

ZADANIE 48

Analiza genetyczna wybranych genotypów brzoskwini (*Prunus persica* L.) z wykorzystaniem czynnika układu krzyżowań i markerów molekularnych

POSTĘP BIOLOGICZNY
Okres realizacji – 2023

KIEROWNIK ZADANIA 48

dr inż. Marek Szymajda

e-mail: Marek.Szymajda@inhort.pl

Wykonawcy:

dr Anita Kuras, dr hab. Agnieszka Masny, prof. dr hab. Stanisław Pluta, dr Łukasz Seliga, dr Mariusz Lewandowski, dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, mgr Jolanta Kubik, mgr Bogusława Idczak, mgr Renata Czarnecka, Tadeusz Filipczak, Ilona Skiba, Julia Supeł, Piotr Skręta, Igor Stankiewicz

**Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice**



CELE PROJEKTU

W 2023 r. realizowano dwa tematy badawcze, których celem było:

- ✓ **Ocena wzrostu i owocowania siewek brzoskwini należących do 20 rodzin mieszańcowych pokolenia F_1 (*temat badawczy 1*)**
- ✓ **Ocena przydatności markerów molekularnych do selekcji mieszańców pokolenia F_1 brzoskwini o białym i żółtym kolorze miąższu (*temat badawczy 2*)**

**Tematy zrealizowano zgodnie z harmonogramem,
a cele osiągnięto**

MATERIAŁY I METODY

Temat badawczy 1.

Ocena siły wzrostu oraz owocowania drzew brzoskwini pokolenia $F_{1,1}$ uzyskanych ze skrzyżowania 9 form rodzicielskich

Formy Rodzicielskie siewek:

- ✓ 4 genotypy mateczne - 'Elberta', 'Madison', Nr 3884 i 'Fioletowomiąższowa' – miąższ koloru bordowego.
- ✓ 5 genotypów ojcowskich - 'Royal Glory', 'Harrow Diamond', 'Harblaze', KD1/2/19 i T5.

(formy rodzicielskie są zróżnicowane pod względem cech fenotypowych owoców (żółto-, biało- i bordowomiąższowe, okrągłe i płaskie, z omszoną skórką i nektaryny oraz o miąższu miękkim i twardym - twardki), a także wywodzą się z różnych rejonów geograficznych świata.

- ✓ Badano 20 rodzin po 40 siewek brzoskwini wyrównanych pod względem siły wzrostu.
- ✓ Doświadczenie polowe założono w układzie bloków losowych (4 powtórzenia po 10 siewek każdej rodziny).
- ✓ Łącznie oceniono 800 siewek posadzonych w rozstawie 4,2 m × 1,0 m.

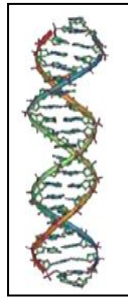
MATERIAŁY I METODY

Temat badawczy 2.

Ocena regionu genomu sprzężonego z kolorem mięszu na wytypowanych z pokolenia F₁_60 pojedynkach należących do różnych rodzin mieszańcowych



60 genotypów
(32-kolor żółty,
28-biały)



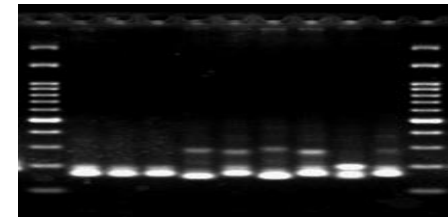
Izolacja DNA
(Doyle & Doyle)



Ocena jakości DNA



PCR-SSR
(10 starterów/LG1)



Wizualizacja
produktów PCR

Analiza polimorfizmu- zestawienie danych, matryca 0/1

Starter	Długość (pz)	GENOTYPY								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
DScar 3	180	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	190	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	210	0	0	1	0	0	1	0	1	1
DScar 6	100	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DScar 7	320	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DScar 3	180	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	190	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	210	0	0	1	0	0	1	1	1	1

Skorelowanie danych
z badaną cechą (barwa mięszu).

Wytypowanie markera
skorelowanego z badaną cechą do
selekcji mieszańców brzoskwini.

