

Zadanie 75: Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem różnej pory dojrzewania i jakości owoców

W roku 2018 realizowano cztery tematy badawcze:

Temat badawczy 1

Indywidualna ocena cech fenotypowych roślin maliny właściwej (siewek i ich form rodzicielskich, rosnących w doświadczeniu polowym, założonym w 2014 r.) pod względem następujących cech: plonowanie roślin, jakość owoców, siła wzrostu roślin, pokrój roślin, kolczastość pędów.

Celem badań przeprowadzonych w temacie, realizowanym w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Ogrodnictwa było uzyskanie wyników oceny fenotypowej wybranych cech maliny właściwej, niezbędnych do oszacowania efektów GCA i SCA dla badanych form rodzicielskich oraz współczynników odziedziczalności i korelacji genetycznej dla tych cech.

Materiałem roślinnym była populacja krzewów maliny właściwej, rosnąca w doświadczeniu polowym, założonym jesienią 2014 roku. Populacja ta obejmuje krzewy-siewki mieszańców pokolenia F₁, otrzymane ze skrzyżowania w układzie diallelicznym, według II metody Griffinga, oraz 10 odmian maliny właściwej ('Canby', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Polana', 'Polka', 'Radziejowa', 'Schönemann', 'Sokolica', 'Veten' i 'Willamette'). Przy doborze odmian do programu krzyżowań brano pod uwagę ich różne pochodzenie geograficzne i różne właściwości biologiczne, w tym różne cechy fenotypowe.

Oceniano następujące fenotypowe cechy roślin: plonowanie, jakość owoców (w tym atrakcyjność, barwę i wielkość owoców), siłę wzrostu roślin, pokrój roślin oraz kolczastość pędów. Stwierdzono, że oceniane siewki w różnym stopniu łączą cechy form rodzicielskich, zgodnie z prawem Mendla, wskazującym, że cechy dziedziczą się niezależnie. W związku z tym wykazano, że jest możliwe poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie gatunku *Rubus idaeus*, do którego należą uprawiane odmiany maliny właściwej. Szczególnie pożądane jest połączenie w jednym genotypie takich cech maliny, jak zdolność do wytwarzania wysokiej jakości owoców, wydłużone letnio-jesienne owocowanie oraz bezkolcowość pędów. Wyniki badań pokazują, że w obrębie dużej populacji mieszańców można znaleźć pojedynki bezkolcowe lub o zredukowanych kolcach, produkujące dobrej jakości owoce w wydłużonym okresie czasu.

Temat badawczy 2

Optymalizacja warunków rozmnażania *in vitro* i rozmnożenie w warunkach *in vitro* 10 pojedynków (klonów) maliny właściwej, wyselekcjonowanych w latach 2016-2017 z siewek rosnących w doświadczeniu polowym, założonym w 2014 r., dla założenia kolekcji klonów (w pojemnikach i w gruncie).

Celem tego tematu, realizowanego w Zakładzie Biologii Stosowanej i w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Ogrodnictwa, była optymalizacja warunków rozmnażania *in vitro* i rozmnożenie *in vitro* wyselekcjonowanych pojedynków dla założenia kolekcji klonów w pojemnikach i w gruncie (w celu kontynuowania ich dalszej oceny dla uzyskania klonów elitarnych) oraz przekazania do zasobów genowych IO. Materiałem roślinnym były pojedynki (siewki) wyselekcjonowane w temacie badawczym nr 1, łącznie 10 pojedynków. Pąki wierzchołkowe i kątowe używane jako eksplantaty inicjalne były pobierane w okresie od stycznia do czerwca 2018 roku. W miesiącach styczeń – marzec z pojedynków matecznych odcinane były jednoroczne pędy i wstawiane do wody w warunkach szklarniowych w celu pobudzenia pąków do rozwoju. Od kwietnia, po ruszeniu wegetacji, pąki inicjalne pobierano z wytypowanych pojedynków rosnących w kolekcji polowej. Eksplantaty inicjalne po sterylizacji powierzchniowej w 0,1 % roztworze chlorku rtęci, wykładane były po jednym do próbki na pożywkę inicjalną i umieszczane w fitotronie w stałej temperaturze 23°C, długości dnia 16 godzin, światło białe o natężeniu 10 μmoli m⁻² sec⁻¹. Eksplantaty inicjalne przebywały w tych warunkach 4 tygodnie, te z nich które podejmowały wzrost, przenoszono na pożywkę do namnażania pędów. Do ukorzenia przeznaczano dobrze wykształcone pędy

