

Tetraploidalna jabłoń jako źródło odporności na stresy biotyczne i abiotyczne – analiza mechanizmów odporności na zarazę ogniową, parcha jabłoni i suszę oraz ocena zdolności do krzyżowania

Numer zadania 49

Okres realizacji: 2021 rok - 12 miesięcy

dr Danuta Wójcik danuta.wojcik@inhort.pl

Małgorzata Podwyszyńska, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Mariusz Lewandowski, Justyna Góraj-Koniarska, Monika Marat, Zbigniew Buler, Przemysław Tomczyk, Katarzyna Wójcik, Jacek Filipczak, Monika Markiewicz, Artur Mikiciński, Anna Tryngiel-Gać

Instytut Ogrodnictwa-Państwowy Instytut Badawczy, 96-100 Skierniewice, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3



Cele w roku 2021

Lp.	Cel tematu badawczego	Czy cel został zrealizowany
1.	Ocena podatności klonów jabłoni na stres suszy – porównanie reakcji fizjologicznych roślin diploidalnych (2x) oraz tetraploidalnych (4x) oraz ocena parametrów morfologicznych tych roślin w warunkach stresu suszy.	Tak
2.	Opracowanie metodyki oceny aktywności enzymów antyoksydacyjnych dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy gwajakolowej oraz badania poziomu peroksydacji lipidów kwasów tłuszczowych (MDA) i zawartości proliny w liściach jabłoni.	Tak
3.	Opracowanie metody izolacji RNA z jabłoni poddanej stresowi suszy. Opracowanie starterów do badania analizy ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy u jabłoni.	Tak
4.	Analiza różnic morfologicznych i anatomicznych pomiędzy tetraploidami jabłoni (4x) a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi (2x).	Tak
5.	Polowa ocena kwitnienia i owocowania tetraploidalnych klonów i diploidalnych odmian jabłoni (form wyjściowych) oraz ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni.	Tak

Materiały i metody

Porównanie fizjologicznej i molekularnej odpowiedzi na suszę klonów tetraploidalnych odmiany 'Redchief' i 'Free Redstar' i ich diploidalnych form wyjściowych:

- pomiary potencjału wody i wymiany gazowej (transpiracja i CO_2),
- pomiary zawartości chlorofilu w liściach i sprawności aparatu fotosyntetycznego,
- pomiary parametrów wzrostu,
- analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy gwaszajolowej oraz badanie zawartości proliny i dialdehydu malonowego (MDA),
- optymalizacja izolacji całkowitego RNA z liści jabłoni oraz opracowanie starterów do analizy ekspresji genów związanych z reakcją jabłoni na stres suszy.

Ocena fenotypowa 5-letnich, własnokorzeniowych i zaszczepionych na podkładce M.9 roślin diploidalnych i tetraploidalnych 3 odmian jabłoni 'Redchief', 'Free Redstar' i 'Pinova', rosnących w sadzie doświadczalnym IO-PIB w Dąbrowicach:

- pomiary parametrów wzrostu: liczba i długość rocznych przyrostów, średnica pnia,
- pomiar zawartości chlorofilu w liściach,
- analizy anatomiczne liści: długość i gęstość aparatów szparkowych, grubość liścia, grubość epidermy górnej i dolnej, grubość mezofilu palisadowego i gąbczastego,
- ocena wielkości kwiatów i liczby kwiatów w kwiatostanie,
- analiza wielkości i żywotności pyłku,
- ocena terminu i intensywności kwitnienia.

Temat badawczy 1: Ocena podatności klonów jabłoni na stres suszy – porównanie reakcji fizjologicznych roślin diploidalnych (2x) oraz tetraploidalnych (4x) oraz ocena parametrów morfologicznych tych roślin w warunkach stresu suszy

- Susza nie powodowała obniżenia zawartości chlorofilu w liściach roślin poddanych stresowi w porównaniu z kontrolą. Nie zaobserwowano również różnic w maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II (Fv/Fm) pomiędzy roślinami optymalnie nawadnianymi i roślinami rosnącymi w warunkach stresu wodnego, jak również pomiędzy diploidami i tetraploidami obydwu badanych odmian jabłoni.
- Wyniki pomiarów wymiany gazowej oraz w przypadku odmiany 'Redchief' również wyniki pomiarów parametrów wzrostu mogą wskazywać, że tetraploidy charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres suszy w porównaniu z roślinami diploidalnymi tych samych odmian.

