

Zadanie 3.7. Wytworzenie materiałów wyjściowych porzeczek czarnej o deserowej jakości owoców, przydatnych do uprawy szpalerowej i odpornych na wielkopąkowca porzeczkowego oraz choroby liści i pędów.

Cel zadania:

1. Uzyskanie materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian typu deserowego, przydatnych do uprawy w formie szpalerowej (ręczny zbiór owoców), odpornych/tolerancyjnych na wielkopąkowca oraz choroby grzybowe liści i pędów.
2. Kontynuacja oceny materiałów selekcyjnych porzeczek czarnej otrzymanych w latach 2015-2020 oraz realizacja nowych programów hodowlanych.
3. Analiza zróżnicowania genetycznego DNA wyselekcjonowanych genotypów (potencjalnych form rodzicielskich) oraz określenie zróżnicowania genetycznego pomiędzy wytypowanymi roślinami, stanowiącymi nośniki zmienności genetycznej
4. Ocena fenotypowa tetraploidalnych klonów pochodzących od dwóch odmian porzeczek czarnej 'Gofert' i 'Polares' uzyskanych metodą poliploidyzacji w warunkach laboratoryjnych.

Opis zadania:

W 2022 roku wykonano kolejny program krzyżowań – 30 kombinacji, z użyciem 25 form rodzicielskich, w sumie zapyłono 2022 kwiaty. Uzyskano 936 owoców z zapyleń (co stanowi 50,5% zapyłonych kwiatów), z których szacunkowo wydobyto ok. 14 tys. nasion. Aktualnie nasiona przechodzą okres stratyfikacji przed ich kiełkowaniem w warunkach szklarniowych, planowanych w poł. lutego 2023 r.

Wstępnej ocenie poddano ok. 11,8 tys. siewek pod kątem siły wzrostu i pokroju krzewów) intensywności kwitnienia i zawiązania owoców. Wykonano wstępną ocenę klonów posadzonych w kolekcji klonów pod względem cech morfologicznych (siła wzrostu i pokrój krzewu), intensywność kwitnienia i zawiązania owoców oraz uszkodzeń przymrozkowych, oraz plonowania, masy (wielkości) owoców i połowej podatności na główne choroby grzybowe.

Przeprowadzono weryfikację tożsamości genetycznej oraz ocenę stopnia zróżnicowania genetycznego DNA dla 10 genotypów mieszańcowych wytypowanych do dalszych badań genetyczno-hodowlanych.

Wykonano analizy składu chemicznego owoców odmian porzeczek czarnej hodowli IO- PIB w Skierniewicach, tj.: zawartość ekstraktu, suchej masy, kwasowości, związków fenolowych i antocyjanów oraz kwasu L-askorbinowego. Stwierdzono, że badane odmiany porzeczek czarnej różniły się między sobą zawartością poszczególnych parametrów chemicznych. Przeprowadzone badania składu związków bioaktywnych potwierdziły, że owoce porzeczek czarnej są bogate w związki fenolowe, w tym w antocyjany oraz kwas L-askorbinowy. Związki te zaliczane są do naturalnych antyoksydantów i mają istotne znaczenie prozdrowotne.

Wyprodukowano kolejną populację (848 siewek) z nasion uzyskanych z ubiegłorocznego programu krzyżowań między wybranymi diploidalnymi (2x) i tetraploidalnymi (4x) klonami dwóch, polskich odmian 'Gofert' i 'Polares'. Siewki wysadzono na polu w Sadzie Pomologicznym „klin” w Skierniewicach, w celu wykonania ich oceny fenotypowej w sezonie wegetacyjnym w roku 2023 oraz w kolejnych 3-4 latach.

Przeprowadzono obserwacje fenotypowe w fazie generatywnej tetraploidalnych klonów dwóch odmian porzeczek czarnej 'Gofert' i 'Polares' w warunkach polowych. Przy użyciu cytometrii przepływowo-oceno-ano poziom ploidalności 800 siewek (mieszańców) pochodzących od

krzyżowania wybranych diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) klonów odmian ‘Gofert’ i ‘Polares’.

Oceniono siłę wzrostu i rozwój młodych, 1-rocznych siewek (200 siewek). Wykonano analizy cytologiczne i anatomiczne 1-rocznych siewek porzeczek czarnej uzyskanych z programu krzyżowań z udziałem form tetraploidalnych. Potwierdzono poziom poliploidalności genotypów mieszańcowych na podstawie liczby chromosomów z wcześniejszymi wynikami cytometrii przepływowego aparatem CyFlow Ploidy analize. Na podstawie obserwacji mikroskopowych określono różnice anatomiczne siewek diploidalnych i mieszańców tetraploidalnych oraz określono liczbę chromosomów w merystemach wierzchołkowych korzeni dwóch odmian wyjściowych: ‘Gofert’ i ‘Polares’, odmiany ‘Dlinskistnaja’ oraz wybranych mieszańców tetraploidalnych.

