

Zadanie 3.16 Wytworzenie materiałów wyjściowych jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea*) o zróżnicowanej porze dojrzewania, wysokiej jakości owoców i tolerancji na choroby grzybowe, suszę i poparzenia słoneczne.

Kierownik Zadania: dr inż. Seliga Łukasz

Cel zadania: Uzyskanie materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian jagody kamczackiej, przydatnych zarówno do przetwórstwa jak i bezpośredniego spożycia.

W Polsce od kilku lat obserwuje się rosnące zainteresowanie uprawą towarową jagody kamczackiej (suchodrzewu jadalnego), którego owoce są przydatne zarówno do przetwórstwa, jak i do bezpośredniego spożycia. Owoce suchodrzewu jadalnego dojrzewają najwcześniej w sezonie (już pod koniec maja) i zawierają wiele witamin, makro- i mikroelementów oraz polifenoli, niezwykle cennych dla organizmu człowieka. Krzewy mają małe wymagania glebowe, są mrozo odporne, a kwiaty wykazują wysoką tolerancję na przymrozki wiosenne (nawet do -7°C). Niestety, dostępne na rynku odmiany w większości są mało plenne, a ich owoce są mało atrakcyjne (małe, o przeciętnym smaku z goryczką) i nieprzystosowane do długiego transportu (mało jędrne). Ponadto wiele z tych odmian wykazuje tendencję do opadania owoców w trakcie dojrzewania. W związku z dużym zainteresowaniem producentów nowymi odmianami o lepszych cechach w stosunku do obecnie dostępnych istnieje pilna potrzeba rozpoczęcia hodowli tego gatunku, celem uzyskania nowych odmian przystosowanych do uprawy towarowej w Polsce.

Opis zadania:

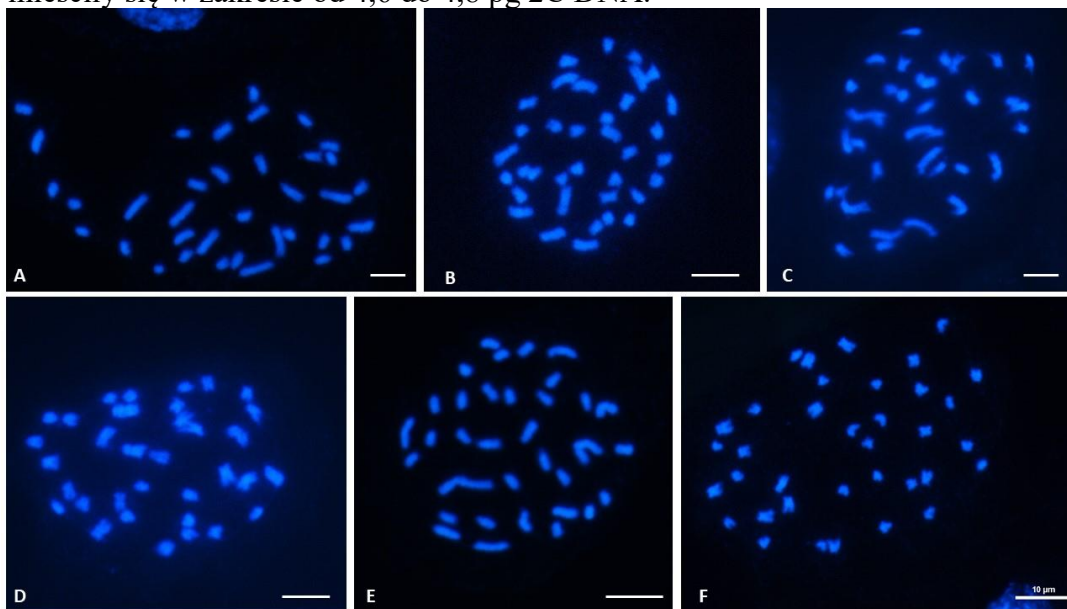
- 1) wykonanie programu krzyżowań w układzie diallelicznym z wykorzystaniem 6 różnych form rodzicielskich jagody kamczackiej (*Lonicera caerulea*) o komplementarnych cechach fenotypowych i użytkowych, zbiór owoców, wybieranie nasion, stratyfikacja i wysiew nasion (dialleliczny układ krzyżowań 6 odmian x 6 kombinacji krzyżowań = 36 kombinacji krzyżowań);

