

## Obszar VI. Postęp biologiczny

### **Zadanie 6.5: Poszukiwanie i tworzenie nowej zmienności genetycznej roślin warzywnych jako źródła odporności na stresowe czynniki biotyczne i abiotyczne oraz o większej wartości odżywczej i prozdrowotnej”**

Kierownik zadania: doc. dr hab. E.U. Kozik

W ramach realizowanego zadania zgromadzono i wstępnie oceniono kolekcję linii marchwi, które będą mogły być wykorzystywane jako materiał wyjściowy w dalszych pracach hodowlanych ze względu na korzystne cechy użytkowe. Wstępna analiza wartości odżywczej korzeni marchwi w obrębie zgromadzonych genotypów wykazała wysoki stopień zróżnicowania pod względem ocenianych cech, takich jak: zawartość karotenoidów i ekstraktu oraz jednolitości zabarwienia. Dodatkowo dzięki współpracy z zagranicznymi placówkami naukowymi, zgromadzono genotypy ogórka i pomidora pochodzące z różnych rejonów geograficznych świata. Przeprowadzono ocenę zmienności międzyliniowej w zakresie najważniejszych cech morfologicznych owoców i roślin. Stwierdzono dużą międzyliniową zmienność fenotypową badanych linii pod względem ocenianych cech. Wstępne analizy tej oceny wskazują, że badane genotypy można zaklasyfikować do różnych grup o zróżnicowanych cechach botanicznych i użytkowych. Pod względem ekspresji płci wyróżniono obiekty żeńskie, jednopienne i męskie. Do grupy roślin homozygotycznie żeńskich należało 10% badanych linii. Najliczniej reprezentowana była grupa roślin jednopiennych, która stanowiła 87%; 2 linie (3%) wytwarzały tylko kwiaty męskie. Zgromadzone materiały linii dzikich gatunków *Lycopersicon* i pomidora uprawnego, które według danych literaturowych i przedstawicieli zagranicznych instytucji naukowych, stanowią cenne źródło cech użytkowych, a zwłaszcza odporności na czynniki biotyczne (patogeny grzybowe, wirusy, bakterie) i abiotyczne (niskie temperatury i brak wody). Niektóre z linii pomidora uprawnego charakteryzują się bardzo dobrymi cechami agronomicznymi oraz wysoką zawartością składników odżywczych (likopenu, cukrów, beta-karotenu).

### **Zadanie 6.6: Identyfikacja markerów DNA sprzężonych z genami warunkującymi odporność na choroby stanowiące istotne zagrożenie w uprawie roślin warzywnych, przydatnych do selekcji genotypów odpornych**

Kierownik zadania: dr M. Staniaszek

Ze względu na duże zainteresowanie spółek hodowlano-nasiennych hodowlą nowych odmian heterozyjnych pomidora z kompleksową odpornością na patogeny, podjęto badania nad poszukiwaniem markerów DNA sprzężonych z genem *Frl* warunkującym odporność na *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), sprawcy fuzaryjnej zgorzeli szyjki i podstawy łodygi. Wykonano dwa testy biologiczne w warunkach sztucznej infekcji grzybem *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Kultura grzyba pochodziła z Instytutu Badań Rolniczych (INRA), Monfavet, Francja. Ocenę odporności wykonano na roślinach 11 linii hodowlanych pomidora o wartościowych cechach użytkowych i jednej odmianie F1 odpornej na FORL (Trust F1, odmiana kontrolna). Patogeniczność grzyba sprawdzono na roślinach linii A100, homozygotycznie podatnej na większość chorób pomidora, w tym na fuzaryjną zgorzel szyjki i podstawy łodyg. W każdym teście oceniono po 20 roślin reprezentujących poszczególne linie hodowlane i odmianę kontrolną. Zdrowotność roślin oceniono po 4 tygodniach od inokulacji według pięciostopniowej skali porażenia (0 – bez objawów chorobowych, 4 – silne porażenie prowadzące do zamierania roślin) oraz obliczono wskaźnik podatności DSI na fuzaryjną zgorzel szyjki i podstawy łodygi.

