

MARTA STANKIEWICZ-KOSYL**EMILIAN PITERA****STANISŁAW W. GAWROŃSKI**

Samodzielny Zakład Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa

Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Przydatność markera QTL w hodowli jabłoni odpornej na mączniaka (*Podosphaera leucotricha* (Ellis et Ev.) Salm.)*

The usefulness of a QTL marker in breeding for apple powdery mildew resistance

Parch i mączniak jabłoni, powodowane przez *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. i *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Ev.) Salm. należą do najważniejszych chorób jabłoni. Klon U 211 jest odporny na parcha, a w polowych warunkach także na mączniaka jabłoni. QTL U 7, jeden z loci cechy ilościowej (QTL — Quantitative Trait Loci) w klonie U 211 charakteryzuje się trwałym efektem działania i kontroluje duży zakres zmienności cechy (48–72%). Został on zidentyfikowany w potomstwie Idared × U 211. Celem przeprowadzonych badań była ocena przydatności jednego z markerów U 7 do selekcji wspomaganej markerami (MAS — marker-assisted selection). Stopień porażenia mączniakiem był oceniany szacunkowo w skali 0–5 w populacji Granny Smith × U 211 przez 2 lata w szkółce i przez rok w sadzie. Selekcja prowadzona przy użyciu markera mikrosatelitarnego NZ28f04 pozwoliłaby na eliminację 33–72% roślin z klasy 3 (szkółka i sad) oraz 100% roślin z klasy 4 (sad). Skuteczność selekcji była różna w zależności od sezonu wegetacyjnego. W potomstwie Granny Smith × U 211 w ciągu 2 lat obserwacji w szkółce żadnego z osobników nie zakwalifikowano do klas 4 i 5. Część potomstwa (22 rośliny) została posadzona w sadzie i tam niektóre rośliny zostały zaliczone do klasy 4. W żadnej z nich nie stwierdzono obecności allele NZ28f04 związanego z większą odpornością na mączniaka.

Słowa kluczowe: loci cechy ilościowej, marker mikrosatelitarny, mączniak jabłoni, odporność

Scab and powdery mildew, caused by *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. and *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Ev.) Salm. respectively, are the most important apple diseases. The apple clone U 211 is resistant to scab and highly resistant to powdery mildew in field conditions. The QTL U 7, one of the quantitative trait loci in the clone U 211, is responsible for 48–72% of the phenotypic variation, and its effect is stable over years. It was identified in the progeny Idared × U 211. The aim of this study was to assess effectiveness of U 7 marker for marker-assisted selection (MAS). Powdery mildew resistance was evaluated visually in a seedling population Granny Smith × U 211 for two years in the nursery, and one year in the orchard using a 0–5 scale. Selection based on the SSR marker

* Praca została zrealizowana w ramach grantu 5 P06C 032 19 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych

NZ28f04 allowed to eliminate 33–72% of plants from class 3 (nursery and orchard), and 100% of plants from class 4 (orchard). The efficiency of selection depended on the year. In the progeny Granny Smith × U 211 neither of the individuals grown in the nursery was classified in class 4 or 5 in the 2-year period of investigations. Twenty-two individuals from the progeny were planted in the orchard. In the following year some of them were classified in class 4. Neither of these plants possessed the NZ28f04 allele, associated with the higher level of resistance to powdery mildew.

Key words: apple powdery mildew, microsatellite marker, quantitative trait loci, resistance

WSTĘP

Uzyskanie odmian jabłoni o trwałej odporności na choroby pozwoli na znaczną redukcję zużycia fungicydów w sadach. Mączniak jabłoni powodowany przez grzyb *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Ev.) Salm. jest jedną z najważniejszych chorób jabłoni pod względem ekonomicznym. W zależności od warunków pogodowych rozmiar szkód może być podobny do powodowanych przez innego bardzo ważnego patogena, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Selekcja w kierunku odporności na mączniaka jabłoni jest utrudniona, ponieważ na stopień porażenia może mieć wpływ wiek rośliny, warunki środowiska i rasa patogena. Użycie markerów molekularnych pozwala rozwiązać te problemy, ponadto stwarza możliwość jednoczesnej selekcji siewek na obecność kilku genów odporności.

