

**BIULETYN** Nr 291 / 2020

ISSN 0373-7837

E-ISSN 2657-8913

**INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN**

**BULLETIN  
OF PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE**



**POSTĘP BIOLOGICZNY  
ARTYKUŁY NAUKOWE**

*Pole IHAR. Fot. Aleksandra Pindor*

RADZIKÓW 2020  
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY  
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

**BIULETYN  
INSTYTUTU HODOWLI  
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
NR 291/2020**



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY  
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: Prof. dr hab. Henryk Bujak

Komitety Redakcyjne

NAUKA

Redaktor Naczelny: Danuta Boros

Maja Boczkowska, Henryk J. Czembor, Renata Lebecka, Anna Linkiewicz, Wiesław Mądry, Katarzyna Mikołajczyk, Sławomir Podlaski, Barbara Zagdańska

WDROŻENIA

Redaktor Tematyczny: Wojciech Nowacki

Józef Adamczyk, Karol Bujoczek, Andrzej Chodkowski, Wiesław Dzwonkowski, Edward Gacek, Piotr Kamiński, Karol Marciniak, Przemysław Matysik, Juliusz Młodecki, Jarosław Mostowski, Adam Stępień, Roman Warzecha, Sławomir Wróbel

KONFERENCJE

Redaktor Tematyczny: Magdalena Szechyńska-Hebda

Katarzyna Gacek, Wiesław Podyma

Czasopismo ukazuje się od 1951 roku

Redaktor techniczny i skład komputerowy: Aleksandra Pindor

---

# Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ dla analizy regionów QTL sprzężonych z wybranymi cechami użytkowymi gatunku *Fragaria*.

Preparation of the mapping population derived from the cross of ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ suitable for analysis of QTL regions linked to selected *Fragaria* traits.

Sylwia Keller-Przybytkowicz<sup>1</sup>✉, Agnieszka Masny<sup>1</sup>, Bogusława Idczak<sup>1</sup>, Krystyna Strączyńska<sup>1</sup>, Abdelrahmen Mostafa Abdelwahab Mohamed<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,

<sup>2</sup> Minia University, Faculty of Agriculture, 61517 Elminia, Egypt,

✉ e-mail: sylwia.keller@inhort.pl

Celem przeprowadzonych badań było przygotowanie populacji mapującej uzyskanej w wyniku skrzyżowania odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’, przydatnej do badań genotypowo-fenotypowych, poprzedzonych sporządzeniem ‘szkieletu’ mapy genetycznej.

Pierwszym etapem badań była ocena molekularna roślin form rodzicielskich pod kątem stopnia polimorfizmu genetycznego. Na podstawie analizy wytypowanych 450 markerów SSR w genomie odmiany ‘Elsanta’ zidentyfikowano łącznie 418 alleli polimorficznych, natomiast w genomie odmiany ‘Senga Sengana’ – 337 alleli. Przeprowadzone badania potwierdzają wysoki stopień heterozygotyczności genomów obu wytypowanych do badań odmian.

Kolejnym etapem prac była analiza molekularna siewek uzyskanych w wyniku krzyżowania obu heterozygotycznych form rodzicielskich oraz ocena statusu genetycznego genotypów potomnych. Badania te potwierdziły, że w obrębie roślin populacji mapującej ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ występują genotypy pochodzące tylko z kontrolowanego zapylenia. Ponadto, analiza segregacji, w populacji mapującej, alleli heterozygotycznych, zidentyfikowanych w genomach form rodzicielskich, umożliwiła sporządzenie szkieletu zintegrowanej mapy obu badanych genomów truskawki. Wstępna mapa genetyczna, do sporządzenia której zastosowano wybranych 44 polimorficznych markerów SSR, zawiera łącznie 27 grup sprzężeń, na których zidentyfikowano loci 53 alleli polimorficznych, pokrywających 1 033 cM genomu truskawki.

W wyniku przeprowadzonych testów potwierdzono, że uzyskana populacja stanowi wartościowy materiał do badań związanych z opracowaniem mapy genetycznej truskawki. Ponadto, sporządzony ‘szkielet’ mapy ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ poszerza bazę do dalszej lokalizacji genów i identyfikacji regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.

**Słowa kluczowe:** allele heterozygotyczne, genom *Fragaria*, mapa genetyczna, SSR

The aim of the study was to generate a mapping population derived from an ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ cross, so as to be useful for genotypic-phenotypic studies, and subsequently, to construct a ‘skeleton’ of the strawberry genetic map.

The first stage of the research was based on molecular assessment of parental plants for genetic polymorphism. After analysis of 450 selected SSR markers, 418 polymorphic alleles were identified in the genome of the ‘Elsanta’, and 337 alleles in the genome of the ‘Senga Sengana’. The study confirms the high degree of genetic heterozygosity of both of the strawberry varieties.

In the next stage of the work, molecular analysis of seedlings resulted from the cross of the heterozygous parental forms, as well as the confirmation of genetic status of hybrid genotypes were conducted. These studies confirm that the origin of the prepared mapping population was the result of the controlled pollination. Moreover, segregation of heterozygous alleles in the mapping population enabled the preparation of the ‘skeleton’ of an integrated map of ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’. Herein, the initial genetic map was found to contain 27 linkage groups representing the loci of 53 polymorphic allele, covering 1 033 cM of the strawberry genome.

Generally, as a result of the tests, we confirmed that the obtained population represents valuable material for research related to the development of a strawberry genetic map. Additionally, the ‘skeleton’ of ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ genetic map enlarged the database for further gene localization and for identifying QTL regions linked to important strawberry traits.

**Key words:** *Fragaria* genome, genetic map, heterozygous alleles, SSR



## Wstęp

Truskawka (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) jest ważnym gatunkiem uprawianym niemal we wszystkich szerokościach geograficznych. Na świecie produkuje się rocznie około 9 mln ton owoców truskawek, w tym połowę w państwach europejskich (FAOStat, 2019).

Hodowla twórcza gatunku *F.* × *ananassa*, ukierunkowana jest na wytwarzanie odmian, o najkorzystniejszym zestawie cech fenotypowych, przystosowanych do zróżnicowanych warunków uprawy (takich jak: zasolenie), różnych warunków agroklimatycznych (tj. mróz, susza), zróżnicowanej presji czynników biotycznych (np: choroby grzybowe tj. wertycylioza, antraknoza) i abiotycznych, jak również do zróżnicowanych preferencji konsumentów (jędrność i trwałość owoców, zawartość kwasu askorbinowego czy cukrów) (Darrow, 1966; Hancock, 2008).

Badania genetyczne, wspierające światową hodowlę tego gatunku, pozwoliły na zidentyfikowanie molekularnych markerów m.in. cech związanych z jakością owoców, zakwitaniem czy odpornością na patogeny. Dla wielu z nich, zidentyfikowano także loci/miejsce na fragmentarycznych mapach genetycznych różnych genomów tego gatunku (Denoyes-Rothan i in. 2004; 2005, Sargent i in. 2011, Sargen i in. 2012).

Na podstawie doświadczeń genetyczno-hodowlanych stwierdzono zarówno monogeniczny (odporność na fytoftorozę i alternariozę), jak i poligeniczny charakter dziedziczenia cech użytkowych truskawki (Lerceteau-Kohler i in., 2002). W wyniku addytywnego (poligenowego) współdziałania genów ma miejsce kumulacja ich alleli w genomie, a każdy genotyp wykazuje inną charakterystykę fenotypową, zależnie od własnego potencjału genetycznego (Semagn i in., 2006; Hancock i in. 2008). Ma to szczególne znaczenie podczas prowadzenia badań, których celem jest sporządzanie map różnych genomów. Wówczas warunkiem przystąpienia do takich prac jest uzyskanie odpowiedniej puli roślin potomnych tzw. populacji mapującej, (przyjmuje się min. 100 – 150 genotypów mieszańcowych), w obrębie której wszystkie genotypy pochodzą z zaplanowanego krzyżowania, a formy rodzicielskie reprezentują wysoki stopień heterozygotyczność (Liebhard i Gessler 2000). Podejście takie daje pewność prawidłowej analizy segregacji zidentyfikowanych alleli markerów molekularnych, przydatnych do wysycaania map genetycznych. Właściwy dobór i przygotowanie materiału roślinnego są zatem kluczowymi etapami w badaniach nad identyfikacją regionów genomu warunkujących

ważne cechy użytkowe gatunku *Fragaria*.

Celem prowadzonych badań było przygotowanie populacji mapującej, przydatnej do utworzenia 'szkieletu' mapy genomu i identyfikacji regionów genomowych (QTL) sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki takimi jak: odporność na choroby wywołane grzybami (*V. dahliae*, *Colletotrichum acutatum*, *Phytophthora cactorum*); jakość owoców (zawartość substancji prozdrowotnych); odporność na czynniki abiotyczne tj; tolerancja na niskie temperatury czy deficyt wody) .

## Materiały i Metody

Materiał do badań stanowiły rośliny mieszańcowe, uzyskane w wyniku krzyżowania roślin rodzicielskich odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (CP – *cross polination*). Wybrane formy rodzicielskie skrajnie różnią się pod względem wielu cech, w tym podatności na czynniki biotyczne i abiotyczne oraz jakością owoców (Van Ooijen 2002, Masny i in. 2002).

### Przygotowanie materiału roślinnego

Nasiona, uzyskane w programie krzyżowań (2014), po wysuszeniu i stratyfikacji wysiewano do doniczek wypełnionych mieszaniną substratu torfowego i piasku w stosunku 3:1. Pozyskane tym sposobem młode siewki potomne (200 roślin), stanowiące populację mapującą, w fazie minimum dwóch liści przesadzono do tac wielodoniczkowych (54 komórki o wymiarach 55 × 55 × 62 mm i objętości 90 cm<sup>3</sup>). Rośliny utrzymywano w szklarni. Następnie uzyskane młode siewki wysadzono w kwaterze polowej. Systematycznie prowadzono prace uprawowo-pielęgnacyjne, jak nawadnianie i nawożenie uzyskanych roślin, spulchnianie podłoża oraz zwalczanie chorób i szkodników (Program Ochrony Roślin, opryski na mączniaka; Signum 33 WG, przedziorka chmielowca; Nissorum Strong 250 SC oraz inne szkodniki i patogeny zagrażające uprawie), obejmujące zarówno formy rodzicielskie, jak i mieszańce F<sub>1</sub>.

Dodatkowo, z roślin matecznych pobierano i wysadzano młode sadzonki rozłogowe celem utrzymania puli tych samych genotypów mieszańcowych, które następnie stanowiły materiał do doświadczeń fenotypowych.

### Materiał do badań molekularnych

Izolacje genomowego DNA form rodzicielskich 'Elsanta' i 'Senga Sengana' oraz 200 roślin populacji mapującej przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Doyle i Doyle (1990). Tkankę liściową (0,2 g) ucierano w ciekłym azocie, zawieszano

w buforze ekstrakcyjnym CTAB i inkubowano w temp. 65 °C przez 30 minut. W celu dokładnego odseparowania fazy wodnej (zawierającej kwasy nukleinowe) zawieszinę rozdrobnionej tkanki mieszano z równoważną ilością roztworu chloroform/alkohol izoamyłowy (24:1 v/v) i wirowano (15 000 g). Następnie uzyskane DNA wytrącano alkoholem izopropylowym (1:3 v/v), suszono w temperaturze pokojowej i rozpuszczono w buforze TE. Częsteczki RNA wytrawiano stosując RNazę A (10 µg ml<sup>-1</sup>, 37 °C/ 1 h). Czystość preparatów DNA oceniano na podstawie elektroforegramów w 0,9% żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki, przy długości fali 230, 260 i 280 nm (Gene Quant Pro Amersham Pharmacia Biotech). Koncentrację DNA w preparacie określano poprzez porównanie z DNA faga λ o znanych stężeniach (315, 157 i 79 ng µl<sup>-1</sup>).

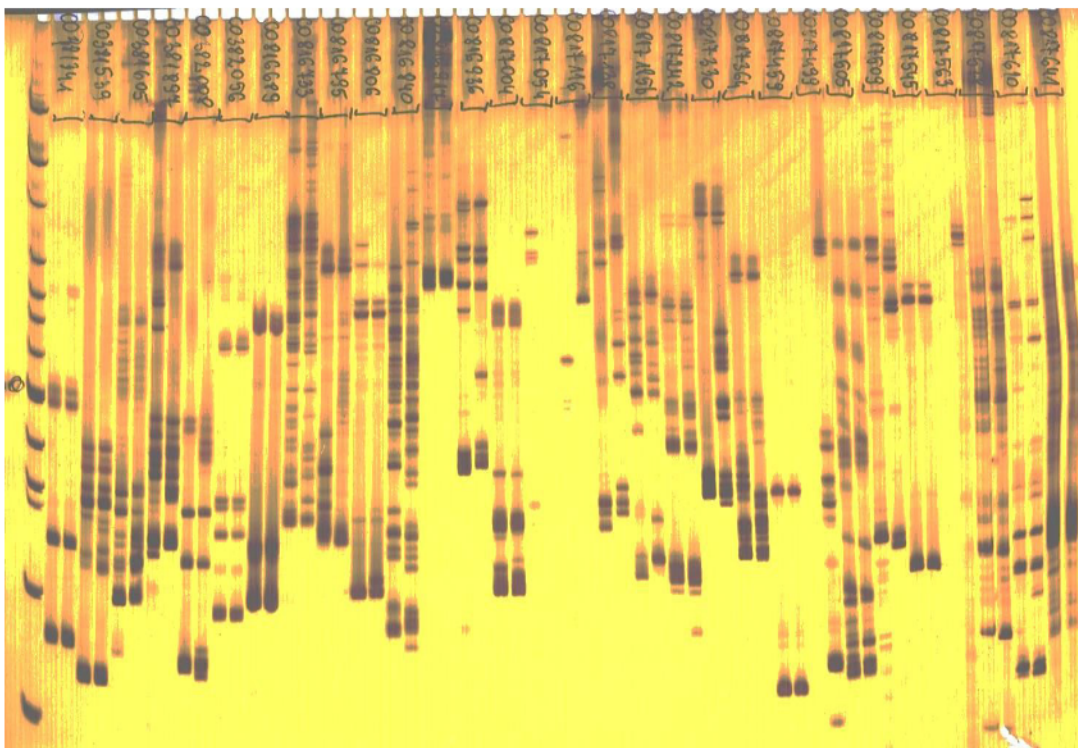
#### Amplifikacja alleli polimorficznych (SSR-PCR)

W oparciu o bazę sekwencyjną GDR (Genome Database for Rosaceae, [www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) dla rodzaju *Fragaria* oraz na podstawie dostępnych danych literaturowych, zsyntetyzowano i przetestowano w reakcjach PCR, 450 par starterów mikrosatelitar-nych.

Mieszanina reakcyjna (13 µl) zawierała 5 ng DNA – wyizolowane z odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' oraz genotypów potomnych uzyskanych w wyniku ich krzyżowania, 0,325 U polimerazy (Ampli Taq, Applied Biosystems), 10 × PCR-bufor II z 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM dNTP (Applied Biosystems) i 0,35 µM starterów SSR. Reakcje Touch-down PCR prowadzone były w zoptymalizowanych warunkach termicznych: 94°C – 30 s, 55°C – 45 s, 72°C – 60 s/10 cykli, 94°C – 30 s, 50°C – 45 s, 72°C – 60 s/25 cykli. Wygenerowane amplikony rozdzielano w 7% żelach poliakrylamidowych, które następnie wizualizowano w świetle białym po wybarwieniu w 0,4% roztworze azotanu srebra.

#### Określenie położenia (loci) markerów

Badania przeprowadzono na matrycach DNA wydzielonych z form rodzicielskich oraz z 200 roślin należących do populacji 'Elsanta' × 'Senga Sengana' o potwierdzonym statusie mieszańca. Do sporządzenia szkieletu mapy genomów obu odmian wytypowano zestaw markerów dostępnych w bazie danych ([www.rosaceae.org](http://www.rosaceae.org)) oraz opisanych dla map genetycznych dzikich gatunków *F. nubicola*, *F. vesca* oraz odmian 'Redgauntlet' i 'Hapil'.



Rys. 1. Wzory prążkowe (reprezentują parę obu form rodzicielskich) przedstawiające wielkości alleli zidentyfikowanych dla 30 przykładowych markerów SSR, różnicujące genom odmiany 'Elsanta' (I ścieżka z pary) oraz 'Senga Sengana' (II ścieżka z pary).

Fig. 1. Band patterns (in pairs of both parental forms) representing the alleles identified for 30 SSR markers, differentiating the genome of 'Elsanta' (1st path from pair) and 'Senga Sengana' (2nd path from pair) cultivars.



Amplifikację specyficznych fragmentów DNA prowadzono zgodnie z w/w procedurą.

Do sporządzenia 'szkieletu' mapy genetycznej 'Elsanta' × 'Senga Sengana' użyto 44 markerów SSR (ARFL002, ARSFL022, EMFn017, BFACT004, EMFn214, ARSFL011, FvH4180, FvH4153, FvH4164, FvH4160, FvH4154, ARSFL100, UDF009, BFACT017, BFFv09-11-02, EMFv018, CO816733, EMFv007, EMF132, FvH4163, BFACT045, FvH4169, BFACT036, UDF001, FvH4161, FvH4155, FvH4177, FvH4165, FvH4173, CFVC0316, BFACT002, ARSFL015, EMFn213, CFVC111, ARSFL012, CFVC015, BFACT003, FvH4171, COBRA, CO817054, BEFv14-29, EMFn049, FvC103, EMFn021).

Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji touch-down PCR były takie same dla wszystkich par oligonukleotydów (temperatura annealingu w zakresie od 60°C do 55°C – 10 cykli, spadek temperatury 0,5°C na cykl), natomiast w przypadku markerów z grupy ARSFL, przez pierwsze 10 cykli temperatura malała o 0,5°C (z 55°C do 50°C). Ostatecznie końcowe przyłączenie oligonukleotydów prowadzono w stałej temperaturze 55 i 50°C.

Szkielet mapy skonstruowano przy użyciu oprogramowania JoinMap v.3.0 (Biometrics, Kyzama NL) (van Ooijen i Voorrips 2001). Typ segregacji alleli badanych markerów genetycznych w populacji mapującej weryfikowano testem  $\chi^2$  na podstawie

wartości odchylenia pomiędzy ich rozkładem teoretycznym (mendlowskim) i obserwowanym. Przynależność markerów do poszczególnych grup sprzężeń określano na podstawie wartości progu LOD (Logarytm Odd Ratio) >3.0. Odległości mapowe zostały oszacowane przy użyciu funkcji mapującej Kosambi. Uzyskane grupy sprzężeń przedstawiono w formie graficznej, za pomocą z programu MapChart 2.1.

## Wyniki

### Ocena stopnia heterozygotyczności genomów odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'.

W testach PCR, przeprowadzonych na matrycy DNA roślin 'Elsanta' i 'Senga Sengana' z 450 parami starterów mikrosatelitarnych, produkty polimorficzne uzyskano dla 228 z nich (Tab. 1). Łącznie przeprowadzono 3 532 reakcje SSR-PCR.

Wyniki amplifikacji fragmentów genomów uzyskanych na matrycy DNA z roślin 'Elsanta' i 'Senga Sengana' z 30 przykładowymi starterami mikrosatelitarnymi przedstawiono na poniższym elektroforogramie (Rys. 1). Wielkości zidentyfikowanych alleli polimorficznych, różnicujących formy rodzicielskie, oraz sekwencje zastosowanych do reakcji PCR oligonukleotydów zestawiono w tabeli 1.

Liczbę alleli heterozygotycznych zidentyfikowanych w genomach obu form rodzicielskich przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 1

Table 1

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
1	FvH4004	480, 600	300, 560	cccagatctccctacctttacc	agttctacccccctttcagacc
2	FvH4005	270, 275	-	teaagttacgtcgcttacatgg	ttgctgtttcaagaccactagc
3	FvH4006	290, 350	270, 315	cgagtactccaccttcaattcg	atgagagatcttccgtcgtagg
4	FvH4009	480	450	ttgctgtttccagtttgaga	ccaaagggactggtggtaaa
5	FvH4014	150, 400	130, 300	tgacctcaatctttgaacc	atccctactcaaacctcagc
6	FvH4019	200	220, 600	catctcagttggatcagaatcg	caagggaatcaaggatcatagcc
7	FvH4022	-	200, 560, 565	agttctggaactgcttttaggc	acacaagcacatacccaaaacc
8	FvH4023	595, 600	-	tactgggggcaatatgtttgg	gccccctgtaactctactgg
9	FvH4025	260	-	gttcagttgagagccataatgc	gaatgatgaaaggcagctaagg
10	FvH4031	520	-	tctcacctcatccaaatcttc	agtggaatggttctcttttgg
11	FvH4033	150, 190	110	ctccacaaactaataccaacg	gacgacgacttctcaaacg

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
12	FvH4041	200, 250	220	cagctgcatctattgactcgg	cgagctcaactctctctaccc
13	FvH4042	280	-	aacaggagcttatacggaaatcg	aggagctcaatctcatcatcg
14	FvH4049	250, 260	-	acggctactctagggagatgg	ctctccaccctttgcattagc
15	FvH4050	185, 200	210	tagcatccatagttccatacgc	caatacaatctcccaactcacc
16	FvH4052	170, 175	320	caagaggtcgttaggtgaaatg	gtgttcaagcccagaaatgatg
17	FvH4056	-	450	gggggtattttgaagtgtaacg	gcgaaaaatfatgagaggagagagg
18	FvH4057	200, 225, 280, 310	235, 240, 300, 380	agtttgaccgggtcaagagg	agctctctccctcacaacg
19	FvH4058	220	-	gtagagaaagcagtggatgacg	gggcatctacacatgttgacc
20	FvH4059	450	-	gacacatagagcaacagtataggg	ttgttagcatgaagtgcacaagc
21	FvH4061	-	200	accaactccatactccacaagc	gcctccctctctagctcttcc
22	FvH4082	-	495	cggtttacctaactccaactgc	cctgcaagaatctctactgtcg
23	FvH4083	360, 600	300, 470	aattgggggtgtgacaatgc	gcttcaaatftggagctctgg
24	FvH4086	-	600	acacccaagcaaatfacagg	tgctatttaggcaactccttcc
25	FvH4088	-	400, 450	cctcagcttaacgaacgaacc	tagagagagcaccgactcaagg
26	FvH4090	320	330	cagttgatgtgtgctgagtc	agttttgtttcactcttttgg
27	FvH4091	220, 300, 400	200	tcaccggctcctctttatagc	taatttcttgacggacgttcg
28	FvH4102	600	610	tttcttttggtgaaaactcc	tcataaggaagctttatcatacc
29	FvH4104	240, 250	510	agactgctcatcctctcttggc	atcatgggagagaacattaggg
30	FvH4105	-	320, 330	cgttgagatctggtaaactcc	taacctcccctgtaaatcc
31	FvH4106	155, 215	220	tacaaggactgcctcttagg	tcactttgctgctcatatcc
32	FvH4112	265, 320, 330	210, 460	tttcaacaaattaaggcaaacg	gccatagaaaaccagaaaaacc
33	FvH4113	125	110	tgactagcaatagtgcaacagc	cggcagagaaccagtaagc
34	FvH4114	200, 380, 400	-	gcagcatgagagacaagatgc	gftagcagaagggaatgaacc
35	FvH4116	290, 405	380	ggacattgaccaagcattttacg	tacggctcaggaagattgagacc
36	FvH4117	295, 305	300	actttgcttgctagttgtcg	gagggtcttgagctcaagtgc
37	FvH4121	400	-	tacacagtgacatagccgatgc	gtcctaggttctctgttctcc
38	FvH4123	240	245	gftgaagcaacttgaatgc	ggaggacaactccaatttatgg
39	FvH4124	240, 285	385	gcacagttccatcagttttca	acaattgatcccttggaattg
40	FvH4127	180, 200, 385	170, 195, 485	accaccacaactagtctctgc	tcctaaagtttctctccatcc
41	FvH4131	135	-	cagactcagcagagtgattgg	ctaattgcccgatcttctcc
42	FvH4134	100	-	aagtgaaggagggaagaagg	gcttcataaaacagccactgc
43	FvH4136	190, 580, 600	-	ttctgatcaagctaggaatgc	ccttggtgactctcaaacctg
44	FvH4145	205, 280, 410	300, 420	aaagtcttggggagtaaaagg	ggtacatggtgatgtgtcatcc
45	ChFaM 149	-	165, 595, 600	ccctctcccgtaaagtcca	cggactcaccggtcactaga
46	ChFaM 262	400	-	actcggtaggaaagacgaa	agagaagaccgctgaggatg
47	ChFvM 232	320	330	gcttcttgggacagcaacac	tgaacctgcaattctctctg
48	ChFvM 243	330	340	tctttctcgtcactgtca	aaacaaaggaaaggctggtg
49	ChFvM 245	-	510	tcaaccacaccgctactcct	cttctgagctcgtccttctg
50	ChFaM 009	410	-	tccaagttccagagctcctt	cgtgcagctcagacatgaaa
51	ChFaM 010	200, 580	210	tatcgctgcaattcatctg	gctggctctgaggatgagt
52	ChFaM 011	95, 300, 360	80, 90, 210, 270	tctctcctcttttccctca	cgagatctcccagactgag
53	ChFaM 017	80, 90, 160, 250, 295	415	ctcactctctcgcaacttgc	caactcacctgaccagatt



Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
54	ChFaM 022	185, 200, 495	-	gggcactcactcttca	ttggccttgagactcgat
55	ChFaM 026	100	-	tgtctctcgtttctctaaaagc	atcaagtctcgtccacgta
56	ChFaM 030	300, 335	-	ccatgaagcagtgaggtcca	agaaaatcccagagacttt
57	ChFaM 031	300, 310	200, 210	gctagcaaaagccctaaagcaa	acgggtggcacaactaaaga
58	ChFaM 032	-	410	ggctcctgcttctcttcttt	ttcagccccattttccagta
59	ChFaM 033	110, 505	115, 510	cacaaatccacacacagcag	cccaggaaggtaacacaaa
60	ChFaM 036	130	135	gcagcctcaagaagtgaagg	ccatctgatatcacaggcataa
61	ChFaM 037	505	-	acgacgatcaccacaaggac	aagctcctgctttctcttt
62	ChFaM 040	-	205, 300	agtgtctcatcagcaccatca	taaccgggaacggctactctg
63	ChFaM 041	185	180, 280, 490	ccacacgaaggagagaaggaga	aactgtctcattcaccacaaa
64	ChFaM 044	170, 615	165, 310, 410, 595	cgtcgtcgttcttaatttca	ttttgttgacgagcagatg
65	ChFaM 046	195, 300, 310	-	ccatttccatggccttgttt	ggccttgttggctctgagag
66	ChFaM 047	235	200, 215, 240, 260	tcatttctctcccctcgat	gatgtgattacggcgaagg
67	ChFaM 056	195, 260	265, 510, 600	aaaacgtcgtctcaggat	cgtactcgtctgctcctgt
68	ChFaM 058	140, 195, 205, 210, 300, 420, 500	550, 560, 580	gaccaaacacaccctgaac	ctccccattctgggaaatct
69	ChFaM 060	165, 550, 560, 580	280, 590, 610	tgagctaccaccaagaacc	aatacccttggtaccctcg
70	ChFaM 063	120, 300	125, 195	gacgtctccgatccgttgat	ctgctcgcgtacgacttcc
71	ChFaM 064	285	190, 280	caccaactcgcacaacctca	gactctctttggcgagctg
72	ChFaM 065	220, 245, 250, 265	200, 250	gaccgggagagataacagca	atagaagccaatgcgtgatg
73	ChFaM 066	110, 590	115, 280, 310, 580	attttggccacgaagaattg	cgatgtcaggaacgaactga
74	ChFaM 068	420	200, 425	catctccagttccttggctc	acgaccattctcttctca
75	ChFaM 070	280, 630	-	agcattgaattcccattttg	ccttcagcaggaactaagg
76	ChFaM 072	385	-	tggcagaaattccaaaagg	ctccccagaagtcagatt
77	ChFaM 077	250, 320, 400, 440	270, 300, 395, 410	gaaaggcctggacatggata	atgtgtatttggcctcct
78	ChFaM 078	245, 285, 290, 300, 315, 390, 410	235	cagcctcattgcaaatctga	cttaccggttcgatgtggt
79	ChFaM 080	530, 560	160, 540	ttcgggtccggtaaagatac	aagttccaccacatgcaat
80	ChFaM 081	-	295, 300, 310, 340, 415	aactgagctctcggcaagtc	gaatactcgcggaggaagtg
81	ChFaM 082	230, 235	220, 245	agtacggcaattgaagctcg	gatctcggttgaagatcgg
82	ChFaM 083	220, 250	-	tttctgcttttgattgg	gcacttttcatcacaggca
83	ChFaM 086	280	225	tttgagctcaatccatctg	atttgccagcctcctctct
84	ChFaM 088	660	140	ggtggcaaaactatggaga	gggaagcgaagttgaagagg
85	ChFaM 092	110	-	acceaaagtcccttgactc	atgcctttgcataacaggt
86	ChFaM 093	285, 290, 300, 390, 395	-	cgccctcaaatccctctaac	gaagtgagtgctcctgct
87	ChFaM 094	180	175, 185	atggaggcgcctactgaaaa	aatggcgagcttgactttc
88	ChFaM 095	210	-	gccagaagcaaaaaccagaa	gggaagttgaaattgcgga
89	ChFaM 097	275, 325, 250, 400, 450, 470	265	gccaaaaggttgcttcttga	gccattttggaagaggtgaa
90	ChFaM 098	305, 495, 520	205, 215	gtgagagtcagcccacccta	gcgacgaggtatgaagaagg
91	ChFaM 100	100, 170	120, 190	ttggaaccagaaaatcgaa	cagcggagagagaaacaagg
92	ChFaM 101	150, 500	220, 240, 520	ggagtaagctgatcactctgt	actccgagcgtgaaatccct

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
93	ChFaM 105	170, 180	160, 175	cctccaaacacaatccacca	tctgaggtttatgcccggact
94	ChFaM 106	170, 190, 230, 335	120, 410	accaaccgagcgcgagagag	cgctcatctgccacctgcttc
95	ChFaM 107	-	500	tgccaaacaacaatgttga	catatcgatgtcctcataggg
96	ChFaM 108	520	170	catggaaagagagcgaagc	cgaggaaatgaggagggaatc
97	ChFaM 109	-	420, 450	aagctgcttgcgaagaacaa	ggctgatgccatccattta
98	ChFaM 110	310, 605, 615	-	tttctcttgggtgttttg	ccagagaaagccatttaggc
99	ChFaM 111	145, 180	135	gcccaaccgagtctctctct	cgggcttcaatttgcctaat
100	ChFaM 112	495	485	ttcaagcttttctctctctc	catcttcaactgaccctct
101	ChFaM 114	-	145, 275, 495	tgtgtgccttggtttaciaa	cgctctctctctctaatcc
102	ChFaM 115	460, 480	280, 285	cctcggctcttctctctttg	accacactgacaggacgatg
103	ChFaM 120	130, 200, 210, 420	255, 300, 320, 330	ggfttcatcagagggcgtctt	taaagctcccagcaggcatt
104	ChFaM 122	245, 255, 260	-	gactcagctctctccagtggt	tgatattgagcaacgggtga
105	ChFaM 126	270	-	gttagggagtcgggaatga	ttccaatcccactgacgac
106	ChFaM 129	195	-	agatcaacatcgctccaac	tgctcgttgcataacctg
107	ChFaM 130	240, 260, 300	195, 310	gccagtcacaagaagccaaa	tgctctgaaaccccttatctg
108	ChFaM 144	390,	-	cagctcttggctctctcttc	cggagcagattttctggag
109	ChFaM 146	170	150, 155	acgaggggaagaatfgagcac	agatggtcctgactggatgg
110	ChFaM 147	350, 360	-	acgaggggtcacctgagactg	ccaggagaagggtaccgaagg
111	ChFaM 148	-	210	ccctccatcaaagccagtt	cattagaccccagcttgtca
112	ChFaM 151	200	-	accaccaccgttttctctc	accaccagctcgtctctt
113	ChFaM 159	285	-	tctctctatcgccccagag	accatccacaggggtcttg
114	ChFaM 160	-	300, 480	ccactcccaaaagagcaca	ctgctccacaatctcacc
115	ChFaM 161	210, 510, 615	270	cgaggccttgtcttcttgt	gcccagggtagctgtgtgac
116	ChFaM 163	150, 265	155	ttcgggtcttattgctttga	ttcaattccgaagccacaac
117	ChFaM 164	235	200	cactcagccagatccagagc	gcccgaaggatggtcttaaf
118	ChFaM 174	140, 175	160, 195	gagggagatggcacggagat	ctccggcattgaaatcgaga
119	ChFaM 177	245, 265, 400	-	cctgcagagtgcaagagaga	cactcacaaggcatgagagcta
120	ChFaM 178	165, 280, 325	320	aaacgaagaaggaggttca	agctgtgcagggtttatgt
121	ChFaM 194	-	175, 195	cccttcttggcagtcattt	ccatcccacagttgtctc
122	ChFaM 196	-	305	cctctacctcttctctctaaa	agcgcgatgagctgctgtta
123	ChFaM 203	480	-	cgagggtcacgctactaaa	tgagatgaccaatccgaaaga
124	ChFaM 209	-	295	ccccaaaacctctattct	atcattccaagccactgtc
125	ChFvM 028	168, 505	170, 507	aatggcatcaactctgcac	cagcctgctgctgtagtct
126	ChFvM 049	-	500, 505	atggttggatcaatggtg	ttcatatgcaattgatggaac
127	ChFvM 087	280, 295	300	gaaaggggaagccttttcat	tgggacgaaagtcccaata
128	ChFvM 125	-	150, 520	gcgactgccatcftaaccta	tctcaatgttttcccaag
129	ChFvM 140	-	185	ccactcccataaccactgga	cgctgtaggttcggtctctg
130	ChFvM 181	175	155, 165	ggagaactgctttgtaggg	acgtacaccagcagatgagc
131	ChFvM 182	400, 435, 515	470	ggaaccaaacgaaccaaac	gcccaggagtgagtgaaagc
132	ChFvM 184	255	235, 240, 340, 350, 600	gcacttgggggtttgggta	ttcaagaacccccctccta
133	ChFvM 191	245, 535	255, 285, 300, 350	ccagcagaatcctcaaatgc	gtgccaacaagccattg
134	ChFvM 192	-	265, 275, 450	tgaggctcagctgtgagaattg	ttccgagagtgagagacat

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
135	ChFvM 193	-	140	catcagaacctcaatcatcg	tactgccggagaatgaaca
136	ChFvM 201	-	245, 285, 325, 335	tgattcaactccagcgaagc	atcagcaggcgaatcctct
137	ChFvM 202	225, 235	-	caaagggctccagctatctc	aggatcgtcagctaaagca
138	ChFvM 205	220	125, 185	gcgaaacctatggattgtt	acaaccaccaattccatt
139	ChFvM 210	-	185, 265, 540	tcccacattttcctgttt	gtggtgttgtagtgagaga
140	ChFvM 212	150, 170, 190	195	caaatcttcaacggctctcc	acggaggaggagggaagtcat
141	ChFvM 213	195, 245, 330, 350, 450	280	aacctaggaggctgaaacc	ataccccggtgtgacttgt
142	AW06432	250, 270, 280, 500, 570	-	tgagctgaagaaggtgctga	aagggaactggaggtagcaa
143	CO378933	150, 500	-	cgaggcttctctctgtttg	cacgacctgacaccttct
144	CO379009	105	-	tgtgattgggagagaggagg	ctgccccaaactggtttta
145	CO379012	-	145	cacgaggattgttgaacce	accaacacacaagctctg
146	CO379659	250, 400	140, 200	aggggaggcctcacttagag	tatcatgatagatcccagcct
147	CO380151	-	150	cgagggtttgatcgagtctg	aacatgatcacaaggccaca
148	CO381174	275	445, 455	ccacaagaaaggagacgagc	tcaggagcatgaatcaatcg
149	CO381539	272	270, 265	gtctgcccctgttacgctac	ctgtgtagctccggcacata
150	CO381605	-	300	ccaccttcttacccttcaca	caatfccgaaggcacaactt
151	CO381897	230	-	agaggctgaggatcatggtg	ggcaaatacaatgctaacca
152	CO382008	-	125, 145, 385	gcccttgcttagtgcctttg	atgcatgctctatgctgttt
153	CO816733	275, 300, 400, 480, 570	310, 350	tccaacacctcactgtcc	attcagccaggctctgagcat
154	CO816806	-	205	cgaggggagaaaccttaacct	ggacgatccctgtagtggga
155	CO816840	270, 340	150, 215, 295, 305	cagccttgatgtctctgttga	ccatgacatcctctgccttt
156	CO816936	300	380, 520	ttctctcgatctctccga	catcgactgctctctcctc
157	CO817004	220, 240	225	cgtcagccctaagaagatgg	acgaccaatacagaccagg
158	CO817138	250	285, 500, 590	tgaaaacttttctctctgggc	tcaggccatgaacactctg
159	CO817185B	195, 400, 510, 565	260, 500	tcactccactgggaagaaagg	catcaatcatgcacacacga
160	CO817242	-	150, 520, 525	aatccccaaatcctcaaac	ctccacgctcttctgttcc
161	CO817330	-	270, 405, 430, 505, 510, 550	gcttcatggcttctgtcttc	gtggcattcagttgggctat
162	CO817364	285, 295	260	gccttcccccttctcaaatc	gtcattttccagtggtgct
163	CO817505	120, 280	-	tcctgaagcaacgatgactg	cacttgccgcagaagaaaa
164	CO817509	130, 140, 195	215	tcacctctccttctcaac	cgaagaggaaattgagccag
165	CO817772	-	500	tcacaaccgacgagttcag	tttctcactgcctctctct
166	CO817850	-	300	gtgttgagcaagaatggggt	tagtgccagaatgaggcctt
167	CO817919	270, 280	-	cagaatccaccggcttacct	cgtagcttttctgctgat
168	CO818131	250, 315	295	ccttctccgaaacctact	gggctcaggttatacagca
169	CX661091	180	235	aagccatgactacctccacg	atgaagccgaaatcgaatg
170	CX661274	-	215	tataacaacgttgggcccctc	tacgcccagctcataccacag
171	CX661428B	295, 330	-	gaagacggtggatgaggtgt	ctgctgaaacccgaatccta
172	CX661749	-	500	tagatttttccattccccc	atctgaccacaacaaacca
173	CX661752	-	165, 175	acctgacctgaccaaaccag	tggggatgaggatgagagtc
174	CX661843	245, 515	-	ctccatagatgcctcgaac	ttgaacagcgagaagtgtg

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Farward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
175	CX661893	-	190, 610	cgggttcttctactctgctg	gccccaaagacagcctagat
176	CX661895A	100	-	gtagccatggaatcgtccac	actgcbagcaagtgtcttga
177	CX662065	170, 495	-	acagagagccagaaacggaa	agcgagagagagagcgaatg
178	CX662065A	-	190, 235, 360, 500	atgaccacagcaactctcc	gcgtgtttgggattgagact
179	CX662153	115, 120, 175	130	gaaactccccgaatttacg	tctcgggtgagctgagaat
180	CX662162	290, 505	-	tcaccacatgaaaagttgcc	atagaaagagcggcacgaaa
181	CX662184	155	145, 160	acgctcttcttactccca	gagagagatgtcggagagg
182	CX662207	265, 285, 290	310	agcagccggctcagatgatag	atcacggtcaaagccaactc
183	CX662235	220, 255, 340, 345	-	cctctcttccccactcaa	gtagctcttccgaactgtgg
184	FvA 108	150	-	acaagagaccaccaactacc	gatagccaaaagagcagtgga
185	FvA 110	185, 245	255, 265	caacttctctagcatcaactc	actgatctgaaatcgtgtct
186	FvA 114	120, 270, 315	150, 295	attggctaataaatctccg	ggcaagggaatggataata
187	FvA 115	98, 370, 450	100, 445	acaagttcgcagggatga	gggaaaacacagaaatctcc
188	FvA 117	110, 295	-	ccatttaccattgtcacaacg	gttagggtttcatgtggactc
189	FvA 119	280, 400	120, 150, 265	gcccttgatgacagaaaag	ccctcgttggagataatg
190	FvA 123	-	310	gcaatgttcttactgaaatgtg	agcatctcttagtgcctcatc
191	FvA 125	420	-	atccaaggcctaagagagg	cagaaatcccaccaaagtcc
192	FvA 127	95, 215	195	tctccctcatccacaatcaac	accggagtgaaacctaatc
193	FvA 129	145	-	gaaaggagtctgtttgtgtcc	actggctcatcatagc
194	FvA 2	250, 270	252, 262	gttccatcacttacagacatcc	cctgattatgtgcctttatc
195	FvA 5	120	85, 135	aagggagagagagagaaagtg	acaacatctcggctcattaac
196	FvA 7	-	550	cagtgaagactccgactag	gcatatcgtcattatgtgc
197	FvA 9	570, 580	610	gagggtctccttctgaaatg	aacctcaaccagtttgg
198	FvB 1	290, 315, 450, 480	620	agagcagaagaaaaccatagc	cctccctggaatagatacac
199	FvB 101	175, 195, 480, 485	120	tcaagtctcgccaaaataact	cgttctcactccattagagg
200	FvB 108	300, 455, 495	130, 215	ggttgacatgagtgcatatc	gaagggtataggagtgcaaatg
201	FvB 110	215, 225	-	ctaccgcaccataattagaag	catccaaatgaactattcaag
202	FvB 111	270, 275, 280, 520	190, 195	ttaggttttgcgaagttgaag	aggagaaccgcgctagtg
203	FvB 112	165, 195, 205, 285, 600	290, 335, 250	ggcaacgaagagtaaggc	caaccataaccctcatttc
204	FvB 113	-	230	tgaccagaaatgaaagaagg	agaaagacctgctccttgag
205	FvB 116	200	215, 225	cctccatccctaacttcc	gctcttctctcgtcagc
206	FvB 119	330, 385	380, 390	accattgccatccctact	ccacctgaacaaccaccac
207	FvB 120	220, 240	-	ataccctcatcttctgtcttg	gattctcatgtgatcgtctga
208	FvB 123	-	360, 370, 390	gaaacacttttgccttctg	ggtttactgggggtcag
209	FvB 124	190, 220, 250, 260	205, 240	agacaacaagcagcaatagt	agaaaggggaagtcctaagt
210	FvB 126	125	110, 180	gagcatcggcactacacc	catggctgcttcagatc
211	FvB 127	420, 500	265, 270	ttcaaggcaaatccactatc	gcatcgggaagcatcaagt
212	FvB 129	510, 550	-	gcgatgaaacagtagcagc	gaaagggggggaagaatc
213	FvB 132	220, 250	260	aaggctccccctgttttag	gaacctgtaggctgtgtagaaa
214	FvB 2	230, 340, 350	600	ttgaggcactgaaaaagac	aaaggaggtgaaagggtg
215	FvB 8	280, 300, 400, 420	275, 290, 320, 410	ggtgagtgatattgcctaac	cttcattacgggtgagctctg



Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Wielkości produktów różnicujących odmiany 'Elsanta' i 'Senga Sengana' (allele segregujące) w reakcji SSR oraz sekwencje starterów generujących powyższe allele heterozygotyczne.

