

ZADANIE 50

Analiza fenotypowa i molekularna wybranej populacji segregującej jabłoni dla wytworzenia genotypów o czerwonej barwie miąższu i zwiększonej odporności na zarazę ogniową

POSTĘP BIOLOGICZNY
Okres realizacji – 2021

KIEROWNIK ZADANIA 50

dr inż. Mariusz Lewandowski

e-mail: Mariusz.Lewandowski@inhort.pl

Wykonawcy: dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, dr hab. Stanisław Pluta, dr hab. Agnieszka Masny, dr Anita Kuras, dr Marek Szymajda, dr Łukasz Seliga, dr Paweł Bielicki, Krzysztof Strojny, Jolanta Kubik, Ilona Skiba, Agnieszka Walencik, Krystyna Strączyńska, Renata Czarnecka, Bogusława Idczak, Agnes Zmarlickine Laszlovszky, Katarzyna Skrzeczkowska, Igor Stankiewicz

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice



CELE PROJEKTU

- ✓ **Ocena możliwości skrzyżowania wybranych genotypów jabłoni ('Trinity' i 'Free Redstar') w oparciu o wykonanie zaplanowanej kombinacji zapyleń dla uzyskania mieszańców pokolenia F_1 o czerwonej barwie miąższu i zwiększonej odporności na zarazę ogniową. (*temat badawczy 1*)**
- ✓ **Ocena stopnia polimorfizmu DNA form rodzicielskich ('Trinity' i 'Free Redstar') zróżnicowanych pod względem barwy miąższu owoców, wykorzystanych w programie krzyżowań. (*temat badawczy 2*)**

Tematy zostały w pełni zrealizowane, a cele osiągnięte.

MATERIAŁY I METODY

1. Krzyżowanie – 2 form rodzicielskich:

- ✓ forma mateczna – 1. **'TRINITY'** – czerwona barwa miąższu
- ✓ forma ojcowska – 2. **'FREE REDSTAR'** – biała barwa miąższu, donor cech odporności na parcha jabłoni, mączniaka jabłoni i zarazę ogniową

2. Materiał do badań – 696 siewek pokolenia F₁ (produkcja szklarniowo-tunelowa)

3. Stopień polimorfizmu (heterozygotyczności) form rodzicielskich – **'TRINITY'**, **'FREE REDSTAR'** – (po 10 roślin na genotyp), 100 oligonukleotydów (baza SSRApple Database www.hidras.unimi.it, www.rosaceae.org)

4. Biblioteka polimorficznych fragmentów DNA różnicujących mieszańce wytworzone z kombinacji krzyżowań **'TRINITY'** x **'FREE REDSTAR'** oraz analiza dystansu genetycznego UPGMA (program XLStat 2000)

5. Markery molekularne dla sporządzenia mapy genetycznej – zastosowanie testów SSR-PCR do oceny segregacji zidentyfikowanych polimorficznych alleli markerów mikrosatelitarnych

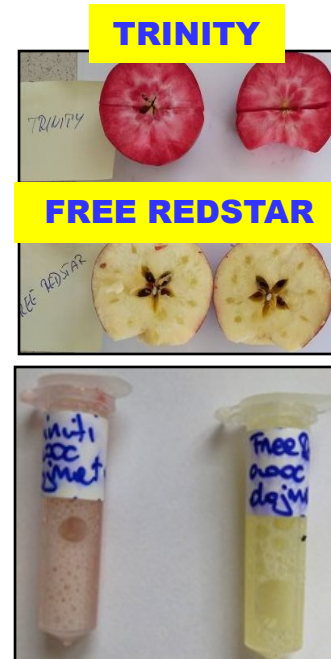
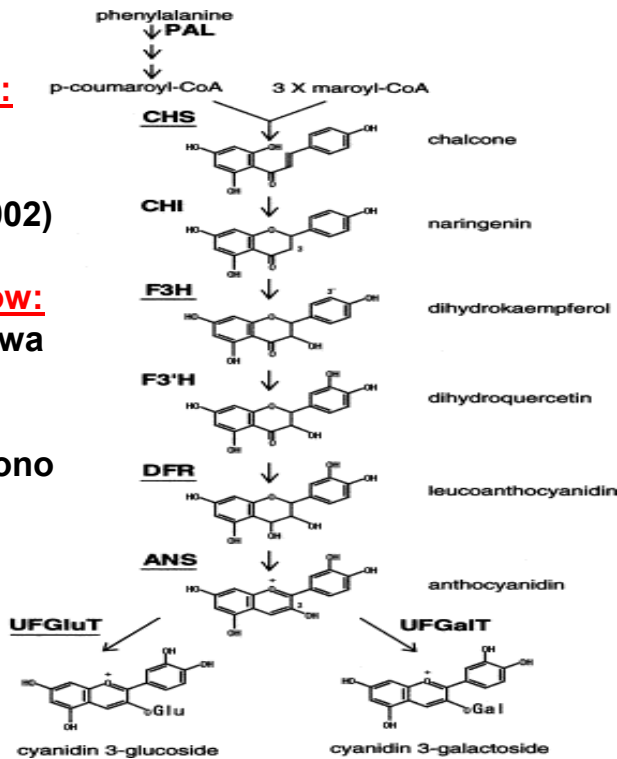


