

**WYKORZYSTANIE MARKERÓW MOLEKULARNYCH
W HODOWLI ODPORNOŚCIOWEJ POMIDORA NA CHOROBY
POWODOWANE PRZEZ *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *LYCOPERSICI*
I *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO***

USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE BREEDING
OF TOMATOES RESISTANCE TO DISEASES CAUSED
BY *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *LYCOPERSICI*
AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO*

Mirosława Staniaszek¹, Danuta Borowiak², Wojciech Szczechura¹

¹Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice
²„IWARZ-PNOS” Sp. z o.o. w Regulach
e-mail: mirosława.staniaszek@inhort.pl

WSTĘP

Pseudomonas syringae pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye i Wilkie (*Pst*) i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Synder i Hansen (*Fol*) należą do patogenów pomidora, które powodują duże straty w produkcji. Pierwszy z nich wywołuje bakteryjną cętkowatość, chorobę występującą w uprawie gruntowej i szklarniowej pomidora. Drugi patogen należy do grzybów klasy *Hyphomycetes* i powoduje fuzaryjne wędnięcie roślin, głównie w uprawie pomidorów pod osłonami. Próby zwalczania lub ograniczania występowania tych chorób są trudne, kosztowne i nie zawsze skuteczne. Najlepszą metodą ochrony roślin przed chorobami jest wprowadzenie do uprawy odmian odpornych. W hodowli ukierunkowanej na uzyskanie odmian odpornych stosuje się klasyczne metody selekcji, polegające na sztucznej inokulacji roślin czynnikiem chorobotwórczym. Są to techniki czasochłonne, kosztowne i wymagające wielu powtórzeń. Alternatywą dla stosowanych dotychczas testów fitopatologicznych mogą być metody molekularne, zwłaszcza te oparte na amplifikacji DNA, przy wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. PCR - polymerase chain reaction). W badaniach prowadzonych w Instytucie Warzywnictwa w Skierniewicach, w Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii, we współpracy z IHAR w Młochowie opracowano marker kodominujący CAPS, TAO1₉₀₂ sprzężony z genem *I-2*, warunkującym odporność roślin pomidora na rasę 2 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* oraz marker RAPD RP487₁₅₀₀ sprzężony z locus *Pto* odpowiedzialnym za odporność na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Stania-

szek i Kozik 2005, Staniaszek i in. 2007). Celem badań była identyfikacja genów *Pto* i *I-2* przy użyciu markerów RP487₁₅₀₀ i TAO1₉₀₂ w materiałach hodowlanych pomidora.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiło 67 pojedynków różnych pokoleń pochodzących ze skrzyżowań, w których formami matecznymi było 9 odmian o wartościowych cechach użytkowych, a formą ojcowską była odmiana Ontario 7710 odporna na bakteryjną cętkowatość (tab. 1). Materiał roślinny do analizy molekularnej otrzymano z Polskiej Hodowli i Nasiennictwa Roślin Ogrodniczych „IWARZ-PNOS” w Regulach. W badaniach wykorzystano również linie hodowlane i odmiany referencyjne o zdefiniowanej odporności/podatności na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Ontario 7710 - odmiana odporna, A100 - linia podatna) i *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (A241 - linia odporna, A238 - linia podatna).

Izolacja DNA

Izolację genomowego DNA z liści pomidora wykonano według procedury opisanej dla zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Stężenie oraz jakość uzyskanego DNA określono spektrofotometrycznie (BioPhotometr Eppendorf) i elektroforetycznie na 0,8% żelu agarozowym.

Identyfikacja markera RP487₁₅₀₀ sprzężonego z genem *Pto* warunkującym odporność roślin pomidora na *Pst*

Do amplifikacji DNA użyto mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 µl, która zawierała: 1x bufor PCR, 3 mM MgCl₂, 0,001% żelatyny, po 0,1 mM każdego z deoksyryboynukleotydów, 0,3 µM startera, 1 U Taq polimerazy (Invitrogen), 20 ng DNA. Reakcje PCR-RAPD przeprowadzono w termocyklerze GeneAmp 9700 zaprogramowanym następująco: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 1 min., a następnie 45 cykli złożonych z trzech etapów: denaturacja 92°C przez 15 sek., przyłączenie startera w temp. 36°C przez 25 sek., synteza komplementarnej nici DNA w temp. 72°C przez 74 sek., 1 cykl: zakończenie syntezy DNA 72°C przez 5 min. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie na 1,4% żelu agarozowym w buforze TBE (Tris-boran-EDTA) po barwieniu bromkiem etydyny.

