

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: 2025 rok - 12 miesięcy

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

Wykonawcy: mgr inż. Monika Działkowska, 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, dr Jacek Filipczak, prof. Małgorzata Podwyszyńska, dr Monika Markiewicz

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



L.p.	Cele projektu w 2025 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> i <i>Erwinia amylovora</i> .	Tak
4	Analiza ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stresy biotyczne w liściach diploidów i tetraploidów jabłoni inokulowanych <i>Venturia inaequalis</i> i <i>Erwinia amylovora</i> oraz analiza obecności markerów odporności na parcha w genotypach tetraploidalnych.	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	Analiza poziomu ploidalności, ocena wielkości genomu oraz potwierdzenie statusu mieszańca siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem tetraploidów	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 jabłoni na porażenie przez parcha jabłoniowego i zarazę ogniową na poziomie biochemicznym i molekularnym.

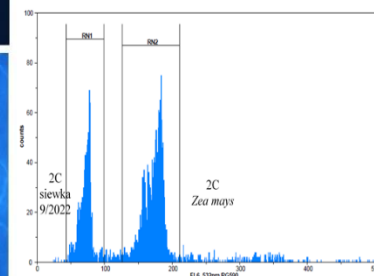
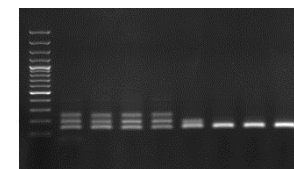
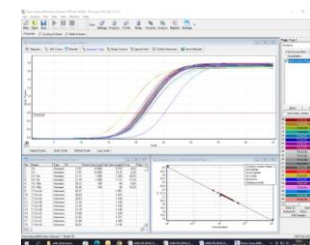
- Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy nadroztlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD) oraz badanie poziomu dialdehydu malonowego (MDA) i proliny.
- Analiza ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stresy biotyczne w liściach diploidów i tetraploidów jabłoni inokulowanych *Venturia inaequalis* i *Erwinia amylovora*.
- Analiza obecności markerów odporności na parcha w genotypach tetraploidalnych.

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 (pomiar średnicy pnia).
- Ocena żywotności pyłku i jego kielkowania 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.

- Ocena siły wzrostu, zawartości chlorofilu oraz długości i gęstości aparatów szparkowych siewek mieszańcowych.
- Cytometryczna analiza poziomu ploidalności i wielkości genomu siewek.
- Potwierdzenie statusu mieszańca siewek z krzyżowań z udziałem tetraploidów.



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.
- Tetraploidy 'Pinova' wykazują wyższy niż diploidy poziom odporności zarówno na parcha jabłoni jak i na zarazę ogniową.
- Stopień podatności na porażenie przez parcha jabłoniowego i zarazę ogniową różni się u poszczególnych klonów tetraploidalnych pochodzących od tej samej odmiany.



Nekrozy na pędach spowodowane rozwojem zarazy ogniowej (A); rośliny odmiany 'Idared' (B) i 'Pinova' 4x-3 (C) 28 dni po inokulacji zawiesiną bakterii *Erwinia amylovora*.