Klon U 211, wyselekcjonowany w Katedrze Sadownictwa i Przyrodniczych Podstaw Ogrodnictwa SGGW, w warunkach polowych wykazuje odporność na mączniaka jabłoni i przekazuje tę cechę na dużą część potomstwa (Pitera, 2003). Jest on również odporny na parcha, ponieważ pochodzi z wolnego zapylenia odmiany Primula, u której odporność warunkuje gen V_f z *Malus floribunda* 821. Na podstawie mapowania interwałowego przeprowadzonego na potomstwie Idared × U 211 stwierdzono, że odporność klonu U 211 na mączniaka jabłoni jest warunkowana między innymi przez QTL U 7 o trwałym efekcie działania i kontrolującym duży zakres zmienności cechy (48–72%). Markerem znajdującym się najbliżej piku U 7 jest NZ28f04 (Stankiewicz-Kosyl i in., 2005). Powtórzenie się w czasie efektu QTL może stanowić weryfikację analizy QTL przeprowadzonej na tym samym tle genetycznym (Sewell i in., 2000). Wśród QTL zidentyfikowanych w klonie U 211 na szczególną uwagę zasługuje więc U 7, którego efekt ujawnił się w czterech spośród pięciu lat prowadzonych obserwacji. Jednak wydaje się, że dla celów wykorzystania U 7 w hodowli odpornościowej konieczne jest jego sprawdzenie na innym tle genetycznym. Zdarza się bowiem, że efekt QTL zmienia się w zależności od tła genetycznego (Kolb i in., 2001) lub też nie można go w ogóle zidentyfikować (Fasoula i in., 2004).

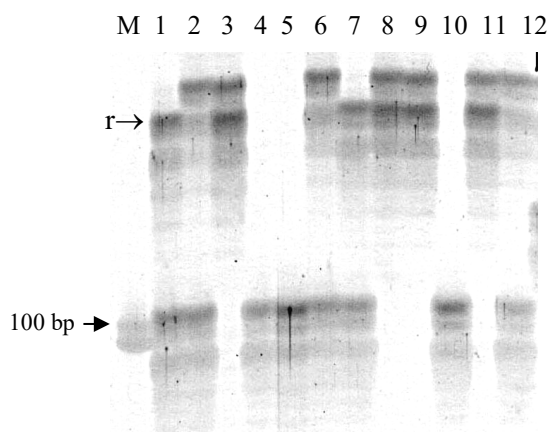
Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie możliwości szerokiego zastosowania markera NZ28f04 w programach hodowlanych wykorzystujących jako źródło odporności na mączniaka klon U 211.

MATERIAŁ I METODY

Ekstrakcję DNA z liści 50 drzew z potomstwa Granny Smith × U 211 przeprowadzono przy użyciu metody CTAB (Rogers i Bendich, 1985) z modyfikacjami (Gadamski i in., 1996). DNA roślin rodzicielskich oraz każdego z osobników z potomstwa amplifikowano w reakcji PCR przy użyciu starterów i procedury dla markera NZ28f04 opisanych przez Guilford i wsp. (1997). Produkty amplifikacji były rozdzielane w 6% poliakrylamidowym żelu denaturującym przygotowanym według procedury Sambrook i wsp. (1989) i barwione azotanem srebra według protokołu Briard i wsp. (2000). Równocześnie rośliny były oceniane w latach 2000–2001 w szkółce, a 22 z nich posadzono w sadzie w 2001 roku i obserwowano w następnym sezonie wegetacyjnym. Reakcję na mączniaka jabłoni oceniano w sześciostopniowej skali od 0 do 5 (0 — nieporażone, 5 — bardzo silnie porażone) (Borecki, 1987). Klon U 211 zaliczany jest do klasy 0, natomiast Granny Smith, jako odmiana wrażliwa na mączniaka, do klasy 4.

WYNIKI

Wynik amplifikacji markera NZ28f04 przy użyciu DNA roślin rodzicielskich oraz części osobników z potomstwa Granny Smith × U 211 przedstawia rysunek 1. Allel związany ze wzrostem odporności na mączniaka jest obecny u klonu U 211 oraz u części potomstwa, brak go natomiast u odmiany Granny Smith.

