

**BOGUMIŁA BADEK****STANISŁAW PLUTA****MAŁGORZATA KORBIN**

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Kierownik Tematu: dr Bogumiła Badek Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, 96-100 Skierniewice, ul. Pomologiczna 18, tel. +48 468345460,

e-mail: bogumila.badek@inhort.pl

*Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.20.2018, Zadanie 78.*

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

### Characteristics of molecular markers linked with the resistance to gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

**Słowa kluczowe:** mapa genetyczna, marker, porzeczka czarna, wielkopąkowiec porzeczkowy

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*) jest najgroźniejszym szkodnikiem w uprawie czarnej porzeczki, zasiedlającym większość uprawianych odmian. *C. ribis* jest wektorem rewersji porzeczki czarnej (Black currant reversion virus — *BRV*), 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 ww. badaniach jest agrest (*R. grossularia*) (Knight i in., 1974), a typu P–*R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Anderson, 1971). Również 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 badań prowadzonych w 2018 roku była: 1) ocena polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności porzeczki na *C. ribis*, oparta na metodzie sekwencjonowania, 2) zagęszczanie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian ‘Ceres’ i ‘Bona’ oraz 3) weryfikacja 10 wytypowanych sekwencji markerowych pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na wielkopąkowca porzeczkowego.

Materiał badawczy do analiz molekularnych stanowiły rośliny pochodzące z kolekcji IO i rodziny mieszańców ‘Ceres’ × ‘Bona’, poddane corocznej ocenie fenotypowej pod względem stopnia zasiedlenia przez wielkopąkowca (57% mieszańców ‘Ceres’ × ‘Bona’ oraz 74% odmian z kolekcji).

Do monitorowania regionów genomu porzeczki czarnej użyto markerów mikrosatelitarnych SSR z dostępnych map genomowych (Brennan i in., 2008; Mazeikiene i in., 2012), bazujących na reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do unikalnych sekwencji flankujących motywy satelitarne. Ocenę polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P dwunastu genotypów *Ribes* (kolekcja IO), zróżnicowanych pod względem odporności na *C. ribis*, oparto na metodzie CAPS-PCR z czterema enzymami restrykcyjnymi (*HpaII*, *PflFI*, *DpnII* i *HpyCH4IV*) oraz sekwencjonowaniu matryc DNA (100 fragmentów DNA). Uzyskane sekwencje DNA porównano z danymi NCBI. Analizę sekwencji przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego 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). Analiza porównawcza wykazała zróżnicowanie układu sekwencji ampliconów genotypów odpornych i wrażliwych, najprawdopodobniej sklasyfikowanych jako polimorfizm jednonukleotydowy (SNP). Taka hipoteza wymaga jednak dalszych badań, które są przewidziane na kolejne lata realizacji projektu. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po jednej parze specyficznych oligonukleotydów.

W następnym etapie badań zaplanowanych na 2018 rok skupiono się na zagęszczaniu uzyskanego w 2017 roku szkieletu mapy genetycznej porzeczki czarnej. Konstrukcję mapy oparto łącznie na 20 markerach SSR zlokalizowanych na mapach referencyjnych rodzaju *Ribes* (Brennan i in., 2008; Mazeikiene i in., 2012). Na podstawie analizy profili markerów SSR wytypowanych dla genotypów rodzicielskich i 149 mieszańców ‘Ceres’ × ‘Bona’, zidentyfikowano 177 alleli polimorficznych segregujących dla genotypów mieszańcowych. Analiza segregacji alleli, różnicujących formy rodzicielskie (allele heterozygotyczne) pozwoliła na określenie typu segregacji oraz rozkładu alleli w populacji mapującej (test  $X^2$ ). Na podstawie frekwencji rekombinacji pomiędzy allelami oszacowano odległości mapowe (cM) między poszczególnymi markerami SSR/ częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami w badanej populacji mapującej. Uzyskany w bieżącym roku szkielet mapy wzbogacony został o 62 allele i obecnie zawiera 11 grup sprzężeń, stanowiących fragmenty siedmiu chromosomów (I–VII) o łącznej długości 537 cM. Analiza porównawcza uzyskanych grup sprzężeń z ich odpowiednikami na mapach referencyjnych, opublikowanych dla innych przedstawicieli rodzaju *Ribes*, wykazała 63% homologię. 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.

Ostatni etap badań zaplanowanych do realizacji w 2018 r. dotyczył poszukiwania markerów sprzężonych z genami *Ce* i *P*, które umożliwiłyby charakterystykę genotypów rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego. 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. Na 100 wytypowanych do badań genotypach przeprowadzono weryfikację 10 markerów SCAR pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na *C. ribis*. Łącznie przeprowadzono 3 000 testów. Wykorzystując w reakcji PCR startery właściwe dla (potencjalnych) markerów SCAR stwierdzono występowanie oczekiwanych produktów amplifikacji zarówno w przypadku genotypów odpornych, jak i wrażliwych na *C. ribis*. 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

1. 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* i będą kontynuowane w kolejnych latach realizacji projektu, zgodnie z harmonogramem.
2. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić brak pełnej kolinearności uzyskanej mapy z mapą referencyjną. O zjawisku tym świadczy fakt, że wygenerowane grupy sprzężeń LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6 i LG7 wykazują homologię z chromosomami I, II, III, IV, V, VI i VII map referencyjnych, niemniej odnotowano zmiany w lokalizacji oraz kolejności sekwencji alleli.
3. Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono korelacji między testowanymi markerami a cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego.

#### LITERATURA

- Anderson M. M. 1971. Resistance to gall mite (*Phytoptus ribis* Nal.) in the Eucoreosma section of *Ribes*. *Euphytica* 20: 422 — 426.
- 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.
- Knight R. L., Keep E., Briggs J. B., Parker J. 1974. Transference of resistance to black currant gall mite *Cecidophyopsis ribis*, from gooseberry to black currant. *Ann. Appl. Biol.* 76: 123 — 130.
- Łabanowska B. H., Piotrowski W., Gruchała M. 2015. Blackcurrant gall mite — *Cecidophyopsis 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 8<sup>th</sup> International Symposium *Rubus* and *Ribes*. Scotland, Dundee. July 2001. *Acta Horticulturae* 585 (1): 393 — 398.