

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: 2024 rok - 12 miesięcy

Kierownik zadania: dr Danuta Wójcik (danuta.wojcik@inhort.pl)

Wykonawcy: mgr inż. Monika Marat, prof. Piotr Sobiczewski, dr Agata Broniarek-Niemiec, dr hab. Agnieszka Marasek-Ciołakowska, dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, dr Mariusz Lewandowski, dr Justyna Góraj-Koniarska, dr Zbigniew Buler, prof. Małgorzata Podwyszyńska, dr Jacek Filipczak, dr Monika Markiewicz

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



L.p.	Cele projektu w 2024 roku	Czy cel został zrealizowany
1	Ocena podatności na porażenie grzybem <i>Venturia inaequalis</i> tetraploidalnych klonów jabłoni w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych.	Tak
2	Ocena podatności na porażenie <i>Erwinia amylovora</i> tetraploidalnych klonów jabłoni w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych.	Tak
3	Porównanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz badanie zawartości proliny i dialdehydu malonowego (MDA) w liściach diploidów i tetraploidów jabłoni inokulowanych <i>Venturia inaequalis</i> .	Tak
4	Analiza ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stresy biotyczne w liściach diploidów i tetraploidów jabłoni inokulowanych <i>Venturia inaequalis</i> .	Tak
5	Analiza różnic fenotypowych pomiędzy tetraploidami jabłoni a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi – polowa ocena kwitnienia, owocowania oraz siły wzrostu roślin.	Tak
6	Ocena możliwości krzyżowania tetraploidalnych klonów jabłoni z odmianami diploidalnymi.	Tak
7	Ocena fenotypowa siewek otrzymanych z programu krzyżowań z udziałem autotetraploidów jabłoni pod kątem siły wzrostu i parametrów morfologicznych.	Tak
8	Ocena wielkości genomu, analiza liczby chromosomów oraz analiza obecności markerów odporności na parcha w genotypach hybrydowych.	Tak

MATERIAŁY I METODY

Temat badawczy 1 i 2. Badanie reakcji odpornościowych tetraploidów jabłoni w odpowiedzi na porażenie grzybem *Venturia inaequalis* i bakterią *Erwinia amylovora*.

- Ocena podatności klonów tetraploidalnych i diploidalnych odmian jabłoni na porażenie przez parcha jabłoniowego i zarazę ogniową po sztucznej inokulacji patogenami.

Temat badawczy 3 i 4. Porównanie odpowiedzi tetraploidów i diploidów odmiany 'Redchief' na porażenie przez parcha jabłoniowego na poziomie biochemicznym i molekularnym .

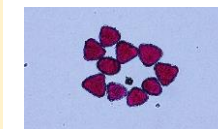
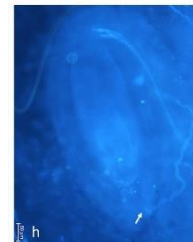
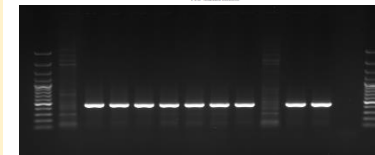
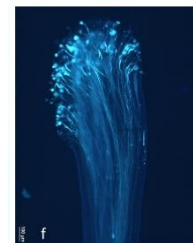
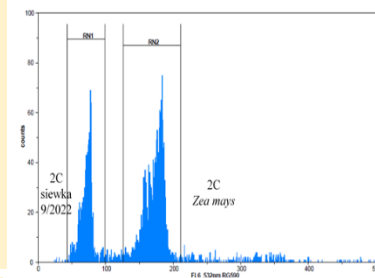
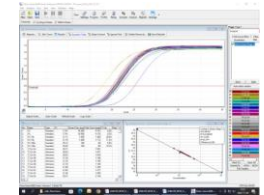
- Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD) oraz badanie poziomu dialdehydu malonowego (MDA) i proliny.
- Opracowanie starterów i analiza metodą qPCR ekspresji genów związanych z reakcją roślin na stresi biotyczne: *SOD*, *CAT*, *APX*, *GPX*, *PR1*, *PR2* i *PAL*.

Temat badawczy 5 i 6. Obserwacje fenotypowe tetraploidów jabłoni w fazie generatywnej i ocena ich zdolności do krzyżowania.

