

**Zadanie 3.14. Wytworzenie materiałów wyjściowych podkładek wegetatywnych dla jabłoni (*Malus Mill.*) odpornych na zgniliznę pierścieniową podstawy pnia jabłoni, wytrzymałych na niskie ujemne temperatury oraz beziernistych.**

**Cele zadania:**

1. Wytworzenie cennych materiałów wyjściowych podkładek wegetatywnych dla jabłoni odpornych na zgniliznę pierścieniową podstawy pnia jabłoni (*Phytophthora cactorum*) oraz wytrzymałych na niskie ujemne temperatury i charakteryzujących się brakiem cierni (kontynuacja oceny materiałów hodowlanych jabłoni otrzymanych w latach 2014-2020 oraz realizacja nowych programów hodowlanych).
2. Opracowanie markerów przydatnych do selekcji najcenniejszych genotypów opartych na analizie sekwencji genomowych oraz ocenie stopnia zróżnicowania poziomu ich ekspresji.

**Opis zadania:**

W ramach zadania 3.14 w 2021 r. wykonano następujące prace:

Zakres rzeczowy zadania i przyjęte cele realizowano zgodnie z założeniami na rok 2021 r.

Wykonano 7 kombinacji krzyżowań, zapyłono 590 kwiatów, zebrano 74 owoce i wydobyto 169 nasion, wyprodukowano w szklarni/ kontynuowano uprawę w polu 269 siewek; w mateczniku selekcyjnym oceniano 3 039 siewek; rozmnożono 3 pojedynki wyselekcjonowane w poprzednim roku; wyselekcjonowano 5 nowych pojedynków; oceniano 220 klonów selekcyjnych; wyselekcjonowano 4 najcenniejsze klony oraz rozmnożono materiał i założono doświadczenie podkładowo-odmianowe. W kulturach *in vitro* utrzymywano podkładkę P 68 (220 pędów) oraz zainicjowano kultury dla podkładki P 66 (50 pędów).

Dla wyselekcjonowanych 15 podkładek przeprowadzono ocenę zróżnicowania genetycznego (analiza UPGMA i PCA) z wykorzystaniem 10 sekwencji oligonukleotydowych komplementarnych do fragmentów mikrosatelitarnych genomu *Malus*. Na podstawie ponad 300 testów PCR określono dystans genetyczny między podkładkami dla jabłoni wzbogacającymi kolekcję IO-PIB. Do najbardziej zróżnicowanych zakwalifikowano podkładki P66, M.9, Jork9 i B9. kolekcję IO-PIB. Do najbardziej zróżnicowanych zakwalifikowano podkładki, P66, M.9, Jork9 i B9. Dla wytypowanych podkładek PJ-173/2012, PJ-191/2016 sporządzono metki identyfikacyjne (DNA-fingerprinting).

W ramach badań w roku 2021 podjęto także próbę opracowania potencjalnego testu molekularnego (oceniono aktywność genów COR i LH1 w różnych tkankach podkładek dla jabłoni tj. korzeń, łodyga, liść), który pozwolił na wstępne określenie specyfiki i lokalizacji (w strukturach tkankowych) mechanizmu obronnego związanego z odpowiedzią roślin na stres mrozu.

**1) utrzymanie roślin ogrodniczych w formie wegetatywnych kolekcji polowych, w karkasach, tunelach foliowych, kulturach *in vitro* oraz w kriobankach zgodnie z normami międzynarodowymi;**

Utrzymywano 3 039 siewek w polowym mateczniku selekcyjnym oraz 220 podkładek w polowej kolekcji klonów. W kulturach *in vitro* (fitotron/chłodnia PGIHRS IO-PIB) na pożywce agarowej (MS), jako zasoby genowe, utrzymywane są rośliny podkładki dla jabłoni P 68 (220 pędów).

**2) dobór form rodzicielskich do krzyżowań w oparciu o ich cechy fenotypowe, testy laboratoryjne i molekularna ocena stopnia pokrewieństwa;**

Oceniono siłę wzrostu roślin, porę i intensywność kwitnienia, porę dojrzewania owoców, plenność drzew, wielkość i masę owoców, podatność drzew na choroby (parch jabłoni, mączniak

jabłoni, zaraza ogniowa) 15 podkładek dla jabłoni, które mogą być potencjalnymi formami rodzicielskimi do nowych programów krzyżowań. Ocenianymi podkładekami były: M.9, M.26, 'Jork 9', 'Mark', 'Bemali', CG 11, CG 16, CG 41, P 66, P 67, B 9, PB-4, Supporter 1vf, Supporter 2vf i Supporter 3vf. W oparciu o oceniane cechy za szczególnie przydatne do nowych programów krzyżowań uznano podkładki 'Bemali', CG 16, CG 41 i P 67.