'Free Redstar'				
Parametr	Kontrola		Susza	
	2x	4x	2x	4x
Potencjał wody (MPa)	-0,89	-0,44	-2,01	-0,93
Natężenie fotosyntezy ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	11,12 a	8,66 b	4,59 c	7,26 b
Natężenie transpiracji ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	2,76 a	2,19 a	1,38 b	2,30 a

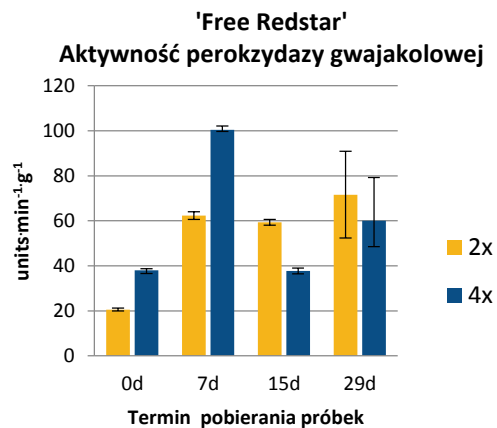
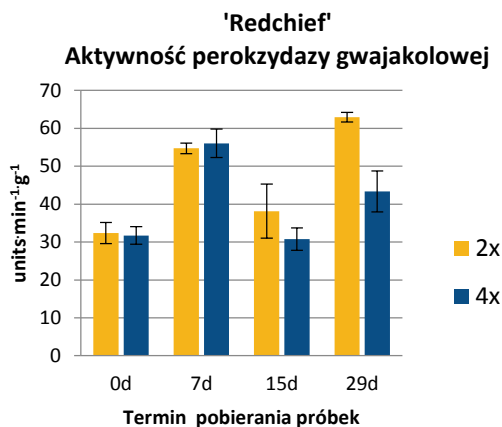
'Redchief'				
Parametr	Kontrola		Susza	
	2x	4x	2x	4x
Potencjał wody (MPa)	-1,22	-1,02	-1,91	-2,93
Natężenie fotosyntezy ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	10,92 ab	12,15 a	3,74 d	5,88 c
Natężenie transpiracji ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	2,57 a	2,77 a	1,02 c	1,69 b

Temat badawczy 2: Opracowanie metodyki oceny aktywności enzymów antyoksydacyjnych dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy gwajakolowej oraz badania poziomu peroksydacji lipidów kwasów tłuszczowych (MDA) i zawartości proliny w liściach jabłoni.

Zoptymalizowano metodyki oznaczania aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz analizy poziomu dialdehydu malonowego (MDA) i proliny w liściach jabłoni:

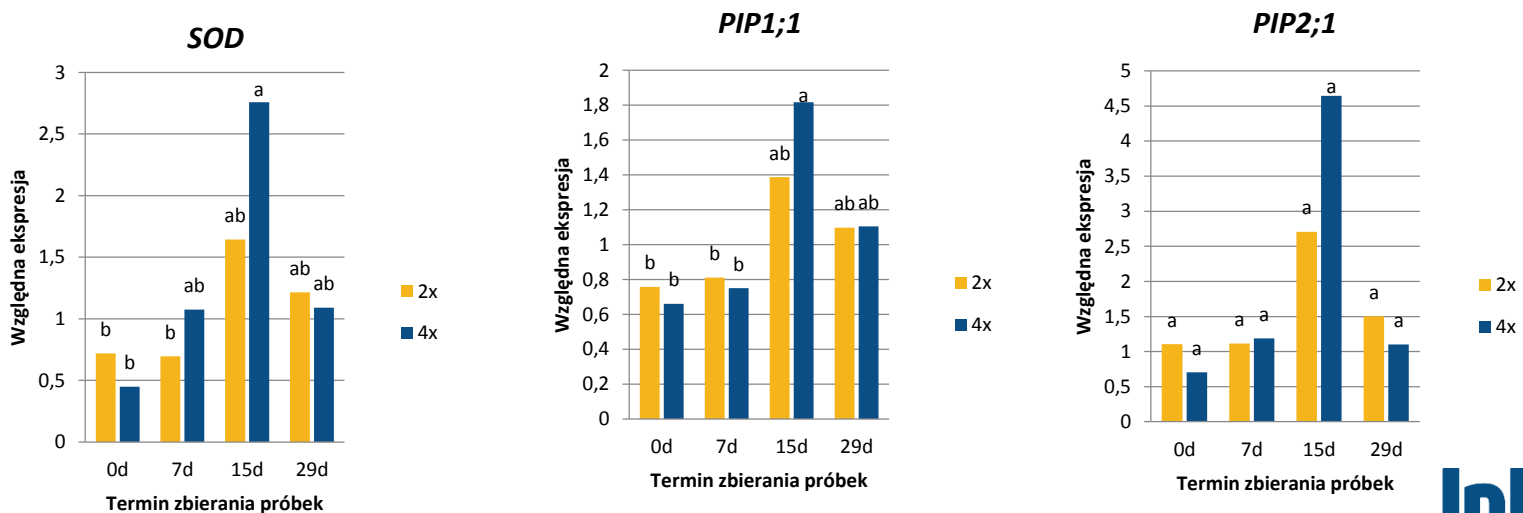
- oznaczanie aktywności peroksydazy gwajakolowej: metoda wg Saniewskiego i in. (1992)
- oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej: metoda wg Giannopolitis i Ries (1977) i Beyera i Fridorovicha (1987)
- oznaczanie aktywności katalazy: metoda wg Aebiego (1974)
- oznaczanie poziomu proliny: metoda wg Bates i in. (1973)
- oznaczanie poziomu MDA: metoda wg Hodges i in. (1999) i Cao i in. (2013)

