

STUDIUM SEGREGACE MAJORGENU ŘÍDÍCÍCH REZISTENCI JABLONÍ VŮČI PADLÍ JABLOŇOVÉMU A STRUPOVITOSTI

Segregation Study of Majorgenes Controlling the Resistance against Powdery Mildew and Scab in Apples

Martina Melounová¹, Pavel Vejl¹, Petr Sedlák¹, Jana Zoufalá¹, Jan Blažek²

¹Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze

²VŠÚO Holovousy, s.r.o.

Abstract

Detection of genes controlling the powdery mildew (*Pl₁*) and the apple scab (*Vf*) resistance and their segregation was the subject of two progenies crosses - HL 39 (Florina x *Malus robusta*) x Rubinstep and HL 804 (FAW3566 x A-679-2) x HL 39 (Florina x *Malus robusta*). In these crosses was discovered 52,5% (55% in the second cross) heterozygous in *Pl₁* gene and 60% (62,5%) heterozygous in *Vf* gene by means of molecular genetics markers. Presence of *Pl₁* gene was found in 6 of 11 studied genotypes. These genotypes can be used in process of new cultivars creating.

Key words: *Malus*, powdery mildew, apple scab, *Pl₁* gene, *Vf* gene, resistance, PCR, segregation

Souhrn

Předmětem studia dvou kombinačních křížení HL 39 (Florina x *Malus robusta*) x Rubinstep a HL 804 (FAW3566 x A-679-2) x HL 39 (Florina x *Malus robusta*), byla detekce genů řídících rezistenci vůči padlí jabloňovému (*Pl₁*) a strupovitosti (*Vf*) a jejich segregace. Pomocí molekulárněgenetických markerů byla v těchto kříženích prokázána přítomnost 52,5%, resp. 55% jedinců s heterozygotní sestavou *Pl₁* genu a 60%, resp. 62,5% hybridů vykazující heterozygotní genotyp v genu *Vf*. U 6 z 11 zkoumaných hybridů byla zjištěna přítomnost *Pl₁* genu. Tyto genotypy mohou být využity při tvorbě nových rezistentních odrůd.

Úvod

Charakteristika rezistence vůči padlí jabloňovému

Padlí jabloňové, stejně jako strupovitost jableň, patří mezi nejvážnější a nejrozšířenější choroby jableň. Padlí jabloňové způsobuje vřekovýtrusá houba *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Evher.) Salm., která napadá pupeny, květenství, listy, větve i plody. Mezi nejcitlivější odrůdy patří Jonathan, Idared a Coxova Reneta, naproti tomu odrůdy Starkrimson Delicious a Lord Lambourne jsou velmi odolné (BLAŽEK, 2001).

Šlechtění jableň odolných vůči patogenu *Podosphaera leucotricha* je velice aktuální, neboť se jedná o chorobu, která způsobuje značné ekonomické ztráty. Výnosy napadených stromů se snižují, zhoršuje se kvalita plodů a infikované stromy mají tendenci k alternující plodnosti (BLAŽEK, 2001).

Většina pěstovaných odrůd je vůči padlí jabloňovému citlivá, a proto je nutné v komerčních výsadbách až 17x ročně aplikovat postřiky fungicidů (BUTT *et al.*, 1983). Alternativou k chemické ochraně je rezistentní šlechtění. Genetické studie ukázaly, že vysokou hladinu rezistence nesou hybridy pocházející z křížení s některými botanickými druhy rodu *Malus*, a to *Malus robusta*, který je donorem major genu *Pl₁* a *Malus zumi* nesoucí major gen *Pl₂* (DAYTON, 1977). Mezi minoritně využívané zdroje major genů zodpovídající za rezistenci vůči padlí jabloňového patří gen *Pl-w* odvozený asijské odrůdy

White Angel (GALLOT *et al.*, 1985), *Pl-d* ze zdroje D 12 (VISSER a VERHAEGH, 1977) a gen *Pl-m* (DAYTON, 1997), které jsou však používány především na území Velké Británie.