### **Zadanie 6.7: Poznanie czynników warunkujących odporność roślin warzywnych na patogeny (wirusy, grzyby, bakterie) z uwzględnieniem cech anatomicznych, cytologicznych i biochemicznych**

Kierownik zadania: doc. dr hab. B. Dyki

Pierwszy etap realizacji zadania objął próby zastosowania kilkunastu dostępnych metod i technik mikroskopowych dla wyeksponowania różnic w budowie tkanki okrywającej korzeni, łodygi, liści

i wybranych elementów kwiatu roślin kapusty, kalafiora, marchwi, pomidora i ogórka. Określenie, jaką strukturą charakteryzują się te tkanki okrywające, jest warunkiem niezbędnym do realizacji dalszych, podstawowych celów zadania, którym jest poznanie mechanizmów decydujących o zróżnicowanej podatności na choroby infekcyjne powodowane przez różnego rodzaju drobnoustroje. Relacje roślina-patogen są inicjowane przy udziale powierzchni rośliny, a odporność czy stopień tolerancji na chorobę są często uzależnione od budowy i składu chemicznego komórek skórki, czyli epidermy. Warstwa epidermy jest pierwszą tkanką powierzchni rośliny i stanowi warstwę kontaktującą roślinę ze środowiskiem zewnętrznym. Niezależnie czy jest to powierzchnia części nadziemnej, czy podziemnej, może ona stanowić barierę strukturalną lub biochemiczną, utrudniającą wnikanie określonych organizmów chorobotwórczych, a tym samym decydować o stopniu podatności rośliny na choroby przez nie wywoływane. Efekty zastosowanych metod dla eksponowania tkanek powierzchniowych badanych roślin porównywano na podstawie obrazów mikroskopowych i udokumentowano licznymi fotografiami.

### **Zadanie 6.8: Opracowanie metod oceny i selekcji roślin oraz wyodrębnienie źródeł odporności na najważniejsze patogeny roślin warzywnych**

Kierownik zadania: doc. dr hab. E.U. Kozik

Na podstawie dostępnej literatury dokonano analizy różnych metod oceny poziomu odporności pomidora i kapusty białej na alternariozy, z uwzględnieniem czynników decydujących o praktycznym wykorzystaniu metod oceny odporności roślin zarówno w warunkach naturalnej infekcji w polu, jak i sztucznej inokulacji roślin w testach szklarniowych i fitotronowych. Opracowano podstawy metodyczne przechowywania i namnażania kultur grzyba *Alternaria* sp. oraz sporządzania inokulum do testów biologicznych.

Z różnych ośrodków naukowych i banków genów na świecie pozyskano dzięki gatunki *Lycopersicon*:

*L. hirsutum* f. *glabratum* – 2 linie;

*L. hirsutum* – 1 linia;

*L. peruvianum* – 1 linia;

*L. pimpinellifolium* – 4 linie.

Do badań włączono również 10 niestabilnych genetycznie, segregujących linii pomidora własnej hodowli, o wysokim poziomie odporności na alternariozę o nieznanym tle genetycznym, ale o cennych wartościach użytkowych.

Zgromadzono populacje 30 genotypów kapusty głowiastej białej o zróżnicowanym poziomie odporności na grzyby z rodzaju *Alternaria*.

Z danych literaturowych wynika, że głównym sprawcą alternariozy pomidora jest grzyb *Alternaria solani*. Choroba występuje powszechnie na liściach, łodygach (sucha plamistość liści i łodyg) oraz owocach (czarna zgnilizna owoców) pomidora, głównie w warunkach uprawy polowej. Grzyb ten może również wywoływać zgorzele siewek pomidora. *Alternaria solani* należy do bardzo licznej rodziny grzybów niedoskonałych (*Deuteromycotina*), które występują tylko w stadium konidialnym.

Identyfikacja zgromadzonych izolatów, pozwalająca określić gatunek patogena wywołującego alternariozy na pomidorach w Polsce, będzie przeprowadzona w następnych latach we współpracy z fitopatologiem i przy wykorzystaniu izolatów pochodzących z zagranicznych banków patogenów.