Wykazano różnice w aktywności peroksydazy gwajakolowej w liściach diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) jabłoni rosnących w warunkach stresu wodnego.



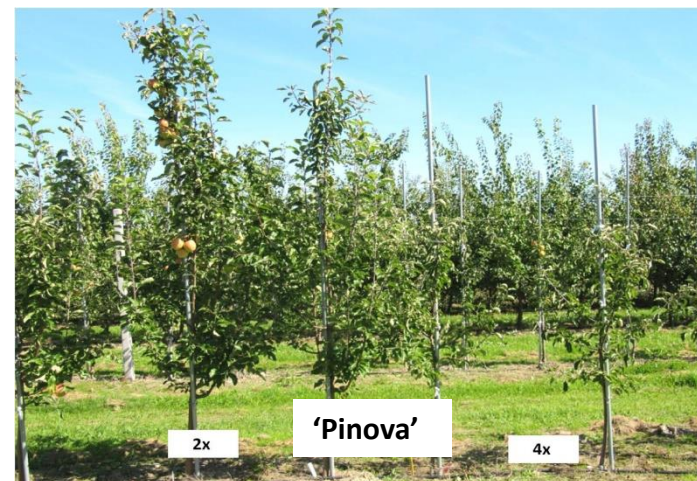
Temat badawczy 3: Opracowanie metody izolacji RNA z jabłoni poddanej stresowi suszy. Opracowanie starterów do badania analizy ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy u jabłoni.

- Najefektywniejszą metodą izolacji całkowitego RNA z liści jabłoni okazało się zastosowanie komercyjnego zestawu do izolacji Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.).
- Opracowano 11 par starterów, które mogą być wykorzystane w analizie ekspresji metodą qRT-PCR. Startery te pozwalają na amplifikację fragmentów genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (GPX, SOD, CAT), akwaporyny (PIP1;1, PIP2;1, PIP2;3, TIP1;1), amoniakoliazę fenyloalaniny (PAL), czynnik transkrypcyjny związany z mechanizmami odpornościowymi (MYB121) oraz dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego i aktynę (GAPDH i AC11).
- W roślinach odmiany 'Redchief' poddanych stresowi suszy, poziom ekspresji genów *SOD*, *PIP1;1* i *PIP2;1* był wyższy u tetraploidów niż u diploidów.



Temat badawczy 4: Analiza różnic morfologicznych i anatomicznych pomiędzy tetraploidami jabłoni (4x) a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi (2x).

Poliploidyzacja spowodowała znaczne zmiany w fenotypie tetraploidalnych klonów jabłoni 'Redchief', 'Free Redstar' i 'Pinova'. Wzrost tetraploidów wszystkich badanych odmian jabłoni był w znacznym stopniu ograniczony w porównaniu do ich diploidalnych form wyjściowych. U roślin własnokorzeniowych, wszystkie parametry wzrostu tetraploidów były gorsze w porównaniu do diploidów tych samych odmian. Szczepienie na podkładce M.9 powodowało efekt karłowatości u diploidów, poprawiając jednocześnie parametry wzrostu roślin tetraploidalnych.

