

Zadanie 78 Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

W roku 2017 badania realizowano w ramach 2 tematów badawczych:

Temat badawczy 1: Przygotowanie materiału badawczego do badań molekularnych i ocena fenotypowa roślin w warunkach presji szkodnika

Celem tematu było przygotowanie materiału roślinnego do badań molekularnych oraz ocena fenotypowa roślin z kolekcji i dwóch populacji mieszańcowych w warunkach silnej presji szkodnika. W ramach realizacji zadania kontynuowano uprawę roślin należących do kolekcji (500 roślin) oraz do rodzin mieszańcowych: 'Ceres' x 'Bona' (150 roślin) i 'Polares' x 'Gołubka' (150 roślin). Ocenę fenotypową zasiedlenia pąków testowanych genotypów przez wielkopąkowca porzeczkowego przeprowadzono w dwóch terminach (marzec i listopad). Ostatecznie, w populacji 'Ceres' x 'Bona', symptomy porażenia obserwowano na 52,7%, natomiast w populacji 'Polares' x 'Gołubka' na 22,7% badanych siewek. Ocena zasiedlenia pąków przez wielkopąkowca genotypów z kolekcji wykazała charakterystyczne objawy zasiedlenia pąków przez *C. ribis*. na 40% odmian porzeczeki czarnej.

Temat badawczy 2: Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczeki czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego

Celem tematu była: ocena stopnia polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P oraz poszukiwanie innych fragmentów genomu odpowiedzialnych za regulację cechy odporności porzeczeki czarnej na wielkopąkowca. Genomowe DNA do badań izolowano metodą wg Doyle i Doyle. Do oceny polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P dwunastu genotypów *Ribes* (kolekcja IO), zróżnicowanych pod względem odporności na *C. ribis*, wykorzystano metodę CAPS-PCR z czterema enzymami restrykcyjnymi (*AluI*, *MseI*, *Sau3AI* i *MluCI*) oraz metodę sekwencjonowania matryc DNA (100 fragmentów DNA). Na podstawie analizy polimorfizmu form rodzicielskich 'Ceres', 'Bona', 'Polares' i 'Gołubka' (40 par starterów mikrosatelitarnych, wytypowanych w oparciu o istniejące mapy genomu *Ribes nigrum* oraz badania własne) do sporządzenia mapy genetycznej wytypowano populację 'Ceres' x 'Bona'. Spośród uzyskanych genotypów potomnych tej populacji (150 siewek) z dalszych badań wyeliminowano jedną siewkę o profilu genetycznym odmiennym od profili form rodzicielskich. Do konstrukcji szkieletu mapy wybrano 10 markerów SSR zlokalizowanych na mapach referencyjnych rodzaju *Ribes* w grupach sprzężeń 1, 2 i 4. Zintegrowaną mapę genetyczną sporządzono w oparciu o wyniki segregacji 64 zidentyfikowanych alleli mikrosatelitarnych. Ustalono loci pięćdziesięciu alleli reprezentujących typowy rozkład mendelowski (test χ^2). Uzyskany w bieżącym roku szkielet mapy zawiera 6 grup sprzężeń, o łącznej długości 335 cM. Analiza porównawcza uzyskanych grup sprzężeń z ich odpowiednikami na mapach referencyjnych, opublikowanych dla innych przedstawicieli rodzaju *Ribes*, wykazała 60% homologię.

Wyniki opublikowano w materiałach konferencyjnych:

Badek B., Pluta S., Korbin M. Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, Skierniewice. 2017. Ocena stopnia polimorfizmu regionów genomu porzeczki czarnej (*Ribes nigrum*) sprzężonych z jej odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa „Ziemia, Roślina, Człowiek”, Kraków, 20-21 września 2017 r. Materiały konferencyjne s 80.

Ocena stopnia polimorfizmu regionów genomu porzeczki czarnej (*Ribes Nigrum*) sprzężonych z jej odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego

Bogumiła Badek^{*}, Stanisław Pluta, Małgorzata Korbin

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

* Autor korespondujący: bogumila.badek@inhort.pl


Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*) jest najgroźniejszym szkodnikiem czarnej porzeczki, zasiedlającym większość uprawianych odmian tego gatunku. Szpeciel ten jest również wektorem wirusa rewersji porzeczki czarnej *Blackcurrant reversion virus* (BRV), będącego sprawcą uszkodzeń roślin prowadzących do zamierania plantacji. Hodowcy porzeczki od lat poszukują odmian charakteryzujących się odpornością na *C. ribis*/ BRV, jak również precyzyjnych narzędzi umożliwiających szybką identyfikację i wyeliminowanie z procesu hodowlanego genotypów wrażliwych.

Celem badań, prowadzonych w Instytucie Ogrodnictwa, było określenie stopnia polimorfizmu sekwencji regionów genomu porzeczki czarnej, zawierających fragmenty Ce i P, znane jako sprzężone z odpornością roślin na wielkopąkowca porzeczkowego.

