

Zadanie 74 Badania nad saturacją mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria x ananassa*)

W 2015 roku badania realizowano w ramach trzech tematów badawczych:

Temat badawczy 1

Przygotowanie materiału badawczego i badania fenotypowe

Celem badań było pozyskanie kolejnej sub-populacji segregującej 'Elsanta' x 'Senga Sengana', przeznaczonej do analiz molekularnych podczas tworzenia mapy genetycznej truskawki oraz ocena fenotypowa wybranych sub-populacji pod względem podatności roślin na antraknozę, tolerancji na niską temperaturę oraz jakości owoców.

Wyjściową populację mapującą 'Elsanta' x 'Senga Sengana' poszerzono o 100 pojedynków F1 (sub-populacja D), pozyskanych z programu zapyleń 2014/2105. Siewki uzyskane w bieżącym roku poddano ocenie fenotypowej pod względem podatności na antraknozę. Równolegle, pulę siewek pozyskanych w ubiegłym roku i uprawianych w warunkach szklarniowych (sub-populacja B) oceniono pod względem wrażliwości na działanie niskich temperatur. Owoce kolejnej puli siewek z 2014 roku (sub-populacja A), uprawianych w kwaterze polowej, poddane zostały ocenie pod względem stopnia jędrności oraz zawartości ekstraktu i kwasu askorbinowego. Analizy fenotypowe wykazały segregujący rozkład w/w cech w obrębie badanej populacji 'Elsanta' x 'Senga Sengana'.

Temat badawczy 2

Saturacja istniejącej mapy E x SS markerami SSR

Celem badań było zagęszczenie szkieletu mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana'.

Do analiz segregacji w obrębie populacji mapującej wytypowano 100 par starterów mikrosatelitarnych. Zidentyfikowano 226 alleli polimorficznych segregujących w genomach genotypów mieszańcowych. Sto dwadzieścia sześć zidentyfikowanych alleli reprezentowało rozkład mendelowski, natomiast 97 alleli zweryfikowano dodatkowo pod względem typu segregacji, rozkładu i frekwencji rekombinacji. Określono przynależność segregujących markerów do pięciu grup sprzężeń oraz oszacowano odległości mapowe pomiędzy wprowadzonymi na mapę allelami mikrosatelitarnymi. Mapa genetyczna truskawki wzbogacona została o loci 97 alleli. Zmapowany genom obejmuje 5 grup sprzężeń, stanowiących fragmenty siedmiu chromosomów, o łącznej długości 687 cM.

Temat badawczy 3

Określanie położenia markerów cech i regionów QTL na mapie 'Elsanta' x 'Senga Sengana'

Celem badań było: a) potwierdzenie statusu mieszańca F₁ siewek z sub-populacji D oraz wyeliminowanie z dalszych analiz, genotypów pochodzących z niezamierzonych zapyleń; b) oflankowanie i zagęszczenie wytypowanych grup sprzężeń (LG) na mapie genetycznej truskawki.

Status mieszańca z planowanego zapylenia został potwierdzony w testach molekularnych (analiza polimorfizmu DNA po amplifikacji z 5 oligonuleotydami mikrosatelitarnymi) dla wszystkich testowanych pojedynków. W testach SSR przeprowadzonych na poszerzonej populacji mapującej z 30 starterami mikrosatelitarnymi, wybranymi na podstawie danych literaturowych jako sprzężone z cechami jakości owoców i odporności na stropy bio- oraz abiotyczne, zidentyfikowano łącznie 58 alleli różnicujących uprzednio obie formy rodzicielskie, w tym 32 allele w trzech fragmentach genomu odmiany 'Elsanta' oraz 35 alleli w sześciu fragmentach genomu 'Senga Sengana'. Wyodrębnione fragmenty genomu flankują potencjalne regiony obejmujące geny badanych cech.