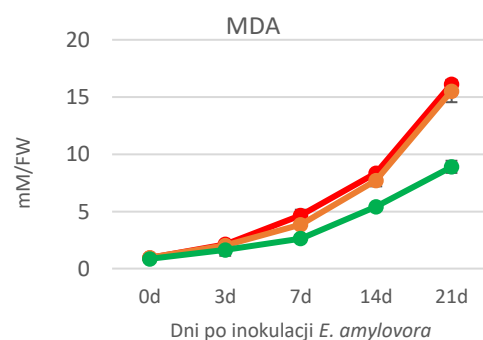
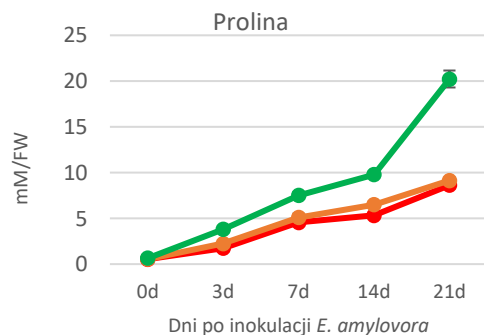
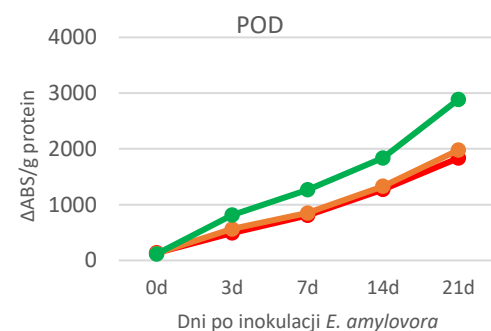
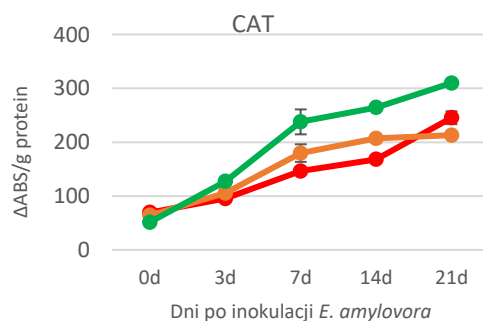
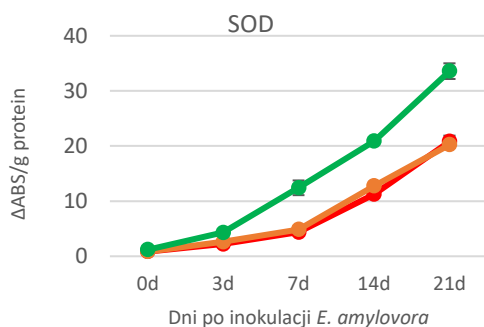
Genotyp	Stopień porażenia pędów przez zarazę ogniową (%)	
	Po 14 dniach	Po 28 dniach
'Idared' 2x odmiana referencyjna	26,84 bc	81,27 c
'Pinova' 2x	19,92 bc	65,44 bc
'Pinova' 4x-3	2,39 a	27,43 a
'Pinova' 4x-5	4,35 a	24,36 a
'Pinova' 4x-17	3,68 a	23,61 a
'Redchief' 2x	29,94 c	72,22 bc
'Redchief' 4x-13	12,09 ab	45,89 ab
'Redchief' 4x-23	20,57 bc	75,25 c
'Redchief' 4x-25	29,35 c	70,72 bc

Genotyp	Stopień porażenia pędów przez parcha jabłoni
'Lobo' 2x odmiana referencyjna	4.2 d
'Pinova' 2x	2.9 c
'Pinova' 4x-3	0.0 a
'Pinova' 4x-4	0.0 a
'Pinova' 4x-5	0.0 a
'Pinova' 4x-7	0.0 a
'Pinova' 4x-17	3.3 cd

WYNIKI

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

- Aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz zawartość proliny i MDA wzrasta po inokulacji *Venturia inaequalis* i *Erwinia amylovora* zarówno u diploidów jak i tetraploidów jabłoni.
- Podczas infekcji tetraploidy wykazują wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych i wyższe stężenie proliny niż diploidy, co świadczy o wydajniejszym uruchamianiu mechanizmów obronnych przez genotypy tetraploidalne. Niższy poziom MDA u tetraploidów wskazuje na mniejsze uszkodzenia błon biologicznych w wyniku infekcji niż u diploidów.
- Poliploidyzacja u jabłoni prowadzi do uzyskania genotypów charakteryzujących się lepszymi zdolnościami przystosowawczymi do warunków stresowych niż diploidalne genotypy wyjściowe.

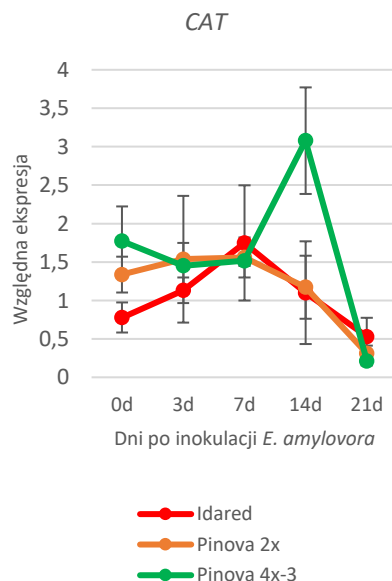
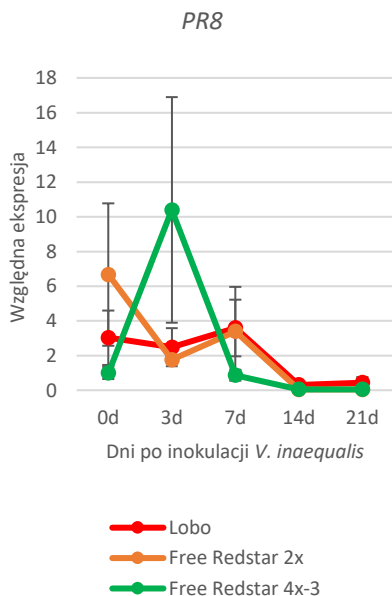


