

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: 2022 rok - 12 miesięcy

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

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

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

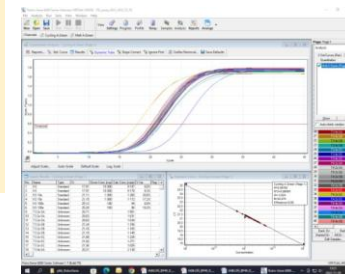


Temat badawczy	Cele projektu w 2022 roku	Czy cel został zrealizowany
1	Ocena podatności klonów jabłoni na stres suszy – porównanie reakcji fizjologicznych roślin diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) oraz ocena parametrów morfologicznych tych roślin w warunkach stresu suszy.	Tak
2	Badanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD) oraz badanie poziomu MDA i proliny w liściach jabłoni.	Tak
3	Analiza metodą qRT-PCR ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy w liściach jabłoni. Opracowanie kolejnych starterów do analiz.	Tak
4	Analiza różnic fenotypowych pomiędzy tetraploidami jabłoni (4x) a ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi (2x).	Tak
5	Polowa ocena kwitnienia i owocowania tetraploidalnych klonów i diploidalnych odmian jabłoni (form wyjściowych) oraz ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni.	Tak
6	Ocena siły wzrostu siewek otrzymanych z programu krzyżowań z udziałem autotetraploidów jabłoni.	Tak
7	Analiza poziomu ploidalności oraz potwierdzenie statusu mieszańca siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem tetraploidów odmiany 'Pinova'.	Tak

MATERIAŁY I METODY

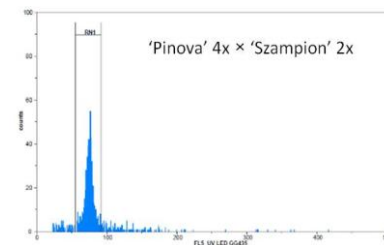
Temat badawczy 1, 2 i 3. Porównanie fizjologicznej i molekularnej odpowiedzi na suszę tetraploidalnych klonów 'Redchief' i 'Free Redstar' oraz ich diploidalnych form wyjściowych.

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.
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 6-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, zawartość chlorofilu w liściach.
2. Obserwacje kwitnienia i owocowania: termin i intensywność kwitnienia i owocowania, wielkość kwiatów, liczba kwiatów w kwiatostanie, plon, masa owoców, powierzchnia rumieńca.
3. Analiza wielkości pyłku, jego żywotności i zdolności do kiełkowania na pożywkach i znamieniu słupka oraz przerastania łagiewki pyłkowej.



Temat badawczy 6 i 7. Ocena fenotypowa i genetyczna siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem tetraploidów 'Pinova'.

1. Ocena siły wzrostu siewek: średnica i wysokość pędu przewodnikowego.
2. Cytometryczna analiza poziomu ploidalności.
3. Potwierdzenie statusu mieszańca siewek: analiza markerów SSR.

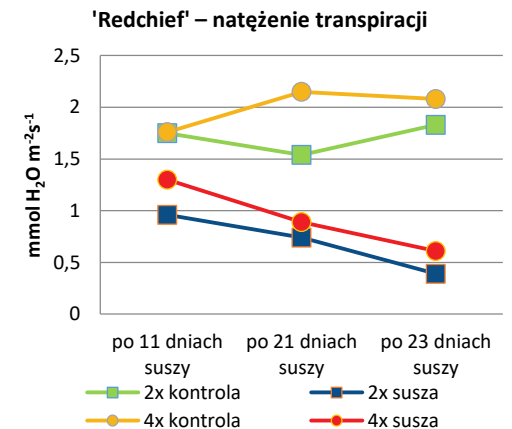
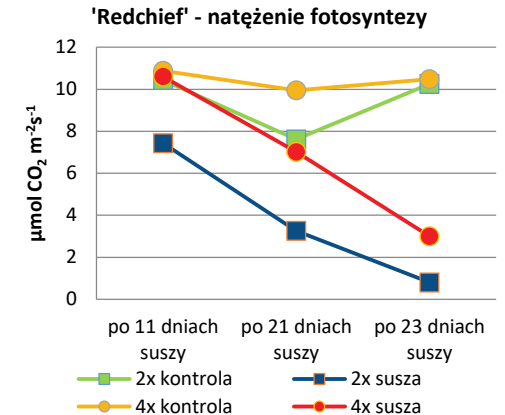