Informacja o publikacji wyników w 2015 roku

Wyniki uzyskane w roku 2014 zaprezentowane zostały w postaci posterów podczas IV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych we Wrocławiu, 14-16 września 2015 roku:

1. Jęcz T., Strączyńska K., Korbin M. 2015. Ocena populacji truskawki 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod względem podatności na porażenie przez *Verticillium dahliae*. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 14-16 września 2015, Wrocław. (Załącznik 1)
2. Keller-Przybyłkiewicz S., Napiórkowska B., Jęcz T., Korbin M. 2015. Ocena stopnia konserwatywności markerów SSR użytych do mapowania genomu truskawki 'Elsanta' x 'Senga Sengana'. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 14-16 września 2015, Wrocław. (Załącznik 2)

Prezentowane wyniki zamieszczone są w sprawozdaniu merytorycznym z 2014 r. Ad. 1 – temat badawczy 1; Ad. 2 – temat badawczy 3b.

OCENA POPULACJI TRUSKAWKI 'ELSANTA' x 'SENGA SENGANA' POD WZGLĘDEM PODATNOŚCI NA PORAZENIE PRZEZ *VERTICILLIUM DAHLIAE*

Tomasz Jęcz, Krystyna Strączyńska, Małgorzata Korbin

InHort | INSTYTUT OGRÓDNICTWA

Badania finansowane przez MRiRW, w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, zadanie nr 74 „Badania nad saturacją mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria x ananassa*)” 2014

Verticillium dahliae jest patogenem odglebowym, stanowiącym zagrożenie dla roślin wielu gatunków, w tym także dla upraw truskawki (*Fragaria x ananassa*). Wszystkie odmiany truskawki mogą być zakażone przez tego grzyba, jednak poszczególne genotypy różnią się znacznie reakcją na inokulację patogenem. Są wśród nich zarówno rośliny, które zamierają w wyniku porażenia przez *V. dahliae*, jak i genotypy charakteryzujące się pełną tolerancją na wertyciliozę. Rośliny tolerancyjne wykazują zdolność do utrzymania procesów życiowych na niezmiennym poziomie, mimo zainfekowania przez patogena. Dużą grupę stanowią też genotypy *F. x ananassa*, wykazujące objawy choroby wędnięcia o nasileniu pośrednim. Badania genetyczne wykazały, że tak duże zróżnicowanie reakcji roślin na porażenie przez *V. dahliae* jest konsekwencją poligenowego, addytywnego uwarunkowania tolerancji truskawki na wertyciliozę. Rośliny tolerancyjne kumulują w swoim genomie większą liczbę alleli kodujących/ regulujących tę cechę. W efekcie, każdy genotyp uruchamia reakcję obronną w innym stopniu, zależnie od własnego potencjału genetycznego.



Materiał roślinny: rośliny odm. 'Elsanta' (podatna na wertyciliozę) i 'Senga Sengana' (tolerancyjna) oraz 110 mieszańców 'Elsanta' x 'Senga Sengana'.



Siewki populacji 'Elsanta' x 'Senga Sengana' utrzymywane w kontrolowanych warunkach szklarniowych

Inokulację izolatem grzyba BPR424 przeprowadzono w kontrolowanych warunkach szklarniowych wg metody opartej na skracaniu korzeni do 1/3 długości przed ich zanurzeniem w inokulum.



Inokulacja roślin truskawki izolatem *V. dahliae*



Kultura izolatu BPR 424 *V. dahliae*

Inokulum do zakażenia roślin truskawki pozyskiwano poprzez zawieszenie rozdrobnionych mechanicznie kultur *V. dahliae* (wzrastających uprzednio przez 2 tygodnie w temperaturze pokojowej na pożywce mikrobiologicznej) w 100 ml dH₂O. Do inokulacji używano preparatów o stężeniu konidiów 10⁷ ml⁻¹.



Rośliny populacji 'Elsanta' x 'Senga Sengana' utrzymywane w kontrolowanych warunkach szklarniowych po inokulacji

Po 24 h inkubacji w roztworze inokulum rośliny wykładano do doniczek i kontynuowano ich uprawę w szklarni (temperatura 20 - 23°C, długość dnia 16 godzin, wilgotność 60%).

