

# Tetraploidalna jabłoń jako źródło odporności na stresy biotyczne i abiotyczne – analiza mechanizmów odporności na zarazę ogniową, parcha jabłoni i suszę oraz ocena zdolności do krzyżowania

**Numer zadania 49**

Okres realizacji: 2023 rok - 12 miesięcy

**Kierownik zadania:** dr Danuta Wójcik ([danuta.wojcik@inhort.pl](mailto:danuta.wojcik@inhort.pl))

**Wykonawcy:** mgr inż. Monika Marat, dr hab. Agnieszka Marasek-Ciołakowska, dr Krzysztof Klamkowski, dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, dr Mariusz Lewandowski, dr Zbigniew Buler, mgr inż. Katarzyna Wójcik, dr hab. Małgorzata Podwyszyńska, prof. Waldemar Treder, dr Jacek Filipczak, mgr Monika Markiewicz, mgr Anna Tryngiel-Gać

**Instytut Ogrodnictwa-Państwowy Instytut Badawczy, 96-100 Skierniewice, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3**

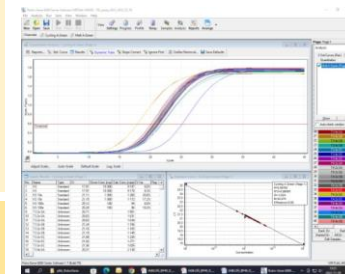


L.p.	Cele projektu w 2023 roku	Czy cel został zrealizowany
1	Ocena podatności klonów jabłoni na stres suszy – porównanie reakcji fizjologicznych, analiza markerów biochemicznych i molekularnych reakcji na stres suszy oraz ocena parametrów morfologicznych i anatomicznych roślin diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) rosnących w warunkach stresu wodnego.	Tak
2	Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni w fazie generatywnej.	Tak
3	Ocena zdolności do krzyżowania tetraploidalnych klonów jabłoni.	Tak
4	Ocena fenotypowa oraz genetyczna mieszańców uzyskanych z krzyżowań z udziałem tetraploidów jabłoni.	Tak

# MATERIAŁY I METODY

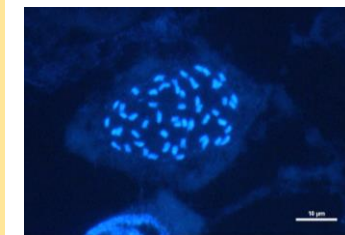
## Temat badawczy 1, 2 i 3. Porównanie fizjologicznej i molekularnej odpowiedzi na suszę tetraploidalnych klonów 'Redchief' i Co-op 32 oraz ich diploidalnych form wyjściowych.

1. Pomiary parametrów fizjologicznych: potencjał wody w liściach, wymiana gazowa (transpiracja i fotosynteza), zawartość chlorofilu i sprawność aparatu fotosyntetycznego.
2. Pomiary parametrów wzrostu: wysokość i średnica pędu głównego, długość i liczba pędów bocznych. Ocena długości i gęstości aparatów szparkowych. Analiza histologiczna struktury liści.
3. Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD) oraz badanie poziomu dialdehydu malonowego (MDA) i proliny.
4. Analiza metodą qRT-PCR ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy: *SOD*, *CAT*, *APX*, *GPX*, *TIP1;1*, *PIP1;1*, *PIP2;1* i *PIP2;3*, *MYB4*, *MYB121*, *DREB2*, *WRKY42* i *NCED2*.



## Temat badawczy 4 i 5. Ocena fenotypowa 7-letnich, własnokorzeniowych i zaszczepionych na podkładce M.9 diploidów i tetraploidów jabłoni rosnących w sadzie doświadczalnym.