tetraploid 'Pinova' 4x-3
diploid 'Pinova' 2x
odmiana referencyjna 'Idared'

WYNIKI

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

- Inokulacja drzewek jabłoni patogenami *V. inaequalis* i *E. amylovora* powoduje zmiany w poziomie ekspresji genów związanych z różnymi mechanizmami obronnymi.
- W odpowiedzi na infekcję *V. inaequalis*, tetraploidy 'Free Redstar' 4x-3 reagują wyższą niż diploidy, ekspresją genów kodujących białka związane z patogenezą (białka PR).
- W przypadku zarazy ogniowej, wyższy poziom odporności na tę chorobę u tetraploidów 'Pinova' 4x-3 związany jest z wysoką ekspresją genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w odpowiedzi na inokulację *E. amylovora*.
- Poliploidyzacja spowodowała zmiany w sekwencjach DNA rejonów odporności na parcha *Rvi*, co może modyfikować odpowiedź odpornościową tych klonów na porażenie przez *V. inaequalis*.



Liczba produktów amplifikacji ze starterami komplementarnymi do rejonów odporności na różne rasy *Venturia inaequalis* (*Rvi*) w reakcji PCR z DNA odmiany diploidalnej 'Pinova' (2x) i jej tetraploidalnych klonów (4x).

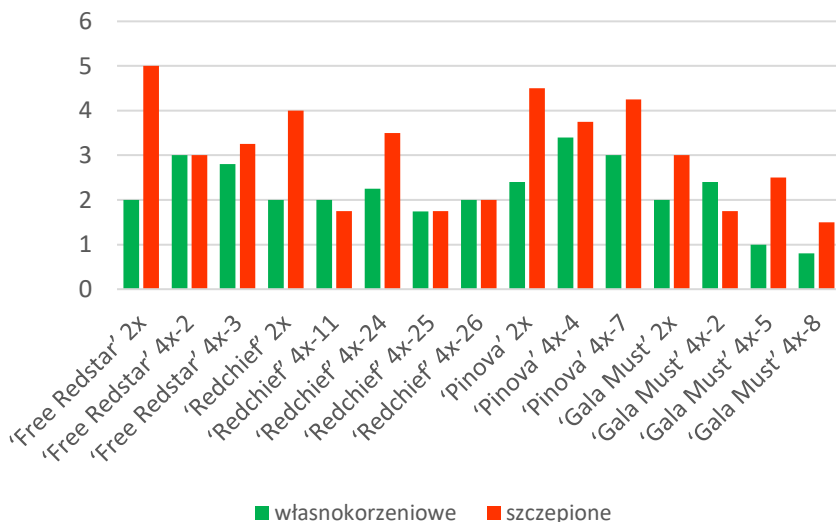
Gen	Marker	Liczba produktów amplifikacji				
		'Pinova' 2x	'Pinova' 4x-3	'Pinova' 4x-4	'Pinova' 4x-5	'Pinova' 4x-16
<i>Rvi4</i>	CH02c02	8	9	8	8	8
<i>Rvi5</i>	Hi7h02	5	4	4	4	1
	Vm	3	3	3	3	3
	AD13	4	4	4	4	4
<i>Rvi6</i>	Vf1	3	3	3	3	3
	ACS 07	2	2	2	2	3
<i>Rvi13</i>	CH02b07	1	2	1	1	2
<i>Rvi15</i>	CH02f06	2	3	2	2	1
<i>Rvi19</i>	CN879773	3	3	3	3	3
<i>Rvi20</i>	NZ02b1	1	2	1	1	1
Całość:		32	35	31	31	29

