

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

W roku 2020 badania realizowano w ramach 3 tematów badawczych:

Temat badawczy 1: Przygotowanie materiału roślinnego do badań molekularnych i ocena fenotypowa roślin w warunkach presji szkodnika

Celem tematu była ocena fenotypowa stopnia porażenia 500 roślin z kolekcji IO i 149 mieszańców populacji 'Ceres' x 'Bona' w warunkach presji szkodnika. Ocenę fenotypową zasiedlenia pąków testowanych genotypów przez wielkopąkowca porzeczkowego przeprowadzono w dwóch terminach. W populacji 'Ceres' x 'Bona', symptomy porażenia obserwowano na 58,4% badanych siewek. Ocena zasiedlenia pąków przez wielkopąkowca genotypów z kolekcji wykazała charakterystyczne objawy zasiedlenia pąków przez *C. ribis*. na 74% odmian porzeczek czarnej.

Temat badawczy 2: Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczek czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Celem tematu było ocena stopnia polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P, zagęszczanie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian 'Ceres' x 'Bona' oraz określenie korelacji genotypowo-fenotypowych w celu identyfikacji fragmentów DNA regulujących cechę odporności na *C. ribis*.

Konstrukcję mapy oparto łącznie na 40 markerach SSR (2017-2020) zlokalizowanych na mapach referencyjnych rodzaju *Ribes*. Mapę genetyczną sporządzono w oparciu o wyniki segregacji 252 zidentyfikowanych alleli mikrosatelitarnych. W 2020 roku mapa genomu porzeczek wzbogacona została o 23 allele. Mapa genetyczna genomu odmiany 'Ceres' zawierała 107 *loci* rozlokowanych w obrębie 23 grup sprzężeń, homologicznych do chromosomów I, II, III, IV, V, VI i VII genomu porzeczek czarnej, o łącznej długości 700 cM. Natomiast na sporządzonej mapie genomu odmiany 'Bona' zlokalizowano 116 alleli markerów SSR sprzężonych w 21 grupach wykazujących homologię z opublikowanymi dotychczas mapami referencyjnymi porzeczek czarnej (*Ribes nigrum*) w obrębie LG 1, LG 2, LG 3, LG 4, LG 5, LG 6 i LG 7, o łącznej długości 670 cM. 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. Ocenę stopnia korelacji genotypowo-fenotypowych (analiza QTL) pomiędzy cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego, a położeniem markerów SSR na sporządzonej w latach 2017-2020 mapie genetycznej populacji 'Ceres' x 'Bona' przeprowadzono przy użyciu programu MapQTL 6.0. Najsilniejszą współzależność pomiędzy cechą odporności na wielkopąkowca a analizowanymi markerami odnotowano w grupach sprzężeń LG 4, LG 6 oraz LG 7 dla obu badanych odmian. Jednocześnie markery zlokalizowane w tych grupach wykazywały stabilną korelację z cechą badaną w poszczególnych sezonach.

Temat badawczy 3: Wytypowanie sekwencji markerowych i weryfikacja ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych

Celem tematu była weryfikacja 10 wytypowanych sekwencji markerowych pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na wielkopąkowca porzeczkowego. Wykorzystując w reakcji PCR pary starterów właściwych dla (potencjalnych)

markerów SCAR stwierdzono obecność oczekiwanych produktów amplifikacji zarówno w przypadku genotypów odpornych, jak i wrażliwych na *C. ribis*. Na obecnym etapie badań, żadna z sekwencji markerowych, nie umożliwiła zróżnicowania genotypów odpornych i wrażliwych na wielkopąkowca porzeczkowego.

Podsumowanie

Utworzone mapy genetyczne stanowią bazę do dalszych badań genomów nowych odmian porzeczeki czarnej, a także do oszacowania korelacji pomiędzy zlokalizowanymi markerami a cechą tolerancji/wrażliwości na porażenie wielkopąkowcem porzeczkowym *C. ribis*. Wytypowane markery skorelowane z badaną cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego, mogą być przydatne do selekcji (MAS: Marker Assisted Selection) nowo wytworzonych genotypów gatunku *Ribes*.