- Polowa ocena intensywności kwitnienia i owocowania oraz terminu kwitnienia.
- Badanie siły wzrostu roślin własnokorzeniowych i rosnących na podkładce M.9 (pomiarzy średnicy pnia).
- Ocena żywotności pyłku i jego kiełkowania na pożywkach i na znamieniu słupka oraz przerastania łagiewki pyłkowej w kombinacjach krzyżowań z udziałem tetraploidów.
- Przeprowadzenie programu krzyżowań z udziałem tetraploidów.

Temat badawczy 7 i 8. Ocena fenotypowa i genetyczna siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych.

1. Ocena siły wzrostu, zawartości chlorofilu oraz długości i gęstości aparatów szparkowych siewek mieszańcowych.
2. Cytometryczna analiza poziomu ploidalności i wielkości genomu oraz analiza liczby chromosomów siewek.
3. Analiza obecności markerów odporności na parcha w genotypach mieszańcowych.



WYNIKI

Temat badawczy 1. Badanie reakcji odpornościowych autotetraploidów w odpowiedzi na porażenie grzybem *Venturia inaequalis*.

Temat badawczy 2. Badanie reakcji odpornościowych autotetraploidów w odpowiedzi na porażenie *Erwinia amylovora*.

- Na skutek poliploidyzacji jabłoni można uzyskać genotypy charakteryzujące się mniejszą podatnością na parcha jabłoniowego i zarazę ogniową niż diploidalne odmiany wyjściowe.
- Stopień podatności na porażenie przez parcha jabłoniowego i zarazę ogniową różni się u poszczególnych klonów tetraploidalnych pochodzących od tej samej odmiany.

Genotyp	Stopień porażenia pędów przez zarazę ogniową (%)		
	Po 4 dniach	Po 11 dniach	Po 18 dniach
'Najdared' 2x (odm. referencyjna)	18,8 a	54,5 a	67,2 a
'Redchief' 2x	12,0 a	31,7 ab	45,2 ab
'Redchief' 4x-25	16,2 a	36,0 ab	44,5 ab
'Pinova' 2x	3,2 a	10,6 b	21,0 ab
'Pinova' 4x-3	2,1 a	10,8 b	12,0 b
'Pinova' 4x-4	8,9	14,0	20,3

Genotyp	Stopień porażenia pędów przez <i>V. inaequalis</i>
'Lobo' 2x (odm. referencyjna)	3,7 cd
'Gala Must' 2x	3,7 cd
'Gala Must' 4x-1	2,9 bcd
'Gala Must' 4x-4	3,2 bcd
'Gala Must' 4x-13	2,0 bc
'Pinova' 2x	2,1 bc
'Pinova' 4x-3	1,8 b
'Pinova' 4x-4	0,3 a
'Pinova' 4x-16	0,0 a
'Redchief' 2x	4,1 d
'Redchief' 4x-5	2,3 bcd
'Redchief' 4x-8	0,2 a
'Redchief' 4x-13	1,7 b



Rośliny inokulowane *Venturia inaequalis*.

