

Zadanie nr 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.

Kierownik zadania: dr inż. Sylwia Keller-Przybyłkiewicz

Cel 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.

Zakres rzeczowy zadania i przyjęte cele realizowano zgodnie z założeniami na 2023 rok.

Wykonano 7 kombinacji krzyżowań, zapyłono 935 kwiatów, zebrano 93 owoce i wydobyto 544 nasiona; wyprodukowano w szklarni/ kontynuowano uprawę w polu 429 siewek; w mateczniku selekcyjnym oceniano 3 290 siewek; rozmnożono 4 pojedynki wyselekcjonowane w poprzednim roku; oceniano 228 klonów selekcyjnych; prowadzono 1 doświadczenie podkładowo-odmianowe i 1 doświadczenie demonstracyjno-wdrożeniowe. Podobieństwo genetyczne (analiza UPGMA i PCA) pomiędzy podkładkami CG14, CG13, 'Bemali', PB-4, P 59, 'Supporter 2vf', 'Mark', CG16, 'Supporter 1vf', P 67, P 66, CG11, B9, P 60, PJ-173/2014, M.26, 'Supporter 3vf', PJ-191/2016, M.9 oraz 'Jork 9' oszacowano na poziomie 39%. Kontynuowano prowadzenie doświadczenia (2021 r.), w którym podkładki PJ-173, PJ-191, P 59, M.9 oraz P 60 zakażono grzybem *Phytophthora cactorum* (sprawca zgnilizny pierścieniowej pnia korzeni). Z podkładki PJ-173/2012 niezakażanej oraz porażonej *P. cactorum* wyizolowano RNA do analizy NGS. W wyniku sekwencjonowania jej transkryptomu, 34 478 surowych sekwencji zmapowano na genom referencyjny 'Golden Delicious'. Wyłonionym genom przypisano grupy funkcyjne: procesy biologiczne (7 681), komponenty komórkowe (2 724) i czynniki molekularne (4 938). Zróżnicowane geny zmapowano w szlaku przetwarzania białek w siateczce śródplazmatycznej (KEGG, mdm4141) oraz wytypowano trzy geny: BiP, HsP70 oraz sHSF, które wykazały nadekspresję w ww. szlaku.

Opracowano profile ekspresji (w tkankach liści, pędów i korzeni ww. podkładek) genów PR2 i PR8. regulujących odpowiedź roślin na czynnik chorobotwórczy oraz Md827882 i Md187048 warunkujących tolerancję roślin na mróz. Dodatkowo, dla perspektywicznych genotypów podkładek dla jabłoni sporządzono metki identyfikacyjne (DNA *fingerprinting*) oraz założono kultury *in vitro*, celem ich namnożenia i przekazania do dalszych doświadczeń polowych.

W ramach zadania 3.14 w 2023 r. wykonano następujące prace:

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

Utrzymywano 3 290 siewek w polowym mateczniku selekcyjnym oraz 228 klonów selekcyjnych podkładek w polowej kolekcji klonów.

Ponadto, 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 podkładkami 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 badane cechy za szczególnie przydatne do nowych programów krzyżowań uznano podkłádki 'Bemali', CG 16, CG 41, P 67 i B 9.

W wyniku przeprowadzonych testów SSR-PCR oraz analizy porównawczej profilu elektroforetycznego fragmentów DNA badanych genotypów podkłádek dla jabłoni, ustalono ich stopień podobieństwa genetycznego na poziomie 39%. Najbardziej oddalona genetycznie okazała się podkłádka P 59, wykazująca 20 procentowe podobieństwo do pozostałych badanych podkłádek.

3. Wykonywanie programów krzyżowań (7 kombinacji) oraz zbiorów owoców, pozyskiwanie i wysiew nasion;

Wykonano 7 kombinacji krzyżowań w kierunku uzyskania podkłádek tolerancyjnych na zgniliznę pierścieniową podstawy pnia jabłoni i karłowych. Użyto 8 form rodzicielskich ('CG 41', 'M.26', 'B 9', 'P 22', 'P 16', 'Supporter 1vf', 'Supporter 2vf' i 'Supporter 3vf'), zapyłono 935 kwiatów. Zebrano 93 owoce, z których, po przechłodzeniu w temperaturze +2°C, skolekcjonowano 544 nasiona. Nasiona umyto, wysuszone w warunkach pokojowych, odkażono 0,5% roztworem fungicydu Aliette 80 WG (poprzez zamoczenie na 48 godz.) i poddano stratyfikacji (umieszczenie w wilgotnym, płukanym piasku i przechowaniu w temperaturze około +5°C do momentu wysadzenia).