Sizes of PCR amplicons (segregating alleles) differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes and the sequences of oligos generating the above heterozygous alleles.

Lp. No.	Mrker Mol. marker	produkty różnicujące (pz) Size of the amplicons (pb)		starter F Forward Primer	starter R Revers Primer
		Elsanta	Senga Sengana		
216	FvC 10	295, 350, 380	255, 285, 300, 460	cctccatgctgatcctcttctc	gccaaatccgattattcttgag
217	FvC 103	200, 215, 250, 395	-	tctccaactccaactctc	cgaatctatgtcccctatcg
218	FvC 105	270, 350	-	gggtggtcaagtctccag	actccgattactgtttccag
219	FvC 107	205, 480	180	ggcaattacatgatgaaccag	gaatggagctccttgagaactc
220	FvC 108	275	345, 255, 495	tcccgtaacagtgctcag	agcaaagaggtagagaacgag
221	FvC 109	165, 210, 520, 590	260	agggcgagactgaaatag	aagccttacctggaattacc
222	FvC 110	420	450	ctgtttctcctcagattgttc	gtcattgtaactgctgtgtg
223	FvC 111	215, 260, 270, 290, 340, 415	200, 240, 315, 400	ccattcttcccctaac	caaaaactgctactgcctcaa
224	FvC 112	145, 160, 170	147, 150, 280	ggtagcaattgtggaattg	cggcctgattgtattatctg
225	FvC 113	220, 250, 260, 270	180	cctcctctctttctcttcc	ggcagacagatccgaga
226	FvC 12	-	190, 250	ggaggacagcagatagatatg	gggtcatttctgttaacaac
227	FvC 122	320, 385	300	tctcatacccatacccactac	ccagacaccatetaaattctac
228	FvC 123	170	140, 250	gaccacaaaccactaatc	caaacaccgagactctgag

Tabela 2

Table 2

Liczba produktów SSR-PCR różnicujących genomy odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'.

Number of SSR-PCR products differentiating 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes.

Grupa starterów Group of teste markers	liczba par starterów testowa- nych z danej grupy Number of primer pairs test- ed from the marker group	liczba starterów w grupie, w reakcji z którymi obserwowano produkty polimorficzne Number of primers in the group in which polymorphic products were observed in the reaction	liczba produktów różnicujących od- miany Number of polymorphic PCR products	
			Elsanta	Senga Sengana
FvH	151	44	80	52
ChFvM	135	97	178	155
CO	48	27	35	42
CX	33	15	20	16
FvA	29	14	23	17
FvB	27	18	45	30
FvC	27	13	37	25

W genomie odmiany 'Elsanta' dla wszystkich badanych grup markerów molekularnych, zidentyfikowano łącznie 418 alleli polimorficznych, natomiast w genomie odmiany 'Senga Sengana' – 337 alleli. Przeprowadzone badania potwierdzają wysoki stopień heterozygotyczności genomów obu wytypowanych do badań odmian.

#### Aanliza populacji mapującej. Uzyskana mapa genetyczna badanych genomów.

Do badań wykorzystano matryce DNA wyizolowane z genomów form rodzicielskich,

dla których potwierdzono wysoki poziom zróżnicowania genetycznego oraz z roślin potomnych, uzyskanych w wyniku ich krzyżowania. W reakcji z 44 wybranymi markerami SSR zidentyfikowano 53 allele, które segregowały w genotypach populacji mapującej. Na podstawie analizy rozkładu i frekwencji rekombinacji, oznaczono położenie i dystans mapowy loci tych alleli (Tab. 3). Skolekcjonowane dane użyto do przygotowania 'szkieletu' mapy genomów odmian 'Elsanta' oraz 'Senga Sengana'.

Zintegrowana mapa genetyczna skonstruowana dla populacji 'Elsanta' × 'Senga Sengana' zawiera łącznie 27 grup sprzężeń (LG, *Linkage groups*), wykazujących wysoki stopień homologii do: chromosomów II i VI (LG2 i LG6 obejmowały homologi a-d), chromosomów I, III i VII (LG1, LG3 i LG7 obejmowały homologi a-c) oraz chromosomów IV i V (LG4 i LG5 obejmowały homologi a i b)

opracowanych dla gatunku *Fragaria*.

Łącznie, na chromosomie I udało się zlokalizować loci 7 markerów, na chromosomie II – osiem, na chromosomie III i VI – po dziesięć, na chromosomach IV i V – po pięć, a na chromosomie VII – loci czterech markerów SSR. Wielkość uzyskanego zmapowanego fragmentu genomu (bin map) wyniosła 1 033,50 cM (Rys. 2).

Tabela 3

Table 3

Wyniki analizy rozkładu alleli i frekwencji rekombinacji w populacji mapującej oraz dystans genetyczny zidentyfikowanych loci markerów SSR.

Allele distribution, recombination frequency in the mapping population and genetic distance of identified SSR markers.

Grupa sprzęż. Linkage group	Locus1	Locus2	Frekwencja rekombinacji/odległość mapowa (cM) Recombination frequency (cM)	Typ segregacji alleli w populacji Segregation type of alleles	Test X2 Chi-square test	Rozkład alleli w populacji Alleles distribution in mapping population
LG1A	EMFn049	FvC103	19	nnxnp	0.8	3:1
	EMFn049	COBRA	25	nnxnp	2.2	3:1
	FvC103	COBRA	6	mlxll	7.8	3:1
LG1B	COBRA	CO817054	24,3	nnxnp	0.3	3:1
	CO817054	FEFv14-29	20,7	mlxll	4.9	3:1
LG1C	BFACT003	FvH4171	21,7	mlxll	0.2	3:1
	FvH4171	ARSFL002	28,3	nnxnp	0.6	3:1
	BFACT003	ARSFL002	50	nnxnp	10.4	3:1
LG2A	ARSFL012	CFVCT015	30	abxab	3.0	1: 2: 1
	ARSFL012	BFACT002	42	abxab	3.5	1: 2: 1
	CFVCT015	BFACT002	12	nnxnp	0.4	3:1
LG2B	EMFn214	CFACT111	34,3	mlxll	3.5	3:1
LG2C	BFACT002	ARSFL015	18,4	mlxll	0.1	3:1
LG2D	FvH4173	CFVC0316	24,3	mlxll	1.7	3:1
LG3A	UDF0001	FvH4161	18,4	nnxnp	4.3	3:1
	UDF0001	FvH4155	26,6	mlxll	0.2	3:1
	UDF0001	FvH4177	46,4	mlxll	0.4	3:1
	UDF0001	FvH4165	70,7	mlxll	2.1	3:1
	FvH4161	FvH4155	8,2	nnxnp	0.2	3:1
	FvH4161	FvH4177	28	nnxnp	0.0	3:1
	FvH4161	FvH4165	51,6	mlxll	0.8	3:1
	FvH4155	FvH4177	19,8	mlxll	0.7	3:1
	FvH4155	FvH4165	43,4	nnxnp	2.3	3:1
LG3B	FvH4177	FvH4165	23,6	mlxll	2.6	3:1
	FvH4169	BFACT036	44,3	mlxll	0.4	3:1
LG3C	FvH4163	FvH4153	36	nnxnp	3.3	3:1
	FvH4163	BFACT045	68	nnxnp	1.8	3:1
	FvH4153	BFACT045	32	abxab	5.8	1: 2: 1
LG4A	EMFn132	FvH4164	34,3	abxab	0.3	1: 2: 1
	EMFn132	FvH456	42	abxab	3.6	1: 2: 1
	FvH4164	FvH4156	8	nnxnp	0.4	3:1
LG4B	CO816733	EMFv007	21,7	nnxnp	0.0	3:1

Tabela 3

Table 3

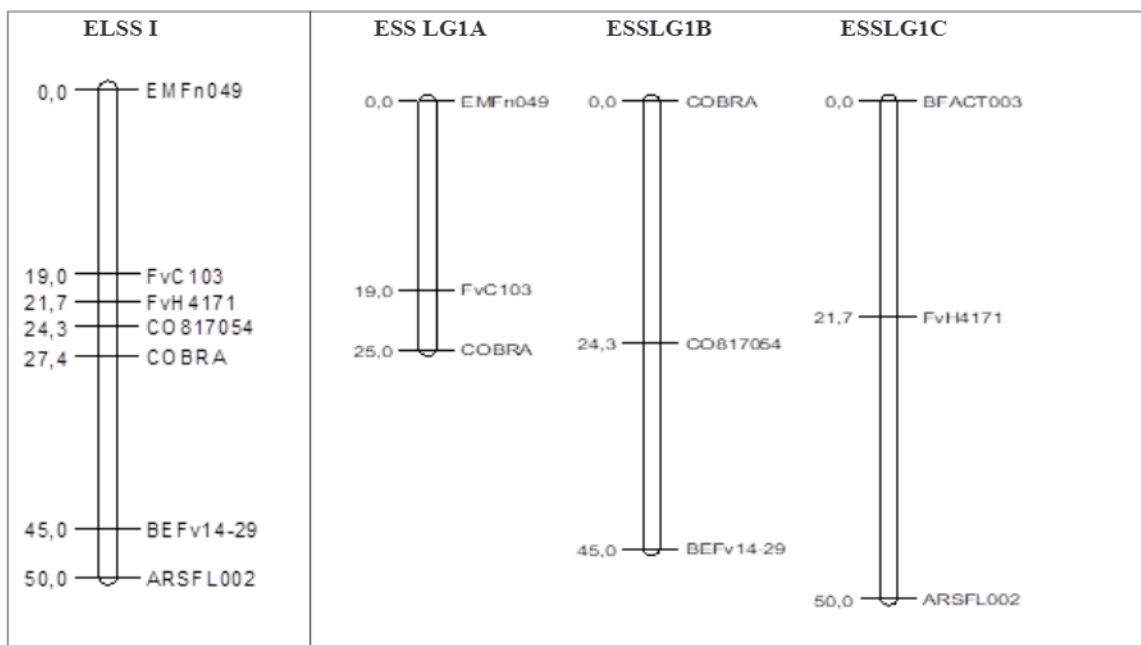
Wyniki analizy rozkładu alleli i frekwencji rekombinacji w populacji mapującej oraz dystans genetyczny zidentyfikowanych loci markerów SSR.

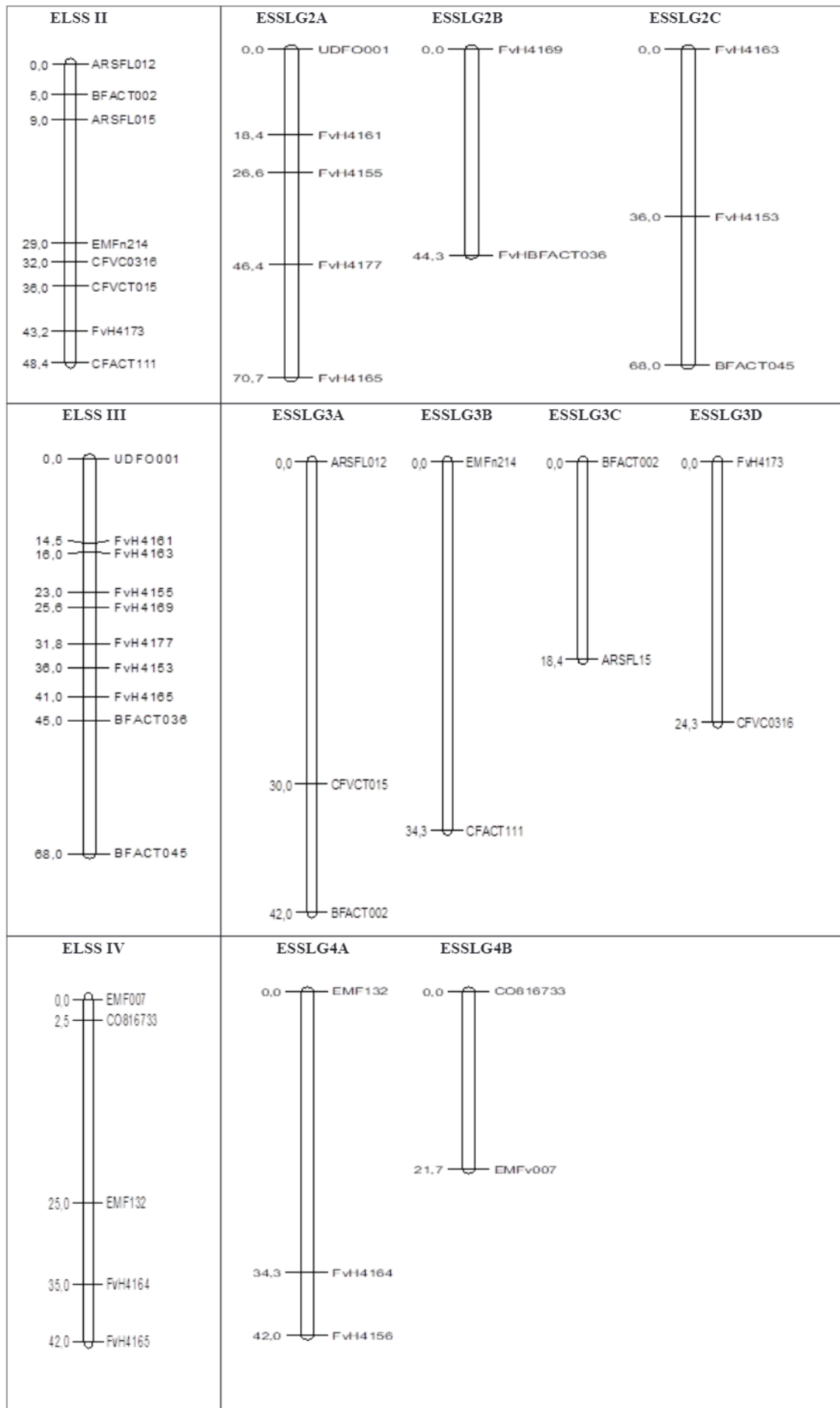
Allele distribution, recombination frequency in the mapping population and genetic distance of identified SSR markers.

Grupa sprzęż. Linkage group	Locus1	Locus2	Frekwencja rekombinacji/odległość mapowa (cM) Recombination frequency (cM)	Typ segregacji alleli w populacji Segregation type of alleles	Test X2 Chi-square test	Rozkład alleli w populacji Alleles distribution in mapping population
LG5A	FvH4164	BFFv09-11-02	18,4	nnxnp	4.1	3:1
	FvH4164	EMFv018	26,6	mlxll	0.2	3:1
	BFFv09-11-02	EMFv018	8,2	mlxll	5.5	3:1
LG5B	UDF009	BFACT017	24,3	nnxnp	1.7	3:1
LG6A	FvH4164	FvH4160	18,4	mlxll	12.6	3:1
	FvH4164	FvH4159	21,6	nnxnp	2.0	3:1
	FvH4164	FvH4154	26,4	nnxnp	4.9	3:1
	FvH4164	ARSFL100	50,7	mlxll	0.5	3:1
	FvH4160	FvH4159	3,2	nnxnp	0.3	3:1
	FvH4160	FvH4154	8	mlxll	2.9	3:1
	FvH4160	ARSFL100	32,3	mlxll	0.6	3:1
	FvH4159	FvH4154	4,8	nnxnp	0.1	3:1
	FvH4159	ARSFL100	29,1	mlxll	4.3	3:1
FvH4154	ARSFL100	24,3	abxab	0.6	3:1	
LG6B	FvH4180	FvH4163	25	mlxll	2.5	3:1
LG6C	ARSFL002	ARSFL022	28,1	abxab	1.1	1: 2: 1
LG6D	EMFn017	ARSFL022	34,9	nnxnp	0.0	3:1
LG7A	BFACT004	EMFn213	25,2	nnxnp	2.4	3:1
LG7B	ARSFL011	EMFn213	7,1	nnxnp	5.2	3:1
	EMFv021	EMFn213	15,5	mlxll	0.2	3:1

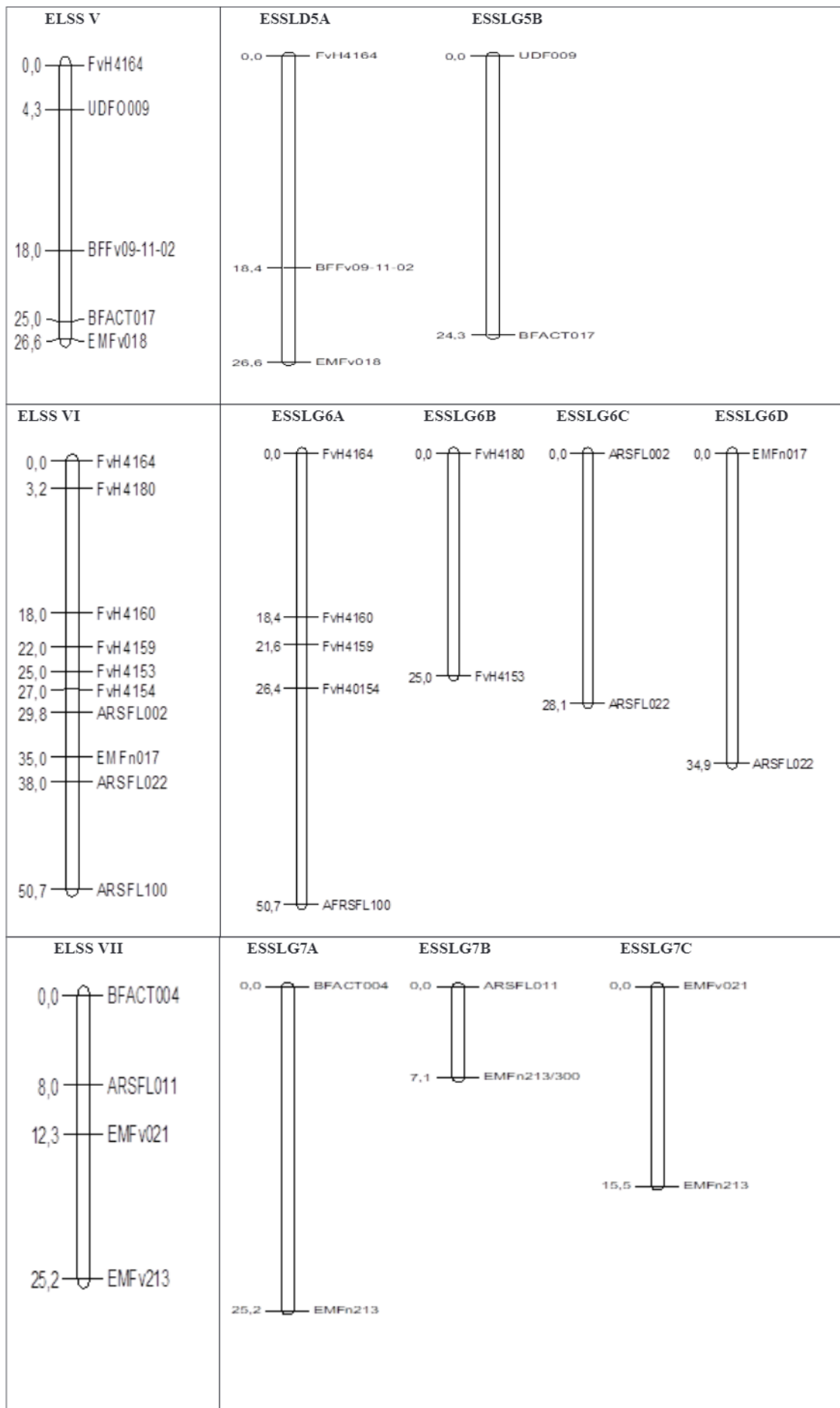
Rys. 2. Schemat szkieletu zintegrowanej mapy ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’.

Fig. 2. The ‘skeleton’ (bin map) of the integrated genetic map of ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’.









## Dyskusja

Truskawka (*Fragaria* × *ananassa* Duch. ex Rozier) jest allopoliploidem (oktoploidem  $2n=8x=56$ ) (Davis i in. 2007), którego poliploidyzacja podczas procesów ewolucyjnych doprowadziła prawdopodobnie do zaburzeń liczby chromosomów w gametach (Hancock 1999). Jej genom powstał na skutek przypadkowej hybrydyzacji dwóch gatunków poziomki *Fragaria chiloensis* Ehrh. (Chile) i *Fragaria virginiana* (USA).

W oparciu o badania cytogenetyczne i molekularne opracowano kilka modeli genomów allopoliploidalnych tego gatunku. Zgodnie z zapisem Y1Y1Y1Y1ZZZZ/Y1Y1Y1'Y1'ZZZZ (Rousseau-Gueutin i in. 2009) i AAAABBCC (Fedorova 1946) w skład genomu *F.* × *ananassa* wchodzić mogą dwa (Y1, Z) bądź trzy rodzaje sub-genomów (Y1, Y1', Z lub A, B, C), a zapis AAA'A'BBB'B' (Bringham 1990) sugeruje udział nawet czterech z nich (A, A', B, B') (Hummer i Janick 2009).

Skomplikowany układ genomu klasyfikuje truskawkę jako bardzo trudny obiekt dla zaawansowanych badań genetyczno-hodowlanych, czego skutkiem jest brak w literaturze doniesień na temat interakcji między genami warunkującymi różne cechy *F.* × *ananassa*. Niemniej jednak próby tworzenia zagęszczonych map genetycznych, służących „rozlokowaniu” genów warunkujących określone cechy na odpowiednich chromosomach, podejmowano w ostatnich latach w kilku współpracujących ośrodkach europejskich, USA i Japonii (Kole i Abbott, 2008, Sargent i in., 2011). Skutkiem tych badań jest dostępność map referencyjnych tego gatunku, sporządzonych dla roślin diploidalnych *F. vesca* i *F. bucharica* FV × FB, (Sargent i in. 2006, 2007, 2008; Zorrilla-Fontanesi i in. 2011) oraz oktoploidalnych *F.* × *ananassa* (Isobe i in. 2013, Sargent i in. 2012; Davik i in. 2015). Mapy te zagęszczone są licznymi markerami mikrosatelitarnymi, które (uwzględniając zasadę kolinearności od 15 do 80% (Mohamed 2014)) stanowią bazę danych do sporządzania map genetycznych genomów nowych odmian gatunku *Fragaria*.

Punktem krytycznym podczas generowania map genetycznych jest dobór populacji mapującej. Użycie populacji mapującej będącej wynikiem krzyżowania form rodzicielskich niewystarczająco zróżnicowanych pod względem fenotypowym i genotypowym, prowadzi do problemów z interpretacją typu segregacji alleli, a w efekcie do błędnego odczytu położenia genów na mapie (Liebhard i Gessler, 2000; Rungis i in., 2005; Semagn i in., 2006; Kole i Abbott, 2008; Myles i in., 2009). Najprostszą metodą uzyskiwania populacji mapującej

jest krzyżowanie heterozygotycznych form rodzicielskich CP (*Cross Polination*, zastosowana również w niniejszych badaniach), ale zależnie od typu dziedziczenia alleli cech stosowane są również populacje  $F_2$ , BC czy  $F_{2,3}$ , wywodzące się z krzyżowania genotypów homozygotycznych (Knapp i in. 1990; Reiter i in., 1992; Yu i in., 2000; Philips i Vasil, 2001; Vinod, 2006; Hittalmani i in., 2008; Kole i Abbott, 2008). Przygotowanie populacji CP ma zwykle charakter kontrolowanego, wewnątrzgatunkowego krzyżowania genotypów o znanym pochodzeniu. Krytyczny podczas badania takiej populacji może być zbyt niski stopień polimorfizmu genetycznego form rodzicielskich oraz towarzyszące obcopylności występowanie potomstwa z nieplanowanych zapyleń (Van Ooijen i Voorrips, 2001). Dlatego przed podjęciem prac nad mapowaniem genomów 'Elsanta' i 'Senga Sengana' przeprowadzono (1) ocenę stopnia heterozygotyczności genomów form rodzicielskich oraz (2) analizę statusu mieszańców uzyskanych w wyniku ich krzyżowania.

W przeprowadzonych badaniach, dzięki analizie porównawczej wzorów prążkowych uzyskanych w testach SSR-PCR na matrycach DNA rodziców oraz genotypów mieszańcowych, pochodzenie z kontrolowanego zapylenia potwierdzono dla wszystkich badanych siewek. Ponadto, wysoki stopień polimorfizmu pomiędzy krzyżowanymi genotypami obserwowany w testach SSR-PCR, wskazuje na znaczny poziom heterozygotyczności odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana', co potwierdza ich przydatność do tworzenia populacji CP, stosowanej przy konstruowaniu map genetycznych.

Kolejnym ważnym elementem analizy populacji przydatnej do tworzenia map genetycznych genomów roślinnych jest także dobór markerów molekularnych (Ritter i in., 1990, Liebhard i Gessler 2000).

Zgodnie z definicją Schulmana i in. (2004), markery powinny być sprzężone z cechą, łatwe do wykrycia w testowanym materiale roślinnym i dziedziczone zgodnie z zasadami Mandla. Inna definicja zakłada również, że powinny one odzwierciedlać allele każdego z reprezentowanych przez nie genów/fragmentów genomu (Griffiths i in. 1996). W niniejszych badaniach wykorzystano zatem tylko markery molekularne, które wyraźnie różnicowały krzyżowane formy rodzicielskie, a zidentyfikowane dla nich allele heterozygotyczne segregowały w genotypach mieszańców.

Uzyskana mapa genetyczna zawiera łącznie 27 grup sprzężeń, na których zidentyfikowano loci 53 alleli polimorficznych, pokrywających 1 033 cM

genomu truskawki. Należy zwrócić uwagę, że sporządzona dla oktoploidalnych genomów odmian 'Redguntlet' i 'Hapil' mapa referencyjna zawiera 30 grup sprzężeń (chromosomów homologicznych) (Sargent i in. 2012), a odmian 'Sonata' i 'Babette' – 31 grup reprezentujących siedem chromosomów genomu *Fragaria* (Davik i in. 2015).

Uzyskana mapa stanowi istotną bazę dla podjęcia prac nad identyfikacją i potwierdzeniem obecności regionów regulujących cechy ilościowe (QTL, Quantitative Trait Loci) w genomach badanych odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'.

Wiedza dotycząca lokalizacji precyzyjnych sekwencji w genomie pozwala na wskazanie potencjalnych markerów molekularnych, regulujących ważne agronomicznie cechy gatunku *Fragaria*, przydatnych do wczesnej selekcji genotypów hodowlanych wspierających konwencjonalne metody hodowli poprzez wdrożenie procesu MAS (Marker Assisted Selection) (Sargent i in. 2012).

Dotychczasowe, przeprowadzone m.in. dla odmian „Hanoye” badania potwierdzają bowiem obecność regionów QTL zawierających markery sprzężone z cechą jakości owoców truskawki, zidentyfikowane w obrębie chromosomów II, IV, V i VII (Zorrilla-Fontanesi i in. 2011, Verma i in. 2017) oraz z odpornością na różnego rodzaju patogeny, potwierdzone w regionach chromosomów III i VI (Denoyes Rothan i in. 2004, 2005; van Dijk i in. 2014; Davik i in. 2015).

## Wnioski

1. Uzyskana populacja roślin potomnych pochodzących ze skrzyżowania odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' stanowi wartościowy materiał do badań związanych z opracowaniem mapy genetycznej truskawki.
2. Wszystkie siewki z uzyskanej populacji mapującej reprezentowały wzory genetyczne wskazujące na segregację alleli pochodzących wyłącznie od form rodzicielskich 'Elsanta' i 'Senga Sengana'.
3. Sporządzony szkielet mapy genetycznej 'Elsanta' × 'Senga Sengana' może stanowić bazę do dalszej saturacji i do lokalizacji genów i identyfikacji regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r. Zadanie nr 74.*

## Literatura

- Bringham, R. S. (1990). Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. Hort. Sci. 25: 879–881.
- Darrow, G. M. (1966). The Strawberry - History Breeding and Physiology. The New England Inst. for Med. Res..
- Davik, J., Sargent, D. J., Brurberg, M. B., Lien, S., Kent, M., Alsheikh. (2015)a. A ddRAD based Linkage map of the cultivated strawberry, *Fragaria annassa*. PLOS ONE 10(9): doi:10.1371/journal.pone.0137746
- Davis, T. M., DiMeglio, L. M., Yang, R. H., Styan, S. M. N., Lewers, K. S. (2007). Assessment of SSR transfer from the cultivated strawberry to diploid strawberry species: Functionality, linkage group assignment, and use in diversity analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131: 506–512.
- Denoyes-Rothan, B., Guerin, G., Lerceteau-Kohler, E., Risser, G. (2005). Inheritance of a race-specific resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria* × *ananassa*. Phytopathology 95: 405-412.
- Denoyes-Rothan, B., Lerceteau-Kohler, E., Guerin, G., Bosseur, S., Bariac, J., Martin, E., Roudeillac, P. (2004). QTL analysis for resistance to *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Acta Hort. 663: 147-151.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- FAOSTA. (2019). Food and Agriculture <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Federova, N. J. (1946). Cross ability and phylogenetic relationships in the main European species of *Fragaria*. Natl. Acad. Sci. USSR. 52: 545–7.5.
- Griffiths, P. L., Dougan, G., Connerton, I. F. (1996). Transcription of the *Campylobacter jejuni* cell division gene *ftsA*. FEMS Micr. Lett. 143(1): 83-87.
- Hancock, J. F. (1999). Strawberries. CAB International, Oxford, U Hancock, K.
- Hancock, J. F. (2008). Temperate fruit crop breeding: germplasm to genomics, Springer Science +Business Media, B.V. New York. USA.
- Hittalmani, S., Girish, T. N., Biradar, H., Maughan, P. J. (2008). Mapping populations: Development, Descriptions and Deployment; Principles and Practices of Plant Genomics: Vol.1: Genome Mapping; Chapter 3, Kolle, C. and Abbott, A.G. Sci. Publishers USA: 69-92.
- Hummer, K. E., Janick, J. (2009). Rosaceae: Taxonomy, economic importance, genomics. In: Foltá, K. Gardiner, S. (eds), Genetics and Genomics of Rosaceae. Springer Science+Business Media, New York, USA, 1-18.
- Isobe, S. N., Hirakawa, H., Sato, S., Maeda, F., Ishikawa, M., Mori, T., Yamamoto, Y., Shirasawa, K., Kimura, M., Fukami, M., Hashizume, F., Tsuji, T., Sasamoto, S., Kato, M., Nanri, K., Tsuruoka, H., Minami, C., Takahashi, C., Wada, T., Ono, A., Kawashima, K., Nakazaki, N., Kishida, Y., Kohara, M., Nakayama, S., Yamada, M., Fujishiro, T., Watanabe, A., Tabata, S. (2013). Construction of an



- integrated high density simple sequence repeat linkage map in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) and its applicability. *DNA Res.* 20: 79–92.
- Kole, C., Abbott, A. G. (2008). Fundamentals of plant genome mapping. W: Kole, C., Abbot, A. G., Principles and practices of plant genomics. Genome mapping. Science Publishers USA: 2–67.
- Lerceteau-Kohler, E., Roudeillac, P., Markocic, M., Guerin, G., Praud, K., Denoyes-Rothan, B. (2002). The use of molecular markers for durable resistance breeding in the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Acta Hort.* 567: 615–618.
- Liebhart, R., Gessler, C. (2000). Possible errors in genome mapping. *Integrated Control of Pome Fruit Diseases IOBC wprs Biulletin* 23(12): 127–135.
- Masny A., Markowski J., Żurawicz E. (2002): Możliwości poprawienia jakości truskawek przez hodowlę nowych odmian. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych* 488:495–501
- Mohamed, A. M. W. (2014). The genetic map of strawberry (*Fragaria × ananassa*) based on 'Elsanta' × 'Senga Sengana' mapping population. *Praca doktorska. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice* pp.108.
- Myles, S., Peiffer, J., Brown, P. J., Ersoz, E. S., Zhang, Z., Costich, D. E., Buckler, E. S. (2009). Association mapping: Critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell* 21. (2194)–2202.
- Philips, R. L., Vasil, I. K. (2001). DNA based markers in Plants. *Kluwer Acad. Publ, Dordrecht, The Netherlands* 42: 227–238.
- Reiter, R. S., Williams, J. G. K., Feldman, K. A., Rafalski, J. A., Tingey, S. V., Scolnik, P. A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *PNAS* 89. (1477)–1481.
- Ritter, E., Gebhardt, C., Salamini, F. (1990). Estimation of recombination frequencies and constructing of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645–654.
- Rousseau-Gueutin, M., Gaston, A., Änouche, A., Ainouche, A., Ainouche, M. L., Olbricht, K., Staudt, G., Richard, L., Denoyes-Rothan, B. (2009). Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria*, L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 515–530.
- Rungis, D., Hamberger, B., Berube, Y., Wilkin, J., Bohlmann, J., Ritland, K. (2005). Efficient genetic mapping of single nucleotide polymorphisms based upon DNA mismatch digestion. *Molecular Breeding* 16: 261–270.
- Sargent, D. J., Cipriani, G., Vilanova, S., Gil-Ariza, D., Arús, P., Simpson, D. W., Tobutt, K. R., Monfort, A. (2008). The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* 51: 120–127.
- Sargent, D. J., Clarke, J., Simpson, D. W., Tobutt, K. R., Arús, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes-Rothan, B., Rousseau, M., Folta, K. M., Bassil, N. V., Batten, N. H. (2006). An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.* 112. (1349)–1359.
- Sargent, D. J., Kuchta, P., Lopez Girona, E., Zhang, H., Davis, T. M., Celton J. M., Marchese, A., Korbin, M., Folta, K., Shulaev, V., Simpson, D. W. (2011). Simple Sequence Repeat Marker Development and Mapping Targeted to reviously Unmapped Regions of the Strawberry Genome Sequence. *Crop Science Society of America - The Plant Genome* 4:165–177.
- Sargent, D. J., Passey, T., Šurbanovski, N., Girona, L. L., Kuchta, P., Davik, J., Harrison, R., Passey, A., Whitehouse, A. B., Simpson, D. W. (2012). A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *Theor. Appl. Genet.* 124. (1229)–1240.
- Sargent, D. J., Rys, A., Nier, S., Simpson, D. W., Tobutt, K. R. (2007). The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theor. Appl. Genet.* 114: 373–384.
- Schulman, A. H., Flavell, A. J., Ellis, T. H. N. (2004). The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants. In: Miller, W. J., Capy, P. (eds) *Mobile Genetic Elements. Methods in Molecular Biology* 260: Humana Press
- Semagn, K., Bjornstad, A., Ndjiondjop, M. N. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25). (2569)–2587.
- Verma, S., Zurn, J. D., Salinas, N., Mathey, M. M., Denoyes, B., Hancock, J. F., Finn, C. E., Bassil, N. V., Whitaker, V. M. (2017). Clarifying sub-genomic positions of QTLs for flowering habit and fruit quality in U.S. strawberry (*Fragaria×ananassa*) breeding populations using pedigree-based QTL analysis. *Horticulture Research* 4. (1706)2; doi:10.1038/hortres.2017.62
- Van Dijk, T., Pagliarani, G., Pikunova, A., Noordij, Y., Yilmaz-Temel, H., Meulenbroek, B., Visser, R., van de Weg, E. (2014). Genomic rearrangements and signatures of breeding in the allo-octoploid strawberry as revealed through an allele dose based SSR linkage map. *BMC plant biology* 14: 55.
- Van Ooijen, J. W., Voorrips, R. E. (2001). *JoinMap 3.0*, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International, Wageningen, The Netherlands*, s. 78
- Vinod, K. K. (2006). Genome mapping in plant populations. *Proceedings of the training programme on "Modern Approaches in Plant Genetic Resources"*. – Collection,
- Yu, K., Park, S. J., Poysa, V., Gepts P. (2000). Integration of simple sequence repeats (SSR) markers into a molekular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The Journal of Heredity* 91(6): 429–434.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Cabeza, A., Torres, A. M. (2011). Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the Rosoideae subfamily. *Mol. Breed.* 27: 137–156.