Przeprowadzony program krzyżowań jagody kamczackiej obejmował 36 kombinacji w układzie diallelicznym, korzystając z różnorodnych form rodzicielskich, w tym odmian rosyjskich, kanadyjskich i japońskich. W ramach tych badań zastosowano metodę Griffinga, gdzie 1 796 kwiatów zostało poddanych procesowi kastracji i zapylania, co zaowocowało uzyskaniem 470 owoców. Wybrane formy rodzicielskie charakteryzowały się zróżnicowanym genotypem, obejmującym różnice w porze dojrzewania, kształcie owoców i zdrowotności roślin. Oceny 32 form genotypowych, obejmujące siłę wzrostu, pokrój krzewów, intensywność kwitnienia, zawiązywanie owoców, plonowanie oraz masę owoców, zostały przeprowadzone na kolekcji odmian w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. Różnice między odmianami w intensywności kwitnienia i owocowania ukazały ich zróżnicowany potencjał wydajności. Niektóre odmiany, takie jak 'Leningradzkij Velikan' i 'Vostorg', uzyskały wysokie oceny w obu kategoriach, co wskazuje na ich potencjalną wydajność. Z kolei 'Bakczarskaja Jubilejnaja' otrzymała niższe oceny, co może sugerować specyficzne wymagania uprawowe lub mniejszą wydajność. Zbiór owoców przeprowadzony na początku czerwca, między 5 a 10 czerwca, ujawnił znaczące różnice w plonie między odmianami. Odmiany, takie jak 'Wojtek', 'Zojka' i 'Vostorg', osiągnęły wysokie wartości plonu z krzewu. Różnice w jędrności i wadze owoców miały wpływ na ich trwałość i potencjał transportowy, co jest istotne z punktu widzenia logistyki i marketingu. Odmiana 'Duet' wyróżniała się najwyższą jędrnością, co może wpływać na jej atrakcyjność rynkową. Zróżnicowanie między odmianami. W analizie składu owoców, zwrócono uwagę na parametry takie jak zawartość cukru, sucha masa, pH, kwasowość ogólna, polifenole, antocyjany i kwas askorbinowy (witamina C). Wyniki te dostarczyły informacji na

temat dojrzałości, słodczy oraz właściwości zdrowotnych próbek. Odmiana 'Kamczadalka' wyróżniała się najwyższą zawartością kwasu askorbinowego, co podkreśla jej potencjalne zdrowotne korzyści w porównaniu do innych odmian.

- 2) cytometryczna ocena poziomu ploidalności wszystkich odmian rodzicielskich przewidzianych do wykorzystania do krzyżowań, również w kolejnych latach (32) i liczby chromosomów (6) odmian wykorzystanych w programie hodowlanym w 2023 r.;

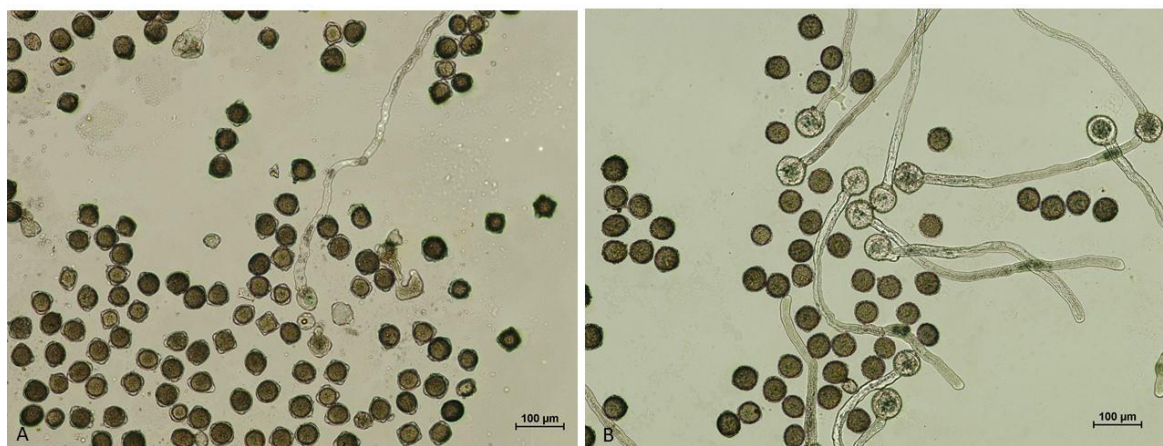
W przeprowadzonej analizie wykorzystano próbki młodych liści pobrane wiosną z różnych genotypów roślin. Poziom ploidalności oceniano za pomocą cytometru przepływowego CyFlow PA (Partec, Niemcy) na jądkach komórkowych izolowanych z rozdrobnionego materiału roślinnego. Zastosowano barwnik fluorescencyjny DAPI z dodatkiem 1% PVP, a poziom fluorescencji DNA odniesiono do standardu 'Aurora'. Analiza cytometryczna wykazała, że wszystkie badane odmiany i linie hodowlane (32 genotypy) są tetraploidami, potwierdzając tetraploidalną liczbę chromosomów $2n=4x=36$, co potwierdzono również analizą mikroskopową preparatów korzeni traktowanych 8-hydroksychinoliną (Fot. 1). Dodatkowo, analiza cytometryczna jodku propidyny oceniła wielkość genomu genotypów, które mieściły się w zakresie od 4,6 do 4,8 pg 2C DNA.