o długości $\geq 1,0$ cm. Etap wytwarzania korzeni trwał około 4 tygodni. Ukorzenione w warunkach *in vitro* sadzonki sadzono do tac wielokomórkowych wypełnionych substratem do ukorzeniania. Tace umieszczano w tunelach przykrytych szkółkarską folią mleczną i cieniowano. Sadzonki podlewano profilaktycznie mieszaniną fungicydów 0,25% Previcur Energy + 0,2% Topsin. Proces aklimatyzacji trwał ok. 30 dni. Od 14 dnia aklimatyzacji rozpoczynano nawożenie dolistne wieloskładnikowym nawozem w stężeniu 0,2%. Gdy korzenie przerastały komórki tacy, rośliny przesadzano do doniczek. Po dwóch miesiącach intensywnego wzrostu w warunkach szklarniowych, przy pełnej ochronie przed chorobami i szkodnikami, rośliny były gotowe do przekazania Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych w celu ich posadzenia w gruncie i w pojemnikach dla kontynuowania dalszej oceny. Podczas zakładania kultur *in vitro* oceniano procent wypadów, który wahał się od 0 do 85,7%. Odsetek pąków inicjalnych, który pozostał w kulturach *in vitro* do dalszego namnażania, zależał przede wszystkim od genotypu, a także od pory pobierania pąków. Najslabiej przebiegała izolacja w miesiącach styczeń-marzec z pąków zimowych. Wiele z nich miało zawiązki kwiatostanów i te pąki zamierały po przeniesieniu do warunków *in vitro*. Ponadto, wiele z nich miało objawy szklistości. Bardziej efektywne były izolacje w miesiącach maj-czerwiec, kiedy pąki wierzchołkowe są dobrze wykształcone. Wpływ genotypu zaznaczał się silnie również na etapie namnażania kultur. Widoczne były bardzo duże różnice w potencjale rozmnożeniowym genotypów tzw. 'łatwych', z których uzyskanie pędów z przeznaczeniem do ukorzeniania nie sprawiało większych trudności. Jednak dla większości genotypów uzyskanie liczebności pędów przydatnych do ukorzeniania wymagało 2-3 pasażów na pożywce do namnażania. Współczynnik namnażania wahał się od 1,6 do 4,4 pędów z jednego eksplantatu. Efektywność ukorzeniania *in vitro* i aklimatyzacji była również zależna od genotypu i wahała się od 52,3% do 100%, średnio wynosiła 88,2%. Podczas aklimatyzacji oceniano procent roślin, które pomyślnie przeszły adaptację do warunków szklarni.

Temat badawczy 3

Analizy chemiczne owoców z roślin najwartościowszych klonów maliny właściwej, otrzymanych z rozmnożenia pojedynków, wyselekcjonowanych z populacji siewek ocenianej w latach 2016-2017 (razem 40 genotypów, w tym 30 klonów i 10 form rodzicielskich) pod względem zawartości następujących związków: substancje rozpuszczalne (ekstrakt), kwasy (cytrynowy, jabłkowy i L-askorbinowy), związki fenolowe ogółem, antocyjany.