Kromě monogenní rezistence, která je řízena výše uvedenými majorgeny, se také uplatňuje rezistence polygenní. BERGENDAL a NYBOM (1966) uvádějí jako zdroje parciální rezistence odrůdy Golden Delicious, Lord Lambourne a Worcester Pearmain. Rovněž VISSER *et al.* (1974) udává, že potomci křížení odrůd Antonovka a Lord Lambourne vykazují rezistenci vůči padlí jabloňovému. BLAŽEK a SYROVÁTKO (1991) uvádí vysoké zastoupení genotypů vykazující polygenní rezistenci z křížení odrůd Starkimson Delicious x Starkspur Delicious, Priscilla x Lord Lambourne. Donory parciální rezistence jsou také kultivary Discovery, Malinové holovouské, Redspur Delicious, Britemac (BLAŽEK, 2004).

Pro identifikaci a selekci genotypů se ve šlechtění využívá několika typů markerů. Nejčastěji aplikované, a to i ve šlechtitelské praxi, jsou PCR markery založené na principech polymerázové řetězové reakce, které umožňují rychlou a jasnou detekci studovaných genů a případnou selekci genotypů ve velmi raných stádiích ontogeneze. Proces selekce, která využívá těchto markerů, se běžně označuje jako MAS „Marker Assisted Selection“ – markery asistovaná selekce.

Markery užívané pro studium choroby způsobovanou askomycetou *Podosphaera leucotricha* se zaměřují především na detekci jednotlivých majorgenů. Jako první byl publikován RAPD marker OPAT 20 (MARKUSSEN *et al.*, 1995), který je v těsné vazbě (4,5 cM) s majorgemem *Pl₁*, který byl nalezen v botanickém druhu *Malus robusta*. Genetické markery detekující gen *Pl₂* původem z botanického druhu *Malus zumi* charakterizovali SEGLIAS a GESSLER (1997). JAMES *et al.* (2004) publikoval sekvenci dvojice PCR primerů pro detekci genu *Pl-d*, známa je i sekvence primerů pro identifikaci genotypů nesoucí gen *Pl-w* z genového zdroje White Angel (EVANS *et al.*, 2003).

V České republice, ve VŠÚO Holovousy, s.r.o., jsou rovněž připravovány genetické materiály, které ve svém genomu mají gen *Pl₁* zodpovědný za rezistenci vůči padlí jabloňovému. Tyto genotypy byly podrobeny molekulárně genetické analýze pomocí PCR – RAPD markeru.

Charakteristika rezistence vůči strupovitosti jabloní

Strupovitost je způsobena vréčkatou houbou *Venturia inaequalis* CKE., která je schopna napadat všechny orgány stromu mimo kořenů. Její konidiová forma známá pod starším jménem *Fusicladium dendriticum* Fckl. parazituje na listech, květech, plodech a větvích.

Rezistentní šlechtění je velice efektivním způsobem ochrany před tímto patogenem. Pěstování rezistentních odrůd jabloní má velký význam rovněž z ekologického hlediska - výrazné omezení fungicidních přípravků i z hlediska ekonomického - omezení aplikace pracovně náročných postřiků.

DVOŘÁK *et al.* (1976) popisuje dva základní typy rezistence jabloní vůči *Venturia inaequalis* CKE. Jako první typ uvádí kvalitativní - monogenně založenou rezistenci, který je charakteristický pro některé botanické druhy rodu *Malus*. Segregace náchylných a rezistentních potomků vzniklých hybridizací probíhá podle Mendelových pravidel. Významným donorem genu výše popsane rezistence je jabloň mnohokvětá - *Malus floribunda* Sieb. - klon 821.

Na základě mezidruhově hybridizace s *Malus floribunda* Sieb. byla získána první rezistentní odrůda Prima (DAYTON *et al.*, 1970). V současné době lze uvést ze světového sortimentu například tyto odrůdy s monogenně založenou rezistencí: Britegold, Dayton, Enterprise, Freedom, Goldrush, Jonafree, Liberty, Macfree, McShay, Moira, Murray, Nova Easygro, Florina, Nova Mac, Nova Spy, Priam, Prima, Priscilla, Redfree, Richelieu, Rouville, Sir Prize, Trent, William's Pride. U starších odrůd jabloní českého původu je odolnost vůči strupovitosti založena obvykle polygenně (VONDŘÁČEK, 1960). V současné době je však i v České republice běžně prováděno šlechtění na monogenně založenou rezistenci jabloní vůči strupovitosti s využitím genů pocházejících z *Malus floribunda* Sieb.