Badania przeprowadzono na roślinach 12 genotypów z rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności na *C. ribis*. Polimorfizm DNA określono dla fragmentów genomu uzyskanych w wyniku amplifikacji z oligonukleotydami komplementarnymi do 10 sekwencji mikrosatelitarnych w obrębie grup sprzężeń LG2 i LG4, opisanych na dostępnych mapach genetycznych *Ribes*. Do oceny stopnia polimorfizmu zastosowano wstępnie metodę CAPS-PCR (endonukleazy: *EcoRI*, *SmaI*, *HaeIII* i *MboI*), a następnie sekwencjonowanie (CEQ 8000 Beckman Coulter). Dla 26 uzyskanych odczytów, wskazujących na najwyższy stopień zróżnicowania sekwencji, zaprojektowano specyficzne startery SCAR. Trwa weryfikacja przydatności potencjalnych markerów do selekcji genotypów z rodzaju *Ribes* pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego.

Wyniki uzyskane w ramach projektu MRiRW - Badania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja: HOR hn-801-6/16_78

Poster prezentowany podczas Ogólnopolskiej Ogrodniczej Konferencji Naukowej „Ziemia, Roślina, Człowiek”, Kraków, 20-21 września 2017 r. Prezentowane wyniki dotyczą tematu badawczego 2 realizowanego w 2016 r. (Sprawozdanie merytoryczne 2016 r.; str. 13-25).



OCENA STOPNIA POLIMORFIZMU REGIONÓW GENOMU PORZECZKI CZARNEJ (*RIBES NIGRUM*) SPRZEŻONYCH Z JEJ ODPORNOŚCIĄ NA WIELKOPĄKOWCA PORZECZKOWGO

Bogumiła Badek, Małgorzata Korbin, Stanisław Pluta
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Badania finansowane przez MRiRW w ramach Postępu Biologicznego, Zadanie 78

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*) jest najgroźniejszym szkodnikiem czarnej porzeczki, zasiedlającym większość uprawianych odmian tego gatunku. Szczególnie ten jest również wektorem wirusa rewersji porzeczki czarnej *Blackcurrant reversion virus* (BRV), będącego sprawcą uszkodzeń roślin, prowadzących do zamierania plantacji. Hodowcy porzeczki od lat poszukują odmian charakteryzujących się odpornością na *C. ribis*/BRV, jak również precyzyjnych narzędzi umożliwiających szybką identyfikację i wyeliminowanie z procesu hodowlanego genotypów wrażliwych. Celem naszych badań jest poszukiwanie fragmentów genomu różnicujących genotypy wrażliwe i odporne na *C. ribis*.

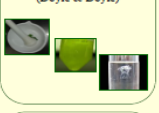
MATERIAL

METODY

**12 GENOTYPÓW
RIBES :**


'Ores', 'Ceres', 'Polares', 'Vir', 'Foxendown', 'Ben Finlay', 'Ben Hope', 'Bona', 'Gofert', 'Gohubka', 'Ojebyn', 'Rjasnaja'

**EKSTRAKCCJA
DNA**
(Doyle & Doyle)

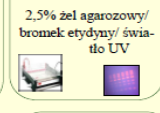


**REAKCJA
SSR-PCR**
10 STARTERÓW SSR
baza danych mapo-
wych
(Brennan *et al.* 2008,
Mazaikine *et al.* 2012)

**REAKCJA
CAPS-PCR**
4 ENZYMY
RESTRYKCYJNE:
EcoRI, *SmaI*, *HaeIII*,
MboI



**WIZUALIZACJA
PRODUKTÓW
PCR**
2,5% żel agarozowy/
bromek etydyny/ swia-
tło UV




**IZOLACJA
FRAGMENTÓW
DNA**
Z ŻELU AGAROZOWEGO
FastGene Gel/ PCR
Extraction Kit
(Nippon Genetics)

**KLONOWANIE
DO
PLAZMIDÓW
BAKTERYJ-
NYCH**
TOPO®/TA Cloning®
Kit for Sequencing,
Invitrogen

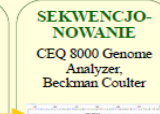
**PLAZMIDY
W KOMPE-
TENTNYCH
BAKTERIACH
*E. coli***
One shot TOP10,
Invitrogen

**SELEKCJA
I NAMNAŻANIE
BAKTERII**



**IZOLACJA
PLAZMIDU
BAKTERYJNEGO**
FastGene
Plasmid Mini Kit,
Nippon Genetics

**SEKWENCJO-
NOWANIE**
CEQ 8000 Genome
Analyzer,
Beckman Coulter

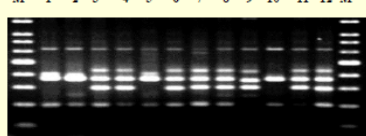


**PROJEKTOWANIE
SPECY-
FICZNYCH OLI-
GONUKLEOTY-
DÓW**
PrimerSelect –
Lasergen v.7

**WERYFIKACJA
MARKERÓW DO
SELEKCJI**

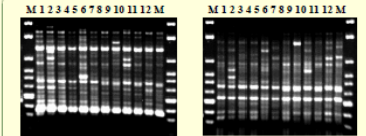
WYNIKI

REAKCJA SSR-PCR




Rys. 1. Przykład wzorów DNA analizowanych genotypów rodzaju *Ribes*, uzyskane w reakcji amplifikacji ze starterem g1-B02F/ g1-G06R; (M-marker wielkości, 1-'Ores', 2-'Ceres', 3-'Polares', 4-'Foxendown', 5-'Vir', 6-'Ben Finlay', 7-'Ben Hope', 8-'Bona', 9-'Gofert', 10-'Gohubka', 11-'Ojebyn', 12-'Rjasnaja').