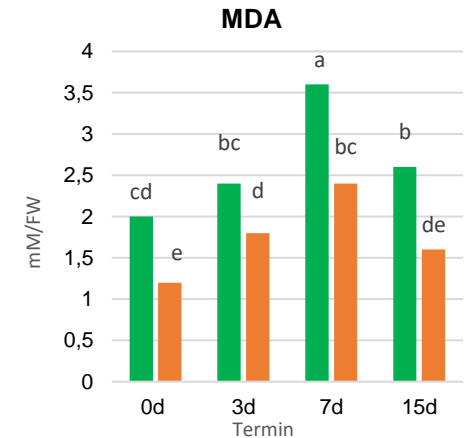
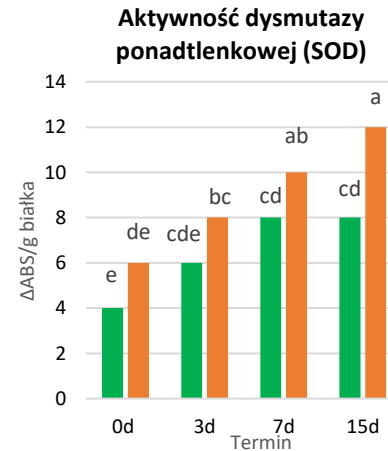
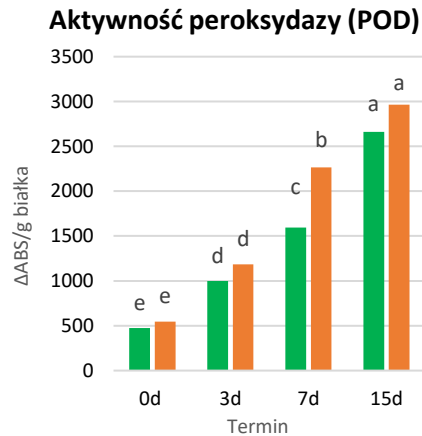
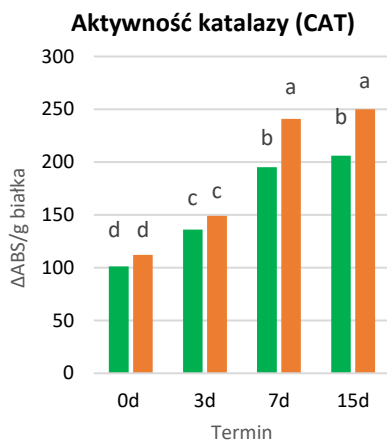
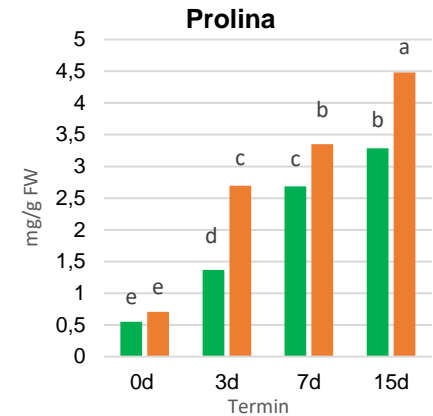




Rośliny zakażone bakterią *Erwinia amylovora*.

WYNIKI

Temat badawczy 3. Analiza biochemicznych markerów reakcji na czynniki stresowe abiotyczne i biotyczne (parch jabłoni).

- Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz zawartość proliny i MDA wzrasta po inokulacji zarodnikami *V. inaequalis* zarówno u diploidów jak i tetraploidów jabłoni odmiany 'Redchief'.
- U tetraploidów 'Redchief' inokulowanych *V. inaequalis* aktywność wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom proliny był wyższy natomiast poziom MDA – niższy niż u diploidów tej odmiany.
- Poliploidyzacja u jabłoni prowadzi do uzyskania genotypów charakteryzujących się lepszymi zdolnościami przystosowawczymi do warunków stresowych niż diploidalne genotypy wyjściowe.