1) wykonanie programu krzyżowań z wykorzystaniem różnych form rodzicielskich porzeczek czarnej (*Ribes nigrum* L.) o komplementarnych cechach fenotypowych i użytkowych, zbiór owoców, wybieranie nasion, stratyfikacja i wysiew nasion;

Wiosną wykonano kolejny program krzyżowań (30 kombinacji), wykorzystując 25 form (odmian) rodzicielskich, w sumie wykastrowano i zapylono 2022 kwiaty. Uzyskano 936 owoców z zapyleń (co stanowi 50,5% zapylonych kwiatów), z których szacunkowo wydobyto ok. 14 tys. nasion. Krzyżowania wykonano na krzewach rosnących w tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. Przy wyborze form rodzicielskich do krzyżowań brano pod uwagę wyniki oceny fenotypowej i opisy pomologiczne oraz analizy pokrewieństwa DNA. Program krzyżowań uwzględniał podstawowe kierunki hodowli: odpornościowej, jakościowej i adaptacyjnej. Nasiona aktualnie poddawane są procesowi stratyfikacji (przez około 3-3,5 miesiąca) do poł. lutego 2023 roku w warunkach najbardziej zbliżonych do naturalnych (na zewnątrz w Belgii), w celu zapewnienia optymalnych warunków dla przebiegu stratyfikacji i ich dobrego kiełkowania w warunkach szklarniowych.

2) Uprawa, ocena i selekcja siewek w połowych kwaterach selekcyjnych.

W sezonie wegetacyjnym prowadzono podstawowe zabiegi uprawowe i pielęgnacyjne w 4 starszych kwaterach selekcyjnych, w sumie 11 813 siewek, o łącznej powierzchni ok. 1 ha, na polu nr 5 (ul. Sobieskiego) w Skierniewicach oraz na nowo założonej kwaterze w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Wykonano wstępną ocenę starszych siewek pod kątem cech morfologicznych (siły wzrostu i pokroju krzewów), intensywności kwitnienia i zawiązania owoców. W II półroczu kontynuowano ocenę siewek pod kątem plonowania, masy (wielkości), smaku owoców oraz odporności roślin na główne choroby grzybowe.

3) Rozmnażanie najcenniejszych genotypów o określonym statusie mieszańca (molekularna weryfikacja tożsamości genetycznej) dla uzyskania cennych klonów.

Rozmnażano wegetatywnie przez sadzonki zdrewniałe („sztobry”) 10 wartościowych klonów hodowlanych porzeczek czarnej, wyselekcjonowanych na podstawie ich oceny fenotypowej w hodowlanej kolekcji w tunelu foliowym i na polu nr 5 (ul. Sobieskiego). Genotypy te posadzone będą w kolekcji klonów w celu wykonania dalszej ich oceny.

Przeprowadzono analizę molekularną 10 wyselekcjonowanych klonów porzeczek czarnej: 20A, 21A, 22A, 23A, 24A, 25A, 26A, 27A, 28A, 29A. Uzyskane preparaty DNA użyto w reakcji PCR z oligonukleotydami specyficznymi do regionów mikrosatelitarnych ISSR i SSR genomu

Ribes. W badaniach zastosowano 12 komercyjnych starterów reakcji PCR. Analiza wzorów DNA uzyskanych dla genotypów mieszańcowych oraz ich form rodzicielskich potwierdziła pochodzenie wytypowanych perspektywicznych siewek od krzyżowanych form.

Ponadto, celem oceny przydatności wytypowanych genotypów mieszańcowych jako potencjalnych form rodzicielskich w programach krzyżowań przeprowadzono analizę ich zróżnicowania genetycznego. Podobieństwo badanych prób weryfikowano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. Na podstawie przeprowadzonych analiz PCA potwierdzono najniższy stopień korelacji pomiędzy klonami porzeczeki 21A, 28A, 20A, 22A, natomiast najbardziej spokrewnione były klony 26A i 25A. Na podstawie analizy dystansu genetycznego badanych roślin określono natomiast wysoki stopień podobieństwa pomiędzy klonami 22A i 21A oraz 27A i 26A (odpowiednio 47 i 65%). Najbardziej zróżnicowane genetycznie (75%) były klony o numerach 27A i 28A i użyte w programach krzyżowań mogą stanowić źródło cennych sekwencji warunkujących cechy użytkowe porzeczeki.

4) Ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych w kolekcji klonów i rozmnożenie najcenniejszych klonów.

Wykonano wstępną ocenę klonów posadzonych w kolekcji klonów porzeczeki czarnej pod względem cech morfologicznych, intensywności kwitnienia i zawiązania owoców oraz uszkodzeń przymrozkowych, a także plonowania krzewów, wielkości owoców i połowej odporności roślin na ważne choroby grzybowe (amerykański mączniak agrestu, antraknoza liści i rdza wejmutkowo-porzeczkowa). Późną jesienią najbardziej wartościowe klony rozmnażano wegetatywnie przez sadzonki zdrewniałe („sztobry”) w szkółce na polu oraz w doniczkach w podłożu.

5) Założenie i prowadzenie doświadczenia porównawczego z klonami selekcyjnymi przed zgłoszeniem odmian do badań rejestrowych COBORU (ocena fenotypowa, laboratoryjna i molekularna).

Ze względu na słabe przyjęcia się sadzonek zdrewniałych („sztobrów”) rozmnażanych klonów hodowlanych nie udało się założyć doświadczenia odmianowo-porównawczego na polu w SD w Dąbrowicach wiosną, ani jesienią 2022 r.

W 2022 r. wykonano analizy składu chemicznego owoców odmian porzeczeki czarnej hodowli IO-PIB w Skierniewicach, tj.: zawartość ekstraktu, suchej masy, kwasowości, związków fenolowych i antocyjanów oraz kwasu L-askorbinowego. Stwierdzono, że badane odmiany porzeczeki czarnej różniły się między sobą zawartością poszczególnych parametrów chemicznych. Najwyższą zawartość ekstraktu notowano w owocach odmian: ‘Tisel’, ‘Gofert’ i ‘Polonus’. Kwasowość w przeliczeniu na kwas cytrynowy była najwyższa w owocach odmian: ‘Tiben’, ‘Ores’ i ‘Thiope’. Zawartość suchej masy w owocach była najwyższa u odmian ‘Ruben’, ‘polonus’ i ‘Tisel’. Przeprowadzone badania składu związków bioaktywnych potwierdziły, że owoce porzeczeki czarnej są bogate w związki fenolowe, w tym w antocyjany oraz kwas L-askorbinowy. W owocach odmian ‘Polares’ i ‘Polonus’ stwierdzono najwyższą zawartość związków polifenolowych ogółem, a najwyższą zawartość antocyjanów miały owoce odmian ‘Polonus’ i ‘Ruben’. Owoce badanych odmian porzeczeki czarnej były bogate w kwas askorbinowy, najwięcej tego związku określono w owocach odmian ‘Tisel’,

'Polonus' i 'Polares'. Dane literaturowe potwierdzają, że owoce porzeczek czarnej są bogatym źródłem związków prozdrowotnych tj.: kwasu askorbinowego, polifenoli, w tym antocyjanów. Związki te zaliczane są do naturalnych antyoksydantów i mają istotne znaczenie prozdrowotne.

6) produkcja siewek z nasion uzyskanych z programu krzyżowań wykonanego w 2021 r., z udziałem tetraploidalnych klonów 2 odmian 'Gofert' i 'Polares';

Wyprodukowano i wysadzono 848 siewek porzeczek czarnej uzyskanych z programu krzyżowań (36 kombinacji) wykonanego w wiosną 2021 r. między wybranymi diploidalnymi (2n) i tetraploidalnymi (4n) klonami dwóch, polskich odmian 'Gofert' i 'Polares'. Siewki wysadzono na polu w Sadzie Pomologicznym „klin” (PP-PS-1B'2021) w Skierniewicach. Wstępne obserwacje wskazują, że młode siewki przyjęły się dobrze i podjęły wzrost wegetatywny. Zakłada się, że wstępna ocena fenotypowa młodych siewek mieszańcowych będzie przeprowadzona w sezonie wegetacyjnym w roku 2023 oraz w kolejnych 3-4 latach.

