

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

W roku 2017 prowadzono 2 tematy badawcze:

### ***Temat badawczy 1***

Ocena fenotypowa populacji siewek pokolenia F<sub>1</sub> (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) oraz przygotowanie materiału roślinnego do założenia doświadczenia polowego, a także ocena efektów GCA, SCA oraz współczynników odziedziczalności i korelacji genetycznej dla badanych cech fenotypowych

Celem badań była ocena fenotypowa populacji siewek (pokolenia F<sub>1</sub>) dla uzyskania mieszańców o krótkim okresie juwenilnym i wysokiej jakości owoców oraz przygotowanie materiału roślinnego do założenia doświadczenia polowego, a także ocena efektów GCA, SCA oraz współczynników odziedziczalności i korelacji genetycznej dla badanych cech fenotypowych.

Na przełomie stycznia/lutego 2017 pobrano z wierzchołków pędów przewodnikowych siewek (z programu krzyżowań wykonanego w roku 2015) i naszczepiono na karłowej podkładce M.9. Uzyskane szczepy na początku kwietnia posadzono do 5-litrowych pojemników foliowych (cylindrów) i ustawiono na ziemi w wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym. Jesienią 2017 roku w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach założono doświadczenie w układzie losowanych bloków kompletnych w 4 powtórzeniach po 25 siewek na poletku. Siewki wysadzono w rozstawie 3,50 x 1,0 m. Łącznie wysadzono 2.800 siewek (28 kombinacji krzyżowań x 100 siewek). W roku 2017 dla każdej rośliny/siewki (z programu krzyżowań wykonanego w roku 2014, obejmującego 28 kombinacji krzyżowań x 100 siewek (4 powtórzenia po 25 roślin) = 2.800 siewek) 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*).

Wyniki analizy statystycznej (program SERGEN) ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla siły wzrostu siewek dla 11 genotypów rodzicielskich 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. Istotnie różne od zera wartości efektów GCA dla tej cechy roślin oszacowano dla odmian: 'Free Redstar', 'Gold Milenium', 'Alwa', 'Glogierówka' i 'Koksa Pomarańczowa'. Była to wartość dodatnia, co oznacza, że genotypy te przekazują potomstwu zdolność do tworzenia drzew o silnym wzroście. Natomiast odmiany 'Golden Delicious' i 'Oliwka Żółta' miały istotne negatywne efekty GCA dla tej cechy. Obie odmiany użyte jako formy rodzicielskie są więc

donorami genów warunkujących słaby wzrost u potomstwa siewek jabłoni. Efekty SCA dla 28 rodzin mieszańcowych przyjmowały wartość zarówno dodatnią, jak i ujemną. Dla siły wzrostu siewek jabłoni istotnie pozytywne efekty SCA uzyskano dla 7 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' x 'Glogierówka', 'Free Redstar' x 'Koksa Pomarańczowa', 'Gold Milenium' x 'Glogierówka', 'Gold Milenium' x 'Kosztela', 'Alwa' x 'Malinowa Oberlandzka', 'Alwa' x 'McIntosh' i 'Golden Delicious' x 'Koksa Pomarańczowa'. 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 6 rodzin mieszańcowych: 'Free Redstar' x 'Kosztela', 'Gold Milenium' x 'Koksa Pomarańczowa', 'Gold Milenium' x 'McIntosh', 'Alwa' x 'Glogierówka', 'Golden Delicious' x 'Glogierówka' i 'Golden Delicious' x 'Malinowa Oberlandzka'. Zatem należy oczekiwać, że mieszańce należące do tych rodzin będą charakteryzować się słabym wzrostem.

Wstępna ocena wczesności (termin) oraz intensywności kwitnienia i owocowania siewek została wykonywana w dniach 27.04-30.06.2017 r. Jednak ze względu na młody wiek roślin (1 rok po posadzeniu) we wszystkich rodzinach mieszańcowych zakwitły tylko pojedyncze drzewka. W trakcie wykonywania oceny intensywności kwitnienia, w dniu 10 maja 2017 r. wystąpił kilkugodzinny przymrozek wiosenny ze spadkiem temperatury do  $-3,0^{\circ}\text{C}$ . Przymrozek ten uszkodził kwiaty lub młode rozwijające się zawiązki owoców. Dalsze obserwacje potwierdziły, że żadne z ocenianych drzewek nie zaowocowało. W dniach 25-27.09.2017 r. została wykonana ocena stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni. W pierwszym roku oceny nie obserwowano objawów porażenia liści i pędów roślin (brak białych, mączystych nalotów w przypadku mączniaka jabłoni i ciemno-oliwkowych plam pokrytych aksamitnym nalotem na górnej stronie liści w przypadku parcha 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 juwenilnej

Celem tematu było zagęszczenie grup sprzężeń mapy genetycznej odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' (2015-2016), poprzedzone analizą segregacji alleli markerów SSR w populacji mapującej.