4. Produkcja siewek w szklarni i sadzenie siewek w polowej kwaterze selekcyjnej;

W szklarni prowadzono uprawę 429 siewek podkłádek dla jabłoni wyprodukowanych z nasion otrzymanych w roku 2022. Siewki umieszczono na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień +22°C, noc +18°C), pod sztucznym doświetlaniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia. W drugiej połowie maja siewki te posadzono w mączniku selekcyjnym, w którym prowadzono zabiegi ochrony roślin i zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie i 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 3 290 siewek wyprodukowanych w latach 2009-2022, rosnących w mączniku selekcyjnym. Prowadzono zabiegi ochrony roślin i zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie, obsypywanie podkłádek. Jesienią oceniono zdolność ukorzenia wyrastających pędów. Zastosowano pięciostopniową skalę bonitacyjną, gdzie 1 – oznacza brak korzeni, 5 – bardzo dobre ukorzenie. Wyselekcjonowano 4 pojedynki [PJ-233/23 (PJ-2020-02 (1) – CG 41 x 'Supporter 2vf'), PJ-234/23 (PJ-2020-02 (2) – CG 41 x 'Supporter 2vf'), PJ-235/23 (PJ-2020-02 (3) – CG 41 x 'Supporter 2vf'), PJ-236/23 (PJ-2021-01 – M.9 x 'Supporter 3vf'),] o wysokiej zdolności ukorzenia, tworzących wzniesione i bezierniste 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 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 bezierniste lub nieznacznie cierniste pędy.

Z wyselekcjonowanych roślin podkłádek PJ-173/2012 i PJ-191/2016 pobrano 50 pędów celem zainicjowania kultur *in vitro*. Zaobserwowano, że PJ-173/2012 charakteryzuje się lepszą zdolnością do regeneracji, w porównaniu do PJ-191/2016. Prace nad optymalizacją metody (warunków wzrostu oraz składu pożywki), najkorzystniejszej dla prowadzenia kultur wytypowanych podkłádek dla jabłoni będą kontynuowane w kolejnych latach.

7. Ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych i rozmnożenie najcenniejszych genotypów (4 genotypy);

Oceniano podstawowe parametry szkółkarskie (wysokość i średnicę pędów, liczbę cierni oraz zagęszczenie węzłów) 228 podkłádek w kolekcji klonów. Wszystkie badane podkłádki 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 belgijce.

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

W 2023 roku prowadzono 1 doświadczenie podkładowo-odmianowe:

Podkłádki dla jabłoni – 1/2021 - doświadczenie porównawcze z 2 klonami podkłádek dla jabłoni: PJ 191/2016 i PJ-173/2012, standardowa podkłádka M.9 i odmiany standardowe ‘Szampion’ i ‘Gloster’. Oceniono intensywność kwitnienia, wielkość plonu i masę 1 owocu oraz siłę wzrostu drzew (wyrażoną jako pole przekroju poprzecznego pnia). Najintensywniej kwitły oraz najwyższy plon i największe owoce dawały drzewa odmiany standardowej ‘Szampion’ rosnące na podkłádce PJ 173/2012. W odniesieniu do podkłádki standardowej M.9 drzewa odmian ‘Szampion’ i ‘Gloster’ rosły najsilniej na podkłádce PJ-191/2016, a słabiej na PJ-173/2012. Dla najbardziej perspektywicznych genotypów podkłádek PJ-173/2012 i PJ-191/2016+ sporządzono metkę identyfikacyjną (DNA *fingerprinting*).

9. Testowanie wartościowych genotypów pod względem tolerancji na stropy biotyczne i abiotyczne w warunkach kontrolowanych (sztuczne przemrażanie roślin, wstępna ocena fenotypowa i molekularna roślin inokulowanych *Phytophthora cactorum* (sprawca zgnilizny podstawy pnia jabłoni)) – w ramach doświadczenia rozpoczętego w 2022 roku (tunel).

W ramach doświadczenia (założone w 2021 r.) rośliny podkłádek M.9, PJ-173/2012, PJ-191/2016, P 59 oraz P 60 inokulowano zarodnikami grzyba *Phytophthora cactorum* (sprawca zgnilizny pierścieniowej korzeni). Celem selekcyjnej detekcji obecności aktywnych zarodników patogena dla prób ziemi, w której rosną rośliny wykonano testy pułapkowe. Obecność czynnika chorobotwórczego potwierdzono w podłożu, w którym rosła podkłádka PJ-173/2012. Z roślin zakażonych oraz kontrolnych podkłádek PJ-173/2012 i standardowej M.9 pobrano próbki korzeni w celu izolacji całkowitego RNA do przeprowadzenia porównawczej analizy transkryptomowej (NGS).