# Ocena zmian profilu ekspresji genów kandydujących w podkładkach jabłoni o odmiennym stopniu tolerancji mrozowej

Evaluation of changes in the expression profile of candidate genes in apple rootstockss with a different degree of frost tolerance

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz<sup>✉</sup>, Mariusz Lewandowski<sup>✉</sup>

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,  
✉ e-mail: sylwia.keller@inhort.pl

Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja genów sprzężonych z cechą mrozoodporności podkładek jabłoni. Ocena zmian w poziomie ekspresji wyizolowanych genów przeprowadzono metodami RNAseq i qRT-PCR, dla podkładek zróżnicowanych po względem stopnia tolerancji mrozowej: P 66 (tolerancyjna) i M.9 (wrażliwa). W wyniku przeprowadzonych odczytów sekwencji RNA (sekwencjonowanie *de novo* w systemie Illumina Solid) dla w/w podkładek zidentyfikowano około 167 milionów odczytów unikatowych sekwencji, z których do wstępnych badań weryfikacyjnych wytypowano 15 o zróżnicowanym profilu ekspresji. Sekwencje poddano adnotacji funkcjonalnej. Wytypowane geny kodują: białka strukturalne i integralne błon komórkowych i wakuoli komórkowych, czynników transkrypcyjnych, białek regulujących transport międzykomórkowy i wewnątrzkomórkowy, białek hydrolizujących wiązania C-O i C-N oraz białek wiążących makro- i mikroelementy. Celem weryfikacji typu regulacji sekwencji transkryptomu uzyskanych z sekwencjonowania nowej generacji (NGS), dla tych samych prób przeprowadzono ilościową analizę transkryptu genów (qRT-PCR). Spośród badanych genów, trzy reprezentowały identyczny typ regulacji w badanych układach eksperymentalnych RNA-seq i qRT-PCR. Wytypowane geny stanowią potencjalne sekwencje kandydujące do sporządzenia markerów funkcjonalnych, umożliwiających wczesną selekcję podkładek jabłoni tolerancyjnych na mróz.

**Słowa kluczowe:** adnotacja funkcjonalna genów, *Malus domestica* Borkh., sekwencjonowanie, profil ekspresji, ilościowa reakcja amplifikacji

The aim of presented study was to identify putative candidate genes associated with apple rootstock winter hardiness. The assessment of changes in expression profile of isolated differentially expressed genes, was performed using two subsequent experiments: RNAseq (based on New Generation Sequencing, NGS) and qRT-PCR (Real Time transcript amplification). In terms of traits of interests two apple rootstocks P 66 (frost tolerant) and M.9 (frost sensitive) were evaluated. As a result of the RNA sequence readings (*de novo* sequencing, Illumina Solid system), approximately 167 million reads of unique sequences were identified. Finally, fifteen functionally annotated expressed tags, representing different expression profile, were chosen. Selected putative genes coding: structural and integral proteins of cell membranes and cellular vacuoles, transcription factors, proteins regulating intercellular and intracellular transport, C-O and C-N bonds hydrolyzes, and proteins binding macro- and microelements.

In order to verify the type of regulation of the transcriptome sequences obtained in NGS technology, qRT-PCR tests were carried out for the same samples layout. Three of studied sequences, represented identical type of regulation in both RNA-seq and qRT-PCR experiments. The selected genes seems to represent potential candidate sequences (functional molecular markers), enabling the early selection of frost-tolerant apple rootstocks.

**Key words:** expression profile, gene annotation, *Malus domestica* Borkh., new generation sequencing (NGS), quantitative transcript level (qRT-PCR)

## Wstęp

Zimowe uszkodzenia roślin wieloletnich uprawianych w regionach o umiarkowanym klimacie stanowią duży problem w hodowli. Długotrwałe przymrozki, często bez pokrywy śnieżnej, szybkie ocieplenie i kolejne fale wiosennych

przymrozków powodują znaczne straty zarówno w naziemnych organach roślinnych, jak i systemie korzeniowym drzew. Co więcej, uszkodzenia mrozowe podczas kwitnienia roślin, powodują istotne zmniejszenie plonów i są bardziej niebezpieczne niż długotrwałe działanie ujemnych

temperatur w okresie zimowym (Aygu. 2005).

Jednym z mechanizmów adaptacji roślin do tolerancji na mróz jest regulacja obejmująca zmiany biochemiczne związane z transkryptomycznym przeprogramowaniem funkcji komórkowych, które pozwalają roślinom tolerować obecność kryształów lodu w tkankach (Wisniewski i in. 2003, Kalberer i in. 2006). Drugim mechanizmem jest tzw. regulacja unikania zamrożenia podczas głębokiego ochłodzenia (-38°C/-42°C), polegająca na zmianie wody komórkowej w emulsję lodową, zmniejszając tym samym stopień rozcieńczenia cząsteczek kriochronnych, takich jak cukry, sole itp. Dodatkowo regulacja tempa migracji wody między komórkami i w przestrzeniach pozakomórkowych może prowadzić także do stopniowego hamowania nagłego tworzenia się kryształów lodu w strukturach komórkowych (Wisniewski i in. 2003).

Tak złożony oraz poligeniczny mechanizm tolerancji mrozowej roślin nie jest w pełni rozpoznany, a dotychczasowe prace genetyczne prowadzone były głównie w USA, Nowej Zelandii, Norwegii i Japonii. W wyniku tych badań zidentyfikowano kilka grup genów, których ekspresja ulegała zmianom pod wpływem działania niskiej temperatury w genomach m.in. brzoskwini, truskawki i jabłoni. Należą do nich geny, kodujące białka z grupy dehydryn – *DREB* (*dehydration response elements binding protein*) aktywowane w wiązkach przewodzących (Feng i in. 2012, Takata i in. 2007, Zhao i in. 2012), geny CBF (*C-repeat binding factor*) – czynniki transkrypcyjne (Wisniewski i in. 2007, 2011), geny z grupy MADS-box – aktywowane w pąkach kwiatowych u roślin wieloletnich (Du i in. 2008) oraz geny COR (*cold regulated gene*) (Wisniewski i in. 2007).

Z uwagi na słabo rozpoznane podłoże molekularne cechy mrozoodporności, w przeprowadzonych badaniach wykorzystano techniki umożliwiające wnikliwą analizę sekwencji całego transkryptomu podkładek jabłoni. Dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS – *New Generation Sequencing*) oraz ilościowej analizie zmian poziomu transkryptu genów (Real-Time quantitative PCR) w roślinach reprezentujących odmienne cechy fenotypowe, możliwe było szybkie rozpoznanie sekwencji eksonowych nowych transkryptów sprzężonych z różnymi cechami użytkowymi rodzaju *Malus* (Bai i in. 2014).

W niniejszej pracy zastosowano najnowsze techniki identyfikacji unikatowych sekwencji genów o zróżnicowanej ekspresji, które pozwoliły na określenie typu regulacji genów oraz wytypowanie fragmentów transkryptomu podkładek

jabłoni, biorących udział w regulacji mechanizmu ich tolerancji na mróz. Ponadto dostępna sekwencja genomu jabłoni odmiany 'Golden Delicious' (Velasco i in. 2010), a częściowo także jej transkryptomu (Bai i in. 2014) umożliwiła adnotację funkcjonalną tych unikatowych sekwencji.

Celem badań podjętych w Instytucie Ogrodnictwa (IO) była ocena profilu ekspresji genów, sprzężonych z cechą tolerancji na mróz podkładek jabłoni pochodzących z kolekcji IO. Poprzez analizę porównawczą wyników uzyskanych w eksperymencie RNAseq oraz oszacowania ilości transkryptu wytypowanych genów (qRT-PCR) przeprowadzono również wstępną weryfikację typu ich regulacji.

### Material i Metody

Materiał roślinny do badań stanowiły matryce RNA wyizolowane z dwóch podkładek jabłoni o zróżnicowanym stopniu tolerancji na stres niskich temperatur – wrażliwej M.9 i tolerancyjnej P 66. Kontrolowane mrożenie wytypowanych podkładek przeprowadzono w komorze do sztucznego przemrażania materiałów roślinnych (BINDER GmbH). Zastosowano 3 temperatury mrożenia: -10°C, -12°C i -14°C, czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/h. Kontrolę stanowiły podkładki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu podkładki przeniesiono do chłodni szkółkarskiej (0°C) celem ich aklimatyzacji.

Próbki RNA izolowano z roślin traktowanych oraz z roślin kontrolnych, niepoddawanych w/w stresowi stosując metodę opisaną przez Zeng i Yang 2000. Uzyskany osad rozpuszczono w wodzie wolnej od RNAz (DEPC). Jakość, stopień integracji oraz koncentrację RNA oceniono metodą elektroforezy mikroprzepływowej przy użyciu Bioanalyzera 2100 i programu Expert 2100 (Agilent).

Odczyty sekwencji transkryptomu podkładki M.9 – próba kontrolna oraz próby przemrażane w temp. -10, -12, -14°C i podkładki P 66 – próba kontrolna oraz próby przemrażane w temp. -10, -12, -14°C (łącznie sekwencjonowaniu poddano 8 prób badawczych) przeprowadzono dla matrycy wyizolowanego totalnego RNA, przy użyciu platformy SOLiDGenome Analyzer, Illumina (Genomed, S.A). Następnie uzyskane DEG (*differentialy expressed genes*) zostały zmapowane przy użyciu programu BBmap, a ilości odczytów dla poszczególnych genów policzono przy pomocy programu HTseq. Końcowe wyniki opracowano w środowisku R [2] i znormalizowano przy pomocy pakietu DEseq2. Poziom korelacji pomiędzy badanymi próbami oszacowano przy użyciu współczynnika Pearsona (zakres od -1 do 1).



Do testów qRT-PCR, użyto RNA (1µg) wyizolowane z tej samej puli roślin, które poddano następnie odwrotnej transkrypcji do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Reakcję prowadzono w obecności uniwersalnego startera oligo-dT (0,1µg/µl) oraz enzymu – odwrotnej transkryptazy (RT) w zoptymalizowanych warunkach termicznych: 25°C/5 min., 42°C/5 min. – przyłączenie oligo-dT, 55°C/15 min – RT, 95°C/5 min. – inaktywacja enzymu (termocyklery Biometra Basic). Stabilne cDNA stanowiło matrycę dla ilościowej reakcji amplifikacji (qRT-PCR).

Reakcje qRT-PCR dla wytypowanych sekwencji transkryptów prowadzono na matrycy cDNA w termocyklerze RotorGen 6000 (Corbett) w obecności barwnika fluorescencyjnego SybrGreenI i uniwersalnego zestawu Kapa SybrqPCR (Kapa Biosystems). W każdym układzie eksperymentalnym w reakcji zastosowano dwie pary starterów specyficznych komplementarnych do sekwencji: genu referencyjnego *PAL* oraz genu badanego. Matrycę cDNA, przygotowano w rozcieńczeniach o znanej koncentracji, umożliwiającich sporządzenie krzywej standardowej reakcji amplifikacji. Badany układ eksperymentalny – gen ref. *PAL*/gen badany zawierał: cDNA oraz oligonukleotydy zaprojektowane do 15 sekwencji DEG (differentially expressed genes).

Profil termiczny ilościowej reakcji amplifikacji był następujący: 95°C/5 min. (aktywacja polimerazy), 95°C – 15 s, 60°C – 20 s (przyłączenie oligonukleotydów), 72°C – 20s (odczyt poziomu fluorescencji).

Ocenę poziomu ekspresji w każdej z badanych

prób przeprowadzono poprzez analizę krzywych amplifikacji (metoda porównania krzywych standardowych  $\Delta\Delta C_t$ , program komputerowy RotorGen. 6000 Series Software 1.7.), wyznaczonych w oparciu o pomiar fluorescencji barwnika SybrGreen w każdym cyklu reakcji. Analizę statystyczną przeprowadzono dla powtórzeń biologicznych (min. dwie próby roślinne) oraz powtórzeń technicznych (min. 2 powtórzone mieszaniny reakcyjne o tym samym składzie). Dla każdej z prób obliczono odchylenie standardowe (SD, standard deviation) natomiast dla średnich odczytów określono relatywny (krotność zmiany) poziom zmiany ilości amplikonu w badanym układzie gen referencyjny vs. gen badany (program komputerowy Rotor-Gen 6000 Series Software 1.7.).

Profile ekspresji wytypowanych genów, uzyskane w eksperymencie RNAseq i qRT-PCR następnie porównywano celem weryfikacji typu regulacji (up/down).

## Wyniki

### *Baza adnotowanych transkryptów wytypowanych z plików wynikowych NGS*

Po przeprowadzeniu wstępnych analiz korelacji pomiędzy próbkami RNA z podkładek tolerancyjnej P 66 i wrażliwej M.9 uzyskano łącznie 166 987 057 odczytów sekwencji (tj. ponad 500 tys. zróżnicowanych transkryptów). Całkowitą liczbę sekwencji odczytanych dla każdej pojedynczej próby zestawiono w tabeli 1, natomiast w Tab. 2 przedstawiono typ regulacji (porównanie poziomu transkryptu pomiędzy próbkami), sekwencje oraz ich funkcjonalną adnotację. Wielkości molekularne opracowanych sekwencji oszacowano w zakresie 20–380 pz.

**Tabela 1**  
**Table 1**

**Liczba odczytanych sekwencji w badanych próbach.**  
**Number of sequences read out in the tested samples.**

	Genotyp/traktowanie podkładki Genotype/treatment of apple rootstock	liczba odczytanych sekwencji Number of sequence reads
Wrażliwa	M.9 Kontrola zbiorcza	16 768 301
	M.9 (-10°C)	32 732 590
	M.9 (-12°C)	19 494 823
	M.9 (-14°C)	16 260 592
Tolerancyjna	P 66 Kontrola zbiorcza	19 587 737
	P 66 (-10°C)	25 391 667
	P 66 (-12°C)	16 512 288
	P 66 (-14°C)	20 238 759
<b>Razem</b>		<b>166 987 057</b>



Tabela 2

Table 2

## Typ regulacji w eksperymencie RNAseq, odczyty sekwencji oraz adnotacja funkcjonalna fragmentów DEG.

## Type of regulation in the RNAseq experiment, sequence and functional annotation of DEG fragments.

Identyfikator genu/regulacja w badanym układzie porównawczym Gene ID/ type of gene regulation observed in comparable layout	Sekwencja Sequence	Adnotacja funkcjonalna Functional gene annotation
<i>MDP0000883315</i> <i>Up-M.9K vs. M.9 -10</i>	ATTCA CATTCCCATTCCCATTCCC ACTCCCCATTCCCC- GACGTTTCTCCTCCACAACGGC TTCAGCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATCGAGATGATCAC- GATCCAGACCGTCACCGGA AAGTTGTTCATTGGGATGGATGTTGCTGCCT	Białko transmembranowe, transportujące jony potasu, komponent błony komórkowej.
<i>MDP0000254705</i> <i>Down-M.9K vs. M.9 -10</i>	CATTCCCATTCCCATTCCC ACTCCCCGACTCGTTTC- TCTCCACAACGGCTTCA GCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATCGAGATGATCACGATC- CAGACCGTCACCTACACCA GCCTCAGGGACCTCCTCCCGCCGTCGCCGAGCCATCGATC- TCGC	Białko proliferacji komórek o właściwościach czynnika wzrostowego.
<i>MDP0000208730</i> <i>Up-M.9K vs. M.9-12</i>	CATTCCCATTCCCATTCCC ACTCCCCGACTTTCTCC- TCCACAACGGCTTCCAGC GACGAGGTCGATGTCTCTGACATCGAGATGATCACGATCCA- GACCGTCACCTACACCAGC	Białko wiążące jony wapnia Ca <sup>2+</sup> (kalmodulina), regulujące procesy sekrecji.
<i>MDP0000310262</i> <i>DownM.9K vs. M.9-12</i>	CCACAACGGCTTCAGCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATC- GAGATGATCACGATCCAGAC CGTCACCTACACCAGCCTCACGGACTCCTCCGGCGTCGCC- GCAGCCATCGATCATGTCA CCGATTCACAATTCCAGCTGGCACACGACGAGACTTTCCGA- TAAAGAAACCC	Esteraza biorąca udział w hy- drolizie estrów zawierających domenę SGNH.
<i>MDP0000195260</i> <i>Down-M.9 K vs M.9 -14</i>	CCACAACGGCTTCAGCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATC- GAGATGATCACGATCCAGAC CGTCACCTACACCAGCCTCAGGGACTCCTCCCGCGTCGCC- GCAGCCATCGATCATGTCA CCGATTCACAATTCCAGC	Białko wiążące jony cynku, biorące udział w regulacji odporności na choroby.
<i>MDP0000920400</i> <i>Up- M.9 K vs M.9 -14</i>	CGTTTCTCCTCCACAACGGCTTCAGCGACGAGGTCGATGTC- TCTGACATCGAGATGATCA CGATCCAGACCGTCACCTACACCAGCCTCAGGGACCTCCTCC	Białko sekrecyjne, aktywowane w tkankach zranionych.
<i>MDP00007527209</i> <i>Down-P66K vs P 66 -10</i>	AGGAATGGAAGTGGCTGTGGTGATGCTACCAGGTGAGGTG- CAAGATCCCTCAGCATTGC AGCAGTGTGGGGTAACTACGGTGGTGACAGACCACGGC- GAAGGCGACAAGAAGTGAAGT TCATCTTCAGCCCAAGATCTTATGCAAAGTGGACAAACAC	Białko wiążące jony cynku.
<i>MDP0000301184</i> <i>Up-P 66K vs P 66 -10</i>	ACATGGAGTTTTTTCCTTAAGCACATAACTTGGTTTCTTTGTAT- CACGGTACTCTTGCCCTG CTCTATGTACCTCTCAATACACATATGTATCCTCTAGAGCA- ACATATTATGGTAGCCAG ATTGCTACGGGAACCCAACTGGAGCTTGTGGGTTTGGAGA- ATATGG	Białko integrujące błonę komórkową.

Tabela 2 cd.

Table 2 cd.

Typ regulacji w eksperymencie RNAseq, odczyty sekwencji oraz adnotacja funkcjonalna fragmentów DEG.

Type of regulation in the RNAseq experiment, sequence and functional annotation of DEG fragments.

Identyfikator genu/regulacja w badanym układzie porównawczym Gene ID/ type of gene regulation observed in comparable layout	Sekwencja Sequence	Adnotacja funkcjonalna Functional gene annotation
<i>MDP0000165364</i> <i>Down-P66 vs P66 -12</i>	TTAAGCACATAACTTGGTTTCTTGTATCACGGTACTCTTGCC- TGCTCTATGTACCTCTC AATACACATATGTATCCTCTAGAGCAACATATTATGGTAGCC- CAGATTGCTACGGGAACC CAACTGGAGCTTGTGGGTTTGGAGAATATGGCTC	Białko strukturalne błony komórkowej.
<i>MDP0000392485</i> <i>Up-P66 vs P66 -12</i>	ACAGCGATCGTTGGAGGAAGATTTCAAGATCATGGTTGCA- ATCAGCCTTTAATGTGGTTT GCGGTAGTCATTTTTTATGCTCGTCGATGTGTATGGTTGG- CATGTATATTCTGGCTATC CTATGTTCCACTCTTGGCCGTTCTGGTTCTAGGAGCCAAACT	Białko o aktywności liazy, katalizuje cięcie wiązań węglowych (C-C, C-O, C-N).
<i>MDP0000948602</i> <i>Down-P 66 K cs P66 -14</i>	AGACTCATATTCTGACACAGGAACAACGGGAAATCAGTGCC- CAGTTCTTGAAACAACCC TATGGAATCACATTCGCCGGAAAAACCCAGATGGCCGGTT- TCTCCGATGGCCGGGTCTCT CACCGATTCCTTGTCTAGGTTTATAGGAGTGAAGTCTCC	Czynnik transkrypcyjny, regulujący procesy zależne od DNA.
<i>MDP0000575908</i> <i>Down-P 66 K cs P66 -14</i>	AGACCATCCTTCACTCAAAAACGACGCTGTCGGGGTGTCTG- TAGGGTCGCCCGAGATTGA GTCAGCACCCGCGCTGCTTAAAGCCCTACTCGACTGCGC- CAGGCTCACCGAGTCGGACAC CGACCCGCGCGTCAAATCACTGATTCGACTCAGGGATC- GATCTCAGACCACGGAGATC	Białko strukturalne błony komórkowej.
<i>MDP0000127750</i> <i>Up-M.9 K vs M.9 -14</i>	TCACTCAAAAACGACGCTGTCGGGGTGTCTGTTAGGGTC- GCCCCGAGATTGAGTCAGCACC GCCGCTGCTTAAAGCCCTACTCGACTGCGCCAGGCTCACC- GAGTCGGACACCGACGCGCC GTCAAATCACTGATTCGACTCAGGGAATCGATCTCAGAC- CACGGAGATCCAACCG	Czynnik transkrypcyjny.
<i>MDP0000228546</i> <i>Up-M.9 vs M. -14</i>	TATGCTGCTTTCGACACTACACCATGTTGTATGGCCCAAGAG- TGGATGGTATGCAGTTCC CTTGACAAGCCTAATAGAAGTTTACAGGTGAAGAAAGCG- TATCAGAAAAGCAAGGCTGTCT GCCTCCAACCCA	Białko strukturalne błony komórkowej.
<i>MDP0000695032</i> <i>Down P 66 K vs. P 66 -14</i>	AATCCAACATTCGTATGCTGCTTTCGACACTACACCATGTTG- TATGGCCCAAGAGTGGAT GGTATGCAGTTCCCTTGACAAGCCTAATAGAAGTTTCA- CAGGTGAAGAAAGCGTATCAGA AAGCAAGGCTGTGCCTCCACCCA	Białko o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, fosforylujące reszty aminokwasowe w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne.

Adnotacje funkcjonalne przeprowadzono dla 4 000 genów wykazujących indukcję (*up regulation*) oraz 4000 genów podlegających inhibicji (*down regulation*) w badanych układach porównawczych eksperymentu RNAseq. Dla poszczególnych sekwencji identyfikatory GO (*gene ontology*) przypisano na podstawie pliku (gff) z opisem genów wyłonionych dla genomu *Malus domestica*.

Zestawiono pliki wynikowe zawierające: identyfikator genu *Malus domestica*, surowe dane dotyczące ilości zmapowanych do genu odczytów, estymowaną przez program DEseq2 zmianę krotności ekspresji (*fold change*) w pierwszej próbce względem drugiej próbki (skala logarytmiczna), wartość (p) wykonanego przez program DEseq2 testu statystycznego, *contig* (pokrycie) z referencyjnym genomem *Malus domestica*, w którym zawiera się dany gen, współrzędne początku i końca odczytu genu w *contigu* oraz terminy GO (*gene ontology terms*) związane z danymi dotyczącymi przewidzianej funkcji genu.

#### Ocena profili ekspresyjnych genów wytypowanych poprzez analizę NGS:

Do amplifikacji fragmentów dscDNA użyto łącznie 15 par oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych (Tab. 3) do sekwencji genów wytypowanych na podstawie odczytów sekwencji

zawartych w tabeli 2.

Dla 9 z badanych genów zaobserwowano różnicowane profile ekspresji w badanych materiale roślinnym.

W przypadku podkładki M.9 cztery wytypowane sekwencje genów o zdefiniowanej adnotacji: MD883315 (wykres 1b), MD7527209 (wykres 1e), MD228546 (-12°C) (wykres 1g) i MD392485 (-14°C) (wykres 1d) wykazały wzrost, a trzy: MD127750 (-14°C) (wykres 1a), MD575908 (-10°C) (wykres 1i) oraz MD301184 (-10°C) (wykres 1h) spadek poziomu transkryptu.

Dla podkładki P 66, wzrost poziomu transkryptu odnotowano w przypadku czterech DEG: MD883315, MD392485, MD165364 (dla prób traktowanych temp. -10°C) (wykresy 1b, d-f) i MD920400 (dla prób traktowanych temp. -12°C) (wykres 1c), natomiast cztery spośród badanych genów: MD127750, MD7527209, MD301184 (dla prób traktowanych temp. -10°C) i MD165364 (dla prób traktowanych -12°C) ulegały inhibicji (wykresy 1a, e, h, f).

Ponadto trzy z wytypowanych sekwencji genów: MD920400, MD163564 i MD7527209 (wykresy 1c, f, e.) ulegały nadekspresji, a jeden inhibicji (MD575908, wykres 1i) w genomach obu analizowanych podkładek. W przypadku pozostałych wytypowanych genów nie obserwowano zmian w profilach ekspresyjnych.

Tabela 3  
Table 3

#### Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów (qRT-PCR).

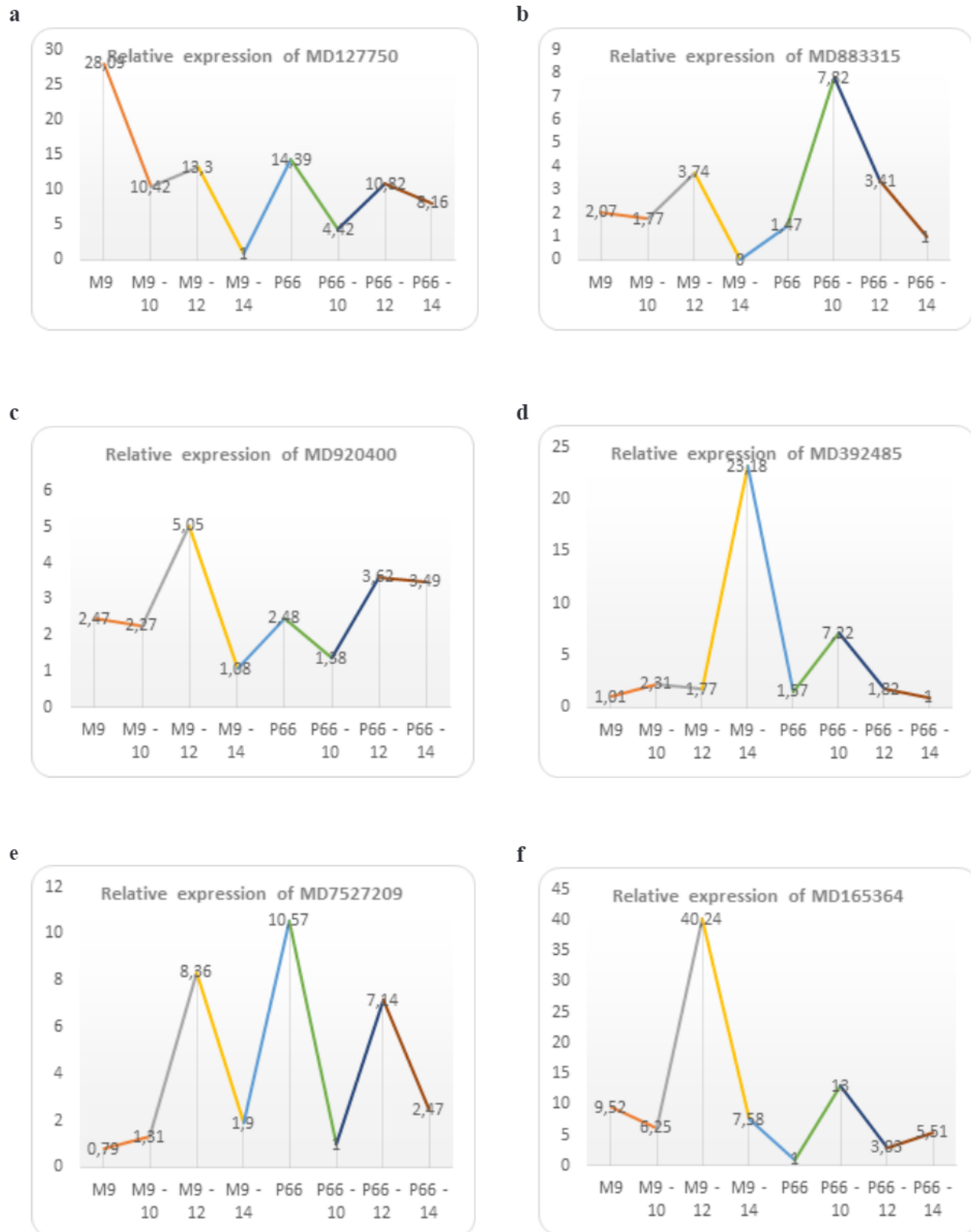
##### Sequences of designed oligonucleotides (qRT-PCR).

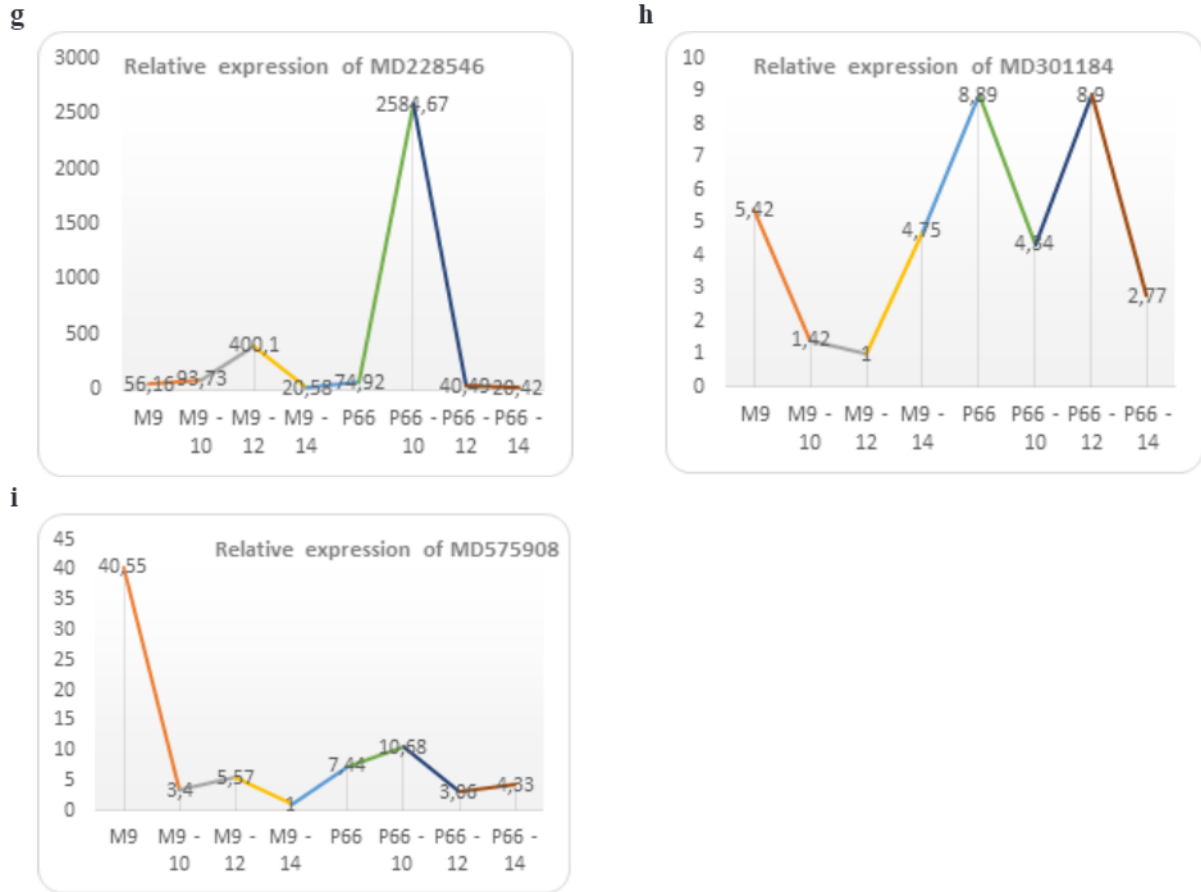
Identyfikator genu/ EST	SEKWENCJA 5' Sequence of Oligos 5'	SEKWENCJA 3' Sequence of Oligos 3'
ID of the gene/ EST		
<i>PAL</i> ( <i>gen ref.</i> )	tatcgaccaatttctgggtg	atgcagcatgtaaacctga
MD883315	tcacattcccattccattcc	catccatccaatgacaacct
MD254705	cattcccattccattccca	aggaggtccctgaggct
MD208730	cccattcccactccattc	tgtagggtgacggctggat
MD310262	cacaacggcttcagcga	ctttatcggaaagtctctcgt
MD195260	cacaacggcttcagcga	gctggaattgtgaatcgggta
MD920400	ctctccacaacggcttc	aggaggtccctgaggct
MD7527209	aggaatggaactggctgtg	gtgtttgtccactttgcat
MD301184	ttccttaagcacataactggtttc	aaaccacaagctccagtt
MD165364	tggttctttgatcacggtact	catattctccaaaccacaagc
MD392485	gcgatcgttgagggaagatt	tttggctcctagaaccagaac
MD948602	agactcatattctgacacaggaac	gagacttcactcctataaacctagc
MD575908	ttagggtcggccgagatt	tcctcgtggtctgagatcg
MD127750	ttagggtcggccgagatt	ttggatcctcgtggtctga
MD228546	atgctgctttcgacactaca	tgggttggaggcgacag
MD695032	ccaacattcgtatgctgcttc	gtggaggcacagccttg



Wykresy 1 a-i. Zmiany w poziomie ekspresji genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq.

Figures 1 a-i. Changes in the level of expression of the selected genes are based on the RNA-seq experiment.





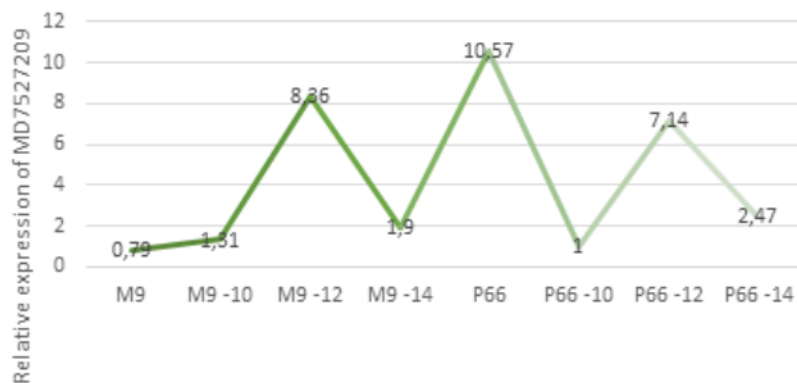
**Weryfikacja poziomu transkryptów genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq poprzez analizę porównawczą wyników uzyskanych metodą qRT-PCR**

Na podstawie analiz przeprowadzonych w oparciu o pomiary ekspresji wytypowanych sekwencji przeprowadzono weryfikację przypuszczalnych markerów mrozoodporności.

Spośród sekwencji transkryptomu, dla których testem qRT-PCR określono profil ekspresji

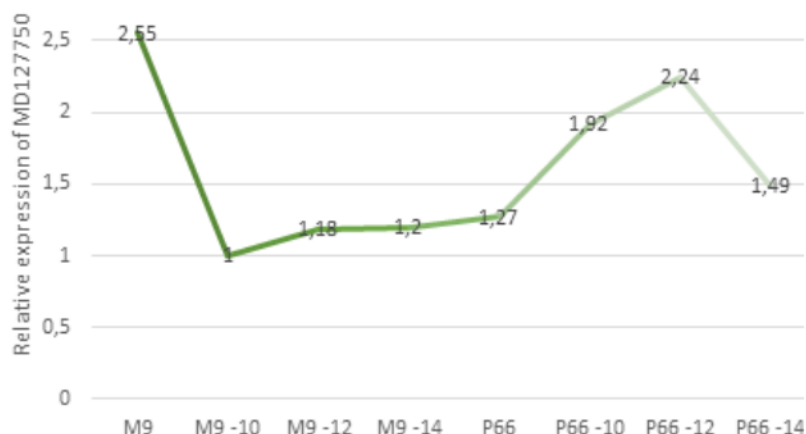
w podkładkach wzorcowych, trzy reprezentowały identyczny typ regulacji jak w badanych układach eksperymentalnych testu RNA-seq.

Spadek poziomu transkryptu (typ regulacji down) w obu przeprowadzonych testach, wywołany zastosowaniem niskiej temperatury, zaobserwowano dla genów: MD7527209 (wykres 3) (podkładka P 66), MD575908 (wykres 5) (podkładka P 66), MD127750 (wykres 4) (podkładka M.9).



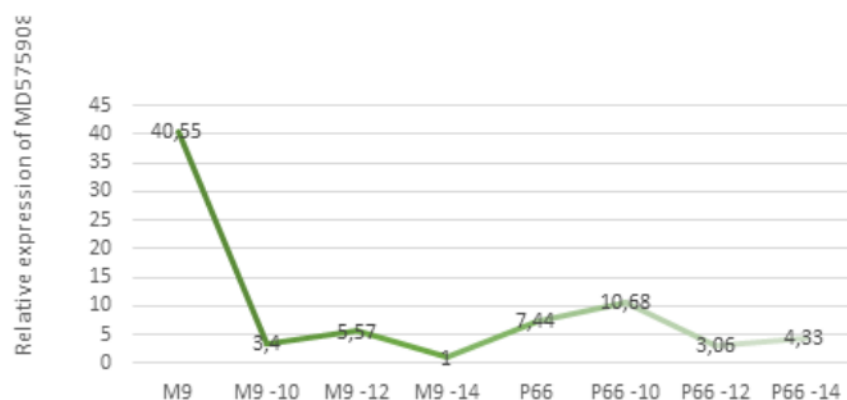
Wykres 2. Profil ekspresji genu MD7527209 uzyskany metodą qRT-PCR. Strzałkami wskazano typ regulacji (*down regulation*) genu w układzie eksperymentalnym prób porównanych po analizie transkryptomu podkładek jabłoni (P66 vs. P66 -10°C, tabela 2).

