

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

W roku 2016 badania prowadzono w ramach 2 tematów badawczych:

Temat badawczy 1

Ocena fenotypowa populacji siewek pokolenia F₁ dla uzyskania mieszańców o krótkim okresie juvenilnym i wysokiej jakości owoców oraz przygotowanie materiału roślinnego do założenia doświadczenia polowego

Celem badań była ocena fenotypowa populacji siewek (pokolenia F₁) dla uzyskania mieszańców o krótkim okresie juvenilnym i wysokiej jakości owoców oraz przygotowanie materiału roślinnego do założenia doświadczenia polowego.

W roku 2016 siewki z programu krzyżowań wykonanego w roku 2015, po uzyskaniu stadium 2-3 liści właściwych (10-15 cm, uprawa w szklarni do kwietnia 2016 r.) 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 sukcesywnie wstawiano paliki bambusowe do cylindrów i przywiązywano do nich pędy przewodnikowe siewek, aby zapobiec ich przewracaniu się, wyłamaniu i niewłaściwemu wzrostowi. W okresie wegetacji wykonywano także pielęgnację posadzonych siewek, uszczykiwano pędy boczne oraz niszczone chwasty w cylindrach. Nawadnianie roślin prowadzono systemem kropłowym, sterowanym automatycznie. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych. W roku 2016 ocenę fenotypową prowadzono w warunkach tunelowych. Dla każdej rośliny/siewki (28 kombinacji krzyżowań x 100 siewek (4 powtórzenia po 25 roślin) = 2.800 siewek) wykonano ocenę siły wzrostu wyrażoną średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm) po zakończeniu wegetacji roślin (październik).

Na przełomie stycznia/ lutego 2016 pobrano zrazy z wierzchołków pędów przewodnikowych siewek (z programu krzyżowań wykonanego w roku 2014: 28 kombinacji krzyżowań x 100 siewek (4 powtórzenia po 25 roślin) = 2.800 siewek) w celu naszczenia ich na karłowej podkładce M.9. Podkładka M.9 (posiadająca status "virus free", wybór I, średnica 8-10 mm) do szczepienia zimowego "w ręku" pochodziła z matecznika Ośrodka Elitarnego Materiału Szkółkarskiego Prusy Instytutu Ogrodnictwa Sp. z o.o. Szczepienie to wykonano w lutym 2016 roku. Przygotowany materiał roślinny w postaci szczepów umieszczono w chłodni szkółkarskiej i przetrzymywano w temperaturze około 2°C do końca marca 2016 roku, tzn. do momentu sadzenia. Na początku kwietnia szczepy te posadzono 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 roślin do podłoża w pojemnikach dodawano nawozy mineralne (Osmocote w ilości 20 g na cylinder) oraz niszczone chwasty. Nawadnianie roślin prowadzono systemem kropłowym, sterowanym automatycznie. Ochronę roślin przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych. Szczepy, w miarę ich wzrostu, kilkakrotnie przywiązywano do palików bambusowych wstawionych do cylindrów, aby zapobiec przewracaniu się, wyłamaniu i niewłaściwemu wzrostowi roślin. Jesienią 2016 roku uzyskane jednopędowe drzewka posadzono w kwaterze hodowlanej w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach w rozstawie 3,5 m x 1,0 m. Po ich posadzeniu założono rusztowanie składające się z betonowych słupków i poziomego drutu na wysokości 2 m i wszystkie drzewka przywiązywano do tyczek bambusowych (wysokości 2,40 m) przymocowanych do drutów rusztowania. Ocena fenotypowa mieszańców pod kątem wczesności wchodzenia w okres kwitnienia i owocowania oraz wysokiej jakości owoców (ocena sensoryczna i instrumentalna, wygląd, wielkość, jędrność, zawartość ekstraktu, kwasu askorbinowego i kwasowości), a także odporności roślin na ważne gospodarczo choroby (parch jabłoni, mączniak jabłoni, zaraza ogniowa) będzie wykonywana od roku 2017.