WYNIKI

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 'Free Redstar' charakteryzowały się lepszymi parametrami fizjologicznymi w trakcie suszy niż rośliny diploidalne tych samych odmian.
- W warunkach stresu wodnego, potencjał wody był wyższy w liściach klonów tetraploidalnych jabłoni 'Redchief' i 'Free Redstar' niż u diploidów tych samych odmian.
- Spadek wszystkich parametrów fizjologicznych: współczynnika zawartości chlorofilu CCI, maksymalnej wydajności reakcji fotochemicznej fotosystemu II (wyrażonej jako współczynnik Fv/Fm), natężenia fotosyntezy (Pn) i transpiracji (Tr) w liściach roślin poddanych suszy był mniejszy u tetraploidów niż diploidów 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.
- Zaobserwowano, że odmiana 'Free Redstar' charakteryzowała się znacznie lepszymi parametrami fizjologicznymi w warunkach suszy niż odmiana 'Redchief'.

Odmiana	Potencjał wody w liściach (MPa) po 23 dniach suszy			
	Diploidy (2x)		Tetraploidy (4x)	
	Kontrola	Susza	Kontrola	Susza
'Redchief'	-0,77	-2,84	-0,99	-1,88
'Free Redstar'	-0,76	-2,40	-0,74	-1,54

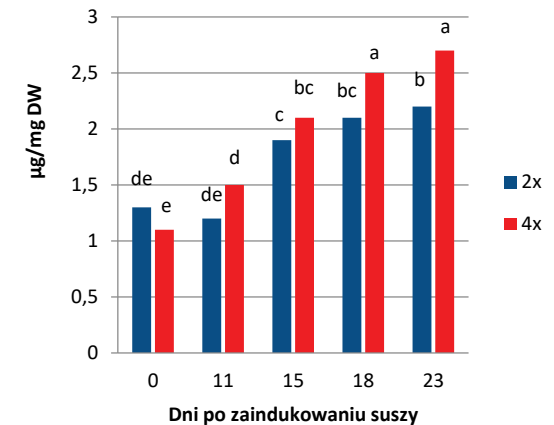


WYNIKI

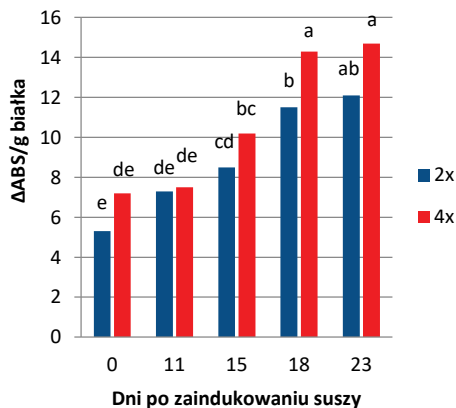
Temat badawczy 2. Badanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD) oraz badanie poziomu MDA i proliny w liściach jabłoni.

- Zarówno aktywność wszystkich badanych enzymów antyoksydacyjnych jak i zawartość proliny i MDA w liściach jabłoni 'Free Redstar' wzrastała w warunkach stresu wodnego zarówno u diploidów jak i tetraploidów. Podczas suszy u tetraploidów 'Free Redstar' poziom wszystkich badanych markerów był wyższy niż u diploidów tej odmiany.
- Wyższa aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz wyższy poziom proliny w liściach tetraploidów 'Free Redstar' świadczy o ich zwiększonej tolerancji na deficyt wody w podłożu w porównaniu z diploidami tej odmiany.

