

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

W roku 2015 badania realizowano w ramach 3 tematów badawczych:

### **Temat badawczy 1**

#### Przygotowanie materiału badawczego do badań molekularnych i fenotypowych

Celem badań było uzupełnienie zróżnicowanej fenotypowo kolekcji *Ribes nigrum* i innych gatunków z rodzaju *Ribes* oraz uprawa w warunkach silnej presji szkodnika mieszańców dwóch populacji ('Ceres' x 'Bona' i 'Polares' x 'Gołubka'). Kolekcję poszerzono o 30 genotypów porzeczeki czarnej (*R. nigrum*), agrestu (*R. glossularia*) i roślin zawierających w rodowodzie *R. nigrum* spp. *sibiricum*. Rośliny te rozmnożono wegetatywnie z sadzonek zielnych/ półdREWNIATYCH, pobranych z roślin matecznych i kolekcji (Sad Pomologiczny w Skierniewicach i Sad Doświadczalny w Dąbrowicach) oraz wysadzono na polu selekcyjnym, w celu naturalnego zasiedlenia przez wielkopąkowca. Kontynuowano uprawę dwóch populacji porzeczeki czarnej, przeznaczonych do badań molekularnych i fenotypowych.

### **Temat badawczy 2**

#### Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczeki czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Celem badań było: a) wydzielenie z genomu grup sprzężeń (LG) potencjalnie związanych z genami/ regionami genomu warunkującymi lub/ i modyfikującymi odporność na wielkopąkowca porzeczkowego oraz b) analiza polimorfizmu genetycznego w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P. Materiał genetyczny do badań molekularnych izolowano z analizowanych roślin metodą wg Doyle i Doyle. W ramach *Tematu badawczego 2a* przeprowadzono 2.250 reakcji z 25 starterami mikrosatelitarnymi (źródło: mapy genetyczne *R. nigrum*). Na podstawie analizy segregacji alleli 25 markerów SSR zidentyfikowanych w genomach 15 genotypów rodzaju *Ribes* wyodrębniono 5 grup sprzężeń (LG1, LG2, LG3, LG4 i LG5)\* odpowiadających grupom z mapy genetycznej opracowanej w Szkocji oraz 4 grupy sprzężeń (LG1, LG2, LG4 i LG6)\*\* odpowiadających grupom z mapy opracowanej na Litwie. Analiza kodów binarnych, przygotowanych na podstawie danych uzyskanych z testów SSR oraz analiza MCA umożliwiła zróżnicowanie genotypów wrażliwych i odpornych na *C. ribis*. W oparciu o analizę korelacji wyników genotypowania oraz fenotypowania wytypowano 3 markery (g2-j08, g2-L17 i RJL-5), zlokalizowane odpowiednio w LG2\*; LG1\*\* i LG4\*; LG2\*, LG2\*\*, charakteryzujące wyłącznie genotypy odporne na *C. ribis*. W drugim etapie badań (*Temat badawczy 2b*) do oceny polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P wprowadzono metodę sekwencjonowania. W badaniach dotyczących sekwencjonowania genomów rodzaju *Ribes* wykorzystano sekwencjator CEQ 8000 Beckman Coulter. Odczytane sekwencje wytypowanych fragmentów genomów rodzaju *Ribes* stanowią będą bazę do opracowania kolejnych markerów sprzężonych z cechą odporności na *C. ribis*, sukcesywnie uzupełnianą w kolejnych latach realizacji projektu, zgodnie z planowanym harmonogramem.

### **Temat badawczy 3**

#### Ocena fenotypowa roślin w warunkach presji szkodnika

W 2015 roku obserwacje charakterystycznych objawów porażenia pąków przez *C. ribis* prowadzono dla dwóch populacji hodowlanych ('Ceres' x 'Bona' i 'Polares' x 'Gołubka') oraz dla *Ribes nigrum* i innych gatunków z rodzaju *Ribes* pochodzących z kolekcji. W przypadku siewek mieszańcowych zaobserwowano obecność pojedynczych, powiększonych pąków na 9 roślinach pochodzących ze skrzyżowania odmian 'Ceres' x 'Bona'. Obserwacje genotypów z kolekcji wykazały słabe zasiedlenie pąków i niski stopień porażenia roślin (8,3 %). Szkodnik zasiedlał przede wszystkim genotypy porzeczeki czarnej. Nie stwierdzono natomiast

symptomów porażenia na roślinach posadzonych wiosną 2015 oraz na roślinach odmian porzeczki czerwonej, agrestu, porzeczkoagrestu i dzikich gatunków *Ribes*.

