

## **Zadanie 71 Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego i poprawy jakości owoców**

W roku 2015 badania prowadzono w ramach 2 tematów badawczych:

### ***Temat badawczy 1***

Ocena możliwości skrzyżowania w układzie czynnikowym 11 genotypów jabłoni w oparciu o wykonanie 28 kombinacji zapyleń dla uzyskania mieszańców pokolenia F<sub>1</sub> oraz ich ocena fenotypowa

Celem badań była ocena możliwości skrzyżowania wybranych genotypów jabłoni dla uzyskania populacji siewek (pokolenia F<sub>1</sub>), o krótkim okresie juwenilnym i wysokiej jakości owoców. Przedmiotem badań były rośliny 11 genotypów jabłoni, które skrzyżowano w układzie czynnikowym (4♀ x 7♂). Genotypami matecznymi były: 'Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium' (odmiany o krótkim okresie juwenilnym), a genotypami ojcowskimi były: 'Glogierówka', 'Kronselka', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa' (odmiany "stare", dzisiaj już nie uprawiane w Polsce, ale znane ze specyficznego, unikalnego smaku owoców). Odmiany 'Free Redstar' i 'Gold Milenium' są ponadto donorami cech odporności na parcha jabłoni i małej podatności na mączniaka jabłoni, a odmiana 'Free Redstar' jest także donorem małej podatności na zarazę ogniową. Wykonano 28 kombinacji krzyżowań, zapylono 3.200 kwiatów, uzyskano 831 owoców, z których wydobyto 6.053 nasion. Uzyskane 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. Łącznie wyprodukowano 4.835 siewek, czyli 79,9 % w stosunku do liczby wysianych nasion. Tak dobry wynik udało się uzyskać dzięki sprzyjającym warunkom pogodowym wiosną w trakcie wykonywania programu krzyżowań (brak przymrozków wiosennych).

Siewki z programu krzyżowań wykonanego w roku 2014, 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 w wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym, bez dodatkowego doświetlania. W trakcie uprawy wszystkich siewek do podłoża w pojemnikach dodawano nawozy mineralne (Osmocote w ilości 20 g na cylinder) oraz wstawiano paliki bambusowe do cylindrów i przywiązywano do nich pędy przewodnikowe siewek, aby zapobiec ich przewracaniu się, wyłamywaniu i niewłaściwemu wzrostowi. W okresie wegetacji wykonywano także pielęgnację posadzonych siewek, uszczykiwano pędy boczne oraz niszczo chwasty w cylindrach. Nawadnianie roślin prowadzono systemem kropłowym, sterowanym automatycznie. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych. Ocenę fenotypową prowadzono w warunkach tunelowych. Dla każdej rośliny/siewki wykonano ocenę siły wzrostu wyrażoną średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm) po zakończeniu wegetacji roślin (październik).

### ***Temat badawczy 2***

Sporządzenie 'szkieletu' mapy genetycznej genomów odmian 'Free Redstar' oraz 'Oliwka Żółta', reprezentujących wysoki stopień polimorfizmu genetycznego oraz istotnie różniących się długością fazy juwenilnej

Materiał do badań stanowiły młode liście pobrane łącznie z 200 roślin/siewek/genotypów potomnych 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta' (w tym 98 genotypów o potwierdzonym statusie genetycznym mieszańca, uzyskanych w roku 2014 oraz 102 siewki uzyskane w programie krzyżowań 2015) oraz genotypy form rodzicielskich. Genomowe DNA wyizolowano z młodych liści metodą opisaną przez Aldrich'a i Culis'a (1993). Czystość preparatów i koncentrację DNA w próbkach określano po elektroforetycznym rozdziale w 1% żelu