MATERIAŁY I METODY

6. Markery molekularne do wstępnej oceny profilu ekspresji genów związanych z barwą miększu owoców

- sekwencje genów:** szlaki metaboliczne, bazy danych, literatura (Kondo i in. 2002)

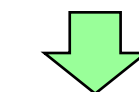
- wytypowano 5 genów:**
 - CHS:** syntaza chalkonowa
 - F3H:** flawono 3-hydroksylaza,
 - DFR:** dihydroksylo flawono 4-hydroksylaza,
 - ANS:** syntaza antocyjanidyny,
 - UFGluT:** 3-glukozyd cyjanidyny



Izolacja RNA



odwrotna transkrypcja do cDNA
(Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit)



qPCR

Nazwa oligo	Sekwencja 5'	Sekwencja 3'
MdANS	caatttggcctcaaacacct	tgagcttcaacaccaagtgc
UFGluT	cggaaacttggactcggtaa	gatggagcctcttgcttgc
pDFR	gagtccgaatccgtttgtgtca	atgtttgtgggggctgtcgatg
pUFGluT	tcccttcactagccatgcaag	gtggaggatggagttttacc
MdF3H	ggatgaactcaaacagcagca	ccactttggctttctccaag
MdCHS ref.	accacttggctctttgcac	actaggccctcggaaggtaa

WYNIKI

- ✓ Zapylenia poprzedzono zebraniem pyłku odmiany 'Free Redstar' oraz kastracją i izolacją kwiatów odmiany 'Trinity'. Łącznie wykastrowano i zapyłono 220 kwiatów, uzyskano 161 owoców wydobyto 1 062 nasiona.
- ✓ Nasiona odkażono 0,5% roztworem fungicydu Aliette 80 WG (poprzez zamoczenie na 48 godz.) i poddano stratyfikacji polegającej na umieszczeniu ich w wilgotnym płukanym piasku w perforowanej torebce foliowej i przetrzymywaniu w chłodziarce w temperaturze około +5°C.



WYNIKI

- ✓ Kiełkujące nasiona sukcesywnie wyjmowano z piasku i wysadzano pojedynczo (1 nasiono do 1 doniczki) do małych doniczek plastikowych o wymiarach 7 x 7 cm, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku w stosunku objętościowym 1:1:1. Doniczki z umieszczonymi nasionami ustawiano na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień +22°C, noc +18°C), pod sztucznym doświetlaniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia.

- ✓ Siewki (696 szt.) po uzyskaniu stadium 2-3 liści właściwych (10-15 cm) przesadzono z małych doniczek plastikowych do 5-litrowych pojemników foliowych (cylindrów), napełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego) i ziemi kompostowej (w proporcji 1:1) i ustawiono na ziemi, wyłożonej czarną folią ogrodniczą i białą agrotkaniną (aby zabezpieczyć siewki jabłoni przed chorobami odglebowymi i chwastami) w wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym, bez dodatkowego doświetlania.



