

Zadanie 71 Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego i poprawy jakości owoców

W roku 2018 prowadzono 2 tematy badawcze:

Temat badawczy 1

Ocena fenotypowa populacji siewek pokolenia F₁ (2.800 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

Celem badań było 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.

Materiał do badań stanowiło 2800 siewek (28 kombinacji krzyżowań x 100 siewek) rosnących na podkładce M.9 w kwaterze hodowlanej w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Doświadczenie założone jest w układzie losowanych bloków kompletnych w 4 powtórzeniach po 25 siewek na poletku, czyli każda rodzina mieszańców reprezentowana jest przez 100 siewek. Siewki wysadzone są w rozstawie 3,50 x 1,0 m. W roku 2018 dla każdej rośliny/siewki wykonano: (a) ocenę siły wzrostu wyrażoną średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm) po zakończeniu wegetacji roślin (październik), (b) ocenę wczesności wchodzenia w okres kwitnienia i owocowania (termin), (c) ocenę intensywności kwitnienia i owocowania siewek rosnących na podkładce M.9, (d) ocenę stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*), (e) ocenę stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni (*Podosphaera leucotricha*).

Ocenę siły wzrostu roślin wykonano w dniach 12-16 października 2018 roku poprzez pomiar wszystkich siewek. Wyniki analizy statystycznej (program SERGEN) ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla siły wzrostu siewek, wyrażonej średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm) dla wszystkich rodzin mieszańców, stanowiących potomstwo 11 genotypów jabłoni (4 genotypy mateczne: 'Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium' i 7 genotypów ojcowskich: 'Glogierówka', 'Kronselka', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa'), krzyżowanych w układzie czynnikowym (♀4 x ♂7) wykazały, że badane formy rodzicielskie miały istotnie zróżnicowane efekty GCA dla tej cechy morfologicznej. Wyniki pokazują, że istotnie dodatnie wartości efektów GCA dla tej cechy roślin oszacowano dla odmian: 'Free Redstar', 'Alwa' i 'Koksa Pomarańczowa'. Oznacza to, że genotypy te przekazują potomstwu zdolność do tworzenia drzew o silnym wroście. 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.

Efekty SCA dla analizowanych 28 rodzin mieszańcowych przyjmowały wartość zarówno dodatnią, jak i ujemną. Dla siły wzrostu siewek jabłoni, wyrażonej średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm), istotnie pozytywne efekty SCA uzyskano dla

7 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' x 'Glogierówka', 'Free Redstar' x 'Kronselska', 'Free Redstar' x 'McIntosh', 'Gold Milenium' x 'Kosztela', 'Gold Milenium' x 'Malinowa Oberlandzka', 'Alwa' x 'Malinowa Oberlandzka' i 'Golden Delicious' x 'Oliwka Żółta'. Oznacza to, że w przypadku tych rodzin genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich warunkuje silny wzrost roślin. Istotnie negatywne efekty SCA dla tej cechy uzyskano dla 10 rodzin mieszańcowych: 'Free Redstar' x 'Kosztela', 'Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka', 'Free Redstar' x 'Kronselska', 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta', 'Free Redstar' x 'Koksa Pomarańczowa', 'Gold Milenium' x 'Glogierówka', 'Gold Milenium' x 'McIntosh', 'Alwa' x 'Glogierówka', 'Golden Delicious' x 'Malinowa Oberlandzka' i 'Golden Delicious' x 'Kronselska'. Zatem należy oczekiwać, że mieszańce należące do tych rodzin będą charakteryzować się słabym wzrostem.

W okresie od 25 kwietnia do 29 czerwca 2018 roku wykonano ocenę wczesności (termin) oraz intensywności kwitnienia i owocowania siewek rosnących na podkładce M.9 w kwaterze hodowlanej w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Jednak ze względu na młody wiek roślin tylko pojedyncze drzewka zakwitły i zaowocowały w niektórych rodzinach mieszańcowych. Zakłada się, że ocena i analiza zdolności kombinacyjnej cech morfologicznych roślin, wysokości plonowania i jakości owoców (w szczególności ich wyglądu i atrakcyjności, wielkości owoców) będą kontynuowane w kolejnych latach badań, kiedy siewki wejdą w okres owocowania.

W dniach 04-06.07.2018 r. została wykonana także ocena stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni. Wyniki analizy statystycznej (program SERGEN) ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni dla wszystkich rodzin mieszańców, stanowiących potomstwo 11 genotypów jabłoni, krzyżowanych w układzie czynnikowym ($\text{♀}4 \times \text{♂}7$) wykazały, że badane formy rodzicielskie miały istotnie zróżnicowane efekty GCA dla tych cech morfologicznych. Wyniki pokazują, że istotnie różne od zera wartości efektów GCA dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni oszacowano dla odmian: 'Free Redstar' i 'Gold Milenium'. Pomimo, że była to wartość ujemna, ale dla hodowcy oznacza to, że genotypy te są donorami genów warunkujących odporność lub małą podatność na parcha jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Natomiast odmiana 'Golden Delicious' miała istotnie dodatni efekt GCA dla tej cechy. Odmiana ta użyta jako forma rodzicielska jest więc donorem genów warunkujących podatność na parcha jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Istotnie ujemną wartość efektów GCA dla stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni oszacowano dla odmiany 'Free Redstar'. Genotyp ten jest więc donorem genów warunkujących odporność lub małą podatność na mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Natomiast odmiana 'Alwa' miała istotnie dodatni efekt GCA dla tej cechy. Odmiana ta użyta jako forma rodzicielska jest więc donorem genów warunkujących podatność na mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni.