Publikacja:

Kuras A., Badek B., 2020. Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczki czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*). Biuletyn IHAR, 291: 85-902. <https://doi.org/10.37317/biul-2020-PB88>

BIULETYN INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN Nr 291 / 2020 : 41–46
E-ISSN: 2657–8913

DOI: 10.37317/biul-2020-PB83



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

Analysis of genome regions linked to the resistance of blackcurrant (*Ribes nigrum*) to blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Anita Kuras[✉], Bogumiła Badek[✉]

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: anita.kuras@inhort.pl

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*), jest jednym z najgroźniejszych szkodników porzeczki czarnej. Powoduje on deformację pąków porzeczki czarnej i redukuje plon owoców. Wybranie najkorzystniejszych markerów molekularnych sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego może przyspieszyć proces hodowli i poprawić skuteczność przy wyborze genotypów odpornych na tę chorobę. Celem pracy była analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczki czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego poprzez ocenę stopnia polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P i poszukiwanie nowych fragmentów genomu regulujących odporność na *C. ribis*. W wyniku analizy elektroforegramów z produktami reakcji CAPS, zidentyfikowano 119 polimorficznych fragmentów DNA, z których wytypowano 100 do analizy sekwencji. W wyniku sekwencjonowania uzyskano 9 specyficznych odczytów na matrycach DNA odmian 'Ceres', 'Ojebyn', 'Vir', 'Ores', 'Foxendown', 'Ben Finlay' i 'Bona'.

Słowa kluczowe: CAPS, *Cecidophyopsis ribis*, marker molekularny, porzeczka czarna,

Blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*) is one of the most dangerous pests of blackcurrant. It causes deformation of blackcurrant buds and reduces fruit yield. The selection of the most favorable molecular markers coupled to resistance to *C. ribis*, can accelerate the breeding process and improve efficacy when choosing genotypes that are resistant to this disease. The aim of this study was to analyze genome regions conjugated with resistance of blackcurrant (*Ribes nigrum*) to blackcurrant gall mite by assessing the degree of polymorphism in coupling groups, including the Ce and P regions, and by searching for new genome fragments regulating *C. ribis* resistance. As a result of the analysis of electrophoregrams with CAPS reaction products, 119 polymorphic DNA fragments were identified, out of which 100 were selected for sequence analysis. As the end product of sequencing, 9 specific readings were obtained on DNA matrices of the varieties 'Ceres', 'Ojebyn', 'Vir', 'Ores', 'Foxendown', 'Ben Finlay' and 'Bona'.

Key words: CAPS, *Cecidophyopsis ribis*, molecular marker, blackcurrant

Wstęp

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*), najgroźniejszy szkodnik w uprawie czarnej porzeczki, jest wektorem rewersji porzeczki czarnej (BRV – Black Currant Reversion Virus), która redukuje plon, prowadząc w konsekwencji do likwidacji plantacji (Pluta i Żurawicz, 2002; Łabanowska i in., 2015). Ograniczanie liczebności populacji wielkopąkowca porzeczkowego oraz pozyskanie odmian porzeczki czarnej o zwiększonej odporności na szpeciela i BRV są niezwykle istotne dla praktyki ogrodniczej. Wiele jednostek naukowych w Europie zajmuje się badaniami nad identyfikacją markerów molekularnych, sprzężonych

z dwoma odrębnymi typami odporności Ce i P. Źródłem odporności typu Ce w w/w badaniach jest agrest (*R. grossularia*) (Knight i in., 1974; Brennan i in., 1993), a typu P – *R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Anderson, 1971). W Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach prowadzone są badania dotyczące poszukiwania sprzężeń między odpornością, a zlokalizowaniem warunkujących ją fragmentów genomu na mapie genetycznej porzeczki czarnej. Celem przedstawionych badań prowadzonych w 2019 roku była: ocena polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności porzeczki na *C. ribis*, oparta na metodzie sekwencjonowania.



