

Zadanie 75 Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem różnej pory dojrzewania i jakości owoców

W roku 2014 realizowano cztery tematy badawcze:

Temat badawczy 1

Ocena stanu zdrowotnego wybranych form rodzicielskich maliny właściwej, uprawianych w szklarni ogrzewanej przed włączeniem do programu krzyżowań oraz ocena możliwości ich skrzyżowania w oparciu o wykonanie zaplanowanych kombinacji zapyleń

Celem badań było potwierdzenie, że rośliny maliny właściwej wytypowane do programu zapyleń są wolne od groźnych chorób wirusowych przenoszonych z pyłkiem, oraz że w wyniku ich krzyżowania można uzyskać żywotne nasiona dla otrzymania populacji siewek, charakteryzujących się genetyczną zmiennością pod względem badanych cech. Materiałem badawczym były rośliny 10 genotypów maliny właściwej, rosnące w szklarni. Były to: 'Canby', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Polana', 'Polka', 'Radziejowa', 'Schönemann', 'Sokolica', 'Veten', 'Willamette'. Przed krzyżowaniem, przy zastosowaniu testu DAS-ELISA i metody RT-PCR wykonano badania laboratoryjne, które potwierdziły, że rośliny przeznaczone do krzyżowania są wolne od chorób wirusowych. W miesiącach marzec-kwiecień wykonano program krzyżowań, zastosowano układ dialleliczny, według drugiej metody Griffinga, uwzględniającej krzyżowania wprost (45 kombinacji krzyżowań) i wsobne (10 kombinacji krzyżowań). Z dojrzałych owoców pozyskiwano nasiona, ich ilość zależała od kombinacji krzyżowań. Najwięcej nasion uzyskano z kombinacji zapyleń 'Polka' x 'Veten' (3.897 nasion) i 'Schönemann' x 'Willamette' (3.019 nasion). Najmniej nasion otrzymano z kombinacji zapyleń 'Glen Ample' x 'Glen Ample' (710), 'Glen Ample' x 'Radziejowa' (743), 'Glen Ample' x 'Veten' (746). Owoce uzyskane z tych kombinacji zapyleń odznaczały się też najmniejszą średnią liczbą nasion w owocu. Najmniej nasion zawierały jednak owoce otrzymane w wyniku samozapylecia kwiatów.

Temat badawczy 2

Ocena stopnia polimorfizmu DNA roślin genotypów maliny właściwej użytych w programie krzyżowań

Celem badań była ocena stopnia zróżnicowania genetycznego dziesięciu genotypów rodzicielskich maliny analizowanych z temacie 1. Polimorfizm DNA oceniano na podstawie wyników testów SSR, pozwalających na analizę sekwencji mikrosatelitarnych w genomach. W tym celu z roślin wszystkich genotypów wyizolowano materiał genetyczny (metoda Doyle i Doyle). Czystość uzyskanych preparatów DNA określano na podstawie analizy elektroforegramów uzyskanych po elektroforezie horyzontalnej w żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki przy długości fali 230, 260, 280 i 320 nm. Reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze firmy MJ Research, w mieszaninie reakcyjnej, zawierającej startery wytypowane z dostępnych baz danych rodzaju *Rubus* (CHFaM011, CHFaM018, CHFaM046, CHFaM056, CHFaM058, CHFaM061, CHFaM064, CHFaM069, CHFaM070, CHFaM072, CHFaM079, CHFaM083, CHFaM085, CHFaM089, CHFaM0110, Ru1b, Ru2a, Ru4a, Ru20a, Ru45c, Ru6a, Ru12a, Ru16a, Ru19a, Ru22a, Ru25a, Ru26a, Ru35a, Ru43a, Rur47a, Rur56a, Rur57a, Ru59b, Ru76b, Rubus98d, Rubus102c, Rubus105b, Rubus107a), przy zoptymalizowanych profilach termicznych. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym (obserwacje w świetle UV po wybarwieniu amplikonów 0,5% bromkiem etydyny) i w systemie elektroforezy mikroprzepływowej. Łącznie przeprowadzono 1600 reakcji amplifikacji. Polimorficzne fragmenty DNA obserwowano w reakcji z 26 parami starterów, w reakcjach z którymi uzyskano 176 polimorficznych amplikonów o długości od 100 do 800 pz, różnicujących wszystkie analizowane genotypy. Do przygotowania profili genetycznych wytypowano 9 starterów. Każda z odmian została scharakteryzowana na podstawie 13-21 polimorficznych produktów PCR. Pełna baza produktów polimorficznych posłużyła natomiast do określenia pokrewieństwa badanych form rodzicielskich (analiza kodów binarnych, met. Jaccarda). Stopień pokrewieństwa badanych genotypów określono w granicach od 27 do 53%. Wyróżniono dwa klasterki pokrewieństwa genetycznego. W pierwszym skupieniu wystąpiły odmiany 'Sokolica', 'Laszka' i 'Radziejowa'. Odmiany te wykazywały także pokrewieństwo z roślinami 'Glen Ample' i 'Polana'. W drugim klasterze znalazły się odmiany 'Schönemann', 'Canby', 'Willamette', 'Veten' i 'Polka'.