W wyniku sekwencjonowania ich transkryptomów w systemie Illumina uzyskano łącznie 34 478 surowych odczytów, które zmapowano na genomie referencyjnym odmiany ‘Golden Delicious’ (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_002114115.1/).

Po przeprowadzeniu normalizacji surowych danych z eksperymentu, 9 335 genów było aktywowanych, a 9 342 - inhibowanych. Wyekstrahowane (Gene Ontology enrichment, analiza funkcjonalna) geny przypisano do trzech głównych grup funkcyjnych/adnotacyjnych: procesy biologiczne (7 681), komponenty komórkowe (2 724) oraz czynniki molekularne (4 938).

Wyłonione geny zmapowano w szlakach metabolicznych bazy KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Największą liczbę zróżnicowanych genów zadnotowano w szlaku przetwarzania białek w siateczce śródplazmatycznej (mdm4141). Trzy z nich tj: BiP, HsP70 (biorący udział w tworzeniu kompleksu ligazy ubikwitynowej) oraz sHSF (istotnie upregulowane w poniższym szlaku) zostaną poddane dalszej analizie weryfikacyjnej (RT-qPCR).

10. Zakładanie i prowadzenie doświadczeń demonstracyjno-wdrożeniowych dla upowszechniania nowych genotypów;

Prowadzono 1 doświadczenie demonstracyjno-wdrożeniowe:

Podkłádki dla jabłoni – DW-2021 – doświadczenie z 2 klonami podkłádek dla jabłoni: PJ-191/2016 i PJ-173/2012, odmiana standardowa ‘Szampion’ (SD Dąbrowice).

Oceniono intensywność kwitnienia, wielkość plonu i masę 1 owocu oraz siłę wzrostu drzew (wyrażoną jako pole przekroju poprzecznego pnia). Najintensywniej kwitły drzewa odmiany standardowej ‘Szampion’ na podkłádce PJ-173/2012. Dla tej kombinacji komponentów (odmiana/ podkłádka) otrzymano wyższy plon z drzewa oraz większe owoce, a drzewa odmiany standardowej ‘Szampion’ rosły silniej na podkłádce PJ-191/2016 niż na podkłádce PJ-173/2012.

W ramach badań molekularnych równolegle prowadzono prace obejmujące:

11. Wyizolowanie DNA/RNA z tkanek roślin wytypowanych genotypów podkłádek zróżnicowanych pod względem ocenianych cech (wstępna ocena fenotypowa), przeznaczonych do badań.

Do badań molekularnych skolekcjonowano RNA z 5 podkładek: PJ -173/2012, PJ-191/2016, P 59, P 60 oraz standardowej M.9.

Profile ekspresyjne (testy RT-qPCR) sporządzono dla genów z grupy PR (pathogenesis related), związanych z regulacją z odpowiedzią roślin na czynniki biotyczne. Istotne różnice w liczbie transkryptu genu PR2 odnotowano w próbkach liści, pędów oraz korzeni wszystkich badanych podkładek. W przypadku prób z liści odnotowano jego większą aktywność. Wzrost liczby transkryptu tego genu zaobserwowano także w pędach (4-krotny) podkładki P 60. Istotny spadek/brak aktywności PR2 odnotowano natomiast w próbach skolekcjonowanych z liści podkładki P 59 oraz z prób korzeni podkładek PJ-173/2012, PJ-191/2016, P 59 i P 60.

W przypadku genu PR8 w badanych próbach nie odnotowano istotnych różnic w oszacowanej liczbie transkryptu, a jego aktywność, we wszystkich badanych próbkach podkładek dla jabłoni, była identyczna jak w próbie kontrolnej M.9.

12. Wytypowanie sekwencji genów kandydujących oraz sekwencji transpozomowych (dostępne bazy, literatura, sekwencje o zróżnicowanej ekspresji uzyskane z analiz NGS wyłonione na podstawie przeprowadzonego sekwencjonowania transkryptomów podkładek wzorcowych – 2 sekwencje z odczytu bibliotek NGS), do analizy qPCR poprzez opracowanie ich profili ekspresyjnych.

Do oceny profilu ekspresji wytypowanych genów kandydujących, z tej samej puli podkładek przygotowano matryce RNA/ cDNA (zgodnie z pkt. 11).

