

MARIUSZ LEWANDOWSKI
SYLWIA KELLER-PRZYBYŁKOWICZ
MAŁGORZATA KORBIN
EDWARD ŻURAWICZ

Instytut Ogrodnictwa, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

Kierownik Tematu: dr inż. Mariusz Lewandowski ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,
tel. 46 8345410; e-mail: mariusz.lewandowski@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 71.

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

Genetic and molecular analysis of selected apple genotypes (*Malus domestica*) for shortening of the juvenile period and quality improvement of the fruits

Słowa kluczowe: faza juwenilna, jabłoni, jakość owoców, markery molekularne

W ramach Zadania 71 w roku 2018 realizowano 2 tematy badawcze.

- Ocena fenotypowa populacji siewek pokolenia F₁ (2800 siewek) pod kątem siły wzrostu, wczesności wchodzenia w okres kwitnienia i owocowania oraz odporności roślin na ważne gospodarczo choroby (parch jabłoni, mączniak jabłoni), a także ocena efektów GCA, SCA dla badanych form rodzicielskich pod względem wybranych cech fenotypowych.
- Zagęszczanie mapy genetycznej genomów odmian ‘Free Redstar’ oraz ‘Oliwka Żółta’, reprezentujących wysoki stopień polimorfizmu genetycznego oraz istotnie różniących się długością fazy juwenilnej.

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

- Oszacowanie efektów GCA i SCA dla badanych form rodzicielskich pod względem wybranych cech fenotypowych (siła wzrostu, wczesność wchodzenia w okres

kwitnienia i owocowania, intensywność kwitnienia i owocowania, odporność roślin na choroby) w oparciu o ocenę potomstwa 28 rodzin mieszańców.

- Zagęszczenie istniejących i nowych grup sprzężeń 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 juwenilnej.

OPIS WYNIKÓW

Obliczenia dotyczące estymacji efektów GCA i SCA dla układu czynnikowego ($\text{♀}4 \times \text{♂}7$) wykonano za pomocą programu komputerowego SERGEN (Caliński i in., 2003). Wśród 11 genotypów rodzicielskich jabłoni, tylko 6 odmian: ‘Free Redstar’, ‘Alwa’, ‘Koksa Pomarańczowa’, ‘Golden Delicious’, ‘Kosztela’ i ‘Oliwka Żółta’ miało istotne (na plus lub minus) wartości efektów GCA dla siły wzrostu siewek (tab. 1).

Tabela 1

Ocena efektów GCA dla siły wzrostu siewek 11 odmian jabłoni krzyżowanych w układzie czynnikowym ($\text{♀}4 \times \text{♂}7$), Dąbrowice, 2018; program statystyczny SERGEN

| Nr matki lub ojca | Formy rodzicielskie | Siła wzrostu siewek | | | |
|--|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| | | średnica pędu przewodnikowego | | wysokość pędu przewodnikowego | |
| | | ocena efektu głównego | statystyka F dla efektu głównego | ocena efektu głównego | statystyka F dla efektu głównego |
| Analiza względem form matecznych - ♀ | | | | | |
| 1 | Free Redstar | 0,494** | 16,41 | 1,38** | 17,31 |
| 2 | Gold Milenium | 0,225 | 3,40 | -0,54 | 2,70 |
| 3 | Alwa | 0,113 | 0,86 | 1,49** | 20,11 |
| 4 | Golden Delicious | -0,832** | 46,56 | -2,32** | 49,04 |
| Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie | | 0,10 | 2,77 | 0,10 | 2,77 |
| | | 0,05 | 3,95 | 0,05 | 3,95 |
| | | 0,01 | 6,95 | 0,01 | 6,95 |
| Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie | | 0,10 | 5,21 | 0,10 | 5,21 |
| | | 0,05 | 6,52 | 0,05 | 6,52 |
| | | 0,01 | 9,72 | 0,01 | 9,72 |
| Analiza względem form ojcowskich - ♂ | | | | | |
| 1 | Glogierówka | 0,716 | 5,38 | 1,80 | 3,79 |
| 2 | Kosztela | -1,048** | 11,53 | -0,84 | 0,82 |
| 3 | Malinowa Oberlandzka | -0,451 | 2,14 | -0,36 | 0,15 |
| 4 | Kronselska | 0,694 | 5,05 | 1,86 | 4,09 |
| 5 | Oliwka Żółta | -0,746 | 5,83 | -3,22** | 12,16 |
| 6 | Koksa Pomarańczowa | 1,197** | 15,04 | 0,08 | 0,01 |
| 7 | McIntosh | -0,361 | 1,37 | 0,68 | 0,54 |
| Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie | | 0,10 | 2,77 | 0,10 | 2,77 |
| | | 0,05 | 3,95 | 0,05 | 3,95 |
| | | 0,01 | 6,95 | 0,01 | 6,95 |
| Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie | | 0,10 | 6,26 | 0,10 | 6,26 |
| | | 0,05 | 7,60 | 0,05 | 7,60 |
| | | 0,01 | 10,88 | 0,01 | 10,88 |