Figure 2. Expression profile of MD7527209 gene obtained by qRT-PCR method. The arrows indicate the type of down regulation of the gene in the experimental setup of samples compared after transcriptome analysis of apple rootstocks (P66 vs. P66 -10°C, Table 2).



Wykres 3. Profil ekspresji genu MD254705 uzyskany metodą qRT-PCR. Strzałkami wskazano typ regulacji (*down regulation*) genu w układzie eksperymentalnym prób porównanych po analizie transkryptomu podkładek jabłoni (M.9 vs. M.9 -10°C. tabela 2).

Figure 3. Expression profile of MD254705 gene obtained by qRT-PCR method. The arrows indicate the type of down regulation of the gene in an experimental set of samples compared after transcriptome analysis of apple rootstocks (M.9 vs. M.9 -10°C. Table 2).



Wykres 4. Profil ekspresji genu MD575908 uzyskany metodą qRT-PCR. Strzałkami wskazano typ regulacji (*down regulation*) genu w układzie eksperymentalnym prób porównanych po analizie transkryptomu podkładek jabłoni (P66 vs. P66 -12°C).

Figure 4. Expression profile of MD575908 gene obtained by qRT-PCR method. The arrows indicate the type of down regulation of the gene in an experimental set of samples compared after transcriptome analysis of apple rootstocks (P66 vs. P66 -12°C).

## Dyskusja

Mechanizm tolerancji roślin sadowniczych na mróz jest regulowany przez wiele genów i nie został dotychczas w pełni rozpoznany, a molekularna ocena zmian zachodzących w genomie roślinnym pod wpływem czynnika stresu, jest trudna (Lub. 1991). Autorzy zwracają uwagę na fakt, że poziom ekspresji genów zależy m.in. od genotypu, sposobu uprawy oraz warunków zewnętrznych/klimatycznych (Girardi i in. 2013). Ponadto Kalberer i współpracownicy (2006) zaobserwowali, że temperatura może regulować procesy mrozoodporności w różny sposób zarówno w roślinach aklimatyzowanych jak i nieaklimatyzowanych.

Obecnie rozpoznanych jest zaledwie kilka grup genów, które regulują te procesy w roślinach modelowych tj: rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), pomidor (*Lycopersicon* Mill.) oraz w niektórych gatunkach roślin sadowniczych jak brzoskwinia (*Prunus persica*), truskawka (*Fragaria x ananasa* Duch) i jabłoń (*Malus domestica* Borkh.) (Medina i in. 1999, 2011; Thomashow 1998; Chinnusamy i in. 2006). Są to geny z grupy: dehydryn (Takata i in. 2007, Artlip i in. 1997), geny CBF (*C-repeat Binding Factor*) (Wisniewski i in. 2007, 2011, Gilmour i in. 1998), geny z grupy *MADS box* i *DREB* (Du i in. 2008) oraz geny COR (*Cold Regulated*) (Wisniewski i in. 2007, Zhao i in. 2012, Feng



i in. 2012). Ostatnie badania potwierdziły także wpływ genów z grupy ERF (ethylene response factors: AP2 / ERF-uczestniczą w szlaku produkcji etylenu), w regulacji tolerancji roślin na mróz (Girardi i in. 2013).

Z uwagi na bardzo złożony i słabo rozpoznany mechanizm mrozoodporności roślin sadowniczych w niniejszych badaniach zastosowano bardzo czułe techniki oparte na analizie funkcjonalnej sekwencji transkryptomu podkładek ekstremalnie reagujących na stres niskich temperatur.

W przeprowadzonych badaniach analizie poddano materiał genetyczny dwóch podkładek jabłoni: M.9 wrażliwej, powszechnie stosowanej w polskich sadach produkcyjnych oraz P 66 charakteryzującej się wysokim stopniem tolerancji na działanie ujemnych temperatur. W prowadzonych doświadczeniach polowych potwierdzono również, że podkładka M.9 znacznie silniej reaguje na stres niskich temperatur niż np.: podkładki P 2, P 16, P 66 czy Antonówka (Quamm. 1990, Callesse. 1996). Tak zróżnicowany materiał pozwolił na prawidłową weryfikację uzyskanych odczytów sekwencji ich transkryptów.

Istotnym elementem w planowaniu tego typu prac jest znajomość/dostępność sekwencji genomu badanego gatunku. Jak wiadomo z dotychczasowych prac prowadzonych w tym zakresie, wielkość oszacowanego genomu referencyjnego jabłoni (diploid,  $2n=2x=34$ ) opracowanego dla odmiany 'Golden Delicious' wynosi 742,3 Mb (Velasco i in. 2010). Wiedza ta stanowiła podstawę prowadzenia badań, polegających na porównaniu sekwencji transkryptów względem bazy sekwencji genomowej gatunku *Malus*, podjętych przez Girardi i in. (2013) oraz Bai (2014), co pozwoliło na zdefiniowanie prawie 60 tys. genów funkcjonalnych, aktywowanych lub inhibowanych w genomach odmian 'Royal Gala' i 'Golden Delicious' (Wisniewski i in. 2008, Girardi i in. 2013, Bai i in. 2014).

Ponadto dzięki zastosowaniu różnorodnych dostępnych platform, takich jak Illumina Solexa, 454 Roche czy ABI-Solid, (Kumar i Blaxte. 2010) dotychczas opracowano i zdefiniowano ponad 800 milionów par zasad genomu *Malus* (Velasco i in. 2010). Niemniej jednak zastosowanie metody sekwencjonowania *de novo* (bez znajomości genu referencyjnego), także umożliwiło odczytanie ponad 71 tysięcy nowych genów funkcjonalnych/transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w genomie tego gatunku (Imelfort i Edward. 2009, X. 2010, Edwards i Batle. 2010, Bai i in. 2014).

Jak podają autorzy, przed sekwencjonowaniem całych genomów, fragmenty o wysokiej masie

cząsteczkowej DNA (cząsteczka DNA z kilku Mb) rozdrobione są na małe kawałki (500 bp do 135 Kbp) i użyte do konstruowania genomowych bibliotek. Xu (2010) przy zastosowaniu metody Illumina dla genomu *Malus* uzyskał 39,2 milionów odczytów sekwencji takich bibliotek, co stanowi ok. 13 miliarda nowo wygenerowanych i zsekwencjonowanych nukleotydów. Analiza bioinformatyczna i złożenie 39,2 milionów odczytów doprowadziło do sporządzenia 122 146 kontigów sumarycznych o długości 604 Mb, które można poddawać adnotowaniu (Xu. 2010). Należy zwrócić uwagę, że ilość sekwencji uzyskana w przeprowadzonych badaniach wyniosła ponad 500 tys. zróżnicowanych transkryptów o rozpoznanej funkcji biologicznej, co znacznie wzbogaca bazę sekwencyjną transkryptomu badanych dwóch podkładek jabłoni. Technologia NGS, zastosowana w opisanych badaniach, umożliwiła wyłonienie genów kodujących m.in. białka strukturalne błony komórkowej, białka integralne błony komórkowej oraz czynniki transkrypcyjne. Z dotychczasowych badań wiadomo, że grupy właśnie tych genów są bardzo silnie zaangażowane w regulację odporności na niskie, ujemne temperatury u roślin drzewiastych i jako pierwsze ulegają aktywacji pod wpływem stresu (Orvar i in. 2000).

Pomimo wysokiej czułości metody RNAseq pozwalającej na ujawnienie specyficznego zestawu genów, indywidualne pomiary ekspresji techniką NGS i qPCR bywają niespójne (Everaert i in. (//)). Niski stopień korelacji (zaledwie kilka%) ekspresji genów zidentyfikowanych metodą qRT-PCR i RNAseq zaobserwowano również w niniejszych badaniach, jednak brak precyzyjnych doniesień w tym zakresie. Przeprowadzona weryfikacja wytypowanych sekwencji o zróżnicowanej ekspresji w podkładkach ekstremalnie reagujących na działanie niskich temperatur umożliwiła wybór trzech (z dziewięciu przeanalizowanych) genów o identyfikatorach: MD7527209, MD127750, MD575908, dla których zweryfikowano stabilny typ regulacji.

Ze względu na potrzebę ukierunkowania hodowli na wytwarzanie podkładek dpornych na mróz, uzyskane wyniki poszerzają wiedzę dotyczącą regulacji mechanizmu ich tolerancji na poziomie molekularnym, a tym samym mogą istotnie wspierać prace genetyczno-hodowlane w tym zakresie.

Ponadto utworzona baza sekwencyjna stanowić będzie podstawę do sporządzenia markerów molekularnych, w przyszłości wykorzystanych do wczesnej selekcji pożądanych genotypów podkładek jabłoni.

## Wnioski

1. Dla badanych podkładek zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresji badanych genów.
2. Fragmenty trzech genów (wytypowane z eksperymentu RNA-seq) stanowią potencjalne sekwencje kandydujące do sporządzenia markerów funkcjonalnych, umożliwiając monitorowanie tolerancji podkładek jabłoni na niskie temperatury.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR.hm.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r. Zadanie nr 73.*

## Literatura

- Artlip, T. S., Callahan, A.M., Bassett, C.L., Wisniewski, M.E. (1997). Seasonal expression of a dehydrin in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Molecular Biology*, 33: 61–70.
- Aygun, A. (2005). The late spring frost hardiness of some apple varieties at various stage of flower buds. *Tarim Bilimeri Degrisi*, 11 (3): 283–285.
- Bai Y, Dougherty, L., Xu, K. (2014). Towards an improved apple reference transcriptome using RNA-seq. *Mol. Genet Genomics*, 289: 427–438.
- Callesen, O. (1996). Testing 20 apple rootstocks. VI Inter-Symposium on Integrated Canopy, Rootstock, Environmental Physiol.in Orchard Systems. *Acta Hort.*, 451: 137–146.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J. K. (2006). Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.*, 126: 52–61. DOI: 10.1111/j.1399–3054.2006.00596.
- Du, X., Xiao, Q., Zhao, R., Wu, F., Xu, Q., Chong, K., Meng, Z. (2008). *TrMADS3*, a New Mad-box gene, from a perennial species *Taihangiarupestris* is upregulated by cold and experiences seasonal fluctuation in expression level. *Dev. Genes Evol.*, 218: 281–292.
- Edwards, D., Batley, J. (2010). Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (10): 2–9.
- Feng M-X., Zhao, Q., Zhao L-L., Qiao, Y., Xie X-B., Li H-F., Yao Y-X., You C-X., Hao Y-J. (2012). The cold-induced basis helix-loop-helix transcription factor gene *MdCI-bHLH1* encodes an ICE-like protein in apple. *Plant Biology*, 12: 22.
- Gilmour, S. J., Zarka, D.G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton J. M., Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold induced COR gene expression. *The Plant Journal*, 16: 433–442. DOI: 10.1046/j.1365–313x.1998.00310.
- Girardi, C. L., Rombaldi, C. V., Cero, J. D., Nobile, P. M., Laurens, F., Bouzayen, M., Quecini, V. (2013). Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in apple and transcriptional evidence of ERF involvement in scab pathogenesis. *Scientia Horticulturae*, 151: 112–121.
- Everaert C, Luybaert M, Maag, J. L. V., Cheng, Quek Xiu, Marcel, E. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using wholetranscriptomeRT-qPCR expression. *Nature*: 7. 1559. DOI: 10.1038/s41598–017–01617–3
- Imelfort, M., Edwards, D. (2009). De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. *Briefings in Bioinformatics*, 10 (6): 609–618.
- Kalberer, S., Wisniewski, M., Arora, R. (2006). Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts. *Plant Science*, 171: 3–16.
- Kumar, S., Blaxter M. L. (2010). Comparing *de novo* assemblers for 454 transcriptome data. *BMC Genomics*, 11: 571.
- Luby, J. J. (1991). Breeding cold-hardy fruit crops in Minnesota. *HortSci.*, 26: 507–512.
- Medina, J., BARGUES, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., Salinas, J. (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.*, 119: 463–469.
- Medina, J., Catalá, R., Salinas, J. (2011). The CBFs: Three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science*, 180: 3–11.
- Orvar Bjorn, L., Sangwan, V., Omann, F., Dhirtda, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin, cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, 23 (6): 785–794.
- Quamme, H.A. (1990). Cold hardiness of apple rootstocks. *Com.Fruit Tree*, 23: 11–16.
- Takata, N., Kasuga, J., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S. (2007). Gene expression associated with increased supercooling capability in xylem parenchyma cells of larch (*Larix kaempferi*). *Journal of Experimental Botany*, 58 (13). 3731–3742.
- Thomashow, M. F. (1998). Role of Cold-Responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.*, 118: 1–7. DOI: org/10.1104/pp.118.1.1.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S. K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L. M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J. T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niaz, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T.,

- King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagné, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouzé, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42 (10): 833–841.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Gusta, V. L. (2003). An overview of cold hardiness in woody plants: Seeing the forest through the trees. *HortScience*, 38 (5): 952–959.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Artlip, T. (2007). Using biotechnology to improve resistance to environmental stress in fruit crops: The importance of understanding physiology. *Acta Hort.*, 738: 145–156.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Macarasin, D., Artlip, T., Gasic, K., Korban, S. (2008). Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. *Physiologia Plantarum*, 133: 298–317.
- Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T., Macarasin, D. (2011). Ectopic expression of novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus x domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*, 233 (5): 971–983.
- Xu. (2010). The Apple genome: A delicious promise. *New York Fruit Quarterly*, 18 (4): 11–14
- Zeng, Ying, Yang, Tao (2002): RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 417–417
- Zhao, T., Liang, D., Wang, P., Liu, J., Ma F. (2012). Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*, 287: 423–436.



# Ocena wzrostu i stabilności genetycznej agrestu (*Ribes grossularia* L.) rozmnażanego *in vitro* oraz *ex vitro*

Assessment of growth and genetic stability of gooseberry (*Ribes grossularia* L.) propagated *in vitro* and *ex vitro*

Danuta Kucharska<sup>1</sup>, Danuta Wójcik<sup>1</sup>, Aleksandra Trzewik<sup>1</sup>

Instytut Ogródnictwa, Zakład Biologii Stosowanej, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3 96–100 Skierniewice  
✉ e-mail: danuta.kucharska@inhort.pl

Celem badań była ocena fenotypowa i genetyczna roślin 15 genotypów agrestu, rozmnożonych *in vitro* oraz *ex vitro* przez sadzonki zielne, uprawianych drugi rok warunkach polowych. Silniej rosły krzewy rozmnożone *in vitro*. Ich wysokość i liczba pędów były istotnie większe dla 11 genotypów, a szerokość dla 12 genotypów agrestu. Krzewów, na których pojawiły się owoce było znacznie więcej u roślin mnożonych tradycyjnie. Przeprowadzono analizę stabilności genetycznej klonów pochodzących z kultur *in vitro* pięciu odmian agrestu. Analizowano 13–15 roślin z *in vitro* oraz rośliny mateczne. Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wahała się od 33 do 108. Najwyższą całkowitą liczbę produktów amplifikacji uzyskano w wyniku reakcji AFLP dla roślin 'Hinnonmaki Rot' (300), a najmniejszą dla odmiany 'Hinsel' i 'Resika' (262). Zmienność genetyczna w roślinach agrestu *in vitro* wahała się od 1,03% dla 'Captivator' do 10,3% w przypadku 'Hinsel'. Stabilność genetyczną oceniano także przy użyciu markerów ISSR. Wykorzystano rośliny 5 genotypów pochodzące z rozmnażania tradycyjnego oraz *in vitro*. Uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji, z czego 2,8% było polimorficznych. Wielkość otrzymanych produktów wynosiła od 250 do 2900 pz, w zależności od startera i odmiany. Analiza ISSR-PCR wskazała na różny stopień polimorfizmu – od 0 dla 'Hinnonmaki Rot' i 'Resica' do 11,6% dla odmiany 'Hinsel'.

**Słowa kluczowe:** AFLP, agrest, DNA, ISSR, kultury *in vitro*, polimorfizm

The aim of the study was to evaluate phenotypically and genetically, 15 gooseberry genotypes plants propagated *in vitro* and *ex vitro* by cuttings grown in the second year in field conditions. The outcome of this was that *in vitro* propagated shrubs were shown to grow more strongly. Their height and the number of shoots were significantly higher for the 11 genotypes and a width of 12 genotypes for gooseberry. However, fruit abundance was greater in much more traditionally multiplied plants. Beyond the aforementioned, Genetic stability analysis of clones derived from *in vitro* cultures of five gooseberry varieties was performed. Herein, 13–15 plants with *in vitro* and mother plants were analyzed. The number of products generated by the AFLP primer pairs ranged from 33 to 108. The highest total number of amplification products was obtained as a result of the AFLP reaction for the plants 'Hinnonmaki Rot' (300), and the lowest for the varieties 'Hinsel' and 'Resika' (262). Genetic variability in gooseberry *in vitro* plants ranged from 1.03% for 'Captivator', to 10.3% for 'Hinsel'. Genetic stability was also assessed using ISSR markers. Plants of five genotypes derived from conventional and *in vitro* reproduction were used. Accordingly, a total of 2294 amplification products were obtained, of which 2.8% were polymorphic. The size of the obtained products was from 250 to 2900 bp, depending on the starter and variety. ISSR-PCR analysis showed different degrees of polymorphism - from 0 for the 'Hinnonmaki Rot' and 'Resica' to 11.6% for the 'Hinsel' variety.

**Key words:** AFLP, gooseberry, DNA, ISSR, *in vitro* cultures, polymorphism

## Wstęp

W badaniach prowadzono obserwacje i ocenę fenotypową roślin agrestu rozmnożonych *in vitro* oraz *ex vitro*, rosnących w doświadczeniu odmianowo – porównawczym, w warunkach polowych. Analizowano również zmienność somaklonalną 5 genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP oraz jednorodność genetyczną sadzonek *in vitro* i rozmnożonych tradycyjnie z zastosowaniem markerów ISSR.

## Material i Metody

Material badawczy stanowiły rośliny 8 odmian i 7 klonów hodowlanych agrestu, rozmnożone *in vitro* oraz *ex vitro* przez sadzonki zielne, rosnące 2 rok w doświadczeniu odmianowo – porównawczym w układzie bloków losowych, w 3 powtórzeniach, po 5 roślin na poletku. Mierzono wysokość, szerokość, liczbę nowych pędów oraz pojawianie się owoców. Dane parametrów wzrostu poddano analizie statystycznej

przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (Statistica 13.1), oddzielnie dla każdego genotypu oraz parametru i porównano za pomocą testu Tukeya przy  $p = 0.05$ .

Przeprowadzono analizę zmienności genetycznej odmian agrestu: 'Captivator', 'Hinnonmaki Rot', 'Hinsel', 'Invicta' i 'Resika'. Dla każdej z odmian analizie poddano 13–15 roślin rozmnożonych *in vitro* oraz rośliny mateczne. Badanie zmienności genetycznej przeprowadzono z wykorzystaniem techniki AFLP według Zabeau i Vos (1993), w dwóch powtórzeniach.

Przeprowadzono także ocenę jednorodności genetycznej sadzonek wegetatywnych i mikro-rozmnażanych dla wymienionych odmian. Analizy prowadzono z wykorzystaniem markerów ISSR. Z każdej odmiany agrestu pobrano młode liście z 10 sadzonek wegetatywnych i 10 sadzonek pochodzących z kultur *in vitro*. Do izolacji genomowego DNA użyto ok. 100 mg utartej tkanki roślinnej. Izolacje prowadzono w dwóch powtórzeniach, przy pomocy komercyjnych zestawów: DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), NucleoSpin® 96 Plant kit (Macherey-Nagel) i DNA Plant/Fungi DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.). Uzyskane preparaty

DNA analizowano spektrofotometrycznie Epoch (BioTek) i obliczono stężenie genomowego DNA oraz wartość współczynnika 260/280 nm, pozwalającego na ocenę czystości preparatów, które wykorzystano w analizie ISSR-PCR. Amplifikację DNA dla każdego genotypu przeprowadzono dwukrotnie z każdym z 5 wybranych starterów. Oceniono całkowitą liczbę produktów ISSR-PCR, obecność i liczbę produktów polimorficznych oraz obliczono poziom polimorfizmu w badanych genotypach.

## Wyniki

Parametry wzrostu 15 ocenianych genotypów agrestu wskazują, że silniej rosły krzewy rozmnożone *in vitro* (tab. 1). Wysokość oraz liczba pędów krzewów z *in vitro*, w porównaniu do rozmnażanych przez sadzonki zielne, były istotnie większe w roślinach 11 genotypów, a szerokość krzewów była istotnie większa w roślinach 12 genotypów. Procent krzewów z owocami był wyższy u roślin *ex vitro* dla 11 genotypów agrestu.

Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wahała się od 33 do 108, średnio wynosiła 52,2. Najwyższą całkowitą liczbę produktów amplifikacji uzyskano dla roślin 'Hinnonmaki

Tabela 1

Table 1

Wysokość, szerokość, liczba pędów i procent roślin z owocami u krzewów agrestu rozmnożonych *in vitro* oraz *ex vitro* (n=15).

Height, width, number of shoots and percentage of plants with fruit in gooseberry bushes propagated *in vitro* and *ex vitro* (n=15).

Genotyp Genotype	Wysokość [cm] Height [cm]		Szerokość [cm] Width [cm]		Liczba pędów [szt.] Number of shoots [pcs.]		Rośliny z owocami [%] Plants with fruits [%]	
	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>
Biały Triumf	*26,9 b	19,9 a	30,6 b	18,3 a	6,2 a	6,9 a	0	33,0
Captivator	46,3 a	48,1 a	54,7 b	49,8 a	14,0 b	7,7 a	86,7	93,3
Hinnonmaki Rot	36,1 a	36,2 a	51,9 a	53,7 a	14,2 b	10,7 a	53,3	100
Hinsel	51,3 b	37,5 a	43,3 a	54,3 b	9,8 a	11,3 a	6,7	53,3
Invicta	38,2 b	30,9 a	44,1 b	37,7 a	10,1 a	7,9 a	20,0	66,6
Kamieniar	31,6 b	25,0 a	37,1 b	25,6 a	10,1 b	5,7 a	13,3	60,0
Pax	32,2 a	31,7 a	42,3 b	31,3 a	11,1 b	5,5 a	0	26,6
Resika	47,6 a	52,6 b	39,7 a	46,7 b	12,1 b	7,5 a	0	53,3
AGR-2/2	37,1 b	30,1 a	45,5 b	37,5 a	16,0 b	6,1 a	20,0	41,7
AGR-2/33	37,8 b	24,5 a	49,0 b	25,5 a	12,8 b	4,3 a	60,0	23,1
AGR-86	48,9 b	30,6 a	60,5 b	47,8 a	12,7 b	7,0 a	20,0	0
AGR-101	52,0 b	22,5 a	68,5 b	25,9 a	24,9 b	4,0 a	33,3	57,1
AGR-102	41,7 b	26,4 a	60,7 b	28,3 a	15,9 b	5,0 a	26,6	44,4
AGR-108	52,2 b	37,6 a	47,8 b	33,2 a	10,2 a	8,0 a	0	0
AGR-117	60,8 b	38,8 a	74,1 b	44,7 a	14,5 b	8,5 a	6,7	0

\*średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie  $p=0,05$  wg testu Tukeya

\*means followed by the same letter, were not significantly acc. to Tukey's test.

Rot' (300), a najmniejszą dla odmian 'Hinsel' i 'Resika' (262). Zmienność genetyczna analizowana metodą AFLP w roślinach z *in vitro* różniła się dla poszczególnych odmian i wahała się od 1,03% dla odmiany 'Captivator' do 10,3% w przypadku odmiany 'Hinsel', w przypadku tej odmiany reakcje AFLP-PCR ze wszystkimi 5 parami starterów generowały produkty polimorficzne. Dla pozostałych

odmian produkty polimorficzne uzyskano w reakcji z 2–3 parami starterów (tab. 2, rys. 1).

Uzyskano DNA o stężeniu od 7,8 do 55,1 ng/μl i wartości współczynnika 260/280 nm od 1,61 do 2,00. W wyniku analizy ISSR-PCR z pięcioma starterami dla 5 badanych genotypów uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji (tab. 3), z czego 64 (2,8%) produktów było polimorficznych.

Tabela 2  
Table 2

**Analiza markerów AFLP w roślinach 5 odmian agrestu pochodzących z kultur *in vitro* oraz roślin matecznych.**

**Analysis of AFLP markers in plants of 5 gooseberry cultivars obtained from *in vitro* and donor plants.**

Odmiana Cultivar	Startery Primers	Liczba produktów amplifikacji Number of amplification products		Polimorfizm % Polymorphism %
		Całkowita Total	Polimorficznych Polymorphic	
'Captivator'	Pst-AT/Mse-CG	71	0	0
	Pst-TA/Mse-GA	103	2	1,94
	Pst-AGC/Mse-CT	37	0	0
	Pst-CAG/Mse-TG	43	0	0
	Pst-GTC/Mse-AC	37	1	2,70
Ogółem: Total:		291	3	1,03
'Hinsel'	Pst-AT/Mse-CG	60	10	16,66
	Pst-TA/Mse-GA	62	3	4,83
	Pst-AGC/Mse-CT	47	8	17,02
	Pst-CAG/Mse-TG	56	4	7,14
	Pst-GTC/Mse-AC	37	2	5,40
Ogółem: Total:		262	27	10,30
'Hinnonmaki Rot'	Pst-AT/Mse-CG	59	0	0
	Pst-TA/Mse-GA	108	0	0
	Pst-AGC/Mse-CT	38	0	0
	Pst-CAG/Mse-TG	58	1	1,72
	Pst-GTC/Mse-AC	37	3	8,10
Ogółem: Total:		300	4	1,33
'Invicta'	Pst-AT/Mse-CG	58	1	1,72
	Pst-TA/Mse-GA	79	1	1,03
	Pst-AGC/Mse-CT	41	1	2,43
	Pst-CAG/Mse-TG	68	0	0
	Pst-GTC/Mse-AC	42	0	0
Ogółem: Total:		288	3	1,04
'Resika'	Pst-AT/Mse-CG	54	1	1,85
	Pst-TA/Mse-GA	36	0	0
	Pst-AGC/Mse-CT	33	4	12,2
	Pst-CAG/Mse-TG	92	0	0
	Pst-GTC/Mse-AC	47	2	4,25
Ogółem: Total:		262	7	2,67



Tabela 3

Table 3

Analiza markerów ISSR w roślinach 5 odmian agrestu pochodzących z kultur *in vitro*, *ex vitro* oraz roślin matecznych.

Analysis of ISSR markers in plants of 5 gooseberry cultivars obtained from *in vitro*, *ex vitro* and donor plants.

Odmiana Cultivar	Starter Primer	Wielkość produktów(pz) The size of products (bp)	Liczba produktów amplifikacji Number of amplification products		Polimorfizm % Polymorphism %
			Ogółem Total	Polimorficzne Polymorphic	
'Captivator'	822	650 – 1300	63	0	0
	825	280 – 1200	112	7	6,4
	830	500 – 1000	105	0	0
	848	500 – 1000	84	0	0
	849	500 – 2900	147	0	0
'Hinnonmaki Rot'	823	450 – 1100	84	0	0
	825	280 – 1300	126	0	0
	834	280 – 1050	105	0	0
	840	450 – 1500	105	0	0
	853	700 – 1400	63	0	0
'Hinsel'	825	250 – 1300	105	4	3,8
	834	500 – 1200	67	5	7,5
	848	500 – 2500	75	17	22,7
	849	400 – 1380	95	11	11,6
	853	400 – 1500	64	10	15,6
'Invicta'	821	550 – 2000	47	5	10,6
	825	250 – 1200	90	5	5,6
	834	260 – 750	42	0	0
	849	400 – 2000	168	0	0
	853	600 – 1500	84	0	0
'Resika'	821	350 – 2000	105	0	0
	822	650 – 1250	63	0	0
	825	250 – 1300	84	0	0
	834	500 – 1200	126	0	0
	849	500 – 1200	84	0	0

Wielkości otrzymanych produktów amplifikacji wahały się w granicach 250 – 2900 pz, w zależności od startera i odmiany. Zastosowane startery różniły się w ilości generowanych produktów PCR, ich liczba w odmianie 'Invicta' wahała się od 42 dla startera 834 do 168 dla startera 849. Analiza ISSR-PCR wskazała na różny stopień polimorfizmu od jego braku, w przypadku odmian 'Hinnonmaki Rot' i 'Resika', do 11,6% dla odmiany 'Hinsel' (tab. 3, rys. 2, 3).

## Dyskusja

Parametry wzrostu krzewów odmian i klonów hodowlanych agrestu, w drugim roku wegetacji w warunkach polowych, potwierdzają wpływ sposobu wegetatywnego rozmnażania agrestu przy użyciu sadzonek zielnych lub *in vitro* ma wpływ na wzrost, pokrój i wigor roślin, a także szybkość

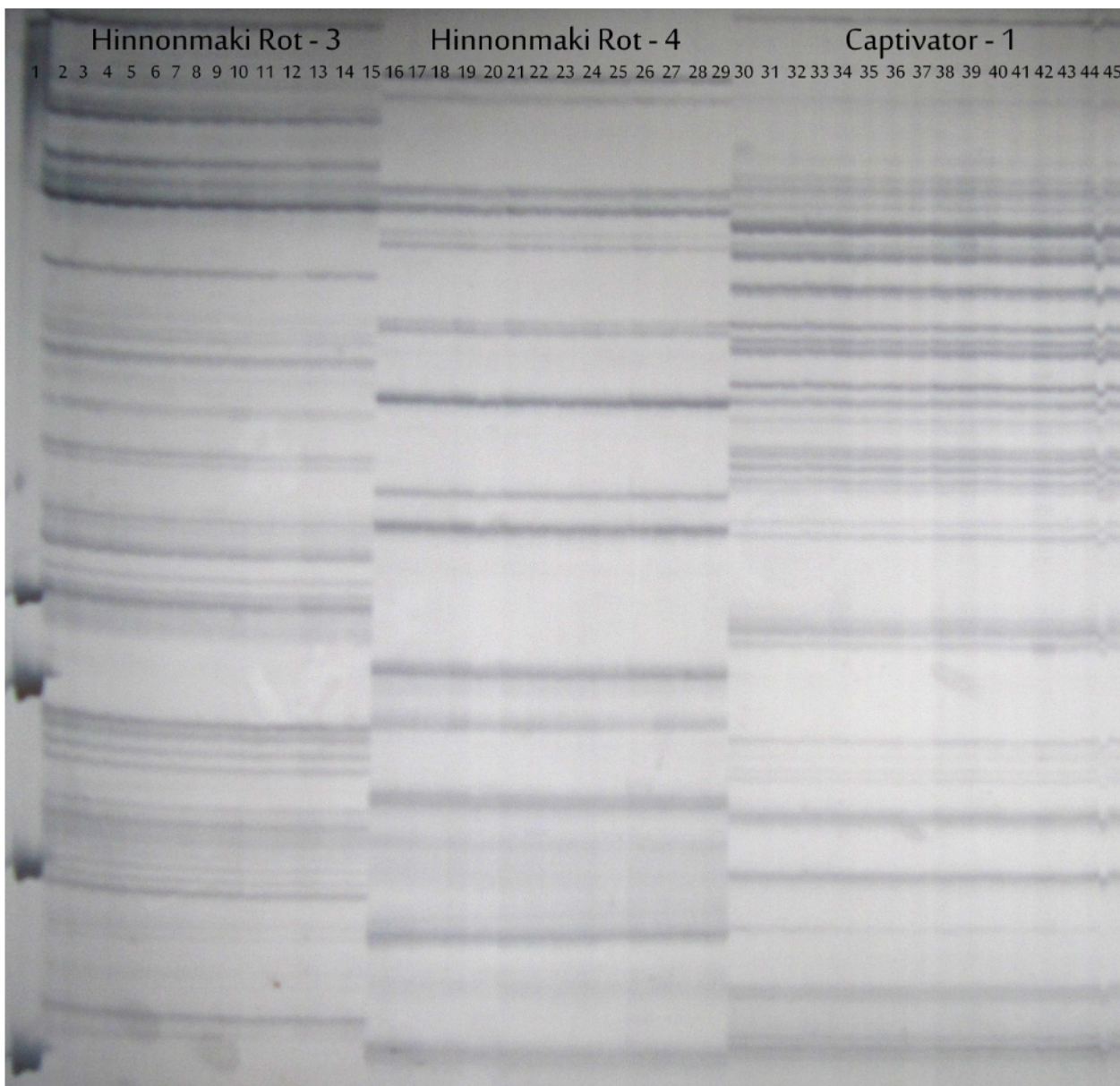
wchodzenia w fazę owocowania. Z wielu doniesień wiadomo, że rośliny pochodzące z kultury *in vitro* mają większy wigor i bardziej dynamiczny przyrost biomasy (Dubois i in. 1988; Howard i in. 1989; Drew i Smith 1990). Potwierdziły to także nasze obserwacje, w których wysokość, szerokość oraz liczba pędów krzewów agrestu rozmnażanych *in vitro* były istotnie większe w porównaniu do krzewów rozmnażanych przez sadzonki zielne dla większości genotypów. Nasze obserwacje o bujniejszym wzroście agrestu z *in vitro* są pionierskie i potwierdzają doniesienia dotyczące wzrostu innych roślin jagodowych mnożonych *in vitro*.

Opublikowano wiele doniesień dotyczących zastosowania technik *in vitro* do namnażania różnych gatunków roślin z rodzaju *Ribes* (Podwyżsyńska i in. 2006, Sedlák i Paprštejn 2012, Podwyżsyńska i Pluta 2019). Tylko kilka z nich dotyczy

możliwości efektywnego mnożenia *in vitro* agrestu (Welander 1985, Wainwright i Flegmann 1986, Reed i Hummer 2002). Kucharska i in. (2020) opisują znaczenie metatopoliny (m-T), zastosowanej zamiast benzyloaminopuryny (BAP), w opracowaniu skutecznej i efektywnej metody mikrorozmnażania 14 genotypów agrestu.

W kulturach *in vitro* roślin jagodowych utrzymywanych przez dłuższy czas często zdarza się

pojawianie zmienności somaklonalnej. Markery molekularne uzyskane przy pomocy technik takich jak: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD), amplifikacja z udziałem arbitralnych starterów PCR (AP-PCR), fingerprinting, proste sekwencje powtarzalne (SSR) a także polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (AFLP) są wykorzystywane jako narzędzia



Rys. 1. Fragment elektroforegramu produktów AFLP-PCR; 1 – marker wielkości DNA 50 pz (50 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); 2-15 – reakcja DNA roślin odmiany Hinnonmaki Rot ze starterami Pst-AGC/Mse-CT (2-14 – rośliny z kultur *in vitro*, 15 - roślina mateczna); 16-29 - reakcja DNA roślin odmiany Hinnonmaki Rot ze starterami Pst-CAG/Mse-TG (16-28 – rośliny z kultur *in vitro*, 29 - roślina mateczna); 30-45 - reakcja DNA roślin odmiany Captivator ze starterami Pst-AT/Mse-CG (30-44 – rośliny z kultur *in vitro*, 45 - roślina mateczna)

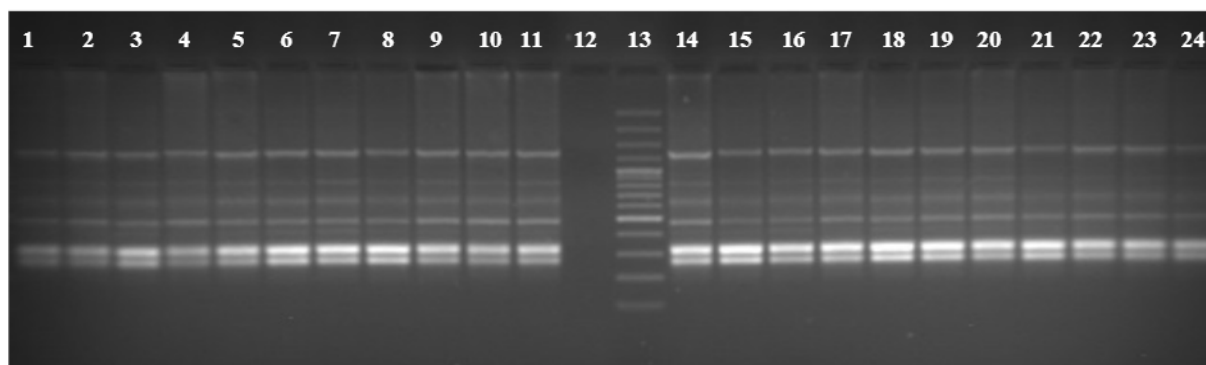
Fig. 1. Fragment of electrophoretic banding pattern of AFLP-PCR; 1 – 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 2-15 – reaction of DNA of Hinnonmaki Rot plants with Pst-AGC/Mse-CT primers (2-14 – *in vitro*-derived plants, 15 - donor plant); 16-29 - reaction of DNA of Hinnonmaki Rot plants with Pst-CAG/Mse-TG primers (16-28 – *in vitro*-derived plants, 29 - donor plant); 30-45 - reaction of DNA of Captivator plants with Pst-AT/Mse-CG primers (30-44 – *in vitro*-derived plants, 45 - donor plant)



do badania zmienności somaklonalnej, ale także do identyfikacji genotypów, badania tożsamości odmianowej oraz określania pokrewieństwa w obrębie wielu gatunków roślin sadowniczych, w tym z rodzaju *Ribes* (Lanham i Brennan 2001, Brennan i in. 2008, Cavanna i in. 2009). W naszych badaniach zdecydowaliśmy się zastosować technikę AFLP ponieważ została ona uznana za najefektywniejszą w detekcji polimorfizmu DNA u agrestu (Lanham i Brennan, 1999a) oraz jest szeroko stosowana w przypadku u innych gatunków (Bahulikar i in. 2004, Meudt i Clarke 2007, Kumar i in 2013, Costa i in. 2016).