Ve šlechtitelských programech mohou být kromě genu *Vf* využity i jiné geny pro získání rezistence vůči strupovitosti. Jedná se například o geny *Va*, *Vm*, *Vr*, *Vbj*. Donorem genu *Vm* je botanický druh *Malus micromalus*. Kvalita genotypů s rezistencí podmíněnou uvedenými geny je obvykle nižší

(KELLERHALS a FURRER, 1994). Tyto geny byly využity rovněž v České republice pro tvorbu rezistentních odrůd vůči strupovitosti. Následnou selekcí byly získány například rezistentní odrůdy Angold a Produkta. Donorem genů rezistence byla odrůda Antonovka (BLAŽEK, 1995, BLAŽEK a PAPRŠTEIN, 1994).

Dalším typem rezistence jabloní vůči strupovitosti je polygenně determinovaná rezistence. Polygenní založení rezistence je obecně obtížněji markerovatelné ve srovnání s monogenním typem rezistence.

Současně s vývojem rezistentních genotypů jabloní byl zjištěn i vývoj ras *Venturia inaequalis* CKE., které se vyznačují patogenitou vůči genotypům se známými majorgeny rezistence (PARISI *et al.*, 1993, URBANIETZ *et al.* 1999). Tyto závěry potvrdili rovněž PARISI a LESPINASSE (1999), kteří navíc zjistili, že rasa nenapadá donory rezistence nesoucí geny *V_{bj}*, *V_a* a *V_r*. CROSBY *et al.* (1992) uvádí, že donorem genu *V_r* je jabloň nízká - *Malus pumila* Mill., genu *V_{bj}* jabloň bobulnatá - *M. baccata* Borkh. Jackii a genu *V_b* *M. baccata* Borkh. Hansen's.

Posuzování rezistence ve skleníkových podmínkách se běžně provádí pomocí inokulačních testů, které simulují optimální podmínky pro rozvoj houbové choroby a na jejichž základě probíhá primární selekce. Po jejím provedení následuje selekce sekundární – pomocí molekulárních markerů.

Metodika

Rostlinný materiál

Pro genetické analýzy byla použita dvě kombinačního křížení: HL 39 (Florina x *Malus robusta*) x Rubinstep a HL 804 x HL 39 (Florina x *Malus robusta*), u kterých byla provedena detekce *V_f* a *Pl₁* genu a 11 potencionálních donorů – tabulka 2, u kterých byla studována přítomnost *Pl₁* genu. Veškerý hodnocený materiál pocházel z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích, s.r.o. Pro molekulárněgenetické účely byly odebrány čerstvé mladé listy, které byly po sběru ihned skladovány v transportním mrazicím boxu a následně zmrazovány v tekutém dusíku.

Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy Plant Mini Kitu (Qiagen, SRN). Pro izolaci jednoho vzorku postačuje množství 100 mg rostlinného materiálu. Kvalita (vysokomolekularita) a kvantita (koncentrace a čistota) DNA byla hodnocena UV-spektrofotometricky a elektroforeticky na 1% agarózovém gelu.

Amplifikace *Pl₁* genu

Pro detekci *Pl₁* genu ve studovaných genotypech byl použit RAPD primer OPAT 20 (5' ACA TCA GCC C 3') podle (MARKUSSEN *et al.*, 1995) poskytující charakteristický fragment dominantní alely o velikosti 450 bp. Podmínky amplifikace a koncentrace výchozích složek premixu byly modifikovány na následující: koncentrace templátové dsDNA 2ng/ 25μl, 2,5 mM MgCl₂, primer 30 ng/25μl, 0,28 dNTP, 0,7 U polymerázy (Fermentas, Litva). Amplifikace probíhala v T-Gradient thermocykleru (Biometra, SRN) při těchto reakčních podmínkách: 1 cyklus (94 °C – 180 s, 35 °C – 45 s, 72 °C – 60 s), 40 cyklů (94 °C – 20 s, 35 °C – 45 s, 72 °C – 60 s), 1 cyklus (72 °C – 360 s).