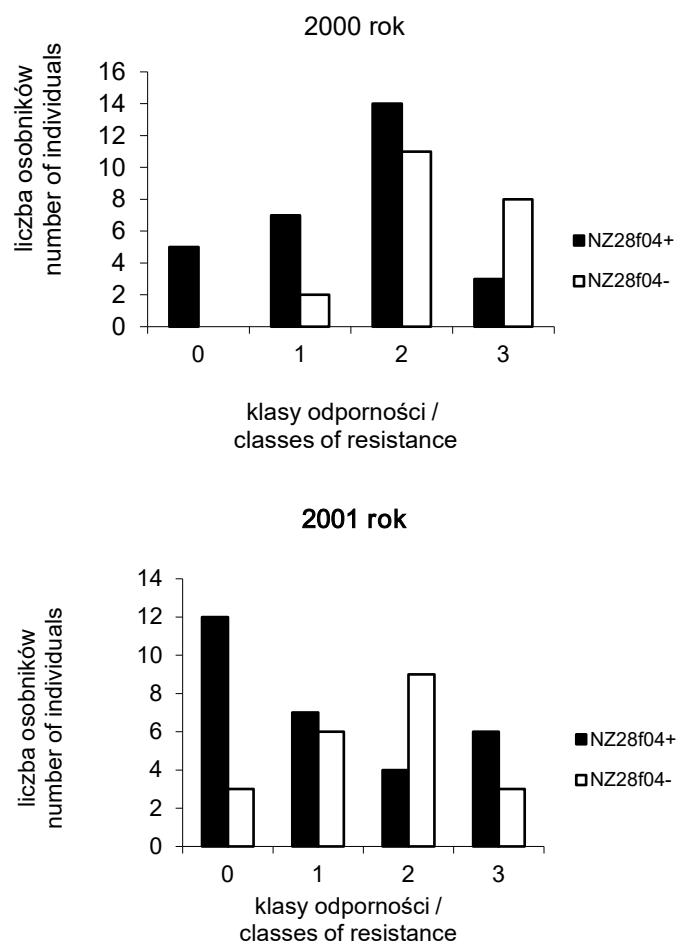


Rys. 1. Elektroforogram prezentujący produkty amplifikacji markera NZ28f04. M — marker wielkości, 1 — U 211, 2 — Granny Smith, 3 — 12: osobniki z potomstwa Granny Smith × U 211, r — allel markera związany ze wzrostem odporności na mączniaka jabłoni

Fig. 1. The result of NZ28f04 marker amplification. M — size marker, lane 1 — U 211, lane 2 — Granny Smith, lanes 3–12: individuals from the progeny, r — marker allele related to higher powdery mildew resistance

Selekcja prowadzona przy użyciu markera mikrosatelitarnego NZ28f04 pozwoliłaby na usunięcie 8 roślin średnio podatnych zaliczonych do klasy 3, jeśli wzięto by pod uwagę

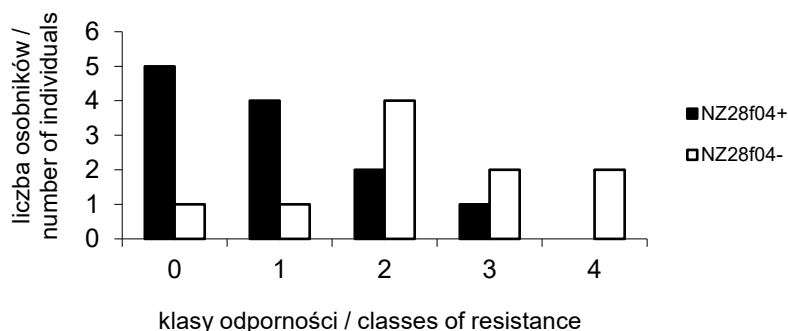
wyniki oceny polowej ze szkółki z roku 2000 (rys. 2), co stanowi 72% wszystkich roślin w klasie 3 w tym roku. W roku 2001 do klasy 3 zakwalifikowano 9 roślin, z których 3, czyli 33% nie wykazało obecności allela NZ28f04 związanego ze wzrostem odporności na mączniaka (rys. 2). W potomstwie Granny Smith × U 211 w ciągu 2 lat obserwacji w szkółce żadnego z osobników nie zakwalifikowano do klas 4 i 5.