1. Pomiary parametrów wzrostu i kondycji roślin: suma rocznych przyrostów, liczba i długość rocznych przyrostów, pole poprzecznego przekroju pnia.
2. Ocena kwitnienia i owocowania: termin i intensywność kwitnienia i owocowania, masa owoców i nasion, powierzchnia rumieńca, indeks skrobiowy, kwasowość, zawartość ekstraktu.
3. Analiza kiełkowania pyłku na znamieniu słupka oraz przerastania łagiewki pyłkowej w kombinacjach krzyżowań z udziałem tetraploidów jabłoni.



## Temat badawczy 6 i 7. Ocena fenotypowa i genetyczna siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych.

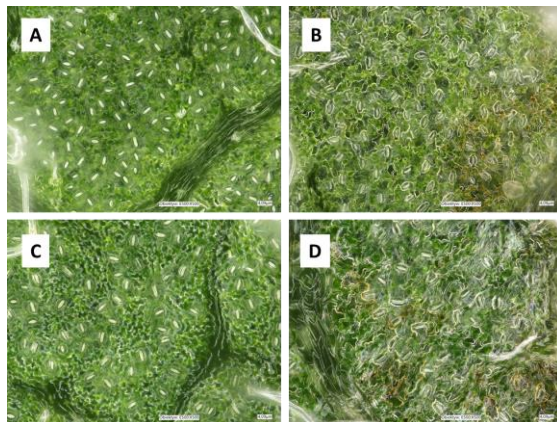
1. Ocena siły wzrostu siewek.
2. Cytometryczna analiza poziomu ploidalności i wielkości genomu.
3. Analiza liczby chromosomów.
4. Potwierdzenie statusu mieszańca siewek: analiza markerów SSR.



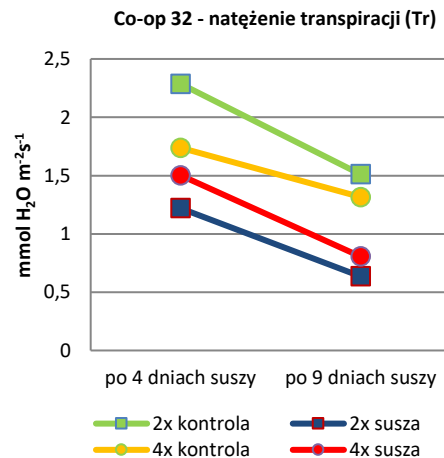
# WYNIKI

**Temat badawczy 1. Ocena podatności klonów jabłoni na stres suszy – porównanie reakcji fizjologicznych roślin diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) oraz ocena parametrów morfologicznych tych roślin w warunkach stresu suszy.**

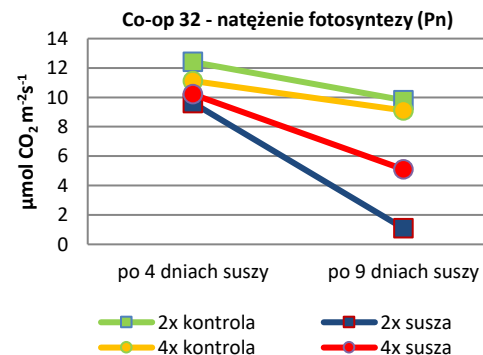
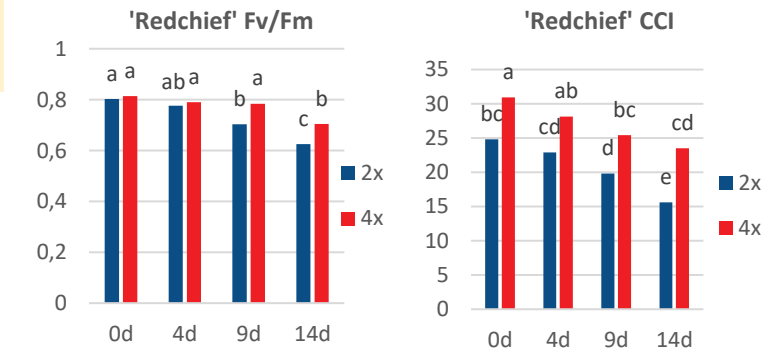
- Tetraploidalne klony odmian 'Redchief' i Co-op 32 charakteryzowały się lepszymi parametrami fizjologicznymi w trakcie suszy niż rośliny diploidalne tych samych odmian.
- Wigor drzewek jabłoni rosnących w warunkach suszy był ograniczony w porównaniu z roślinami optymalnie nawadnianymi, zarówno u diploidów jak i tetraploidów badanych odmian.
- Stres suszy spowodował zmiany w wielkości i gęstości aparatów szparkowych oraz w strukturze histologicznej liści.