Kontrolę w doświadczeniu stanowiły rośliny nie poddawane inokulacji i ekałeczeniu korzeni oraz rośliny z obcięzonymi korzeniami, zanurzone w wodzie.



Objawy wertyciliozy na roślinach truskawki. Od lewej wg przyjętej skali bonitacyjnej: 0, 2, 4

Obserwacje prowadzono od piątego tygodnia po zabiegu.

Do oceny stopnia porażenia zastosowano pięciostopniową skalę bonitacyjną, w której 0 = brak objawów chorobowych, 4 = zamieranie roślin.

Wyniki:

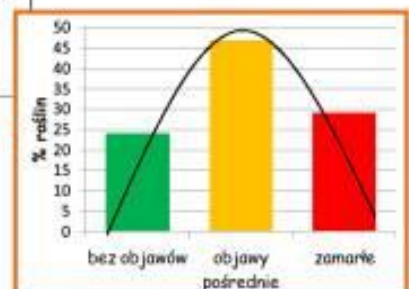
Pierwsze objawy porażenia (wędnięcie najstarszych liści) zaobserwowano na inokulowanych roślinach po 4 tygodniach od zabiegu. Ostateczną ocenę stopnia nasilenia objawów przeprowadzono 8 tyg. po inokulacji. Większość (52 %) roślin wykazało objawy o pośrednim nasileniu (oceny 1-3).



Objawy wertyciliozy na poszczególnych roślinach populacji 'Elsanta' x 'Senga Sengana'

Stopień porażenia	Liczba roślin	% roślin
0	26	24
1	18	16
2	19	17
3	15	14
4	32	29

Rozkład nasilenia objawów wertyciliozy w populacji roślin 'Elsanta' x 'Senga Sengana'



Wnioski:

- Rozkład cechy tolerancji na wertyciliozę w badanej populacji świadczy o segregującym charakterze uzyskanej populacji, co czyni ją cennym źródłem materiału do analiz molekularnych.
- Zastosowana metoda inokulacji stanowi narzędzie przydatne do szybkiej i rzetelnej oceny podatności roślin truskawki na wertyciliozę.

OCENA STOPNIA KONSERWATYWNOŚCI MARKERÓW SSR UŻYTYCH DO MAPOWANIA GENOMU TRUSKAWKI 'ELSANTA' I 'SENGA SENGANA'.



INSTYTUT
OGRODNICTWA

Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Bogusława Napiórkowska, Tomasz Jęcz, Małgorzata Korbin

Truskawka (*Fragaria x ananassa* Duch. ex Rozier) jest allopoliploidem ($2n=8x=56$), którego genom podlegał w trakcie ewolucji poliploidyzacji oraz redukcji liczby chromosomów. W oparciu o badania cytogenetyczne i molekularne opracowano kilka modeli charakteryzujących kompozycję genomów allopoliploidalnych, obejmujących dwa, trzy, bądź nawet cztery rodzaje subgenomów. Taka kompozycja utrudnia przenoszenie informacji z map genomów diploidalnych na oktaploidalne, a także między genomami o tej samej ploidi. Przyjmuje się, że kolinearność regionów genomów dla roślin pochodzących z różnych taksosów może wahać się od 15 do 80%.

W Instytucie Ogródnictwa sporządzony został szkielec mapy genetycznej truskawki 'Elsanta' x 'Senga Sengana' (149 loci markerów SSR, 1450,4 cM) i podjęta próba wyyczenia tej mapy nowymi markerami SSR, opisanymi dla gatunków diploidalnych rodzaju *Fragaria* oraz dla populacji oktaploidów 'Mapi' x 'Redgautflut'. Celem badań była także określenie stopnia uniwersalności analizowanych markerów.