Fot. 1. Obserwacje mikroskopowe liczby chromosomów w merystemach wierzchołkowych korzeni. (A) 'Jugana' ($2n = 4x = 36$). (B) 'Sinji Utes' ($2n = 4x = 36$). (C) 'Boreal Blizzard' ($2n = 4x = 36$) (D) 'Boreal Beast' ($2n = 4x = 36$) (E) 'Colin' ($2n = 4x = 36$) (F) 'Lori' ($2n = 4x = 36$). Odcinek = 10 μ m.

- 3) sprawdzanie żywotność pyłku na podstawie wybarwienia ziaren oraz na podstawie kiełkowania na pożywkach (6);

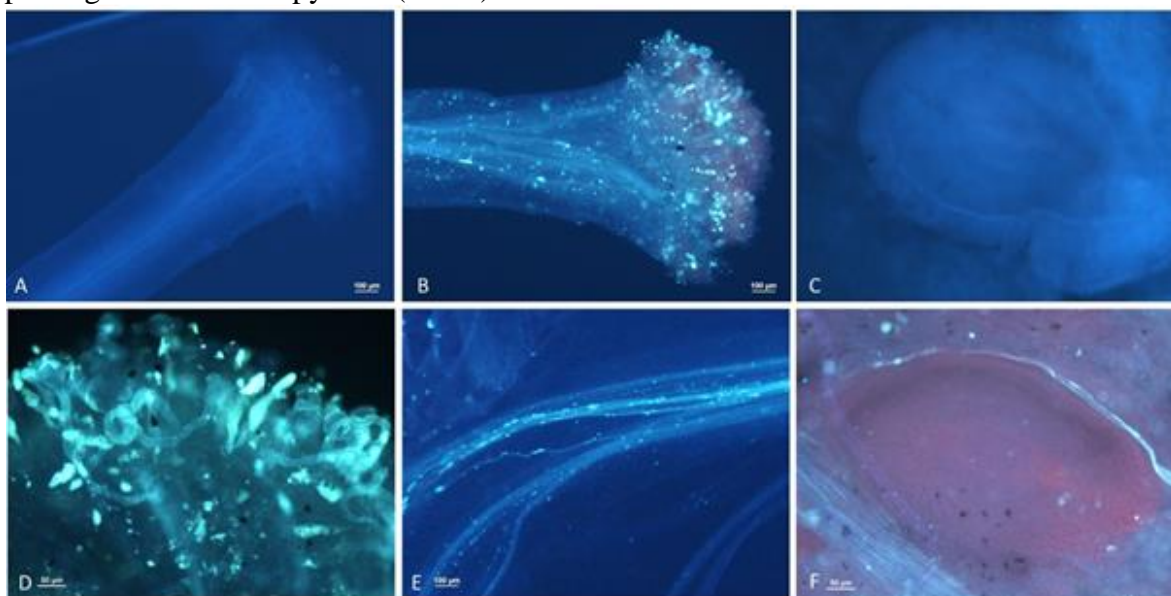
Żywotność pyłku została oceniona w dwóch terminach: na początku marca u kwitnących roślin uprawianych w szklarni 6 genotypów rodzicielskich oraz w połowie kwietnia w pełni kwitnienia roślin w warunkach polowych. Procent wybarwionych ziaren pyłku dla wszystkich analizowanych odmian był znacznie wyższy niż procent skiełkowanego pyłku na pożywce. Wykazano, że ocena żywotności pyłku na podstawie wybarwienia pyłu nie jest miarodajną metodą oceny żywotności pyłku jagody kamczackiej. Żywotność pyłku na podstawie kiełkowania pyłku na pożywkach w warunkach szklarniowych wynosiła Jugana -7,46%, Sinji Utes - 11,85%, Boreal Blizzard -5,34%, Boreal Beast - 13,13%, Colin-6,64%, Lori - 16,59. Żywotność pyłku dla tych odmian w warunkach polowych była wyższa i wynosiła odpowiednio Jugana -34,50%, Boreal Blizzard -21,42% Boreal Beast - 36,01%, Lori -67,09% (Fot. 2)