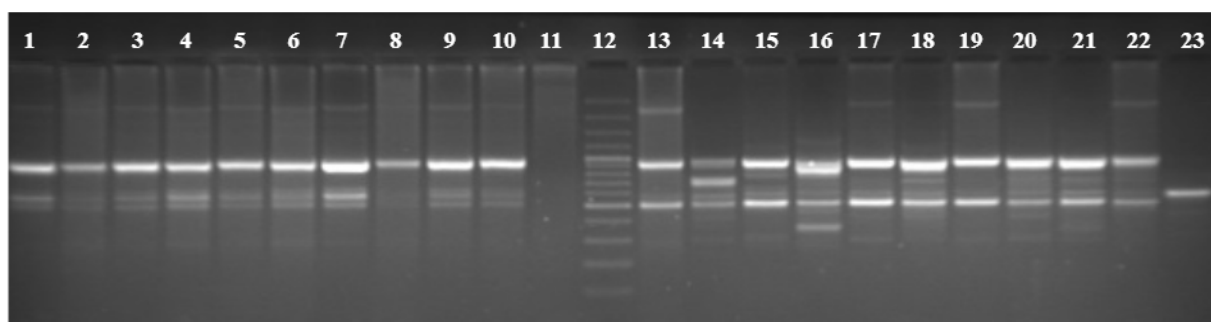
Markery oparte na DNA uzyskanym w reakcjach RAPD oraz ISSR-PCR były stosowane do scharakteryzowania genotypów skolekcjonowanych

w banku genów i używanych w programach hodowlanych IO takich roślin jak: truskawki, jabłonie, porzeczka czerwona i czarna oraz agrest (Korbin i in. 2002). W badaniach nad polimorfizmem 12 odmian agrestu Lanham i Brennan (1999a, 1999b, 2001) wykazali, że użycie starterów ISSR nie pozwoliło na odróżnienie od siebie 3 odmian. W naszych pracach zastosowane startery ISSR pozwoliły na odróżnienie 5 badanych genotypów agrestu. Największy polimorfizm uzyskano dla odmiany 'Hinsel', w której każdy z pięciu testowanych starterów wykazywał obecność produktów polimorficznych (tab. 3, rys. 3). Tak duża zmienność odmiany 'Hinsel', w porównaniu to innych badanych genotypów, świadczy o jej niestabilności genetycznej.



Rys. 2. Elektroforegram produktów PCR z zastosowaniem startera 825 dla odmiany Hinnonmaki Rot, ścieżka 1 i 14: roślina mateczna, 2–11: sadzonki z kultur *in vitro*, 12: kontrola negatywna, 13: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 14–24 sadzonki vegetatywne

Fig. 2. Electrophoretic banding pattern of PCR products using primer 825 for cultivar Hinnonmaki Rot, lane 1 and 14: donor plant, 2–11: seedlings from cultures *in vitro*, 12: negative control, 13: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 14–24 vegetative seedlings



Rys. 3. Elektroforegram produktów PCR z zastosowaniem startera 848 dla odmiany Hinsel, ścieżka 1–10: sadzonki z kultur *in vitro*, 11: kontrola negatywna, 12: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 13: roślina mateczna, 14–23 sadzonki vegetatywne

Fig. 3. Electrophoretic banding pattern of PCR products using primer 848 for cultivar Hinsel, lane 1–10: seedlings from cultures *in vitro*, 11: negative control, 12: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 13: donor plant, 14–23: vegetative seedlings



**Wnioski**

1. Wysokość, szerokość oraz liczba pędów krzewów z *in vitro*, w porównaniu do rozmnażanych *ex vitro*, były istotnie wyższe dla większości ocenianych genotypów agrestu.
2. Potwierdzono skuteczność techniki AFLP w detekcji stopnia zmienności somaklonalnej u agrestu, generowanej w procesie rozmnażania *in vitro*.
3. Odmiany 'Captivator', 'Invicta', 'Hinnonmaki Rot' i 'Resika' wykazują stabilność genetyczną w kulturach *in vitro*. Zastosowanie opracowanej metody mikrorozmnażania agrestu pozwala uzyskać rośliny jednorodnie genetycznie.
4. Odmiana 'Hinsel' charakteryzuje się wyższym stopniem zmienności w kulturach *in vitro*.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie rozporządzenia MRiRW z dnia 29 lipca 2015 r. (Dz. U. poz. 1170, z późn. zm.). Zadanie nr 79*

**Literatura**

- Bahulikar R.A., Stanculescu D., Preston C.A., Baldwin I.T. 2004. ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, in SW Utah. *BMC Ecol.* 4: 12.
- Cavanna M., Marinoni D.T., Beccaro G.L., Bounous G. 2009. Microsatellite-based evaluation of *Ribes* spp. germplasm. *Genome* 52(10): 839-848.
- Costa R., Pereira G., Garrido I., Tavares-deSousa M.M., Espinosa F. 2016. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and classify orchard-grass (*Dactylis glomerata* L.) germplasm variations. *PLoS ONE* 11(4): e0152972. doi:10.1371/journal.pone.0152972.
- Drew R.A., Smith M.K. (1990): Field evaluation of tissue-cultured bananas in south-eastern Queensland. *Austr. J. Exp. Agric.*, 30: 569-574.
- Dubois L.A.M., Roggermans J., Soyeurt G., de Vries D.P. (1988): Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated *in vitro* and *in vivo* by softwood cuttings. *Sci. Hortic.*, 55: 293-299.
- Howard B.H., Jones O.P., Vasek J. (1989): Long-term improvement in the rooting of plum cuttings following apparent rejuvenation. *J. Hort. Sci.*, 64: 147-156.
- Korbin M., Kuras A., Żurawicz E. 2002. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7(2B): 785-94.
- Kucharska D., Orlikowska T., Maciorowski R., Kunka M., Wójcik D., Pluta S. 2020. Application of meta-topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*). *Sci. Hort.*, 272: 109529. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109529>
- Kumar A., Misra P., Dube A. 2013. Amplified fragment length polymorphism: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites. *Parasitol. Res.* 112: 457-466.
- Lanham P.G., Brennan R.M. 1999a. Genetic characterization of gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) germplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers. *J. Hort. Sci. Biotech.* 74(3): 361-366.
- Lanham P.G., Brennan R.M. 1999b. Genetic characterisation of *Ribes nigrum*, *Ribes rubrum* and *Ribes grossularia*. *Acta Hort.* 505: 385-392.
- Lanham P.G., Brennan R.M. 2001. Genetic diversity in *Ribes*. *Acta Hort.* 546: 135-137.
- Meudt H.M., Clarke A.C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends Plant Sci.* 12(3): 106-117.
- Podwyszyńska M., Niedoba K., Korbin M., Marasek A. 2006. Somaclonal variation in micropropagated tulips determined by phenotype and DNA markers. *Acta Hort.* 714: 211-220.
- Podwyszyńska M., Pluta S. 2019. *In vitro* tetraploid induction of the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and preliminary phenotypic observations. *Zemdirbyste-Agriculture*, 106(2), 151-158.
- Reed B.M., Hummer K.E. 2002. Cryopreservation of *Ribes*. W: Towill L.E., Bajaj Y.P.S. (red.), *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Biotech. in Agriculture and Forestry 50: 323-343.
- Sedlák J., Paprštejn F. 2012. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars. *Hort. Sci.* 39: 21-25.
- Wainwright H., Flegmann A.W. 1986. Studies on the micropropagation of *Ribes* species. *Acta Horticulturae* 183: 315-322.
- Welander M. 1985. Micropropagation of gooseberry, *Ribes grossularia*. *Sci. Hort.* 26(3): 267-272.
- Zabeau M., Vos P., 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7, Publication number 0 534 858 A1.

# Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczek czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Analysis of genome regions linked to the resistance of blackcurrant (*Ribes nigrum*) to blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Anita Kuras<sup>✉</sup>, Bogumiła Badek<sup>✉</sup>

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice  
✉ e-mail: anita.kuras@inhort.pl

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*), jest jednym z najgroźniejszych szkodników porzeczek czarnej. Powoduje on deformację pąków porzeczek czarnej i redukuje plon owoców. Wybranie najkorzystniejszych markerów molekularnych sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego może przyspieszyć proces hodowlany i poprawić skuteczność przy wyborze genotypów odpornych na tę chorobę. Celem pracy była analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczek czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego poprzez ocenę stopnia polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P i poszukiwanie nowych fragmentów genomu regulujących odporność na *C. ribis*. W wyniku analizy elektroforegramów z produktami reakcji CAPS, zidentyfikowano 119 polimorficznych fragmentów DNA, z których wytypowano 100 do analizy sekwencji. W wyniku sekwencjonowania uzyskano 9 specyficznych odczytów na matrycach DNA odmian ‘Ceres’, ‘Ojebyn’, ‘Vir’, ‘Ores’, ‘Foxendown’, ‘Ben Finlay’ i ‘Bona’.

**Słowa kluczowe:** CAPS, *Cecidophyopsis ribis*, marker molekularny, porzeczek czarna,

Blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*) is one of the most dangerous pests of blackcurrant. It causes deformation of blackcurrant buds and reduces fruit yield. The selection of the most favorable molecular markers coupled to resistance to *C. ribis*, can accelerate the breeding process and improve efficacy when choosing genotypes that are resistant to this disease. The aim of this study was to analyze genome regions conjugated with resistance of blackcurrant (*Ribes nigrum*) to blackcurrant gall mite by assessing the degree of polymorphism in coupling groups, including the Ce and P regions, and by searching for new genome fragments regulating *C. ribis* resistance. As a result of the analysis of electrophoregrams with CAPS reaction products, 119 polymorphic DNA fragments were identified, out of which 100 were selected for sequence analysis. As the end product of sequencing, 9 specific readings were obtained on DNA matrices of the varieties ‘Ceres’, ‘Ojebyn’, ‘Vir’, ‘Ores’, ‘Foxendown’, ‘Ben Finlay’ and ‘Bona’.

**Key words:** CAPS, *Cecidophyopsis ribis*, molecular marker, blackcurrant

## Wstęp

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*), najgroźniejszy szkodnik w uprawie czarnej porzeczek, jest wektorem rewersji porzeczek czarnej (BRV – Black Currant Reversion Virus), która redukuje plon, prowadząc w konsekwencji do likwidacji plantacji (Pluta i Żurawicz, 2002; Łabanowska i in., 2015). Ograniczanie liczebności populacji wielkopąkowca porzeczkowego oraz pozyskanie odmian porzeczek czarnej o zwiększonej odporności na szpecieła i BRV są niezwykle istotne dla praktyki ogrodniczej. Wiele jednostek naukowych w Europie zajmuje się badaniami nad identyfikacją markerów molekularnych, sprzężonych

z dwoma odrębnymi typami odporności Ce i P. Źródłem odporności typu Ce w w/w badaniach jest agrest (*R. grossularia*) (Knight i in., 1974; Brennan i in., 1993), a typu P – *R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Anderson, 1971). W Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach prowadzone są badania dotyczące poszukiwania sprzężeń między odpornością, a zlokalizowaniem warunkujących ją fragmentów genomu na mapie genetycznej porzeczek czarnej. Celem przedstawionych badań prowadzonych w 2019 roku była: ocena polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności porzeczek na *C. ribis*, oparta na metodzie sekwencjonowania.

**Material i Metody****Material badawczy**

Badania przeprowadzono na roślinach 12 genotypów rodzaju *Ribes* (6 odpornych i 6 wrażliwych na *C. ribis*), wytypowanych do badań na podstawie danych literaturowych oraz analiz przeprowadzonych w ramach realizacji projektu w latach 2015–2019 (Tab. 1).

**Metody badawcze**

DNA z wytypowanych genotypów wyekstrahowano z młodych liści metodą Doyle i Doyle (1990). Jakość i koncentrację DNA w uzyskanych próbach określano na podstawie elektroforegramów w 0,8%

żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki przy długości fali 230, 260, 280 i 320 nm (Gene Quant Pro Amersham Pharmacia Biotech).

Na matrycy DNA wyekstrahowanego z badanych genotypów rodzaju *Ribes* (Tab. 1) przeprowadzono reakcje amplifikacji z kombinacjami starterów SSR (Tab. 2) wytypowanych do badań w oparciu o bazy danych (na podstawie lokalizacji regionów blisko sprzężonych z QTL warunkującymi odporność na wielkopakowca porzeczkowego – Lg2\*; LG4\* i LG6\*\* Brennan i in., 2008\* i Mazeikiene i in., 2012\*\*) oraz wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu w latach 2015–2019.

Tabela 1

Table 1

Wykaz genotypów rodzaju *Ribes*, wytypowanych do analiz molekularnychList of genotypes of the genus *Ribes* selected for molecular analysis

Lp. No.	Odmiana Variety	Rodowód Parentage	Wrażliwa Odporna <sup>1</sup> Susceptibility Resistant	Kraj Country
1.	Ores	(Ojebyn × S24) × Ceres	odporna	Polska
2.	Ceres	( <i>R. Dikuscha</i> × Barchatnaja) × samozapylenie	odporna	Polska
3.	Polares	S12/3/83 × EMB (1834)/113	odporna	Polska
4.	Foxendown	Ben LomondD x (BC3 z agrestu × BC2 <i>R. Glutinolum</i> )	odporna	Szkocja
5.	Vir	nieznany	odporna	Rosja
6.	Ben Finlay	[(SCRI P10/9/13 × Ben Alder) × EMB 1834-67]	odporna	Szkocja
7.	Ben Hope	Westra x (SCRI 238/36 × EM 21/15)	wrażliwa	Szkocja
8.	Bona	Ojebyn × ( <i>R. Dikuscha</i> × Climax)	wrażliwa	Polska
9.	Gofert	Gołubka × Fertodi 1	wrażliwa	Polska
10.	Gołubka	<i>R. Nigrum</i> × <i>R. Dikuscha</i> .	wrażliwa	Rosja
11.	Ojebyn	Seedling selection of <i>R. Nigrum</i> from north sweden	wrażliwa	Szkocja
12.	Riasnaja	nieznany	wrażliwa	Rosja

<sup>1</sup> dane z literatury

Tabela 2

Table 2

Wykaz starterów SSR użytych do analiz molekularnych

List of SSR primers used for molecular analysis

Starter Primer	Sekwencja startera (5'-3')	Lokalizacja na chromosomach Location on the chromosome	
g1-G06F/g2-J08R	AAAACACACATCTCTCACCCC	ATAGCCCATGCCCATATTCA	LG 2*
g2-J08F/g1-G06R	CGCCGAGCTCTAATCACTGT	TCGAATCTGAACCACGATGA	LG 2*
g2-J08F/g1-B02R	CGCCGAGCTCTAATCACTGT	CCATTGATTTGGTGAGGGT	LG 2*
g1-B02F/g2-J08R	CGCTTCATCGCTCTCTCTCT	ATA GCC CAT GCC CAT ATT CA	LG 2*
g1-G06F/g1-B02R	AAAACACACATCTCTCACCCC	CCA TTG ATT TGG TGA GGG T	LG 2*
g1-B02F/g1-G06R	CGACTTCATCGCTCTCTCTCT	TCG AAT CTG AAC CAC GAT GA	LG 2*
e1-O21F/g2-L17R	TCTCTCCAAGTGAAGGAAA	GAG CTG TTG CTG TTG CCA TA	LG 4*
g2-L17F/e1-O21R	TTTGGA AAA CCT CCC CTT TT	GAT TTG TTC TTG TGC AGC GA	LG 4*
g1-I02F/g1-D11R	TGA ATA TCA GAC CGC CAT CA	AAT CGA ATG GAA TCG TCC	LG6**
g1-D11F/g1-I02R	GAA GAC GAC AAA GCC TCC	TCC AAG ATG AAG CTT CTC AAA TC	LG6**

\* Brennan i in. 2008; \*\* Mazeikiene i in. 2012



Mieszanka reakcyjna w przeprowadzonych testach PCR zawierała: 10 ng DNA, 0,5U polimerazy Taq Platinum® (Invitrogen), 10 × PCR-buforu, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM dNTP (Applied Biosystems) i 0,35 μM startera SSR (zgodnie z zaleceniami producenta). Zastosowano profil termiczny reakcji: wstępna denaturacja -94°C/2 min, 4 cykle (denaturacja 94°C/50 s, przyłączanie startera 55–50°C/50 s (w każdym kolejnym cyklu spadek temperatury przyłączania o 1°C), wydłużanie nici DNA 72°C/60 s), 30 cykli (denaturacja 94°C/50 s, przyłączanie startera 55–50°C/90 s, wydłużanie nici DNA 72°C/60 s), wydłużanie końcowe 72°C/10 min. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Biometra Basic.

Produkty reakcji SSR-PCR poddano trawieniu 4 enzymami restrykcyjnymi (Tab. 3), które rozdzielono w 2% żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydy, następnie charakterystyczne dla analizowanych genotypów fragmenty DNA wyizolowano z żeli agarozowych, przy użyciu zestawu komercyjnego FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics), według procedury dołączonej przez producenta.

Wyizolowane z żelu i oczyszczone fragmenty DNA wkładowano do plazmidów bakteryjnych (TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen)). Następnie plazmidy umieszczono w ukompetentnych bakteriami *E. coli* One shot TOP10 (Invitrogen), według protokołu producenta. Po wyselekcjonowaniu, wybrane kolonie bakteryjne, zawierające plazmid z wstawionym fragmentem DNA analizowanych genotypów *Ribes*, przeniesiono na pożywkę płynną LB. Po inkubacji (37°C/16 h) z zawiesiny bakterii, wyizolowano plazmid bakteryjny przy użyciu komercyjnego zestawu FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon Genetics).

Plazmidy bakteryjne zawierające charakterystyczne fragmenty genomu wyznakowano w reakcji PCR z uniwersalnym starterem M13, stosując zestaw DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter), a następnie poddano sekwencjonowaniu przy użyciu systemu CEQ (8000) Genome Analyzer (Beckman Coulter).

Analizę sekwencji przeprowadzono przy użyciu programu CEQ (8000) software v.9.0. Uzyskane z odczytów kontigi 'składano' przy użyciu programu SeqMan (pakiet Lasergen v.7). Zróżnicowanie nukleotydowe sekwencji analizowano przy użyciu programu MegAlign (pakiet Lasergen v.7). Uzyskane sekwencje DNA porównano z danymi NCBI za pomocą programu bioinformatycznego blast-nt.

Do uzyskanych sekwencji DNA zaprojektowano specyficzne oligonukleotydy (program komputerowy PrimerSelect- pakiet Lasergen v.7).

## Wyniki

Po zidentyfikowaniu polimorfizmów pomiędzy genotypami wrażliwymi/odpornymi na *C. ribis*, uzyskane sekwencje analizowano za pomocą programu MegAlign (pakiet Lasergen v.7), aby sprawdzić, czy możliwe jest przekształcenie polimorfizmu w marker CAPS. Analiza, umożliwiła wytypowanie czterech enzymów restrykcyjnych: PstI, TruII, AseI, SmaI, które spełniały następujące założenia: długości produktów uzyskanych po reakcji cięcia musiały pozwolić na wyraźne rozróżnienie alleli, obecność maksymalnie trzech miejsc cięcia w analizowanej sekwencji (Tab. 3).

Po przeprowadzeniu łącznie 1440 reakcji amplifikacji PCR z 10 parami starterów flankujących regiony Ce i P w różnych kombinacjach (Tab. 2), które poddano trawieniu przy użyciu wytypowanych enzymów restrykcyjnych, w wyniku analizy elektroforegramów, zidentyfikowano 119 polimorficznych fragmentów DNA, z których do analizy wytypowano 100 sekwencji (Tab. 4). W wyniku sekwencjonowania uzyskano 9 specyficznych odczytów o długości od 351 do 490 pz (Tab. 5).

Analiza porównawcza uzyskanych sekwencji wykazała zróżnicowanie układu sekwencji ampikonów uzyskanych dla badanych genotypów odpornych i wrażliwych, najprawdopodobniej sklasyfikowanych jako polimorfizm jednonukleotydowy (SNP). Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po jednej parze specyficznych oligonukleotydów (Tab. 6)

Tabela 3  
Table 3

Wykaz enzymów restrykcyjnych użytych do analizy CAPS  
List of restriction enzymes used for CAPS analysis

Enzym Enzyme	Pochodzenie Origin	Rozpoznawana sekwencja Recognized sequence	Warunki reakcji Reaction conditions	Inaktywacja Inactivation
PstI	<i>Providencia stuarti</i>	5'...CTGCA G...3'	37°C/ 16 h	80°C/ 20min
TruII	<i>Thermus ruber</i>	5'...T TAA...3'	65°C/ 16 h	80°C/ 20min
AseI	<i>Vibrio species</i>	5'...AT TAA...3'	37°C/ 16 h	65°C/ 20min
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	5'...CCC GGG...3'	30°C/ 16 h	65°C/ 20min

Tabela 4  
Table 4Wykaz fragmentów DNA wytypowanych do analizy sekwencji.  
List of DNA fragments selected for sequence analysis.

Starter/enzym Primer/enzyme	Długość [Pz] Fragmentów dna Band size of dna fragments (bp)	Analizowane genotypy Analyzed genotypes												
		Ores	Ceres	Polares	Foxendown	Vir	Ben Finlay	Ben Hope	Bona	Gofert	Grotubka	Ojebyn	Riasnaja	
g1-G06F/ g2-J08R/ <i>PstI</i>	360	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	390	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	430	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	490	+	+			+			+	+				
g1-B02F/ g1-G06R/ <i>AseI</i>	300	+		+	+	+	+					+	+	
	340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
g1-G06F/ g2-J08R/ <i>AseI</i>	350		+			+	+	+	+	+				
	460	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	510	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
g1-B02F/ g1-G06R/ <i>SmaI</i>	430		+			+	+	+	+					
	580	+	+	+	+			+	+	+			+	

<sup>1</sup> -, + – fragment wytypowany do sekwencjonowaniaTabela 5  
Table 5Wykaz specyficznych sekwencji uzyskanych w wyniku sekwencjonowania  
List of specific sequences obtained as a result of sequencing

Lp. No.	Nazwa sekwencji Sequence name	Pochodzenie/genotyp Origin/ Genotype	Kombinacje starterów Flankujących regiony ce i p/enzym Primers flanking regions ce and p/enzyme	Wielkość zsekwencjonowanego fragmentu dna [Pz] Dna band size [bp]
1	Seq.73	'Ceres'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>PstI</i>	363
2	Seq.74	'Ojebyn'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>PstI</i>	390
3	Seq.75	'Vir'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>PstI</i>	490
4	Seq.76	'Ceres'	g1-G06F/ g2-J08R/ <i>AseI</i>	351
5	Seq.77	'Ores'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>AseI</i>	460
6	Seq.78	'Foxendown'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>AseI</i>	462
7	Seq.79	'Vir'	g1-G06F/g2-J08R/ <i>AseI</i>	461
8	Seq.80	'Ben Finlay'	g1-B02F/ g1-G06R/ <i>SmaI</i>	435
9	Seq.81	'Bona'	g1-B02F/ g1-G06R/ <i>SmaI</i>	436

Tabela 6  
Table 6Wykaz sekwencji oligonukleotydów specyficznych  
List of specific oligonucleotide sequences

Lp. No..	Oligonukleotyd Oligonucleotide	Reverse	Forward
1.	2.73	CTCGCTGAGCGGATTGGAT	ACGGCGGTTAGGAAGGTGTGGGT
2.	2.74	CGATAGCGGGACTGTAAGAG	TTATGAGCCCCAAAGCCCTAAG
3.	2.75	CGTGGTATGACATCAGACTACAC	ACGGACTGGACCGGGAC
4.	2.76	TAGTGAAGAACGGAGCTCAGGAG	TTTATTGCGGAGGGAGAGGCGCT
5.	2.77	CCGACCATACTTGAGTCGTAATAG	ACTGATTTCCCCGAGCTCTTG
6.	2.78	GAGGCTAAGAAGGACGTGTATGGG	TAGGATGCTTCCCGTCAATACGA
7.	2.79	GCCGAGTTTCTGTATCGTGCA	CGAATAAGTCAGGGCGCATAGGC
8.	2.80	TCTGTCAACTCGGCTCCAGACT	CAGGGCAGAAAGCTGTGGAGGGAA
9.	2.81	TGAGTTCATCGCCATCAGACATG	GAAGGGCGAATGGAGGGCTGATAT



## Dyskusja

Ze względu na cenne walory zdrowotne porzeczki czarnej na całym świecie prowadzone są badania, których celem jest znalezienie odmian odpowiednich do uprawy w danych warunkach klimatycznych, o podwyższonej tolerancji na niską temperaturę oraz choroby stanowiące zagrożenie (głównie rewersja porzeczki czarnej) i szkodniki (wielkopąkowiec porzeczkowy). Ograniczanie liczebności populacji wielkopąkowca porzeczkowego oraz pozyskanie odmian porzeczki czarnej o zwiększonej odporności na szpeciela i BRV są niezwykle istotne dla praktyki ogrodniczej. Dotychczas zidentyfikowano, w oparciu o wyniki prac genetyczno-hodowlanych, dwa odrębne typy odporności na wielkopąkowca (Brennan i in., 2008; Mazeikiene i in., 2012), których źródłem jest agrest (*R. grossularia*) (Knight i in., 1974) i *R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Anderson 1971).

Wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli roślinnej zwiększa efektywność konwencjonalnej hodowli, poprzez selekcję roślin posiadających markery sprzężone z ważnymi gospodarczo cechami użytkowymi (Gupta i wsp. 1999). Poszukiwanie i identyfikacja takich markerów ma na celu skrócenie cyklu hodowlanego, gdyż selekcję materiału roślinnego można przeprowadzić już w stadium siewki, niezależnie od tego, w jakiej fazie rozwojowej rośliny ujawnia się dana cecha. W hodowli odpornościowej poszukujemy markerów sprzężonych z cechami odporności, a do selekcji (MAS) wystarczający może być pojedynczy marker lub zestaw markerów sprzężonych z tą cechą.

W 2019 roku kontynuowano badania dotyczące oceny polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności, oparte na metodzie sekwencjonowania. Działanie najpopularniejszych sekwenatorów, wykorzystywanych do badań naukowych i diagnostycznych, polega na modyfikacji metody opracowanej przez Sangera i Coulsona w 1975 r. W badaniach dotyczących sekwencjonowania genomów rodzaju *Ribes* wykorzystaliśmy sekwenator CEQ (8000) Beckman Coulter. Metoda sekwencjonowania często stosowana jest do analiz porównawczych (*alignment*) i identyfikacji jednonukleotydowych różnic w obrębie tego samego fragmentu (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) (Bang i in., 2007; Thiel i in., 2004). Porównania takie dostarczają szczegółowych informacji na temat podobieństwa/zróżnicowania genetycznego, pochodzenia i ewolucji badanych organizmów.

Prowadzone w naszych badaniach wstępne

analizy porównawcze sekwencji DNA charakterystycznych dla genotypów rodzaju *Ribes* zróżnicowanych pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego pozwoliły na poszerzenie bazy danych dotyczących polimorfizmu odmian porzeczki podatnych i odpornych dla potrzeb analizy regulacji zjawiska odporności na wielkopąkowca porzeczkowego *C. ribis*.

Analiza porównawcza zsekwencjonowanych fragmentów DNA zidentyfikowanych w w/w genotypach wykazała silną homologię (88–90%) z sekwencją nukleotydów markera *Ce* zaprezentowaną przez Brennana i wsp. (2008). Obecnie, badania naukowców koncentrują się na rozpoznaniu sposobów dziedziczenia genów odporności (*Ce* i *P*) w genotypach uzyskanych w wyniku hybrydyzacji gatunków, u których stwierdzono ich występowanie.

W naszej pracy również poszukujemy markerów sprzężonych z genami odporności *Ce* i *P*, które umożliwiłyby charakterystykę genotypów rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności. Na obecnym etapie badań, przeprowadzone przez nas wstępne badania weryfikujące wytypowane sekwencje markerowe, nie potwierdziły ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i wrażliwych na wielkopąkowca porzeczkowego.

## Wnioski

Wyniki badań dotyczące oceny polimorfizmu fragmentów różnicujących genotypy rodzaju *Ribes* (odporne/podatne) uzyskane na matrycach DNA roślin wybranych z kolekcji stanowią podstawę bazy sekwencji sprzężonych z cechą odporności na *C. ribis*.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 78*

## Literatura

- Anderson, M. M. (1971). Resistance to gall mite (*Phytoptus ribis* Nal.) in the *Eucoreosma* section of *Ribes*. *Euphytica* (20), 422–426.
- Bang, H., Kim, S., Leskovaar, D., King, S. (2007). Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in *lycopen-β-cyclase* (*LCYB*) gene. *Molecular Breedin* (20), 63–72
- Brennan, R., Jorgensen, L., Gordon, S., Loades, K., Hackett, C., Russell, J. (2008). The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: *Eriophyidae*). *Theor. Appl. Genet.* (118), 205–211.



- Brennan, R. M., Lanham, P. G., McNicol, R. J. (1993). Ribes reeding and research in the UK. *Acta Horticulturae* (352), 267–275. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.352.38>.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* (12),13–15.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed* (118),369–390.
- Knight, R. L., Keep, E., Briggs, J. B., Parker, J. (1974). Transference of resistance to black currant gall mite *Cecidophyopsis ribis*, from gooseberry to black currant. *Ann. Appl. Biol.* (76),123–130.
- Łabanowska, B. H., Piotrowski, W., Gruchała, M. (2015). Blackcurrant gall mite – *Cecidophyopsis ribis* (Westw.), harmfulness and possibility to control with fenpyroximate (Ortus 05 SC). *Prog. Plant Prot.* 55 (3), 305–311.
- Mazeikiene, I., Bendokas, V., Stanys, V., Siksnianas, T. (2012): Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant. *Plant Breeding.* (131),762–766.
- Pluta, S., Żurawicz, E. (2002). Effect of reversion virus on the yield and fruit size in blackcurrant *Ribes nigrum* L. Proceedings 8th International Symposium *Rubus* and *Ribes*. Scotland, Dundee. July 2001. *Acta Horticulturae* 585 (1): 393–398.
- Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 94(3): 441–448.
- Thiel, T, Kota, R, Grosse, I, Stein, N, Graner, A. (2004). SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Res;* (32),e5.

## Wartość hodowlana wybranych odmian jabłoni (*Malus domestica*) pod względem odporności na parcha i mączniaka jabłoni

Breeding value of selected apple cultivars (*Malus domestica*) for the resistance to apple scab and powdery mildew

Mariusz Lewandowski<sup>✉</sup>, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz<sup>id</sup>

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,  
✉ e-mail: mariusz.lewandowski@inhort.pl

Celem badań była ocena przydatności kilku odmian jabłoni do hodowli nowych genotypów odpornych/mało podatnych na parcha i mączniaka jabłoni w oparciu o ich ogólną (GCA) i specyficzną zdolność kombinacyjną (SCA). Stopień porażenia siewek jabłoni, stanowiących potomstwo 11 genotypów jabłoni, krzyżowanych w układzie czynnikowym: ♀4 × ♂7 – 4 odmiany mateczne ('Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium') i 7 odmian ojcowskich ('Glogierówka', 'Kronselka', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa') przez oba patogeny oceniono w lipcu 2019 r. Istotnie ujemną wartość efektu GCA dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni oszacowano dla odmiany 'Free Redstar'. Wskazuje to, że odmiana ta jest donorem genów warunkujących 'odporność' lub małą podatność na parcha jabłoni u potomstwa. Istotnie ujemną wartość efektu GCA dla stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni oszacowano dla odmiany 'Free Redstar'. Oznacza to, że genotyp ten jest donorem genów warunkujących 'odporność' lub małą podatność na mączniaka jabłoni u siewek. Negatywne efekty SCA dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni uzyskano dla 3 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' × 'McIntosh', 'Alwa' × 'Malinowa Oberlandzka' i 'Alwa' × 'McIntosh'. Oznacza to, że w przypadku tych rodzin genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich warunkuje 'odporność' lub małą podatność roślin na parcha jabłoni.

**Słowa kluczowe:** jabłoń, *Malus domestica* L., mączniak jabłoni, parch jabłoni

The aim of the study was to assess the suitability of several apple cultivars for breeding of new genotypes resistant/low susceptible to apple scab and powdery mildew based on their general (GCA) and specific (SCA) combining abilities. Infection degree of the apple seedlings, being the progeny of 11 cultivars crossed in the model: ♀4 × ♂7 – 4 maternal cultivars ('Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium') and 7 paternal cultivars ('Glogierówka', 'Kronselka', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa') by both apple pathogens was evaluated in July 2019. Significantly negative value for the GCA effect for the infection degree by apple scab was estimated for 'Free Redstar'. This indicates that this cultivar is a good donor of genes responsible for resistance to apple scab in the progeny. Negative value of GCA effect for susceptibility to powdery mildew was also stated for 'Free Redstar'. This means that this cultivar may serve as good donor of genes determining resistance/low susceptibility to powdery mildew in its progeny. Negative SCA effects for resistance/low susceptibility to apple scab, moreover, were indicated for 3 cross combinations: 'Free Redstar' × 'McIntosh', 'Alwa' × 'Malinowa Oberlandzka' and 'Alwa' × 'McIntosh'. This indicates that genetic interaction of both parental genotypes results in genetic determination of resistance or high tolerance to apple scab in their progeny.

**Key words:** apple, apple scab, *Malus domestica* L., powdery mildew

### Wstęp

Jabłoń jest najważniejszym gatunkiem roślin sadowniczych klimatu umiarkowanego, dobrze przystosowanym do uprawy w warunkach przyrodniczych Polski. Światowa produkcja jabłek wynosi ok. 70 milionów ton. Według szacunku GUS, w 2019 r. produkcja jabłek w Polsce wyniosła 3 mln ton. Polska jest więc największym producentem owoców tego gatunku w Unii Europejskiej, a trzecim w świecie po Chinach (35–40 mln ton) i USA (4,5–5 mln ton). W uprawie jabłoni w Polsce dominują odmiany zagraniczne,

jak 'Idared', 'Szampion', 'Jonagold' czy 'Golden Delicious' (Kruczyńska, 2008; Badowska-Czubik i in., 2012). Warunkiem dalszego dynamicznego rozwoju produkcji jabłek w Polsce jest systematyczne wdrażanie do uprawy towarowej nowych, cennych odmian jabłoni, które są najważniejszym nośnikiem postępu biologicznego w produkcji sadowniczej. Tylko takie genotypy umożliwiają wdrażanie innowacyjnych technologii uprawy oraz zwiększanie konkurencyjności i opłacalności produkcji jabłek, przy zachowaniu wymogów ochrony środowiska i zasad produkcji bezpiecznej

żywności. Dlatego hodowcy stale poszukują nowych odmian jabłoni, lepszych od będących w uprawie, które odznaczałyby się kompleksem wielu cech, często trudnych do pogodzenia ze sobą, ale decydujących o wysokich walorach produkcyjnych i użytkowych odmian, jak: zróżnicowana pora dojrzewania owoców, wysoka plenność i jakość deserowa owoców (podwyższona zawartość ekstraktu, witaminy C i kwasowości), atrakcyjna barwa i kształt owoców, zdolność owoców do dobrego i długiego przechowywania się, słaba siła wzrostu drzew oraz wysoka wytrzymałość drzew na mróz (Lewandowski i Żurawicz, 2007). Rynek konsumencki w coraz większym stopniu zainteresowany jest odmianami o jednolitej barwie skórki (zielone, żółte lub czerwone). Barwa często decyduje o jakości owoców, a w konsekwencji i ich cenie. Poszukiwane są także odmiany wykazujące dużą zdolność do samodzielnego regulowania owocowania, bez konieczności przerzedzania zawiązków, tak aby plonowały corocznie i obficie. Czynnikiem decydującym o sukcesie w uprawie jabłoni jest także tworzenie nowych odmian z wysoką odpornością lub małą podatnością drzew na parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*), mączniaka jabłoni (*Podosphaera leucotricha*) i zarazę ogniową (*Erwinia amylovora*). Uprawiając odporne odmiany jabłoni, producenci jabłek mogą obniżyć koszty produkcji poprzez zmniejszenie liczby oprysków w sadach. Jest to bardzo ważny problem, zwłaszcza obecnie, gdy następuje znaczny spadek opłacalności produkcji jabłek oraz duży wzrost zainteresowania proekologicznymi metodami uprawy (Żurawicz i in., 2004; Żurawicz i Lewandowski, 2011; Żurawicz i in., 2013).

Celem badań było określenie wartości hodowlanej badanych form rodzicielskich poprzez oszacowanie efektów GCA (ogólna zdolność kombinacyjna) i SCA (specyficzna zdolność kombinacyjna) dla odporności roślin na parcha i mączniaka jabłoni w oparciu o ocenę potomstwa 28 rodzin mieszańców.

### Material i Metody

Przedmiotem badań była populacja 2800 siewek jabłoni otrzymanych ze skrzyżowania 11 odmian jabłoni – 4 formy mateczne ♀ (odmiany o krótkim okresie juwenilnym – ‘Alwa’, ‘Golden Delicious’, ‘Free Redstar’, ‘Gold Milenium’) i 7 form ojcowskich ♂ (odmiany ‘stare’, dzisiaj już nie uprawiane w Polsce na skalę towarową, ale znane ze specyficznego, unikalnego smaku owoców – ‘Glogierówka’, ‘Kronselka’, ‘Kosztela’, ‘McIntosh’, ‘Oliwka Żółta’, ‘Malinowa Oberlandzka’, ‘Koksa

Pomarańczowa’) (tab. 1). Badane siewki należą do 28 kombinacji uzyskanych z krzyżowań w układzie czynnikowym (♀4 × ♂7) (tab. 2). Wszystkie siewki były zaszczerpione na podkładce M.9. Doświadczenie polowe posadzono jesienią 2017 w kwarterze hodowlanej w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach, w układzie losowanych bloków kompletnych, w 4 powtórzeniach, po 25 siewek na poletku, w rozstawie 3,50 × 1,0 m. W dniach 08–12.07.2019 r. dla każdej rośliny/siewki została wykonana ocena stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni:

1. ocena stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*) wykonana była przy zastosowaniu skali bonitacyjnej (1–5) wg Shay i Hough (1952) i Crosby i wsp. (1992), gdzie poszczególne klasy oznaczają: 1 – brak makroskopowych objawów infekcji na liściach, 2 – małe plamy parcha na liściach, grzyb nie zarodnikuje, 3 – nieregularne chlorotyczne lub nekrotyczne plamy na liściach, grzyb nie zarodnikuje, 4 – niewielkie i nieliczne plamy parcha na liściach, grzyb zarodnikuje, 5 – duże i liczne plamy parcha na liściach, grzyb zarodnikuje,
2. ocena stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni (*Podosphaera leucotricha*) wykonana była przy zastosowaniu skali bonitacyjnej (1–5) wg Boreckiego (1987), biorąc za podstawę powierzchnię liści pokrytą białym nalotem grzybni *Podosphaera leucotricha*. Poszczególne klasy oznaczają: 1 – brak objawów porażenia mączniakiem, pojedyncze liście pokryte nalotem grzybni, średnio 1%, 2 – od 1 do 10% powierzchni liści pokrytej nalotem grzybni, średnio 5%, 3 – od 11 do 30% powierzchni liści pokrytej nalotem grzybni, średnio 20%, 4 – od 31 do 50% powierzchni liści pokrytej grzybnią, średnio 40%, 5 – od 51 do 100% powierzchni liści pokrytej grzybnią, średnio 75%.