Dodatkowo, na matrycy wyizolowanego całkowitego DNA oraz przeprowadzonych testów PCR, przeprowadzono molekularną ocenę stopnia pokrewieństwa ww. podkładek (form rodzicielskich). Łącznie przeprowadzono ponad 300 reakcji, w których zidentyfikowano 60 polimorficznych fragmentów DNA różnicujących badane genotypy. Najwyższy stopień zróżnicowania genetycznego odnotowano dla podkładek P66, B9, Jork9 i M.9, najniższy natomiast dla podkładek z grupy Supporter (1vf, 2vf, 3vf).

### **3) wykonywanie programów krzyżowań oraz zbiorów owoców, pozyskiwanie i wysiew nasion.**

Wykonano 7 kombinacji krzyżowań z użyciem 10 form rodzicielskich ('CG 41', 'M.9', 'M.26', 'B 9', 'Jork 9', 'Mark', P 22, Supporter 1vf, Supporter 2vf i Supporter 3vf), zapyłono 590 kwiatów. Program krzyżowań ukierunkowany był na uzyskanie podkładek tolerancyjnych na zgniliznę pierścieniową podstawy pnia jabłoni i karłowych. Do zapyleń włączono słabo rosnącą podkładkę CG 41, wyhodowaną w Nowojorskiej Stacji Doświadczalnej w Genewie (USA) oraz podkładkę B 9 (pochodząca z Rosji) odporne na zarazę ogniową, mączniaka jabłoni i zgniliznę pierścieniową podstawy pnia, charakteryzujące się brakiem cierni oraz wytrzymałe na mróz. Zebrano 74 owoce i wydobyto 169 nasion.

### **4) produkcja siewek w szklarni i sadzenie siewek w połowej kwaterze selekcyjnej;**

W szklarni prowadzono uprawę 269 siewek podkładek jabłoni, w małych doniczkach plastikowych, o wymiarach 7 cm x 7 cm, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku w stosunku objętościowym 1:1:1, wyprodukowanych z nasion otrzymanych w roku 2020. Siewki produkowano na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień +22°C, noc +18°C), pod sztucznym doświetlaniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia. W pierwszej połowie maja siewki te posadzono w mateczniku selekcyjnym, w którym prowadzono zabiegi ochrony roślin i zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie.

### **5) pielęgnacja, ocena i selekcja pozytywna w obrębie populacji siewek (oznaczanie pojedynków będących nośnikami pożądanymi cech);**

Kontynuowano uprawę i pielęgnację oraz wykonano ocenę siły wzrostu i zdrowotności 3 039 siewek wyprodukowanych w latach 2009-2020, rosnących w mateczniku selekcyjnym (0,3 ha) w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. W mateczniku selekcyjnym prowadzono zabiegi ochrony roślin i zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie, obsypywanie podkładek. Jesienią oceniono zdolność ukorzenia wyrastających pędów, stosując pięciostopniową skalę bonitacyjną, gdzie 1 – oznacza brak korzeni, 5 – bardzo dobre ukorzenie. Wyselekcjonowano 5 pojedynków [PJ-224/21 (PJ-2018-03– 'CG 41' x 'Supporter 2vf'), PJ-225/21 (PJ-2018-04– 'CG 41' x 'B 9'), PJ-226/21 (PJ-2018-06– 'Mark' x 'Supporter 3vf'), PJ-227/21 (PJ-2018-06– 'Mark' x 'Supporter 3vf'), PJ-228/21 (PJ-2018-07– 'Jork 9' x 'Supporter 1vf')] o wysokiej zdolności ukorzenia, tworzących wzniesione i bezcierniste lub nieznacznie cierniste pędy.

**6) rozmnażanie tradycyjne i in vitro wyselekcjonowanych pojedynków dla założenia kolekcji klonów w celu ich dalszej oceny pod kątem poziomu pożądanych cech;**

Rozmnożono metodą tradycyjną 3 pojedynki [PJ-221/20 ('CG 16' x 'M.9'), PJ-222/20 ('CG 41' x 'Supporter 2Vf'), PJ-223/20 ('CG 41' x 'M.9')] wyselekcjonowane w poprzednim roku, o wysokiej zdolności ukorzenia, tworzących wzniesione i bezierniste lub nieznacznie cierniste pędy. Dla słabo rosnącej w warunkach polowych podkładki P 66, założono kutyry *in vitro* (uzyskano 50 pędów).

**7) ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych i rozmnożenie najcenniejszych genotypów;**

Oceniano podstawowe parametry szkółkarskie 220 podkładek w kolekcji klonów (pow. ok. 0,2 ha): wysokość i średnicę pędów, liczbę cierni oraz zagęszczenie węzłów. Wszystkie badane podkładki ukorzeniały się na podobnym poziomie, a bezierniste pędy dawały 4 klony: PJ-165/2011 (M.26 x 'Pajam 2'), PJ-168/2011 (M.9 x 'Bemali'), PJ-173/2012 (BW x 'Pajam 1') i PJ-191/2016 ('Jork 9' x 'Bemali'). Klony te rozmnożono w Belgii.