Aparaty szparkowe diploidalnej (A i B) i tetraploidalnej (C i D) jabłoni odmiany Co-op 32 przed zaindukowaniem suszy (A i C) i po 14 dniach stresu (B i D).



Odmiana	Potencjał wody w liściach (MPa) po 9 dniach suszy			
	Diploidy (2x)		Tetraploidy (4x)	
	Kontrola	Susza	Kontrola	Susza
'Redchief'	-1,67	-4,60	-0,98	-1,99
Co-op 32	-1,79	-2,33	-1,44	-1,94

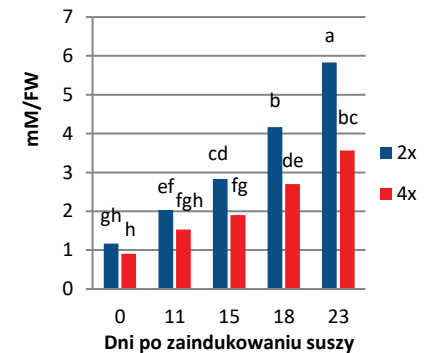


# WYNIKI

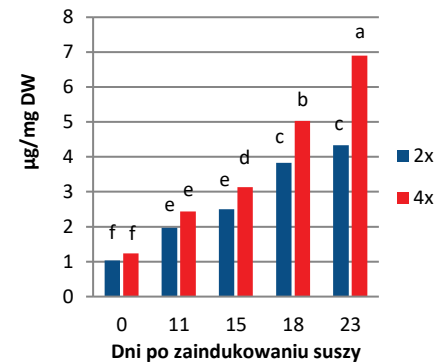
**Temat badawczy 2. Badanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD) oraz badanie zawartości proliny i dialdehydu malonowego (MDA) w liściach diploidów i tetraploidów jabłoni poddanych stresowi wodnemu.**

- Aktywność wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych oraz zawartość proliny i MDA w liściach jabłoni 'Redchief' wzrastała w warunkach stresu wodnego zarówno u diploidów jak i tetraploidów.
- Podczas suszy u tetraploidów 'Redchief' aktywność wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom proliny był wyższy natomiast poziom MDA – niższy niż u diploidów tej odmiany.
- Uzyskane wyniki świadczą, że tetraploidy odmiany 'Redchief' wykazują większą tolerancję na deficyt wody w podłożu niż diploidy tej samej odmiany.