Temat badawczy 3

Optymalizacja pozbiorczonego traktowania zebranych nasion dla uzyskania dobrego kiełkowania i wzrostu siewek otrzymanych mieszańców

Celem badań była ocena trzech sposobów skaryfikacji nasion maliny właściwej, dla ustalenia, który z nich zapewnia najszybsze kiełkowanie nasion i najbardziej równomierny wzrost siewek. Materiałem badawczym były nasiona uzyskane w temacie 1, a pozbiorczone traktowanie nasion obejmowało trzy sposoby chemicznej skaryfikacji nasion i jeden sposób standardowej stratyfikacji, trwającej 6 tygodni. Sposoby skaryfikacji różniły się długością czasu, w jakim nasiona poddane były działaniu stężonego kwasu siarkowego (20 min., 30 min. i 40 min.). Pomimo zastosowanej skaryfikacji i długiej stratyfikacji, nasiona po wysiewie nie kiełkowały od razu, a kiełkowanie to nie było równomierne. Niezależnie od sposobu skaryfikacji, dopiero po 18 dniach od wysiewu obserwowano wschody pojedynczych nasion, chociaż był tu widoczny wpływ genotypów rodzicielskich, zwłaszcza odmian matecznych. Pod tym względem pozytywnie wyróżniały się odmiany Laszka, Radziejowa i Sokolica, użyte jako mateczne formy rodzicielskie. Wschody poprawiały się wraz z upływem dni od wysiewu. Przeciętnie dla badanych 55 rodzin mieszańców, po 32 dniach od wysiewu, przy pierwszym sposobie skaryfikacji, wzeszło 7,5% wysianych nasion, przy drugim – 9,2% nasion, a przy trzecim – 5,1%. Po kolejnych 30 dniach (po 60 dniach od wysiewu) ilość skiełkowanych nasion w tych kombinacjach wynosiła odpowiednio: 35,4%, 43,0% i 31,9%, a po upływie kolejnych dwóch tygodni (74 dni od wysiewu), czyli w ostatnim dniu oceny dynamiki kiełkowania badanych nasion – 39,3%, 45,3% i 35,6%. Tak więc najwięcej nasion skiełkowało, jeżeli nasiona, przed stratyfikacją były sakryfikowane stężonym kwasem siarkowym w czasie 30 minut. Niezależnie od sposobu pozbiorczonego traktowania nasion najgorzej kiełkowały nasiona w tych rodzinach mieszańców, w których formą mateczną była Polana (od 0% do 12% skiełkowanych nasion), co świadczy o bardzo małej przydatności tego genotypu do tworzenia nowej zmienności genetycznej u maliny właściwej.