Materiał do badań stanowiły młode liście 200 genotypów potomnych 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta', o potwierdzonym statusie genetycznym, oraz liście obu form rodzicielskich, użytych do krzyżowania. Genomowe DNA izolowano z młodych liści metodą wg Aldrich'a i Culis'a. Analizie poddano 50 oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji mikrosatelitarnych genomu *Malus* (SSR Apple Database, [www.hidras.unimi.it](http://www.hidras.unimi.it)), których allele segregowały w populacji mapującej, a zlokalizowanych na chromosomach I, IX i XVII mapy referencyjnej genomu *Malus x domestica*. W pierwszym etapie badań do amplifikacji fragmentów SSR użyto oligonukleotydów nieoznakowanych, a uzyskane w reakcji PCR amplikony analizowano w świetle białym po rozdziale elektroforetycznym w 7% żelach poliakrylamidowych, wybarwionych roztworem azotanu srebra. Po użyciu oligonukleotydów wyznakowanych (WelRed, Sigma) namnożone fragmenty DNA identyfikowano 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  $LOD \geq 3$ ), maksymalnego prawdopodobieństwa ML (*Maximum Likelihood*) oraz oceny zależności pomiędzy rzeczywistym a oczekiwanym (teoretycznym) rozkładem genotypów w populacji segregującej (test CHI-KWARAT:  $\chi^2$ ). Częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami w badanej populacji mapującej oszacowana została przy użyciu współczynnika  $REC \leq 50$  (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 dwudziestoma spośród 50 testowanych starterów SSR, zidentyfikowano 53 polimorficzne allele, segregujące w populacji mapującej oraz określono ich loci w genomach badanych form rodzicielskich. Analiza typu segregacji oraz frekwencji rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami pozwoliła na sporządzenie szkieletu grup sprzężeń dla homologów chromosomów I, IX oraz XVII genomu jabłoni, dotychczas nie zmapowanych dla odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta'. Uzyskany szkielet obejmował fragment genomu jabłoni o długości 175 cM.

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

Na podstawie analizy wszystkich dotychczas zidentyfikowanych markerów (173 allele), różnicujących genomy odmian 'Free Redstar' oraz 'Oliwka Żółta', określono typ segregacji oraz ich rozkład w populacji mapującej (test  $\chi^2$ ). Typowy rozkład 'mendelowski' odnotowano dla 138 alleli polimorficznych. Po określeniu typu segregacji oszacowano, że 70 wprowadzonych na mapę alleli markerów występujących w populacji pochodziło z genomu odmiany 'Free Redstar', natomiast 68 z genomu odmiany 'Oliwka Żółta'. W przypadku 35 markerów zidentyfikowano allele pochodzące z genomów obu form rodzicielskich.

Uzyskana mapa genomu odmiany 'Free Redstar' (930 cM) zawiera obecnie osiemnaście grup sprzężeń, w obrębie których zidentyfikowano loci 66 alleli markerów SSR, segregujących w populacji mapującej. Uzyskane grupy sprzężeń wykazały wysoki stopień homologii do chromosomów XIII, III, IX, X, I, V, XIV, XVI oraz XVII referencyjnej mapy genetycznej, opracowanej dla rodzaju *Malus*. Na mapie genomu odmiany 'Oliwka Żółta' (1075 cM) zlokalizowano 110 alleli markerów SSR sprzężonych w dziewiętnastu grupach sprzężeń homologicznych do chromosomów XIII, III, XV, IX, V, X, XVI, VI, I oraz XVII z mapy referencyjnej. Stopień kolinearności zmapowanych fragmentów genomów obu odmian jabłoni z odczytami referencyjnej mapy rodzaju *Malus* oszacowano na 65% (analiza porównawcza dla mapy zintegrowanej 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta').

