

Zadanie 3.13. Wytworzenie materiałów wyjściowych jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) o jednolitej barwie skórki, owocujących corocznie oraz odpornych na parcha jabłoni.

Cele zadania:

1. wytworzenie nowych cennych materiałów wyjściowych jabłoni o jednolitej barwie skórki (zielone, żółte lub czerwone) i zróżnicowanej porze dojrzewania owoców, zdolnych do samoregulacji owocowania oraz odpornych lub mało podatnych na parcha jabłoni (kontynuacja oceny materiałów hodowlanych jabłoni otrzymanych w latach 2014-2020 oraz realizacja nowych programów hodowlanych),
2. identyfikacja sekwencji genomowych, skorelowanych z badanymi cechami, jako potencjalne markery molekularne, przydatne do selekcji najcenniejszych genotypów.

Opis zadania:

W ramach zadania 3.13 w 2021 r. wykonano następujące prace:

Zakres rzeczowy zadania i przyjęte cele realizowano zgodnie z założeniami na 2021 r. Wykonano 15 kombinacji krzyżowań, zapylono 1 820 kwiatów, zebrano 428 owoców i wydobyto 3 096 nasion, wyprodukowano w szklarni/ kontynuowano uprawę w tunelu 1 658 siewek jednorocznych i 230 siewek dwuletnich oraz 408 siewek rosnących na podkładce M.9; w kwaterach selekcyjnych oceniano 5 096 siewek; rozmnożono 9 pojedynków wyselekcjonowanych w poprzednim roku; oceniano 184 klony selekcyjne; wyselekcjonowano 5 najcenniejszych klonów w celu ich rozmnożenia i założenia doświadczenia odmianowo-podkładowego; prowadzono 3 doświadczenia odmianowo-porównawcze i 2 doświadczenia demonstracyjno-wdrożeniowe. Dla wyselekcjonowanych roślin mieszańcowych przeprowadzono weryfikację tożsamości genetycznej stosując 10 markerów molekularnych o sekwencjach komplementarnych do fragmentów mikrosatelitarnych genomu *Malus*. Dodatkowo w genomach roślin wyselekcjonowanych klonów, ich form rodzicielskich oraz odmian standardowych oceniono profil ekspresji 2 wytypowanych genów uczestniczących w odpowiedzi roślin na porażenie *E. amylovora*. Profile te sporządzono na matrycach materiału skolekcjonowanego 24, 72 i 120 h po inokulacji izolatem Ea 659. Łącznie dla 34 prób wykonano ponad 300 testów qPCR. Równolegle przeprowadzono ocenę aktywności dwóch genów uczestniczących w regulacji mechanizmu odpowiedzi genotypów jabłoni na stresy abiotyczne. Profil ekspresji określono dla wyselekcjonowanych siewek jabłoni oraz ich form rodzicielskich. Łącznie dla 21 prób wykonano 190 testów qPCR.

1) wykonanie programu krzyżowań z wykorzystaniem różnych form rodzicielskich o komplementarnych cechach fenotypowych i użytkowych oraz zbiorów owoców, pozyskiwanie i wysiew nasion;

Oceniono wzrost i owocowanie 17 odmian i klonów jabłoni - 'Ligol', 'Ligol Red', 'Ligol Spur', 'Ligolina', 'Gold Milenium', 'Free Redstar', 'Szampion', 'Topaz', 'Pink Braeburn', 'Putinka', 70 (J-2003-11 - 'Gold Milenium' x 'Szampion'), 69 (J-2003-05 - 'Melfree' x 'Sawa'), 7 (J-2003-11-01 - 'Gold Milenium' x 'Szampion'), 14 (J-2002-09-01 - 'Gold Milenium' x '6518 *Malus floribunda* 821'), 16 (J-2004-14 - 'Melfree' x 'Topaz'), 1 (J-2002-21-01 - 'Rubin' x 'Gold Milenium') i 64 (J-2002-21 - 'Rubin' x 'Gold Milenium'), jako potencjalnych form rodzicielskich dla nowych programów krzyżowań. Ocenianymi cechami fenotypowymi były: siła wzrostu drzew, pora i intensywność kwitnienia, pora dojrzewania owoców, plenność drzew, wielkość (masa) owoców, kształt owoców, wybarwienie skórki, barwa miąższu, podatność drzew na choroby (parch jabłoni, mączniak jabłoni, zaraza ogniowa).