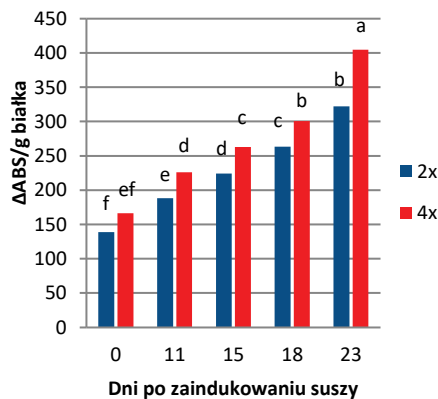
Zawartość MDA



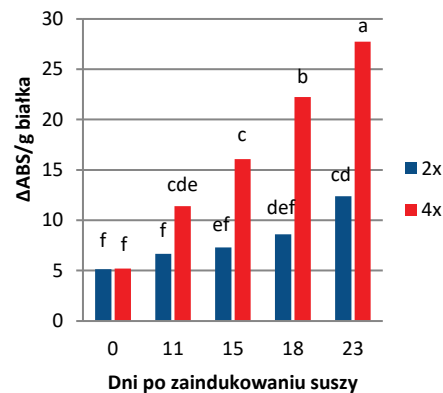
Zawartość proliny



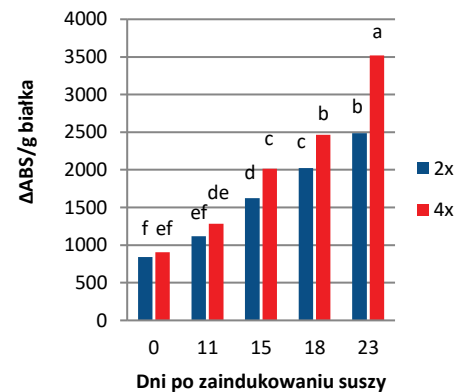
Aktywność CAT



Aktywność SOD



Aktywność POX

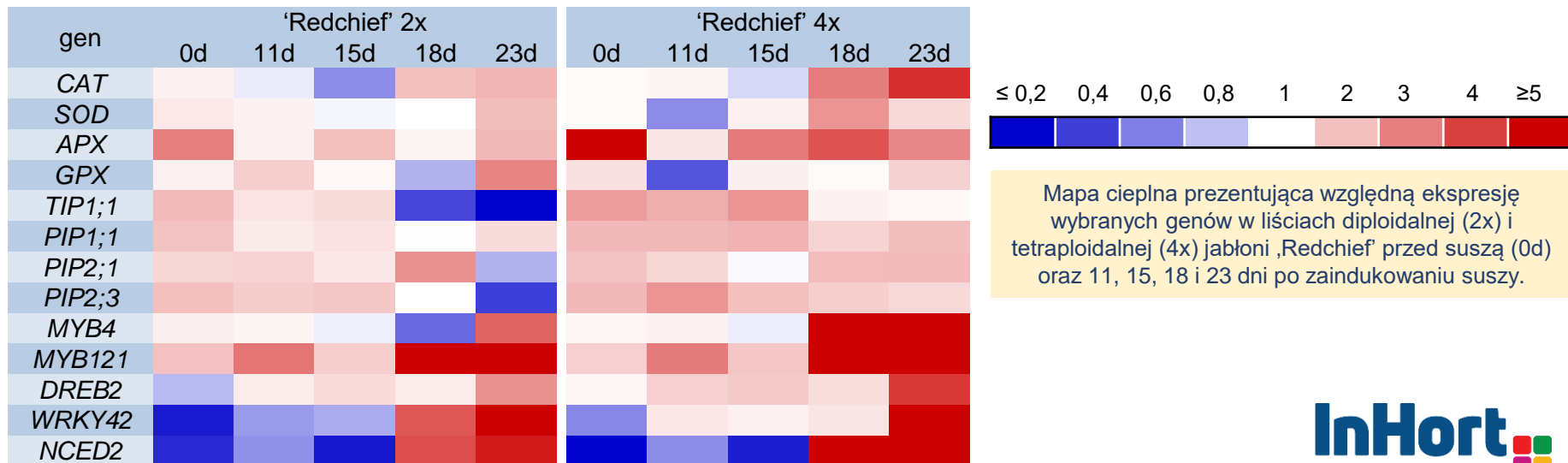




# WYNIKI

## Temat badawczy 3. Analiza metodą qRT-PCR ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy w liściach diploidów i tetraploidów jabłoni poddanych stresowi wodnemu.