Poster prezentowany podczas Ogólnopolskiej Ogrodniczej Konferencji Naukowej „Ziemia, Roślina, Człowiek”, Kraków, 20-21 września 2017 r., uwzględnia wyniki badań z Tematu badawczego 1 „Ocena możliwości skrzyżowania w układzie czynnikowym 11 genotypów jabłoni w oparciu o wykonanie 28 kombinacji zapyleń dla uzyskania mieszańców pokolenia F<sub>1</sub>” (Sprawozdanie za rok 2014, str. 4-9) oraz z Tematu badawczego 1 „Ocena możliwości skrzyżowania w układzie czynnikowym 11 genotypów jabłoni w oparciu o wykonanie 28 kombinacji zapyleń dla uzyskania mieszańców pokolenia F<sub>1</sub> oraz ich ocena fenotypowa” (Sprawozdanie za rok 2015, str. 3-12).

Lewandowski Mariusz, Żurawicz Edward, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, Skierniewice, „Kielkowanie nasion jabłoni (*Malus domestica*) w zależności od krzyżowanych genotypów rodzicielskich”.



## KIELKOWANIE NASION JABŁONI (*MALUS DOMESTICA*) W ZALEŻNOŚCI OD KRZYŻOWANYCH GENOTYPÓW RODZICIELSKICH



**Mariusz Lewandowski, Edward Żurawicz**  
Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
e-mail: [Manusz.Lewandowski@inhort.pl](mailto:Manusz.Lewandowski@inhort.pl)

### WSTĘP

Nasiona większości roślin sadowniczych klimatu umiarkowanego, w tym nasiona jabłoni, po wydobyciu z owoców są niezdolne do kiełkowania, ponieważ znajdują się w stanie głębokiego spoczynku fizjologicznego. Do wykielkowania wymagają posprzętnego dojrzewania, które w programach hodowlanych odbywa się podczas zabiegu stratyfikacji. Stratyfikację nasion jabłoni rozpoczyna się zaraz po wydobyciu z owoców (Keulemans i in. 1994) lub po ich wysuszeniu i przechowaniu w temperaturze pokojowej (Dayton 1977). Ustąpienie spoczynku nasion następuje jedynie wtedy, gdy pozostają one przez około 6 do 14 tygodni w chłodnym, dobrze zaopatrzonej w tlen i odpowiednio wilgotnym środowisku (Bartlett 1961). Optymalna temperatura stratyfikacji wynosi 3-5°C i nie może wahać się w granicach szerszych niż od 0 do 10°C (Abbott 1955). Stabe wschody nasion mogą być spowodowane tym, że część wysianych nasion nie dojrzała posprzętnego dojrzewania. Nasiona mogą się różnić pod względem wymagań co do długości oddziaływania bodźca niskich temperatur nie tylko w obrębie potomstwa określonych par rodzicielskich, ale również między rodzinami. Oznacza to, że długość posprzętnego dojrzewania nasion mieszańców może być uzależniona od genotypu form rodzicielskich użytych do krzyżowania (Pitera 2003, Lewandowski i Żurawicz 2007). Ślaski (1964) stwierdził, że długość okresu stratyfikacji zależy od gatunku i odmiany, a także warunków przebiegu wegetacji w okresie formowania się i dojrzewania nasion, pory zbioru owoców (ich dojrzałości), pory wydobycia nasion z miąższu oraz warunków stratyfikacji (rodzaj podłoża, wilgotność i temperatura).

### CEL BADAŃ

Celem prezentowanych badań jest wykonanie oceny zdolności kiełkowania stratyfikowanych nasion jabłoni, otrzymanych z 2 programów krzyżowań wykonanych w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach.

### MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono w latach 2014-2015. Do programów krzyżowań (układ czynnikowy 4:2 x 7:3), w sumie 28 kombinacji krzyżowań wybrano 4 genotypy macieczne ('Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium') i 7 genotypów ojcowskich ('Glogierówka', 'Kronselska', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa'). W dniach 21-24 kwietnia 2014 r. oraz 30 kwietnia – 3 maja 2015 r. wykonano programy krzyżowań w kolekcji odmian w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Owoce uzyskane z tych programów krzyżowań zbierano sukcesywnie w miarę ich dojrzewania i umieszczano w chłodni w temperaturze +1°C. W tych warunkach przechowywano je do połowy października 2014 i 2015 roku, po czym przeprowadzono wydobycie nasion z owoców (fot. 1). Bezpośrednio po wybraniu nasiona umyto i pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Pod koniec października 2014 i 2015 r. nasiona odkażono 0,5% roztworem fungicydu Alette 80 WG (poprzez zamoczenie na 48 godz., fot. 2) i poddano stratyfikacji polegającej na umieszczeniu ich w wilgotnym, płukany piasku w perforowanych torebkach foliowych i przetrzymywaniu w chłodniarce w temperaturze około +5°C (fot. 3). Nasiona kiełkujące (fot. 4) sukcesywnie wyjmowano z piasku i wysadzano do małych kwadratowych doniczek plastikowych, o wymiarach 7 cm x 7 cm x 10 cm i pojemności 0,3 l, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku w stosunku objętościowym 1:1:1 (1 nasiono do 1 doniczki). Doniczki z wysianymi nasionami ustawiano na parapeku ze szklarni ze zmienną temperaturą (dzień – 22°C, noc – 18°C), pod sztucznym oświetleniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia.