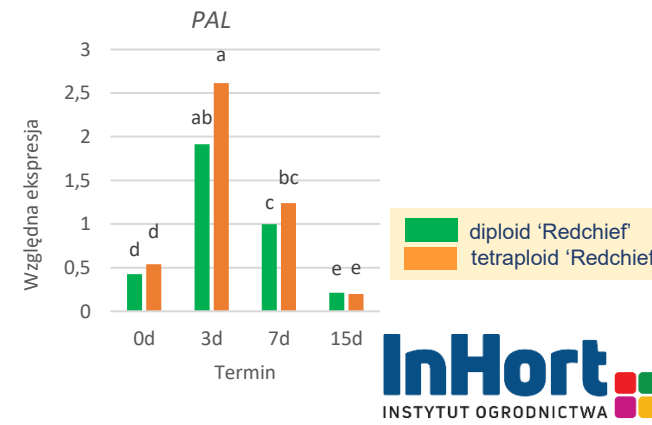
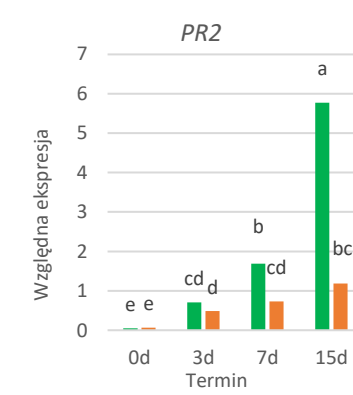
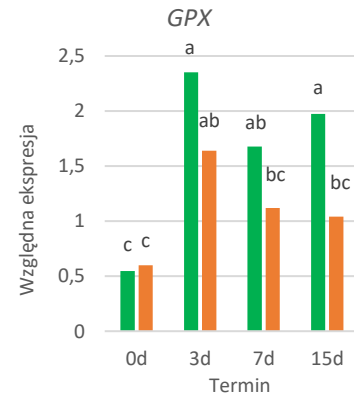
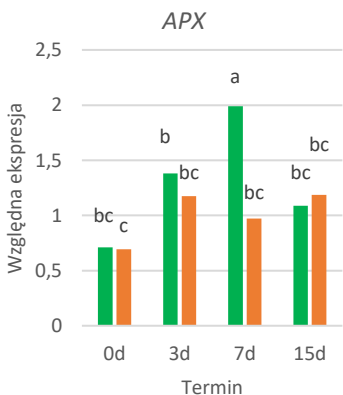
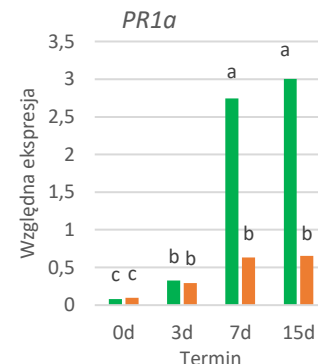
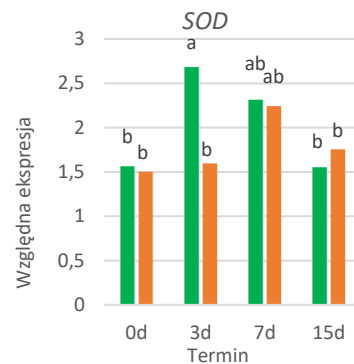
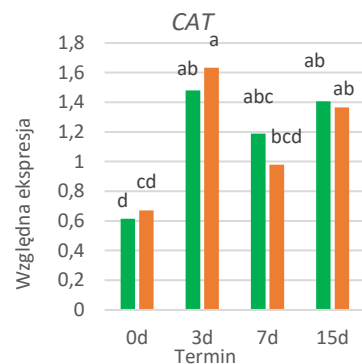


 diploid odmiany 'Redchief' (2x)
 tetraploid odmiany 'Redchief' (4x-25)

WYNIKI

Temat badawczy 4. Analiza molekularnych mechanizmów odpornościowych autotetraploidów na stresy abiotyczne i biotyczne (parch jabłoni).

- Opracowano sekwencje starterów do analizy ekspresji genów związanych z reakcją na stresy biotyczne u jabłoni i zoptymalizowano warunki reakcji qPCR z wykorzystaniem tych starterów.
- Inokulacja drzewek jabłoni zarodnikami *V. inaequalis* powoduje wzrost poziomu ekspresji genów związanych z mechanizmami obronnymi zarówno u form diploidalnych jak i tetraploidalnych jabłoni odmiany 'Redchief'.
- Klon tetraploidalny 'Redchief' 4x-25 po inokulacji zarodnikami *V. inaequalis* nie wykazuje wyższego poziomu ekspresji genów związanych z mechanizmami obronnymi niż diploidalna odmiana wyjściowa.