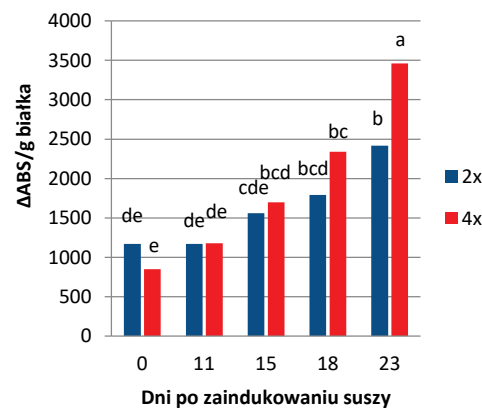
Zawartość proliny



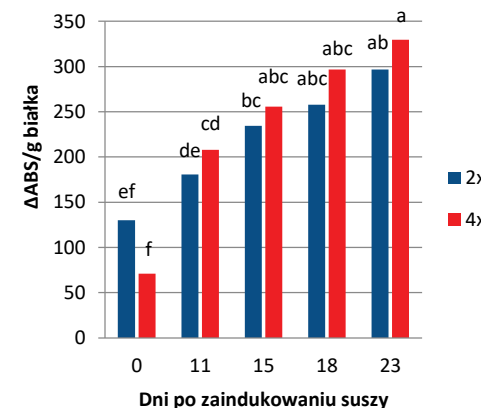
Aktywność SOD



Aktywność POX



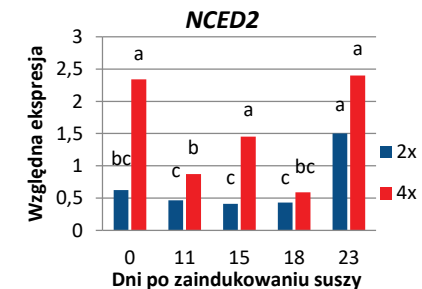
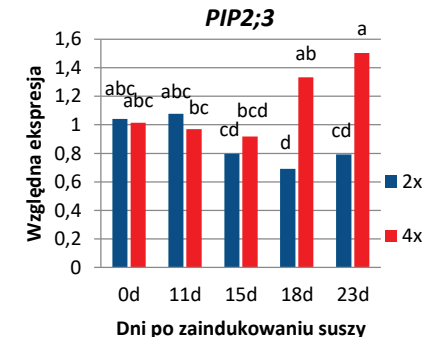
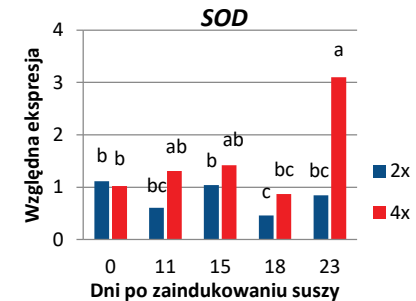
Aktywność CAT



WYNIKI

Temat badawczy 3. Analiza metodą qRT-PCR ekspresji genów związanych z odpornością na stres suszy w liściach jabłoni. Opracowanie kolejnych starterów do analiz.

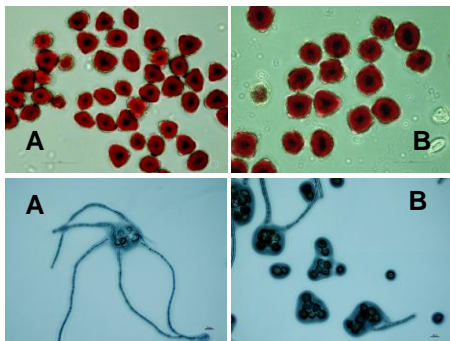
- Poziom ekspresji większości badanych genów, związanych z odpornością na stres abiotyczny, był wyższy u tetraploidów niż u diploidów jabłoni 'Free Redstar' rosnących w warunkach stresu wodnego. Podwyższoną ekspresję u tetraploidów w porównaniu z diploidami wykazano dla następujących genów:
 - *CAT*, *SOD*, *APX* i *GPX* (geny kodujące enzymy antyoksydacyjne),
 - *PIP1;1* i *PIP2;3* (geny kodujące akwaporyny),
 - *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 'Free Redstar' wskazuje na ich podwyższoną tolerancję na deficyt wody w porównaniu z diploidami tej odmiany.
- Spośród 14 par starterów, zaprojektowanych do analiz ekspresji genów metodą qRT-PCR, 8 okazało się przydatnych do dalszych badań.