### LITERATURA

- Abbott D.L. 1955. Temperature and the dormancy of apple seeds. In: Rep. Int. Congr. Scheveningen, p. 746-753.
- Bartlett C.E.C. 1961. The after-ripening of apple seeds in the fruit during cold storage. Ann. Rep. Agr. and Hort. Long Ashton, Res. Sta. Bristol: 66-67.
- Dayton D.F. 1977. Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha*. Hort Science 12 (3): 225-226.
- Keulemans R., Eysen R., Coida G. 1994. Improvement of seed set and seed germination in apple. In: Progress in Temperate Fruit Breeding (Schmidt H. and Kellerhals M., Eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 225-228.
- Lewandowski M., Żurawicz E. 2007. Wpływ genotypu na kiełkowanie nasion *Malus domestica* i szybkość zakwitania siewek jabłoni zaszczerpionych na podkładce M.9. W: Naturalna i indukowana zmienność w genetycznym doskonaleniu roślin ogrodniczych. Monografia pod red. P. Nowaczyka. Wydawnictwa Uczelniane Uniwersytetu Techniczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy: 73-80.
- Pitera E. 2003. Przydatność klonu U 211 w hodowli odpornościowej jabłoni. Rozprawy Naukowe i Monografie (Rozprawa habilitacyjna), Wydawnictwo SGGW: 1-106.
- Ślaski J. 1964. Szkółkarstwo sadownicze. PWRiL, Warszawa: 442 ss.



Fot. 1. Wydobycie nasion z owoców



Fot. 2. Odkazanie nasion



Fot. 3. Stratyfikacja nasion



Fot. 4. Kielkowanie nasion

### WYNIKI

Tabela 1. Kielkowanie nasion jabłoni po stratyfikacji w latach 2014-2015

Rodziny mieszańców (rodowód)	Liczba ocenianych nasion		Kiełkujące nasiona po stratyfikacji			
	2014	2015	liczba	(%)	2014	2015
Free Redstar x Glogierówka	409	293	368	223	90	76
Free Redstar x Kosztela	407	309	353	246	87	80
Free Redstar x Malinowa Oberlandzka	393	355	315	265	80	75
Free Redstar x Kronselska	178	276	147	218	83	79
Free Redstar x Oliwka Żółta	281	387	241	310	86	80
Free Redstar x Koksa Pomarańczowa	358	212	303	175	85	83
Free Redstar x McIntosh	136	171	123	154	90	90
Gold Milenium x Glogierówka	120	143	115	121	96	85
Gold Milenium x Kosztela	123	176	116	144	94	82
Gold Milenium x Malinowa Oberlandzka	220	174	198	138	90	79
Gold Milenium x Kronselska	135	120	126	104	93	87
Gold Milenium x Oliwka Żółta	250	313	211	255	84	81
Gold Milenium x Koksa Pomarańczowa	105	184	103	142	98	77
Gold Milenium x McIntosh	103	91	102	84	99	92
Alwa x Glogierówka	169	233	152	176	90	76
Alwa x Kosztela	108	167	104	134	96	80
Alwa x Malinowa Oberlandzka	104	222	102	172	98	77
Alwa x Kronselska	106	165	103	133	97	81
Alwa x Oliwka Żółta	158	323	146	234	92	72
Alwa x Koksa Pomarańczowa	108	141	105	118	97	84
Alwa x McIntosh	102	53	102	46	100	87
Golden Delicious x Glogierówka	160	174	144	143	90	82
Golden Delicious x Kosztela	212	165	189	137	89	83
Golden Delicious x Malinowa Oberlandzka	106	358	105	276	99	77
Golden Delicious x Kronselska	108	184	103	145	97	79
Golden Delicious x Oliwka Żółta	169	227	148	176	88	78
Golden Delicious x Koksa Pomarańczowa	126	182	122	156	97	86
Golden Delicious x McIntosh	122	255	117	210	96	82
<b>Razem</b>	<b>5,074</b>	<b>6,053</b>	<b>4,563</b>	<b>4,835</b>	<b>89,9</b>	<b>79,9</b>