Identyfikacja markera TAO1₉₀₂ sprzężonego z genem *I-2* warunkującym odporność roślin pomidora na rasę 2 *Fol*

Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µl zawierała: 1x bufor PCR, po 0,1 mM każdego z deoksyrybonukleotydów, 0,8 mM MgCl₂, po 0,12 µM każdego z dwóch starterów, 1 U Taq polimerazy (Invitrogen), 30 ng DNA. Profil termiczny reakcji: 1 cykl: 94°C - 1 min, 40 cykli: 93°C - 15 sek., 62°C - 20 sek., 72°C - 60 sek., 1 cykl: 72°C - 5 min. W badaniach polimorfizmu powielanych fragmentów DNA stosowano trawienie produktów PCR enzymem restrykcyjnym *RsaI* (Fermentas) w temperaturze 37°C przez 2 godziny, a następnie rozdzielano elektroforetycznie na 1,8% żelu agarozowym w buforze TBE po barwieniu bromkiem etydyny.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zbadano obecność markera RP487₁₅₀₀ i fragmentów restrykcyjnych markera TAO1₉₀₂ we wszystkich 67 genotypach.

Marker RP487₁₅₀₀ jest markerem dominującym, co oznacza, że będzie powielany z taką samą skutecznością, zarówno dla roślin o genotypie *PtoPto*, jak i hereozygot *Ptopto*. Obecność fragmentu DNA o długości 1500 par zasad (pz) świadczy o odporności badanego genotypu na *Pst* (fot. 1). Spośród badanych roślin pomidora obecność markera RP487₁₅₀₀ obserwowano w profilach amplifikacyjnych odmiany odpornej Ontario 7710 oraz w 54 roślinach otrzymanych z „IWARZ- PNOS” w Regulach (tab. 1, fot. 1 A,B), co świadczy, że są to genotypy odporne na *Pst*.

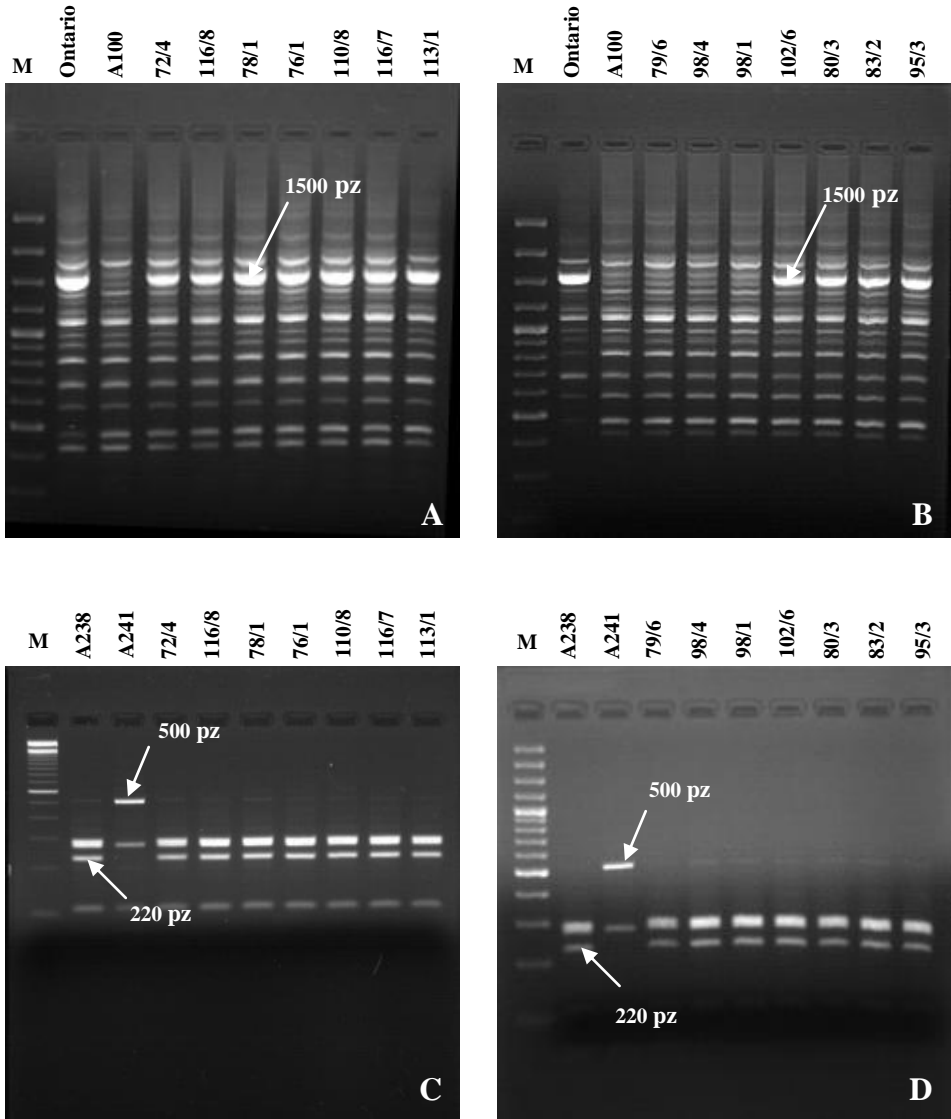
Marker TAO1₉₀₂ jest markerem typu kodominującego, który umożliwia identyfikację genotypów odpornych, homozygotycznych względem locus *I-2*. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *RsaI* otrzymamy fragment DNA o długości 500 pz, specyficzny dla odmiany, linii odpornej na *Fol* i fragment restrykcyjny DNA o długości 220 pz dla odmiany, linii podatnej. Dla wszystkich 67 badanych roślin uzyskano profile produktów restrykcyjnych markera TAO1₉₀₂ jak dla linii podatnej A238 (tab. 1, fot. 1 C,D).