Efekty SCA dla analizowanych 28 rodzin mieszańcowych przyjmowały wartość zarówno dodatnią, jak i ujemną. Dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni, wartość ujemną efektów SCA uzyskano dla 5 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' x 'Koksa Pomarańczowa', 'Gold Milenium' x 'Kosztela', 'Alwa' x 'Oliwka Żółta', 'Golden Delicious' x 'Glogierówka' i 'Golden Delicious' x 'Malinowa Oberlandzka'. Oznacza to, że w przypadku tych rodzin genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich warunkuje odporność lub małą podatność roślin na parcha jabłoni. Wartość dodatnią efektów SCA dla tej cechy uzyskano

dla 5 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka', 'Alwa' x 'Koksa Pomarańczowa', 'Alwa' x 'McIntosh', 'Golden Delicious' x 'Kosztela' i 'Golden Delicious' x 'Oliwka Żółta'. Zatem należy oczekiwać, że mieszańce należące do tych rodzin będą charakteryzować się podatnością na parcha jabłoni. Dla stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni, wartość ujemną efektów SCA uzyskano tylko dla jednej rodziny mieszańców 'Alwa' x 'Koksa Pomarańczowa'. Oznacza to, że w przypadku tej rodziny genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich warunkuje odporność lub małą podatność roślin na mączniaka jabłoni. Wartość dodatnią efektów SCA dla tej cechy uzyskano także dla jednej rodziny mieszańców 'Gold Milenium' x 'Koksa Pomarańczowa'. Zatem należy oczekiwać, że mieszańce należące do tej rodziny będą charakteryzować się podatnością na mączniaka jabłoni.

Temat badawczy 2

Zagęszczanie mapy genetycznej genomów odmian 'Free Redstar' oraz 'Oliwka Żółta', reprezentujących wysoki stopień polimorfizmu genetycznego oraz istotnie różniących się długością fazy juvenilnej

Celem tematu było 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 juvenilnej.

Materiał do badań stanowiły młode liście 198 genotypów potomnych 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta', o potwierdzonym statusie genetycznym oraz dwóch form rodzicielskich. Genomowe DNA wyizolowano z młodych liści metodą Aldrich'a i Culis'a. Analizie poddano 50 oligonukleotydów, komplementarnych do sekwencji mikrosatelitarnych genomu *Malus*, których allele segregowały w populacji mapującej (bazy SSR Apple Database (www.hidras.unimi.it)), zlokalizowanych na chromosomach I, VII i VIII mapy referencyjnej genomu *Malus x domestica*. Do amplifikacji fragmentów SSR i identyfikacji alleli polimorficznych, segregujących w populacji mapującej użyto oligonukleotydy nieznakowane, których amplikony analizowano w świetle białym po rozdziale elektroforetycznym w 7% żelach poliakrylamidowych wybarwionych roztworem azotanu srebra oraz wyznakowane (WelRed, Sigma), których detekcję i ocenę wielkości molekularnych obliczano za pomocą programu komputerowego (CEQ 8000 Genomic Analysis System, CEQ 8000 Software v.5.0, Beckman Coulter). Do analizy odległości mapowych (cM) zidentyfikowanych alleli SSR w badanej populacji zastosowano funkcję *Kosambi* programu JoinMap v. 3.0. Sprzężenia pomiędzy badanymi markerami weryfikowano za pomocą współczynnika wartości krytycznej LOD (*Logarithm Odd Ratio*; próg wartości LOD ≥ 3), maksymalnego prawdopodobieństwa ML (*Maximum Likelihood*) oraz oceny zależności pomiędzy rzeczywistym a oczekiwanym (teoretycznym) rozkładem genotypów w populacji segregującej (test CHI-KWARAT: χ^2). Częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami w badanej populacji mapującej oszacowana została przy użyciu współczynnika REC ≤ 50 (JoinMap v.3.0). Do graficznego przedstawienia mapy genetycznej wykorzystano program Map Chart 2.0.

a). Analiza markerów SSR wytypowanych w roku 2017, przeprowadzona dla populacji uzyskanej ze skrzyżowania odmian 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta'

W wyniku reakcji amplifikacji przeprowadzonych z 50 markerami SSR zidentyfikowano 108 polimorficzne allele, segregujące 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.

b). Analiza uzyskanej (2015-2017) mapy genetycznej genomów jabłoni odmian 'Free Redstar' oraz 'Oliwka Żółta'

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'. Uzyskana mapa genomu odmiany 'Free Redstar' zawiera 36 grup sprzężeń, w obrębie których zidentyfikowano loci 127 alleli markerów SSR, segregujących w populacji mapującej. Uzyskane grupy sprzężeń wykazały istotny stopień homologi 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' x 'Oliwka Żółta').