Amplifikovaný RAPD produkt byl obarven ethidium bromidem a separován v 1,5% horizontálním agarózovém gelu při konstatním napětí 3,3 V . cm⁻¹ po dobu 150 minut (Bio-Rad, USA).

Amplifikace *V_f* genu

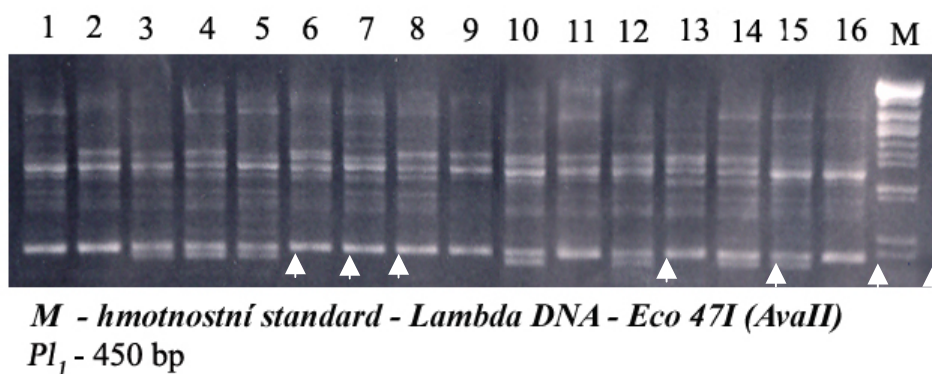
Detekce *V_f* genu byla provedena podle metodiky TARTARINI *et al.* (1999), VEJL *et al.* (2003) a MELOUNOVÁ *et al.* (2004).

Výsledky a diskuse

Detekce a segregace Pl_1 genu

Pl_1 gen byl detekován na základě použití RAPD reakce. Metoda podle MARKUSSEN et al. (1995) byla optimalizována řadou pokusů, jejichž výsledkem byla stále totožná velikost amplifikovaného fragmentu 540 bp. Složení premixu a teplotní profil reakce byl upraven. V případě teplotního profilu byla zachována annelační teplota, ale teplota denaturace templátové DNA byla o 1 °C snížena z důvodu použití jiného termocykleru a odlišné termostabilní DNA polymerázy. Koncentrace výchozích složek premixu byly upraveny tak, aby vedly ke většímu zvýraznění amplifikovaného produktu. Elektroforeogram části analyzované kombinace HL 39 x Rubinstep představuje obrázek 1.

Obrázek 1: Elektroforeogram kombinace HL 39 x Rubinstep



Přítomnost Pl_1 genu byla vyhodnocována u dvou kombinačních křížení: HL 39 x Rubinstep a HL 804 x HL 39, v obou kombinacích se analýza prováděla u 40 reprezentativních semenáčků. Donorem dominantní alely Pl_1 genu byl v prvním křížení hybrid HL 39 nesoucí tuto alelu zřejmě v heterozygotní sestavě (Pl_1pl_1), který byl použit jako mateřská komponenta. Otcovský genotyp Rubinstep je citlivý vůči padlí a má genotyp pl_1pl_1 . V druhém křížení byl jako mateřský genotyp použit hybrid HL 804 (pl_1pl_1), který je rovněž citlivý vůči padlí. Jako otcovská komponenta byl použit již zmíněný rezistentní hybrid HL 39. Obě dvě křížení tudíž předpokládala štěpení potomstva na heterozygoty a recesivní homozygoty v poměru 1:1. Experimentálně bylo potvrzeno 21 (52,5%) heterozygotních hybridů a 19 (47,5%) recesivních homozygotů v křížení HL 39 x Rubinstep a 22 (55%) heterozygotů a 18 (45%) recesivních homozygotů v křížení HL 804 x HL 39. χ^2 bylo zjištěno, že u první hybridní kombinace se zjištěný štěpný poměr shodoval s teoretickým poměrem s pravděpodobností $P \in (0,3 - 0,5)$. U druhé hybridní kombinace byla pravděpodobnost shody $P \in (0,5 - 0,7)$ - tabulka 1. Segregaci alel v tomto poměru odpovídá i skutečnosti, že semenáčky nebyly selektovány na základě umělé inokulace, neboť izoláty *Podospheara leucotricha* nejsou k dispozici.