W oparciu o oceniane cechy za szczególnie przydatne do nowych programów krzyżowań uznano odmiany 'Gold Milenium', 'Free Redstar', 'Szampion', 'Ligol' i 'Ligol Red'.

Wykonano 15 kombinacji krzyżowań z użyciem 10 form rodzicielskich ('Ligol Red', 'Ligolina', 'Pink Braeburn', 'Putinka', 'Gold Milenium', 'Szampion', 'Trinity', 'Zestar', 'Ligol' i 'Sawa'), zapylono 1 820 kwiatów. Zebrano 428 owoców, z których wydobyto 3 096 nasion.

2) produkcja siewek w szklarni i wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym;

W szklarni wyprodukowano 1 658 siewek jabłoni, z nasion otrzymanych w roku 2020, które po uzyskaniu stadium 2-3 liści właściwych (10-15 cm) przesadzono z małych doniczek plastikowych, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku (w stosunku objętościowym 1:1:1) do 5-litrowych pojemników foliowych (cylindrów), napełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego) i ziemi kompostowej (w proporcji 1:1) i ustawiono na ziemi w wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym, bez dodatkowego doświetlania.

W tunelu foliowym prowadzono także uprawę 230 dwuletnich siewek jabłoni, wyprodukowanych z nasion otrzymanych w roku 2019.

3) przeszczepienie siewek na karłowatą podkładkę M.9;

W lutym wykonano zimowe szczepienie w ręku 408 siewek na karłowatą podkładkę M.9, po wcześniejszej ich selekcji na parcha i mączniaka jabłoni. Następnie szczepy te posadzono do 5-litrowych pojemników foliowych (cylindrów), napełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego) i ziemi kompostowej (w proporcji 1:1) i ustawiono na ziemi w wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym, bez dodatkowego doświetlania. Wykonywano zabiegi ochrony roślin i zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie, cięcie siewek, przywiązywanie pędów przewodnikowych siewek do palików bambusowych.

4) sadzenie siewek w polowej kwaterze selekcyjnej, pielęgnacja i ocena siewek;

Jesienią 408 siewek na podkładce M.9 posadzono w hodowlanej kwaterze selekcyjnej w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. W kwaterze hodowlanej (ok. 1,5 ha) w SD w Dąbrowicach kontynuowano uprawę oraz wykonano ocenę siły wzrostu i intensywności kwitnienia 5 096 siewek, wyprodukowanych w latach poprzednich. Z tej populacji siewek wyselekcjonowano 13 pojedynków oznaczonych numerami: J-2009-01 (18) ('Ligol Redspur' x 'Trinity'), J-2009-01 (28) ('Ligol Redspur' x 'Trinity'), J-2009-01 (43) ('Ligol Redspur' x 'Trinity'), J-2009-01 (48) ('Ligol Redspur' x 'Trinity'), J-2014-01 (23) ('Free Redstar' x 'Glogierówka'), J-2014-03 (45) ('Free Redstar' x 'Malinowa Oberlandzka'), J-2014-14 (32) ('Gold Milenium' x 'McIntosh'), J-2014-26 (42) ('Golden Delicious' x 'Oliwka Żółta'), J-2016-04 (50) ('Free Redstar' x 'Ligol Red'), J-2016-16 (2) ('Ligolina' x 'Pinova'), J-2016-16 (5) ('Ligolina' x 'Pinova'), J-2016-17 (15) ('Ligolina' x 'Free Redstar'), J-2016-19 (109) ('Ligol' x 'Gold Milenium'). Pojedynki te odznaczają się wysoką zdrowotnością, wysoką jakością owoców, późną porą dojrzewania owoców oraz zdolnością do samoregulacji owocowania.

5) oznaczanie (wybór) i rozmnażanie siewek (pojedynków) będących nośnikami pożądanых cech dla założenia kolekcji klonów;

Rozmnożono metodą tradycyjną (szczepienie na podkładce M.9) 9 perspektywicznych pojedynków wyselekcjonowanych w roku 2020: BP-01-2013 ('Free Redstar' x 'Sunrise'), BP-01-2013-01 ('Free Redstar' x 'Sunrise'), BP-06-2013 ('Free Redstar' x 'Pinova'), J-2010-24 ('Ligolina' x 'Rajka'), J-2010-27 ('Free Redstar' x 'Idared'), J-2013-02 ('Ariwa' x 'Sunrise'), J-2014-08 (95) ('Gold Milenium' x 'Glogierówka'), J-2014-25 (3) ('Golden Delicious' x 'Kronselska'), J-2014-25 (42) ('Golden Delicious' x 'Kronselska'). Każdy pojedynek reprezentowany po 3 drzewka, jesienią posadzono w polowej kolekcji klonów w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach.

6) ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych w kolekcji klonów;

Oceniono siłę wzrostu (wysokość i średnica pędu), intensywność kwitnienia oraz owocowanie 184 klonów rosnących w kolekcji klonów (ok. 0,5 ha) w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach.

Rozmnożono materiał roślinny 4 klonów jabłoni hodowli IO-PIB ('Red Szampion' – J-2003-11-01 – 'Gold Milenium' x 'Szampion', 'Freemal' – J-2002-09-01 – 'Gold Milenium' x 6518 *Malus floribunda* 821, Nr 1 – J-2002-21-01 – 'Rubin' x 'Gold Milenium', Nr 16 – J-2004-14 – 'Melfree' x 'Topaz') i 3 odmian standardowych ('Szampion', 'Idared' i 'Free Redstar')

do testowania podatności na zarazę ogniową. Najmniej porażonych pędów po inokulacji zawiesiną wysoko wirulentnego dzikiego szczepu bakterii *Erwinia amylovora* Ea 659 obserwowano u odmian 'Red Szampion' i 'Free Redstar'. Najbardziej podatne okazały się odmiana 'Idared' oraz klony Nr 1 i Nr 16.

Na podstawie analizy profili ekspresji genów: Beclin1 (białko obronne aktywowane w tkankach roślinnych pod wpływem czynnika chorobotwórczego) i WRKY53 (koduje czynnik transkrypcyjny), regulujących odpowiedź roślin na porażenie bakterią *E. amylovora*, ocenionych w odstępach czasowych – 24 h, 72 h oraz 120 h po inokulacji, zaobserwowano istotny wzrost aktywności obu genów w genomach wyselekcjonowanych klonów Nr 1 i Nr 16 oraz odmian: 'Goldmal' / 'Freemal', 'Szampion', 'Free Redstar', 'Red Szampion'. Dla zastosowanego w układzie, podatnego standardu 'Idared' odnotowano istotnie słabszą aktywność badanych genów. Na tym etapie przeprowadzonych analiz wstępnie zweryfikowano przydatność klonów Nr 1 i Nr 16 jako cennych nośników cechy odporności na zarazę ogniową.

7) wyznaczenie klonów, spełniających wymogi materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian o pożądanych cechach i ich rozmnażanie w celu założenia hodowlanego doświadczenia porównawczego;

Wytypowano 5 najcenniejszych klonów w celu ich rozmnożenia i założenia doświadczenia odmianowo-podkładowego: Nr 23 (J-2002-25-03 – 'Sawa' x 'Rubin'), Nr 41 (J-2002-14-01 – 'J-79' x 'Szampion'), Nr 44 (J-2002-10-01 – 'J-79' x 'Topaz'), Nr 58 (J-2004-29 – 'J-79' x 'Rubinola') i Nr 162 (J-2010-24-02 – 'Ligolina' x 'Rajka'). W grudniu pobrano zrazy do wykonania zimowego szczepienia w rękę.

8) szczegółowa ocena wartości produkcyjnej najbardziej wartościowych genotypów w doświadczeniach porównawczych, z możliwością zgłoszenia ich do badań rejestrowych COBORU, jako potencjalne nowe odmiany jabłoni, z uwzględnieniem badań laboratoryjnych (analiza zawartości składników bioaktywnych w owocach) oraz molekularnych (molekularna weryfikacja tożsamości genetycznej i statusu zdrowotności mieszańców pod kątem chorób wirusowych);

Kontynuowano 3 doświadczenia odmianowo-porównawcze:

