

## ZADANIE 50

**Analiza fenotypowa i molekularna wybranej populacji segregującej jabłoni dla wytworzenia genotypów o czerwonej barwie miąższu i zwiększonej odporności na zarazę ogniową**

**POSTĘP BIOLOGICZNY**  
**Okres realizacji – 2023**

**KIEROWNIK ZADANIA 50**

**dr inż. Mariusz Lewandowski**

**e-mail: [Mariusz.Lewandowski@inhort.pl](mailto:Mariusz.Lewandowski@inhort.pl)**

**Wykonawcy:** dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, prof. dr hab. Stanisław Pluta, dr hab. Agnieszka Masny, dr Anita Kuras, dr Marek Szymajda, dr Łukasz Seliga, dr Paweł Bielicki, Krzysztof Strojny, Jolanta Kubik, Ilona Skiba, Agnieszka Walencik, Krystyna Strączyńska, Renata Czarnecka, Katarzyna Trzaska

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



# CELE PROJEKTU

- ✓ **Ocena fenotypowa populacji siewek jabłoni pokolenia F<sub>1</sub> otrzymanej ze skrzyżowania wybranych genotypów jabłoni ('Trinity' i 'Free Redstar') i wyodrębnienie z niej genotypów o czerwonej barwie miąższu i zwiększonej odporności na zarazę ogniową. (*temat badawczy 1*)**
- ✓ **Analiza segregacji alleli polimorficznych oraz zagęszczanie map genetycznych genomów odmian 'Trinity' i 'Free Redstar'. (*temat badawczy 2*)**

**Tematy zostały w pełni zrealizowane, a cele osiągnięte.**

# MATERIAŁY I METODY

1. Materiał do badań – 696 siewek pokolenia  $F_1$ , otrzymane ze skrzyżowania:

- ✓ forma mateczna – 1. 'TRINITY' – czerwona barwa miąższu
- ✓ forma ojcowska – 2. 'FREE REDSTAR' – biała barwa miąższu, donor cech odporności na parcha jabłoni, mączniaka jabłoni i zarazę ogniową



2. Ocena fenotypowa 696 siewek, pod kątem:

- ✓ siły wzrostu wyrażonej średnicą pędu przewodnikowego (w mm),
- ✓ wczesności wchodzenia w okres kwitnienia i owocowania (termin),
- ✓ intensywności kwitnienia i owocowania (1-9),
- ✓ stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni (1-5),
- ✓ podatności drzew na zarazę ogniową (1-5),
- ✓ wyglądu (atrakcyjności) owoców (1-5),
- ✓ smaku owoców (1-5),
- ✓ wielkości owoców (1-9),
- ✓ kształtu owoców (1-7),
- ✓ barwy miąższu owoców (1-6).



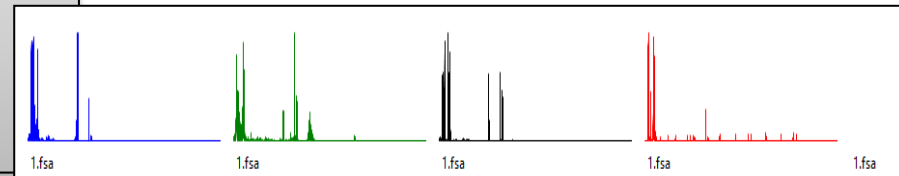
# MATERIAŁY I METODY

**MATERIAŁ ROŚLINNY** – (populacja mapująca ‘Trinity’ x ‘Free Redstar’ 94 rośliny o potwierdzonym statusie mieszańca (2022r.))  
**IZOLACJA GENOMOWEGO DNA** (Aldrich&Culis)  
**AMPLIFIKACJA FRAGMENTÓW DNA**

**Warunki reakcji PCR ‘Touch down’:**



96°C – 30"  
65°C – 90" 4x (-1°C/cykl)  
72°C – 60"  
96°C – 30"  
60°C – 60" 35x  
72°C – 60"