Ocenę profilu ekspresji przeprowadzono dla genów o identyfikatorach Md827882 i Md187048 (białka regulujące odpowiedź roślin na stres mrozu - baza sekwencyjna genów mrozoodporności PGIHRO).

W odniesieniu do podkładki standardowej M.9 (wrażliwa na niskie temperatury), istotny wzrost ekspresji (krotność od 15 do 70 razy), w próbach skolekcjonowanych z pędów podkładek PJ-173/2012, PJ 191/2016, P 59 oraz P 60 odnotowano dla obu wybranych genów. Może to świadczyć, że pędy tych podkładek wykazują większą tolerancję na mróz. Dla prób liści i korzeni badanej puli roślin zaobserwowano natomiast istotny spadek ich aktywności.

Wyjazdy zagraniczne:

XVI EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics), Dresden-Pillnitz, Niemcy, 11-16 września 2023 r. Na Sympozjum przedstawiono wyniki badań i osiągnięcia w zakresie hodowli podkładek wegetatywnych dla jabłoni pt. „Nowe kierunki hodowli podkładek dla jabłoni” („New breeding directions for apple rootstocks”).

Wymierne/trwałe rezultaty realizacji zadania:

Analiza fragmentów DNA pozwoliła na pogrupowanie badanych podkładek pod względem stopnia ich różnorodności genetycznej. Podobieństwo - 39%.

Wstępnie przeprowadzono analizę bioinformatyczną surowych sekwencji uzyskanych z porównawczego eksperymentu RNA-seq, obejmującego analizę porównawczą prób RNA kontrolnych i porażonych *Phytophthora cactorum* wyizolowanych z podkładki PJ-173/2012. Do dalszych badań wytypowano trzy geny uczestniczące w procesie przetwarzania białek w siateczce śródplazmatycznej komórek roślinnych.

Przeprowadzono charakterystykę profili genów uczestniczących w regulacji odpowiedzi wytypowanych podkładek na stres abiotyczny (m.in. uszkodzenia mechaniczne tkanek i mrozoodporność) Md187048 i Md827882 oraz genów z grupy pathogenesis related PR2 i PR8 regulujących mechanizm odpowiedzi roślin na porażenie *P. cactorum*. Podczas profilowania ekspresji, przydatność do wstępnej charakterystyki molekularnego podłoża podatności podkładek na zgniliznę pnia korzeni, wykazano dla genu PR2. Uzyskane wyniki opisane zostały w materiałach konferencyjnych XVI EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics, abstrakt: S. Keller-Przybyłkiewicz, M. Lewandowski, A. Walencik, K. Strojny: „New breeding directions for apple rootstocks” (Nowe kierunki hodowli podkładek dla jabłoni) str. 88.

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 podkładowki dla jabłoni wyhodowane w IO-PIB.

5 grudnia 2023. odbyły się w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach wykłady dla studentów Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Podczas spotkania wygłoszono prelekcję pt: „Zastosowanie markerów molekularnych i metod biotechnologicznych w ogrodnictwie” – dr inż. Sylwia Keller-Przybyłkiewicz.

8 grudnia 2023. dr inż. Mariusz Lewandowski prowadził konsultacje w zakresie hodowli nowych podkładek wegetatywnych dla jabłoni na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie.

14 grudnia 2023. dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz brała udział w Konferencji Upowszechnieniowo-Wdrożeniowej "Nauka-Praktyce" - zadania celowe finansowane przez MRiRW, podczas której przedstawione zostały wyniki z realizacji badań w zakresie hodowli podkładek dla jabłoni. Materiały konferencyjne str. 63-64.

15 grudnia 2023. dr Mariusz Lewandowski brał udział w seminarium hodowlano-naukowym zorganizowanym przez Związek Twórców Odmian Roślin Uprawnych w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR-PIB Poznań oraz prowadził konsultacje w zakresie hodowli nowych podkładek wegetatywnych dla jabłoni na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu.

Wykonanie mierników zadania:

Mierniki na 2023 r. dla zadania 3.14.:

1. liczba kombinacji w wykonanym programie krzyżowań – plan: 7, wykonanie: 7
2. liczba uzyskanych materiałów wyjściowych o pożądanym cechach – plan: 4 klony, wykonanie: 4 klony
3. liczba wytypowanych sekwencji DNA/RNA dla pożądanym cech – plan: 2, wykonanie: 2
4. liczba doniesień (ustnych lub posterów) na konferencjach międzynarodowych: plan: 1, wykonanie: 1