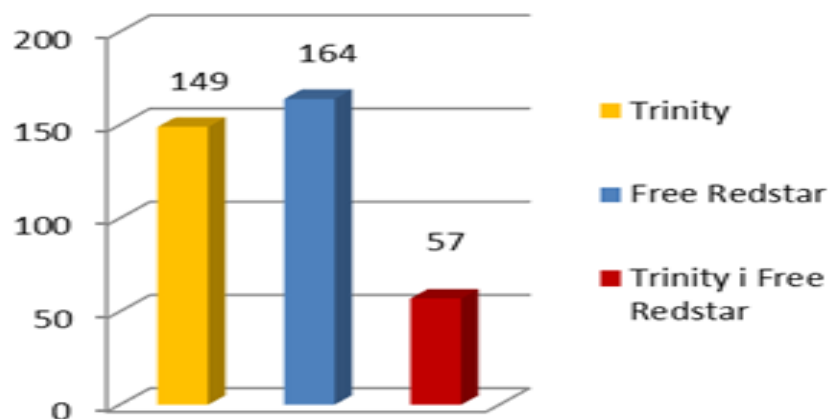
WYNIKI

Analiza poziomu heterozygotyczności (DNA) genomów odmian 'Trinity' i 'Free Redstar' - SSR-PCR

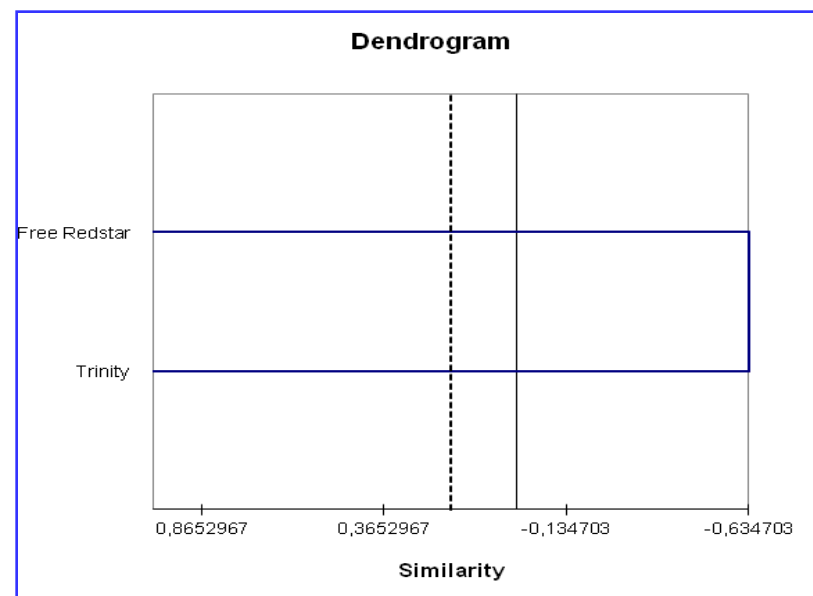
Polimorfizm: **256** fragmentów DNA
199 sekwencji różnicujących



Liczba zidentyfikowanych fragmentów DNA



Analiza dystansu genetycznego obu odmian

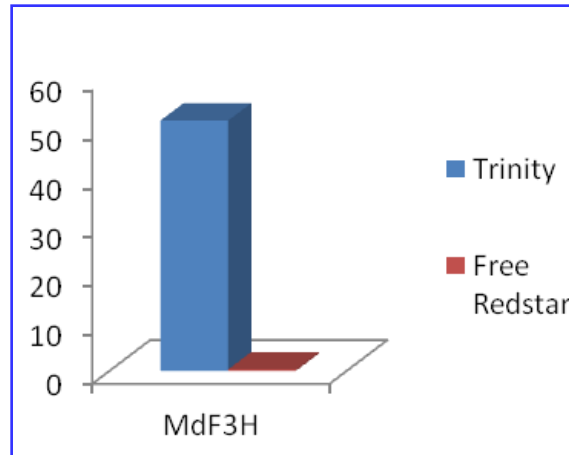
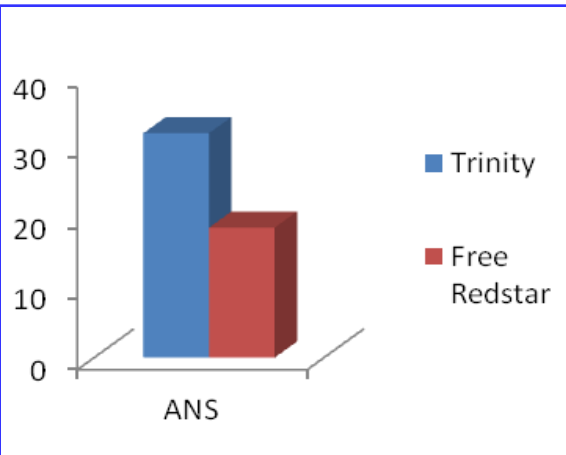


Stopień polimorfizmu 'Trinity' - 58%
'Free Redstar' - 64%

Dystans genetyczny pomiędzy 'Trinity'
a 'FreeRedstar' - **63,5%**.