Material i Metody**Material badawczy**

Badania przeprowadzono na roślinach 12 genotypów rodzaju *Ribes* (6 odpornych i 6 wrażliwych na *C. ribis*), wytypowanych do badań na podstawie danych literaturowych oraz analiz przeprowadzonych w ramach realizacji projektu w latach 2015–2019 (Tab. 1).

Metody badawcze

DNA z wytypowanych genotypów wyekstrahowano z młodych liści metodą Doyle i Doyle (1990). Jakość i koncentrację DNA w uzyskanych próbach określano na podstawie elektroforegramów w 0,8%

żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki przy długości fali 230, 260, 280 i 320 nm (Gene Quant Pro Amersham Pharmacia Biotech).

Na matrycy DNA wyekstrahowanego z badanych genotypów rodzaju *Ribes* (Tab. 1) przeprowadzono reakcje amplifikacji z kombinacjami starterów SSR (Tab. 2) wytypowanych do badań w oparciu o bazy danych (na podstawie lokalizacji regionów blisko sprzężonych z QTL warunkującymi odporność na wielkopąkowca porzeczkowego – Lg2^{*}; LG4^{*} i LG6^{**} Brennan i in., 2008^{*} i Mazeikiene i in., 2012^{**}) oraz wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu w latach 2015–2019.

Tabela 1

Table 1

Wykaz genotypów rodzaju *Ribes*, wytypowanych do analiz molekularnychList of genotypes of the genus *Ribes* selected for molecular analysis

Lp. No.	Odmiana Variety	Rodowód Parentage	Wrażliwa Odporna ¹ Susceptibility Resistant	Kraj Country
1.	Ores	(Ojebyn × S24) × Ceres	odporna	Polska
2.	Ceres	(<i>R. Dikuscha</i> × Barchatnaja) × samozapylenie	odporna	Polska
3.	Polares	S12/3/83 × EMB (1834)/113	odporna	Polska
4.	Foxendown	Ben Lomond × (BC3 z agrestu × BC2 <i>R. Glutinosum</i>)	odporna	Szkocja
5.	Vir	nieznany	odporna	Rosja
6.	Ben Finlay	[(SCRI P10/9/13 × Ben Alder) × EM B1834-67]	odporna	Szkocja
7.	Ben Hope	Westra × (SCRI 238/36 × EM 21/15)	wrażliwa	Szkocja
8.	Bona	Ojebyn × (<i>R. Dikuscha</i> × Climax)	wrażliwa	Polska
9.	Gofert	Golubka × Fertodi 1	wrażliwa	Polska
10.	Golubka	<i>R. Nigrum</i> × <i>R. Dikuscha</i> .	wrażliwa	Rosja
11.	Ojebyn	Seedling selection of <i>R. Nigrum</i> from north sweden	wrażliwa	Szkocja
12.	Riasnaja	nieznany	wrażliwa	Rosja

¹ dane z literatury

Tabela 2

Table 2

Wykaz starterów SSR użytych do analiz molekularnych

List of SSR primers used for molecular analysis

Starter Primer	Sekwencja startera (5'-3') Starter sequence (5'-3')	Lokalizacja na chromosomach Location on the chromosome
g1-G06F/g2-J08R	AAAACACACATCTCTCACCCC ATAGCCCATGCCCATATTCA	LG 2 [*]
g2-J08F/g1-G06R	CGCCGAGCTCTAATCACTGT TCGAATCTGAACCACGATGA	LG 2 [*]
g2-J08F/g1-B02R	CGCCGAGCTCTAATCACTGT CCATTGATTTGGTGAGGGT	LG 2 [*]
g1-B02F/g2-J08R	CGCTTCATCGCTCTCTCTCT ATA GCC CAT GCC CAT ATT CA	LG 2 [*]
g1-G06F/g1-B02R	AAAACACACATCTCTCACCCC CCA TTG ATT TGG TGA GGG T	LG 2 [*]
g1-B02F/g1-G06R	CGACTTCATCGCTCTCTCTCT TCG AAT CTG AAC CAC GAT GA	LG 2 [*]
e1-O21F/g2-L17R	TCTCTCCAAGTGAAGGAAA GAG CTG TTG CTG TTG CCA TA	LG 4 [*]
g2-L17F/e1-O21R	TTTGGAAA CCT CCC CTT TT GAT TTG TTC TTG TGC AGC GA	LG 4 [*]
g1-I02F/g1-D11R	TGA ATA TCA GAC CGC CAT CA AAT CGA ATG GAA TCG TCC	LG6 ^{**}
g1-D11F/g1-I02R	GAA GAC GAC AAA GCC TCC TCC AAG ATG AAG CTT CTC	LG6 ^{**}
	AAA TC	