Wyniki opublikowano w materiałach konferencyjnych:

IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa pt. „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”

Badek Bogumiła, Korbin Małgorzata, Kuras Anita, Keller-Przybyłkiewicz Sylwia, Pluta Stanisław (Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice). 2015. Analiza genomu porzeczki pod kątem markerów odporności na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophysis ribis*). IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa pt. „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”, 14-16 września 2015, Wrocław. Streszczenia prac: 199

Prezentowane wyniki zamieszczone są w sprawozdaniu merytorycznym z 2014 r. Temat badawczy 2. str. 14-18.

Załącznik 1 – Poster

Załącznik 2 – Streszczenie prezentowanych wyników

# ANALIZA GENOMU PORZECZKI POD KĄTEM MARKERÓW ODPORNOŚCI NA WIELKOPĄKOWCA PORZECZKOWEGO (*CECIDOPHYPSIS RIBIS*)

Bogumila Badek, Małgorzata Korbin, Anita Kuras, Sylwia Keller-Przybytkowicz, Stanisław Pluta  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice



## WSTĘP

Badania finansowane przez MRiRW w ramach Postępu Biologicznego, Zadanie 78

Wielkopąkowiec porzeczkowy stanowi ogromne zagrożenie dla uprawy porzeczek czarnej. Szpeciel ten powoduje uszkodzenie i deformacje pąków, skutkujące znaczącym zmniejszeniem plonu. Hodowcy porzeczek czarnej od lat poszukują odmian charakteryzujących się odpornością na *Cecidophypsis ribis* i BRV. Celem prowadzonych badań jest scharakteryzowanie potencjalnych markerów, sprzężonych z odpornością porzeczek czarnej i roślin innych gatunków z rodzaju *Ribes* na wielkopąkowca porzeczkowego.

## MATERIAŁ ROŚLINNY

### 15 ODMIAN RODZAJU *RIBES*:

'Ores', 'Foxendown', 'Josta', 'Ruś',  
'Titania', 'R. janczewski', 'Pax',  
'Polonus', 'Nariadnaja', 'Ojebyn',  
'Dainiai', 'Ben Lomond', 'Riasnaja',  
'Ferliegh', 'Ben Finlay'



## METODY

**IZOLACJA DNA**  
(Doyle & Doyle, 1990)

**AMPLIFIKACJA PCR**

**WIZUALIZACJA PRODUKTÓW PCR**  
(bioanalizator Agilent 2100)

**Startery SSR (25)**  
(baza danych mapowych:  
Brennan i in. 2008; Mazeikiene  
i in. 2012)



### ANALIZA POLIMORFIZMU

- metoda kodów binarnych
- analiza MCA (Multiple Correspond. Analysis)

## WYNIKI

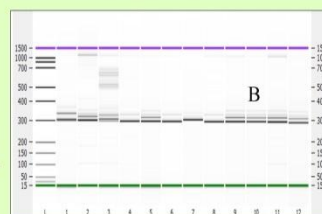
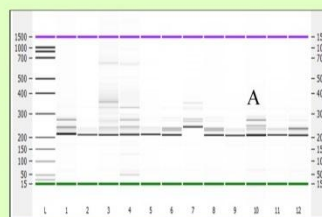
Tab. 1. Fragment tabeli profili genetycznych

| Starter | Genotyp |         |           |          |       |
|---------|---------|---------|-----------|----------|-------|
|         | 'Ores'  | 'Josta' | 'Titania' | 'Ojebyn' | 'Ruś' |
| g2-J08  |         | 160     |           |          |       |
|         | 200     | 200     | 200       | 200      | 200   |
|         | 270     | 270     |           |          | 270   |
|         | 300     |         |           |          |       |
| g2-L17  | 210     | 210     | 210       | 210      | 210   |
|         | 230     | 230     |           |          | 230   |
|         | 240     |         | 240       |          |       |
|         | 270     |         | 270       |          |       |

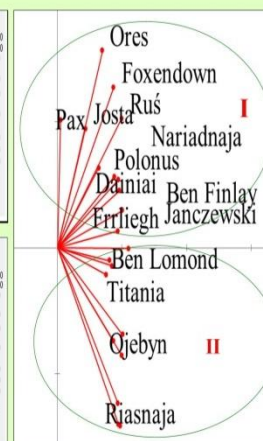
Tab. 2. Długości alleli a (charakterystycznych dla wszystkich analizowanych genotypów) oraz alleli b (charakterystycznych dla genotypów odpornych na wielkopąkowca porzeczkowego)

| Marker             | Allel a (dl. pz) | Allel b (dl. pz) |
|--------------------|------------------|------------------|
| g2-J08/LG2*        | 200              | 270              |
| g2-L17/LG4*, LG1** | 210              | 230              |
| RJL-5LG2*, LG2**   | 150              | 200              |