agarozowym w obecności DNA faga lambda (Invitrogen) o znanych koncentracjach oraz spektrofotometrycznie (GenQuant<sup>pro</sup>). Próbkę przechowywano w temperaturze -20°C do chwili rozpoczęcia analiz molekularnych. Do analizy segregujących w populacji mapującej alleli mikrosatelitarnych użyto 50 oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji z dostępnej bazy SSRApple Database ([www.hidras.unimi.it](http://www.hidras.unimi.it)). Do badań wprowadzono startery komplementarne do sekwencji flankujących chromosomy V, XIV i XVI z opublikowanej zintegrowanej mapy referencyjnej genomu *Malus x domestica*. Do amplifikacji fragmentów SSR i identyfikacji alleli polimorficznych, segregujących w populacji mapującej, użyto zarówno nieznakowane jak i wyznakowane (WelRed, Sigma) oligonukleotydy. W przypadku wprowadzenia do reakcji oligonukleotydów nieznakowanych wzory prążkowe uzyskane dla poszczególnych genotypów potomnych oraz form rodzicielskich analizowano w świetle białym po rozdiale elektroforetycznym w 7% żelach poliakrylamidowych w obecności markera wielkości molekularnych 100bp (Axygen). Żele te wybarwiano roztworem azotanu srebra (1g/L). Natomiast w przypadku zastosowania w reakcji PCR oligonukleotydów znakowanych, detekcję produktów amplifikacji prowadzono przy użyciu systemu CEQ 8000 (Genomic Analysis System, Beckman Coulter), a wielkości molekularne fragmentów DNA obliczano za pomocą programu komputerowego CEQ 8000 Software v.5.0. Analizę segregacji zidentyfikowanych alleli SSR w badanej populacji mapującej przeprowadzono przy użyciu programu JoinMap v. 3.0. Odległości mapowe (cM) pomiędzy wprowadzonymi na mapę markerami określono przy zastosowaniu funkcji *Kosambi*. Sprzężenia pomiędzy badanymi markerami weryfikowano za pomocą współczynnika wartości krytycznej LOD (*Logarithm Odd Ratio*; próg wartości LOD  $\geq 3$ ), maksymalnego prawdopodobieństwa ML (*Maximum Likelihood*) oraz oceny zależności pomiędzy rzeczywistym a oczekiwanym (teoretycznym) rozkładem genotypów w populacji segregującej (test CHI-KWARAT:  $X^2$ ). Częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami w badanej populacji mapującej oszacowana została przy użyciu współczynnika REC  $\leq 50$  (JoinMap v.3.0). Do graficznego przedstawienia mapy genetycznej wykorzystano program Map Chart 2.0. Analiza reakcji przeprowadzonych na matrycach DNA 102 siewek potomnych, uzyskanych w 2015 roku z oligonukleotydami komplementarnymi do sekwencji mikrosatelitarnych genomu jabłoni wykazała, że wszystkie badane genotypy są mieszańcami z planowanego zapyleń. W badanej populacji 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta' nie odnotowano genotypów pochodzących z niekontrolowanych zapyleń. Dla dwudziestu sześciu spośród 50 wytypowanych do badań potencjalnych markerów SSR zidentyfikowano 57 alleli polimorficznych. Osiemnaście alleli segregujących w populacji mapującej pochodziło z genomu odmiany 'Free Redstar', dwadzieścia pięć - z genomu odmiany 'Oliwka Żółta', a pięć - z genomów obu genotypów rodzicielskich. Wielkość zmapowanego genomu odmiany 'Free Redstar' wyniosła 366 cM (cztery grupy sprzężeń), natomiast genomu odmiany 'Oliwka Żółta' – 381 cM (trzy grupy sprzężeń). W celu określenia poziomu homologii zmapowanych fragmentów genomów badanych odmian jabłoni z referencyjnym genomem gatunku *Malus* sporządzono zintegrowaną mapę genetyczną 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta'. Na mapie tej przedstawiono specyficzne loci określone dla 48 alleli polimorficznych segregujących w populacji mapującej, a podczas analizy porównawczej z mapami genetycznymi innych genomów jabłoni (uznanych z referencyjne) ustalono ich przynależność do poszczególnych chromosomów/grup sprzężeń. Duplikacje loci alleli zaobserwowano dla 6 markerów SSR. Jednocześnie zaobserwowano, że loci oraz kolejność zidentyfikowanych alleli wprowadzonych na mapę markerów SSR nieznacznie różniły się w porównaniu do loci tych samych markerów zlokalizowanych na mapach referencyjnych. Na obecnym etapie badań uzyskano szkielet mapy dla wybranych chromosomów odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' oraz szkielet zintegrowanej mapy genetycznej, wysyczonej 48 loci markerów SSR i zawierającej sześć grup sprzężeń, wykazujących znaczny stopień konserwatywności z chromosomami XVI, XIV i V genomu *Malus*. Wielkość sporządzonego szkieletu mapy genetycznej, uwzględniającej dane dla obydwu form rodzicielskich, wyniosła 695 cM.