^{*} Brennan i in. 2008; ^{**} Mazeikiene i in. 2012

Mieszanina reakcyjna w przeprowadzonych testach PCR zawierała: 10 ng DNA, 0,5U polimerazy Taq Platinum® (Invitrogen), 10 × PCR-buforu, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTP (Applied Biosystems) i 0,35 μM startera SSR (zgodnie z zaleceniami producenta). Zastosowano profil termiczny reakcji: wstępna denaturacja -94°C/2 min, 4 cykle (denaturacja 94°C/50 s, przyłączanie startera 55–50°C/50 s (w każdym kolejnym cyklu spadek temperatury przyłączania o 1°C), wydłużanie nici DNA 72°C/60 s), 30 cykli (denaturacja 94°C/50 s, przyłączanie startera 55–50°C/90 s, wydłużanie nici DNA 72°C/60 s), wydłużanie końcowe 72°C/10 min. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Biometra Basic.

Produkty reakcji SSR-PCR poddano trawieniu 4 enzymami restrykcyjnymi (Tab. 3), które rozdzielono w 2% żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydyny, następnie charakterystyczne dla analizowanych genotypów fragmenty DNA wyizolowano z żeli agarozowych, przy użyciu zestawu komercyjnego FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics), według procedury dołączonej przez producenta.

Wyizolowane z żelu i oczyszczone fragmenty DNA wklonowano do plazmidów bakteryjnych (TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen). Następnie plazmidy umieszczono w ukompetentniowanych bakteriami *E. coli* One shot TOP10 (Invitrogen), według protokołu producenta. Po wyselekcjonowaniu, wybrane kolonie bakteryjne, zawierające plazmid z wstawionym fragmentem DNA analizowanych genotypów *Ribes*, przeniesiono na pożywkę płynną LB. Po inkubacji (37°C/16 h) z zawiesiny bakterii, wyizolowano plazmid bakteryjny przy użyciu komercyjnego zestawu FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics).

Plazmidy bakteryjne zawierające charakterystyczne fragmenty genomu wyznakowano w reakcji PCR z uniwersalnym starterem M13, stosując zestaw DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter), a następnie poddano sekwencjonowaniu przy użyciu systemu CEQ (8000) Genome Analyzer (Beckman Coulter).

Analizę sekwencji przeprowadzono przy użyciu programu CEQ (8000) software v.9.0. Uzyskane z odczytów kontigi 'składano' przy użyciu programu SeqMan (pakiet Lasergen v.7). Zróżnicowanie nukleotydowe sekwencji analizowano przy użyciu programu MegAlign (pakiet Lasergen v.7). Uzyskane sekwencje DNA porównano z danymi NCBI za pomocą programu bioinformatycznego blast-nt.

Do uzyskanych sekwencji DNA zaprojektowano specyficzne oligonukleotydy (program komputerowy PrimerSelect- pakiet Lasergen v.7).

Wyniki

Po zidentyfikowaniu polimorfizmów pomiędzy genotypami wrażliwymi/odpornymi na *C. ribis*, uzyskane sekwencje analizowano za pomocą programu MegAlign (pakiet Lasergen v.7), aby sprawdzić, czy możliwe jest przekształcenie polimorfizmu w marker CAPS. Analiza, umożliwiła wytypowanie czterech enzymów restrykcyjnych: PstI, TruII, AseI, SmaI, które spełniały następujące założenia: długości produktów uzyskanych po reakcji cięcia musiały pozwolić na wyraźne rozróżnienie alleli, obecność maksymalnie trzech miejsc cięcia w analizowanej sekwencji (Tab. 3).