*Analiza statystyczna.* Uzyskane dane poddano analizie, którą przeprowadzono kilkietapowo. Na podstawie obserwacji każdej cechy na pojedynczych roślinach wyznaczono średnie arytmetyczne dla każdego powtórzenia. Średnie te użyto do ich wstępnego opracowania statystycznego metodą jednoczynnikowej analizy wariancji według układu losowanych bloków, w którym czynnikiem są rodziny mieszańców. Po stwierdzeniu istotnego zróżnicowania średnich cech u badanych mieszańców wykonano analizę wariancji dla układu czynnikowego (♀4 × ♂7) na podstawie modelu stałego,



w celu oszacowania efektów GCA i SCA oraz ilorazu średnich kwadratów odchyłeń dla GCA i SCA dla badanych cech. Szczegółową analizę istotności efektów GCA i SCA wykonano przy użyciu procedury jednoczesnej opartej na nierówności Bonferoniego. Wszystkie obliczenia, dotyczące estymacji efektów GCA i SCA w powyższym modelu, analizy wariancji oraz szczegółowego testowania jednoczesnego wykonano za pomocą programu komputerowego SERGEN, opracowanego przez naukowców z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (Caliński i in., 2003).

## Wyniki i Dyskusja

Wykonano badania nad wartością fenotypową populacji siewek jabłoni w oparciu o indywidualną ocenę ich porażenia przez parcha i mączniaka jabłoni. Przydatność wybranych 11 genotypów (form rodzicielskich) jabłoni do programu krzyżowań oceniono na podstawie ogólnej (GCA) i specyficznej (SCA) zdolności kombinacyjnej (Mądry i Ubysz-Borucka, 1982). Według tych autorów GCA jest to średnia wartość cechy ilościowej w potomstwie rozpatrywanej formy rodzicielskiej. Jest miarą addytywnego działania genów na tę cechę. SCA jest interakcją (współdziałaniem) obu form rodzicielskich ujawnianą w ich potomstwie, w wyniku pojedynczych kombinacji krzyżowań. Jest wynikiem nieaddytywnego działania genów (dominacji i epistazy) (Ubysz-Borucka i in., 1985).

W praktyce najwartościowsze potomstwo pod względem pożądanej cechy uzyskuje się w wyniku krzyżowania form rodzicielskich, które odznaczają się istotnymi i pozytywnymi wartościami efektów GCA (Griffing, 1956 a, b). W naszych badaniach genetycznych stwierdzono, że wśród 11 genotypów rodzicielskich jabłoni, tylko 3 odmiany: 'Free Redstar', 'Alwa' i 'Oliwka Żółta' miały istotne (na plus lub minus) wartości efektów GCA dla stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni (tab. 1). Wyniki pokazują, że istotnie różne od zera wartości efektów GCA dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni oszacowano dla odmiany 'Free Redstar'. Pomimo, że była to wartość ujemna, ale dla hodowcy oznacza to, że genotyp ten jest donorem genów warunkujących odporność lub małą podatność na parcha jabłoni u potomstwa jabłoni. Natomiast odmiany 'Alwa' i 'Oliwka Żółta' miały istotnie dodatnie efekty GCA dla tej cechy. Odmiany te użyte jako formy rodzicielskie są więc donorami genów warunkujących podatność na parcha jabłoni u siewek jabłoni. Istotnie ujemną wartość efektów GCA dla stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni oszacowano

dla odmiany 'Free Redstar'. Genotyp ten jest więc donorem genów warunkujących odporność lub małą podatność na mączniaka jabłoni u potomstwa jabłoni. Natomiast odmiana 'Alwa' miała istotnie dodatni efekt GCA dla tej cechy. Odmiana ta użyta jako forma rodzicielska jest więc donorem genów warunkujących podatność na mączniaka jabłoni u potomstwa jabłoni. Nasze wyniki znajdują potwierdzenie w literaturze, która wskazuje, że genotyp 'Free Redstar' jest odmianą odporną na parcha jabłoni ( $V_f$ ), zaś genotypy 'Alwa' i 'Oliwka Żółta' są odmianami średnio podatnymi na tego patogena (Rejman, 1994; Żurawicz, 2003; Lewandowski i Żurawicz, 2007; Żurawicz i in., 2013). W badaniach prowadzonych w latach 2004–2006 w warunkach polowych przez Lewandowskiego i Żurawicza (2007), na odmianie 'Free Redstar' nie obserwowano żadnych objawów mączniaka jabłoni na liściach i owocach. Genotyp ten jest więc odmianą odporną lub mało podatną na tego patogena.

Zróżnicowanie efektów SCA w obrębie badanego układu krzyżowań świadczy o dużym znaczeniu genetycznego współdziałania obu form rodzicielskich w uwarunkowaniu cech w potomstwie (Baker, 1978). Zatem efekty SCA ujawniają się tylko w niektórych kombinacjach krzyżowań i mogą poprawiać lub pogarszać wartość analizowanych cech u potomstwa. Z literatury wiadomo, że wysokie wartości efektów SCA, stwierdzone w poszczególnych populacjach mieszańcowych, dotyczą najczęściej pojedynczych cech użytkowych. Sprawia to, że uzyskanie nowych odmian o poprawionych kilku cechach jednocześnie jest bardzo trudne lub niemożliwe (Spangelo i in., 1971; Hortyński, 1987; Simpson i Sharp, 1988; Żurawicz i in., 1996; Mądry i in., 2004; Masny i in., 2008; Pluta i in., 2008). W naszych badaniach nad zdolnością kombinacyjną 11 form rodzicielskich (4 matecznych i 7 ojcowskich) stwierdzono istotne (dodatnie lub ujemne) wartości efektów SCA dla stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni (tab. 2). Dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni, wartość ujemną efektów SCA uzyskano dla 3 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' × 'McIntosh', 'Alwa' × 'Malinowa Oberlandzka' i 'Alwa' × 'McIntosh'. Oznacza to, że w przypadku tych rodzin genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich warunkuje odporność lub małą podatność roślin na parcha jabłoni. Wartość dodatnią efektów SCA dla tej cechy uzyskano dla 6 rodzin mieszańców: 'Free Redstar' × 'Kosztela', 'Free Redstar' × 'Malinowa Oberlandzka', 'Gold Milenium' × 'McIntosh',

'Alwa' × 'Kronselska', 'Alwa' × 'Koksa Pomarańczowa' i 'Golden Delicious' × 'Oliwka Żółta'. Zatem należy oczekiwać, że mieszańce należące do tych rodzin będą charakteryzować się podatnością na parcha jabłoni. Dla stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni, wartość dodatnią efektów SCA uzyskano dla 3 rodzin mieszańców: 'Gold Milenium' × 'Malinowa Oberlandzka', 'Alwa' × 'Kronselska' i 'Alwa' × 'Koksa Pomarańczowa'. Zatem należy oczekiwać, że mieszańce należące do tych rodzin będą charakteryzować się podatnością na mączniaka jabłoni.

Dotychczas nie prowadzono w Polsce badań nad zdolnością kombinacyjną genotypów rodzicielskich jabłoni używanych w programach hodowli, o czym świadczy brak stosownej literatury. Literatura zagraniczna dotycząca tych zagadnień i dla tego gatunku uprawnego jest także bardzo ograniczona.

Badania takie wykonano jedynie w Rumunii (Dan i in., 2015). Brak takich badań jest związany głównie z trudnościami wykonania kompletnego programu krzyżowań (układ dialleliczny lub czynnikowy) i uzyskania dużej populacji siewek do oceny fenotypowej. Ponadto barierą do prowadzenia tego typu badań jest także duża pracochłonność wykonania indywidualnej obserwacji, pomiarów i oceny wielu cech użytkowych dla kilku tysięcy siewek. Związane to jest również z dużymi nakładami finansowymi.

## Wnioski

1. Wstępne wyniki badań pokazują, że badane genotypy rodzicielskie jabłoni różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni.

Tabela 1  
Table 1

Ocena efektów GCA dla stopnia porażenia przez parcha i mączniaka jabłoni siewek 11 odmian jabłoni krzyżowanych w układzie czynnikowym ( $♀4 \times ♂7$ ), Dąbrowice, 2019

Estimates of GCA effects for the infection level by apple scab and powdery mildew of 11 apple genotypes crossed in the factorial design ( $♀4 \times ♂7$ ), Dąbrowice, 2019

Nr matki lub ojca Maternal or paternal No.	Formy rodzicielskie Parental forms	Stopień porażenia siewek jabłoni Infection level of apple seedlings			
		Parch jabłoni Apple scab		Mączniak jabłoni Powdery mildew	
		Ocena efektu głównego Main effect evaluation	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect	Ocena efektu głównego Main effect evaluation	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect
<i>Analiza względem form matecznych - ♀</i> <i>Analysis in relation to maternal forms - ♀</i>					
1	<b>Free Redstar</b>	<b>-0,131**</b>	17,14	<b>-0,064**</b>	12,96
2	Gold Milenium	0,004	0,02	-0,039	4,84
3	<b>Alwa</b>	<b>0,140**</b>	19,55	<b>0,082**</b>	21,16
4	Golden Delicious	-0,013	0,18	0,021	1,44
<i>Analiza względem form ojcowskich - ♂</i> <i>Analysis in relation to paternal forms - ♂</i>					
1	Glogierówka	-0,182	6,78	-0,064	1,52
2	Kosztela	0,099	2,01	-0,046	0,76
3	Malinowa Oberlandzka	-0,038	0,30	0,079	2,33
4	Kronselska	-0,157	5,05	-0,064	1,52
5	<b>Oliwka Żółta</b>	<b>0,287**</b>	16,79	0,048	0,86
6	Koksa Pomarańczowa	-0,063	0,82	-0,033	0,40
7	McIntosh	0,055	0,63	0,079	2,33

Objaśnienie: \* - wartości istotnie różne od średniej wartości ogólnej przy poziomie  $\alpha=0,05$

\*\* - wartości istotnie różne od średniej wartości ogólnej przy poziomie  $\alpha=0,01$

Explanation: \* - values significantly different from the average general value at the level of  $\alpha = 0.05$

\*\* - values significantly different from the average general value at the level of  $\alpha = 0.01$

2. Oszacowane efekty GCA i SCA 11 form rodzicielskich przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Genotypy rodzicielskie jabłoni użyte w krzyżowaniach w różnym stopniu przekazują odporność/podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. *Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. ln.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 71.*

Tabela 2

Table 2

Ocena efektów SCA dla stopnia porażenia przez parcha i mączniaka jabłoni siewek należących do 28 rodzin mieszańcowych uzyskanych ze skrzyżowania 11 odmian jabłoni w układzie czynnikowym ( $\varnothing 4 \times \sigma 7$ ), Dąbrowice, 2019

Estimates of SCA effects for the infection degree by apple scab and powdery apple seedlings belonging to 28 hybrid families obtained from 11 apple genotypes crossed in the factorial design ( $\varnothing 4 \times \sigma 7$ ), Dąbrowice, 2019

Nr rodziny Family No.	Rodziny mieszańcowe Hybrid families	Stopień porażenia siewek Infection level of apple seedlings			
		Parch jabłoni Apple scab		Mączniak jabłoni Powdery mildew	
		Ocena efektu głównego Main effect evaluation	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect	Ocena efektu głównego Main effect evaluation	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect
1	Free Redstar × Glogierówka	-0,031	0,16	-0,196	7,19
2	<b>Free Redstar × Kosztela</b>	<b>0,350**</b>	20,31	-0,096	1,72
3	<b>Free Redstar × Malinowa Oberlandzka</b>	<b>0,306**</b>	15,55	-0,146	3,98
4	Free Redstar × Kronselska	-0,125	2,59	-0,096	1,72
5	Free Redstar × Oliwka Żółta	-0,087	1,27	-0,196	7,19
6	Free Redstar × Koks Pomarańczowa	-0,106	1,87	-0,196	7,19
7	<b>Free Redstar × McIntosh</b>	<b>-0,306**</b>	15,55	-0,096	1,72
8	Gold Milenium × Glogierówka	-0,117	2,27	-0,096	1,72
9	Gold Milenium × Kosztela	-0,186	5,72	-0,071	0,94
10	<b>Gold Milenium × Malinowa Oberlandzka</b>	0,196	6,34	<b>0,254*</b>	12,18
11	Gold Milenium × Kronselska	-0,211	7,36	-0,021	0,08
12	Gold Milenium × Oliwka Żółta	-0,173	4,97	-0,221	9,15
13	Gold Milenium × Koks Pomarańczowa	-0,142	3,34	-0,121	2,73
14	<b>Gold Milenium × McIntosh</b>	<b>0,633**</b>	66,44	0,029	0,16
15	Alwa × Glogierówka	0,022	0,08	0,204	7,86
16	Alwa × Kosztela	0,029	0,14	-0,046	0,39
17	<b>Alwa × Malinowa Oberlandzka</b>	<b>-0,440**</b>	32,12	-0,096	1,72
18	<b>Alwa × Kronselska</b>	<b>0,254*</b>	10,66	<b>0,404**</b>	30,77
19	Alwa × Oliwka Żółta	-0,009	0,01	0,179	6,06
20	<b>Alwa × Koks Pomarańczowa</b>	<b>0,422**</b>	29,57	<b>0,254*</b>	12,18
21	<b>Alwa × McIntosh</b>	<b>-0,278*</b>	12,78	0,129	3,15
22	Golden Delicious × Glogierówka	0,126	2,63	0,154	4,49
23	Golden Delicious × Kosztela	-0,193	6,17	-0,146	3,98
24	Golden Delicious × Malinowa Oberlandzka	-0,062	0,63	0,079	1,19
25	Golden Delicious × Kronselska	0,082	1,12	0,204	7,86
26	<b>Golden Delicious × Oliwka Żółta</b>	<b>0,270*</b>	12,05	-0,096	1,72
27	Golden Delicious × Koks Pomarańczowa	-0,174	5,03	-0,121	2,73
28	Golden Delicious × McIntosh	-0,049	0,40	0,154	4,49

Objaśnienie: \* - wartości istotnie różne od średniej wartości ogólnej przy poziomie  $\alpha=0,05$

\*\* - wartości istotnie różne od średniej wartości ogólnej przy poziomie  $\alpha=0,01$

Explanation: \* - values significantly different from the average general value at the level of  $\alpha = 0.05$

\*\* - values significantly different from the average general value at the level of  $\alpha = 0.01$



## Literatura

- Badowska-Czubik, T., Bielicki, P., Bryk, H., Buczek, M., Cieślińska, M., Kołtowski, Z., Kruczyńska, D., Lisek, J., Meszka, B., Morgaś, H., Rabcewicz, J., Rutkowski, K., Sekrecka, M., Sobiczewski, P. J., Treder, W., Wawrzyński, A., Wójcik, P. (2012). Jabłoń. Hortpress, 216 p.
- Baker, R. J. (1978). Issues in diallel analysis. *Crop Science*, 18 (4): 533–536.
- Borecki, Z. (1987). Field susceptibility of 13 scab-resistant apple cultivars to apple powdery mildew [*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salmon]. *Acta Agrobotanica*, 40 (1–2): 87–98.
- Caliński, T., Czajka, S., Kaczmarek, Z., Krajewski, P. (2003). Podręcznik użytkownika programu SERGEN 4. Metodyka statystyczna i obsługa programu SERGEN (Wersja 4 dla Windows) przeznaczonego do serii doświadczeń odmianowych i genetyczno-hodowlanych. Wyd. IGR PAN w Poznaniu. ss 77.
- Crosby, J. A., Janick, J., Pecknold, P. C., Korban, S. S., O'Connor, P. A., Ries, S. M., Goffreda, J., Voordeckers, A. (1992). Breeding apples for scab resistance: 1945–1990. *Fruit Varieties Journal*, 46: 145–166.
- Dan, C., Sestras, A. F., Bozdog, C., Sestras, R. E. (2015). Estimation of genetic effects implied in apple inheritance of quantitative traits. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 19(1): 85–90.
- Griffing, B. (1956)a. A generalised treatments of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity*, 10: 31–50.
- Griffing, B. (1956)b. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austr. J. Biol. Sci.*, 9: 463–493.
- Hortyński, J. A. (1987). Dziedziczenie niektórych cech ilościowych truskawki (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Metody i problemy oszacowań*. AR, Lublin: 1–98.
- Kruczyńska, D. (2008). Jabłonie – nowe odmiany. Hortpress, Warszawa, 214 p.
- Lewandowski, M., Żurawicz, E. (2007). Plonowanie nowych parchoodpornych odmian jabłoni hodowli Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach na różnych typach podkładek. *Roczniki AR Poznań CCCLXXXIII, Ogrodnictwo*, 41: 333–337.
- Masny, A., Mądry, W., Żurawicz, E. (2008). Combining ability for important horticultural traits in medium and late-maturing strawberry cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16: 133–152.
- Mądry, W., Ubysz-Borucka, L. (1982). Biometryczna analiza zdolności kombinacyjnej w niekompletnym układzie diallel cross. Cz. I. Model stały dla cech ilościowych. *Rocz. Nauk Roln. Ser. A*, 105: 9–27.
- Mądry, W., Krajewski, P., Pluta, S., Żurawicz, E. (2004). Wielocechowa analiza wartości hodowlanej i zróżnicowania genetycznego odmian porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) na podstawie efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej. *Acta Scient. Polon. Ser. Hortorum. Cultus*, 3: 93–109.
- Pluta, S., Mądry, W., Żurawicz, E. (2008). General combining ability of selected blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) genotypes in breeding for dessert quality fruit. *Acta Hort.*, 777: 57–62.
- Rejman, A. (1994). Jabłonie, W: Rejman, A. (ed.). *Pomologia – Odmianoznawstwo Roślin Sadowniczych*. PWRiL, Warszawa, 19–130.
- Shay, J. R., Hough, L. F. (1952). Evaluation of Apple Scab Resistance in Selections of *Malus*. *American Journal of Botany*, 39 (4): 288–297.
- Simpson, D. W., Sharp, D. S. (1988). The inheritance of fruit yield and stolon production in everbearing strawberries. *Euphytica*, 38: 65–74.
- Spangelo, L. P., Watkins, R., Hsu, C. S., Fejer, S. O. (1971). Combining ability analysis in the cultivated strawberry. *Can. J. Plant Sci.*, 51: 377–383.
- Ubysz-Borucka, L., Mądry, W., Muszyński, S. (1985). Podstawy statystyczne genetyki cech ilościowych w hodowli roślin. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa: 220 s.
- Żurawicz, E., Mądry, W., Pluta, S. (1996). Variation and heritability of economically important traits in black currant (*Ribes nigrum* L.) evaluated in a diallel cross design. *Euphytica*, 91: 219–224.
- Żurawicz, E. (2003). *Pomologia – odmianoznawstwo roślin sadowniczych*, aneks. Wyd. PWRiL, Warszawa.
- Żurawicz, E., Lewandowski, M., Broniarek-Niemiec, A., Rutkowski, K. (2004). Preliminary results on the production value of new scab-resistant apple cultivars bred at the Research Institute of Pomology and Floriculture (RIPF), Skierniewice, Poland. *Acta Hort.*, 663: 879–882.
- Żurawicz, E., Lewandowski, M. (2011). Nowe polskie odmiany odporne na parcha jabłoni. *Sad Nowoczesny*, 4: 23–25.
- Żurawicz, E., Lewandowski, M., Pruski, K. (2013). Productivity of selected Polish scab resistant apple cultivars grown on different rootstocks. *Acta Hort.*, 976: 141–146.

# Wstępne wyniki oceny wybranych klonów maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) poszerzających zmienność genetyczną pod względem ważnych cech fenotypowych

Preliminary results of the evaluation of selected red raspberry (*Rubus idaeus* L.) clones so as to extend existing genetic variability in terms of important phenotypic features

Agnieszka Masny<sup>✉</sup>, Edward Żurawicz<sup>✉</sup>, Jolanta Kubik<sup>✉</sup>

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
✉ e-mail: agnieszka.masny@inhort.pl

W pracy przedstawiono wyniki badań z roku 2019, czyli z pierwszego roku oceny klonów. Celem badań było określenie możliwości poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.), istniejącej w zasobach genetycznych Instytutu Ogrodnictwa, pod względem takich cech biologicznych, jak okres dojrzewania, atrakcyjność (wygląd), wielkość i masa owoców, wytwarzanie kolców przez rośliny, siła wzrostu i zdrowotność krzewów. Badaniem objęto najbardziej wartościowe genotypy wyselekcjonowane z populacji 2640 siewek pokolenia F<sub>1</sub>, otrzymanych ze skrzyżowania w układzie diallelicznym, wg II metody Griffinga (Griffing, 1956) 10 odmian maliny ('Canby', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Polana', 'Polka', 'Radziejowa', 'Schönemann', 'Sokolica', 'Veten' i 'Willamette'). Uzyskane wyniki badań potwierdziły, że możliwe jest poszerzenie zmienności genetycznej przy zastosowaniu metod hodowli konwencjonalnej, a także połączenie w jednym genotypie takich cech maliny, jak zdolność do wytwarzania wysokiej jakości owoców, wydłużone letnio-jesienne owocowanie i bezkolcowość pędów.

**Słowa kluczowe:** genotypy maliny czerwonej, hodowla konwencjonalna, hodowla krzyżówkowa, hodowla twórcza maliny, hybrydyzacja, selekcja,

The aim of the study was to determine the possibility of extending the genetic variability of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) stock existing in the genetic resources of the Research Institute of Horticulture in terms of such biological characteristics as ripening time, attractiveness (appearance), size and weight of fruit, spine production by plants, growth vigour and health of shrubs. The paper presents the results of research from 2019, i.e. the first year of clone evaluation. The study includes the most valuable genotypes selected from a population of 2640 seedlings of the F<sub>1</sub> generation, obtained from hybridization made in a diallel system, according to the Griffing II method (Griffing, 1956) of 10 cultivars of raspberry ('Canby', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Polana', 'Polka', 'Radziejowa', 'Schönemann', 'Sokolica', 'Veten' and 'Willamette'). The obtained test results confirmed that it is possible to broaden genetic variability using conventional breeding methods, as well as to combine in one genotype such features of raspberry as the ability to produce high quality fruit, extend summer-autumn fruiting and produce spineless shoots.

**Key words:** conventional breeding, creative raspberry breeding, cross breeding, hybridization, red raspberry genotypes, selection

## Wstęp

Owoce maliny właściwej (*Rubus idaeus*), potocznie zwanej czerwoną, należą do grupy najbardziej delikatesowych owoców świata, o bardzo wszechstronnym wykorzystaniu. Są wyśmienite jako świeże owoce deserowe i doskonale na dżemy, kompoty, soki, mrożonki i cenne dodatki smakowe do różnych wyrobów (lody, czekolady, cukierki, herbaty itp.). Maliny zawierają wiele substancji odżywczych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego, jak witaminy A, B2 (ryboflawina),

B3 (niacyna), B6, B9 (kwas foliowy), C (kwas askorbinowy), E i K, czy takie pierwiastki, jak potas, magnez, wapń, sód, żelazo i cynk (Burton-Freeman i in., 2016). Wielką zaletą malin jest ich niska kaloryczność, 100 g świeżych malin to tylko 52 kcal. Ponadto owoce te, ze względu na zawartość kwasu elagowego (Markowski i Płocharski, 2011), charakteryzującego się właściwościami antybakteryjnymi, wspomagają leczenie przeziębień i grypy. Znane jest również ich działanie antyoksydacyjne, antykancerogenne i przeciwdziałające wolnym rodnikom,



dzięki dużej zawartości związków fenolowych, w tym antocyjanów i elagitannin (Castilho Maro i in., 2013; Burton-Freeman i in., 2016).

Polska od wielu lat jest czołowym w świecie producentem i eksporterem malin – świeżych, mrożonych i ich przetworów. W ostatnich latach średnio rocznie produkujemy około 120 tys. ton malin (w roku 2019, z uwagi na suszę było to tylko około 75 tys. ton) (GUS 2019). Polska jest więc największym w świecie producentem tych owoców (obok Serbii), a produkcja malin cały czas rozwija się. W szybkim tempie rośnie powierzchnia malin uprawianych pod osłonami wysokimi (uprawa sterowana na zbiór przyspieszony i opóźniony). Dużą część malin produkowanych w Polsce dostarczają odmiany hodowli Instytutu Ogrodnictwa. Przez wiele lat szczególnie cenną była „powtarzająca” odmiana ‘Polka’ (Danek i Markowski, 2003; Danek 2012), która owocuje w okresie letnio-jesiennym. Oprócz takich zalet, jak wysoka plenność, dobra zimotrwałość, atrakcyjny kształt i wygląd oraz dobry smak owoców, odmiana ta posiada także wady. Należy do nich wysoka podatność roślin i owoców na wirusa o nazwie *Raspberry Bushy Dwarf Virus* (RBDV), który powoduje krzaczącą karłowatość roślin oraz nierównomierne dojrzewanie i deformację owoców, zwane też rozpadaniem się owoców maliny właściwej (Żurawicz i Cieślińska 2005; Tzanetakis i in. 2007; Muster 2008). Wirus ten rozprzestrzenia się nie tylko z porażonym materiałem roślinnym, ale także z pyłkiem kwiatów i poprzez zainfekowane nasiona. Nie ma możliwości zwalczania tego patogena na plantacji, a straty z powodu porażenia roślin są duże i mają charakter narastający (Moore i Hoashi-Erhardt, 2012; Paszko, 2012; Paszko i in., 2018). Wadą roślin tej odmiany jest też silna kolczatość (kolczastość) pędów. Cecha ta znacząco utrudnia prace pielęgnacyjne, a zwłaszcza zbiór owoców. Za wadę odmiany ‘Polka’ uznaje się też intensywnie czerwoną barwę skórki jej owoców. Powoduje to, że po krótkim okresie przetrzymywania, np. ekspozycji na półkach w supermarketach, owoce ‘Polki’ stwarzają wrażenie przejrzałych.

Informacje dostępne w literaturze fachowej wskazują, że są już genotypy maliny właściwej o różnej porze dojrzewania owoców, charakteryzujące się wytwarzaniem jasnoczerwonych owoców, małą podatnością na RBDV, zróżnicowanym terminem dojrzewania i bezkolcowością pędów (Jones i McGavin, 2004; Moore i Martin, 2008). Oznacza to, że możliwe jest poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie gatunku *Rubus idaeus* poprzez zastosowanie konwencjonalnych metod hodowli. Jest więc możliwe uzyskanie nowych

genotypów, łączących w sobie różne, pożądane cechy biologiczne, w tym bardzo ważne z użytkowego punktu widzenia, jak zróżnicowana pora dojrzewania, dobra jakość zewnętrzna i wewnętrzna owoców, mała podatność/tolerancja roślin na groźne choroby wirusowe, czy bezkolcowość i w ten sposób wzbogacenie genetycznej i fenotypowej różnorodności w obrębie gatunku *Rubus idaeus*.

Celem badań jest sprawdzenie hipotezy zakładającej, że w oparciu o użyte w badaniach odmiany i zastosowane techniki hodowli konwencjonalnej, możliwe jest poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie gatunku *Rubus idaeus* i wykorzystanie jej jako źródła genów do tworzenia nowych odmian maliny czerwonej. Prawdopodobieństwo uzyskania takich innowacyjnych genotypów jest bardzo duże, ponieważ użyte w badaniach odmiany maliny pochodzą z różnych regionów świata i różnią się pod względem bardzo wielu cech biologicznych, co potwierdzają wyniki badań, również polskich (Żurawicz, 2016a, 2016b, 2017, 2018; Żurawicz i in., 2017, 2018).

## Materiały i Metody

Wyjściowym materiałem roślinnym w badaniach była populacja mieszańców (siewek) pokolenia F<sub>1</sub>, otrzymanych w roku 2014 ze skrzyżowania w układzie diallelicznym, wg II metody Griffinga (Griffing, 1956) dziesięciu odmian maliny właściwej. Wykaz oraz krótką charakterystykę tych odmian zamieszczono w Tabeli 1, zaś schemat krzyżowań – w Tabeli 2.

Badana populacja siewek rosła w doświadczeniu na polu doświadczalnym Sadu Pomologicznego Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Doświadczenie to założono wiosną 2015 roku w układzie bloków losowych, w czterech powtórzeniach, z 12 roślinami na poletku, w rozstawie 0,4 m × 2,0 m. Łącznie było to 2640 siewek, należących do 45 rodzin mieszańców, otrzymanych w wyniku kontrolowanych krzyżowań form rodzicielskich oraz do 10 rodzin mieszańców, otrzymanych na drodze samozapylenia tych form. Pielęgnacja roślin w doświadczeniu była zgodna z zaleceniami dla plantacji produkcyjnych maliny właściwej w Polsce.

W latach 2016–2017 oceniono wszystkie mieszańce (siewki) i ich formy rodzicielskie pod względem następujących cech: plonowanie (typ owocowania), wybrane cechy owoców (wygląd czyli atrakcyjność i wielkość), masa owoców, siła wzrostu roślin, pokrój roślin oraz kolczatość pędów.



Tabela 1

Table 1

## Wykaz oraz krótka charakterystyka odmian użytych w programie krzyżowań

## List and brief description of the cultivars used in the crossing program

Nazwa odmiany Cultivar name	Kraj pochodz. Country of the origin	Rodowód Pedigree	Pora dojrzewania Ripening time	Plenność Productivity	Wielkość owoców Fruit size	Barwa owoców Fruit colour	Podatność na RBDV RBDV susceptibility	Obecność kolców na pędach Presence of spines on shoots
Canby*	USA	Viking × Lloyd George	dość wczesna	wysoka	średnie	żywo czerwone	podatna	+
Glen Ample*	UK	Brak informacji	średnio-wczesna	wysoka	duże	jasno czerwone	mało podatna	-
Laszka*	POL	80408 × 80192	wczesna	wysoka	bardzo duże	jasno czerwone	podatna	+
Polana**	POL	Heritage × Eva Herbsternte	połowa VIII	dość wysoka	średnie	żywo czerwone z silnym połyskiem	mało podatna	+
Polka**	POL	Autumn Bliss + Lloyd George + <i>R. crataeifolius</i>	VII/VIII	wysoka	średnie i duże	żywo czerwone z silnym połyskiem	bardzo podatna	+
Radziejowa*	POL	92271 × 96221	wczesna (druga połowa VI)	dość wysoka	duże	żywo czerwone	podatna	+
Schönemann*	GER	Lloyd Georg × Preussen	bardzo późna	wysoka	bardzo duże	ciemnoczerwone	mało podatna	+
Sokolica*	POL	96131 × 96221	średnio wczesna	wysoka	duże	jasno czerwone	podatna	+
Veten*	NOR	Asker × Lloyd George	wczesna	średnia do wysokiej	średnie i duże	czerwone i ciemnoczerwone	mało podatna	+
Willamette*	USA	Lloyd George × Newburgh	późna	wysoka	duże	żywo czerwone	tolerancyjna	+

Objaśnienie: \* – odmiana tradycyjna (letnia); \*\* – odmiana „powtarzająca” (letnio-jesienna)

Explanation: \* – traditional (summer) cultivar; \*\* – “repeating” cultivar (summer-autumn)

Tabela 2

Table 2

## Schemat krzyżowania wybranych form rodzicielskich maliny właściwej

## Diagram of crossing of selected raspberry parental forms

♀ \ ♂	Canby	Glen Ample	Laszka	Polana	Polka	Radziejowa	Schönemann	Sokolica	Veten	Willamette
Canby	xx	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Glen Ample		xx	x	x	x	x	x	x	x	x
Laszka			xx	x	x	x	x	x	x	x
Polana				xx	x	x	x	x	x	x
Polka					xx	x	x	x	x	x
Radziejowa						xx	x	x	x	x
Schönemann							xx	x	x	x
Sokolica								xx	x	x
Veten									xx	x
Willamette										xx

Objaśnienie: ♀ – forma mateczna, ♂ – forma ojcowska; x – krzyżowanie wprost, xx – samozapylenie

Explanation: ♀ – maternal form, ♂ – paternal form; x – straight crossing, xx – selfing

W wyniku przeprowadzonej oceny roślin w doświadczeniu, oznaczono (wyselekcjonowano) siewki najbardziej wyróżniające się pod względem ocenianych cech, mogące poszerzać zmienność genetyczną, zachowywaną w zasobach genowych maliny Instytutu. W roku 2017 dokonano rozmnożenia (rozklonowania) wyselekcjonowanych genotypów, w taki sam sposób rozmnożono ich formy rodzicielskie. Otrzymane klony oraz ich formy rodzicielskie wiosną 2018 roku posadzono w kolekcji klonów, w Sadzie Pomologicznym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Wszystkie klony i ich formy rodzicielskie były reprezentowane przez trzy rośliny, rosnące w rozstawie 0,4 m × 2,5 m.

Rok 2019 był pierwszym rokiem pełnego owocowania roślin w kolekcji klonów i zarazem ich pierwszej szczegółowej oceny. Obejmowała ona takie cechy, jak:

- typ owocowania - L-odmiana letnia, J - odmiana jesienna, L-D - odmiana letnia dwupiętrowa (mająca zdolność do wytworzenia owoców także w wierzchołkowej części pędu pierwszego roku, owoce te mogą stanowić plon handlowy), L-D-P - odmiana letnia dwupiętrowa późna (mająca zdolność do wytworzenia owoców także w wierzchołkowej części pędu pierwszego roku, ale owoce te powstają bardzo późno, nie dorastają i dlatego nie stanowią plonu handlowego);
- wygląd owoców (wielkość i atrakcyjność uwzględniająca jednolitość i regularność kształtu owoców, barwę i jej jednolitość, a także natężenie połysku) - ocena w skali bonitacyjnej 1-9, w której 1 to najniższa, zaś 9 to najwyższa wartość cechy;
- masa owoców - iloraz plonu i liczby owoców w końcu drugiego tygodnia (dojrzewania) zbiorów;
- obecność lub brak kolców na pędach;
- wysokość krzewów – pomiar najwyższego pędu w krzewie;
- zdrowotność krzewów – ocena w skali bonitacyjnej 1-3, w której 3 to najwyższa wartość cechy (najwyższa zdrowotność).

## Wyniki

Rezultatem wykonanej oceny było wskazanie 39 klonów, które zdaniem oceniających, mają najwyższy potencjał do poszerzenia istniejącej zmienności genetycznej maliny utrzymywanej w zasobach genowych Instytutu. Ich wykaz, numery oraz wyniki oceny wraz z wynikami analogicznej oceny form rodzicielskich padano w Tabeli 3.

Jak pokazują wyniki zawarte w Tabeli 3,

oceniane klony bardzo różnią się pod względem ocenianych cech. Spośród nich, tylko dziewięć genotypów (23,1% populacji klonów) to klony typowo letnie (oznaczone w Tab. 3 literą L), owocujące tylko w okresie wczesnego lata (czerwiec/lipiec). Nieco więcej, bo 14 klonów (35,9%) to klony o jesiennym charakterze owocowania (J), owocujące w miesiącach sierpień i wrzesień, a nawet jeszcze w październiku. Pozostałe 15 klonów (38,5%) to genotypy jesienno-letnie (L-D, tzn. Letnie-Dwupiętrowe). Mają one zdolność do wydawania owoców jesienią w górnej części wysokich pędów młodych (tegorocznych) oraz z uwagi na swoją wysokość, także wczesnym latem w roku następnym, w dolnej części tych samych pędów. Z morfologicznego punktu widzenia takie genotypy można nazywać malinami dwupiętrowymi, bo w pierwszym roku wydają owoce w górnej części (górne piętro) pędu, a w drugim roku w dolnej części (dolne piętro) tego samego pędu. Jednakże sześć klonów z tej grupy zaliczono do podgrupy oznaczonej w Tabeli 3 jako L-D-P, czyli Letnie-Dwupiętrowe-Późne. U tych klonów owoce na górnym piętrze młodego pędu powstają późnym latem i dlatego na ogół nie dojrzewają. Do grupy genotypów o takim charakterze wzrostu i owocowania zaliczono też cztery odmiany rodzicielskie badanych klonów, czyli 'Veten', 'Canby', 'Laszka' i 'Sokolica' oraz odmianę standardową 'Przehyba'. Wymienione odmiany z agrotechnicznego punktu widzenia uznawane są za odmiany typowo letnie, ale mają zdolność do wytwarzania kwiatostanów i związków owocowych na wierzchołkach młodych (tegorocznych) pędów.

Owoce ocenianych klonów charakteryzują się na ogół dobrą zewnętrzną jakością, określaną ich atrakcyjnością i wielkością. Cechy te oceniano w skali bonitacyjnej 1-9 i za wartościowe uznano jedynie te klony, których owoce dla obu cech uzyskały ocenę co najmniej 6 w przyjętej skali bonitacyjnej, w trakcie dwukrotnej oceny. Ważną informacją jest także przeciętna masa zbieranych owoców. Pod tym względem wyróżniały się klony o numerach M-52, M-412, M-206, M-378, M-336, M-402 oraz M-363, u których średnia masa owoców była wyższa niż 4 g. Owoce o największej masie wytwarzał klon M-206, przeciętna masa jego owoców to 6,2 g, była ona wyraźnie większa niż przeciętna masa owoców rodzicielskiej odmiany 'Glen Ample' (5,7 g).

Oceniane klony różniły się też stopniem kolczastości pędów, ale tylko osiem genotypów (20,5% populacji tych klonów) to klony bezkolcowe. Były nimi klony o numerach M-217, M-258, M-397, M-271, M-378, M-47 oraz M-255.