WYNIKI

Temat badawczy 1

Ocena siły wzrostu oraz owocowania drzew brzoskwini pokolenia F_1 uzyskanych ze skrzyżowania 9 form rodzicielskich

- ✓ Średnio dla form matecznych największą siłę wzrostu, wyrażoną polem poprzecznego przekroju pnia, posiadały siewki uzyskane z genotypu Fioletowomiąszowa. Przeciętnie dla 5 rodzin, w których genotyp ten był formą mateczną, pole poprzecznego przekroju pnia siewek wynosiło 19,0 cm².
- ✓ Intensywność kwitnienia wynosiła od 8,1 pkt. (w dziewięciopunktowej skali bonitacyjnej) w rodzinie siewek uzyskanych ze skrzyżowania odmian 'Elberta' × 'Harrow Diamond' do 9,0 pkt. w rodzinie Fioletowomiąszowa × KD1/2/19.
- ✓ Średnio owoce siewek genotypu Nr 3884 dojrzewały wcześniej niż siewki pozostałych form matecznych. Zdecydowanie najpóźniej owocowały siewki genotypu Fioletowomiąszowa.



WYNIKI

Temat badawczy 1

- ✓ Największy plon owoców wytworzyły siewki uzyskane z nasion genotypu Nr 3884, natomiast najmniejszy plon owoców miały siewki odmiany 'Elberta'.
- ✓ Największy plon owoców wytworzyły siewki z rodziny Nr 3884 × 'Royal Glory'.
- ✓ Średnio siewki odmiany 'Elberta' wytwarzały większe owoce niż siewki pozostałych form matecznych. Najmniejsze owoce wytwarzały siewki, których formą mateczną był genotyp Nr 3884.



Wnioski:

1. Spośród ocenionych 20 rodzin mieszańcowych najsilniejszy wzrost wykazują siewki, których formą mateczną jest genotyp Fioletowomiąszowa.
2. Z ocenianej populacji najlepiej plonują siewki uzyskane z nasion genotypu Nr 3884.
3. Największe owoce wytwarzają siewki otrzymane ze skrzyżowania odmian 'Elberta' × 'Royal Glory' oraz 'Elberta' × 'Harblaze'.

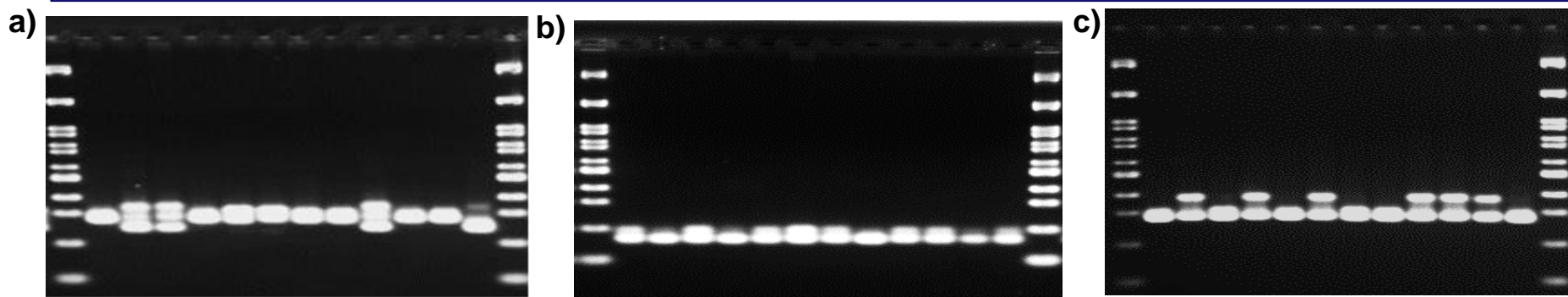
WYNIKI

Temat badawczy 2.

Ocena regionu genomu sprzężonego z kolorem mięszu na wytypowanych z pokolenia F₁ 60 pojedynkach należących do różnych rodzin mieszańcowych

- ✓ Łącznie na matrycach DNA wyekstrahowanych z 60 roślin należących do pięciu rodzin mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowań genotypu Nr 3884 z pięcioma formami ojcowskimi: 'Royal Glory', 'Harblaze', 'Harrow Diamond', KD1/2/19 i T5, przeprowadzono 3600 reakcji amplifikacji, uzyskano 38 amplikonów.
- ✓ W reakcji z jednym z dziesięciu testowanych oligonukleotydem o nazwie: DScar7 uzyskano tylko jeden monomorficzny fragment DNA o długości 320 pz.
- ✓ Długość polimorficznych amplikonów charakteryzujących testowane geotypy brzoskwini wahała się od 100 do 420 pz.
- ✓ W reakcji amplifikacji z oligonukleotydem CPPCT022 obserwowano między innymi allele o długości 250, 300 i 310 pz odpowiednio u mieszańców rodzających owoce o żółtym (22%, 50%, 42%) i białym kolorze mięszu (18%, 54%, 36%)
- ✓ W reakcji amplifikacji z zastosowaniem markera CPPCT028 obserwowano fragment DNA o długości 200 pz u 50% mieszańców rodzających owoce o żółtym kolorze mięszu i 61% genotypów o białym mięszu.
- ✓ Utworzono tabelę z profilami genetycznymi uzyskanymi w reakcji amplifikacji z dziesięcioma oligonukleotydami metodą SSR dla 60 genotypów należących do pięciu rodzin mieszańcowych.

