

ZADANIE 42

OCENA POTENCJAŁU GENETYCZNEGO MALINY WŁAŚCIWEJ (*Rubus idaeus* L.) POD WZGLĘDEM WAŻNYCH CECH FENOTYPOWYCH (ZDOLNOŚĆ DO DWUKROTNEGO OWOCOWANIA, POZBIORCZA TRWAŁOŚĆ OWOCÓW, BEZKOLCOWOŚĆ, SAMOPŁODNOŚĆ) PRZY ZASTOSOWANIU METOD KONWENCJONALNYCH I BIOTECHNOLOGICZNYCH

POSTĘP BIOLOGICZNY

Okres realizacji: 2024

KIEROWNIK ZADANIA 42

dr hab. Agnieszka Masny, prof. IO

e-mail: Agnieszka.Masny@inhort.pl

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

Wykonawcy: prof. dr hab. Stanisław Pluta, dr Anita Kuras,
dr Mariusz Lewandowski, dr Marek Szymajda, dr Łukasz Seliga,
dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, mgr Renata Czarnecka, mgr Bogusława
Ildczak, mgr Jolanta Kubik, Krzysztof Pęzik, Krystyna Strączyńska,
Piotr Skręta, Katarzyna Skrzeczkowska, Marzena Śnieguła



CELE PROJEKTU

1. Ocena siewek, należących do 40 rodzin mieszańców oraz ich form rodzicielskich w doświadczeniu polowym pod względem wybranych cech fenotypowych (sposób owocowania - letnie, jesienne, dwukrotne, wielkość owoców, atrakcyjność owoców - kształt, barwa, połysk, pozbiorcza trwałość owoców, siła wzrostu, kolcowość pędów) i wybór pojedynków o pożądanych cechach fenotypowych.
2. Optymalizacja namnażania i rozmnażanie *in vitro* pojedynków maliny czerwonej, wyselekcjonowanych w 2024 roku ze względu na wysokie wartości wybranych cech biologicznych oraz ich form rodzicielskich, w celu założenia II kolekcji klonów dla ich bardziej szczegółowej oceny, jak również kontynuacja rozmnażania i aklimatyzacja *ex vitro* siewek maliny wyselekcjonowanych w 2023 r. dla założenia I kolekcji klonów.
3. Weryfikacja statusu mieszańca z planowanego zapylenia 20 klonów maliny właściwej wyselekcjonowanych w 2023 r. i opracowanie dla nich profili genetycznych („DNA-fingerprinting”).

Cele zostały osiągnięte

MATERIAŁY I METODY

TEMAT BADAWCZY 1. Indywidualna ocena cech fenotypowych roślin wszystkich rodzin mieszańców maliny właściwej i ich form rodzicielskich

- **Materiał roślinny:** siewki 40 rodzin mieszańców, uzyskanych z programu krzyżowań w układzie czynnikowym 10 form matecznych - 'Glen Ample', 'Przehyba', 'Cowichan', 'Willamette', 'Veten', 'Tulameen', 'Sokolica', 'Canby', 'Schönemann', 'Laszka' oraz 3 form ojcowskich M-258 ('Glen Ample' × 'Sokolica'), M-345 ('Canby' × 'Polana') oraz M-378 ('Glen Ample' × 'Polka'), a także siewki uzyskane z samozapylenia form matecznych.
- **Indywidualna ocena mieszańców i ich form rodzicielskich** pod względem następujących cech:
 - sposób owocowania – klasyfikacja genotypów do jednej z trzech grup: genotypy letnie (owocujące głównie na dwuletnich pędach), jesienne (owocujące głównie na jednorocznych pędach) oraz dwupiętrowe (owocujące zarówno na dwuletnich, jak i jednorocznych pędach);
 - wielkość owoców – określana podczas każdego zbioru (skala bonitacyjna 1-9, w której 1 to najniższa wartość cechy, zaś 9 - najwyższa wartość cechy);
 - atrakcyjność owoców (kształt, barwa, połysk) – określana podczas każdego zbioru (skala bonitacyjna 1-9, w której 1 to najniższa, zaś 9 - najwyższa wartość cechy);
 - pozbiorcza trwałość owoców – owoce po każdym zbiorze przetrzymywano przez okres 24-godzin w temperaturze pokojowej, a następnie oceniano ich atrakcyjność (zachowalność kształtu, barwy i połysku, brak tendencji do gnicia lub „puszczenia” soku); skala bonitacyjna 1-9, w której 1 to najniższa, zaś 9 - najwyższa wartość cechy;
 - siła wzrostu roślin – po zakończonej wegetacji wykonano pomiar wysokości każdej siewki (w cm);
 - kolcowość pędów (ilość i „agresywność” kolców w środkowej części) - oceniana po zakończonej wegetacji (skala bonitacyjna 0-4, w której 0 to brak kolców, a 4 to silna kolczastość).