1. **Jabłoń – 1/2012** - doświadczenie porównawcze z 17 klonami jabłoni na podkładce M.9; odmianami standardowymi są: 'Ligolina', 'Szampion' i 'Topaz'. Najintensywniej kwitły drzewa odmiany standardowej 'Szampion' oraz klonu J-2004-14. Najwyższy plon z drzewa otrzymano dla klonu J-2004-14, a największe owoce wytwarzał klon J-9805-01. Najsilniej rosły drzewa klonu J-2002-21-01, zaś najsłabiej J-9805-03 i odmiany standardowej 'Szampion'.
2. **Jabłoń – 1/2015** - doświadczenie odmianowo-porównawcze z klonami jabłoni na podkładce M.9 – obejmujące 5 klonów: Nr 70 ('J-2003-11'), Nr 22 ('J-2003-11-02'), Nr 26 ('J-2003-11-05'), Nr 28 ('J-2003-11-04'), Nr 69 ('J-2003-05'). Odmianami standardowymi są 'Szampion' i 'Gold Milenium'. Najintensywniej kwitły drzewa klonu Nr 22 (J-2003-11-02) i Nr 28 (J-2003-11-04). Najwyższy plon z drzewa otrzymano dla klonu Nr 28 (J-2003-11-04), a największe owoce wytwarzał klon Nr 69 (J-2003-05). Stwierdzono także, że najsilniej rosły drzewa klonu Nr 69 (J-2003-05), zaś najsłabiej klonu Nr 70 (J-2003-11).
3. **Jabłoń – 1/2016** - doświadczenie porównawcze z 11 klonami jabłoni: 21 (J-2002-050), 41 (J-2002-14-01), 44 (J-2002-10-01), 46 (J-2004-13), 47 (J-2002-15-02), 52 (J-2002-15-01), 58 (J-2004-29), 24 (J-2003-11-01), 28 (J-2003-11-04), 23 (J-2002-25-03), 36 (J-2002-21-01) na podkładce M.9; odmianami standardowymi są: 'Szampion' i 'Gold Milenium'. Najintensywniej kwitły drzewa klonu Nr 28 (J-2003-11-04). Najwyższy plon z drzewa otrzymano dla klonu Nr 28 (J-2003-11-04), a największe owoce wytwarzał klon Nr 23 (J-2002-25-03). Najsilniej rosły drzewa odmiany standardowej 'Gold Milenium', zaś najsłabiej odmiany standardowej 'Szampion'.

9) zakładanie i prowadzenie doświadczeń demonstracyjno-wdrożeniowych dla upowszechniania nowych odmian;

Kontynuowano 2 doświadczenia demonstracyjno-wdrożeniowe:

1. **Jabłoń – DW-2010-13** – doświadczenie z odmianą jabłoni ‘Ligolina’ na podkładkach P 14 i P 67 (Sad Doświadczalny Dąbrowice, powierzchnia ok. 0,3 ha).
W roku 2021 intensywniej kwitły drzewa odmiany ‘Ligolina’ na podkładce P 67. Dla tej kombinacji komponentów (odmiana/ podkładka) otrzymano także wyższy plon z drzewa oraz większe owoce. Tegoroczne obserwacje potwierdzają nasze wieloletnie badania, że podkładka P 67 stymuluje intensywniejsze wybarwienie skórki owoców odmiany ‘Ligolina’.
2. **Jabłoń – DW-2016** - doświadczenie z nowymi odmianami jabłoni: ‘Putinka’, ‘PinkBraeburn’, Nr 69 (J-2003-05) i Nr 70 (J-2003-11) na podkładce M.9 (Sad Doświadczalny Dąbrowice, powierzchnia ok. 0,1 ha).
Najintensywniej kwitły drzewa odmiany Nr 70 (J-2003-11). Dla tej odmiany otrzymano także najwyższy plon z drzewa. Największe owoce wytwarzała odmiana Nr 69 (J-2003-05), a najmniejsze odmiana Nr 70 (J-2003-11).

10) wytypowanie perspektywicznych genotypów mieszańcowych (wstępna ocena fenotypowa) i wyizolowanie DNA/RNA z tkanek roślin przeznaczonych do badań;

Do badań molekularnych użyto materiał roślinny skolekcjonowany z wytypowanych 9 genotypów mieszańcowych: BP-01-2013 i BP-01-2013-01 (‘Free Redstar’ x ‘Sunrise’), BP-06-2013 (‘Free Redstar’ x ‘Pinova’), J-2010-24 (‘Ligolina’ x ‘Rajka’), J-2010-27 (‘Free Redstar’ x ‘Idared’), J-2013-02 (‘Ariwa’ x ‘Sunrise’), J-2014-08 (95) (‘Gold Milenium’ x ‘Glogierówka’), J-2014-25 (3) oraz J-2014-25 (42) (‘Golden Delicious’ x ‘Kronselska’).