Tabulka 1: Studium segregace genu Pl_1 v hybridních kombinacích

Rodičovská generace		Teoretický štěpný poměr F_1	Skutečný štěpný poměr F_1	χ^2	Pravděpodobnost P
Mateřský genotyp	Otcovský genotyp				
HL39 (Florina x <i>M. robusta</i>) Pl_1pl_1	Rubinstep pl_1pl_1	20 Pl_1pl_1 20 pl_1pl_1	21 Pl_1pl_1 19 pl_1pl_1	0,4	(0,5-0,7)
HL804 (FAW3566 x A-679-2) pl_1pl_1	HL39 (Florina x <i>M. robusta</i>) Pl_1pl_1	20 Pl_1pl_1 20 pl_1pl_1	22 Pl_1pl_1 18 pl_1pl_1	0,55	(0,3-0,5)

Pomocí RAPD markeru OPAT 20 byly rovněž analyzovány následující hybridy HL 37, HL 39, HL 424, HL 428, HL 429, HL 431, HL 791, HL 793, HL 796, HL 807 a HL 827 – tabulka 2, které by mohly být potencionálními zdroji *Pl₁* genu pro tvorbu rezistentních novošlechtění vůči padlí. Molekulárněgenetická analýza jasně prokázala, že genotypy HL 37, HL 39, HL 424, HL 428, HL 429, HL 431 mají ve svém genomu dominantní alelu *Pl₁* genu pocházející z *Malus robusta*, která je jejím primárním zdrojem. Donorem *Pl₁* genu je rovněž i genotyp A 814/9, zatímco genotypy FAW 3566 a A 679-2 donory *Pl₁* genu nejsou.

Tabulka 2: Původ hybridů jabloní – potenciálních donorů *Pl₁* genu

Genotyp	Původ	Sestava <i>Pl₁</i> genu
HL 37	Florina x <i>Malus robusta</i>	<i>Pl₁pl₁</i>
HL 39	Florina x <i>Malus robusta</i>	<i>Pl₁pl₁</i>
HL 424	Florina x <i>Malus robusta</i>	<i>Pl₁pl₁</i>
HL 428	Florina x A-814/9	<i>Pl₁pl₁</i>
HL 429	Florina x A-814/9	<i>Pl₁pl₁</i>
HL 431	Florina x A-814/9	<i>Pl₁pl₁</i>
HL 791	FAW 3566 x A-679-2	<i>pl₁pl₁</i>
HL 793	FAW 3566 x A-679-2	<i>pl₁pl₁</i>
HL 796	FAW 3566 x A-679-2	<i>pl₁pl₁</i>
HL 807	FAW 3566 x A-679-2	<i>pl₁pl₁</i>
HL 827	FAW 3566 x A-679-2	<i>pl₁pl₁</i>

Detekce a segregace *Vf* genu

Molekulárněgenetické analýzy prokazující přítomnost *Vf* genu byly provedeny na základě optimalizovaných postupů podle VEJL *et al.* (2003) a MELOUNOVÁ *et al.* (2004), kteří použili dvojici kodominantního primeru navrženého dle TARTARINI *et al.* (1999) pro detekci dominantní, heterozygotní i recesivní sestavy *Vf* genu. Dominantní alela se po amplifikaci vyznačuje charakteristickou velikostí 466 bp a recesivní alela je podmíněna výskytem fragmentu o velikosti 724 bp. Při analýzách detekce *Vf* genu byly získány fragmenty velikostně shodných s výsledky publikovaných podle TARTARINI *et al.* (1999).