Po przeprowadzeniu łącznie 1440 reakcji amplifikacji PCR z 10 parami starterów flankujących regiony Ce i P w różnych kombinacjach (Tab. 2), które poddano trawieniu przy użyciu wytypowanych enzymów restrykcyjnych, w wyniku analizy elektroforegramów, zidentyfikowano 119 polimorficznych fragmentów DNA, z których do analizy wytypowano 100 sekwencji (Tab. 4). W wyniku sekwencjonowania uzyskano 9 specyficznych odczytów o długości od 351 do 490 pz (Tab. 5).

Analiza porównawcza uzyskanych sekwencji wykazała zróżnicowanie układu sekwencji amplikonów uzyskanych dla badanych genotypów odpornych i wrażliwych, najprawdopodobniej sklasyfikowanych jako polimorfizm jednonukleotydowy (SNP). Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po jednej parze specyficznych oligonukleotydów (Tab. 6)

Tabela 3
Table 3

Wykaz enzymów restrykcyjnych użytych do analizy CAPS
List of restriction enzymes used for CAPS analysis

Enzym Enzyme	Pochodzenie Origin	Rozpoznawana sekwencja Recognized sequence	Warunki reakcji Reaction conditions	Inaktywacja Inactivation
PstI	<i>Providencia stuarti</i>	5'...CTGCA G...3'	37°C/ 16 h	80°C/ 20min
TruII	<i>Thermus ruber</i>	5'...T TAA...3'	65°C/ 16 h	80°C/ 20min
AseI	<i>Vibrio species</i>	5'...AT TAA...3'	37°C/ 16 h	65°C/ 20min
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5'...CCC GGG...3'	30°C/ 16 h	65°C/ 20min

Tabela 4
Table 4Wykaz fragmentów DNA wytypowanych do analizy sekwencji.
List of DNA fragments selected for sequence analysis.

Starter/enzym Primer/enzyme	Długość [Pz] Fragmentów dna Band size of dna fragments (bp)	Analizowane genotypy Analyzed genotypes											
		Ores	Ceres	Polares	Foxendown	Vir	Ben Finlay	Ben Hope	Bona	Gofert	Golubka	Ojebyn	Rusnaja
g1-G06F/ g2-J08R/ <i>PstI</i>	360	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	390	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+
	430	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	490	+	+			+			+	+	+		
g1-B02F/ g1-G06R/ <i>AseI</i>	300	+		+	+	+	+					+	+
	340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
g1-G06F/ g2-J08R/ <i>AseI</i>	350		+			+	+	+	+	+			
	460	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	510	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
g1-B02F/ g1-G06R/ <i>SmaI</i>	430		+			+	+	+	+				
	580	+	+	+	+			+	+	+			+

+ „+” – fragment wytypowany do sekwencjonowania

Tabela 5
Table 5Wykaz specyficznych sekwencji uzyskanych w wyniku sekwencjonowania
List of specific sequences obtained as a result of sequencing

Lp. No.	Nazwa sekwencji Sequence name	Pochodzenie/genotyp Origin/ Genotype	Kombinacje starterów Flankujących regiony ce i p/enzym Primers flanking regions ce and p/enzyme	Wielkość zsekwencjonowanego fragmentu dna [Pz] Dna band size [bp]
1.	Seq.73	‘Ceres’	g1-G06F/g2-J08R/ <i>PstI</i>	363
2.	Seq.74	‘Ojebyn’	g1-G06F/g2-J08R/ <i>PstI</i>	390
3.	Seq.75	‘Vir’	g1-G06F/g2-J08R/ <i>PstI</i>	490
4.	Seq.76	‘Ceres’	g1-G06F/ g2-J08R/ <i>AseI</i>	351
5.	Seq.77	‘Ores’	g1-G06F/g2-J08R/ <i>AseI</i>	460
6.	Seq.78	‘Foxendown’	g1-G06F/g2-J08R/ <i>AseI</i>	462
7.	Seq.79	‘Vir’	g1-G06F/g2-J08R/ <i>AseI</i>	461
8.	Seq.80	‘Ben Finlay’	g1-B02F/ g1-G06R/ <i>SmaI</i>	435
9.	Seq.81	‘Bona’	g1-B02F/ g1-G06R/ <i>SmaI</i>	436