**Sporządzanie mapy genetycznej** - 20 SSR, zlokalizowanych w chromosomach II, III, V, VI, VII, X, XVI genomu *Malus*

**Analiza bioinformatyczna:**

- ✓ odległości mapowe (cM) – funkcja *Kosambi*
- ✓ sprzężenia między allelami – *LOD* ( $LOD \geq 3$ )
- ✓ prawdopodobieństwo znalezienia sprzężeń – *ML* (*Maximum Likelihood*)
- ✓ ocena zależności pomiędzy rzeczywistym a teoretycznym rozkładem genotypów w populacji segregującej – test **CHI-KWARAT:  $\chi^2$**
- ✓ częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami – **REC  $\leq 50$**
- ✓ graficzny obraz mapy genetycznej – **Map Chart 2.0**

# WYNIKI

- ✓ Wykonana ocena intensywności kwitnienia i owocowania potwierdziła, że z populacji 696 siewek tylko 3 zakwitły i zaowocowały: nr 32, nr 79 i nr 153.
- ✓ W pierwszym roku oceny zaobserwowano pojedyncze objawy porażenia liści i pędów roślin, tzn. obserwowano na tych organach roślinnych białą, mączystą nalot w przypadku mączniaka jabłoni (3 siewki: nr 348, nr 457, nr 458) i ciemno-oliwkowe plamy pokryte aksamitnym nalotem na górnej stronie liści w przypadku parcha jabłoni (5 siewek: nr 10, nr 414, nr 456, nr 516 i nr 608).
- ✓ W całej populacji siewek nie obserwowano objawów zarazy ogniowej.

## Ocena wyglądu (atrakcyjności), smaku, wielkości, kształtu i barwy miąższu owoców (Skierniewice, 2023)

| Numer siewki | Wygląd (1-5) | Smak (1-5) | Wielkość (1-9) | Kształt (1-7) | Barwa miąższu (1-6) |
|--------------|--------------|------------|----------------|---------------|---------------------|
| 32           | 5            | 4          | 6              | 7             | 6                   |
| 79           | 4            | 3          | 5              | 7             | 6                   |
| 153          | 4            | 3          | 5              | 7             | 1                   |

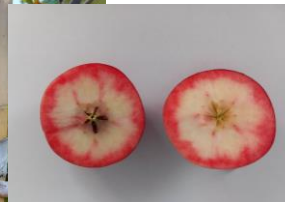
### Objaśnienia:

- wygląd (atrakcyjność) owoców (1-5): 1-mało atrakcyjne, 5-bardzo atrakcyjne,
- smak owoców (1-5): 1-mało smaczne, 5-bardzo smaczne,
- wielkość owoców (1-9): 1-bardzo małe, 2-bardzo małe do małych, 3-małe, 4-małe do średnich, 5-średnie, 6-średnie do dużych, 7-duże, 8-duże do bardzo dużych, 9-bardzo duże,
- kształt owoców (1-7): 1-cylindryczny wcięty, 2-stożkowaty, 3-jajowaty, 4-walcowaty, 5-elipsoidalny, 6-kulisty, 7-kulisty spłaszczony,
- barwa miąższu (1-6): 1-biała, 2-kremowa, 3-żółtawa, 4-zielonkawa, 5-różowawa, 6-czerwonawa.