Tabela 3

Table 3

Wykaz i charakterystyka najwartościowszych klonów, potencjalnie poszerzających zmienność genetyczną zasobów genetycznych maliny właściwej w Instytucie Ogrodnictwa (z uwzględnieniem odmian rodzicielskich / standardowych)

List and characteristics of the most valuable clones, potentially extending the genetic variability of red raspberry genetic resources at the Research Institute of Horticulture (including parental / standard cultivars)

Nr klonu Clone number	Rodowód Pedigree	Typ owocowania Ripening type L, J, L-D, L-D-P*	Cechy owoców (atrakcyjność, wielkość) Fruit characters (attractiveness, size)**			Masa owoców Fruit weight (g) ***	Kolce Spines (+/-)	Wysokość krzewów Shrub height (cm)	Zdrowotność krzewów Shrub healthiness (1-3)****
			15.VI (a, w)	29.VIII (a, w)	20.IX (a, w)				
M-7	Polana × Schönemann	L-D	7,7	6,5		3,8	+	135	3
M-104	Canby × Polana	L-D	7,7		7,7	3,1	+	115	3
M-52	Polana × Sokolica	J			7,8	4,7	+	120	3
M-115	Polka × Radziejowa	L-D	8,8	7,7	8,7	2,7	+	150	2
M-42	Polka × Sokolica	J	8,7			3,2	+	115	2,5
M-57	Polka × Sokolica	J	7,7	8,8	7,7	2,9	+	115	3
M-95	Laszka × Radziejowa	L	8,8			3,3	+	205	2
M-164	Polka × Radziejowa	L-D	8,7		8,8	3,0	+	155	3
M-140	Polka × Polka	J	7,7	7,7	7,7	3,5	+	60	3
M-217	Polka × Sokolica	L	8,7	5,7	6,6	2,6	-	105	3
M-258	Glen Ample × Sokolica	L	7,6			3,2	-	235	3
M-412	Glen Ample × Radziejowa	L	7,7			4,5	+	255	2
M-341	Laszka × Schönemann	L-D-P	8,7			3,6	+/-	210	3
M-345	Canby × Polana	L-D	9,7	9,8	9,9	3,2	+/-	215	2,5
M-410	Radziejowa × Schönemann	L	7,7			3,5	+	150	3
M-311a	Glen Ample × Polana	L-D	6,6			2,8	+/-	180	3
M-397	Canby × Sokolica	L-D-P				2,4	-	225	3
M-271	Laszka × Sokolica	L	6,6			2,4	-	210	3
M-278	Radziejowa × Sokolica	L	9,7			3,7	+	115	3
M-198	Radziejowa × Veten	L-D-P	9,7			3,3	+	160	3
M-208	Radziejowa × Veten	L	8,8			3,6	+	185	3
M-206	Glen Ample × Polka	L-D-P	7,7			6,2	+	160	2,5
M-293	Polana × Sokolica	J	8,8	7,7	7,6	3,5	+	160	2,5
M-317	Glen Ample × Polana	L-D	8,7		8,8	3,7	+	180	2
M-378	Glen Ample × Polka	J		6,7	7,7	4,4	-	155	3
M-336	Polana × Sokolica	J	9,8		6,5	4,3	+	110	3
M-388	Radziejowa × Veten	L	8,9			3,9	+	190	2
M-14	Polana × Veten	J	7,8	7,8	7,7	3,0	+	140	3
M-402	Laszka × Polka	L-D-P	8,8			4,5	+	200	3
M-363	Radziejowa × Sokolica	L-D-P	8,7			4,2	+	180	3

Objaśnienie:

\* - L-odmiana letnia, J - odmiana jesienna, L-D - odmiana letnia dwupiętrowa (mająca zdolność do wytworzenia owoców także w wierzchołkowej części pędu pierwszego roku, owoce te mogą stanowić plon handlowy), L-D-P - odmiana letnia dwupiętrowa późna (mająca zdolność do wytworzenia owoców także w wierzchołkowej części pędu pierwszego roku, ale owoce te powstają bardzo późno, nie dorastają i dlatego nie stanowią plonu handlowego).

\*\* - a-atrakcyjność owoców, w-wielkość owoców; ocena w skali bonitacyjnej 1-9, w której 9 to najwyższa wartość cechy.

\*\*\* - iloraz masy owoców w końcu drugiego tygodnia (dojrzwania) zbiorów i liczby owoców

\*\*\*\* - zdrowotność krzewów w skali bonitacyjnej 1-3, w której 3 to najwyższa wartość cechy (najwyższa zdrowotność).



Tabela 3 cd.

Table 3 cd.

Wykaz i charakterystyka najwartościowszych klonów, potencjalnie poszerzających zmienność genetyczną zasobów genetycznych maliny właściwej w Instytucie Ogrodnictwa (z uwzględnieniem odmian rodzicielskich / standardowych)

List and characteristics of the most valuable clones, potentially extending the genetic variability of red raspberry genetic resources at the Research Institute of Horticulture (including parental / standard cultivars)

Nr Klonu Clone number	Rodowód Pedigree	Typ owocowania Ripening type L, J, L-D, L-D-P*	Cechy owoców (atrakcyjność, wielkość) Fruit characters (attractiveness, size) **			Masa owoców Fruit weight (g) ***	Kolce Spines (+/-)	Wysokość krzewów Shrub height (cm)	Zdrowotność krzewów Shrub healthiness (1-3)****
			15.VI (a, w)	29.VIII (a, w)	20.IX (a, w)				
M-74	Polka × Veten	J	8, 8		7, 7	2,9	+	110	3
M-35	Polka × Veten	L-D	5, 5		7, 8	2,7	-	205	3
M-48	Polka × Sokolica	J	8, 7		7, 6	2,9	+	140	3
M-433	Polka × Schönemann	J	8, 7		7, 7	3,4	+	130	3
M-26	Laszka × Polana	L-D	7, 7	7, 7	8, 7	2,3	+	160	3
M-47	Polka × Sokolica	J	6, 6	7, 6	6, 6	3,6	-	170	3
M-146	Laszka × Polka	J			7, 7	3,7	+	160	3
M-111	Laszka × Polana	L-D	6, 6	8, 8	7, 8	3,0	+	185	3
M-255	Glen Ample × Polka	J			7, 7	2,5	-	100	3
Średnia dla całej populacji mieszańców			(a) 4,3; (w) 4,3					159	
	Polana	J	7, 6	6, 6	6, 6	3,0	+	125	2,5
	Polka	J	7, 6	6, 6	6,6	3,0	+	95	2
	Veten	L-D-P	7, 7			2,8	+	220	3
	Canby	L-D-P	5, 6			2,4	+/-	250	2,5
	Przehyba	L-D-P	7, 9			4,5	+	225	3
	Laszka	L-D-P	7, 8			3,5	+	225	2,5
	Glen Ample	L	8, 8			5,7	-	225	3
	Heritage	J	7, 7	7, 7	7, 7	4,0	+	100	3
	Poemat	J	7, 7	7, 6	6, 5	3,5	+	150	3
	Sokolica	L-D-P	8, 7			3,8	+	205	3
	Radziejowa	L	7, 7			3,9	+	225	2,5

Objaśnienie:

\* - L-odmiana letnia, J - odmiana jesienna, L-D - odmiana letnia dwupiętrowa (mająca zdolność do wytworzenia owoców także w wierzchołkowej części pędu pierwszego roku, owoce te mogą stanowić plon handlowy), L-D-P - odmiana letnia dwupiętrowa późna (mająca zdolność do wytworzenia owoców także w wierzchołkowej części pędu pierwszego roku, ale owoce te powstają bardzo późno, nie dorastają i dlatego nie stanowią plonu handlowego).

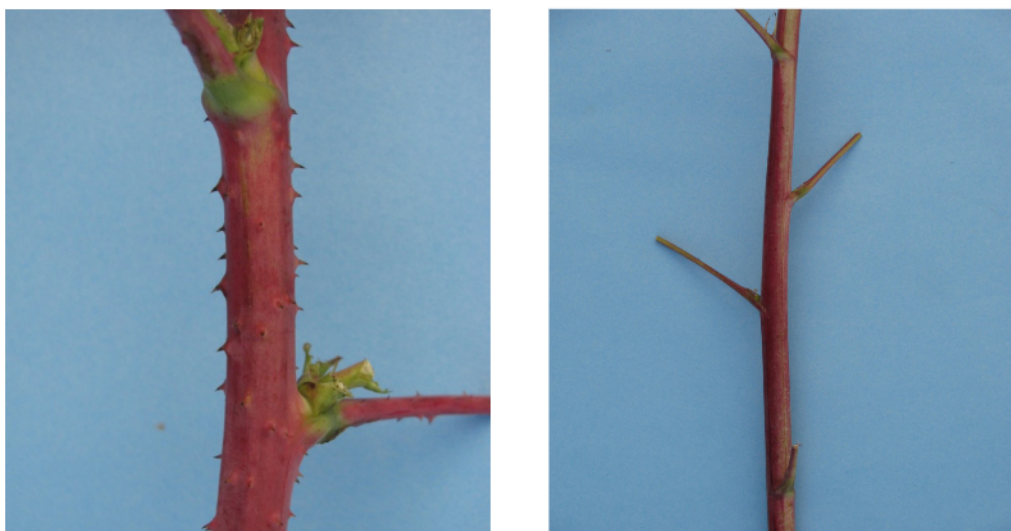
\*\* - a-atrakcyjność owoców, w-wielkość owoców; ocena w skali bonitacyjnej 1-9, w której 9 to najwyższa wartość cechy.

\*\*\* - iloraz masy owoców w końcu drugiego tygodnia (dojrzewania) zbiorów i liczby owoców

\*\*\*\* - zdrowotność krzewów w skali bonitacyjnej 1-3, w której 3 to najwyższa wartość cechy (najwyższa zdrowotność).



Fot. 1. Różna wielkość i kształt owoców maliny właściwej



Fot 2. Dwa typy pędów maliny właściwej: kolcowe i bezkolcowe



Fot. 3. Różnice w sile wzrostu pędów.

W grupie genotypów bezkolcowych były zarówno klony letnie, jesienne, jak i jesienno-letnie czyli dwupiętrowe, a także rodzicielska odmiana 'Glen Ample'. Natomiast trzy klony, oznaczone numerami M-341, M-345 i M-311a uznano za małokolcowe; w przypadku tych klonów kolce występują tylko w dolnej części pędu, podobnie, jak u rodzicielskiej odmiany 'Canby'.

Jak można było oczekiwać, oceniane klony różniły się też pod względem siły wzrostu pędów. Najsilniejszym wzrostem odznaczały się klony typowo letnie oraz dwupiętrowe, a najslabszym – jesienne. Wysokość tych pierwszych osiągała lub przekraczała poziom 200 cm, podczas gdy przeciętna wysokość klonów jesiennych oscylowała w granicach 150 cm. Podobny wzrost stwierdzono

dla odmian rodzicielskich, z tym że w tej grupie odmian najslabiej rosły pędy jesiennej odmiany 'Polka', u odmiany tej przeciętna wysokość pędów wynosiła jedynie 95 cm.

Ostatnią z ocenianych cech badanych klonów była zdrowotność pędów w krzewie. W przypadku krzewów zdecydowanej większości klonów (79,5% ich populacji), oceniana zdrowotność była na poziomie 3,0 (według skali bonitacyjnej 1-3), a więc nie zaobserwowano widocznych symptomów porażenia pędów przez choroby czy szkodniki. Tylko w przypadku ośmiu klonów (20,5% populacji klonów) zdrowotność ta była na poziomie przeciętnym, czyli zawierała się w przedziale 2,0-2,5 punktu w przyjętej skali bonitacyjnej. W sposób dość zbliżony oceniono pod tym względem odmiany rodzicielskie.



## Dyskusja

Poszerzanie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie gatunku *Ribes idaeus* ma sens, jeżeli w jednym genotypie możliwe jest połączenie wielu cech biologicznych roślin, które są ważne z użytkowego punktu widzenia. Za cechy takie w przeprowadzonych badaniach uznano typ owocowania badanych klonów, atrakcyjność, wielkość i masę wytwarzanych owoców, kolczastość pędów, siłę wzrostu krzewów oraz ich zdrowotność. Na to, że połączenie takich cech w jednym genotypie jest możliwe, chociaż dość trudne, wcześniej zwracali uwagę Jennings (1988), Jennings i McNicol (1991) i Daubeny (1996), chociaż autorzy ci nie prowadzili szczegółowych badań w tym kierunku. Trudność tę łatwo wytłumaczyć jednym z praw Mendla, mówiącym, że cechy dziedziczą się niezależnie. Uzyskanie pożądanego celu, zwłaszcza u roślin wieloletnich, wymaga więc szerokich programów krzyżowań z uwzględnieniem znanych źródeł genów, dużych populacji siewek i czasu, a więc dużych nakładów finansowych.

Tymczasem to właśnie odmiany jesienne dominują w uprawie maliny w Polsce, zwłaszcza 'Polana' i 'Polka' (Danek, 2002). Obie wytwarzają dobrej jakości owoce, ale posiadają obfite i dość agresywne kolce. Kolczastość pędów bardzo utrudnia prace pielęgnacyjne związane z przywiązywaniem pędów do konstrukcji wspierającej (rusztowania) i ich usuwaniem po zbiorach owoców. Kolce utrudniają również zbiór owoców, ponieważ mogą kaleczyć ręce osób zbierających owoce, ale mogą także uszkadzać owoce, w wyniku silnego kołysania owocujących pędów przez wiatr, na co zwracał uwagę Daubeny (1996). W przypadku malin jesiennych jest to o tyle istotne, że plantacje takich odmian są prowadzone bez konstrukcji wspierającej rośliny, zapobiegającej nadmiernemu kołysaniu pędów w czasie wietrznej pogody. Warto przy okazji wspomnieć, że obecnie praktycznie wszystkie odmiany jeżyny, uprawiane komercyjnie w świecie to odmiany bezkolcowe, a ogromna większość uprawianych odmian maliny czerwonej to odmiany kolcowe. Są wprawdzie już odmiany bezkolcowe, jak 'Glen Ample', ale udział tej odmiany w produkcji towarowej w Polsce ciągle nie jest wystarczająco wysoki.

Wyniki naszych badań pokazują, że w obrębie dużej populacji siewek i wyselekcjonowanych klonów można znaleźć genotypy bezkolcowe, owocujące w tym samym czasie co polskie odmiany jesienne 'Polka', 'Polana', czy najnowsze 'Poemat'

i 'Polonez', ale nie wytwarzające kolców. Nasze bezkolcowe klony, letnie, jesienne, czy jesienno-letnie wytwarzają dobrej jakości owoce – atrakcyjne w wyglądzie i duże, i nie ustępują pod tym względem odmianom rodzicielskim, które w naszych badaniach służą także jako odmiany standardowe.

Jest rzeczą oczywistą, że rośliny maliny czerwonej powinny odznaczać się dobrą siłą wzrostu i małą podatnością na choroby i szkodniki, ale także wysokim stopniem samopłodności, zwłaszcza w przy uprawach w monokulturach odmianowych i w uprawach pod osłonami na zbiór przyspieszony lub opóźniony (Keep, 1968; Daubeny, 1969, 1971; Redalen, 1976; Colbert i de Oliveira, 1990; Żurawicz, 2016a, 2016b; Żurawicz, 2017; Żurawicz, 2018; Żurawicz i in., 2018). Wprawdzie to ostatnie zagadnienie nie było przedmiotem badań ocenianych klonów, ale takie badania będą podjęte w stosunku do najbardziej perspektywicznych klonów.

Rok 2020 będzie drugim rokiem pełnego owocowania ocenianych klonów, co umożliwi weryfikację wyników oceny uzyskanych w roku 2019. Pozwoli to na wybór tych klonów, które w najwyższym stopniu będą łączyć pożądaną cechy użytkowe, i w ten sposób poszerzać istniejącą zmienność genetyczną zasobów genowych maliny właściwej Instytutu Ogrodnictwa.

## Wnioski

1. Efektywność krzyżowania użytych w badaniach form rodzicielskich (odmian uprawnych) maliny właściwej jest różna, ale możliwe jest uzyskanie dostatecznie dużej populacji siewek o zróżnicowanych cechach biologicznych.
2. Możliwe jest otrzymanie nowych genotypów, poszerzających istniejącą zmienność genetyczną w obrębie gatunku *Rubus idaeus* metodą hodowli konwencjonalnej przy wykorzystaniu odmian uprawnych maliny właściwej, różniących się pod względem wielu cech biologicznych.
3. Szczególnie cennym elementem nowej zmienności jest połączenie w jednym genotypie takich cech biologicznych maliny właściwej, jak zdolność do owocowania w terminie letnim, jesiennym i jesienno-letnim, ze zdolnością do tworzenia pędów bez kolców oraz wytwarzaniem wysokiej jakości owoców.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR.lm.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 75.*



## Literatura

- Burton-Freeman, B. M., Sandhu, A. K., Eridisinghe, I. (2016). Red raspberries and their bioactive polyphenols: cardiometabolic and neuronal health links. *Advances in Nutrition* 7 (1): 44–65. <https://doi.org/10.3945/an.115.009639>
- Castilho Maro, L. A., Pio, R., Santos Guedes, M. N., Patto de Abreu, C.M., Nogueira Curi, P. (2013). Bioactive compounds, antioxidant activity and mineral composition of fruits of raspberry cultivars grown in subtropical areas in Brazil. *Fruits* (68), 209–217.
- Colbert, S., de Oliveira, D. (1990). Influence of pollen variety on raspberry (*Rubus idaeus* L.) development. *J. Heredity* 81 (6): 434–437.
- Danek, J. (2002). 'Polka' and 'Pokusa' – New primocane fruiting raspberry cultivars from Poland. *Acta Hort.* (585), 197–198.
- Danek, J. (2012). Problemy produkcyjne w głównych ośrodkach uprawy malin w świecie. *Mat. z konf. „Produkcja owoców miękkich w warunkach niestabilnego rynku”*, 26 stycznia 2012, Kraśnik: 40–42.
- Danek, J., Markowski, J. (2003). Skład chemiczny owoców wybranych genotypów maliny jako element hodowli jakościowej. I Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych nt. „Współczesne ogrodnictwo i jakość życia”, Kraków, 9–11 września 2003. *Folia Horticulturae*, supl. (2), 397–399.
- Daubeny, H. A. (1969). Some variations in self-fertility in the red raspberry. *Can. J. Plant Sci.* (49), 511–512.
- Daubeny, H. A. (1971). Self-fertility in red-raspberry cultivars and selections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96(5): 588–591.
- Daubeny, H. A. (1996). *Brambles*. In *Fruit Breeding. Volume II. Wine and Small Fruits*. Ed. Jules Janic, James, N. Moore, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Griffing, B. (1956). A generalised treatments of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* (10), 31–50.
- GUS (2019). Wynikowy szacunek zbioru owoców i warzyw, Grudzień 2019.
- Jennings, D. L. (1988). *Raspberries and blackberries: their breeding, disease and growth*. Academic Press. London.
- Jennings, D. L., McNicol, R. J. (1991). *Rubus* breeding: recent progress and problems. *Plant Breeding Abstr.* (61), 329–340.
- Jones, A., McGavin, W. J. (2004). Different rates of spread of Raspberry Bushy Dwarf Virus and some aphid-borne viruses into red raspberry cultivars containing different resistance genes. *Acta Hort.* (656), 149–153.
- Markowski, J., Płocharski, W. (2011). Owoce jako źródło składników ważnych dla zdrowia człowieka [W:]. *Fizjologia roślin sadowniczych strefy umiarkowanej*. Red. nauk. L.S. Jankiewicz, M. Filek, W. Lech. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 438–473.
- Moore, P.P., Hoashi-Erhardt, W.K. (2012). Effects of Raspberry Bushy Dwarf Virus on fruit traits in five raspberry cultivars. *Acta Hort.* (946), 263–266.
- Moore, P. P., Martin, R. R. (2008). Screening for resistance to Raspberry Bushy Dwarf Virus via pollen transmission. *Acta Hort.* (777), 379–383.
- Muster, G. (2008). A survey of the research work on crumbly fruit in red raspberry in Europe. *Acta Hort.* (777), 505–509.
- Paszko, D. (2012). Szanse i zagrożenia opłacalnej produkcji maliny w Polsce. *Mat. z konf. „Produkcja owoców miękkich w warunkach niestabilnego rynku”*, Kraśnik 26 stycznia (2012), 12–16.
- Paszko, D., Krawiec, P., Yareshchenko, A. (2018). Konkurencyjność polskich malin w porównaniu do serbskich i ukraińskich. XIV Konferencja Sadownicza „Jagodowe trendy”, Kraśnik, 7–8 lutego 2018 r.
- Redalen, G. (1976). Pollination and fruit set in raspberries. *Acta Hort.* (60), 169–173.
- Tzanetakis, I. E., Halgren, A., Mosier, N., Martin, R. R. (2007). Identification and characterization of Raspberry Mottle Virus, a novel member of the *Closteroviridae*. *Virus Res.* (127), 26–33.
- Żurawicz, E. (2016)a. Cross-pollination increases the number of drupelets in the fruits of red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Acta Hort.* (1133), 145–151; DOI 10.17660/Acta Hort. 2016.1133.22.
- Żurawicz, E. (2016)b. Zapylenie kwiatów a jakość owoców maliny czerwonej w uprawie pod osłonami. *Biuletyn Związku Sadowników Rzeczpospolitej Polskiej, XII Międzynarodowa Konferencja Sadownicza „Jagodowe trendy”*, Kraśnik, 25 – 26 lutego (2016), 92–97.
- Żurawicz, E. (2017). Wpływ zapylaczy (źródła pyłku) na wielkość owoców maliny czerwonej w uprawie pod osłonami wysokimi. *Biuletyn Związku Sadowników Rzeczpospolitej Polskiej, XIII Międzynarodowa Konferencja Sadownicza „Jagodowe trendy”*, Kraśnik, 19–20 stycznia (2017), 87–93.
- Żurawicz, E. (2018). Jedna technologia w uprawie maliny pod osłonami, ale nie jedna odmiana – dlaczego? *Informator – Biuletyn Związku Sadowników Rzeczpospolitej Polskiej – wydanie specjalne; XIV Międzynarodowa Konferencja Sadownicza „Jagodowe Trendy 2018”*, Kraśnik 7–8 lutego (2018), 20–25.
- Żurawicz, E., Cieślińska, M. (2005). Rozpadanie się owoców maliny czerwonej. *Owoce Warzywa Kwiaty*, nr (11), 32–33.
- Żurawicz, E., Masny, A., Kubik, J., Lewandowski, M. (2017). Germination of red raspberry seeds as affected by the origin and chemical scarification. *Hort. Sci. (Prague)* 44 (3): 133–140. DOI: 10.17221/22/2016-HORTSCI.
- Żurawicz, E., Studnicki, M., Kubik, J., Pruski, K. (2018). A careful choice of compatible pollinizers significantly improves the size of fruits in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Scientia Horticulturae* (235), 253–257.

# Możliwości poprawy jakości owoców truskawki metodą hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*

Possibilities of improvement the quality of strawberry fruit by intra- and interspecific hybridization within the *Fragaria* genus

Agnieszka Masny<sup>1</sup>✉, Monika Mieszczakowska-Frać<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,

<sup>2</sup>Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa Owoców i Warzyw, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,

✉ e-mail: agnieszka.masny@inhort.pl

Prace badawcze nad poszerzaniem zmienności genetycznej u truskawki na świecie ukierunkowane są głównie na poprawę zewnętrznej i wewnętrznej jakości owoców. Celem podjętych w Instytucie Ogrodnictwa badań było określenie możliwości zwiększenia zawartości substancji bioaktywnych (przede wszystkim polifenoli, antocyjanów oraz kwasów organicznych) w owocach truskawki metodą hodowli konwencjonalnej. Na podstawie dwuletniej oceny fenotypowej spośród 6097 siewek, otrzymanych w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowano 90 wartościowych genotypów. W roku 2019 genotypy te oceniono pod względem plonu, masy, atrakcyjności i jędrności owoców, a także zawartości w owocach ekstraktu, związków fenolowych, antocyjanów i kwasu askorbinowego.

Stwierdzono, że największe, najbardziej atrakcyjne i jędrne owoce wytworzyły klony T-201536-16 i T-201536-08 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201514-04 i T-201514-05 ('Candiss' × 'Panvik') oraz T-201560-07 ('Onda' × 'Panvik'). Największą zawartością ekstraktu odznaczały się owoce genotypów T-201536-16 i T-201536-09 ('Clery' × 'Grandarosa'). Najwięcej związków fenolowych zawierały owoce klonów T-201501-02 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201512-04 ('Camarosa' × 'Panvik') oraz T-201567-01 ('Patty' × 'Panvik'), zaś antocyjanów - owoce klonów T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201508-01 ('Alice' × 'Matis'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis') oraz T-201580-01 (*Fragaria chiloensis* Del Norte × 'Elsanta'). Najbardziej bogate w kwas askorbinowy były owoce klonów T-201526-05 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201536-15 ('Clery' × 'Grandarosa') oraz T-201567-01 ('Patty' × 'Panvik'). Najwyższą łączną zawartością wszystkich analizowanych związków bioaktywnych w owocach odznaczały się klony T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis') oraz T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik').

**Słowa kluczowe:** antocyjany, jakość owoców, kwas L-askorbinowy, polifenole, truskawka

Research on widening genetic variation in strawberry around the world is focused mainly on improving external and internal fruit quality. The aim of the research undertaken at the Research Institute of Horticulture was to determine the possibility of increasing the content of bioactive compounds (polyphenols, anthocyanins and organic acids) in strawberry by conventional breeding. Based on a two-year phenotypic evaluation, 90 valuable genotypes were selected from 6097 hybrids obtained as a result of intra- and interspecific hybridization within the *Fragaria* genus. In 2019, these genotypes were assessed in terms of fruit yield, weight, attractiveness and firmness, as well as the content of the extract, phenolic compounds, anthocyanins and ascorbic acid in the fruit.

We found that the largest, most attractive and firmest fruits were produced by clones T-201536-16 and T-201536-08 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201514-04 and T-201514-05 ('Candiss' × 'Panvik') and T-201560-07 ('Onda' × 'Panvik'). The highest extract content was noted in the fruits of genotypes T-201536-16 and T-201536-09 ('Clery' × 'Grandarosa'). The greatest number of phenolic compounds were encountered in the fruits of clones T-201501-02 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201512-04 ('Camarosa' × 'Panvik') and T-201567-01 ('Patty' × 'Panvik'), while the highest anthocyanin levels were evident in the fruit of clones T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201508-01 ('Alice' × 'Matis'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis') and T-201580-01 (*Fragaria chiloensis* Del Norte × 'Elsanta'). Moreover, the richest levels of ascorbic acid were in the fruits of clones T-201526-05 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201536-15 ('Clery' × 'Grandarosa') and T-201567-01 ('Patty' × 'Panvik'). Finally, the highest total content of all analyzed bioactive compounds in fruits was noted for clones T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis') and T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik').

**Key words:** anthocyanins, fruit quality, L-ascorbic acid, polyphenols, strawberry



## Wstęp

Polska należy do grona największych producentów i eksporterów truskawek w świecie. W ostatnich latach w naszym kraju produkuje się ok. 180-200 tys. ton tych owoców (dane za lata 2013-2018). Według FAOSTAT (dane za 2017 r.), z taką wielkością produkcji Polska zajmuje drugie miejsce w Europie i siódme w świecie. Aby utrzymać tak wysoką pozycję, prace badawcze nad poprawieniem jakości truskawek powinny uwzględniać trendy europejskie, wśród których najważniejsza jest obecnie poprawa jakości życia i zdrowia mieszkańców Europy. W sadownictwie szczególnie nacisk kładziony jest na poprawę właściwości odżywczych i prozdrowotnych owoców poprzez zwiększenie w nich zawartości substancji bioaktywnych (Capocasa i in., 2008 a, b). Związki te, znane z właściwości antyoksydacyjnych i antykancerogennych, pełnią bardzo istotną rolę w diecie człowieka, zwłaszcza w zapobieganiu chorobom nowotworowym, miażdżycy i cukrzycy oraz nadciśnieniu tętniczemu (Battino i in., 2009; 2017; Mirończuk-Chodakowska i in., 2011; Giampieri i in., 2012; Białasiewicz i in., 2014; Zasowska i in., 2016). Szczególne znaczenie w profilaktyce tych chorób przypisuje się związkom z grupy polifenoli, flawonoidom i antocyjanom, kwasowi askorbinowemu oraz oligomerom kwasu elagowego - elagotanimom (da Silva-Pinto i in., 2008; Kazimierczak i in., 2009; Marques i in., 2010; Prymont-Przymińska i in., 2016).

Truskawki, podobnie jak i inne owoce jagodowe, są uznawane za bardzo ważne źródło związków bioaktywnych. Jednakże zawartość tych związków w bardzo dużym stopniu zależy od genotypu/odmiany (Wang i Lewers, 2007). Bogate w związki bioaktywne są owoce odmian 'Clery', 'Diana', 'Selvik' (Michalska i in., 2017), 'Manille', 'Matis', 'Asia', 'Camarosa', 'Alice', 'Roxana', 'Madeleine', 'Cifrance', 'Patty' i 'Dora' (Capocasa i in., 2008 b), a także 'Alba', 'Sveva', 'Marina', 'Darselect', 'Elsanta', 'Honeoye' i 'Panvik' (EUBerry germplasm database, 2014). Jednak znacznie więcej związków bioaktywnych, w porównaniu do wymienionych odmian uprawnych z gatunku *Fragaria* × *ananas-sa*, zawierają owoce dzikich form *F. chiloensis* i *F. virginiana* (Wang i Lewers, 2007; Diamanti i in., 2012). Wyniki niektórych badań wskazują, że wykorzystanie puli genowej tych gatunków może skutkować zwiększeniem zawartości związków odżywczych i fitochemicznych w owocach truskawki (Capocasa i in., 2008 a).

Celem podjętych badań było określenie możliwości zwiększenia zawartości związków

bioaktywnych (przede wszystkim polifenoli, antocyjanów oraz kwasów organicznych) w owocach truskawki metodą hodowli konwencjonalnej w oparciu o ocenę mieszańców uzyskanych w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych wybranych form rodzicielskich należących do rodzaju *Fragaria*.

## Material i Metody

Badania prowadzono w Instytucie Ogrodnictwa (IO) w Skierniewicach w roku 2019. Przedmiotem badań były owoce 90 mieszańców (klonów) truskawki, wyselekcjonowanych i rozmnożonych w roku 2017 po dwuletniej ocenie 6097 siewek pokolenia F<sub>1</sub>, uzyskanych w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych wybranych form rodzicielskich z rodzaju *Fragaria*, odznaczających się wysoką zawartością w owocach składników bioaktywnych, głównie kwasu askorbinowego, antocyjanów i polifenoli.

Doświadczenie porównawcze założono jesienią 2017 roku w Sadzie Pomologicznym IO w Skierniewicach na glebie płowej, IV klasy bonitacyjnej, średnio zasobnej w składniki pokarmowe. Szczegółowy wykaz genotypów wraz z ich rodowodami zamieszczono w Tabeli 1. Każdy z wyselekcjonowanych genotypów reprezentowany był przez 15 roślin, posadzonych w jednym powtórzeniu w rozstawie 1,1 × 0,3 m, w kolejności zgodnej z numeracją wyselekcjonowanych pojedynków. Wszystkie prace uprawowo-pielęgnacyjne wykonywano zgodnie z zaleceniami dla plantacji towarowych.

Dojrzewające owoce każdego klonu zbierano sukcesywnie w miarę ich dojrzewania (przeprowadzono łącznie 5 zbiorów owoców), a następnie sortowano na owoce zdrowe i porażone przez szarą pleśń. W każdym z terminów zbiorów oceniano wagowo wielkość plonu i masę owoców zdrowych, zaś bonitacyjnie - atrakcyjność i jędrność owoców, używając w tym celu skali 1-5, gdzie 1 oznacza najniższą wartość, zaś 5 – najwyższą wartość badanej cechy. Oceniając atrakcyjność owoców zwracano uwagę zwłaszcza na kształt owocu i jego wyrównanie (brak deformacji), barwę skórki oraz jej połysk. Po wykonaniu oceny plenności i jakości zewnętrznej, wszystkie owoce zebrane w każdym terminie zbioru umyto, usunięto z nich kielich, zapakowano w indywidualne torebki strunowe i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -25°C do czasu wykonywania analiz. Po zakończeniu zbiorów przygotowano próby mieszane owoców każdego genotypu i przekazano do Pracowni Przetwórstwa i Oceny Jakości Owoców i Warzyw Zakładu Przechowalnictwa i Przetwórstwa Owoców i Warzyw w celu wykonania podstawowych



analiz składu chemicznego owoców. Bezpośrednio przed analizą owoce rozdrobniono za pomocą młynka Blixer 3. Stosowano stały CO<sub>2</sub> lub ciekły N<sub>2</sub> w zależności od wielkości dostarczonej próby. Powstała w ten sposób średnia próbka laboratoryjna została podzielona na dwa powtórzenia techniczne i poddana analizom chemicznym. W badanych próbach oznaczono następujące składniki:

1. Ekstrakt (ekstrakt ogólny): suma składników substancji nielotnych do temperatury 100 oC, rozpuszczalnych w wodzie określona za pomocą refraktometru (RE 50, Mettler Toledo, Szwajcaria) według normy PN-90 A-75101/02;
2. Zawartość barwników antocyjanowych (ANT) - metodą różnicowego pH z zastosowaniem spektrofotometru UV/Vis CARY 300E (Varian) według Giusti i Wrolstad (2001). Pomiar absorbancji przy długości fali 520 nm. Zawartość antocyjanów wyliczono na podstawie molowej absorbancji glukozydu-3-pelargonidyny (22400) i masy molowej – 433,2 g/mol, a wyniki wyrażono w mg/100 g świeżej masy owoców;
3. Zawartość związków fenolowych ogółem (TPC) oznaczono zmodyfikowaną metodą spektrofotometryczną (Tsao i Yang, 2003) przy użyciu odczynnika Folin-Ciocalteu. Ogólna zawartość związków fenolowych przy długości fali 765 nm wyrażona została w mg kwasu galusowego/100 g świeżej masy owocu;
4. Zawartość kwasu L-askorbinowego oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Agilent 1200, detektor DAD) po ekstrakcji w 6% kwasie metafosforowym. Rozdział prowadzono przy użyciu kolumny Supelco LC-18 z prekolumną. Warunki elucji: 0,8 ml/min, temperatura 30 oC, długość fali 244 nm i 210 nm, faza ruchoma – 1% bufor fosforanowy (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) o pH=2,5 w przepływie izokratycznym. Wyniki wyrażono w mg/100 g świeżej masy owoców.

## Wyniki i Dyskusja

Plonowanie badanych genotypów było bardzo różnicowane; różnice dla poszczególnych genotypów wynosiły od 104 do 2802 g/poletko (Tab. 1). Przyczyną tak dużych różnic były przede wszystkim uszkodzenia przez przymrozki wiosenne pąków kwiatowych i kwiatów u genotypów odznaczających się wczesną porą kwitnienia. W okresie wiosennym 2019 roku odnotowano spadki temperatury (mierzone na wysokości 2 m nad powierzchnią gruntu) do -1,2°C w dniach 10-11 kwietnia, do -3,6°C w dniach 15-16 kwietnia oraz do -1,7°C w dniu 8 maja. Do grupy najlepiej

plonujących genotypów (powyżej 2 kg owoców z poletka) zaliczono T-201506-01 i T-201506-02 ('Alice' × 'Pink Rosa'), T-201510-02 i T-201510-04 ('Asia' × 'Matis'), T-201511-01 ('Asia' × 'Panvik'), T-201526-01, T-201526-02 i T-201526-05 ('Cigaline' × 'Grandarosa') oraz T-201536-06 ('Clery' × 'Grandarosa'). Dwie z wymienionych odmian ojcowskich, 'Grandarosa' i 'Pink Rosa', we wcześniejszych badaniach prowadzonych w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach odznaczały się wysoką plennością (Masny i Żurawicz, 2015; Masny i in., 2015). Jak wynika z przeprowadzonych wcześniej badań, odmiany te są nie tylko wysoce przydatne do uprawy towarowej, ale są również dobrymi donorami cechy wysokiej plenności, którą przekazują potomstwu.

Ocena fenotypowa cech jakości owoców badanych klonów (pomiar ich wielkości, a także ocena bonitacyjna atrakcyjności i jędrności) pozwoliła na wyodrębnienie najbardziej wartościowych genotypów. Do klonów o największych owocach zaliczono: T-201536-07 ('Clery' × 'Grandarosa'; średnia masa 1 owocu 21,0 g), T-201525-01 ('Cifrance' × 'Panvik'; 18,0 g) oraz T-201536-16 ('Clery' × 'Grandarosa'; 16,2 g). Najbardziej atrakcyjnymi owocami (ocena powyżej 4,5 w skali 1-5) w grupie badanych genotypów odznaczały się: T-201511-01 ('Asia' × 'Panvik'), T-201536-04 oraz T-201536-16 ('Clery' × 'Grandarosa'), zaś najbardziej jędrne owoce (ocena 5 w skali 1-5) posiadały klony: T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201512-06 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201536-10 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201555-02 ('Marmolada' × 'Grandarosa') oraz T-201560-02 ('Onda' × 'Panvik'). Biorąc pod uwagę cały kompleks wymienionych cech jakości owoców, za najbardziej cenne uznano klony: T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201511-01 ('Asia' × 'Panvik'), T-201512-05 i T-201512-06 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201514-04 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201526-06 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201536-01, T-201536-02, T-201536-05, T-201536-06, T-201536-07 i T-201536-09 ('Clery' × 'Grandarosa') oraz T-201560-07 ('Onda' × 'Panvik').

Wymienione genotypy odznaczały się bardzo atrakcyjnymi owocami: dużymi lub bardzo dużymi, o stożkowatym lub sercowatym kształcie, pomarańczowoczerwonej lub intensywnie czerwonej barwie skórki z silnym połyskiem oraz wysokiej jędrności. Owoce o takich cechach są szczególnie pożądane przez konsumentów, dlatego też wysoka wizualna jakość owoców jest jednym z głównych kierunków prac hodowlanych prowadzonych na całym świecie (Roudeillac i Trajkovski, 2004), również w Instytucie Ogrodnictwa.

Tabela 1

Table 1

Plon i wizualna jakość owoców 90 genotypów truskawki (Skierniewice, 2019)  
Fruit yield and external fruit quality of 90 strawberry genotypes (Skierniewice, 2019)

Genotyp Genotype	Rodowód Parentage	Plon owoców Fruit yield (g)	Masa 1 owocu Weight of 1 fruit (g)	Atrakcyjność owoców <sup>1</sup> Fruit attractiveness <sup>1</sup>	Jędrność owoców <sup>1</sup> Fruit firmness <sup>1</sup>
T-201501-01	Alba × Grandarosa	1414	10,63	4,4	4,3
T-201501-02	Alba × Grandarosa	819	9,53	3,7	4,8
T-201501-03	Alba × Grandarosa	1494	8,81	4,2	5,0
T-201506-01	Alice × Pink Rosa	2094	11,44	3,6	4,3
T-201506-02	Alice × Pink Rosa	2334	10,14	3,5	4,5
T-201508-01	Alice × Matis	827	6,70	3,0	3,8
T-201508-02	Alice × Matis	832	7,46	2,8	4,8
T-201508-03	Alice × Matis	530	8,25	2,8	4,7
T-201508-04	Alice × Matis	1608	10,51	4,0	4,1
T-201510-01	Asia × Matis	771	7,02	3,9	4,9
T-201510-02	Asia × Matis	2737	11,49	3,9	4,9
T-201510-03	Asia × Matis	1860	8,01	4,3	4,4
T-201510-04	Asia × Matis	2744	8,18	4,1	4,8
T-201511-01	Asia × Panvik	2802	10,96	4,6	4,8
T-201512-01	Camarosa × Panvik	617	7,90	3,6	4,3
T-201512-02	Camarosa × Panvik	1934	9,06	4,1	4,6
T-201512-03	Camarosa × Panvik	1934	10,61	3,5	4,8
T-201512-04	Camarosa × Panvik	1057	8,20	3,7	4,8
T-201512-05	Camarosa × Panvik	333	8,74	4,5	4,8
T-201512-06	Camarosa × Panvik	1016	8,23	4,0	5,0
T-201513-01	Candiss × Matis	626	8,89	4,0	4,1
T-201513-02	Candiss × Matis	680	6,09	4,0	4,7
T-201513-03	Candiss × Matis	373	6,80	3,9	4,5
T-201513-04	Candiss × Matis	1060	7,59	3,9	4,8
T-201513-05	Candiss × Matis	1067	9,92	3,7	4,3
T-201513-06	Candiss × Matis	1145	9,89	4,0	4,4
T-201514-01	Candiss × Panvik	2000	10,74	4,2	4,6
T-201514-02	Candiss × Panvik	1987	9,27	3,3	4,3
T-201514-03	Candiss × Panvik	1569	7,00	4,1	4,4
T-201514-04	Candiss × Panvik	1784	11,62	4,3	4,7
T-201514-05	Candiss × Panvik	628	11,80	4,5	4,6
T-201514-06	Candiss × Panvik	692	9,73	4,3	4,8
T-201514-07	Candiss × Panvik	472	8,73	4,0	4,8
T-201514-08	Candiss × Panvik	536	7,70	3,6	4,1
T-201514-09	Candiss × Panvik	561	10,95	3,8	4,5
T-201517-01	Chandler × Matis	734	10,65	3,9	4,5
T-201517-02	Chandler × Matis	672	8,71	4,1	4,6
T-201517-03	Chandler × Matis	1251	10,32	4,4	4,6
T-201517-05	Chandler × Matis	1282	5,39	3,3	4,8
T-201524-01	Cifrance × Matis	1333	8,05	4,1	4,7

Objaśnienie: <sup>1</sup>Ocena według skali bonitacyjnej 1-5, gdzie 1 oznacza najniższą wartość, zaś 5 – najwyższą wartość badanej cechy.