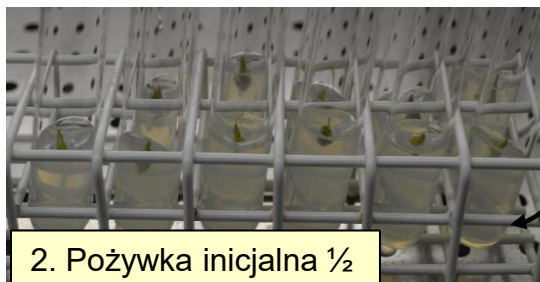
MATERIAŁY I METODY

TEMAT BADAWCZY 2. Optymalizacja rozmnażania i rozmnożenie (rozklonowanie) *in vitro* siewek (pojedynków) maliny właściwej, wyselekcjonowanych w 2024 roku, w celu założenia II kolekcji i dalszej ich oceny, a także kontynuacja rozmnażania siewek maliny wyselekcjonowanych w 2023 r. (I kolekcja)

Kolejne etapy rozmnażania *in vitro*



1. Sterylizacja powierzchniowa



2. Pożywka inicjalna 1/2 makro- i mikro MS

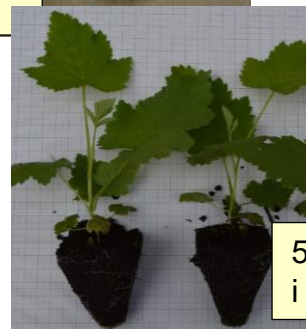


Pąki inicjalne



3. Namnażanie pędów

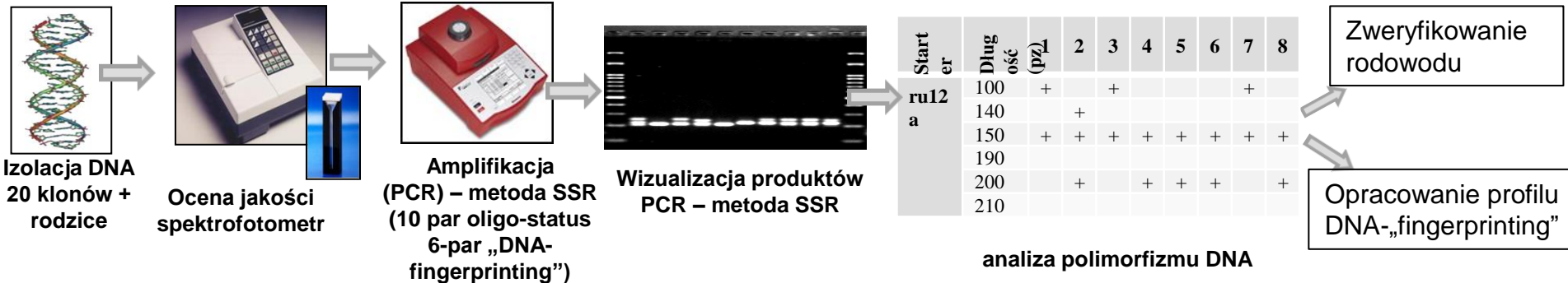
4. Ukorzenianie pędów



5. Wysadzanie roślin i aklimatyzacja w szklarni



TEMAT BADAWCZY 3. Analizy molekularne dla zweryfikowania rodowodu i opracowania profili genetycznych „fingerprinting” najcenniejszych klonów hodowlanych z I kolekcji klonów.