Fot 2. Kielkowanie ziaren pyłu odmiany ‘Jugana’ na pożywce z dodatkiem sacharozy w stężeniu 15%. (A) pyłek z roślin uprawianych w szklarni (B) pyłek z roślin uprawianych w polu.

4) analiza kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu oraz przerastanie łagiewek pyłkowych przez poszczególne elementy słupka (wybrane 12 kombinacji);

Przeprowadzono 12 kombinacji krzyżowań w celu analizy kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu oraz przerastania łagiewek pyłkowych przez poszczególne elementy słupka. Słupki pobrano z trzech kwiatów dla każdej kombinacji krzyżowania, analizując je po 24, 48 i 72 godzinach od zapylenia. Procedurę obejmującą macerację w 4N NaOH w temperaturze 60°C przez 13 minut oraz barwienie 3% roztworem błękitu aniliny zastosowano przed analizą mikroskopową w mikroskopie fluorescencyjnym Optiphot-2 (Nikon). Wyniki analizy mikroskopowej wykazały zróżnicowanie między kombinacjami krzyżowań pod względem liczby kiełkujących ziaren pyłku na znamieniu oraz siły wzrostu łagiewek pyłkowych przez słupki. W szczególności, w kombinacji 10 stwierdzono, że łagiewki pyłkowe dotarły do zalążni po 72 godzinach od zapylenia (Fot. 3).



Fot. 3. Obserwacje mikroskopowe kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu oraz penetracji słupka jagody kamczackiej przez łagiewki pyłkowe. (A) Niekiełkujące ziarna pyłku na znamieniu słupka w krzyżowaniu nr 2 po 24 godzinach od zapylenia. (B) Pojedyncze kiełkujące ziarna pyłku na znamieniu po 24 godzinach po zapyleniu w krzyżowaniu nr 8. (C) Fragment zalążni z krzyżowania nr 8 niezapłodnionym zalążkiem 24 godziny po zapyleniu. (D) Kielkujące ziarna pyłku na znamieniu słupka w kombinacji krzyżowań 10 - 72 godziny po zapyleniu. (E) Fragment słupka z przerastającymi łagiewkami 72 godzin po zapyleniu – krzyżowanie nr 10. (F) Obecność łagiewek pyłkowych na terenie zalążni 72 godziny po zapyleniu w krzyżowaniu 10.

- 5) molekularna weryfikacja genotypów rodzicielskich i określenie ich stopnia pokrewieństwa odmian jagody kamczackiej – 6 form wykorzystanych w 2023 r. i 4 przewidziane do wykorzystania w 2024 r.;

Przeprowadzono weryfikację genotypów rodzicielskich jagody kamczackiej oraz ocenę ich stopnia pokrewieństwa dla dziesięciu różnych form: 'Jugana', 'Sinij Utes', 'Boreal Blizzard', 'Boreal Beast', Nr 5, Nr 6, Nr 44, 'Rebeka', 'Wojtek', 'Indigo Gem'. Materiał roślinny w postaci młodych liści został poddany izolacji DNA zgodnie z metodą opartą na CTAB, a uzyskane preparaty DNA (30 prób) poddano analizie spektrofotometrycznej w zakresie 230, 260, 280 i 320 nm w celu oceny czystości i jakości. Technika mikrosatelitów (SSR) została zastosowana do analizy regionów mikrosatelitarnych genomu. W wyniku 900 testów PCR uzyskano 120 polimorficznych fragmentów DNA o długości od 100 do 690 pz za pomocą 16 z trzydziestu testowanych oligonukleotydów. Ocenę pokrewieństwa genetycznego przeprowadzono na podstawie obecności lub braku tych polimorficznych fragmentów DNA. Dystans genetyczny między badanymi genotypami został określony na podstawie analizy kodów binarnych 0/1, gdzie "0" oznaczał brak fragmentu DNA o określonej długości, a "1" - jego obecność, stosując metodę Jaccarda. Na podstawie tych danych skonstruowano dendrogram obrazujący pokrewieństwo genetyczne genotypów za pomocą metody UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean). Wyniki te mogą być istotne dla dalszych prac hodowlanych, umożliwiając selekcję genotypów o preferowanych cechach genetycznych.