Generalnie lepiej kiełkowały nasiona z programu krzyżowań wykonanego w 2014 roku (średnio 89,9%), niż w roku 2015 (średnio 79,9%). W roku 2014 najlepiej kiełkowały nasiona stwierdzono w rodzinach: 'Alwa' x 'McIntosh' (100%), 'Gold Milenium' x 'McIntosh' (99%) i 'Golden Delicious' x 'Malinowa Oberlandzka' (99%), a najmniej w rodzinach: 'Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka' (80%), 'Free Redstar' x 'Kronselska' (83%) i 'Gold Milenium' x 'Oliwka Żółta' (84%). W roku 2015 najlepiej kiełkowały nasiona w rodzinach: 'Gold Milenium' x 'McIntosh' (92%) i 'Free Redstar' x 'McIntosh' (90%), a najmniej w rodzinach: 'Alwa' x 'Oliwka Żółta' (72%) i 'Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka' (75%).

Praca została wykonana w ramach Badań Podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej. Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego i poprawy jakości owoców, zadanie 71, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Abstrakt zamieszczony w materiałach konferencyjnych:

Lewandowski Mariusz, Żurawicz Edward, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, Skierniewice, „**Kielkowanie nasion jabłoni (*Malus domestica*) w zależności od krzyżowanych genotypów rodzicielskich**”. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa „Ziemia, Roślina, Człowiek”, Kraków, 20-21 września 2017 r. Materiały konferencyjne: 106.

### **KIELKOWANIE NASION JABŁONI (*MALUS DOMESTICA*) W ZALEŻNOŚCI OD KRZYŻOWANYCH GENOTYPÓW RODZIELSKICH**

Mariusz Lewandowski, Edward Żurawicz  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

W latach 2014-2015 wykonano ocenę zdolności kielkowania stratyfikowanych nasion jabłoni, otrzymanych z 2 programów krzyżowań wykonanych w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach. Do programów krzyżowań (układ czynnikowy (4♀ x 7♂), w sumie 28 kombinacji krzyżowań) wybrano 4 genotypy mateczne ('Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium') i 7 genotypów ojcowskich ('Glogierówka', 'Kronselska', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa'). W dniach 21-24 kwietnia 2014 r. oraz 30 kwietnia – 3 maja 2015 r. wykonano programy krzyżowań w kolekcji odmian w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Owoce uzyskane z tych programów krzyżowań zbierano sukcesywnie w miarę ich dojrzewania i umieszczano w chłodni w temperaturze +1°C. W tych warunkach przechowywano je do połowy października 2014 i 2015 roku, po czym przeprowadzono wydobywanie nasion z owoców. Bezpośrednio po wybraniu nasiona umyto i pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Pod koniec października 2014 i 2015 r. nasiona odkażono 0,5% roztworem fungicydu Aliette 80 WG (poprzez zamoczenie na 48 godz.) i poddano stratyfikacji polegającej na umieszczeniu ich w wilgotnym, płukanym piasku w perforowanych torebkach foliowych i przetrzymywaniu w chłodni w temperaturze około +5°C. Nasiona kielkujące sukcesywnie wyjmowano z piasku i wysadzano do małych kwadratowych doniczek plastikowych, o wymiarach 7 cm x 7 cm x 10 cm i pojemności 0,3 l, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku w stosunku objętościowym 1:1:1 (1 nasiono do 1 doniczki). Doniczki z wysianymi nasionami ustawiano na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień – 22°C, noc – 18°C), pod sztucznym doświetlaniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia.

Generalnie lepiej kielkowały nasiona z programu krzyżowań wykonanego w 2014 roku (średnio 89,9%), niż w roku 2015 (średnio 79,9%). W roku 2014 najczęściej skielkowanych nasion stwierdzono w rodzinach: 'Alwa' x 'McIntosh' (100%), 'Gold Milenium' x 'McIntosh' (99%) i 'Golden Delicious' x 'Malinowa Oberlandzka' (99%), a najmniej w rodzinach: 'Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka' (80%), 'Free Redstar' x 'Kronselska' (83%) i 'Gold Milenium' x 'Oliwka Żółta' (84%). W roku 2015 najlepiej kielkowały nasiona w rodzinach: 'Gold Milenium' x 'McIntosh' (92%) i 'Free Redstar' x 'McIntosh' (90%), a najslabiej w rodzinach: 'Alwa' x 'Oliwka Żółta' (72%) i 'Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka' (75%).

*Badania finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 71 „Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego i poprawy jakości owoców”.*