

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 bezciernistych.

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;
- 2) Opracowanie markerów opartych na analizie sekwencji genomowych oraz ocenie stopnia zróżnicowania poziomu ich ekspresji, przydatnych do monitorowania ww. cech i selekcji najcenniejszych genotypów podkładek dla jabłoni.

W ramach zadania 3.14 w 2022 r. wykonano następujące prace:

Wykonano 7 kombinacji krzyżowań; zapyłono 755 kwiatów; zebrano 110 owoców; wydobyto 567 nasion; wyprodukowano w szklarni/ kontynuowano uprawę w polu 74 siewek; w mateczniku selekcyjnym oceniano 3 216 siewek; rozmnożono 5 pojedynków wyselekcjonowanych w poprzednim roku; oceniano 223 klony selekcyjne; wyselekcjonowano 4 najcenniejsze klony; prowadzono 1 doświadczenie podkładowo-odmianowe i 1 doświadczenie demonstracyjno-wdrożeniowe. Z uzyskanej puli roślin wyselekcjonowano 5 genotypów podkładek: PJ-173/2012, PJ-191/2016, P 59, P 60, M.9. Dla celów przeprowadzenia oceny zróżnicowania genetycznego, z wytypowanych roślin skolekcjonowano próby - młode liście. Z pobranej tkanki wyizolowano materiał genetyczny. Na matrycy DNA przeprowadzono reakcje amplifikacji specyficznych fragmentów i dla każdego uzyskanego profilu genetycznego sporządzono matrycę binarną. Ostatecznie przeprowadzono analizę zróżnicowania genetycznego wytypowanych genotypów podkładek dla jabłoni (analiza UPGMA i PCA). W ramach zadania przygotowane rośliny ww. genotypów poddano procesowi inokulacji grzybem *Phytophthora cactorum*. Podczas wstępnej oceny stopnia porażenia zaobserwowano bark specyficznych objawów chorobowych, a dalsza ocena kontynuowana będzie w latach następnych. Z roślin inokulowanych *P. cactorum* pobrano liście, pędy i korzenie, z których wyizolowano całkowite RNA. Po przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji, dla dwóch wytypowanych sekwencji regulatorowych (PR-5 oraz CDSDeh) sporządzono odrębne profile ekspresji. W badanych próbach (genotyp/ tkanka roślinna) odnotowano zróżnicowane ilości transkryptów badanych genów.

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

Utrzymywano 3216 siewek w polowym mateczniku selekcyjnym oraz 223 podkładowki w polowej kolekcji klonów. W warunkach kontrolowanych *in vitro* (chłodnia/fitotron) utrzymywane są pędy podkładek P 66 i P 68, materiał jest sukcesywnie przekazywany do doświadczeń polowych IO-PIB.

2) dobór form rodzicielskich do krzyżowań w oparciu o ich cechy fenotypowe, testy laboratoryjne i molekularną ocenę stopnia pokrewieństwa metodami SSR-PCR oraz przy zastosowaniu programów statystycznych przeznaczonych do analizy skupień PCA, UPGMA;

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) 19 podkładek dla jabłoni, które mogą być potencjalnymi formami rodzicielskimi do nowych programów krzyżowań. Ocenianymi podkładowkami były: M.9, M.26, 'Jork 9', 'Mark',

'Bemali', CG 11, CG 13, CG 16, CG 41, P 59, P 60, P 66, P 67, P 68, B 9, PB-4, 'Supporter 1vf', 'Supporter 2vf' i 'Supporter 3vf'. W oparciu o oceniane cechy za szczególnie przydatne do nowych programów krzyżowań uznano podkładowki 'Bemali', CG 16, CG 41 i P 67.

Ocenę stopnia pokrewieństwa ww. podkładek (analiza DNA), stosując testy PCR z 10 wybranymi markerami molekularnymi (SSR), wyznaczonych na podstawie analizy map referencyjnych genomu jabłoni (Apple Database (www.hidras.unimi.it) oraz uzyskanych w PGIHRS ('Free Redstar', 'Oliwka Żółta', 'Rajka' i 'Topaz').

Łącznie przeprowadzono ponad 400 reakcji PCR, w których zidentyfikowano 86 polimorficznych fragmentów DNA różnicujących badane genotypy. Do analizy różnicowania genetycznego użyto programu XLStat 2006 i metody: PCA (*Principle Component Analysis*) oraz UPGMA (*Unweighted pair-group average*).