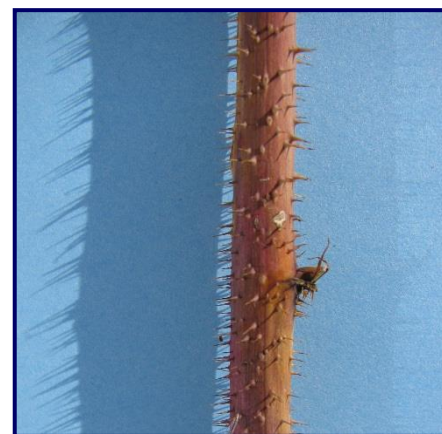
TEMAT BADAWCZY 1. Indywidualna ocena cech fenotypowych roślin wszystkich rodzin mieszańców maliny właściwej i ich form rodzicielskich

- Większość siewek owocowała latem na dwuletnich pędach. Siewki owocujące jesienią przeważały w rodzinach 'Przehyba' × 'Przehyba', 'Willamette' × M-378, 'Willamette' × 'Willamette', 'Veten' × M-378, 'Veten' × 'Veten', 'Tulameen' × M-378, 'Tulameen' × 'Tulameen', 'Sokolica' × M-258, 'Sokolica' × 'Sokolica', 'Schönemann' × M-378 oraz 'Schönemann' × 'Schönemann'. W rodzinach 'Glen Ample' × M-258, 'Glen Ample' × M-345, 'Glen Ample' × 'Glen Ample', 'Przehyba' × M-345, 'Przehyba' × M-378, 'Tulameen' × M-378, 'Schönemann' × M-345 oraz 'Schönemann' × M-378 stwierdzono od 1 do 3 siewek typu „dwupiętrowego” owocujących jesienią na górnej części pędów jednorocznych, zaś wiosną następnego roku – na dolnej części tych samych pędów (wówczas już dwuletnich).
- Najwyższe pędy wytwarzały siewki z rodzin 'Cowichan' × 'Cowichan', 'Willamette' × M-345, 'Sokolica' × 'Sokolica', 'Schönemann' × M-345 oraz 'Laszka' × M-345, a także formy rodzicielskie 'Veten', 'Schönemann' i M-258 (średnia powyżej 180 cm), zaś najniższe 'Willamette' × M-258 i 'Veten' × M-258 (średnia poniżej 120 cm).
- Największe owoce wytwarzały siewki 'Przehyba' × M-345, 'Cowichan' × M-345, 'Cowichan' × 'Cowichan', 'Veten' × M-345, 'Veten' × M-378, 'Veten' × 'Veten' oraz 'Sokolica' × 'Sokolica', a także genotypy rodzicielskie 'Glen Ample', 'Przehyba', M-258 i M-345 (ocena powyżej 5,5 w skali 1-9), zaś najmniejsze - siewki z rodzin 'Willamette' × M-258 oraz 'Schönemann' × M-258 (ocena poniżej 4,0 w skali 1-9).
- Najbardziej atrakcyjnymi owocami odznaczały się genotypy rodzicielskie M-258 i 'Cowichan', a także siewki z rodzin 'Przehyba' × M-345, 'Veten' × 'Veten' oraz 'Przehyba' × M-378. Najmniej atrakcyjne owoce zaobserwowano w rodzinach: 'Willamette' × M-258, 'Schönemann' × M-258 oraz 'Willamette' × 'Willamette'.
- Najlepszą trwałością pozbiorną odznaczały się owoce zebrane z roślin genotypów rodzicielskich M-258, 'Cowichan' i 'Sokolica', a także siewek należących do rodzin 'Przehyba' × M-345 oraz 'Cowichan' × M-378. Największy spadek jakości owoców po 24-godzinym okresie przechowywania odnotowano w przypadku siewek z rodzin 'Schönemann' × M-258 i 'Willamette' × M-258 oraz odmian 'Veten' i 'Canby'.