7) obserwacje fenotypowe wyprodukowanych siewek uzyskanych z programu krzyżowań z udziałem tetraploidów;

Wykonano ocenę fenotypową młodych, 1 rocznych 200 siewek porzeczek czarnej pod względem siły wzrostu i rozwoju na podstawie analizy zawartości chlorofilu w liściach (CCM-200 Plus) oraz pomiaru intensywności procesu fotosyntezy. Wykonano również trwałe preparaty mikroskopowe z fragmentów łodyg i liści zatopionych w parafinie i barwionych zielenią mocną i safraniną, które analizowano w mikroskopie świetlnym Optiphot-2 (Nikon) z użyciem systemu analizy obrazu (NIS-Elements Basic Research). Obserwacje wykazały występowanie różnic w budowie anatomicznej łodyg i liści siewek diploidalnych (2n) i tetraploidalnych (4n). Mieszańce tetraploidalne, w porównaniu z siewkami diploidalnymi, posiadały grubszą łodygę, warstwa perydermy miała bardziej zwarty układ komórek. Również pierścień wiązki przewodzącej był grubszy w porównaniu z łodygą diploidalną. Liście tetraploidalnych siewek były większe i grubsze. Podobnie, długość aparatów szparkowych oraz rozmiary komórek miękiszu palisadowego i gąbczastego były pozytywnie skorelowane z wielkością genomu. Obserwowano również różnice w ultrastrukturze chloroplastów, co może mieć wpływ na intensywność procesu fotosyntezy.

8) Ocena poziomu ploidalności uzyskanych siewek przy użyciu cytometrii przepływowej (potwierdzenie statusu mieszańca w przypadku krzyżowań genotypów diploidalnych z tetraploidalnymi oraz pomiędzy tetraploidami).

Przy użyciu cytometrii przepływowej aparatem CyFlow Ploidy analyse, z wykorzystaniem barwienia DAPI przebadano 800 siewek uzyskanych z krzyżowań wykonanych w 2021 r. pomiędzy wybranymi diploidalnymi i tetraploidalnymi klonami odmian 'Gofert' i 'Polares'. Oceniane siewki pochodzące od kombinacji krzyżowań 2x x 4x [(83 siewki) 'Polares' (2x) x 'Gofert' (4x) i (63 siewki) 'Gofert' (2x) x 'Polares' (4x)] okazały się diploidami (2x). Inne przebadane siewki (120 szt.) z kombinacji krzyżowań [Polares (4x) x Gofert (4x) i Gofert (4x) x Gofert (4x)] okazały się tetraploidami (4x). Siewki (534) otrzymane z nasion od kombinacji krzyżowań 'Polares' (2x) x 'Gofert' (2x) były diploidami.

9) Ocena cytologiczna wybranych genotypów (2 odmiany wyjściowe i wyselekcjonowane siewki)

Określono liczbę chromosomów dla odmiany 'Dlinnokistnaja', 2 odmian wyjściowych 'Gofert' i 'Polares', 6 ich tetraploidalnych klonów oraz 10 genotypów mieszańcowych porzeczek czarnej pochodzących od kombinacji krzyżowań form diploidalnych i tetraploidalnych ($2x \times 4x$). Dla badanych genotypów wykonano preparaty mikroskopowe z wierzchołków wzrostu korzeni traktowanych 8-hydroksychinoliną. Preparaty barwiono DAPI i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Optiphot-2 (Nikon) z użyciem systemu analizy obrazu (NIS-Elements Basic Research). Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że odmiany wyjściowe 'Gofert' i 'Polares' miały $2n=2x = 16$ chromosomów, liczba chromosomów u tetraploidalnych klonów wynosiła $2n=4x = 32$ chromosomy. Potwierdzono również liczbę chromosomów u innej formy rodzicielskiej 'Dlinnokistnaja' ($2n=3x= 24$ chromosomy), która okazała się odmianą triploidalną w hodowlanej kolekcji *Ribes* w ZHRO. Natomiast liczba chromosomów u wszystkich analizowanych mieszańców otrzymanych krzyżowań $2x \times 4x$ wynosiła $2n=2x = 16$ chromosomów.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

Prowadzono porady, głównie telefonicznie i e-mailowo dla plantatorów i amatorów w kraju i zagranicą na temat realizowanego programu hodowli twórczej porzeczek czarnej w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych IO-PIB, wartości produkcyjnej wyhodowanych odmian oraz ich przydatności do uprawy towarowej, w technologii kombajnowego zbioru owoców i produkcji owoców deserowych na świeży rynek w naszym kraju.

W Materiałach Konferencyjnych (Informator) XVIII Międzynarodowej Konferencji Sadowniczej „Jagodowe Trendy 2022”, organizowanej w dniach 25-26.11.2022 r., w Kraśniku opublikowano artykuł pt. „Hodowla twórcza porzeczek czarnej i osiągnięcia w ostatnich 35 latach w IO-PIB” – S. Pluta, Ł. Seliga, str. 48-50.