Objaśnienie:

* wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,05$

** wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,01$

Odmiany: ‘Free Redstar’, ‘Alwa’, ‘Koksa Pomarańczowa’ wykazują istotnie dodatnie wartości efektów GCA dla tej cechy. Odmiany te użyte w programach krzyżowań będą więc donorami silnego wzrostu u potomstwa siewek tego gatunku. Natomiast odmiany Golden Delicious’, ‘Kosztela’ i ‘Oliwka Żółta’ miały istotnie negatywne efekty GCA dla tej cechy. Odmiany te użyte jako formy rodzicielskie są więc donorami genów warunkujących słaby wzrost u potomstwa siewek jabłoni. Należy jednak pamiętać, że w przypadku drzew jabłoni, część odmian początkowo po posadzeniu w polu rośnie silnie, a po wejściu w okres owocowania siła ich wzrostu maleje. Przekłada się to na uzyskiwanie większej liczby owoców, o bardziej atrakcyjnym wyglądzie (Rejman, 1994). Wyniki analizy ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni pokazują, że wartość ujemną efektów GCA dla tej cechy roślin oszacowano dla odmian: ‘Free Redstar’ i ‘Gold Milenium’, a dla odmiany ‘Free Redstar’ dodatkowo dla stopnia porażenia roślin przez mączniaka jabłoni (tab. 2).

Tabela 2

Ocena efektów GCA dla stopnia porażenia przez parcha i mączniaka jabłoni siewek 11 odmian jabłoni krzyżowanych w układzie czynnikowym (♀4 x ♂7), Dąbrowice, 2018; program statystyczny SERGEN

| Nr matki lub ojca | Formy rodzicielskie | Stopień porażenia siewek | | | |
|---|---|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | | parch jabłoni | | mączniak jabłoni | |
| | | ocena efektu głównego | statystyka F dla efektu głównego | ocena efektu głównego | statystyka F dla efektu głównego |
| Analiza względem form matecznych - ♀ | | | | | |
| 1 | Free Redstar | -0,339** | 98,50 | -0,064** | 12,96 |
| 2 | Gold Milenium | -0,132** | 14,94 | -0,039 | 4,84 |
| 3 | Alwa | 0,050 | 2,14 | 0,082** | 21,16 |
| 4 | Golden Delicious | 0,421** | 151,97 | 0,021 | 1,44 |
| | Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie | 0,10 0,05 0,01 | 2,77 3,95 6,95 | 0,10 0,05 0,01 | 2,77 3,95 6,95 |
| | Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie | 0,10 0,05 0,01 | 5,21 6,52 9,72 | 0,10 0,05 0,01 | 5,21 6,52 9,72 |
| Analiza względem form ojcowskich - ♂ | | | | | |
| 1 | Glogierówka | 0,238 | 4,81 | 0,054 | 3,10 |
| 2 | Kosztela | 0,188 | 3,00 | -0,040 | 1,75 |
| 3 | Malinowa Oberlandzka | -0,143 | 1,73 | 0,029 | 0,88 |
| 4 | Kronselska | -0,287 | 6,95 | -0,015 | 0,25 |
| 5 | Oliwka Żółta | -0,218 | 4,01 | 0,029 | 0,88 |
| 6 | Koksa Pomarańczowa | 0,182 | 2,81 | -0,040 | 1,75 |
| 7 | McIntosh | 0,038 | 0,12 | -0,015 | 0,25 |
| | Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie | 0,10 0,05 0,01 | 2,77 3,95 6,95 | 0,10 0,05 0,01 | 2,77 3,95 6,95 |
| | Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie | 0,10 0,05 0,01 | 6,26 7,60 10,88 | 0,10 0,05 0,01 | 6,26 7,60 10,88 |