Temat badawczy 2

Zagęszczanie mapy genetycznej odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' poprzedzone analizą segregacji alleli markerów SSR w populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania obu form rodzicielskich, odmiennych pod względem długości fazy juvenilnej

Celem tematu było zagęszczenie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' ('szkielet' uzyskano w 2015 r.) poprzedzone analizą segregacji alleli markerów SSR w populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania obu form rodzicielskich, odmiennych pod względem długości fazy juwenilnej.

Materiał do badań stanowiły młode liście pobrane łącznie z 202 roślin – 200 siewek potomnych uzyskanych w wyniku krzyżowania odmian 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta' oraz obu form rodzicielskich. Genomowe DNA wyizolowano z młodych liści metodą opisaną przez Aldrich'a i Culis'a (1993). Próbki 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). Do badań wprowadzono startery komplementarne do sekwencji flankujących chromosomy III, VI, IX, X, XIII, XV 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 analizowano w świetle białym po rozdiale elektroforetycznym w 7% żelach poliakrylamidowych wybarwionych 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 $\text{LOD} \geq 3$), 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 $\text{REC} \leq 50$ (JoinMap v.3.0). Do graficznego przedstawienia mapy genetycznej wykorzystano program Map Chart 2.0.

Dla trzydziestu dwóch spośród 50 wytypowanych markerów SSR zidentyfikowano 73 allele polimorficzne segregujące (zgodnie z Mendlowskim rozkładem) w populacji mapującej 'FR x OŻ'. Po określeniu typu segregacji ustalono, że w przypadku trzynastu wprowadzonych na mapę markerów występujące w populacji allele pochodziły z genomu odmiany 'Free Redstar', natomiast dwadzieścia osiem z genomu odmiany 'Oliwka Żółta'. W przypadku markerów COL, NZ23g04 oraz CHf4f8 zidentyfikowano allele, które pochodziły z genomów obu form rodzicielskich. Sporządzona mapa genetyczna genomu odmiany 'Free Redstar' zawiera osiemnaście alleli markerów sprzężonych w siedmiu grupach, homologicznych do chromosomów XIII, III, IX, X i VI genomu jabłoni. Natomiast na sporządzonej mapie genomu odmiany 'Oliwka Żółta' zlokalizowano trzydzieści dwa allele markerów SSR sprzężonych w dziewięciu grupach homologicznych do chromosomów XIII, III, XV, IX, VI, X genomu *Malus*. Wielkość zmapowanego genomu odmiany 'Free Redstar' wyniosła 174 cM, natomiast genomu odmiany 'Oliwka Żółta' – 292 cM.

Poziom homologii zmapowanych fragmentów genomów badanych odmian jabłoni z referencyjnym genomem gatunku *Malus* oceniono po uprzednim zidentyfikowaniu loci zmapowanych markerów SSR na zintegrowanej mapie genetycznej 'FR x OŻ'. Stopień kolinearności uzyskanej mapy z mapami referencyjnymi, oszacowano na poziomie 77%.

Na tym etapie badań uzyskano mapy genetyczne zawierające dwadzieścia dwie grupy sprzężeń wykazujące kolinearność z chromosomami III, V, VI, IX, X, XIII, XVI, XIV genomu jabłoni. Wielkość zmapowanego genomu odmiany 'Free Redstar', wysyconego loci 32 markerów SSR sprzężonych w dziesięciu grupach sprzężeń, wyniosła 540 cM, natomiast wielkość sporządzonej mapy genetycznej genomu odmiany 'Oliwka Żółta', zawierającego 59 loci markerów SSR, sprzężonych w dwunastu grupach sprzężeń, wyniosła 673 cM. Wielkość zmapowanego genomu jabłoni, uwzględniając dane dla obydwu form rodzicielskich, wyniosła ponad 1 200 cM.