\*Brennan i in. 2008; \*\*Mazeikiene i in. 2012



Rys. 1. Wzory DNA różniące badane odmiany, uzyskane w reakcji ze starterem g1-A01 (A) i e1-O21 (B); 1-'Ores', 2-'Foxendown', 3-'Josta', 4-'Titania', 5-'R. janczewski', 6-'Ben Finlay', 7-'Pax', 8-'Polonus', 9-'Ben Lomond', 10-'Nariadnaja', 11-'Ojebyn', 12-'Ruś'



Rys. 2. Analiza MCA dla analizowanych genotypów rodzaju *Ribes*

- genotypy odporne
- genotypy wrażliwe

## PODSUMOWANIE:

- Klasy genotypów odpornych i wrażliwych na wielkopąkowca porzeczkowego uzyskane metodą MCA, bazującą na wynikach badań molekularnych, odpowiadają ich pogrupowaniu przeprowadzonemu w oparciu o wyniki oceny odporności polowej badanych odmian.
- W oparciu o analizę segregacji testowanych starterów do dalszych analiz wytypowano 5 grup sprzężeń najprawdopodobniej zawierających geny odpowiedzialne za odporność na wielkopąkowca porzeczkowego.
- Na podstawie korelacji przeprowadzonych analiz genotypowych i fenotypowych można sądzić, że markery g2-J08/LG2\*/270 pz, g2-L17/LG4\*/G1\*\*/230 pz oraz RJL-5LG2\*/LG2\*\*/200 pz są sprzężone z odpornością analizowanych genotypów na wielkopąkowca porzeczkowego.

## LITERATURA

- 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.
- Doyle, J. J., Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Mazeikiene, I., Bendokas, V., Stanys, V., Siksniunas, T. 2012. Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant. *Plant Breeding*, 131, 762-766.

# **ANALIZA GENOMU PORZECZKI POD KĄTEM MARKERÓW ODPORNOŚCI NA WIELKOPĄKOWCA PORZECZKOWEGO (*CECIDOPHYPSIS RIBIS*)**

**Bogumiła Badek, Małgorzata Korbin, Anita Kuras, Sylwia Keller-Przybylkowicz, Stanisław Pluta**

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

E-mail: [Bogumila.Badek@inhort.pl](mailto:Bogumila.Badek@inhort.pl)

Wielkopąkowiec porzeczkowy stanowi ogromne zagrożenie dla uprawy porzeczki czarnej. Szpeciel ten powoduje uszkodzenie i deformacje pąków, skutkujące znaczącym zmniejszeniem plonu. Hodowcy porzeczki czarnej od lat poszukują odmian charakteryzujących się odpornością na *C. ribis* i *BRV*. Celem prowadzonych badań jest scharakteryzowanie potencjalnych markerów, sprzężonych z odpornością porzeczki czarnej i roślin innych gatunków rodzaju *Ribes* na wielkopąkowca porzeczkowego. Badania przeprowadzono na DNA wyekstrahowanym z młodych liści 15 odmian porzeczki czarnej i roślin innych gatunków rodzaju *Ribes* (kolekcja polowa Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach). Na matrycy wydzielonego DNA przeprowadzono reakcję z 25 starterami mikrosatelitarnymi, wytypowanymi do badań w oparciu o bazy danych mapowych opracowany przez zespół szkocki i litewski.

Wieloczynnikowa analiza MCA przeprowadzona w oparciu o uzyskane wyniki obrazujące polimorfizm DNA badanych genotypów oraz w oparciu o dane literaturowe, dotyczące odporności badanych roślin na *C. ribis* w różnych warunkach uprawy, potwierdziła zgrupowanie odpornych na wielkopąkowca porzeczkowego genotypów *Ribes* ('Ceres', 'Polares', 'Ores', 'Foxendown', 'Josta', 'R. Janczewski', 'Ben Finlay', 'Pax', 'Polonus', 'Nariadnaja', 'Ruś' i 'Dainiai'). Analiza segregacji 25 markerów SSR pozwoliła na wyodrębnienie wśród badanych genotypów 5 grup sprzężeń: LG1, LG2, LG3, LG4 i LG5 (mapa szkocka) oraz 3 grup sprzężeń: LG1, LG2 i LG4 (mapa litewska).

Na podstawie analizy korelacji wyników genotypowania oraz wyników oceny fenotypowej (dane literaturowe) sformułowano hipotezę, że markery: g2-j08/ LG2<sup>\*</sup>/ 270 pz; g2-L17/ LG1<sup>\*\*</sup> i LG4<sup>\*</sup>/ 230 pz oraz R JL-5/ LG2<sup>\*</sup>, LG2<sup>\*\*</sup>/ 200 pz mogą być sprzężone z odpornością analizowanych genotypów na wielkopąkowca porzeczkowego.