Donorem dominantní alely *Vf* genu byl hybrid HL 39 (Florina x *Malus robusta*), konkrétně odrůda Florina (*Vf/vf*). Odrůda Rubinstep (*vf/vf*) a hybrid FAW3566 (*vf/vf*) dominantní alelou *Vf* genu nedisponují. V křížení HL 39 x Rubinstep bylo detekováno 24 (60%) genotypů s heterozygotní sestavou, zbývajících 16 (40%) mělo recesivní sestavu *Vf* genu. Výsledek segregace alel odpovídá s pravděpodobností $P \in (0,1 - 0,3)$ teoretickému štěpnému poměru 1:1.

Křížení HL 804 x HL 39 představuje po genetické stránce křížení recesivního homozygota a heterozygota v genu *Vf* s očekávaným štěpným poměrem 1:1. Genetické analýzy odhalily přítomnost 25 (62,5%) jedinců nesoucích *Vf* gen v heterozygotní sestavě a 15 (37,5%) recesivně homozygotních jedinců, což s pravděpodobností $P \in (0,1 - 0,3)$ odpovídá předpokládanému štěpnému poměru.

U těchto dvou analyzovaných křížení byla provedena inokulace izoláty *Venturia inaequalis* CKE. a provedena následná selekce senzitivních genotypů. Výsledky molekulárněgenetické analýzy ukazují, že přesto byly nalezeny genotypy s recesivní formou genu *Vf*, což představuje v případě křížení HL 39 x Rubinstep zastoupení 40% *vf/vf* jedinců, resp. u kombinace HL 804 x HL 39 37,5% *vf/vf* jedinců. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena nevýraznou reakcí rostliny na přítomnost patogena, případně pomalým rozvojem infekce po provedené inokulaci. Statistické vyhodnocení segregace markerů je prezentováno v tabulce 3.

Tabulka 3: Studium segregace genu *Vf* v hybridních kombinacích

Rodičovská generace		Teoretický štěpný poměr F ₁	Skutečný štěpný poměr F ₁	χ^2	Pravděpodobnost P
Mateřský genotyp	Otcovský genotyp				
HL39 (Florina x <i>M. robusta</i>) <i>Vf</i> <i>vf</i>	Rubinstep <i>vf</i> <i>vf</i>	20 <i>Vf</i> <i>vf</i> 20 <i>vf</i> <i>vf</i>	24 <i>Vf</i> <i>vf</i> 16 <i>vf</i> <i>vf</i>	1,6	(0,1-0,3)
HL804 (FAW3566 x A-679-2) <i>vf</i> <i>vf</i>	HL39 (Florina x <i>M. robusta</i>) <i>Vf</i> <i>vf</i>	20 <i>Vf</i> <i>vf</i> 20 <i>vf</i> <i>vf</i>	25 <i>Vf</i> <i>vf</i> 15 <i>vf</i> <i>vf</i>	2,5	(0,1-0,3)

Závěr

Uvedené výsledky ukazují, že použití molekulárněgenetických markerů založených na principu PCR reakce představuje velmi efektivní metodu, pomocí které je možno detekovat geny *Vf* a *Pl₁* a na jejím základě provádět selekci genotypů i ve velmi časném stádiu vývoje semenáčků. Takovýto způsob selekce je možný kdykoliv, a to i bez předcházejících inokulačních testů. Ve studovaných kombinačních křížení HL 39 (Florina x *Malus robusta*) x Rubinstep a HL 804 (FAW3566 x A-679-2) x HL 39 (Florina x *Malus robusta*) byla prokázána přítomnost 47,5% resp. 45% heterozygotních hybridních genotypů vykazující *Pl₁* gen a 60%, resp. 62,5% genotypů s heterozygotní sestavou *Vf* genu, které mohou být využity pro tvorbu nových rezistentních odrůd.

Literatura

Přehled citované literatury je k dispozici u autora.

Příspěvek vznikl za podpory grantových projektů agentury NAZV MZe ČR QD1267 a QD1049.

Kontaktní adresa autora: Mgr.Martina Melounová. Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, E-mail: melounova@af.czu.cz