WYNIKI

TEMAT BADAWCZY 1 (cd.).

- We wszystkich badanych rodzinach mieszańców występowały siewki o pędach charakteryzujących się brakiem kolców w ich środkowej i górnej części, jednak u niektórych z nich obserwowano nieliczne kolce u nasady pędów.
- U 16 rodzin zaobserwowano siewki o silnych i „agresywnych” pędach (od 1 do maksymalnie 5 roślin w obrębie poszczególnych rodzin).
- Najwyższy procent roślin o bezkolcowych pędach zaobserwowano u rodzin ‘Cowichan’ × M-345 (93,3% siewek odznaczało się brakiem kolców na pędach, a pozostałe 6,7% siewek wytwarzało pędy o bardzo małej ilości kolców), ‘Schönemann’ × M-378 (91,1% roślin o bezkolcowych pędach), ‘Willamette’ × M-378 (64,4%), ‘Przehyba’ × M-258 (53,3%) oraz ‘Glen Ample’ × M-378 (51,1%).
- Ponad 40% siewek bezkolcowych odnotowano także w rodzinach: ‘Sokolica’ × M-345 (48,9 %), ‘Cowichan’ × M-378 (46,7%), ‘Przehyba’ × ‘Przehyba’ (42,2%), ‘Cowichan’ × ‘Cowichan’ (42,2%) oraz ‘Veten’ × M-345 (42,2%). Bezkolcowością pędów odznaczały się również rośliny genotypów rodzicielskich – ‘Glen Ample’, M-258, M-345 oraz M-378.
- Najwięcej, bo aż 11,1% roślin o silnych i „agresywnych” kolcach oraz 24,4% siewek o średniej kolcowości zaobserwowano w rodzinie mieszańców ‘Laszka’ × ‘Laszka’. Dość dużą liczbą siewek o „agresywnych” kolcach (6,7% roślin w klasie 4) charakteryzowały się także rodziny ‘Tulameen’ × M-345, ‘Sokolica’ × ‘Sokolica’, ‘Canby’ × ‘Canby’ oraz ‘Laszka’ × M-345.



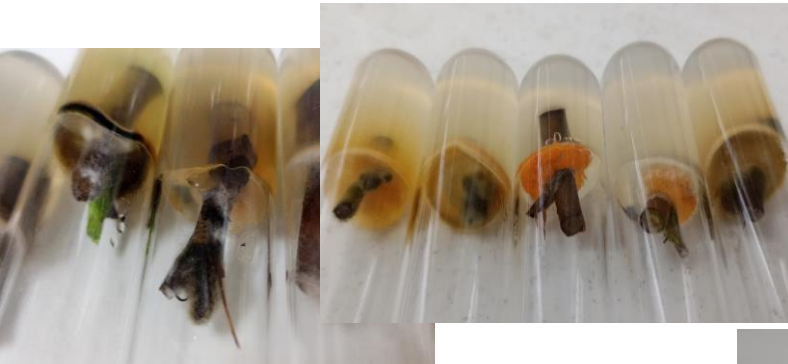
WYNIKI

TEMAT BADAWCZY 2. Optymalizacja rozmnażania i rozmnożenie (rozklonowanie) *in vitro* siewek (pojedynków) maliny właściwej, wyselekcjonowanych w 2024 roku, w celu założenia II kolekcji i dalszej ich oceny, a także kontynuacja rozmnażania siewek maliny wyselekcjonowanych w 2023 r. (I kolekcja)