WYNIKI

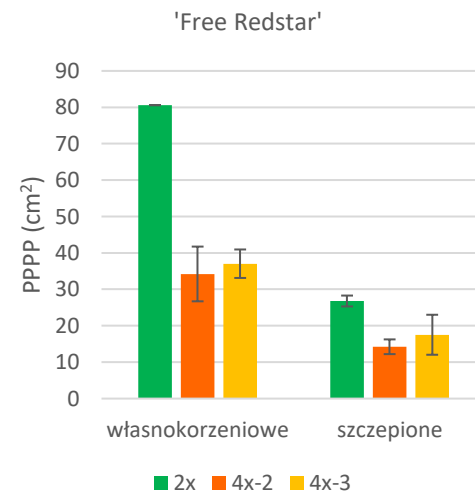
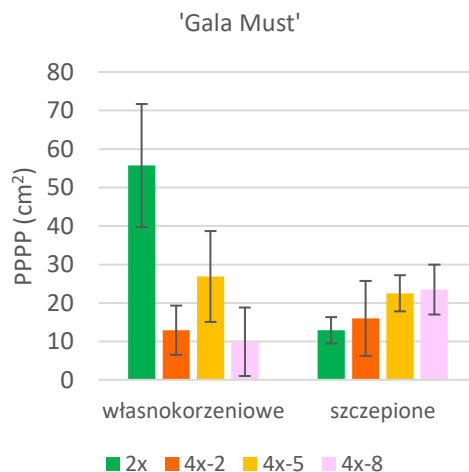
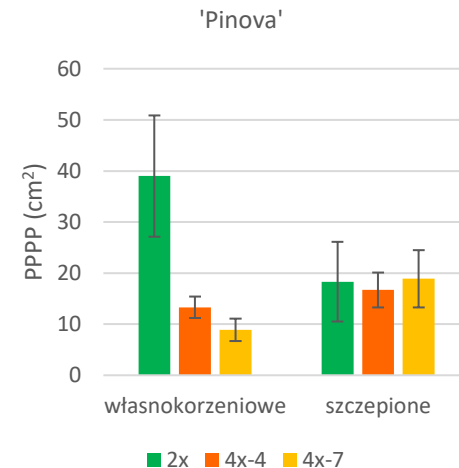
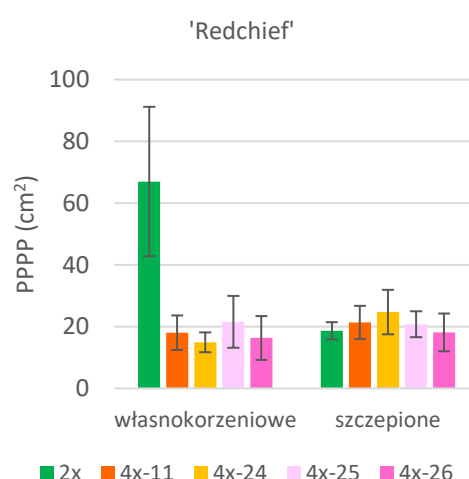
Temat badawczy 5. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni w fazie generatywnej.

- Formy tetraploidalne jabłoni charakteryzują się wydłużonym okresem juvenilnym, ich kwitnienie jest opóźnione w stosunku do form diploidalnych.
- Podkładka M.9 stymuluje kwitnienie i owocowanie drzew jabłoni w porównaniu do roślin rosnących na własnych korzeniach.
- Zaszczepienie odmian diploidalnych na karłową podkładkę powoduje zmniejszenie siły wzrostu drzewek, natomiast w przypadku tetraploidów odmian 'Redchief', 'Pinova' i 'Gala Must' – polepsza wigor roślin.

Intensywność kwitnienia i owocowania, 2025 r.