WYNIKI (TEMAT BADAWCZY 2 c.d.)



Przykładowy elektroforegram produktów amplifikacji z oligonukleotydem: a) CPPCT022 nr. kombinacji krzyżowań k15 (Nr 3884 × T5), b) nr. k12 (Nr 3884 × 'Harblaze'), c) MA26a nr. k13 (Nr 3884 × 'Harrow Diamond').

Starter	Długość	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
CPPCT 022	250															+		+					+		+							
	280																															
	290	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	300	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+				+	+	+		+		+					
	310																+		+					+		+		+	+	+	+	+
	350																															
CPPCT 028	180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	190														+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
	200	+		+		+	+	+		+	+		+			+	+											+	+	+	+	+
CPPCT 030	180		+		+	+		+	+		+	+	+	+	+																	

Fragment tabeli przedstawiającej profile genetyczne uzyskane w reakcji amplifikacji z dziesięcioma oligonukleotydami metodą SSR dla genotypów należących do pięciu rodzin mieszańcowych brzoskwini gdzie: „+”-obecność fragmentu DNA

Wnioski:

1. Wytypowane markery do weryfikacji badanych siewek mieszańcowych pod względem koloru miąższu owoców żółty/biały nie są znacząco skorelowane z badaną cechą. Istnieje zatem konieczność kontynuowania badań w kolejnych latach realizacji projektu.

PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ NA KONFERENCJI

Poster i abstrakt prezentowany podczas VI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych – Konferencja Naukowa pt. „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka”, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r., Streszczenia, s. 80.

WSTĘPNE WYNIKI ANALIZY REGIONU GENOMU BRZOSKWINI SPRZĘŻONEGO Z KOLEM MIAŻSZU OWOCÓW



ANITA KURAS, MAREK SZYMAJDA, RENATA CZARNECKA
INSTYTUT OGRODNICTWA – PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
UL. KONSTYTUCJI 3 MAJA 1/3, 96-100 SKIERNIEWICE



WSTĘP

Barwa miąższu jest jednym z podstawowych kryteriów klasyfikacji brzoskwin [Prunus persica (L.) Batsch], ponieważ wpływa na preferencje konsumentów i jakość odżywczą owoców. W Polsce, podobnie jak w Europie i Ameryce Północnej, konsumenci preferują odmiany brzoskwiń o żółtym miąższu, owoce o białym miąższu preferowane są w Azji, szczególnie w Chinach.

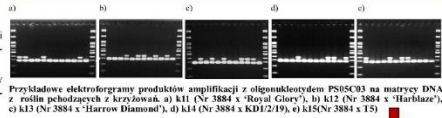
Dotychczasowe badania wykazały, że barwa miąższu brzoskwiń jest determinowana przez pojedynczy locus (Y) zlokalizowany w pierwszej grupie sprzężeń (LG1), jednak wciąż nie znane są geny warunkujące barwę miąższu. Istnieje zatem potrzeba rozpoznania nowych genów/fragmentów genu, uczestniczących w regulacji barwy miąższu owoców. Zważywszy na długi okres owocowania roślin drzew owocowych, trwający 3-5 lat, zastosowanie w hodowli markerów molekularnych znacznie przyspieszy pracę i selekcję wytworzonych materiałów roślinnych we wczesnym etapie ich wzrostu. Celem realizowanych badań jest wytypowanie specyficznych sekwencji genu brzoskwiń do selekcji mieszańców brzoskwiń o białym i żółtym kolorze miąższu.

MATERIAŁY I METODY



WYNIKI

- Potwierdzono tożsamość badanych roślin mieszańcowych i wyeliminowano siewki o nieustalonym rodowodzie, tzw. outcross z wytypowanymi eksperymentalnie 7 oligonukleotydami (różniące formy rodzicielskie).
- Ocenię metodą SSR poddano 60 siewek brzoskwiń, użyto 10 par oligonukleotydów specyficznych dla analizowanego genu. Łącznie przeprowadzono 3600 reakcji amplifikacji, uzyskano 45 ampikonów.
- Trzy z dziesięciu testowanych oligonukleotydów było monomorficznych.
- W reakcjach z 7. parami starterów uzyskano 36 polimorficznych ampikonów o długości od 160 do 400 pz.
- Każdy z testowanych genotypów został scharakteryzowany na podstawie 7-10 polimorficznych fragmentów DNA.