- W celu założenia II kolekcji klonów maliny, kultury *in vitro* 30 pojedynków wyselekcjonowanych w 2024 roku, zainicjowano w dwóch sezonach (wiosna, jesień). Dodatkowo ponownie zainicjowano kultury 16 genotypów, które nie podjęły rozwoju w 2023 r., a były niezbędne do założenia I kolekcji klonów maliny.
- Wyłożono na pożywkę selekcyjno-inicjalną 1080 eksplantatów. Po selekcji kultur pod kątem fitopatologicznym oraz uszkodzeń związanych z procesem sterylizacji zaobserwowano, że zakażenia bakteryjno-grzybowe stanowiły 13%, a uszkodzenia chemiczne eksplantatów 11%.
- W okresie późnoletnim zainicjowano kultury kolejnych 19 wyselekcjonowanych w 2024 roku pojedynków rosnących w warunkach polowych. Materiał w postaci pąków wierzchołkowych i kątowych zbierano w 5 terminach. Aby ograniczyć liczbę zakażeń bakteryjno-grzybowych jakie pojawiają się w kulturach *in vitro* inicjowanych jesienią, dla sześciu klonów (BP-202119-05, BP-202119-01, BP-202107-80, BP-202119-04, BP-202107-10, BP-202128-02) wprowadzono modyfikację sterylizacji.
- Na pożywkę selekcyjno-inicjalną wyłożono 726 eksplantatów uzyskanych z 13 pojedynków oraz 307 eksplantatów (zmodyfikowana metoda sterylizacji) z 6 pojedynków, w sumie 1033 eksplantaty. Obserwacje fitopatologiczne zainicjowanego materiału roślinnego wykazały duży udział zakażeń grzybowych. Dla materiału sterylizowanego tylko chlorkiem rtęci procent „wypadów” spowodowany zakażeniami grzybowymi wynosił ogółem 50%, natomiast zakażenia bakteryjne stanowiły 19%. Zastosowanie dodatkowego czynnika chemicznego w postaci 10% ACE nie wpłynęło w znaczący sposób na zmniejszenie liczby zakażeń.
- Najslabiej przebiegała inicjacja kultur z eksplantatów pobieranych na przełomie sierpnia i września. Powodem niezdolności pąków do rozwoju były pojawiające się liczne zakażenia bakteryjno-grzybowe (średnio 69% zakażeń w sezonie późnego lata w porównaniu do 13% zakażeń w sezonie wiosennym).

WYNIKI

TEMAT BADAWCZY 2. (c.d)



Zakażenia bakteryjno-grzybowe w kulturach maliny inicjowanych jesienią



Pędy malin na etapie namnażania – po prawej pęd namnażany na pożywce z żelazem FeEDDHA, po lewej pęd rosnący na pożywce z żelazem FeNa₂EDTA