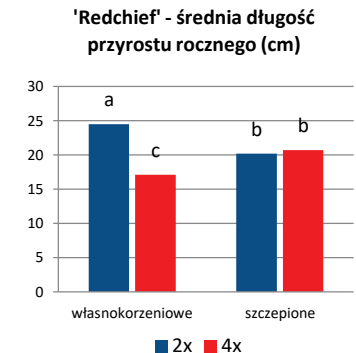
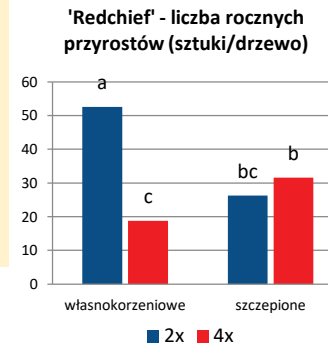
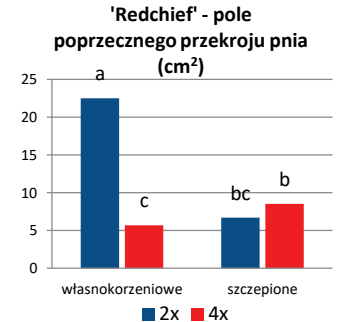
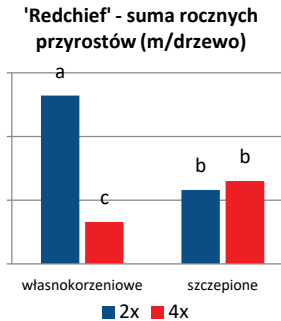
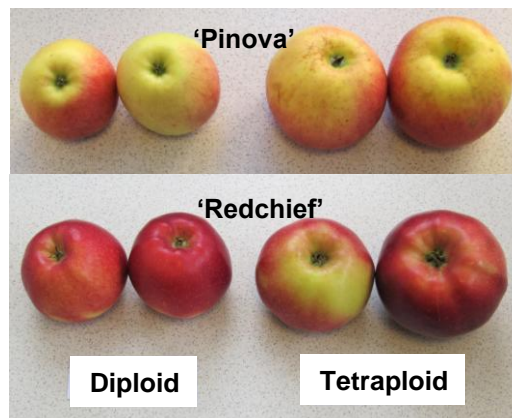
WYNIKI

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 badanych odmian, natomiast polepsza wzrost roślin tetraploidalnych.
- Tetraploidy w porównaniu z diploidami charakteryzują się wyższą zawartością chlorofilu w liściach, większymi kwiatami i owocami, mniejszą liczbą kwiatów w kwiatostanie oraz mniejszym plonem.
- Ziarna pyłku tetraploidów są większe niż diploidów, ale mają osłabioną żywotność i kiełkowanie.



Wielkość i kiełkowanie ziaren pyłku jabłoni 'Redchief'; A – diploid, B – tetraploid.

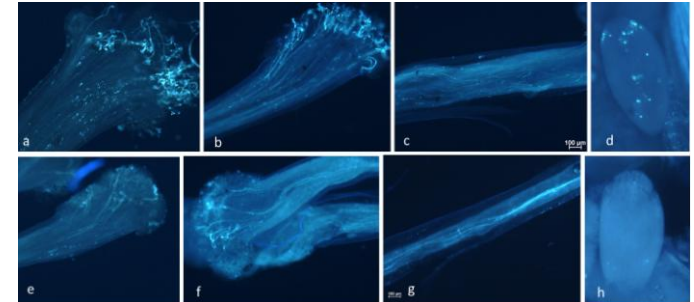


WYNIKI

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

- W przypadku krzyżowań interploidalnych w obu kierunkach krzyżowań ($2x \times 4x$ i $4x \times 2x$) kielkowanie pyłku oraz rozwój łagiewki pyłkowej są ograniczone. W kombinacjach krzyżowań z wykorzystaniem form tetraploidalnych większą zgodność krzyżową obserwuje się, gdy forma mateczna jest diploidalna.

Kielkowanie ziaren pyłku na znamieniu oraz penetracja słupka przez łagiewki pyłkowe; (a-d) 'Free Redstar'(2x) × 'Pinova' (2x); (e-h) 'Pinova' (2x) × 'Free Redstar' (4x-2).



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 juvenilnej tetraploidów jabłoni.
- Drzewka wszystkich odmian, zarówno diploidy jak i tetraploidy, zaszczepione na podkładce M.9 kwitły obficie niż drzewka rosnące na własnych korzeniach.
- Poliploidyżacja powoduje opóźnienie zakwitania roślin w ciągu sezonu wegetacyjnego o 2-6 dni.
- W 2022 roku zapylenia kwiatów form tetraploidalnych odmian 'Free Redstar' i 'Pinova' pyłkiem diploidalnej odmiany 'Szampion' było mało efektywne.