- 6) ocena porażenia roślin jagody kamczackiej rosnącej w kolekcji przez patogeny grzybowe i bakteryjne (32);

W roku 2023 przeprowadzono dwie inspekcje (19.05.2023 i 02.06.2023) w celu monitorowania chorób bakteryjnych i grzybowych na różnych odmianach jagody kamczackiej. Podczas pierwszej obserwacji zauważono objawy chorobowe przypominające raka bakteryjnego na liściach odmian takich jak 'Baczkarskaja', 'Bakczarskij Wielikan', 'Docz Velikana', 'Jugana', 'Morena' A, 'Morena' B, 'Silginka', 'Tomiczka' A, 'Tomiczka' B, 'Uslada'. Bakterie uzyskano ze wszystkich prób z wyjątkiem 'Docz Velikana'. Testy patogeniczności wykazały, że izolaty z prób 'Bakczarskij Wielikan' i 'Jugana' były niepatogeniczne. Pozostałe izolaty, wywołujące reakcje nadwrażliwości na liściach tytoniu (HR+), zaklasyfikowano jako *Pseudomonas* na podstawie analizy sekwencji genu metabolizmu podstawowego *gyrB*. Podczas pierwszej inspekcji zauważono również zasychanie kwiatostanów odmian 'Honeybee' i 'Indigo Trent'. Analiza molekularna grzybów z porażonych kwiatostanów wykazała obecność takich grzybów jak *Seimatosporium lichenicola* i *Botrytis cinerea*, oraz grzyby z rodzajów *Epicoccum* i *Alternaria*. W trakcie drugiej inspekcji skupiono się na objawach na owocach odmian 'Indigo Gem', 'Jugana', 'Leningradzkij Velikan', 'Boreal Beast' oraz 'Lawina'. Izolowano sprawców zaobserwowanych objawów na owocach, a były nimi grzyby: *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum* sp., *Seimatosporium lichenicola* oraz *Mytothecium vermucaria*. Po dodatkowym przechowywaniu dojrzałych owoców przez 10 dni w warunkach pokojowych, zaobserwowano objawy szarej pleśni spowodowanej przez grzyb *Botrytis cinerea*.

- 7) ocena zasiedlenia jagody kamczackiej rosnącej w kolekcji przez różne gatunki szkodników

W pierwszym półroczu 2023 roku, przeprowadzono dwie lustracje w miesiącach maj i czerwiec w celu oceny zasiedlenia wszystkich odmian jagody kamczackiej przez szkodniki. Pierwsza lustracja miała miejsce 12.05.23, a druga 09.06.2023. W trakcie tych obserwacji stwierdzono obecność nielicznych osobników w postaci larwalnej, które zostały zebrane i przetransportowane do laboratorium entomologii ZORS IO w celu dokładnego oznaczenia gatunku. Zidentyfikowano je jako larwy zwójki różóweczki (*Archips rosana*) z rodziny zwójkowatych (*Tortricidae*).

Wykonane mierniki:

1. liczba kombinacji w wykonanym programie krzyżowań: **plan: 36, wykonanie: 36**
2. cytometryczna ocena poziomu ploidalności: **plan: 32, wykonanie: 32**, ocena liczby chromosomów– **plan: 6 odmian, wykonanie: 6**
3. sprawdzenie żywotności pyłku wykorzystanych odmian: **plan: 6 odmian, wykonanie: 6**
4. analiza kiełkowania ziaren pyłku dla wybranych kombinacji krzyżowań: **plan: 12, wykonanie: 12**
5. molekularna weryfikacja genotypów rodzicielskich i określenie ich stopnia pokrewieństwa: - **plan: 10, wykonanie: 10**
6. ocena porażenia roślin przez patogeny i szkodniki: 32 odmiany **plan: 32, wykonanie: 32**
7. liczba doniesień (na konferencjach krajowych **plan: 1, wykonanie: 1**
pt. „Ocena poziomu ploidalności oraz żywotności pyłku genotypów jagody kamczackiej (Lonicera caerulea)” – VI zjazd PTNO 21-22 czerwca 2023, Olsztyn