# WYNIKI



Owoce siewki nr 32

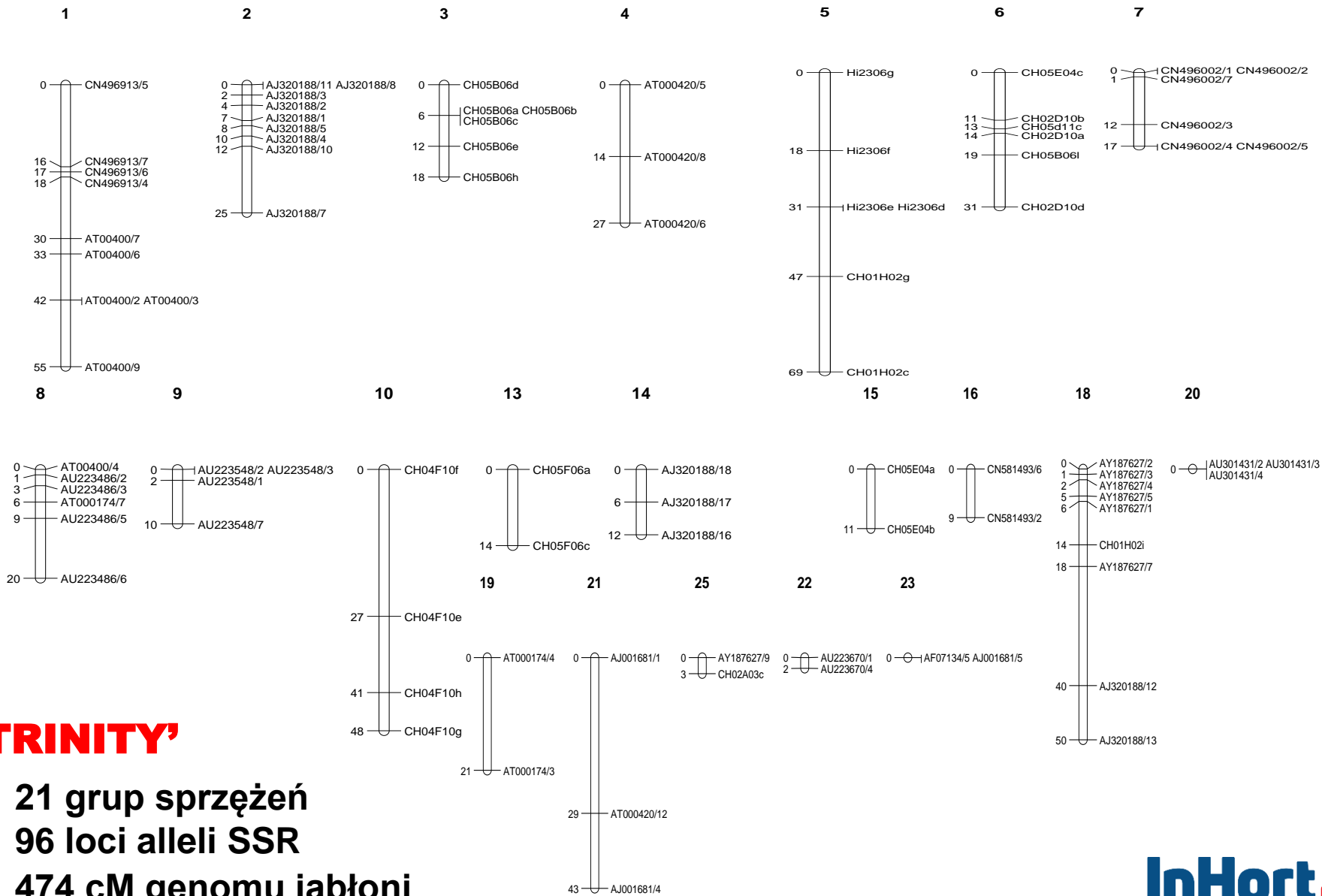


Owoce siewki nr 79



Owoce siewki nr 153

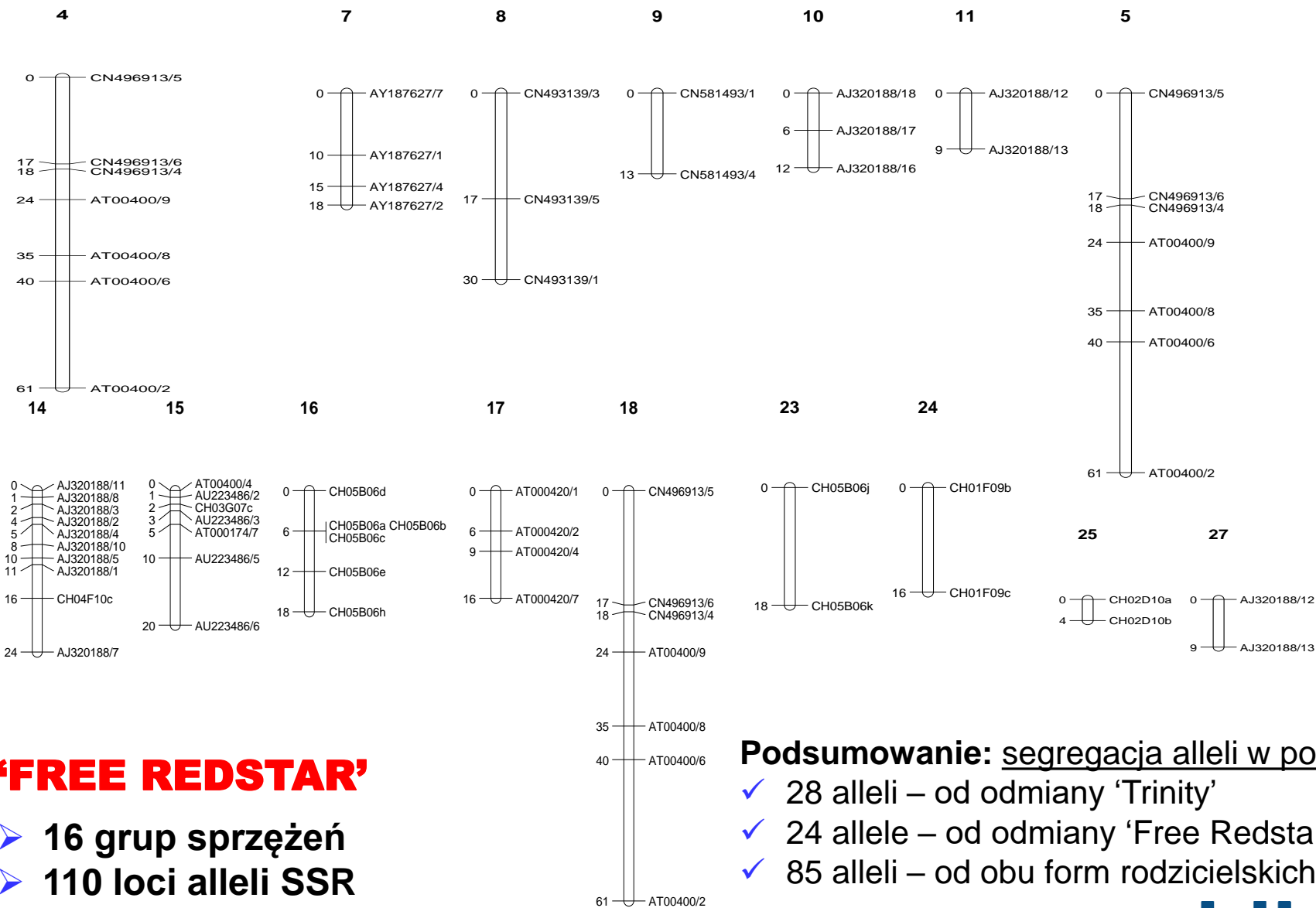
# WYNIKI – Mapa genetyczna sporządzona na podstawie oceny segregacji łącznie 233 alleli SSR w populacji 'Trinity' x 'Free Redstar' (137 - zidentyfikowano w 2023 r.)



## 'TRINITY'

- 21 grup sprzężeń
- 96 loci alleli SSR
- 474 cM genomu jabłoni

# WYNIKI – mapa genetyczna populacji ‘T x FR’ – cd.



## ‘FREE REDSTAR’

- 16 grup sprzężeń
- 110 loci alleli SSR
- 485 cM genomu jabłoni

## Podsumowanie: segregacja alleli w populacji

- ✓ 28 alleli – od odmiany ‘Trinity’
- ✓ 24 allele – od odmiany ‘Free Redstar’
- ✓ 85 alleli – od obu form rodzicielskich



