

## Ocena zdolności kombinacyjnej nowych genotypów truskawki dla określenia ich przydatności do hodowli deserowych odmian odpornych na werciliozę z zastosowaniem markerów molekularnych QTL

W roku 2009 badania realizowano w Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniążka w Skierniewicach, w Pracowni Genetyki i Hodowli oraz Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli.

Celem badań przeprowadzonych w Pracowni Genetyki i Hodowli była ocena zdolności ogólnej (GCA) i specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA) genotypów przeznaczonych do hodowli odmian deserowych.

Do programu krzyżowań wykonanego w 2008 roku w oparciu o niekompletny układ dialleliczny według III metody Griffinga (krzyżowania proste i odwrotne), użyto nowe deserowe odmiany truskawki, odznaczające się wysoką odpornością na werciliozę ('Selvik', 'Elianny', 'Figaro', 'Sonata', 'Susy', 'Salsa', 'Albion' i 'Filon') oraz dwie odmiany o średniej wrażliwości na tę chorobę, ale bardzo cenione ze względu na bardzo dobry smak i atrakcyjny wygląd owoców ('Darselect') lub zdolność do powtarzania owocowania w okresie letnio-jesiennym ('Charlotte'). Z uzyskanych nasion zimą 2008/2009 wyprodukowano siewki należące do 36 rodzin mieszańcowych.

W ramach badań polowych wykonano ocenę stopnia porażenia roślin przez *Verticillium dahliae* dla 2160 siewek należących do ww. 36 rodzin, wysadzonych na pola prowokacyjne („pola śmierci”) o znanej koncentracji patogena. Wstępną analizę zebranych wyników uzyskanych w każdym terminie oceny (średnie dla 15 roślin na poletku) wykonano w oparciu o jednoczynnikową analizę wariancji w układzie losowanych bloków. Dla średnich rodzin z powtórzenia wykonano analizę wariancji według niekompletnego diallelicznego układu Griffinga, dla III metody, posługując się modelem stałym Griffinga.

Najwyższą dodatnią wartość efektów GCA, wskazującą na możliwość przekazywania potomstwu cechy dużej podatności roślin na werciliozę, oszacowano dla odmian 'Susy' i 'Elianny'. Wysoką przydatność do hodowli odpornościowej pod względem tej choroby stwierdzono dla dwóch odmian wyhodowanych w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach – 'Filon' i 'Selvik'. Dla odmian tych wykazano wysokie ujemne wartości efektów GCA. Wysokie dodatnie wartości efektów SCA dla cechy podatności na werciliozę oszacowano dla rodzin mieszańcowych 'Darselect' x 'Albion', 'Figaro' x 'Sonata', 'Figaro' x 'Darselect' oraz 'Susy' x 'Charlotte' - należy oczekiwać, że potomstwo tych rodzin mieszańcowych będzie wrażliwe na werciliozę. Wysokie ujemne wartości efektów SCA stwierdzono dla rodzin mieszańcowych 'Selvik' x 'Filon', 'Sonata' x 'Filon', 'Susy' x 'Filon', 'Albion' x 'Charlotte' – dla rodzin tych istnieje duże prawdopodobieństwo wyselekcjonowania pojedynków, odznaczających się małą podatnością na werciliozę.

W ramach badań polowych wykonano także nowy program krzyżowań (w oparciu o niekompletny układ dialleliczny wg III metody Griffinga, łącznie 42 kombinacje krzyżowań), w wyniku którego uzyskano 7643 siewki, przeznaczone do oceny w roku 2010.

W Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli kontynuowano próby zidentyfikowania potencjalnych markerów odporności truskawki na werciliozę poprzez analizę BSA, przeprowadzono analizę genów kandydujących (Real time PCR) oraz ocenę stopnia ekspresji genów z systemu genów kandydujących techniką High Throughput Sequencing.

Badania metodą BSA (Bulked Segregant Analysis) przeprowadzono dla 80 roślin wybranych na drodze losowej z populacji potomnych uzyskanych dla 8 kombinacji krzyżowań. W reakcji PCR z 60 starterami mikrosatelitarnymi ISSR, uzyskano 90 amplikonów, różnicujących genotypy podatne i tolerancyjne w poszczególnych populacjach potomnych, w tym dwa potencjalne markery różnicujące rośliny podatne i tolerancyjne. Były to amplikony o długości 950 i 890 pz ( starter 848) dla genotypów wrażliwych z populacji potomnych 'Darselect' x 'Charlotte' i 'Figaro' x 'Darselect' oraz 'Elianny' x 'Susy' i 'Figaro' x 'Darselect'.

W ramach badań nad genami bezpośrednio warunkującymi odporność roślin na patogeny analizowano poziom ekspresji następujących genów-kandydatów:

- genu amoniakolizy fenyloalaniny (PAL) – ogniwo łączące metabolizm podstawowy ze szlakami metabolizmu wtórnego rośliny
- genu izomerazy chalkonowej (CHI) – enzym szlaku biosyntezy flawonoidów, biorący udział w odpowiedzi na infekcję
- genu  $\beta$ -1,3-glukanazy – enzym biorący udział w aktywnym zwalczaniu patogenów grzybowych podczas infekcji.

Rolę genu referencyjnego pełnił gen 3-fosfodehydrogenazy gliceraldehydu (GAPDH2). Badanie prowadzono dla genotypów potomnych 'Darselect' x 'Filon' oraz Charlotte' x 'Filon' (W x T).

W wyniku ww. badań stwierdzono znaczącą różnicę w ekspresji genu PAL dla roślin nie wykazujących objawów (wysoka ekspresja) i roślin o silnych objawach werciliozy (ekspresja relatywnie niska) dla obu grup. Dla genu CHI, duża różnica w ekspresji genu dla roślin o silnych objawach i roślin bezobjawowych wystąpiła w genotypach potomnych 'Charlotte' x 'Filon', natomiast w przypadku genotypów pochodzących z krzyżowania 'Darselect' x 'Filon' zaobserwowano znaczącą różnicę w poziomie ekspresji genu CHI pomiędzy dwiema roślinami wykazującymi silne objawy chorobowe. Powyższe dane potwierdzają złożoność mechanizmu odporności na werciliozę.

Analizę transkryptomu HTS przeprowadzono dla genotypów reagujących ekstremalnie na porażenie przez *V. dahliae*. Badano poziom ekspresji genów, stanowiących ogniwo z systemie genów kandydujących, w tkankach pochodzących z korzeni i liścia roślin podatnych (I grupa) i tolerancyjnych (II grupa). Kontrolę stanowiły rośliny nieinokulowane patogenem. W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano około 3 mln 18 nukleotydowych fragmentów cDNA o zwiększonej liczbie kopii, z których po wstępnej selekcji bioinformatycznej wyodrębniono około 1500 fragmentów, przeznaczonych do dalszych analiz porównawczych z dostępną bazą danych NCBI w 2010 roku.

W ramach kontynuacji tematu w 2010 roku planuje się:

- pozyskiwanie nowych materiałów wyjściowych dla hodowli wysokiej jakości odmian deserowych truskawki (badania genetyczno-hodowlane)
- identyfikację nowych i walidację uzyskanych markerów selekcyjnych do oceny podatności truskawki na werciliozę (badania molekularne)