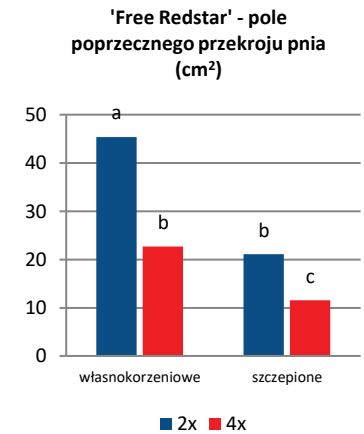
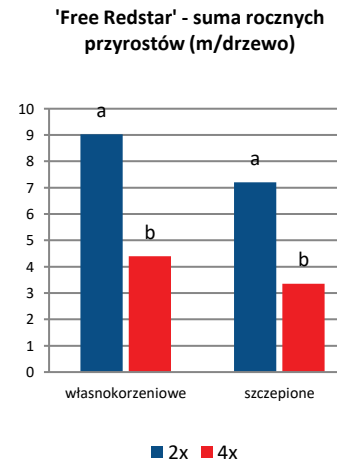
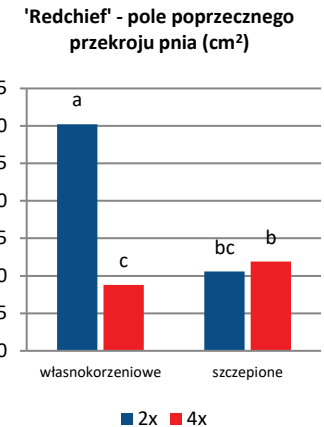
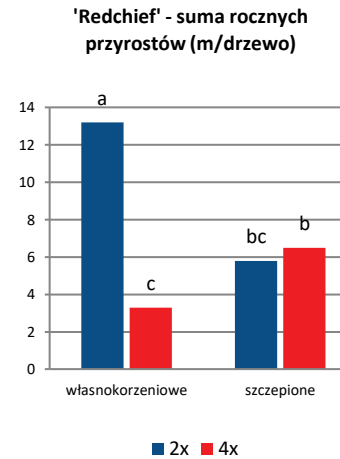
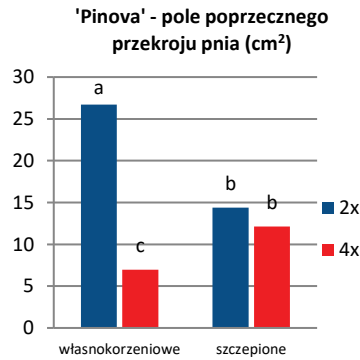
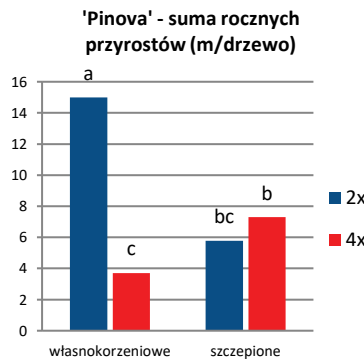
- Poziom ekspresji większości badanych genów, związanych z odpornością na stres abiotyczny, był wyższy u tetraploidów niż u diploidów jabłoni 'Redchief' rosnących w warunkach stresu wodnego. Podwyższoną ekspresję u tetraploidów w porównaniu z diploidami wykazano dla następujących genów:
  - *CAT*, *SOD*, *APX* i *GPX* (geny kodujące enzymy antyoksydacyjne),
  - *TIP1;1*, *PIP1;1*, *PIP2;1* i *PIP2;3* (geny kodujące akwaporyny),
  - *MYB4*, *DREB2* i *WRKY42* (geny kodujące czynniki transkrypcyjne),
  - *NCED2* (gen kodujący kluczowy enzym szlaku biosyntezy kwasu abscysynowego).
- Wyższy poziom ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy u tetraploidów jabłoni 'Redchief' wskazuje na ich podwyższoną tolerancję na deficyt wody w porównaniu z diploidami tej odmiany.



# WYNIKI

## Temat badawczy 4. Analiza różnic fenotypowych pomiędzy tetraploidami jabłoni (4x) a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi (2x).