REAKCJA CAPS-PCR



Rys. 2. Przykłady elektroforegramów produktów amplifikacji fragmentów DNA analizowanych genotypów rodzaju *Ribes* ze starterem g1-G06F/ g2-J08R trawionych endonukleazami: A) *EcoRI*; B) *HaeIII*; (M-marker wielkości, 1-'Ores', 2-'Ceres', 3-'Polares', 4-'Foxendown', 5-'Vir', 6-'Ben Finlay', 7-'Ben Hope', 8-'Bona', 9-'Gofert', 10-'Gohubka', 11-'Ojebyn', 12-'Rjasnaja').

**PRODUKTY REAKCJI CAPS-PCR
PRZYTOTOWANE DO WYCINANIA
Z ŻELU AGAROZOWEGO**



Rys. 3. Przykłady elektroforegramów produktów amplifikacji fragmentów DNA genotypów rodzaju *Ribes* odpornych na wielkopąkowiec porzeczkowca ze A) starterem g1-G06F/ g2-J08R trawionych endonukleazą *EcoRI* i B) g1-B02F/g2-J08R trawionych endonukleazą *EcoRI* (M-marker wielkości, 1-'Ores', 2-'Ceres', 3-'Polares', 4-'Foxendown', 5-'Vir', 6-'Ben Finlay').

SEKWENCJONOWANIE

Tab. 1. Fragment wykazu specyficznych sekwencji (26 specyficznych odczytów).

Lp.	Nazwa sekwencji	Pochodzenie / Genotyp	Starter/ Enzym	Wielkość zsekwenconowanego fragmentu DNA [pz]
1.	Seq.18	'Ores'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>EcoRI</i>	296
2.	Seq.19	'Ceres'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>EcoRI</i>	281
3.	Seq.20	'Polares'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>EcoRI</i>	292
4.	Seq.21	'Foxendown'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>EcoRI</i>	295
5.	Seq.22	'Vir'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>EcoRI</i>	288
6-25.
26.	Seq.43	'Rjasnaja'	g1-B02F/g2-J08R/ <i>EcoRI</i>	128

GGGGCCAAATTGATTAGCGCCCGCAAT-
TCGCCCTTAGCCCAAGCCCATATTCAGAAG
AATTTTGGGTTTATTCTTTAAAGATCAAG
AATTAACACCTCAAAGTAACATCGATGAA
TGTAAGAGCGGTAGACTTACCTTATTTAGG
AAGCTTCTGCTGATGACTTCGAAAAT
TGAAGAAAAAATCTCTACTCTCTCGGGT
TGCTCTTCTCGGTGACGACGGCTACTTAG
CTGCTCACTGGCAGTTTCTGCTGCTGCT
GAGGTAGTGTCTGGCCGAGAAGAAAAAGG
GGGGTGAAGATGCTGTTTAAAGGGGGA
ATTCTTTAAACCTCGAGGACTAGTCCCTT
TAGTAGCGGTTAATTCGAGCTTGGCCATA
TCATGCTCATAAGCCCTGCTTTCGGCT
CGGGGAGCGGTATCAGCTTCACTCAAAGG
CGTAATACGGTTATCACAGAATCAGGGG

Rys. 4. Przykład uzyskanej sekwencji: Seq.30 - sekwencja uzyskana w reakcji z kombinacją starterów g1-G06F x g2-J08R / *EcoRI* na matrycy DNA odmiany 'Ceres' (472 pz)

Tab. 2. Fragment wykazu sekwencji oligonukleotydów specyficznych.

Lp.	Nazwa	Forward	Reverse
1.	2.18	agggcaggctggaacaggagag	tggcggagcggctatgac
2.	2.19	cgctctcccccacacttac	gatcggctggcctctctgtat
3.	2.20	gtttccaccctctgactga	ggggagagcggcttgcgtattg
4.	2.21	caattgcccatagtgatgta	catttcgggtgctgaga
5.	2.22	ctggcgaatagcgaagag	ggagaccgcacactgg
6-25.
26.	2.43	ctaggatgagcggcgaagagag	ggttgacctggtgtct

LITERATURA

1. Brennan, R., Jorgensen, L., Hackett, C., Woodhead, M., Gordon, S., Russell, J. 2008. The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits. *Euphytica*, 161, 19-34.
2. Doyle, J. J., Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.
3. Mazaikene, I., Bendokas, V., Stanys, V., Siksnianas, T. 2012. Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant. *Plant Breeding*, 131, 762-766.