Rys. 2. Wyniki oceny polowej w latach 2000–2001 w szkółce a obecność markera NZ28f04 wśród osobników z potomstwa Granny Smith × U 211. NZ28f04 + i – oznacza odpowiednio obecność i brak allela markera związanego ze wzrostem odporności na mączniaka

Fig. 2. Frequency distribution of individuals by class of powdery mildew resistance (results from the nursery in the years 2000 and 2001) and presence of the NZ28f04 marker in the progeny Granny Smith × U 211. NZ28f04 + and – denote respectively presence and absence of a marker allele related to higher powdery mildew resistance

Gdyby wzięto pod uwagę wyniki oceny fenotypowej z sadu (rok 2002) oraz wynik analizy z markerem, wyeliminowane zostałyby 2 rośliny, co stanowi 100% osobników zaliczonych do klasy 4 oraz 2 rośliny z klasy 3, czyli 66% (rys. 3). Rośliny charakteryzujące się odpornością lub małą podatnością na mączniaka jabłoni (klasy 0–2) nie wymagają prowadzenia ochrony w sadzie, tak więc uzasadnione jest pozostawienie tylko takich roślin do dalszej ich oceny pod względem innych cech użytkowych.



Rys. 3. Wyniki oceny polowej w sadzie w 2002 roku a obecność markera NZ28f04 wśród osobników z potomstwa Granny Smith × U 211. NZ28f04 + i – oznacza odpowiednio obecność i brak allele markera związanego ze wzrostem odporności na mączniaka

Fig. 3. Frequency distribution of individuals by class of powdery mildew resistance (results from the orchard in the year 2002) and presence of the NZ28f04 marker in the progeny Granny Smith × U 211. NZ28f04 + and – denote respectively presence and absence of a marker allele related to higher powdery mildew resistance

DYSKUSJA

Do badań zdecydowano się wziąć tylko jeden marker U 7: NZ28f04. Spośród markerów U 7 znajduje się on najbliżej piku QTL, a ponadto, jak wynika z prowadzonych badań, jeden marker wykazuje podobną skuteczność w MAS jak markery flankujące QTL (Zhou i in., 2003).

Selekcja prowadzona przy użyciu markera mikrosatelitarnego NZ28f04 pozwoliłaby na eliminację 33–72% roślin z klasy 3 (szkółka i sad) i 100% roślin z klasy 4 (sad). Podobne wyniki skuteczności selekcji wspomaganej markerami molekularnymi uzyskano dla markera QTL odporności na mączniaka winorośli (*Uncinula necator* (Schw.) Burr) (Dalbo i in., 2001), a także markerów QTL odporności na fuzariozę pszenicy (Zhou i in., 2003).

Stosunkowo dużo roślin zakwalifikowanych do klasy 3 na podstawie oceny fenotypowej ze szkółki z 2001 roku wykazało obecność allele NZ28f04 związanego ze wzrostem odporności na mączniaka. Rok ten jest równocześnie jedynym spośród pięciu analizowanych, w którym nie ujawnił się efekt działania QTL U 7 w potomstwie Idared × U 211 (Stankiewicz-Kosyl i in., 2005). Fakt ten jest prawdopodobnie wynikiem zaistnienia interakcji między QTL a czynnikami środowiska. Geny kontrolujące cechy ilościowe mogą

wykazywać różny stopień specyficzności wobec patogena (Caranta i in., 1997). Mączniak jabłoni, jak wiele innych patogenów roślin uprawnych, wykazuje zróżnicowanie w postaci ras fizjologicznych (Krieghoff, 1995). Podobną sytuację obserwowano dla odporności na parcha jabłoni, gdzie na mapie jabłoni utworzonej na bazie potomstwa Discovery × TNR 10-8 zlokalizowano 2 rodzaje QTL. Dwa z nich okazały się rasowo specyficzne, trzy warunkowały odporność na rasę 6 i 7, natomiast inne trzy na rasę 1 i 6 (Calenge i in., 2004).

Jako kolejny etap badań planuje się przekształcenie markerów AFLP innych QTL w klonie U 211 w markery SCAR i ustalenie ich przydatności w hodowli na innym tle genetycznym niż potomstwo Idared × U 211. Do czasu opracowania i potwierdzenia przydatności markerów innych QTL warunkujących odporność na mączniaka w klonie U 211 proponuje się połączenie dwóch metod selekcji: wyeliminowanie siewek nie posiadających markera NZ28f04, a następnie wysadzenie do szkółki i obserwacja pozostałych roślin. Podobne rozwiązanie przedstawiają Zhou i wsp. (2003) dla markerów QTL odporności na fuzariozę pszenicy.