Tabela 6
Table 6Wykaz sekwencji oligonukleotydów specyficznych
List of specific oligonucleotide sequences

Lp. No.	Oligonukleotyd Oligonucleotide	Reverse	Forward
1.	2.73	CTCGCTGAGCGGATTGGAT	ACGGCGGTTAGGAAGGTGTGGGT
2.	2.74	CGATAGCGGGACTGTAAGAG	TTATGAGCCCCAAAGCCCTAAG
3.	2.75	CGTGGTATGACATCAGACTACAC	ACGGACTGGACCGGGAC
4.	2.76	TAGTGAAGAACGGAGCTCAGGAG	TTTATTGCGGAGGGAGAGGCGCT
5.	2.77	CCGACCATACTTGAGTCGTAATAG	ACTGATTTCCCCGAGCTCTTG
6.	2.78	GAGGCTAAGAAGGACGTGTATGGG	TAGGATGCTTCCCGTCAATACGA
7.	2.79	GCCGAGTTTCTGTATCGTGCA	CGAATAAGTCAGGGCGCATAGGC
8.	2.80	TCTTGCAACTCGGCTCCAGACT	CAGGGCAGAAAGCTGTGGAGGGAA
9.	2.81	TGAGTTCATCGCCATCAGACATG	GAAGGGCGAATGAGGGCTGATAT

Dyskusja

Ze względu na cenne walory zdrowotne porzeczki czarnej na całym świecie prowadzone są badania, których celem jest znalezienie odmian odpowiednich do uprawy w danych warunkach klimatycznych, o podwyższonej tolerancji na niską temperaturę oraz choroby stanowiące zagrożenie (głównie rewersja porzeczki czarnej) i szkodniki (wielkopąkowiec porzeczkowy). Ograniczanie liczebności populacji wielkopąkowca porzeczkowego oraz pozyskanie odmian porzeczki czarnej o zwiększonej odporności na szpeciela i BRV są niezwykle istotne dla praktyki ogrodniczej. Dotychczas zidentyfikowano, w oparciu o wyniki prac genetyczno-hodowlanych, dwa odrębne typy odporności na wielkopąkowca (Brennan i in., 2008; Mazeikiene i in., 2012), których źródłem jest agrest (*R. grossularia*) (Knight i in., 1974) i *R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Anderson 1971).

Wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli roślinnej zwiększa efektywność konwencjonalnej hodowli, poprzez selekcję roślin posiadających markery sprzężone z ważnymi gospodarczo cechami użytkowymi (Gupta i wsp. 1999). Poszukiwanie i identyfikacja takich markerów ma na celu skrócenie cyklu hodowlanego, gdyż selekcję materiału roślinnego można przeprowadzić już w stadium siewki, niezależnie od tego, w jakiej fazie rozwojowej rośliny ujawnia się dana cecha. W hodowli odpornościowej poszukujemy markerów sprzężonych z cechami odporności, a do selekcji (MAS) wystarczający może być pojedynczy marker lub zestaw markerów sprzężonych z tą cechą.

W 2019 roku kontynuowano badania dotyczące oceny polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności, oparte na metodzie sekwencjonowania. Działanie najpopularniejszych sekwenatorów, wykorzystywanych do badań naukowych i diagnostycznych, polega na modyfikacji metody opracowanej przez Sangera i Coulsona w 1975 r. W badaniach dotyczących sekwencjonowania genomów rodzaju *Ribes* wykorzystaliśmy sekwenator CEQ (8000) Beckman Coulter. Metoda sekwencjonowania często stosowana jest do analiz porównawczych (*alignment*) i identyfikacji jednonukleotydowych różnic w obrębie tego samego fragmentu (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) (Bang i in., 2007; Thiel i in., 2004). Porównania takie dostarczają szczegółowych informacji na temat podobieństwa/zróżnicowania genetycznego, pochodzenia i ewolucji badanych organizmów.