Celem badań, realizowanych w Zakładzie Przechowalnictwa i Przetwórstwa Owoców i Warzyw Instytutu Ogrodnictwa, było uzyskanie informacji, czy możliwa jest poprawa jakości wewnętrznej owoców maliny właściwej w oparciu o użyte w badaniach odmiany rodzicielskie. Wykonano analizę składu chemicznego owoców, w tym zawartości substancji rozpuszczalnych, kwasów organicznych i kwasu L-askorbinowego, zawartości związków fenolowych ogółem oraz zawartości barwników antocyjanowych (przy użyciu metod spektrofotometrycznych). Do analizy składu chemicznego owoców malin wykorzystano próby mieszane owoców, zebranych w pełni dojrzwania z wszystkich roślin każdego genotypu. Analizy wykonywano na próbach zamrożonych, w dwóch powtórzeniach technicznych (40 prób x 2 powtórzenia, łącznie 80 prób analitycznych). Próby owoców zamrażano do czasu analiz w temperaturze co najmniej -32°C . Przed analizą owoce rozdrobniono w stałym CO_2 . Powstałą w ten sposób średnią próbkę laboratoryjną poddano analizom chemicznym. W próbkach oznaczono: ekstrakt refraktometryczny ($^{\circ}\text{Brix}$), zawartość kwasu jabłkowego, cytrynowego i L-askorbinowego, zawartość antocyjanów oraz zawartość związków fenolowych ogółem (TPC). Badane genotypy były zróżnicowane pod względem zawartości badanych związków chemicznych w owocach. Zawartość polifenoli ogółem w badanych próbach mieściła się w przedziale 250 – 505 mg/100 g. Zawartość antocyjanów w próbach owoców mieściła się w zakresie 21-57 mg/100 g. Dominującym kwasem organicznym w owocach malin jest kwas cytrynowy, którego zawartość w badanych owocach kształtowała się na poziomie 1307 – 2420 mg/100 g. Poziom kwasu askorbinowego w owocach badanych czterdziestu genotypów wynosił od 19 do 50 mg/100 g. Owoce ocenianych genotypów maliny bardzo różnią się jakością wewnętrzną, posiadają zarówno wyższą, jak i niższą zawartość związków chemicznych w porównaniu do odmian rodzicielskich. Możliwe jest jednak uzyskanie genotypów maliny, których owoce będą zawierały więcej związków chemicznych, decydujących o ich jakości wewnętrznej, zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym.

Temat badawczy 4

Analiza molekularna 10 klonów maliny właściwej otrzymanych z rozmnożenia najwartościowszych pojedynków, wyselekcjonowanych w latach 2016-2017 z populacji siewek, ocenianej w doświadczeniu polowym, założonym jesienią 2014 roku.

Celem badań, realizowanych w Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin Instytutu Ogrodnictwa, była weryfikacja statusu mieszańca z planowanego zapylenia 10 klonów maliny właściwej i opracowanie dla nich profili genetycznych („DNA-fingerprinting”). Badania przeprowadzono na roślinach 10 klonów maliny właściwej i ich formach rodzicielskich. Łącznie przeprowadzono 1.326 reakcji amplifikacji, w których wygenerowano 180 amplikonów, w tym 169 polimorficznych. Długość uzyskanych amplikonów wahała się od 120 do 520 pz. Każdy z testowanych genotypów został oceniony na podstawie 7-10 charakteryzujących go fragmentów DNA. Określono również procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej, który wynosił od 22 do 100%. Ponadto oszacowano procentowy udział alleli pochodzących od formy ojcowskiej, który wynosił od 78 do 25%. Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy matecznej obserwowano na matrycy DNA wydzielonych z genotypu nr 335 (‘Polana’ x ‘Sokolica’), najniższy zaś dla genotypu nr 316 (‘Glen Ample’ x ‘Polana’). Dla wszystkich testowanych genotypów opracowano ich profil genetyczny „DNA-fingerprinting” metodą SSR z wytypowanymi 5 parami oligonukleotydów. Mieszańce z planowanego zapylenia o potwierdzonym statusie stanowią 9 z 10 testowanych mieszańców F₁ maliny właściwej.