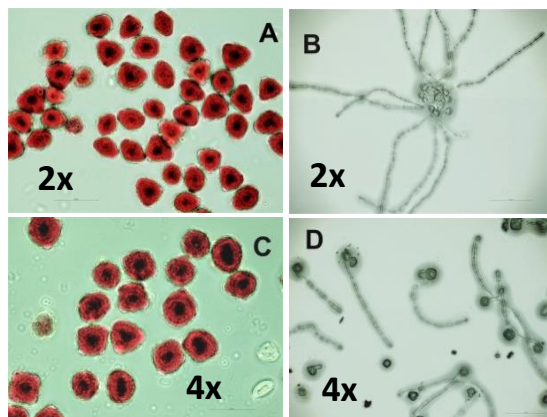
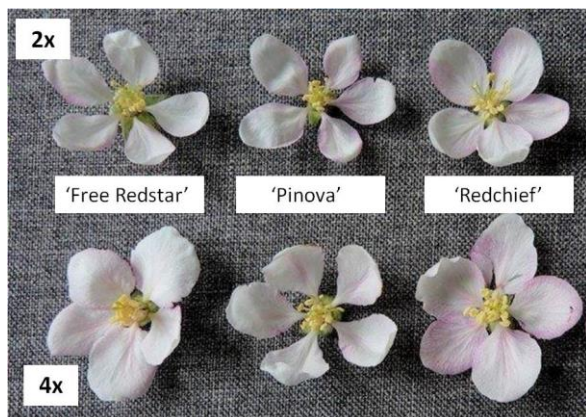
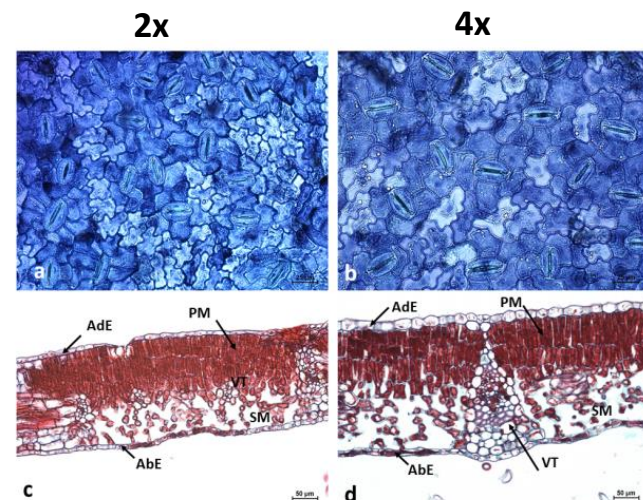


Cecha	'Redchief'				'Free Redstar'				'Pinova'			
	Własnokorzeniowe		Szczepione na M.9		Własnokorzeniowe		Szczepione na M.9		Własnokorzeniowe		Szczepione na M.9	
	2x	4x*	2x	4x*	2x	4x*	2x	4x*	2x	4x*	2x	4x*
Suma przyrostów rocznych (m/drzewo)	14,1 a	2,9 d	8,4 b	5,2 c	10,7 a	2,0 c	5,8 b	3,0 c	9,3 a	2,2 c	4,1 b	2,4 c
Liczba przyrostów (sztuki/drzewo)	56,8 a	16,3 d	38,7 b	26,0 c	38,8 a	10,4 c	22,5 b	15,1 bc	37,0 a	9,1 c	21,0 b	8,5 c
Średnia długość przyrostu rocznego (cm)	24,7 a	17,6 c	21,8 b	20,0 b	27,8 a	18,9 b	25,9 a	20,1 b	25,9 a	25,3 a	19,7 a	27,7 a
Pole poprzecznego przekroju pnia (cm ²)	14,3 a	3,1 b	5,0 b	4,7 b	11,9 a	2,7 c	7,2 b	5,6 b	13,8 a	6,7 bc	3,8 c	5,3 bc

* Średnia dla klonów tetraploidalnych

Temat badawczy 4: Analiza różnic morfologicznych i anatomicznych pomiędzy tetraploidami jabłoni (4x) a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi (2x).

- Zawartość chlorofilu w liściach była wyższa u klonów tetraploidalnych niż u ich odmian wyjściowych.
- Aparaty szparkowe tetraploidów wszystkich badanych odmian były istotnie dłuższe niż diploidów.
- Gęstość aparatów szparkowych była wyższa u diploidów niż u klonów tetraploidalnych.
- Analiza mikroskopowa wykazała, że zarówno całe liście, epiderma górna i dolna oraz oba typy mezofilu były znacznie grubsze u klonów tetraploidalnych niż u diploidów.