# WNIOSKI

- ✓ Wstępne wyniki badań pokazują, że badane genotypy/siewki jabłoni różnią się pod względem siły wzrostu, wyrażonej średnicą pędu przewodnikowego (w mm).
- ✓ Genotypy rodzicielskie ('Trinity' i 'Free Redstar') użyte w krzyżowaniach mogą przyczynić się do poprawy lub pogorszenia siły wzrostu u potomstwa oraz modyfikować zdolność do obfitego lub słabszego kwitnienia i owocowania siewek jabłoni. Genotypy rodzicielskie jabłoni mogą także warunkować zwiększenie lub obniżenie podatności na parcha i mączniaka jabłoni oraz zarazę ogniową u siewek jabłoni.
- ✓ Wstępna mapa genetyczna dla odmian 'Trinity'- wytwarzającej owoce o czerwonym miąższu i 'Free Redstar' - produkującej owoce o białym miąższu zawierająca *loci* markerów SSR, będzie przydatna do identyfikacji regionów genomów *Malus*, regulujących cechę barwy owoców jabłoni.
- ✓ W dotychczas przeprowadzonym procesie mapowania genomów obu odmian, zaobserwowano stosunkowo niski stopień homologii sporządzonych map z referencyjnymi mapami *Malus*, a *loci* zastosowanych w badaniach markerów były mapowane w odmiennych grupach sprzężeń w odniesieniu do ich lokalizacji na chromosomach.

# WYKAZ PUBLIKACJI



## Kielkowanie nasion jabłoni (*Malus domestica*) i siła wzrostu siewek jabłoni populacji segregującej 'Trinity' x 'Free Redstar'

### WSTĘP

Jabłoni jest najważniejszym gatunkiem roślin sadowniczych klimatu umiarkowanego, dobrze przystosowanym do uprawy w warunkach przyrodniczych Polski. Światowa produkcja jabłek w roku 2022 wyniosła 78,8 mln ton (USDA 2022). Według szacunku GUS, w tym samym czasie produkcja jabłek w Polsce wyniosła około 4,2 mln ton. Polska jest więc największym producentem owoców tego gatunku w Unii Europejskiej, a czwartym w świecie po Chinach (41 mln ton), Turcji (4,8 mln ton) i USA (4,5 mln ton).

Celem badań jest określenie przydatności wybranych genotypów jabłoni dla uzyskania populacji segregującej (mieszanek pokolenia F<sub>1</sub>) i wyodrębnienia z niej genotypów o czerwonej barwie miąższu i zwiększonej odporności na zarazę ogniową.

### MATERIAŁY I METODY

- Krzyżowanie – 2 form rodzicielskich:
  - ✓ forma mączeczna – 1. TRINITY – czerwona barwa miąższu
  - ✓ forma opłowska – 2. FREE REDSTAR – biała barwa miąższu, donor cech odporności na parcha jabłoni, mączniaka jabłoni i zarazę ogniową



- Materiał do badań – 696 siewek pokolenia F<sub>1</sub>

### PODSUMOWANIE

- ✓ Długość okresu stratyfikacji nasion w rodzinach mieszanych jest zmienna i zależy przede wszystkim od genotypu krzyżowanych form rodzicielskich, a także warunków przebiegu wegetacji w okresie formowania się i dojrzewania nasion, pory zbioru owoców (ich dojrzałości), pory wydobycia nasion z miąższu oraz warunków stratyfikacji (rodzaj podłoża, wilgotność i temperatura).
- ✓ Silny wzrost siewek można uzyskać uprawiając je w pojemnikach, np. w cylindrach foliowych ustawionych pod osłonami, w nieogrzewanych wysokich tunelach foliowych. Zaletą produkcji siewek jabłoni w pojemnikach jest znaczne skrócenie ich okresu juvenilnego. W takich warunkach, w ciągu jednego roku uprawy, pędy przewodnikowe siewek uzyskują wysokość nawet ponad 2 m. Po naszczeniu wierzchołków takich pędów na podkładkę karłowatą uzyskuje się drzewka, które w dużym procencie zakwitną i zaowocują już w następnym roku po posadzeniu w polu.