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

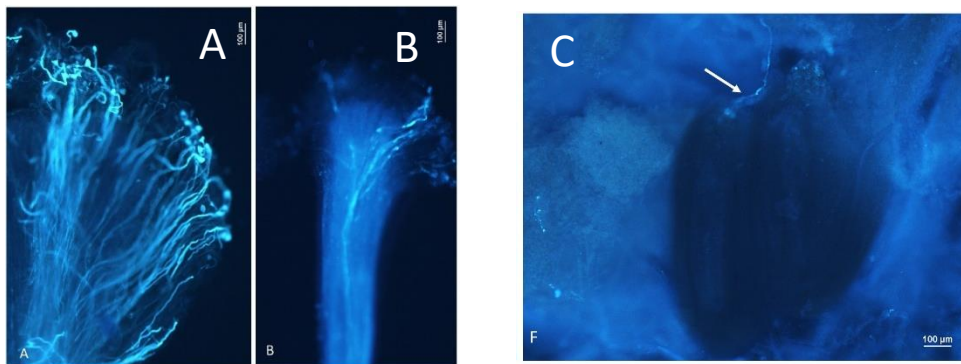


WYNIKI

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

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

- Poliploidyzacja powoduje zmniejszenie żywotności pyłku oraz jego zdolności do kiełkowania.
- W krzyżowaniach pomiędzy formami tetraploidalnymi oraz w krzyżowaniach interploidalnych występuje obniżona kompatybilność lub bariera fizjologiczna, co wpływa na wzrost łagiewki pyłkowej i potencjał zapłodnienia.
- Krzyżowania interploidalne pomiędzy formami tetraploidalnymi i diploidalnymi jabłoni pozwalają na uzyskanie żywotnych siewek.
- Siewki uzyskane z krzyżowań interploidalnych charakteryzują się dużą zmiennością pod względem siły wzrostu, zawartości chlorofilu oraz wielkości i gęstości aparatów szparkowych.



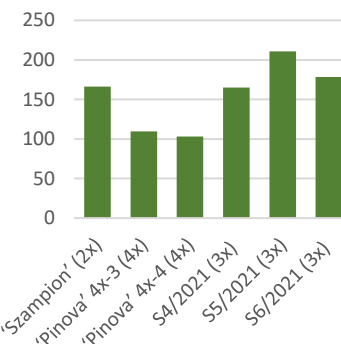
Mikroskopowe obserwacje kiełkowania ziarna pyłku na znamieniu słupka (A), przerastania łagiewek pyłkowych przez szyjkę słupka (B) i wnikanie łagiewki pyłkowej do zalążka (C).



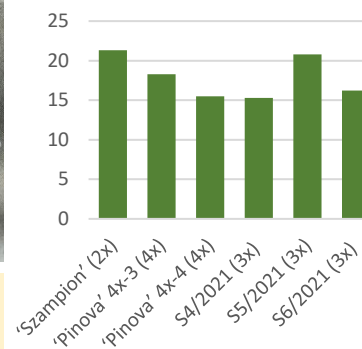
Zróznicowanie fenotypowe siewek triploidalnych z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3.

Aparaty szparkowe triploidalnej siewki mieszańcowej S5/2021 oraz jej genotypów rodzicielskich 'Pinova' 4x-4 i 'Szampion' 2x.

wysokość pędu głównego (cm)



średnica pędu głównego (mm)