Poziom różnicowania pomiędzy badanymi genotypami podkładek dla jabłoni wyniósł w zakresie 3-22% . Na podstawie analizy UPGMA podkładowki pogrupowano w 4 klastrach. W pierwszej grupie znalazły się podkładowki P 59, PJ-191/2016, Bemali, PJ-173/2012, P 60, Mark, M.9, P 67, CG 13, CG 11, CG 41, CG 16, w drugiej grupie natomiast: M.26, P 60, 'Supporter 2vf', 'Supporter 1vf', 'Supporter 3vf', B 9, PB-4 oraz 'Jork 9'. W wyniku przeprowadzenia analizy skupień (PCA), różnicowanie pomiędzy obecnością lub brakiem w genomach podkładek zidentyfikowanych fragmentów DNA, odnotowano na poziomie około 56%.

3) wykonywanie programów krzyżowań oraz zbiorów owoców, pozyskiwanie i wysiew nasion;

Wykonano 7 kombinacji krzyżowań (program krzyżowań dla uzyskania podkładek tolerancyjnych na zgniliznę pierścieniową podstawy pnia jabłoni i karłowych) z użyciem 9 form rodzicielskich (CG 41, M.9, M.26, B 9, P 22, 'Bemali', 'Supporter 1vf', 'Supporter 2vf' i 'Supporter 3vf'), zapylono 755 kwiatów. Do zapyleń włączono: słabo rosnącą podkładowkę CG 41, wyhodowaną w Nowojorskiej Stacji Doświadczalnej w Genewie (USA), podkładowkę B 9 (pochodząca z Rosji) oraz podkładowkę 'Bemali', odporne na zarazę ogniową, mączniaka jabłoni i zgniliznę pierścieniową podstawy pnia, charakteryzujące się brakiem cierni oraz wytrzymałe na mróz.

Zebrano 110 owoców. Po zbiorze owoce umieszczono w chłodni w temperaturze +2°C i jesienią wydobyto z nich nasiona (skolekcjonowano 567 nasion). Nasiona umyto i pozostawiono do wysuszenia w warunkach pokojowych, odkażono 0,5% roztworem fungicydu Aliette 80 WG i poddano stratyfikacji (umieszczono w piasku w torebce foliowej) i przechowywano w temperaturze +5°C.

4) produkcja siewek w szklarni i sadzenie siewek w polowej kwaterze selekcyjnej;

W szklarni prowadzono uprawę 74 siewek podkładek jabłoni, wyprodukowanych z nasion otrzymanych w roku 2021. Siewki, celem dalszego wzrostu, umieszczono na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień +22°C, noc +18°C), pod sztucznym doświetlaniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia. Następnie 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 pożądanych cech);

Kontynuowano uprawę i pielęgnację oraz wykonano ocenę siły wzrostu i zdrowotności 3216 siewek wyprodukowanych w latach 2009-2021, rosnących w maceczniku selekcyjnym. Sukcesywnie prowadzono zabiegi ochrony roślin i zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie, obsypywanie podkładek. Oceniono zdolność ukorzenia wyrastających pędów, stosując pięciostopniową skalę bonitacyjną, gdzie 1 – oznacza brak korzeni, 5 – bardzo dobre ukorzenie. Wyselekcjonowano 4 pojedynki [PJ-229/22 (PJ-2018-03– CG 41 x ‘Supporter 2vf’), PJ-230/22 (PJ-2018-04– CG 41 x B 9), PJ-231/22 (PJ-2018-05– ‘Bemali’ x ‘Supporter 1vf’), PJ-232/22 (PJ-2018-09– P 67 x P 22)] 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 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’)] wyselekcjonowanych w poprzednim roku, o wysokiej zdolności ukorzenia, tworzących wzniesione i bezcierniste lub nieznacznie cierniste pędy.

W kulturach *in vitro*, utrzymywane / sukcesywnie przeszczepiane są rośliny podkładek P 68 i P 66 z zastosowaniem pożywek o zróżnicowanym składzie. W prowadzonych kulturach pędów wegetatywnych lepsze parametry namnażania odnotowano dla podkładki P 68.