### WYNIKI

1. Zapylenia poprzedzono zebraniem pyłku odmiany 'Free Redstar' oraz kastracją i izolacją kwiatów odmiany 'Trinity'. Łącznie wykastrowano i zapylono 220 kwiatów, uzyskano 161 owoców, wydobyło 1 062 nasiona.



2. Nasiona odkazano 0,5% roztworem fungicydu Alette 80 WG (poprzez zamoczenie na 48 godz.) i poddano stratyfikacji polegającej na umieszczeniu ich w wilgotnym plukany piasku w perforowanej torbie foliowej i przetrzymywaniu w chłodzarni w temperaturze około +5°C.



5. Szczępienie wierzchołków pędów przewodnikowych siewek na podkładkę M.9 (produkcja tunelowa).



3. Kielkujące nasiona sukcesywnie wyjmowano z piasku i wysadzano pojedynczo (1 nasiono do 1 doniczki) do małych doniczek plastikowych o wymiarach 7 x 7 cm, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego), ziemi kompostowej i piasku w stosunku objętościowym 1:1:1. Doniczki z umieszczonymi nasionami ustawiano na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień +22°C, noc +18°C), pod sztucznym doświetleniem, przy zapewnieniu 16-to godzinnego dnia. W roku 2021 w procesie produkcji siewek łącznie uzyskano 696 siewek, co stanowiło 65,5% w stosunku do liczby wysianych nasion.



4. Siewki (696 szt.) po uzyskaniu stadium 2-3 liści właściwych (10-15 cm) przesadzono z małych doniczek plastikowych do 5-litrowych pojemników foliowych (cylindrów), napełnionych mieszaniną substratu torfowego (warzywnego) i ziemi kompostowej (w proporcji 1:1) i ustawiono na ziemi, wyłożonej czarną folią ogrodniczą i białą agrotkaniną (aby zabezpieczyć siewki jabłoni przed chorobami odglebowymi i chwastami) w wysokim, nieogrzewanym tunelu foliowym, bez dodatkowego doświetlania.

6. Sadzenie drzewek w polowej kwaterze hodowlanej w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach.



- ✓ Dla każdej z 696 siewek wykonano ocenę siły wzrostu wyrażoną średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm) po zakończeniu wegetacji roślin (24-26.10.2022r.)

| Średnia dla 696 siewek | Wysokość pędu przewodnikowego (cm) | Średnica pędu przewodnikowego (mm) |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                        |                                    | 196,4                              |

- ✓ W ciągu jednego roku uprawy pędy przewodnikowe siewek uzyskały w naszych badaniach wysokość od 110 cm do 290 cm, średnia wysokość dla 696 siewek to 196,4 cm.
- ✓ W życiowym cyklu rozwojowym drzewiastych roślin sadowniczych rozważanych z nasion, takich jak jabłoni, występuje okres juvenilny (młodociany). Obejmuje on początkową fazę życia, w czasie którego rośliny te nie są zdolne do zakwitania i wydawania owoców.
- ✓ Najbardziej efektywnym sposobem przelamywania fazy juvenilnej siewek jabłoni jest silne promowanie ich wzrostu, tak aby po wysiewie nasion mogły one uzyskać jak największą wysokość pędu przewodnikowego, tj. co najmniej 2 m w ciągu jednego roku uprawy.
- ✓ Wiadomo jest, że im wyższe uzyska się siewki, z których pobiera się zrazy do szczytowania (powyżej 150 cm), tym otrzymane w wyniku zimowego szczytowania drzewka jabłoni wcześniej zakwitną i zaowocują.

Doświadczenie prowadzono w ramach Badań Podstawowych na temat postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 59 „Analiza fenotypowa i molekularna wybranej populacji segregującej jabłoni dla wyizolowania genotypów o czerwonej barwie miąższu i zwiększonej odporności na zarazę ogniową”.

## ✓ POSTER

Lewandowski M., Keller-Przybyłkiewicz S., Strojny K. 2023. Kielkowanie nasion jabłoni (*Malus domestica*) i siła wzrostu siewek jabłoni populacji segregującej 'Trinity' x 'Free Redstar'.