Wprowadzenie markerów DNA, zwłaszcza tych generowanych przy zastosowaniu metody PCR, doprowadziło do przełomu w badaniach genetycznych roślin. Identyfikacja markerów DNA silnie i trwale sprzężonych z badanym genem może w znacznym stopniu ułatwić identyfikację pożądaney cechy w materiałach hodowlanych, bądź przyspieszyć selekcję roślin pod kątem eliminacji genotypów z genami niepożądanymi (Paterson i in. 1991).

Tabela 1. Identyfikacja markerów RP487₁₅₀₀ i TAO1₉₀₂ w materiałach hodowlanych
 Table 1. Identification of RP487₁₅₀₀ and TAO1₉₀₂ markers in breeding materials

| Nr polowy Field number | Liczba analizowanych pojedynków Number of tested plants | Pokolenie Generation | Marker RP487 ₁₅₀₀ | Marker TAO1 ₉₀₂ po trawieniu RsaI; Marker TAO1 ₉₀₂ after digestion RsaI |
|--------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------|---|
| Atol x Ontario 7710 | | | | |
| 72 | 2 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| Delta x Ontario 7710 | | | | |
| 76 | 2 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| 78 | 1 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| 79 | 1 | F ₄ po BC ₃ | + | - |
| 80 | 1 | F ₄ po BC ₃ | + | - |
| 81 | 1 | F ₁ po BC ₅ | + | - |
| 82 | 3 | F ₃ po BC ₅ | - | - |
| Lubań x Ontario 7710 | | | | |
| 83 | 1 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| 84 | 5 | F ₅ po BC ₂ | - | - |
| 87 | 2 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| 89 | 2 | F ₄ po BC ₂ | + | - |
| Kmicic x Ontario 7710 | | | | |
| 91 | 3 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| 92 | 3 | F ₅ po BC ₂ | + | - |
| 93 | 5 | F ₄ po BC ₂ | + | - |
| 95 | 3 | F ₁ po BC ₂ | + | - |
| 86 | 1 | F ₁ po BC ₅ | + | - |
| Rumba x Ontario 7710 | | | | |
| 98 | 3 | F ₅ po BC ₂ | - | - |
| Sobieski x Ontario 7710 | | | | |
| 102 | 1 | F ₄ po BC ₃ | + | - |
| 103 | 2 | F ₄ po BC ₃ | + | - |
| 104 | 2 | F ₁ po BC ₅ | + | - |
| 105 | 2 | F ₃ po BC ₄ | + | - |
| Granit x Ontario 7710 | | | | |
| 108 | 1 | F ₃ po BC ₁ | - | - |
| 109 | 1 | F ₃ po BC ₁ | + | - |
| 110 | 1 | F ₃ po BC ₁ | + | - |
| Konsul x Ontario 7710 | | | | |
| 113 | 1 | F ₃ po BC ₁ | + | - |
| 114 | 1 | F ₃ po BC ₁ | + | - |
| 112 | 1 | F ₃ po BC ₁ | + | - |
| R3 x Ontario 7710 | | | | |
| 115 | 1 | F ₁ po BC ₃ | + | - |
| 116 | 3 | F ₃ po BC ₃ | + | - |
| 117 | 2 | F ₃ po BC ₃ | + | - |
| 119 | 1 | F ₁ po BC ₃ | - | - |
| 120 | 2 | F ₁ po BC ₃ | + | - |
| 121 | 1 | F ₃ po BC ₂ | + | - |
| 124 | 1 | F ₃ po BC ₂ | + | - |
| 125 | 1 | F ₃ po BC ₂ | + | - |
| 127 | 3 | F ₁ po BC ₂ | + | - |