- Siła wzrostu klonów tetraploidalnych rosnących na własnych korzeniach jest znacznie ograniczona w porównaniu z ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi. Zaszczepienie jabłoni na podkładce M.9 powoduje ograniczenie wzrostu u diploidów wszystkich badanych odmian, natomiast polepsza wzrost roślin tetraploidalnych 'Redchief' i 'Pinova'.
- Poliploidyzaacja powoduje zmiany w wielkości owoców i nasion. Tetraploidy w porównaniu z diploidami charakteryzują się większymi owocami i nasionami.



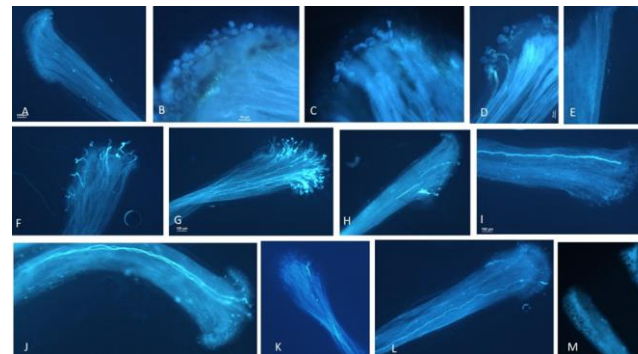
# WYNIKI

## Temat badawczy 4 (cd.). Analiza różnic fenotypowych pomiędzy tetraploidami jabłoni (4x) a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi (2x).

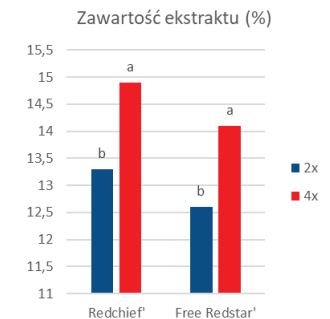
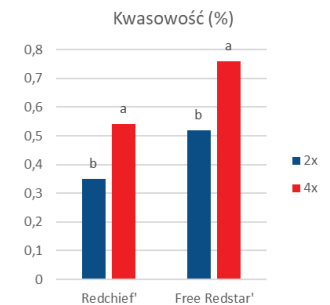
- Poliploidyzacja spowodowała zmiany w składzie chemicznym owoców oraz ich dojrzewaniu. Owoce tetraploidów w porównaniu z owocami form diploidalnych charakteryzują się wyższą kwasowością i większą zawartością ekstraktu.
- Obserwacje kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu słupka oraz rozwoju łagiewek pyłkowych wskazują, że w roku 2023 procesy te uległy zakłóceniu.



Ocena dojrzałości jabłek diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) form 'Redchief' i 'Free Redstar' metodą testu skrobiowego wykonana bezpośrednio po zbiorze.



Obserwacje mikroskopowe kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu słupka i wzrostu łagiewek pyłkowych w słupkach.



## Temat badawczy 5. Polowa ocena kwitnienia i owocowania tetraploidalnych klonów i diploidalnych odmian jabłoni (form wyjściowych) oraz ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni.

- Formy diploidalne kwitły obficie niż tetraploidy, co świadczy o wydłużonej fazie juwenilnej tetraploidów jabłoni.
- Drzewka wszystkich odmian, zarówno diploidy jak i tetraploidy, zaszczepione na podkładce M.9 kwitły obficie niż drzewka rosnące na własnych korzeniach.
- Poliploidyzacja powoduje opóźnienie zakwitania roślin w ciągu sezonu wegetacyjnego o 2-6 dni.
- W 2023 roku krzyżowania interploidalne z udziałem tetraploidów 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova' nie powiodły się.