Przykładowe elektrogramy produktów amplifikacji z oligonukleotydami PS05C03 na matrycy DNA z roślin pochodzących z krzyżowań: a) K1 (Nr 3884 - 'Royal Glory'), b) K2 (Nr 3884 - 'Harblaze'), c) K3 (Nr 3884 - 'Harrow Diamond'), d) K4 (Nr 3884 x KDI/2/19), e) K1SNr 3884 x T5

STARTER	pz	GENOTYPY																													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
PS11A4	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS12A02	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS15A02	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS16A01	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A01	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A04	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A05	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A06	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A07	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A08	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A09	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PS19A10	100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fragment tabeli przedstawiający profile genetyczne uzyskane w reakcji amplifikacji z testowanymi oligonukleotydami dla genotypów należących do pięciu rodzin mieszańcowych brzoskwiń
Gdzie: B- genotyp o białym kolorze miąższu, Z- genotyp o żółtym kolorze miąższu

Badania wykonano w ramach Badań Podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 48

WSTĘPNE WYNIKI ANALIZY REGIONU GENOMU BRZOSKWINI SPRZĘŻONEGO Z KOLEM MIAŻSZU OWOCÓW

Anita Kuras, Marek Szymajda, Renata Czarnecka
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,
e-mail: Anita.Kuras@inhort.pl

Słowa kluczowe: markery molekularne, selekcja, region genu, klon brzoskwiń, kolor miąższu

Barwa miąższu jest jednym z podstawowych kryteriów klasyfikacji brzoskwiń [Prunus persica (L.) Batsch], ponieważ wpływa na preferencje konsumentów i jakość odżywczo owoców. W Polsce, podobnie jak w Europie i Ameryce Północnej, konsumenci preferują odmiany brzoskwiń o żółtym miąższu, owoce o białym miąższu preferowane są w Azji. Dotychczasowe badania wykazały, że barwa miąższu brzoskwiń jest determinowana przez pojedynczy locus (Y) zlokalizowany w pierwszej grupie sprzężeń (LG1), jednak wciąż nie są znane geny warunkujące barwę miąższu. Zważywszy na długi okres owocowania roślin drzew owocowych, trwający 3-5 lat, zastosowanie w hodowli markerów molekularnych znacznie przyspieszy ocenę i selekcję wytworzonych materiałów roślinnych we wczesnym etapie ich wzrostu.

Celem realizowanych badań jest wytypowanie specyficznych sekwencji genu brzoskwiń do selekcji mieszańców brzoskwiń o białym i żółtym kolorze miąższu. W pierwszym etapie prac badawczych (2022 r.) przeprowadzono analizę 60 siewek brzoskwiń pokolenia F₁ (32 siewki żółtomiaższowe i 28 siewek białomiaższowych), należących do różnych rodzin mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowania form rodzicielskich o żółtym oraz białym miąższu. Metodą SSR (Simple Sequence Repeats) z wytypowanymi eksperymentalnie 7 oligonukleotydami (różniące formy rodzicielskie) potwierdzono tożsamość badanych roślin mieszańcowych i wyeliminowano siewki o nieustalonym rodowodzie, tzw. outcross. Następnie, przeprowadzono reakcje amplifikacji z wytypowanymi z baz danych GDR (<https://www.rosaceae.org/species/prunus/all>) oligonukleotydami występującymi w pierwszej grupie sprzężeń w regionie locus (Y). Łącznie przeprowadzono 3600 reakcji amplifikacji, uzyskano 45 ampikonów, długość polimorficznych ampikonów wynosiła od 160 do 400 pz., trzy z dziesięciu testowanych oligonukleotydów były monomorficzne. W reakcjach amplifikacji z testowanymi oligonukleotydami obserwowano przeważnie allele zarówno u genotypów o białym, jak i żółtym kolorze miąższu. W reakcji amplifikacji z oligonukleotydem PS12A02 obserwowano allele o długości 210 pz i 260 pz, które występowały u genotypów wytwarzających owoce. Zidentyfikowany w wyniku wstępnych badań marker może być przydatny do selekcji materiałów hodowlanych brzoskwiń. Badania będą kontynuowane w kolejnych latach, celem dalszego poszukiwania markerów silnie skorelowanych z badaną cechą.

Doświadczenie prowadzone w ramach Badań Podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 48 „Analiza genetyczna wybranych genotypów brzoskwiń (Prunus persica L.) z wykorzystaniem czynnika układu krzyżowań i markerów molekularnych”