

### **Zadanie 109: Analiza fenotypowa i molekularna wybranej populacji segregującej jabłoni dla wyodrębnienia genotypów o zwiększonej tolerancji na zarazę ogniową i wysokiej jakości owoców**

W roku 2011 badania realizowano w Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych oraz Pracowni Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin Sadowniczych. Z uwagi na wieloletni charakter prowadzonych badań (rośliny drzewiaste) do wyprodukowania segregującej populacji jabłoni wykorzystano nasiona, z programu krzyżowań wykonanego wiosną 2010 roku. Zapylenia poprzedzono zebraniem pyłku oraz kastracją i izolacją kwiatów roślin matecznych. Nasiona otrzymano w wyniku skrzyżowania dwóch form rodzicielskich, odmiany 'Free Redstar' będącej donorem cech odporności na parcha jabłoni, mączniaka jabłoni i tolerancji na zarazę ogniową, ale o umiarkowanym smaku owoców oraz odmiany 'Idared' średnio wrażliwej na parcha i mączniaka jabłoni, bardzo wrażliwej na zarazę ogniową, ale o lepszym smaku i bardziej przydatnej do przerobu, której owoce mają doskonałe walory przechowalnicze. Łącznie zapylono 1.020 kwiatów, uzyskano 162 owoce, z których wydobyto 946 nasion. Następnie nasiona odkażono 0,1% roztworem fungicydu Benlate (poprzez zamoczenie na 48 godz.) i poddano stratyfikacji polegającej na umieszczeniu ich w wilgotnym, płukanym piasku w perforowanej torebce foliowej i przetrzymywaniu w chłodni w temperaturze około +5°C. Nasiona kielkujące sukcesywnie wyjmowano z piasku i wysadzano do małych plastikowych doniczek zespolonych, o kształcie odwróconego stożka, o podstawie prostokątnej i ściętym wierzchołku, wymiarach 5,5 cm x 5,5 cm x 6,2 cm i pojemności 90 cm<sup>3</sup>, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku w stosunku objętościowym 1:1:1 (1 nasiono do 1 doniczki). Doniczki z wysianymi nasionami ustawiano na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień – 22°C, noc – 18°C), pod sztucznym doświetlaniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia. Łącznie uzyskano 944 siewki, czyli 99,8 % w stosunku do liczby wysianych nasion. Na początku maja 2011 r. po uzyskaniu stadium 2-3 liści właściwych (wysokość siewek 10-15 cm) siewki przesadzono 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 roku 2011 w trakcie uprawy siewek w tunelu foliowym do podłoża w pojemnikach dodawano nawozy mineralne (Osmocote), w ilości 5 g/litr podłoża oraz wstawiano paliki bambusowe do cylindrów i przywiązywano do nich pędy przewodnikowe siewek, aby zapobiec ich przewracaniu się, wyłamywaniu i niewłaściwemu wzrostowi. W okresie wegetacji wykonywano także pielęgnację posadzonych siewek, uszczykiwano pędy boczne oraz niszczone chwasty w cylindrach. Nawadnianie roślin prowadzono systemem kroplowym, sterowanym automatycznie. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych. W dniu 5 lipca 2011 roku wykonano ocenę stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*) w tunelu foliowym. W wyniku tej oceny 935 siewek (99,05%) wykazało całkowitą odporność na parcha jabłoni w warunkach tunelowych, 9 siewek (0,95%) wykazało wysoką odporność na parcha jabłoni w warunkach tunelowych. W dniu 14 września 2011 roku oceniane siewki potraktowano bioregulatorem o nazwie Ethrel 480 SL, którego substancją czynną jest etefon (kwas 2-chloro-etylo-fosfoniowy), w ilości 2 ml/litr wody, poprzez opryskanie całych roślin. Zabieg ten sprzyjać będzie wcześniejszej indukcji pąków kwiatowych i kwitnieniu siewek w roku następnym, co pozwoli na wcześniejszą ocenę jakości owoców. W 2011 roku przeprowadzono także badania molekularne (miejsce realizacji: Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin Sadowniczych), określające status genotypów mieszańcowych dla pojedynków 'Free Redstar' x 'Idared' (994 pojedynki) oraz badania nad genetycznym uwarunkowaniem odporności, obejmujące analizę materiałów wyjściowych pod kątem obecności markerów odporności na zarazę ogniową (QTL – LG3 i LG7) i b) poszukiwanie nowych markerów odporności na zarazę ogniową poprzez ocenę zmian w ekspresji genów kandydujących. Do oceny statusu mieszańca użyto 5 starterów mikrosatelitarnych, zsyntetyzowanych pod podstawie sekwencji markerowych na genomowej mapie referencyjnej 'Fiesta' x 'Discovery' oraz analizie alleli w systemie sekwencyjnym Beckman Coulter. Wśród 214 roślin poddanych ocenie w 2011 roku żadna nie wykazywała obecności fragmentów genomu pochodzącego z nieznanego źródła, Analiza markerów sprzężonych z cechą odporności na zarazę ogniową wykazała, że każdy z genotypów potomnych tj. 'Idared' (podatny) i 'Free Redstar' (cechy tolerancji) zawierają w genomie 3 spośród pięciu testowanych markerów. Równocześnie w testach PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) stwierdzono odmienne profile dla każdej z tych odmian w odnienieniu do czterech genów z grupy PR, genu Beclin 1, WRKY i dwóch domen CHS.