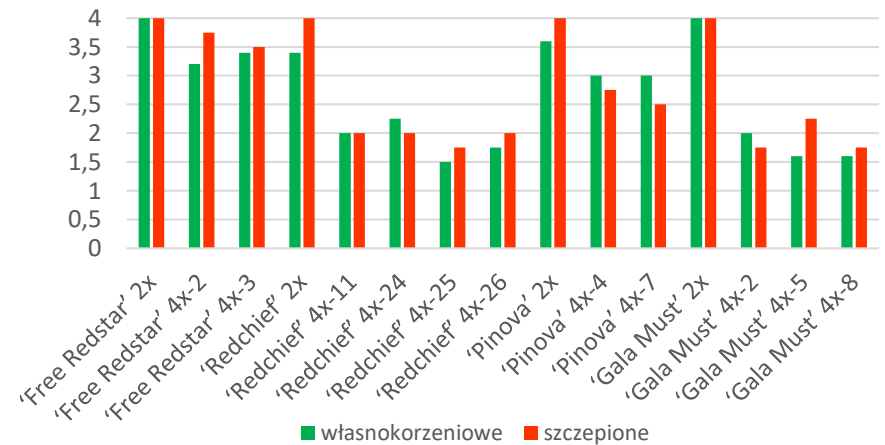


WYNIKI

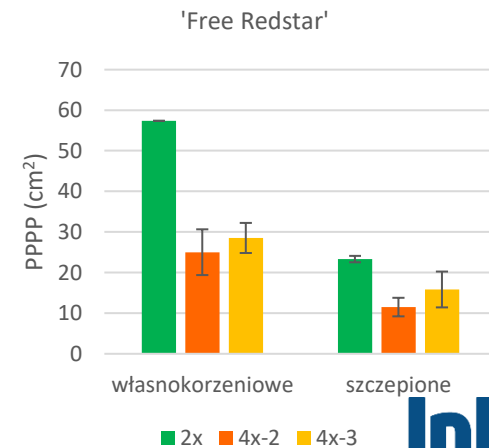
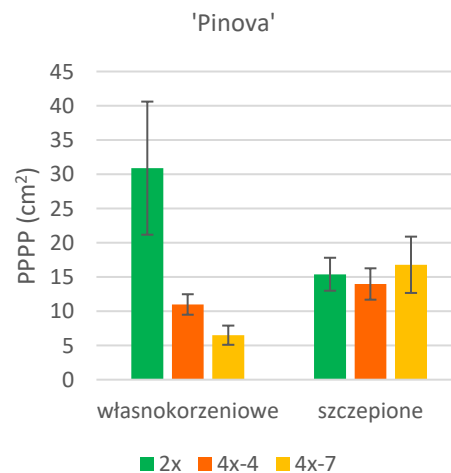
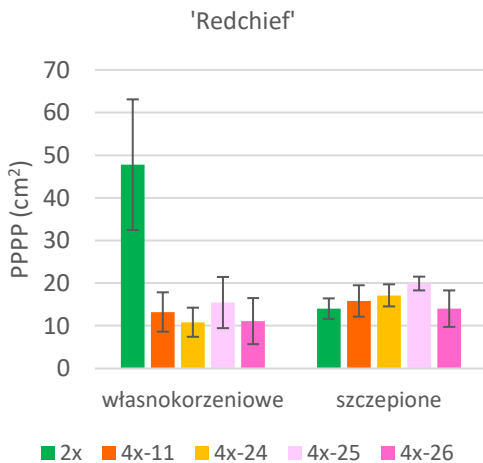
Temat badawczy 5. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni w fazie generatywnej.

- Na podstawie oceny pola porzecznego przekroju pnia (PPPP) wykazano, że 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'.
- Formy diploidalne jabłoni kwitły obficie niż tetraploidy, co świadczy o wydłużonej fazie juwenilnej u klonów tetraploidalnych.
- Poliploidyzacja powoduje opóźnienie zakwitania roślin w ciągu sezonu wegetacyjnego o 2-6 dni.

Intensywność kwitnienia i owocowania



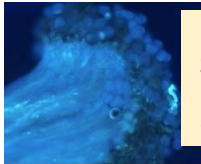
skala bonitacyjna 0-4: 0 – brak kwiatów i owoców, 1 – do 10 kwiatów i owoców, 2 – 11-20 kwiatów i owoców, 3 – 21-30 kwiatów i owoców, 4 – 31 i więcej kwiatów i owoców



WYNIKI

Temat badawczy 6. Ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidalnych klonów jabłoni.

- Krzyżowania między genotypami diploidalnymi jabłoni są efektywniejsze niż krzyżowania z udziałem tetraploidów.
- Efektywność krzyżowań interploidalnych jabłoni jest zależna od poziomu ploidalności genotypu matecznego – bardziej efektywne są krzyżowania, gdy genotyp mateczny jest diploidem.
- W zależności od użytych genotypów rodzicielskich, w różnych kombinacjach krzyżowań obserwuje się różnice w intensywności kiełkowania ziaren pyłku i wnikania łagiewek pyłkowych do poszczególnych części słupka.