Marker NZ28f04 może także posłużyć do odróżniania heterozygot od homozygot w locus markera. Osobniki posiadające 2 allele markera QTL związane ze wzrostem odporności wykazują niekiedy znacznie zmniejszoną wrażliwość na chorobę w porównaniu do osobników posiadających tylko 1 taki allel. Sytuację taką zaobserwowano m.in. dla roślin odpornych na fuzariozę pszenicy (Zhou i in., 2003), a także w przypadku odporności warunkowanej genem głównym, czego przykładem jest gen *Vf* warunkujący odporność na parcha jabłoni (Viviani i in., 1996).

WNIOSKI

1. Wyniki analizy przeprowadzonej z markerem NZ28f04 na potomstwie Granny Smith × U 211 potwierdzają stabilność QTL oznaczonego jako U7, zidentyfikowanego w potomstwie Idared × U 211.
2. Marker NZ28f04 może znaleźć zastosowanie w programach hodowlanych wykorzystujących jako źródło odporności na mączniaka klon U 211.

LITERATURA

- Borecki Z. 1987. Field susceptibility of 13 scab-resistant apple cultivars to apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha* /Ell. et Ev./ Salm.). Acta Agrobot. 40 (1-2):87 — 98.
- Briard M., Le Clerc V., Grzebelus D., Senalik D., Simon P. W. 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver staining or radioisotopes. Plant Mol. Biol. Rep. 18: 235 — 241.
- Calenge F., Faure A., Goerre M., Gebhardt C., van de Weg W. E., Parisi L., Durel C. E. 2004. A QTL analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 94: 370 — 379.
- Caranta C., Levebvre V., Palloix A. 1997. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate specific and broad spectrum quantitative trait loci. Mol. Plant-Microbe Int. 10: 862 — 870.
- Dalbo M. A., Ye G. N., Weeden W. F., Wilcox W. F., Reisch B. I. 2001. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126: 83 — 89.

- Fasoula V. A., Harris D. K., Boerma H. R. 2004. Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil and seed weight from two soybean populations. *Crop Sci.* 44: 1218 — 1225.
- Gadamski G., Ciarka D., Gawronski S. W. 1996. Molecular survey of Polish resistant biotypes of weeds. *Proc. Sec. Int. Weed Control Congress.* Copenhagen: 547 — 550.
- Guilford P., Prakash S., Zhu J. M., Rikkerink E., Gardiner S., Bassett H., Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple) abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249 — 254.
- Kolb F. L., Bai G. H., Muehlbauer G. J., Anderson J. A., Smith K. P., Fedak G. 2001. Host plant resistance genes for Fusarium head blight: mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Sci.* 41: 611 — 619.
- Krieghoff O. 1995. Entwicklung einer In-vitro-Selektionsmethode auf Resistenz von *Malus*-Genotypen gegenüber *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. und In-vitro-Differenzierung von Virulenzunterschieden des Erregers. Ph D dissertation, Humboldt-Universität, Berlin.
- Pitera E. 2003. Przydatność klonu U 211 w hodowli odpornościowej jabłoni. *Rozprawy Naukowe i Monografie.* Wyd. SGGW-AR Warszawa.
- Rogers S. O., Bendich A. J. 1985. Extraction of DNA from miligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant. Mol. Biol.* 5: 69 — 76.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sewell M. M., Bassoni D. L., Megraw R. A., Wheeler N. C., Neale D. B. 2000. Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1273 — 1281.
- Stankiewicz-Kosyl M., Pitera E., Gawronski S.W. 2005. Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U 211. *Plant Breed.* 124: 63 — 66.
- Viviani A., Kellerhals M., Gianfranceschi L., Gessler C. 1996. Towards marker-assisted breeding of scab resistant apple cultivars. *Eucarpia Fruit Breeding Section Newsletter* 2: 25 — 26.
- Zhou W. C., Kolb F. L., Bai G. H., Domier L. L., Boze L. K., Smith N. J. 2003. Validation of major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breed.* 122: 40 — 46.