Pęd maliny przekładany z pożywki selekcyjnej na rozkrzewiającą



Ukorzenione pędy malin



Pędy malin na etapie namnażania



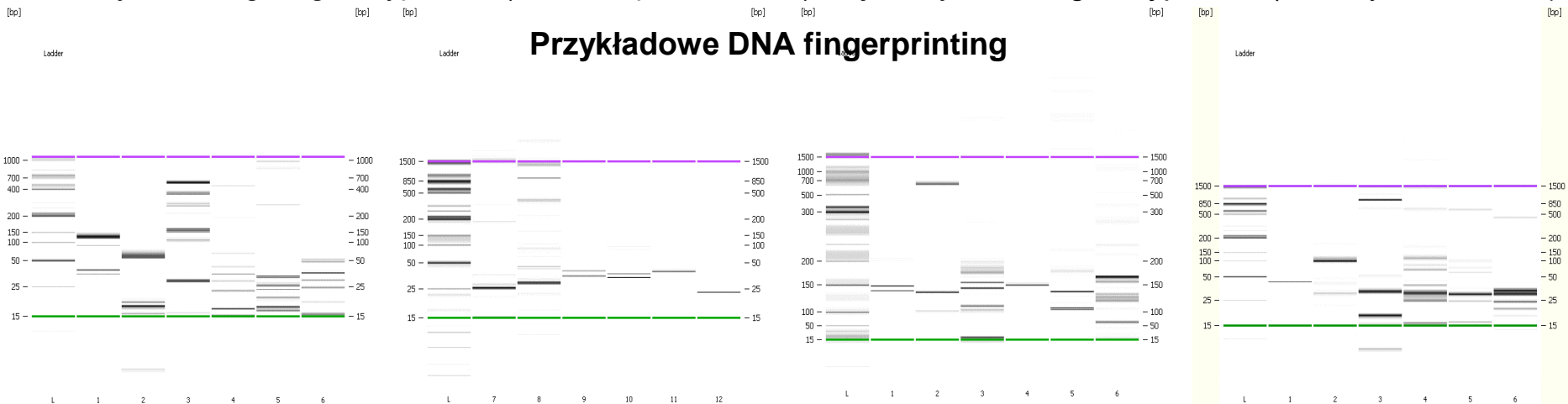
Siewki maliny czerwonej bezpośrednio po wysadzeniu do podłoża

WYNIKI

TEMAT BADAWCZY 3. Analizy molekularne dla zweryfikowania rodowodu i opracowania profili genetycznych „fingerprinting” najcenniejszych klonów hodowlanych z I kolekcji klonów.

- Łącznie przeprowadzono 3.720 reakcji amplifikacji, w których wygenerowano 105 polimorficznych aplikantów. Długość uzyskanych amplikonów wahała się od 110 do 700 pz.
- Każdy z testowanych genotypów został oceniony na podstawie 7-10 charakteryzujących go fragmentów DNA; opracowano ich profil genetyczny „DNA-fingerprinting” metodą SSR z wytypowanymi 6 parami oligonukleotydów .
- Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla wszystkich testowanych genotypów.
- Określono procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej, który wynosił od 100 do 40%.
- Najwyższy procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej obserwowano dla genotypów nr 11 i 25 (‘Tulameen’ × ‘Tulameen’), 6, 15 i 22 (‘Schönemann’ × ‘Schönemann’), 23 (‘Przehyba’ × ‘Przehyba’), jak również dla genotypów nr 8 (‘Przehyba’ × M-378), nr 9 (‘Willamette’ × M-378), nr 16 (‘Glen Ample’ × M-258) i nr 12 (‘Veten’ × M-258), najniższy zaś dla genotypu nr 3 (‘Glen Ample’ × M-258).
- Oszacowano procentowy udział alleli pochodzących od formy ojcowskiej i wynosił on od 60 do 21%. Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy ojcowskiej obserwowano na matrycy DNA wydzielonego z genotypu nr 3 (‘Glen Ample’ × M-258), najniższy zaś dla genotypu nr 8 (‘Przehyba’ × M-378).

Przykładowe DNA fingerprinting



WNIOSKI

1. Uzyskanie genotypów maliny o dużych, atrakcyjnych i trwałych owocach oraz bezkolcowych pędach metodą tradycyjnej hodowli krzyżówkowej jest możliwe, wymaga jednak wsparcia wynikami szerszych badań genetyczno-hodowlanych.
2. Inicjację kultur *in vitro* malin można prowadzić z pąków pobranych zarówno w okresie wiosennym jak i jesiennym, jednak wraz z opóźnianiem terminu pobierania i inicjacji pąków rośnie w kulturach liczba zanieczyszczeń bakteryjno–grzybowych.
3. Intensywność rozmnażania kultur zależy od współczynnika namnażania charakterystycznego dla danego genotypu.
4. Inicjacja kultur w sezonie jesiennym wymaga dopracowania metody sterylizacji materiału roślinnego.
5. Mieszańce o potwierdzonym statusie stanowią 100% testowanych mieszańców F₁ maliny właściwej.