikowane w trakcie realizacji niniejszego zadania mogą być rutynowo stosowane w diagnostyce molekularnej do selekcji roślin odpornych na rasę 1 Fol.
3. Wyższa efektywność markera ps-2ABL, opracowanego na podstawie sekwencji sklonowanego genu *ps-2*, w porównaniu z markerem C4-30 wskazuje na większą jego przydatność w identyfikacji genu *ps-2*.
4. Markery opracowane na podstawie sekwencji genu CER6 (T1535/MboI, Cer6-3/Taq1) mogą być rutynowo stosowane w diagnostyce molekularnej do identyfikacji roślin *ps*.

5. Obniżony poziom ekspresji genu *SLCER6* we wszystkich analizowanych organach linii męskosterylnych może sugerować iż mutacje *slcer6* oraz *ps* są tożsame.

LITERATURA

- Gorguet, B., Schipper D., van Lammeren A., Visser R., van Heusden A. 2009. *Ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the results of a mutation in novel polygalacturonase gene. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1199 — 1209.
- Jinks J. L., Jones R.M. 1958. Estimation of the components of heterosis. *Genetics* 43: 223 — 234.
- Leide J., Hildebrandt U., Vogt G., Riederer M. 2011. The positional sterile (*ps*) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *J. Plant Physiol.* 168: 871 — 877.
- Mather K., Jinks J. L. 1982. *Biometrical Genetics. The study of continuous variation.* Third edition. London, New York. Chapman and Hall.
- Scott J. W., Agram H. A. A., Jones J. P. 2004. RFLP — based analysis of recombination among resistance genes to fuzarium wilt races 1, 2 and 3 in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129 (3): 394 — 400.
- Smirnova A., Leide, J., Riederer M. 2013. Deficiency in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-coenzyme A synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. *Plant Physiology* 161 (1): 196 — 209.
- Staniaszek M., Szajko K., Kozik E. U., Nowakowska M., Marczewski W. 2012. The novel *ps* and *ps-2* specific markers for selection functional male sterile lines in breeding programs and hybrids seed production. *J. of Agric. Sci.*, vol. 4, (10): 61 — 67.