Niekiełkujące ziarna pyłku na znamieniu słupka.

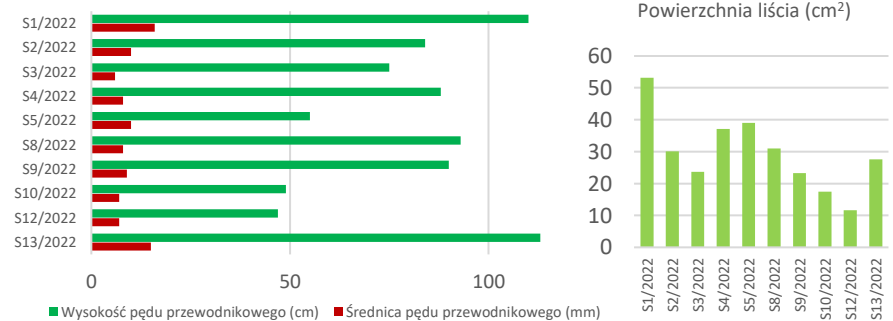
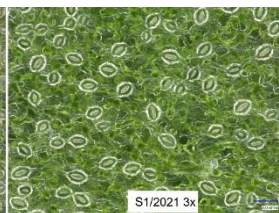
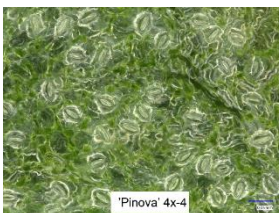


Kiełkowanie pyłku i przerastanie łagiewek przez znamię słupka.

Parametr	Krzyżowanie		
	2x × 2x	2x × 4x	4x × 2x
Liczba zapylnych kwiatów (szt.)	100	320	460
Liczba otrzymanych owoców (szt.)	37	35	10
% wytworzonych owoców w odniesieniu do liczby zapylnych kwiatów	37,0	10,9	2,2
Liczba wydobytych nasion (szt.)	298	89	34
Średnia liczna nasion w owocu	8,1	2,5	3,4

Temat badawczy 7. Ocena fenotypowa siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem autotetraploidów jabłoni.

- Krzyżowania interploidalne pomiędzy formami tetraploidalnymi i diploidalnymi jabłoni pozwalają na uzyskanie żywotnych siewek.
- Siewki uzyskane z krzyżowań interploidalnych z udziałem tetraploidów odmian 'Pinova' i 'Free Redstar' charakteryzują się dużą zmiennością pod względem siły wzrostu, zawartości chlorofilu oraz wielkości i gęstości aparatów szparkowych.



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

Aparaty szparkowe triploidalnej siewki mieszańcowej S1/2021 oraz jej genotypów rodzicielskich.

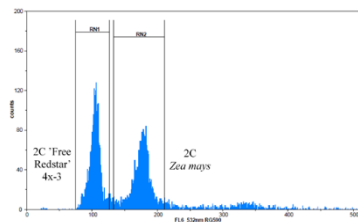
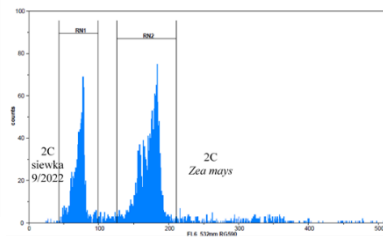
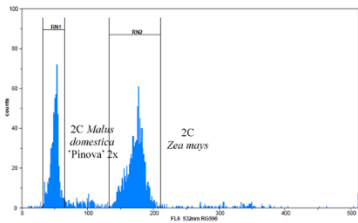
WYNIKI

Temat badawczy 8. Potwierdzenie statusu mieszańca siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem autotetraploidów.