**8) szczegółowa ocena wartości produkcyjnej najbardziej wartościowych genotypów w doświadczeniach porównawczych, z możliwością zgłoszenia ich do badań rejestrowych COBORU, jako potencjalne nowe podkładki wegetatywne dla jabłoni, z uwzględnieniem badań molekularnych (molekularna weryfikacja tożsamości genetycznej i statusu zdrowotności mieszańców pod kątem chorób wirusowych);**

Rozmnożono materiał i założono jesienią doświadczenie podkładowo-odmianowe: Podkładki dla jabłoni – 1/2021 - doświadczenie porównawcze z 2 klonami podkładek dla jabłoni: PJ-191/2016 i PJ-173/2012, standardowa podkładka M.9 i odmiana standardowa 'Szampion'. Dla ww. roślin oraz podkładki standardowej M.9 przeprowadzono ocenę molekularną poprzedzoną sporządzeniem metek identyfikacyjnych.

**9) testowanie wartościowych genotypów pod względem tolerancji na stesy biotyczne i abiotyczne w warunkach kontrolowanych (sztuczne przemrażanie roślin, inokulacja roślin zawiesiną zarodników grzyba *Phytophthora cactorum*);**

Wybrano i rozmnożono najwartościowsze genotypy pod względem tolerancji na stesy biotyczne i abiotyczne w warunkach kontrolowanych (sztuczne przemrażanie roślin, inokulacja roślin zawiesiną zarodników grzyba *Phytophthora cactorum*). Badania będą kontynuowane w roku następnym.

**10) zakładanie i prowadzenie doświadczeń demonstracyjno-wdrożeniowych dla upowszechniania nowych genotypów;**

Dla klonów (pkt 8) założono doświadczenie demonstracyjno-wdrożeniowe.

**11) wytypowanie genotypów podkładek zróżnicowanych pod względem ocenianych cech (wstępna ocena fenotypowa) i wyizolowanie DNA/RNA z tkanek roślin przeznaczonych do badań;**

Do badań molekularnych użyto materiał roślinny (liście, pędy i korzenie) skolekcjonowany z wytypowanych 4 podkładek dla jabłoni, tj.: beziernistych podkładek PJ-173/2012, PJ-191/2016 i B9 oraz wytwarzającej ciernie podkładki M.9. Z pobranych próbek wyizolowano matryce DNA (wg. Aldrich i Culis 1998) i RNA (wg Zeng i Yang 2000). Wyziolowane DNA wykorzystano w badaniach na potwierdzenie tożsamości genetycznej podkładek (pkt 2).

**12) 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.**

Przygotowane matryce RNA, przepisane do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent) użyto do oceny profilu ekspresji (metoda qPCR) wytypowanych genów kandydujących.

Ocenę ilości transkryptu przeprowadzono dla genów kodujących białko COR (cold resistance) oraz genu indukującego odpowiedź rośliny na stres mrozu - LH1 (Cold-Induced bHLH1). Łącznie przeprowadzono ponad 216 testów qPCR. Analizy profili ekspresji potwierdziły wysoką aktywność genu COR w tkankach korzenia podkładek PJ-173 oraz w tkankach łodygi podkładek PJ-191 i B9.

W przypadku genu LH1 wysoką ilość transkryptu odnotowano natomiast w tkankach liści badanych podkładek. Niska aktywność obu genów w tkankach korzeni podkładek PJ-191 i B9, może wskazywać na inny mechanizm regulacji cechy tolerancji tych roślin na mróz.

**Wymierne/trwale rezultaty realizacji zadania:**

Identyfikacja zróżnicowania genetycznego w puli badanych podkładek z kolekcji IO-PIB pozwoli na precyzyjniejszy i bardziej ukierunkowany dobór form wyjściowych/rodzicielskich w planowanych programach krzyżowań. Wstępnie rozpoznano aktywność genów, regulujących odpowiedź roślin na stres abiotyczny oraz wykazano ich przydatność jako markerów funkcjonalnych, do wczesnej selekcji podkładek i monitorowania cechy mrozoodporności.

**Działania upowszechnieniowo-promocyjne:**

Prowadzono spotkania informacyjne dla producentów owoców oraz szkółkarzy zainteresowanych podkładekami dla 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 podkładek oraz ich przydatności do uprawy towarowej w Polsce.

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>

**Wykonanie miernika:**

1. liczba kombinacji w wykonanym programie krzyżowań – plan 7, wykonanie 7
2. liczba uzyskanych materiałów wyjściowych o pożądanym cechach – plan 4 klony, wykonanie 4
3. liczba wytypowanych sekwencji DNA/RNA dla pożądanym cech – plan 2, wykonanie 2