Objaśnienie:

* wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,05$

** wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,01$

Genotypy te są donorami genów warunkujących odporność lub małą podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Natomiast odmiany ‘Golden Delicious’ i ‘Alwa’ miały istotnie dodatnie efekty GCA, odpowiednio dla stopnia porażenia roślin przez parcha i mączniaka jabłoni. Obie odmiany użyte jako formy rodzicielskie są więc donorami genów warunkujących podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Nasze wyniki mają potwierdzenie w literaturze, która wskazuje, że genotypy ‘Free Redstar’ i ‘Gold Milenium’ są odmianami odpornymi na parcha jabłoni (V_f), zaś genotypy ‘Golden Delicious’ i ‘Alwa’ są odmianami średnio podatnymi na tego patogena (Rejman, 1994; Żurawicz, 2003; Lewandowski i Żurawicz, 2007; Żurawicz i in., 2013). W badaniach prowadzonych przez Lewandowskiego i Żurawicza (2007) stwierdzono także, że odmiana ‘Free Redstar’ jest odmianą odporną lub mało podatną na mączniaka jabłoni.

Do sporządzenia map genetycznych nowych odmian jabłoni wykorzystywane jest zjawisko konserwatywności (kolinearności) markerów, których sekwencje zidentyfikowane mogą być w genomach innych roślin tego samego lub innego gatunku (Gianfranceschi i in., 1998; Velasco i in., 2010). Zjawisko to wykorzystano w niniejszych badaniach podczas wyboru sekwencji markerów umożliwiających wysycenie mapy genetycznej jabłoni odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’. W wyniku reakcji amplifikacji przeprowadzonych z 50 markerami SSR zidentyfikowano 108 polimorficznych alleli, segregujących w badanej populacji mapującej, dla których określono *loci* w genomach obu badanych form rodzicielskich. Analiza typu segregacji oraz frekwencji rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami pozwoliła na sporządzenie szkieletu grup sprzężeń stanowiących homologi chromosomów I, VII oraz VIII genomu jabłoni. Uzyskany szkielet mapy wybranych chromosomów obejmuje fragment genomu gatunku *Malus* o długości 595 cM. Na podstawie analizy łącznie 230 zidentyfikowanych (lata 2015–2018) heterozygotycznych alleli, różnicujących genomy odmian ‘Free Redstar’ oraz ‘Oliwka Żółta’, określono typ segregacji oraz ich rozkład w populacji mapującej (test χ^2), uzyskanej w wyniku skrzyżowania obu form rodzicielskich. Po określeniu typu segregacji oszacowano, że 86 wprowadzonych na mapę alleli markerów występujących w siewkach potomnych pochodziło z genomu odmiany ‘Free Redstar’, natomiast 89 z genomu odmiany ‘Oliwka Żółta’. W przypadku 55 markerów zidentyfikowano allele, które pochodziły z genomów obu form rodzicielskich. Na tym etapie badań sporządzono odrębne mapy genetyczne genomów jabłoni odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’. Sporządzona mapa genomu odmiany ‘Free Redstar’ zawiera 36 grup sprzężeń, w obrębie których zidentyfikowano *loci* 127 alleli markerów SSR, segregujących w populacji mapującej. Uzyskane fragmenty wykazały istotny stopień homologii do chromosomów XIV, V, XVI, XIII, III, X, IX, XVIII, VII, VI, VIII, XII, II oraz I, referencyjnego genomu jabłoni. Natomiast na sporządzonej mapie genomu odmiany ‘Oliwka Żółta’ zlokalizowano 180 alleli markerów SSR sprzężonych w 43 grupach sprzężeń homologicznych do chromosomów I, IX, VI, XVI, X, XIII, V, XV, XVII, XIV, VIII oraz III genomu *Malus*. Wielkość zmapowanego genomu odmiany ‘Free Redstar’ wyniosła 1 522 cM, natomiast genomu odmiany ‘Oliwka Żółta’ — 2 130 cM. Stopień kolinearności zmapowanych fragmentów genomów obu odmian jabłoni z odczytami