WYNIKI

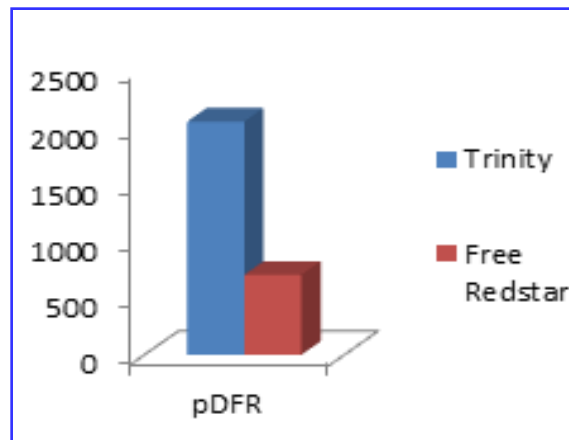
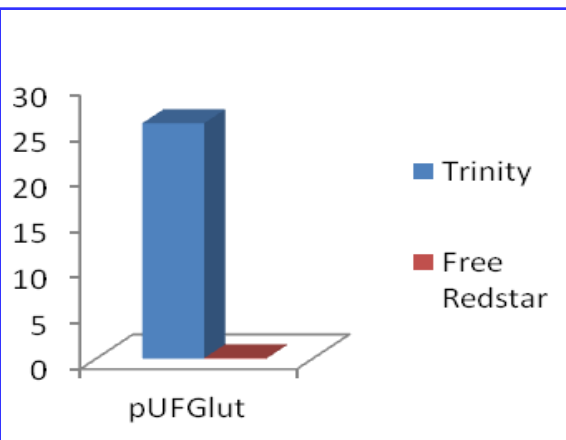
Rozpoznanie poziomu aktywności genów zidentyfikowanych w genomach odmian 'Trinity' i 'Free Redstar', zróżnicowanych pod kątem barwy miąższu owoców



➤ Wszystkie wytypowane geny aktywne w genomie 'Trinity'.

➤ Dla genu **pDFR** – 100-krotnie, a dla **ANS** – 2-krotnie większa ilość transkryptu odnotowano u odmiany 'Trinity'.

➤ Mała aktywność genów **MdF3H** i **pUFGlut** w owocach odmiany 'Free Redstar'.



➤ Dla genu **CHS** nie odnotowano oczekiwanej ilości transkryptu w odniesieniu do genu ref. - co uniemożliwiło analizę.

WNIOSKI

- ✓ **Długość okresu stratyfikacji nasion w rodzinach mieszańców jest zmienna i zależy przede wszystkim od genotypu krzyżowanych form rodzicielskich, a także warunków przebiegu wegetacji w okresie formowania się i dojrzewania nasion, pory zbioru owoców (ich dojrzałości), pory wydobywania nasion z miąższu oraz warunków stratyfikacji (rodzaj podłoża, wilgotność i temperatura).**
- ✓ **Silny wzrost siewek można uzyskać uprawiając je w pojemnikach, np. w cylindrach foliowych ustawionych pod osłonami, w nieogrzewanych wysokich tunelach foliowych. Zaletą produkcji siewek jabłoni w pojemnikach jest znaczne skrócenie ich okresu juwenilnego. W takich warunkach, w ciągu jednego roku uprawy, pędy przewodnikowe siewek uzyskują wysokość nawet ponad 2 m. Po naszczeniu wierzchołków takich pędów na podkładkę karłową uzyskuje się drzewka, które w dużym procencie zakwitną i zaowocują już w następnym roku po posadzeniu w polu.**
- ✓ **Wytypowane do badań ‘Trinity’ (reprezentuje odmianę czerwono-miąszową) oraz ‘Free Redstar’ (reprezentuje odmianę o białym wybarwieniu miąższu jabłek) wykazały wysoki stopień heterozygotyczności pod względem liczby zidentyfikowanych alleli markerów SSR, jak również pod względem aktywności genów związanych z regulacją szlaków syntezy antocyjanów. Obie odmiany, włączone do programów krzyżowań, stanowić mogą cenne źródło genów oraz ich alleli uczestniczących w regulacji cechy barwy miąższu owoców.**