- Pyłek klonów tetraploidalnych był istotnie większy niż pyłek pobrany z kwiatów roślin diploidalnych.
- Żywotność i kiełkowanie pyłku u tetraploidów były ograniczone.

- Kwiaty klonów tetraploidalnych były większe niż u ich diploidalnych odmian wyjściowych.
- Liczba kwiatów w kwiatostanie była mniejsza u klonów tetraploidalnych niż u diploidów.

Temat badawczy 5: Polowa ocena kwitnienia i owocowania tetraploidalnych klonów i diploidalnych odmian jabłoni (form wyjściowych) oraz ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni .

- W roku 2021 wszystkie rośliny diploidalne, zarówno szczepione jak i własnokorzeniowe zakwitły, podczas gdy spośród form tetraploidalnych kwiaty rozwinęły się tylko na pojedynczych roślinach, wyłącznie szczepionych na podkładce M.9.
- Tetraploidy wszystkich odmian zaczęły kwitnąć później niż ich wyjściowe formy diploidalne, opóźnienie wynosiło od 1 do 5 dni.

Drzewka rosące na własnych korzeniach		Drzewka rosące na podkładce M.9		
Genotyp	Intensywność kwitnienia*	Genotyp	Intensywność kwitnienia*	Termin początku kwitnienia
Free Redstar 2x	1, 1, 2, 2, 1	Free Redstar 2x	3, 2, 2	17.05.2021
Free Redstar 4x-1	0, 0, 0, 0, 0	Free Redstar 4x-1	0, 0, 1, 1	20.05.2021
Free Redstar 4x-2	0, 0, 0, 0, 0	Free Redstar 4x-2	2, 1, 0, 2	18.05.2021
Free Redstar 4x-3	0, 0, 0, 0, 0	Free Redstar 4x-3	0, 1, 0, 0	18.05.2021
Redchief 2x	2, 2, 1, 1, 2	Redchief 2x	3, 1, 2,	17.05.2021
Redchief 4x-14	0, 0, 0, 0	Redchief 4x-14	0, 0, 1, 0	22.05.2021
Redchief 4x-24	0, 0, 0, 0	Redchief 4x-24	0, 0, 1, 0	19.05.2021
Redchief 4x-26	0, 0, 0, 0	Redchief 4x-26	0, 0, 0, 0	-
Pinova 2x	2, 1, 1, 2, 1	Pinova 2x	4, 4, 4, 4	17.05.2021
Pinova 4x-3	0, 0, 0, 0	Pinova 4x-3	0, 0, 0, 2	19.05.2021
Pinova 4x-4	0, 0, 0, 0, 0	Pinova 4x-4	1, 2, 1, 1	18.05.2021
Pinova 4x-7	0, 0, 0	Pinova 4x-7	0, 0, 1, 1	18.05.2021

* - objaśnienia: skala bonitacyjna 0-4, gdzie: 0 – brak kwiatów i owoców, 1 – do 10 kwiatów i owoców, 2 – 11-20 kwiatów i owoców, 3 – 21-30 kwiatów i owoców, 4 – 31 i więcej kwiatów i owoców.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2021 r.

Doniesienia konferencyjne

1. Marat M., Wójcik D., Podwyszyńska M., Marasek-Ciołakowska A. „Evaluation of flowering apple tetraploids”. Międzynarodowa konferencja naukowa “Sustainable horticulture from plant to product: Challenges in temperate climate”, 25-26 sierpnia 2021 r., Dobeles novads, Łotwa (poster)
2. Marat M., Wójcik D., Marasek-Ciołakowska A., Podwyszyńska M. „Ocena tetraploidów jabłoni w fazie generatywnej”. Konferencja naukowa „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, SGGW, Warszawa, 22-24 września 2021 r. (poster)
3. Wójcik D., Podwyszyńska M., Markiewicz M., Marat M., Marasek-Ciołakowska A., Buler Z., Filipczak J. „Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni”. Konferencja naukowa „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, SGGW, Warszawa, 22-24 września 2021 r. (poster)

Publikacje naukowe

1. Wójcik D., Marat M., Marasek-Ciołakowska A., Klamkowski K., Buler Z., Podwyszyńska M., Tomczyk P., Wójcik K., Treder W., Filipczak J. Apple autotetraploids – phenotypic characterisation and response to drought stress. (praca wysłana do redakcji „Agronomy”, numer specjalny „New polyploids of crop plants – application in breeding, phenotypic and genetic evaluation”)