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

Izolacja materiału genetycznego (met. Doyle i Doyle) z form rodzicielskich oraz 200 roślin siewek potomnych 'Elsanta' x 'Senga Sengana'



Ocena czystości genetycznej siewek potomnych (PCR-SSR)

Eliminacja genotypów potomnych pochodzących z niekontrolowanych zapyleń

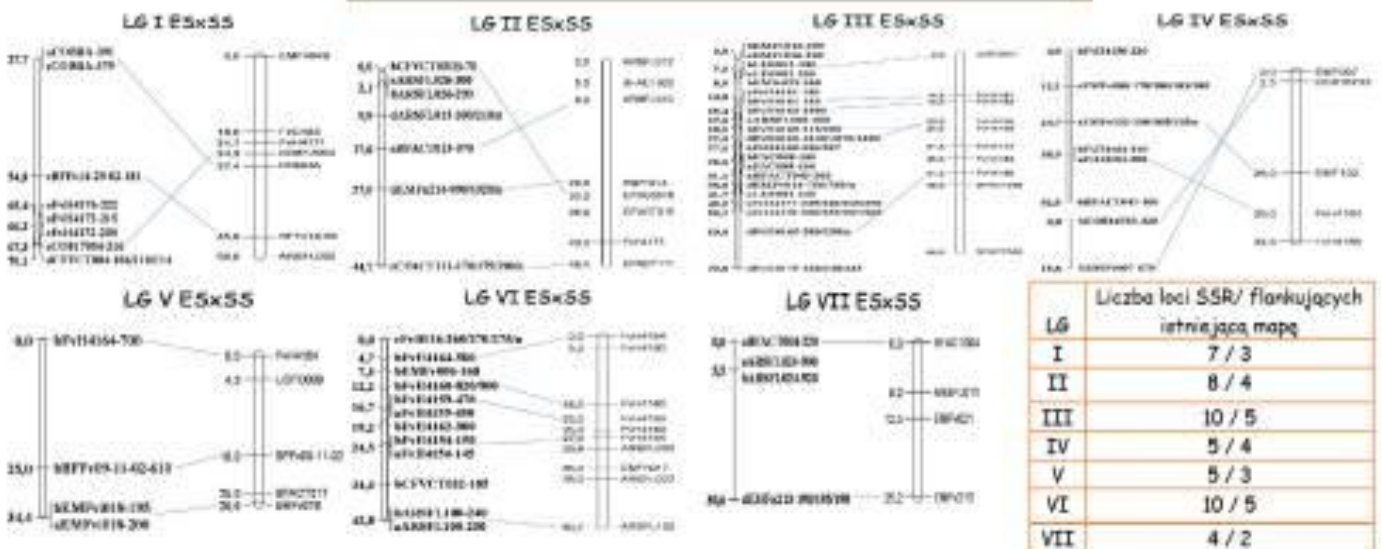
↓ 'outcross' = populacja 199 roślin



ANALIZA POPULACJI I SPORZĄDZANIE MAPY GENETYCZNEJ (PCR-SSR)

1. Szkielec mapy skonstruowano przy użyciu oprogramowania JoinMap v.3.0.
2. Rozkład alleli (odchylenia pomiędzy teoretycznym, mendelowskim i obserwowanym) w populacji weryfikowano testem χ^2 .
3. Przynależność markerów do poszczególnych grup sprzężeń określano na podstawie wartości progu LOD (Logarytm Odd Ratio) > 3.0
4. Odległości mapowe (cM) oszacowano przy użyciu funkcji mapującej Kosambi.
5. Formę graficzną uzyskano korzystając z programu MapChart 2.1.

PORÓWNIANIE MAP 'E'x'SS'



PODSUMOWANIE

1. Wykorzystane markery pozwoliły na sporządzenie szkieletu mapy genetycznej nowej sub-populacji 'Elsanta' x 'Senga Sengana'
2. Markery znajdowały się na chromosomach odpowiadających tym samym LG z mapy referencyjnej
3. Położenie i odległość mapowa zidentyfikowanych loci były inne niż w referencyjnych
4. Kolinearność określano na ok. 50%.

Badania finansowane przez MARR, w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, zadanie nr 74. Badania realizacja mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria x ananassa*) 2014