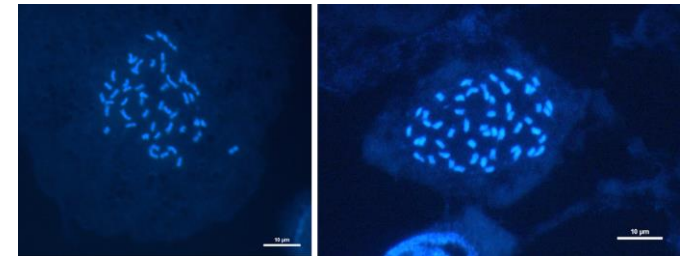


# WYNIKI

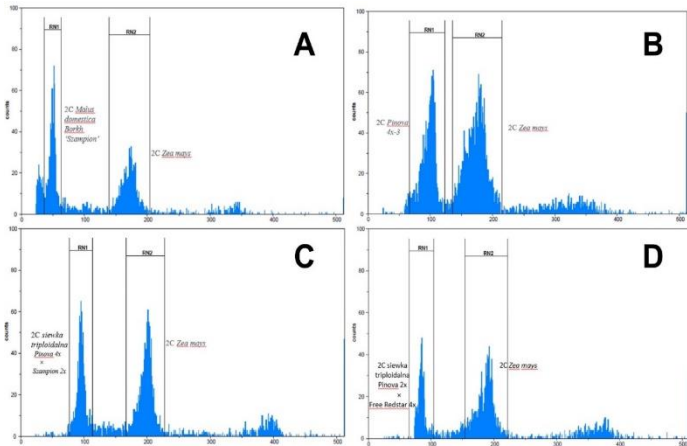
**Temat badawczy 6. Ocena siły wzrostu siewek otrzymanych z programu krzyżowań z udziałem autotetraploidów jabłoni.**

**Temat badawczy 7. Analiza poziomu ploidalności, ocena wielkości genomu, analiza liczby chromosomów oraz potwierdzenie statusu mieszańca siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem tetraploidów.**

- W wyniku krzyżowania interploidalnego 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3 uzyskano 12 żywotnych siewek.
- Analiza cytometryczna obejmująca ocenę poziomu ploidalności i zawartości jądrowego DNA oraz analiza liczby chromosomów wykazała, że wszystkie uzyskane siewki są triploidami.
- W oparciu o wyniki reakcji PCR-SSR potwierdzono mieszańcowy status genetyczny uzyskanych siewek jabłoni.



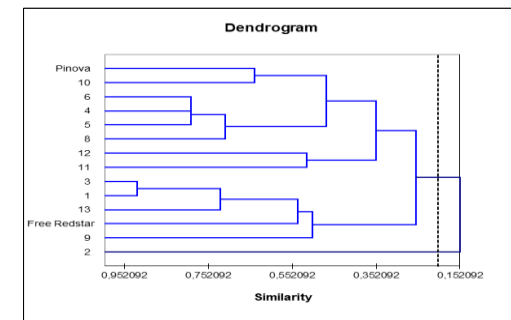
Zdjęcia chromosomów triploidalnych genotypów hybrydowych.



Histogramy analizy cytometrycznej siewek jabłoni uzyskanych z krzyżowań interploidalnych oraz genotypów rodzicielskich



Zmienność fenotypowa siewek z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3



Dendrogram podobieństwa genetycznego siewek z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3 oraz form rodzicielskich

# Wykaz publikacji wyników projektu w 2023 r.

## Doniesienia konferencyjne:

1. Wójcik D., Marat M., Marasek-Ciołakowska A., Lewandowski M., Podwyszyńska M. Wpływ poliploidyacji na rozwój generatywny jabłoni. Konferencja naukowa pt. „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” w ramach VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r. (poster)
2. Marat M., Wójcik D., Klamkowski K., Wójcik K., Podwyszyńska M., Treder W. Badanie mechanizmów zwiększonej tolerancji autotetraploidów jabłoni na stres suszy. Konferencja naukowa pt. „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” w ramach VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r. (poster)
3. Wójcik D., Marat M., Keller-Przybyłkiewicz S., Marasek-Ciołakowska A., Lewandowski M., Podwyszyńska M. Preliminary study on interploid crossing of apple (*Malus × domestica*) to obtain triploid genotypes. XVI Sympozjum Hodowli i Genetyki Roślin Sadowniczych EUCARPIA (XVI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics), Dresden-Pillnitz, Niemcy, 11-16 września 2023 r. (poster)