referencyjnej mapy rodzaju *Malus* oszacowano na 58% (analiza porównawcza dla mapy zintegrowanej 'Free Redstar' × 'Oliwka Żółta') (Liebhard i in., 2002, 2003).

WNIOSKI

1. Badane genotypy rodzicielskie jabłoni różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem siły wzrostu siewek, wyrażonej średnicą i wysokością pędu przewodnikowego oraz pod względem stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni.
2. Oszacowane efekty GCA i SCA 11 form rodzicielskich przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Odmiany te użyte w krzyżowaniach mogą przyczynić się do poprawy lub pogorszenia siły wzrostu u potomstwa, a także warunkować zwiększenie lub obniżenie podatności na parcha i mączniaka jabłoni u siewek jabłoni.
3. Nie obserwuje się pełnej kolinearności konstruowanej przez nas mapy genetycznej jabłoni 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' z referencyjną mapą genomu *Malus* (poziom 58%).
4. Utworzone w Instytucie mapy genetyczne stanowią precyzyjną bazę do dalszych badań nad lokalizacją genów oraz regionów genomów, warunkujących długość fazy juvenilnej i poprawy jakości owoców, a także innych ważnych cech użytkowych badanych odmian jabłoni dla potrzeb hodowli twórczej gatunku.

LITERATURA

- Caliński T., Czajka S., Kaczmarek Z., Krajewski P. 2003. Podręcznik użytkownika programu SERGEN 4. Metodyka statystyczna i obsługa programu SERGEN (Wersja 4 dla Windows) przeznaczonego do serii doświadczeń odmianowych i genetyczno-hodowlanych. Wyd. IGR PAN w Poznaniu: 77.
- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069 — 1076.
- Lewandowski M., Żurawicz E. 2007. Plonowanie nowych parchoodpornych odmian jabłoni hodowli Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach na różnych typach podkładek. *Roczniki AR Poznań CCCLXXXIII, Ogrodnictwo* 41: 333 — 337.
- Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., van de Weg E., Gessler C. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10: 217 — 241.
- Liebhard R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1497 — 1508.
- Rejman A. 1994. Jabłonie. W: Rejman A. (ed.). *Pomologia — odmianoznawstwo roślin sadowniczych*. PWRiL, Warszawa: 19 — 130.
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S.K., Troggio M., Pruss D., Salvi S., Pindo M., Baldi P., Castelletti S., Cavaiuolo M., Coppola G., Costa F., Cova V., Dal Ri A., Goremykin V., Komjanc M., Longhi S., Magnago P., Malacarne G., Malnoy M., Micheletti D., Moretto M., Perazzolli M., Si-Ammour A., Vezzulli S., Zini E., Eldredge G., Fitzgerald L. M., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J.T., Reid J., Wardell B., Kodira C., Chen Z., Desany B., Niazi F., Palmer M., Koepke T., Jiwan D., Schaeffer S., Krishnan V., Wu C., Chu V.T., King S. T., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchietti A., Kater M. M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A.C., Bus V., Chagné D., Crowhurst R. N., Gleave A. P., Lavezzo E., Fawcett J.A., Proost S., Rouzé P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R. P.,

- Durel C. E., Gutin A., Bumgarner R. E., Gardiner S. E., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42 (10): 833 — 841. DOI:10.1038/ng.654.
- Żurawicz E. 2003. Pomologia — odmianoznawstwo roślin sadowniczych. Aneks. Wyd. PWRiL, Warszawa.
- Żurawicz E., Lewandowski M., Pruski K. 2013. Productivity of selected Polish scab resistant apple cultivars grown on different rootstocks. *Acta Hort.* 976: 141 — 146.