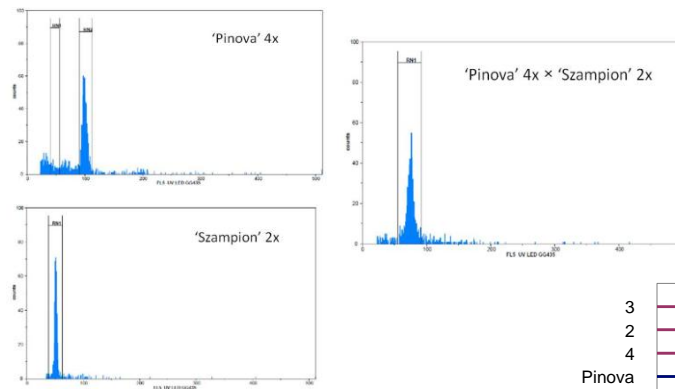
WYNIKI

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

Temat badawczy 7. Analiza poziomu ploidalności oraz potwierdzenie statusu mieszańca siewek uzyskanych z krzyżowań z udziałem tetraploidów odmiany 'Pinova'.

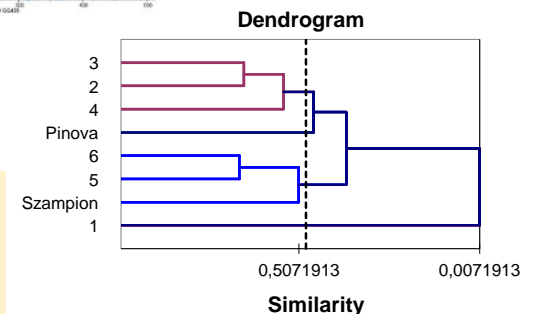
- Krzyżowania interploidalne pomiędzy tetraploidami 'Pinova' i diploidalną odmianą 'Szampion' pozwalają na uzyskanie żywotnych siewek.
- W wyniku zapylenia 57 kwiatów tetraploidów 'Pinova' pyłkiem odmiany 'Szampion' uzyskano 20 nasion, z których 6 wykiełkowało.
- Uzyskane siewki charakteryzowały się dużą zmiennością fenotypową.

- Krzyżowania interploidalne z udziałem tetraploidów odmiany 'Pinova' pozwalają na uzyskanie potomstwa o triploidalnym poziomie ploidalności. Analiza cytometryczna wykazała, że spośród 6 siewek uzyskanych z krzyżowań, 5 siewek było triploidalnych natomiast 1 tetraploidalna.



Siewki 'Pinova' (4x) × 'Szampion' (2x)

- W oparciu o wyniki reakcji PCR-SSR potwierdzono mieszańcowy status genetyczny uzyskanych siewek jabłoni. W przypadku siewek potomnych o numerach 2, 3, 4 zaobserwowano, że ok. 46% alleli markerów SSR pochodziło od odmiany 'Pinova', natomiast dla siewek o numerach 1, 5 i 6 od odmiany 'Szampion' (ok. 50%).



Wykaz publikacji wyników projektu w 2022 r.

Doniesienia konferencyjne:

1. Marat M., Wójcik D., Marasek-Ciołakowska A., Podwyszyńska M. 2022. Phenotypic differences between diploids and autotetraploid clones of apple (*Malus × domestica* Borkh.). 11th Annual University Research Symposium, The University of West Alabama, Livingston, AL., USA, 8-9 marca 2022 r. (poster)
2. Wójcik D., Marat M., Góraj-Koniarska J., Klamkowski K., Tomczyk P.P., Podwyszyńska M., Wójcik K., Treder W. Badanie reakcji odpornościowych autotetraploidów jabłoni na stres suszy (The response of apple autotetraploids to drought stress). LIX Zjazd w Stulecie Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Warszawa, 26 czerwca – 3 lipca 2022 r. (poster)
3. Marat M., Wójcik D., Marasek-Ciołakowska A., Lewandowski M., Podwyszyńska M. Ocena kwitnienia autotetraploidalnych klonów jabłoni odmiany 'Pinova' oraz możliwości krzyżowania z diploidalną odmianą jabłoni 'Szampion' (Evaluation of the flowering of autotetraploid clones of apple cv. 'Pinova' and the ability of their crossing with the diploid apple cv. 'Szampion'). LIX Zjazd w Stulecie Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Warszawa, 26 czerwca – 3 lipca 2022 r. (poster).
4. Marat M., Wójcik D., Marasek-Ciołakowska A., Buler Z., Lewandowski M., Podwyszyńska M., Tomczyk P., Filipczak J. Phenotypic evaluation of autotetraploid apple. Międzynarodowy Kongres Ogrodniczy - XXXI International Horticultural Congress: IHC2022IV, Angers, Francja, 14-20 sierpnia 2022 r. (poster)