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

Oceniano podstawowe parametry szkółkarskie 223 podkładek w kolekcji klonów: wysokość i średnicę pędów, liczbę cierni oraz zagęszczenie węzłów. Wszystkie badane podkładki ukorzeniały się na podobnym poziomie, a bezcierniste 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 belgijce.

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 do uzupełnienia jesienią doświadczenia podkładowo-odmianowego: **Podkładki dla jabłoni – 1/2021** - doświadczenie porównawcze z 2 klonami podkładek: PJ-191/2016 i PJ-173/2012, standardowa podkładka M.9 i odmiany standardowe ‘Szampion’ i ‘Gloster’. W 2022 roku oceniono siłę wzrostu drzew, wyrażoną jako pole przekroju poprzecznego pnia. Drzewa obu odmian standardowych (‘Szampion’ i ‘Gloster’) rosły najsilniej na podkładce PJ-191/2016, nieco słabiej na podkładce PJ-173/2012, zaś najsłabiej na podkładce standardowej M.9.

Dodatkowo dla ww. roślin przeprowadzono ocenę molekularną (DNA fingerprinting) celem uzupełnienia metek identyfikacyjnych.

9) testowanie wartościowych genotypów pod względem tolerancji na stropy biotyczne i abiotyczne w warunkach kontrolowanych (sztuczne przemrażanie roślin, inokulacja roślin zawiesiną zarodników grzyba *Phytophthora cactorum*); przewidziane będzie założenie doświadczenia (tunel) obejmującego inokulację roślin *P. cactorum* – sprawca zgnilizny podstawy pnia jabłoni i ich ocenę fenotypową i molekularną;

Przygotowano doświadczenie, oceniające stopień podatności wyselekcjonowanych podkładek dla jabłoni: PJ-173/2012, PJ-191/2016, M.9, P 59, P 60 na zgniliznę podstawy pnia. Rośliny poddano immunizacji przygotowaną zawiesiną inokulum zawierającą 10^7 ml⁻¹ (zliczone w komorze Bürckera) konidiów grzyba *Phytophthora cactorum* – sprawca zgnilizny podstawy pnia jabłoni. Szczep PCLukMich grzyba *P. cactorum* pochodził z kolekcji patogenów Zakładu Ochrony Roślin Ogrodniczych IO-PIB. W tym celu prowadzono hodowlę grzyba na pożywkę ziemniaczaną PDA (Czapeks Agar, Duchefa) z godnie z opracowaną w IO-PIB metodyką. Pożywkę, przefiltrowaną kulturą grzyba, rozdrabniano przy użyciu blendera kielichowego (Zelmer) i mieszano z podłożem (torf i piasek vv. 1:1; 1 szalka na 1 litr podłoża), a rosące w tunelu siewki wyselekcjonowanych podkładek przesadzono do zainfekowanego zarodnikami *P. cactorum* podłoża oraz dodatkowo podlano zawiesiną patogena. Po posadzeniu rośliny przycięto i pozostawiono do dalszego wzrostu.

Doświadczenie prowadzone jest w tunelu foliowym. Pierwszą ocenę zakażonych roślin przeprowadzono po 14 dniach od inokulacji, a następne obserwacje wykonywano co 20 dni (wrzesień-grudzień). Dla inokulowanych roślin w sezonie badawczym (2022) nie zaobserwowano istotnych objawów, ale ze względu na długotrwały proces rozwoju choroby rośliny pozostawiono w tunelu do dalszej oceny. Na okres zimy rośliny zabezpieczono opaskami foliowymi i pozostawiono do obserwacji, która będzie kontynuowana w roku 2023.

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

Prowadzone jest 1 doświadczenie demonstracyjno-wdrożeniowe:

Podkłádki dla jabłoni – DW-2021 – doświadczenie z 2 klonami podkładek dla jabłoni: PJ-191/2016 i PJ-173/2012, odmiana standardowa ‘Szampion’. W 2022 roku oceniono siłę wzrostu drzew, wyrażoną jako pole przekroju poprzecznego pnia. Zaobserwowano, że drzewa odmiany standardowej ‘Szampion’ rosły silniej na podkładce PJ-191/2016 niż na podkładce PJ-173/2012.