Z materiału pobranego z roślin potomnych oraz z form rodzicielskich wyizolowano matryce DNA (wg Aldrich i Culis 1998) oraz RNA (wg metody Zeng i Yang 2000). Weryfikację tożsamości genetycznej roślin mieszańcowych przeprowadzono stosując testy PCR w oparciu o reakcję amplifikacji fragmentów mikrosatelitarnych (SSR) gronemu *Malus*. Dzięki przeprowadzonym analizom molekularnym potwierdzono status genetyczny genotypów mieszańcowych, wytypowanych do dalszych badań.

11) wytypowanie sekwencji genów kandydujących (dostępne bazy, literatura, sekwencje o zróżnicowanej ekspresji uzyskane z analiz NGS przeprowadzonych w poprzednich latach badań, inne) do analizy qPCR poprzez opracowanie ich profili ekspresyjnych.

Do oceny profilu ekspresji genów kandydujących, z tych samych perspektywicznych genotypów potomnych przygotowano matryce RNA (pkt. 10), które następnie przeznaczono do ilościowych testów qPCR. Celem uzyskania stabilnych matryc do reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym, wyizolowane RNA (0.5-1µg) poddano odwrotnej transkrypcji do cDNA (zestaw Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent)).

Do oceny profilu ekspresji wytypowano dwa geny kodujące białka dehydrogenaz (Deh5 i Deh9) związane z odpowiedzią roślin na stresi abiotyczne (mróz, susza). Na podstawie analizy uzyskanych profili ekspresji, zaobserwowano istotnie niską aktywność badanych genów w genomach odmian: ‘Rajka’, ‘Golden Delicious’, ‘Ariwa’, ‘Gold Milenium’ oraz siewki J-2010-24 (‘Ligolina’ x ‘Rajka’). Wysoką aktywność genu kodującego Deh9 uzyskano w genomach pozostałych badanych genotypów. Ponadto, wysoką aktywność obu genów, oszacowano w genomie siewki J-2014-25 (3) (‘Golden Delicious’ x ‘Kronselska’).

Wymierne/trwałe rezultaty realizacji zadania:

W roku 2021 do Krajowego Rejestru Odmian (KR) i Księgi Ochrony Wylącznego Prawa (KO) wpisano 1 odmianę jabłoni – ‘PUTINKA’ – Krajowy Rejestr 19.03.2021 r. (S 681), Księga Ochrony 08.03.2021 r. (S 258).

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

Przygotowano prezentację multimedialną na temat „LIGOLINA’ i ‘GOLD MILENIUM’ – czy warto postawić na polskie odmiany jabłoni”, wygłoszoną przez dr. Mariusza Lewandowskiego, przedstawioną podczas Otwartych Drzwi Instytutu Ogrodnictwa w dniu 30 czerwca 2021 roku (https://www.youtube.com/watch?v=ZsgXk_9-y68)

W dniu 23 listopada 2021 roku wygłoszono referat pt. „Postęp w hodowli nowych odmian jabłoni w IO–PIB”, autorstwa dr Mariusz Lewandowski, dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, w ramach seminarium on-line pt. „Kierunki i osiągnięcia hodowli twórczej roślin ogrodniczych w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach” (<https://www.youtube.com/watch?v=QTFdDBnpWAY>)

Prowadzono spotkania informacyjne dla producentów owoców oraz szkółkarzy zainteresowanych odmianami jabłoni wyhodowanymi w IO–PIB oraz udzielano licznych porad i konsultacji na temat realizowanego programu hodowli i dotychczasowych osiągnięć w obrębie tego gatunku, wartości produkcyjnej wyhodowanych odmian oraz ich przydatności do uprawy towarowej w Polsce.

Wykonanie miernika:

1. liczba kombinacji w wykonanym programie krzyżowań – plan **15**, wykonanie **15**,
2. liczba wyselekcjonowanych i rozmnożonych materiałów wyjściowych o pożądanych cechach – plan **5** klonów, wykonanie **5** klonów,
3. liczba wytypowanych sekwencji DNA/RNA dla pożądanych cech – plan **2**, wykonanie **2**.