Temat badawczy 4

Indywidualna wstępna ocena cech fenotypowych roślin wszystkich rodzin mieszańców dla określenia potencjału genetycznego wybranych genotypów maliny właściwej i ich przydatności do tworzenia nowej zmienności genetycznej

Celem badań była ocena wigoru wyprodukowanych siewek dla stwierdzenia w jakim stopniu sposób skaryfikacji nasion i rodowód decydują o sile wzrostu siewek we wczesnym stadium ich rozwoju. Materiałem badawczym były siewki rodzin mieszańców, wyprodukowane w temacie badawczym 3. Skiełkowane nasiona (siewki w fazie 2 liścieni) pikowano w miarę wschodów, pojedynczo do doniczek o pojemność 360 cm³, w mieszaninę substratu torfowego i piasku. Doniczki z siewkami ustawiano na parapecie w ogrzewanej i doświetlanej szklarni. Zaplanowano wypikowanie 80 siewek z każdej kombinacji pozbiorczonego traktowania nasion. Oceny siły wzrostu rozpikowanych siewek dokonano 8 października 2014 r. Oceniano oddzielnie każdą siewkę, stosując skalę bonitacyjną 1-5, w której 1 to siewki najslabiej rosnące, a 5 najsilniej rosnące. Wykazano, że sposoby sakryfikowania nasion miały wpływ na to ile siewek uzyskano po upływie 74 dni od wysiewu. Najwięcej siewek wyrosło z nasion sakryfikowanych według drugiego sposobu (traktowanie nasion stężonym H₂SO₄ w ciągu 30 min.). Było to 3595 siewek, czyli o 13,8% więcej niż z nasion sakryfikowanych według sposobu pierwszego (stężony H₂SO₄ w ciągu 20 min.) i 14,1% więcej niż według sposobu trzeciego (stężony H₂SO₄ w ciągu 40 min.). Jednakże siewki bardzo różniły się siłą wzrostu i zależało to też od kombinacji krzyżowań. Przy pierwszym, najbardziej łagodnym sposobie sakryfikowania nasion, najsilniej rosły siewki tych rodzin, w których formami matecznymi były 'Laszka', 'Radziejowa' i 'Sokolica'. Niekorzystny wpływ na wzrost siewek miały mateczne odmiany 'Canby' i 'Glen Ample', a w rodzinach 'Canby' x 'Glen Ample', 'Canby' x 'Laszka', 'Canby' x 'Polana', a nawet 'Canby' x 'Polka' nie udało się wyprodukować 80 szt. siewek. Podobne stwierdzenie można odnieść do drugiego sposobu traktowania nasion, ale nie do sposobu trzeciego. W tym ostatnim przypadku, w rodzinach, w których formą mateczną były takie odmiany, jak 'Canby', 'Glen Ample' i 'Polana' nie udało się uzyskać zaplanowanych ilości (80 szt.) siewek, ale najgorzej wypadły te rodziny mieszańców, w których formą mateczną była 'Polana'. Przeciętnie w ocenianej populacji najsilniej rosły te siewki, które wyrosły z nasion sakryfikowanych H₂SO₄ w czasie 30 minut (2,1 punktu w pięciostopniowej skali bonitacyjnej). Tylko nieco słabiej rosły siewki gdy nasiona były poddane działaniu H₂SO₄ przez 20 minut (1,9 punktu), a najslabiej te, które otrzymano z nasion traktowanych H₂SO₄ przez 40 minut (1,7 punktu). W dniu oceny badane siewki bardzo różniły się siłą wzrostu, były zarówno siewki rosnące bardzo silnie, którym przypisano 5 punktów, jak i takie, które rosły bardzo słabo, którym przypisano tylko 1 punkt. Najsilniej rosły te siewki, które wyrosły z najwcześniej kiełkujących nasion, najlepszą siłą wzrostu odznaczały się te siewki, które otrzymano z nasion sakryfikowanych w H₂SO₄ w czasie 30 minut.