11) wyizolowanie DNA/RNA z tkanek roślin wytypowanych genotypów podkładek zróżnicowanych pod względem ocenianych cech (wstępna ocena fenotypowa), przeznaczonych do badań w tym z roślin inokulowanych *P. cactorum*;

Do badań molekularnych użyto materiał skolekcjonowany z 5 podkładek dla jabłoni: PJ -173/2012, PJ-191/2016, P 59, P 60, P 66 oraz standardowej M.9, z którego wyizolowano matryce DNA (młode liście; metoda oparta na CTAB wg. Aldrich i Culis 1998) oraz RNA (pęd, korzeń i liście: pobrane przed w 14 dniu od inokulacji *P. cactorum*; wg metody Zeng i Yang 2000).

Jakość i koncentracje preparatów oceniono odpowiednio: spektrofotometrycznie (spektrofotometr GeneQuant *pro*) oraz przy użyciu Bioanlizatora Agilent 2100 (Pelran Technologies programu Expert 2100). Odwrotną transkrypcję RNA do cDNA prowadzono przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNASynthesis Kit (Agilent), w obecności uniwersalnego startera oligo-dT (0,1µg/µl) oraz enzymu – odwrotnej transkryptazy (RT) w zoptymalizowanych warunkach termicznych: 25°C/ 5 min., 42°C/ 5 min. - przyłączanie oligo-dT, 55°C/ 15 min - RT, 95°C/ 5 min.

– inaktywacja enzymu (termocyklery Biometra Basic). Stabilne cDNA stanowiło matrycę dla ilościowej reakcji amplifikacji (RT-qPCR).

12) wytypowanie sekwencji genów kandydujących oraz sekwencji transpozomowych (dostępne bazy, literatura, sekwencje o zróżnicowanej ekspresji uzyskane z analiz NGS i inne), do analizy qPCR poprzez opracowanie ich profili ekspresyjnych.

Ocenę profilu ekspresji przeprowadzono dla genów DHS (CDSDeh, koduje białko dehydryny) oraz PR-5 (pathogene related gene) związanych z odpowiedzią roślin na stresy abiotyczne i biotyczne. Relatywną ekspresję ww. genów obliczono w odniesieniu do sekwencji referencyjnego genu Md18sRNA za pomocą programu RotorGene 6000 Series Software v. 1.7 (Corbett Life Science).

Dla podkładek M.9, PJ191, P 60 oraz P 59 (w liściach i pędach) odnotowano wysoką aktywność badanych genów. Inhibicję ekspresji PR-5 zaobserwowano w liściach i pędach podkładki PJ173 i P 60, a obu genów w tkankach korzeni podkładek M.9, PJ173, PJ191 i P 59. Ponadto, wysoką aktywności genu CDSDeh oszacowano w pędach i liściach odpowiednio podkładek PJ173 i P 60.

Najwyższą aktywność genu PR-5 odnotowano w próbkach liści pobranych z podkładki PJ191 oraz w tkankach pędów podkładki P 59 i korzeni podkładki P 60.

Wymierne rezultaty realizacji poszczególnych zadań

Badane podkładki pogrupowano pod względem stopnia ich różnorodności genetycznej. Scharakteryzowano profile ekspresji genów uczestniczących w regulacji ich odpowiedzi na stres abiotyczny oraz biotyczny. Pełna weryfikacja aktywności genów PR będzie przeprowadzona w kolejnych sezonach badawczych.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

W siedzibie Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, a także telefonicznie oraz e-mailowo udzielano porad i konsultacji wielu producentom na temat realizowanego w IO-PIB programu hodowli podkładek dla jabłoni, wartości produkcyjnej wyhodowanych podkładek oraz ich przydatności dla hodowli odmian przeznaczonych do uprawy towarowej w Polsce.

Prowadzono spotkania informacyjne dla producentów owoców oraz szkółkarzy posiadających lub zainteresowanych licencjami na podkładki dla jabłoni wyhodowane w IO-PIB.

18 listopada br. przeprowadzono, w laboratorium PGIHRS, warsztaty dla studentów Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, w ramach których przedstawiono sposoby opracowania markerów molekularnych dla cech użytkowych podkładek wegetatywnych dla jabłoni i odmian jabłoni - dr inż. Sylwia Keller-Przybyłkiewicz.

25 listopada br. odbyły się w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach wykłady dla studentów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Podczas spotkania wygłoszono prelekcję: „Zastosowanie biotechnologii w ogrodnictwie” – dr inż. Sylwia Keller-Przybyłkiewicz.