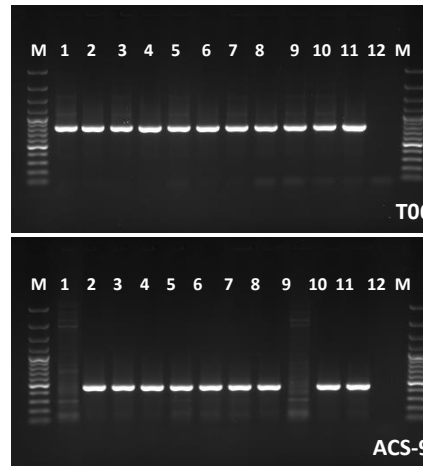
- Analiza zawartości jądrowego DNA oraz liczby chromosomów siewek mieszańcowych z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3 potwierdziła, że uzyskane siewki są triploidami.
- Na skutek zwiększenia poziomu ploidalności, u triploidalnych genotypów mieszańcowych następuje zwiększenie liczby alleli odporności na parcha jabłoniowego w porównaniu do odmian rodzicielskich.

Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności
'Pinova' 2x	1,59	2x
'Free Redstar' 4x-3	3,18	4x
S4/2022	2,44	3x
S5/2022	2,49	3x
S8/2022	2,45	3x
S9/2022	2,31	3x
S10/2022	2,39	3x

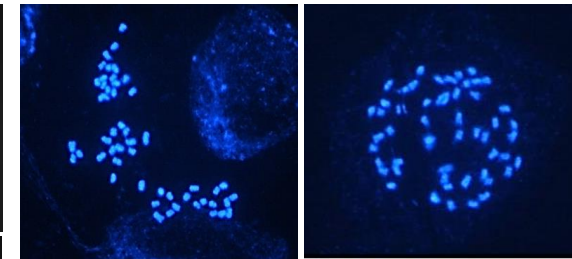
Numer siewki/odmiana rodzicielska	Region Vf (<i>Rvi6</i>)	Region Vbj (<i>Rvi17</i>)	Region Vr (<i>Rvi3</i>)	Region Vm (<i>Rvi5</i>)	Całkowita liczba alleli
S1/2022	12	6	3	2	23
S2/2022	10	7	3	3	23
S3/2022	10	8	3	2	23
S4/2022	11	8	3	3	25
S5/2022	11	5	1	2	19
S8/2022	10	8	3	2	23
S9/2022	11	6	1	1	19
S10/2022	12	6	3	3	21
S12/2022	11	8	1	3	23
S13/2022	10	8	3	3	24
'Free Redstar'	8	5	1	2	16
'Pinova'	10	6	3	2	21



Histogramy analizy cytometrycznej siewki S9/2022 uzyskanej z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3 oraz jej genotypów rodzicielskich.



Produkty uzyskane w reakcji PCR ze starterami: ACS-9 (specyficzny dla genu *Rvi6*) i T06 (specyficzny dla genu *Rvi11*).



Zdjęcia chromosomów triploidalnych genotypów mieszańcowych jabłoni.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2024 r.

Publikacje naukowe:

Wójcik, D., Marat, M., Keller-Przybyłkiewicz, S., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M. and Podwyszyńska, M. (2024). Preliminary study on interploid crossing of apple (*Malus × domestica*) to obtain triploid genotypes. Acta Hort. 1412, 251-260. DOI: 10.17660/ActaHortic.2024.1412.39

Doniesienia konferencyjne:

1. Marat M., Wójcik D., Marasek-Ciołakowska A., Lewandowski M., Podwyszyńska M. “Use of tetraploid forms of apple in breeding and evaluation of progeny seedlings”, 5th European Horticultural Congress, Symposium 08: Genetic Resources in Horticulture: Screening, Propagation, Use, and Conservation. Bukareszt, Rumunia, 12-16 maja 2024 r. (poster).
2. Wójcik D., Marat M., Keller-Przybyłkiewicz S., Marasek-Ciołakowska A., Lewandowski M., Podwyszyńska M. “Badania nad wykorzystaniem tetraploidów jabłoni w hodowli odpornościowej”, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Innowacyjne ogrodnictwo źródłem produktów wysokiej jakości”, Lublin, 4-6 czerwca 2024 r. (poster)
3. Marat M., Wójcik D., Broniarek-Niemiec A. “Badanie reakcji odpornościowych tetraploidów jabłoni na porażenie grzybem *Venturia inaequalis*” („Research on resistant reaction of apple tetraploids to infection with fungus *Venturia inaequalis*”), Dni Młodego Naukowca 2024, IHAR-PIB, Radzików, 24-25 października 2024 r. (poster)