+ obecność markera/ presence of marker; - brak markera/ absence of marker



M – wzorzec mas DNA, 100 pz; 100 bp DNA ladder

← - polimorficzny fragment DNA; polymorphic DNA fragment

Fot. 1. Identyfikacja RAPD markera RP487₁₅₀₀ (A, B) i markera TAO1₉₀₂ po trawieniu enzymem restrykcyjnym *RsaI* (C, D) w materiałach hodowlanych otrzymanych z IWARZ-PNOS Reguły

Fig. 1. Identification of RAPD marker RP487₁₅₀₀ (A, B) and TAO1₉₀₂ marker after digestion with *RsaI* (C, D) in breeding materials obtained from IWARZ-PNOS Reguły

Selekcja materiałów hodowlanych, z wykorzystaniem markerów molekularnych, określana jako MAS (ang. marker-assisted selection), znajduje coraz szersze zastosowanie w programach hodowlanych wielu gatunków roślin (Barone 2003, Michelmore 2003, Foolad i Panthee 2012, Panthee i Foolad 2012). Co również istotne, metodyka identyfikacji określonego markera DNA musi być prosta, powtarzalna i tania, tak aby jej stosowanie było konkurencyjne względem klasycznych metod selekcji. Metoda molekularna powinna wносить nową jakość do programów hodowlanych. W przypadku pomidora będzie to detekcja genotypów homozygotycznych i heterozygotycznych względem określonego locus przy użyciu markerów specyficznych dla obu alleli - tzw. markerów kodominujących. Takim przykładem jest marker TAO1₉₀₂ sprzężony z genem *I-2*. Procedura jego detekcji, oprócz etapu powielania sekwencji, obejmuje trawienie enzymem restrykcyjnym *RsaI*.

Marker RP487₁₅₀₀ sprzężony z genem *Pto* odporności na *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* jest markerem typu RAPD. Technika RAPD jest najprostszą i wciąż najbardziej popularną metodą amplifikacji fragmentów DNA przy użyciu reakcji PCR, stosowaną w badaniach genetycznych roślin. Markery RAPD są dominujące, co oznacza, że taki sam obraz amplifikacji markera uzyskamy dla genotypów posiadających jeden lub dwa takie same allele w locus markerowym. Jeśli celem selekcji jest wyróżnienie roślin odpornych, marker RP487₁₅₀₀ może być przydatnym narzędziem diagnostycznym.

Uzyskane wyniki wskazują, że selekcja w oparciu o markery RP487₁₅₀₀ i TAO1₉₀₂ jest skuteczną metodą identyfikacji genotypów o pożądanych cechach użytkowych.

Literatura

- Barone A. 2003. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogenes in tomato. International Workshop 2003. October 17-18, Villa Guliano, Torino, Italy: 29-34.
- Foolad M.R., Panthee D.R. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Critical Reviews in Plant Science* 31,2: 93-123.
- Michelmore R.W. 2003. The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 397-404.
- Panthee D.R., Foolad M.R. 2012. A reexamination of molecular markers for use in marker-assisted breeding in tomato. *Euphytica* 184: 165-179.
- Paterson A.H., Tanksley S.D., Sorrells M.E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv. Agronomy* 46: 39-90.

- Staniaszek M., Kozik E. 2005. RAPD markers for resistance genes in plants. International Workshop "Application of biotechnology in breeding cultivars suitable for sustainable fruit production". Skierniewice.
- Staniaszek M., Kozik E.U., Marczewski W. 2007. A CAPS marker TAO1₉₀₂ diagnostic for the *I-2* gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 in tomato. Plant Breeding 126: 331-333.

Mirosława Staniaszek, Danuta Borowiak, Wojciech Szczechura

USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE BREEDING OF TOMATOES
RESISTANCE TO DISEASES CAUSED BY *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP.
LYCOPERSICI AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TOMATO*

Summary

The objective of this research was the identification of the *Pto* gene and of the *I-2* gene in tomato breeding materials, using DNA markers. The amplification of RP487₁₅₀₀ and TAO1₉₀₂ markers was tested in 67 genotypes made from a cross between the cultivar Ontario 7710 and breeding line A100. Of the genotypes studied, the presence of the RP487₁₅₀₀ marker was observed in 54 plants, whereas 67 plants were homozygous susceptible to the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. These two markers can be used in resistance breeding of tomato, in order to select resistant genotypes. It especially refers to the TAO1₉₀₂, which is co-dominant and allows the identification of homozygotic genotypes.