W warunkach naturalnej infekcji w polu wykonano ocenę odporności/podatności zgromadzonych materiałów hodowlanych na alternariozę pomidora. Rośliny objęte badaniami nie były chronione żadnymi zabiegami chemicznymi przeciwko chorobom. W czasie wegetacji oceniono poziom nasilenia alternariozy na podstawie procentowego porażenia powierzchni liści, łodyg oraz owoców przez *Alternaria* sp., według dziewięciostopniowej skali bonitacyjnej (9 – brak objawów, 1 – porażenie powyżej 90%). Warunki pogodowe, jakie panowały w pierwszej połowie lata, czyli wysoka temperatura i wilgotność spowodowana silnymi okresowymi opadami deszczu, sprzyjały szczególnie rozwojowi alternariozy na pomidorach. Pierwsze objawy tej choroby w postaci nekrotycznych plam na liściach z koncentrycznie i strefowo ułożonymi pierścieniami pojawiły się w połowie czerwca i od tego momentu obserwowano znaczny wzrost ich nasilenia, głównie na podatnych genotypach (np. odmianie Rumba). Wśród dzikich gatunków *Lycopersicon* obserwowano znaczne różnice pod względem poziomu odporności roślin na alternariozę pomidora. Najwyższą odpornością wyróżniła się linia *L. hirsutum*, której liście, łodygi i owoce nie były porażane przez sprawcę tej choroby. Najsilniej

zainfekowane zostały rośliny jednej linii *L. hirsutum* f. *glabratum* i dwóch – *L. pimpinellifolium*. U pozostałych badanych genotypów zarówno pomidora uprawnego, jak i dzikich gatunków *Lycopersicon* odnotowano segregację na osobniki odporne, średniopodatne i podatne. Na wyróżnienie zasługuje szczególnie linia *L. esculentum* PWA8, u której dominowały rośliny odporne (klasy 7-9).

Warto podkreślić, że wegetacja roślin odpornych utrzymywała się do pierwszych przymrozków (początek października), podczas gdy rośliny podatne zamierały już na przełomie sierpnia i września. Do dalszej hodowli z każdej badanej populacji wyselekcjonowano rośliny najbardziej odporne (z klas 8 i 9) o zróżnicowanych, ale korzystnych cechach użytkowych roślin i owoców, które następnie poddano samozapyleciu.

W warunkach uprawy polowej analizowano również poziom odporności/podatności genotypów kapusty głowiastej białej na czerń krzyżowych wśród zgromadzonej w Instytucie Warzywnictwa kolekcji form użytkowych. Wszystkie genotypy charakteryzowały się dobrą jakością główek, zróżnicowanym okresem wegetacji, dobrym lub średnim wyrównaniem międzyliniowym oraz cechami morfologicznymi typowymi dla kapusty głowiastej białej. Oceniana populacja 30 genotypów odznaczała się zróżnicowanym poziomem podatności na patogeny z rodzaju *Alternaria*, ocenianym w 5-stopniowej skali bonitacyjnej. Zidentyfikowano genotypy praktycznie bez objawów porażenia w warunkach polowych, porażane w stopniu bardzo silnym, jak również wiele genotypów porażonych w średnim stopniu.

**Zadanie 6.9: Ocena wartości użytkowej dwóch systemów męskosterylności cytoplazmatycznej i cytoplazmatyczno-jądrowej roślin kapustowatych, marchwi oraz męskiej sterylności pomidora**  
Kierownik zadania: dr P. Kamiński

Na podstawie analizy stanu piśmiennictwa naukowego dokonano wstępnej oceny i wyboru różnych mechanizmów dziedziczenia cechy cytoplazmatycznej i cytoplazmatyczno-jądrowej i jądrowej męskiej sterylności dla potrzeb tworzenia nowej zmienności genetycznej roślin kapustowatych, marchwi i pomidora. Na podstawie oceny dostępności oraz stabilności w zmiennych warunkach środowiska badanych mechanizmów ograniczających męską płodność, dokonano wyboru metod badawczych i technik hodowlanych umożliwiających realizację zadania.

W celu oceny wartości użytkowej linii kalafiora z różnymi systemami męskiej sterylności, zgromadzono kolekcję 24 genotypów kalafiora z cytoplazmą *Brassica nigra* warunkującą cechę cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności oraz 28 linii dopełniających z płodną cytoplazmą, umożliwiających rozmnażanie męskosterylnych genotypów, 9 genotypów kalafiora z cytoplazmą *Raphanus sativus* oraz 9 męskopłodnych linii wypierających. W wyniku współpracy z ośrodkami naukowymi w Stanach Zjednoczonych, sprowadzono również genotypy pomidora uprawnego z cechą męskiej sterylności uwarunkowanej obecnością genu ms10. Do realizacji zadania wytypowano 6 linii marchwi z cechą cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności o różnym poziomie ekspresji tej cechy oraz 7 linii dopełniających.