Prowadzone w naszych badaniach wstępne

analizy porównawcze sekwencji DNA charakterystycznych dla genotypów rodzaju *Ribes* zróżnicowanych pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego pozwoliły na poszerzenie bazy danych dotyczących polimorfizmu odmian porzeczki podatnych i odpornych dla potrzeb analizy regulacji zjawiska odporności na wielkopąkowca porzeczkowego *C. ribis*.

Analiza porównawcza zsekwencjonowanych fragmentów DNA zidentyfikowanych w w/w genotypach wykazała silną homologię (88–90%) z sekwencją nukleotydów markera *Ce* zaprezentowaną przez Brennana i wsp. (2008). Obecnie, badania naukowców koncentrują się na rozpoznaniu sposobów dziedziczenia genów odporności (*Ce* i *P*) w genotypach uzyskanych w wyniku hybrydyzacji gatunków, u których stwierdzono ich występowanie.

W naszej pracy również poszukujemy markerów sprzężonych z genami odporności *Ce* i *P*, które umożliwiłyby charakterystykę genotypów rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności. Na obecnym etapie badań, przeprowadzone przez nas wstępne badania weryfikujące wytypowane sekwencje markerowe, nie potwierdziły ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i wrażliwych na wielkopąkowca porzeczkowego.

Wnioski

Wyniki badań dotyczące oceny polimorfizmu fragmentów różnicujących genotypy rodzaju *Ribes* (odporne/podatne) uzyskane na matrycach DNA roślin wybranych z kolekcji stanowią podstawę bazy sekwencji sprzężonych z cechą odporności na *C. ribis*.

Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 78

Literatura

- Anderson, M. M. (1971). Resistance to gall mite (*Phytoptus ribis* Nal.) in the *Eucoresma* section of *Ribes*. *Euphytica* (20), 422–426.
- Bang, H., Kim, S., Leskovaar, D., King, S. (2007). Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in *lycopen-β-cyclase* (*LCYB*) gene. *Molecular Breedin* (20), 63–72
- Brennan, R., Jorgensen, L., Gordon, S., Loades, K., Hackett, C., Russell, J. (2008). The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: *Eriophyidae*). *Theor. Appl. Genet.* (118), 205–211.

- Brennan, R. M., Lanham, P. G., McNicol, R. J. (1993). *Ribes* reeding and research in the UK. *Acta Horticulturae* (352), 267–275. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.352.38>.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* (12),13–15.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed* (118),369–390.
- Knight, R. L., Keep, E., Briggs, J. B., Parker, J. (1974). Transference of resistance to black currant gall mite *Cecidophyes ribis*, from gooseberry to black currant. *Ann. Appl. Biol.* (76),123–130.
- Łabanowska, B. H., Piotrowski, W., Gruchała, M. (2015). Blackcurrant gall mite – *Cecidophyes ribis* (Westw.), harmfulness and possibility to control with fenpyroximate (Ortus 05 SC). *Prog. Plant Prot.* 55 (3), 305–311.
- Mazeikiene, I., Bendokas, V., Stanys, V., Siksnianas, T. (2012): Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant. *Plant Breeding*. (131),762–766.
- Pluta, S., Żurawicz, E. (2002). Effect of reversion virus on the yield and fruit size in blackcurrant *Ribes nigrum* L. Proceedings 8th International Symposium *Rubus* and *Ribes*. Scotland, Dundee. July 2001. *Acta Horticulturae* 585 (1): 393–398.
- Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 94(3): 441–448.
- Thiel, T, Kota, R, Grosse, I, Stein, N, Graner, A. (2004). SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Res;* (32),e5.