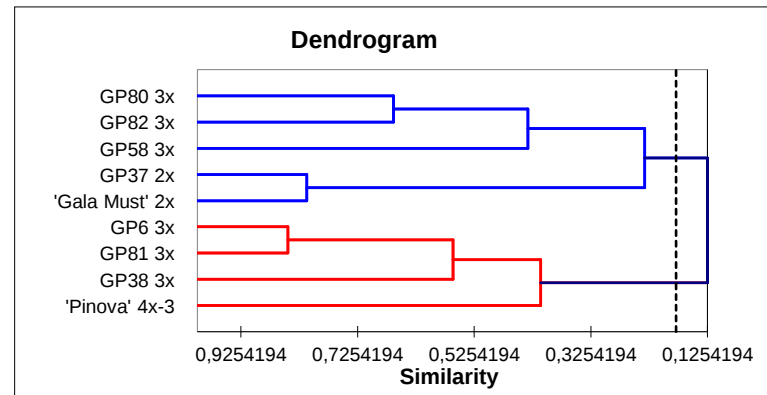
WYNIKI

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

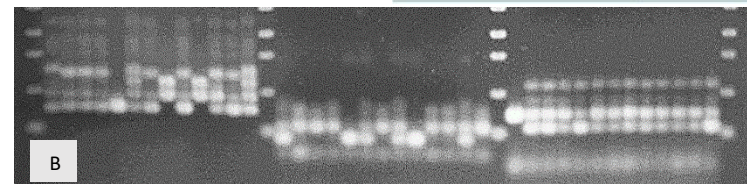
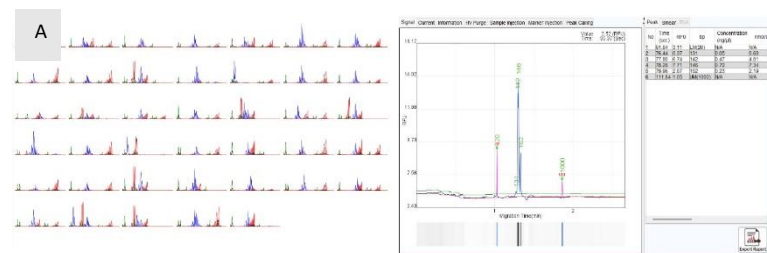
- Częstość uzyskiwania triploidów w wyniku krzyżowań interploidalnych jabłoni jest wysoka i wynosi od 83,3% do 98%, w zależności od kierunku krzyżowania.
- W oparciu o wyniki reakcji PCR-SSR z wytypowanymi starterami mikrosatelitarnymi potwierdzono mieszańcowy status genetyczny większości siewek jabłoni z badanych populacji.

Poziom ploidalności oraz zawartość jądrowego DNA siewek hybrydowych, uzyskanych z krzyżowania interploidalnego: 'Gala Must' 2x × 'Pinova' 4x-3 oraz ich genotypów rodzicielskich.

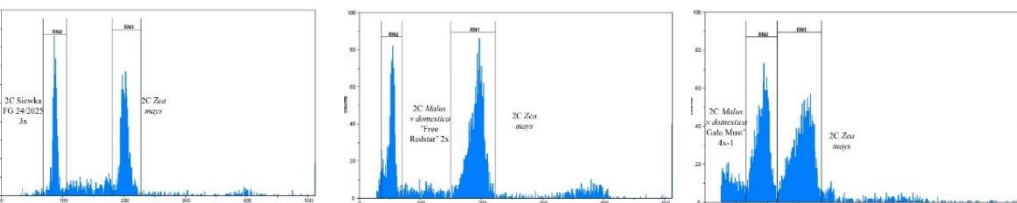
Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności
'Gala Must' 2x	1,63 ± 0,01 c	2x
'Pinova' 4x-3	3,22 ± 0,01 a	4x
GP6	2,31 ± 0,03 b	3x
GP37	1,60 ± 0,05 c	2x
GP38	2,23 ± 0,04 b	3x
GP80	2,28 ± 0,01 b	3x
GP81	2,30 ± 0,02 b	3x
GP82	2,34 ± 0,02 b	3x



Dendrogram podobieństwa genotypów potomnych z krzyżowania 'Gala Must' 2x × 'Pinova' 4x-3 oraz ich form rodzicielskich.



Rozdział alleli przy zastosowaniu automatycznego analizatora (A) oraz w żelu agarozowym (B).



Histogramy analizy cytometrycznej siewki triploidalnej FG24 oraz jej genotypów rodzicielskich 'Free Redstar' 2x i 'Gala Must' 4x-1.

Wykaz publikacji wyników projektu w 2025 r.

Doniesienia konferencyjne:

1. Wójcik D., Działkowska M., Broniarek-Niemiec A., Marasek-Ciołakowska A., Trzeciak J., Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Podwyszyńska M. „Przydatność poliploidów jabłoni do hodowli genotypów odpornych na porażenie *Venturia inaequalis*”. Konferencja naukowa krajowa: „Wyzwania współczesnego ogrodnictwa” oraz Jubileusz 55-lecia Wydziału Ogródnictwa i Architektury Krajobrazu, Lublin, 4-6 czerwca 2025 r. (poster).
2. Działkowska M., Wójcik D., Lewandowski M. „Ocena krzyżowalności tetraploidów jabłoni i charakterystyka uzyskanych hybryd”. LX Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, „Natura zmian... z botaniką w przyszłość”, Katowice, 29 czerwca – 4 lipca 2025 r. (poster)
3. Wójcik D., Działkowska M., Broniarek-Niemiec A., Sobiczewski P., Podwyszyńska M. “Studies on the increased tolerance of apple polyploids to biotic stresses”. 12 Konferencja Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin „Plantae vita sunt”, Warszawa, 9-12 września 2025 r. (referat)
4. Działkowska M., Wójcik D., Klamkowski K., Marasek-Ciołakowska A., Podwyszyńska M. „Polyploidization as a strategy to improve drought tolerance in apple trees”, publikacja przesłana do redakcji International Journal of Molecular Sciences, manuskrypt w recenzjach.