Uzyskane genotypy będą materiałem wyjściowym do przeprowadzenia oceny wartości użytkowej różnych systemów męskiej sterylności dla praktycznego wykorzystania w hodowli roślin warzywnych.

Większość genotypów charakteryzowała się dobrym wyrównaniem wewnątrzliniowym oraz korzystnymi cechami użytkowymi typowymi dla kalafiora. Stwierdzono duże zróżnicowanie między genotypami pod względem wczesności, masy, kształtu, barwy i zwartości róży, okrycia liśćmi zewnętrznymi oraz podatności na przerastanie. Genotypy charakteryzujące się słabszym wyrównaniem wewnątrzliniowym oraz cechami odbiegającymi od standardów przyjętych dla kalafiora będą wymagały dalszych krzyżowań wstecznych, w celu wprowadzenia wartościowych cech użytkowych oraz zachowania cechy męskiej sterylności. W warunkach szklarniowych oceniono poziom sterylności zgromadzonych linii pomidora z genem ms10. Wstępną selekcję roślin sterylnych przeprowadzono w fazie siewek na podstawie markerowej cechy zielonego hipokotylu (gen a). Badane genotypy charakteryzowały się całkowitą sterylnością kwiatów i dlatego stanowią cenny materiał wyjściowy do dalszych badań. W celu uzyskania następnego pokolenia linie te przekrzyżowano z płodnymi genotypami o korzystnych cechach użytkowych pomidora gruntowego. Dla potrzeb realizacji zadania, wyselekcjonowano sześć męskosterylnych genotypów marchwi oraz siedem form dopełniających, dla których oceniono w warunkach polowych podstawowe cechy jakościowe

i morfologiczne, takie jak: masa, długość i szerokość korzenia oraz rdzenia, a także kształt i wybarwienie. Wybrane genotypy posiadały korzystne cechy użytkowe charakterystyczne dla dobrej jakości linii hodowlanych. Materiały te po jarowizacji zostaną poddane analizie cech morfologicznych i rozmnożeniu w fazie generatywnej. Zgromadzone genotypy kalafiora, kapusty głowiastej, marchwi i pomidora stanowią wartościową i zróżnicowaną genetycznie kolekcję, która w kolejnych latach realizacji zadania zostanie oceniona w fazie generatywnej pod względem cech anatomiczno-morfologicznych kwiatów oraz mechanizmów dziedziczenia cechy męskiej sterility dla poszczególnych gatunków warzyw.

**Zadanie 6.10: Otrzymywanie populacji roślin warzyw odpornych na szkodliwe czynniki abiotyczne z zastosowaniem kultur pylnikowych i kultur mikrospor**

Kierownik zadania: prof. dr hab. K. Górecka

W 2008 roku rozpoczęto realizację zadania dotyczącego otrzymania populacji roślin warzywnych odpornych na szkodliwe czynniki abiotyczne. Wzrastające skażenie środowiska powoduje zmiany warunków klimatycznych i glebowych panujących w Polsce. Dlatego ważne jest otrzymanie roślin do nich dostosowanych. W ramach zadania wybrano odpowiedni materiał wyjściowy. Są to odmiany i linie wybrane przez specjalistę w trakcie procesu hodowlanego, ze względu na korzystne cechy użytkowe. Materiał został zebrany, zgromadzony i aktualnie jest jarowizowany w temp. +4 °C. Pracowano nad optymalizacją procedury androgeny in vitro w kulturach pylnikowych i kulturach izolowanych mikrospor. Efektywność androgeny można podwyższyć przez modyfikacje składu pożywki, warunków kultury, wybór najbardziej odpowiednich eksplantatów, użycie różnego rodzaju szoków, odpowiednią procedurę zakładania kultur. Przeprowadzono doświadczenia nad pożywką do indukcji embriogenezy w kulturze pylników i izolowanych mikrospor marchwi. Większą liczbę zarodków w kulturach pylnikowych otrzymano na pożywce B5 (Gamborg i in. 1968) niż na pożywce MS (Murashige i Skoog 1962), a podniesienie poziomu sacharozy powyżej 100 g/l pożywki okazało się niekorzystne. Również w kulturach izolowanych mikrospor wyższy niż 100 g/l poziom sacharozy miał negatywny wpływ na efektywność embriogenezy. Zachodziły tylko pierwsze podziały mikrospor, natomiast zarodki nie powstawały.