Explanation: <sup>1</sup>Assessment according to the rating scale 1-5, where 1 is the lowest value and 5 - the highest value of the examined trait

Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

## Plon i wizualna jakość owoców 90 genotypów truskawki (Skierniewice, 2019)

## Fruit yield and external fruit quality of 90 strawberry genotypes (Skierniewice, 2019)

Genotyp Genotype	Rodowód Parentage	Plon owoców Fruit yield (g)	Masa 1 owocu Weight of 1 fruit (g)	Atrakcyjność owoców <sup>1</sup> Fruit attractiveness <sup>1</sup>	Jędrność owoców <sup>1</sup> Fruit firmness <sup>1</sup>
T-201524-02	Cifrance × Matis	916	9,59	4,0	4,6
T-201525-01	Cifrance × Panvik	821	17,97	3,3	4,5
T-201526-01	Cigaline × Grandarosa	2294	8,10	4,1	4,9
T-201526-02	Cigaline × Grandarosa	2618	10,97	3,7	4,7
T-201526-03	Cigaline × Grandarosa	1010	7,59	3,6	4,6
T-201526-04	Cigaline × Grandarosa	1374	8,07	3,9	4,6
T-201526-05	Cigaline × Grandarosa	2143	7,70	4,0	4,5
T-201526-06	Cigaline × Grandarosa	840	9,96	4,5	4,7
T-201529-01	Cigaline × Matis	476	10,08	4,0	4,0
T-201536-01	Clery × Grandarosa	1103	9,08	4,2	4,8
T-201536-02	Clery × Grandarosa	1033	9,03	4,5	4,9
T-201536-03	Clery × Grandarosa	1208	7,13	4,3	4,8
T-201536-04	Clery × Grandarosa	671	10,81	4,6	4,6
T-201536-05	Clery × Grandarosa	997	9,44	4,3	4,7
T-201536-06	Clery × Grandarosa	2791	10,44	4,4	4,7
T-201536-07	Clery × Grandarosa	218	20,96	4,5	4,9
T-201536-08	Clery × Grandarosa	362	11,37	4,5	4,5
T-201536-09	Clery × Grandarosa	633	9,22	4,0	4,9
T-201536-10	Clery × Grandarosa	489	11,76	4,0	5,0
T-201536-14	Clery × Grandarosa	187	6,74	3,8	4,8
T-201536-15	Clery × Grandarosa	202	7,35	3,8	4,5
T-201536-16	Clery × Grandarosa	744	16,12	4,9	4,6
T-201536-17	Clery × Grandarosa	241	14,92	3,8	4,0
T-201537-01	Clery × Matis	226	10,23	3,5	4,2
T-201537-02	Clery × Matis	1031	9,16	4,0	4,3
T-201539-01	Darselect × Grandarosa	920	6,27	3,3	3,5
T-201555-01	Marmolada × Grandarosa	1170	8,18	3,0	4,3
T-201555-02	Marmolada × Grandarosa	996	8,79	3,3	5,0
T-201555-04	Marmolada × Grandarosa	952	7,83	4,3	4,4
T-201555-06	Marmolada × Grandarosa	1241	7,43	3,8	4,8
T-201555-07	Marmolada × Grandarosa	104	11,00	4,0	4,8
T-201555-08	Marmolada × Grandarosa	833	7,92	3,6	4,9
T-201555-09	Marmolada × Grandarosa	675	10,33	3,7	4,7
T-201560-01	Onda × Panvik	629	6,29	3,8	4,5
T-201560-02	Onda × Panvik	397	5,79	4,0	5,0
T-201560-04	Onda × Panvik	519	7,37	3,8	4,3
T-201560-05	Onda × Panvik	244	5,71	3,3	4,7
T-201560-07	Onda × Panvik	1563	11,44	4,2	4,8
T-201560-08	Onda × Panvik	1167	11,61	3,8	4,9
T-201567-01	Patty × Panvik	876	6,86	3,9	4,9

Objaśnienie: <sup>1</sup>Ocena według skali bonitacyjnej 1-5, gdzie 1 oznacza najniższą wartość, zaś 5 – najwyższą wartość badanej cechy.

Explanation: <sup>1</sup>Assessment according to the rating scale 1-5, where 1 is the lowest value and 5 - the highest value of the examined trait



Tabela 1 cd.

Table 1 cd.

Plon i wizualna jakość owoców 90 genotypów truskawki (Skierniewice, 2019)  
Fruit yield and external fruit quality of 90 strawberry genotypes (Skierniewice, 2019)

Genotyp Genotype	Rodowód Parentage	Plon owoców Fruit yield (g)	Masa 1 owocu Weight of 1 fruit (g)	Atrakcyjność owoców <sup>1</sup> Fruit attractiveness <sup>1</sup>	Jędrność owoców <sup>1</sup> Fruit firmness <sup>1</sup>
T-201567-02	Patty × Panvik	307	11,80	3,9	4,6
T-201567-03	Patty × Panvik	1070	8,27	4,1	4,8
T-201567-04	Patty × Panvik	1173	7,98	4,1	4,3
T-201571-01	Sophie × Pink Rosa	509	8,70	4,0	4,5
T-201571-02	Sophie × Pink Rosa	210	4,62	3,3	4,3
T-201571-03	Sophie × Pink Rosa	725	8,78	3,4	4,6
T-201580-01	<i>F. chil.</i> Del Norte × Elsanta	1046	3,56	3,2	4,3
T-201580-02	<i>F. chil.</i> Del Norte × Elsanta	649	3,61	2,8	4,3
T-201585-01	<i>F. chil.</i> Yaquina A × Matis	335	4,53	3,7	4,5
T-201590-01	<i>F. chil.</i> Yaquina B × Panvik	1408	4,49	2,7	4,3
Średnia dla wszystkich genotypów Average for all genotypes		1051	9,05	3,87	4,58

Objaśnienie: <sup>1</sup>Ocena według skali bonitacyjnej 1-5, gdzie 1 oznacza najniższą wartość, zaś 5 – najwyższą wartość badanej cechy.

Explanation: <sup>1</sup>Assessment according to the rating scale 1-5, where 1 is the lowest value and 5 - the highest value of the examined trait

Zawartość ekstraktu refraktometrycznego (substancji rozpuszczalnych) w owocach 90 badanych genotypów wahała się od 5,3% do 12,7% (Tab. 2). Najwyższą zawartość ekstraktu (powyżej 11%) wykazano w owocach klonów: T-201508-03 ('Alice' × 'Matis'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis'), T-201536-09 i T-201536-16 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201567-01 i T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201580-01 (*F. chiloensis* Del Norte × 'Elsanta'). Należy podkreślić, że owoce tych klonów w naszych badaniach zawierają więcej cukrów rozpuszczalnych w porównaniu z ocenianymi przez Hasinga i współautorów (2013) owocami mieszańców, otrzymanych w wyniku czynnika układu krzyżowań (5 × 4), w których stwierdzono zawartość ekstraktu na poziomie 5,1% do 9,9% oraz 6,5% do 10,6%, zależnie od sezonu. Podobnie Voća i in. (2008), badając skład chemiczny owoców siedmiu odmian truskawki ('Clery', 'Maya', 'Alba', 'Miss', 'Camarosa', 'Queen Elisa' i 'Elsanta'), wykazali zawartość substancji rozpuszczalnych na poziomie od 6% dla odmiany 'Maya' do 10,1% dla odmiany 'Elsanta'. Poziom cukrów rozpuszczalnych w owocach truskawki, przede wszystkim sacharozę, glukozy i fruktozy, jest ważną cechą jakościową, decydującą o ich smaku (Cordenunsi i in., 2002; Perkins-Veazie, 1995).

Zawartość kwasu askorbinowego w owocach badanych klonów wahała się od 24 do 106 mg/100 g. Tak duże zróżnicowanie tej cechy jest typowe pomiędzy odmianami uprawnymi truskawki (da Silva-Pinto i in., 2008; van De Velde i in., 2013). Jednak

z punktu widzenia zdrowia ludzkiego najcenniejsze są owoce o wysokiej zawartości kwasu askorbinowego (Cruz-Rus i in., 2011). W naszych badaniach najwyższym poziomem kwasu askorbinowego w owocach (powyżej 90 mg/100 g) odznaczały się klony: T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201526-02 i T-201526-05 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201536-08 i T-201536-15 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201537-02 ('Clery' × 'Matis'), T-201539-01 ('Darselect' × 'Grandarosa'), T-201555-02, T-201555-08 i T-201555-09 ('Marmolada' × 'Grandarosa') oraz T-201567-01 i T-201567-03 ('Patty' × 'Panvik'). Zawartość tego składnika w owocach wymienionych klonów jest zatem znacznie wyższa od przeciętnej, wynoszącej około 60 mg/100 g świeżych owoców (Miller i in., 2019). Według Cruz-Rus i współautorów (2011), jeszcze niższą zawartością kwasu askorbinowego (50 mg/100 g) charakteryzują się owoce odmiany 'Camarosa', będącej formą mateczną sześciu, spośród 90 genotypów opisywanych w niniejszej pracy.

Zawartość antocyjanów w owocach wszystkich badanych klonów wahała się od 8 do 70 mg/100 g. Należy podkreślić, że bardzo wysoka zawartość antocyjanów w spożywanych owocach jest pożądana z uwagi na silne właściwości przeciwutleniające tych związków. W naszych badaniach zawartość antocyjanów przekraczająca 50 mg/100 g owoców, stwierdzona została w owocach klonów T-201508-01 ('Alice' × 'Matis'), T-201512-03 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201514-02 i T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis'),

T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201580-01 (*Fragaria chiloensis* Del Norte × 'Elsanta'). Świadczy to o wysokiej wartości prozdrowotnej owoców wymienionych klonów. Według Voća i współautorów (2008), najmniej antocyjanów (spośród siedmiu badanych przez nich odmian truskawki) zawierały owoce odmiany 'Elsanta' (114,76 mg/kg), podczas gdy najwyższą zawartością tych związków odznaczała się odmiana 'Camarosa' (327,39 mg/kg), będąca formą mateczną jednego z wymienionych wyżej mieszańców. Na bardzo wysoką zawartość antocyjanów w owocach odmiany 'Camarosa' (840,2 mg/kg), zwrócili również uwagę Garcia-Viguera i współautorzy (1998).

Zawartość związków fenolowych w owocach badanych genotypów wynosiła od 257 do 478 mg/100 g świeżych owoców. Najwyższym poziomem związków fenolowych w owocach (powyżej 430 mg/100 g) wyróżniały się genotypy: T-201501-02 i T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201512-04 i T-201512-05 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201567-01, T-201567-02 i T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201585-01 (*Fragaria chiloensis* Yaquina A × 'Matis'). Tak wysokiego poziomu związków fenolowych wymaga się zwłaszcza od owoców, przeznaczonych na rynek owoców deserowych, ze względu na ich wysoką wartość prozdrowotną. Jednakże, mimo ogromnego znaczenia polifenoli dla diety człowieka, nadmierny poziom tych związków może powodować lekko cierpki smak truskawek i przez to obniżać ich wartość sensoryczną. Z kolei dla owoców przeznaczonych do przetworstwa, wysoki poziom związków fenolowych może wiązać się z szeregiem problemów technologicznych, a więc najlepsze do tego celu są owoce o średniej zawartości tych związków, która w przypadku badanych klonów wynosiła 360 mg/100 g świeżych owoców. W badaniach, przeprowadzonych przez Palmieri i in. (2017), zawartość fenoli w dojrzałych

truskawkach także była zależna od odmiany i wynosiła od 33,2 mg/100 g świeżych owoców dla odmiany 'Marmolada' do 127,3 mg/100 g dla odmiany 'Eva', a więc znacznie mniej w porównaniu z klonami wyhodowanymi w Instytucie Ogrodnictwa.

Biorąc pod uwagę kompleks analizowanych składników bioaktywnych, za szczególnie cenne klony uznano T-201510-02 ('Asia' × 'Matis'), T-201514-02 i T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis'), T-201526-01 i T-201526-04 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201567-03 i T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201571-02 ('Sophie' × 'Pink Rosa'), ze względu na wysoką zawartość w owocach związków fenolowych ogółem, antocyjanów, a także kwasu askorbinowego. Ponadto, z uwagi na fakt, że związki fenolowe oddziałują synergistycznie na organizm człowieka wraz z kwasem L-askorbinowym (Kazimierzczak i in., 2009), do wartościowych genotypów zaliczono także klony T-201501-02 i T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201526-05 i T-201526-06 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201536-04, T-201536-05, T-201536-06, T-201536-14, T-201536-15 i T-201536-16 ('Clery' × 'Grandarosa') oraz T-201571-02 ('Sophie' × 'Pink Rosa'), posiadające owoce o wysokiej zawartości obu tych składników. Należy także podkreślić, że cztery z wymienionych klonów (T-201501-03, T-201526-06, T-201536-05, T-201536-06) odznaczały się również wysoką jakością zewnętrzną owoców. Można zatem oczekiwać, że owoce tych klonów będą szczególnie cenione przez konsumentów ze względu na ich wysokie walory jakościowe i prozdrowotne. Klony te mogą w przyszłości dać początek nowym, cennym odmianom, jeżeli potwierdzą swoje inne walory produkcyjne, w tym odporność lub małą wrażliwość roślin na stropy biotyczne i abiotyczne.

Tabela 2  
Table 2

Skład chemiczny owoców 90 genotypów truskawki (Skierniewice, 2019)

Chemical composition of fruit of 90 strawberry genotypes (Skierniewice, 2019)

Genotyp Genotype	Ekstrakt Extract [%]	Zawartość związków fenolowych Content of phenolic compounds [mg /100 g]	Zawartość antocyjanów Content of anthocyanins [mg/100 g]	Zawartość kwasu L-askorbinowego Content of L-ascorbic acid [mg/100 g]
T-201501-01	9,0	306	20	73
T-201501-02	9,3	478	20	89
T-201501-03	8,8	434	18	103
T-201506-01	7,9	265	42	52
T-201506-02	7,2	369	48	26
T-201508-01	9,0	322	54	39
T-201508-02	8,6	337	48	32

Tabela 2 cd.

Table 2 cd.

## Skład chemiczny owoców 90 genotypów truskawki (Skierniewice, 2019)

## Chemical composition of fruit of 90 strawberry genotypes (Skierniewice, 2019)

Genotyp Genotype	Ekstrakt Extract [%]	Zawartość związków fenolowych Content of phenolic compounds [mg /100 g]	Zawartość antocyjanów Content of anthocyanins [mg/100 g]	Zawartość kwasu L-askorbinowego Content of L-ascorbic acid [mg/100 g]
T-201508-03	11,1	366	34	61
T-201508-04	8,9	291	39	60
T-201510-01	8,8	303	26	74
T-201510-02	8,7	372	50	71
T-201510-03	9,3	360	37	66
T-201510-04	7,2	298	31	41
T-201511-01	9,3	325	20	69
T-201512-01	9,0	383	35	44
T-201512-02	9,0	362	33	50
T-201512-03	7,5	391	55	58
T-201512-04	9,9	452	36	52
T-201512-05	10,2	433	46	45
T-201512-06	10,0	388	43	56
T-201513-01	9,8	348	24	39
T-201513-02	10,1	421	50	59
T-201513-03	9,6	358	38	54
T-201513-04	9,1	390	26	53
T-201513-05	8,6	392	41	46
T-201513-06	9,6	422	40	59
T-201514-01	8,0	304	27	61
T-201514-02	9,3	394	65	75
T-201514-03	9,1	322	33	71
T-201514-04	9,1	367	34	52
T-201514-05	11,0	356	41	75
T-201514-06	10,0	301	36	67
T-201514-07	9,2	321	23	61
T-201514-08	10,5	403	70	70
T-201514-09	10,1	397	40	65
T-201517-01	8,0	381	36	54
T-201517-02	8,6	328	32	55
T-201517-03	9,4	359	44	59
T-201517-05	11,2	390	54	81
T-201524-01	5,3	318	21	25
T-201524-02	10,5	344	37	84
T-201525-01	9,6	326	34	61
T-201526-01	7,8	407	33	83
T-201526-02	9,0	351	26	98
T-201526-03	10,0	319	23	83
T-201526-04	9,7	392	34	88
T-201526-05	9,9	422	28	106
T-201526-06	9,1	377	25	80
T-201529-01	9,3	344	24	88
T-201536-01	9,4	306	31	85
T-201536-02	9,4	347	20	87
T-201536-03	9,1	313	25	75
T-201536-04	8,6	385	21	73
T-201536-05	10,5	368	19	78
T-201536-06	9,4	385	23	74
T-201536-07	8,3	320	39	65
T-201536-08	8,8	340	22	98
T-201536-09	11,6	280	12	86
T-201536-10	10,5	325	20	76
T-201536-14	10,2	427	24	60



Tabela 2 cd.

Table 2 cd.

## Skład chemiczny owoców 90 genotypów truskawki (Skierniewice, 2019)

## Chemical composition of fruit of 90 strawberry genotypes (Skierniewice, 2019)

Genotyp Genotype	Ekstrakt Extract [%]	Zawartość związków fenolowych Content of phenolic compounds [mg/100 g]	Zawartość antocyjanów Content of anthocyanins [mg/100 g]	Zawartość kwasu L-askorbinowego Content of L-ascorbic acid [mg/100 g]
T-201536-15	11,0	373	30	102
T-201536-16	11,8	418	22	83
T-201536-17	7,0	341	27	33
T-201537-01	6,0	295	22	24
T-201537-02	10,9	354	27	98
T-201539-01	10,3	354	27	91
T-201555-01	10,0	258	35	73
T-201555-02	9,7	257	32	98
T-201555-04	9,5	318	27	57
T-201555-06	9,0	367	24	54
T-201555-07	6,6	333	25	27
T-201555-08	8,5	335	25	94
T-201555-09	8,1	340	16	97
T-201560-01	6,3	309	9	47
T-201560-02	8,2	367	29	46
T-201560-04	10,1	366	27	73
T-201560-05	7,1	281	35	46
T-201560-07	9,5	327	18	49
T-201560-08	8,7	345	27	62
T-201567-01	11,2	454	8	102
T-201567-02	10,7	442	33	64
T-201567-03	10,1	386	34	98
T-201567-04	12,7	442	52	80
T-201571-01	8,2	419	24	76
T-201571-02	11,0	419	33	74
T-201571-03	10,0	332	28	65
T-201580-01	11,1	367	54	57
T-201580-02	10,0	314	43	59
T-201585-01	8,8	435	34	44
T-201590-01	10,9	416	18	45
Średnia dla wszystkich genotypów Average for all genotypes	9,31	359,5	31,9	66,5

**Wnioski**

1. Możliwe jest poprawienie zewnętrznej jakości owoców truskawki oraz zwiększenie w nich zawartości składników bioaktywnych metodą hodowli konwencjonalnej opartej na hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*.
2. Szczególne cenne dla diety człowieka są owoce klonów T-201510-02 ('Asia' × 'Matis'), T-201514-02 i T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517-05 ('Chandler' × 'Matis'), T-201526-01 i T-201526-04 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201567-03 i T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201571-02 ('Sophie' × 'Pink Rosa'),
3. Genotypy o wysokiej jakości zewnętrznej i wewnętrznej owoców mogą stać się w przyszłości cennymi odmianami uprawnymi lub być wykorzystane w dalszych pracach hodowlanych jako źródło genów warunkujących te cechy.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. ln.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 76.*

## Literatura

- Battino, M., Beekwilder, J., Denoyes–Rothan, B., Laimer, M., McDougall, G.J., Mezzetti, B. (2009). Bioactive compounds in berries relevant to human health. *Nutrition Reviews* 67 (1): 145–150.
- Battino, M., Forbez–Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Mezzetti, B., Giampieri, F. (2017). The effects of strawberry bioactive compounds on human health. *Acta Hort. (ISHS)* (1156): 355–362. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.54>
- Białasiewicz, P., Prymont–Przymińska, A., Zwolińska, A., Sarniak, A., Włodarczyk, A., Krol, M., Glusac, J., Nowak, P., Markowski, J., Rutkowski K.P., Nowak, D. (2014). Addition of strawberries to the usual diet decreases resting chemiluminescence of fasting blood in healthy subjects—possible health-promoting effect of these fruits consumption. *Journal of the American College of Nutrition* 33 (4): 274–87.
- Capocasa, F., Diamanti, J., Tulipani, S., Battino, M., Mezzetti, B. (2008) a. Breeding strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) to increase fruit nutritional quality. *Biofactors* 34 (1): 67–72.
- Capocasa, F., Scalzo, J., Mezzetti, B., Battino, M., 2008 b. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chemistry* 111: 872–878.
- Cordenunsi, B. R., Oliveira Do Nascimento, J. R., Genovese, M. I., Lajolo, F. M. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2581–2586.
- Cruz–Rus, E., Amaya, I., Sanchez–Sevilla, J. F., Botella, M. A., Valpuesta, V., 2011. Regulation of L–ascorbic acid content in strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 62 (12): 4191–4201.
- Da Silva–Pinto, M., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *Food Chemistry* 107: 1629–1635.
- Diamanti, J., Capocasa, F., Balducci, F., Battino, M., Hancock, J., Mezzetti, B. (2012). Increasing strawberry fruit sensorial and nutritional quality using wild and cultivated germplasm. *PLoS ONE* 7 (10): e46470. DOI: 10.1371/journal.pone.0046470
- EUBerry germplasm database (2014). [http://www.euberry.univpm.it/sites/www.euberry.univpm.it/files/euberry/documenti/D1.1%20Data%20base/Revisione/Summary–Genotype%20characteristics%20–%20WP1%207\\_2\\_14%20last%20versionStrawberry.pdf](http://www.euberry.univpm.it/sites/www.euberry.univpm.it/files/euberry/documenti/D1.1%20Data%20base/Revisione/Summary–Genotype%20characteristics%20–%20WP1%207_2_14%20last%20versionStrawberry.pdf)
- García–Viguera, C., Zafrilla, P., Tomás–Barberán, F. A. (1998). The use of acetone as an extactionsolvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochem. Anal.* 9: 274–277.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez–Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., Battino, M., 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality and impact on human health. *Nutrition* 28: 9–19.
- Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons, Inc., August 2001): F1.2.1–F1.2.13. DOI: 10.1002/0471142913.faf0102s00
- Hasing, T. N., Osorio, L. F., Whitaker, V. M. (2013). Within-season stability of strawberry soluble solids content. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 138 (3): 190–197.
- Kazimierczak, R., Hallmann, E., Brodzka, A., Rembiałkowska, E. (2009). A comparison of the polyphenol and vitamin C content in jams of several varieties of black currants *Ribes nigrum* L. from the organic and conventional cultivation. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 54 (3): 123–130.
- Marques, K. K., Renfroe, M. H., Bowling, B. Brevard, P., Lee, R. E., Gloeckner, J. W. (2010). Differences in antioxidant levels of fresh, frozen and freeze–dried strawberries and strawberry jam. *International Journal of Food Science and Nutrition* 61 (8): 759–769.
- Masny, A., Żurawicz, E. (2015). ‘Pink Rosa’ Strawberry. *HortScience* 50 (10): 1585–1587.
- Masny, A., Żurawicz, E., Markowski, J. (2015). ‘Grandarosa’ Strawberry. *HortScience* 50 (9): 1401–1404.
- Michalska, A., Carlen, C., Heritier, J., Andlauer, W. (2017). Profiles of bioactive compounds in fruits and leaves of strawberry cultivars. *Journal of Berry Research* 7 (2): 71–84.
- Miller, K., Feucht, W., Schmid, M. (2019). Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: a brief overview. *Nutrients*, 11, 1510. DOI: 10.3390/nu11071510
- Mironczuk–Chodakowska, I., Zujko, M. E., Witkowska, A. (2011). Zawartość polifenoli oraz aktywność antyoksydacyjna niektórych przetworów owocowych o znacznym stopniu przetworzenia. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV (3): 905–910.
- Palmieri, L., Masuero, D., Martinatti, P., Baratto, G., Martens, S., Vrhovsek, U. (2017). Genotype–by–environment effect on bioactive compounds in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). *J. Sci. Food Agric.* 97: 4180–4189. DOI: 10.1002/jsfa.8290
- Perkins–Veazie, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Hort. Rev.* 17: 267–297.
- Prymont–Przymińska, A., Białasiewicz, P., Zwolińska, A., Sarniak, A., Włodarczyk, A., Markowski, J., Rutkowski, K. P., Nowak, D. (2016). Addition of strawberries to the usual diet increases postprandial but not fasting non urate plasma antioxidant activity in healthy subjects. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 59 (2): 1–8.
- Roudeillac, P., Trajkovski, K. (2004). Breeding for fruit quality and nutrition in strawberries. *Acta Horticulturae* 649: 55–60.

- Tsao, R., Yang, R. (2003) Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr, A.*, 1018 (1): 29–40. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.08.034
- Van De Velde, F., Tarola, A. M., Guemes, D., Pirovani, M. E. (2013). Bioactive compounds and antioxidant capacity of Camarosa and Selva strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Foods*, 2 (2): 120–131.
- Voća, S., Dobričević, N., Dragović-Uzelac, V., Duralija, B., Družić, J., Čmelik, Z., Skendrović Babojelić, M. (2008). Fruit quality of new early ripening strawberry cultivars in Croatia. *Food Technol. Biotechnol.* 46 (3): 292–298.
- Wang, S. Y., Lewers, K. S., 2007. Antioxidant capacity and flavonoid content in wild strawberries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132 (5): 629–637.
- Zasowska-Nowak, A., Nowak, P. J., Bialasiewicz, P., Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., Włodarczyk, A., Markowski, J., Rutkowski, K. P., Nowak, D. (2016). Strawberries added to the usual diet suppress fasting plasma paraoxonase activity and have a weak transient decreasing effect on cholesterol levels in healthy non obese subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 35 (5): 422–35.



# Ocena zdolności kombinacyjnej wybranych form rodzicielskich borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) dla siły wzrostu siewek

Assessment of the combining ability of selected highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) parental forms for seedling's growth

Stanisław Pluta<sup>✉</sup>, Łukasz Seliga<sup>id</sup>

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,  
✉ e-mail: Stanislaw.Pluta@inhort.pl

Celem badań było określenie wartości hodowlanej 12 genotypów rodzicielskich borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) na podstawie oceny ich ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej (GCA i SCA) dla siły wzrostu siewek. Materiał badawczy stanowiła populacja 2100 siewek  $F_1$  uzyskanych z programu krzyżowania w 2014 roku. Krzyżowania 7 form matecznych (♀) – 'Aurora', 'Bluecrop', 'Brigitta Blue', 'Chandler', 'Draper', 'Duke', 'Northland' oraz 5 form ojcowskich (♂) – 'Earliblue', 'KazPliszka', 'Polaris', 'Toro', 'Weymouth' były wykonane w układzie czynnikowym (7x5). Jesienią 2014 r. założono doświadczenie polowe w układzie kompletnych bloków losowych, w 4 powtórzeniach, z 15 siewkami na poletku. W 2019 r. wykonano ocenę fenotypową populacji siewek pod kątem siły wzrostu roślin. Stwierdzono, że siewki różniły się istotnie tą cechą morfologiczną roślin. Na podstawie wyników oceny fenotypowej populacji siewek określono efekty GCA dla 12 rodzicielskich odmian i efekty SCA dla 35 rodzin mieszańcowych dla tej cechy. Analiza statystyczna wykazała, że formy rodzicielskie różniły się istotnie pod względem zdolności kombinacyjnej (efekty GCA i SCA) dla siły wzrostu. Formy rodzicielskie posiadające istotne i dodatnie wartości efektów GCA były potencjalnie przydatnymi dawcami genów determinujących silny wzrost, natomiast istotne i negatywne wartości efektów innych form rodzicielskich wskazywały na pogorszenie tej cechy u ocenianego potomstwa. Statystycznie istotne dodatnie lub ujemne wartości efektów SCA były wynikiem interakcji genetycznej obu form rodzicielskich w tych rodzinach mieszańcowych, a zatem mogły wpłynąć na poprawę lub pogorszenie siły wzrostu siewek borówki wysokiej.

**Słowa kluczowe:** borówka wysoka, GCA, hodowla, ocena fenotypowa, SCA, siła wzrostu.

The aim of the study was to determine the breeding value of 12 highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) parental genotypes based on the estimation of their general and specific combining ability (GCA and SCA) for seedling growth. The research material was a population of 2,100  $F_1$  plants obtained from the 2014 crossing program. Crosses of 7 maternal forms (♀) - 'Aurora', 'Bluecrop', 'Brigitta Blue', 'Chandler', 'Draper', 'Duke', 'Northland' - and 5 paternal forms (♂) - 'Earliblue', 'KazPliszka', 'Polaris', 'Toro', 'Weymouth' - were made in a factorial design (7x5). In autumn 2014, the field experiment was established in complete randomized block design, in 4 replications, with 15 seedlings per plot. In 2019, a phenotypic evaluation of the seedling population was done for plant growth. We found that the seedlings differed significantly in this plant morphological trait. Based on the results of the phenotypic evaluation of the seedling population, the GCA effects for 12 parental cultivars and SCA effects for 35 hybrid families for this trait were determined. Statistical analysis showed that the parental forms differed significantly in their combining ability (GCA and SCA effects) for plant growth. The parental forms possessing significant and positive values of GCA effects were potentially useful donors of genes determining strong growth, while, conversely, significant and negative effects in other parental forms influenced the deterioration of this trait in the assessed offspring. Statistically significant positive or negative values of SCA effects were the results of genetic interaction of both parental forms within these hybrid families, and could, therefore, inform the breeder of the improvement or deterioration of plant growth in blueberry seedlings.

**Key words:** highbush blueberry, breeding, GCA, phenotypic evaluation, plant growth, SCA

## Wstęp

W tradycyjnej hodowli roślin uprawnych, w tym borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.), ważny jest wybór odpowiednich form rodzicielskich do programów krzyżowań. Poznanie wartości hodowlanej form rodzicielskich i genetyczne określenie cech ilościowych w populacji, poziom i sposób ich dziedziczenia zwiększają

prawdopodobieństwo szybkiego osiągnięcia celów hodowlanych. Wartość hodowlana genotypu rodzicielskiego jest określana na podstawie efektów ogólnej (GCA) i specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA), korelacji genetycznej między cechami, wariacji genetycznej cech i ich odziedziczalności (Sprague i Tatum, 1942; Sherrif i in., 1985; Żurawicz i in., 2006; Pluta i in., 2014).

Ogólna zdolność kombinacyjna (GCA) formy rodzicielskiej dla rozważanej cechy ilościowej określa jej możliwość do przekazywania średniego poziomu tej cechy potomstwu (Baker, 1978; Vieira i in., 2009). Efekt GCA jest miarą addytywnego działania genów formy rodzicielskiej na tę cechę (Griffing 1956 a, b). Genotypy rodzicielskie użyte w programach krzyżowań charakteryzujące się istotnie dodatnimi efektami GCA dla danej cechy znacznie zwiększają prawdopodobieństwo uzyskania siewek (mieszaińców) o pożądanych wartościach tej cechy (Bestfleisch i in., 2014; Masny i in., 2014; Pluta i in., 2014).

Specyficzna zdolność kombinacyjna (SCA) pary form rodzicielskich dla danej cechy jest efektem interakcji genetycznej obu rodziców, objawiającej się w ich potomstwie (Griffing, 1956 a, b; Baker, 1978). Efekt SCA jest wynikiem nieaddytywnego działania genów (dominacja i epistaza). Pokazuje różnicę między średnią wartością cechy u potomstwa (pełne rodzeństwo dwóch form rodzicielskich) a sumą efektów GCA dla tych form rodzicielskich (Bestfleisch i in., 2014).

Efekty GCA i SCA form rodzicielskich testowane w układach krzyżowań są miernikami ich wartości hodowlanej dla rozważanych cech użytkowych. Oznacza to przydatność genotypów rodzicielskich do programów hodowlanych ukierunkowanych na poprawę tych cech u nowych odmian (Baker, 1978; Masny i in., 2005; 2016; Bestfleisch i in., 2014; Pluta i Żurawicz 2014). Sukces wyboru wartościowych form rodzicielskich w programie hodowlanym może być dodatkowo zwiększony, jeśli rozważa się efekty SCA poszczególnych kombinacji rodzicielskich. Ponadto, zróżnicowanie efektów SCA w danym programie krzyżowania wskazuje na duże znaczenie interakcji genetycznej obu form rodzicielskich w dziedziczeniu cech u potomstwa (Baker, 1978). Zarówno efekty GCA, jak i SCA mają wartości istotne dodatnie i ujemne. Oznacza to, że testowane formy rodzicielskie w programach hodowlanych mogą mieć pozytywny lub negatywny wpływ na występowanie cech ocenianych siewek.

Celem badań było określenie ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej (GCA i SCA) 12 form rodzicielskich borówki amerykańskiej i 35 rodzin mieszańcowych na podstawie oceny fenotypowej siły wzrostu siewek rosnących w doświadczeniu polowym.

### **Materiały i Metody**

*Materiał badawczy.* Materiał roślinny stanowiła populacja 2100 siewek (mieszaińców) pokolenia F<sub>1</sub>

borówki wysokiej należących do 35 rodzin mieszańcowych, uzyskana z programu krzyżowań 12 odmian rodzicielskich, w układzie czynnikowym (7x5). Genotypami rodzicielskimi było 7 form matecznych (♀) – ‘Aurora’, ‘Bluecrop’, ‘Brigitta Blue’, ‘Chandler’, ‘Draper’, ‘Duke’ i ‘Northland’ oraz 5 form ojcowskich (♂) – ‘Earliblue’, ‘KazPliszka’, ‘Polaris’, ‘Toro’ i ‘Weymouth’, które użyto w programie krzyżowań, wykonanym wiosną w 2014 roku. Odmiany rodzicielskie pochodzą z różnych rejonów geograficznych (USA, Nowa Zelandia i Polska) oraz charakteryzują się wieloma wartościowymi cechami użytkowymi i dużą zmiennością fenotypową i genetyczną (siłą wzrostu i pokrój krzewu, termin kwitnienia i dojrzewania owoców, plonowanie, masa i atrakcyjność owoców oraz, odporność na główne choroby i szkodniki). Siewki należące do 35 rodzin mieszańcowych wysadzono jesienią 2014 roku w doświadczeniu polowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach. Doświadczenie założono w układzie bloków kompletnych, w 4 powtórzeniach z 15 siewkami na poletku. Siewki rosną w rzędach wyłożonych agrowłókniną. Uprawa, pielęgnacja siewek, nawożenie gleby i dokarmianie roślin prowadzone były zgodnie z zaleceniami dla plantacji towarowych borówki wysokiej. Wiosną w rzędy krzewów, stosowano siarczan amonu (21% N) w dawce przeliczeniowej 100 kg/ha, podzielonej (50%:50%), w odstępie 3-4 tygodni. Po kwitnieniu krzewów (II poł. maja) rozsiewano wieloskładnikowy nawóz Yara Mila Complex (12-11-18+Mg+S+Mikro) w dawce 150 kg/ha. Jesienią (koniec września) stosowano siarczan potasu (42% K<sub>2</sub>O), w dawce 120 kg/ha. W sezonie wegetacyjnym siewki były nawadniane przy użyciu systemu kropłowego, 2 razy dziennie, rano i pod wieczór. Wczesną wiosną w rzędy roślin na agrowłókninę zastosowano trociny, które co roku są uzupełniane. Regulowanie zachwaszczenia prowadzono poprzez pielenie ręczne lub mechanicznie, w miarę potrzeby stosowano herbicydy (Fusilade Forte 150 EC i Basta 150 SL). Na podstawie monitoringu siewek w ograniczonym zakresie stosowano integrowaną ochronę roślin przed chorobami grzybowymi i szkodnikami, (szkodniki: Calypso 480 SC, Spin Tor 240 SC, choroby grzybowe: Switch 62,5 WG, Topsin M 500 SC), zgodnie z zaleceniami Poradnika Integrowanej Ochrony Roślin Jagodowych na rok 2019. Ochrona przed ptakami (szpaki, kwiczoły, kosy i gołębie), które stanowią poważny problem w uprawie borówki, polegała na rozciągnięciu siatki polietylenowej na drutach przymocowanych w górnej części do impregnowanych drewnianych słupków o wys. 3,5 m.



*Warunki pogodowe* określono na podstawie danych meteorologicznych ze stacji METOS-COMPACT (firmy Pessl Instruments) Przebieg warunków pogodowych w każdym miesiącu sezonu wegetacyjnego w roku 2019 przedstawiono w tabeli 1.

Najniższą temperaturę powietrza na wysokości 2 m od poziomu gleby odnotowano 16 kwietnia (-4,92°C). Maksymalną temperaturę stwierdzono w czerwcu (36,6°C), chociaż wysokie temperatury panowały także w miesiącach letnich (lipiec-wrzesień). Opady atmosferyczne występowały cyklicznie w ciągu całego okresu wegetacyjnego w roku 2019. Największe opady deszczu odnotowano w maju, sierpniu i wrześniu. W pozostałych miesiącach tego roku notowano słabsze opady atmosferyczne, które nie miały wpływu na słabszy wzrost krzewów borówki wysokiej w prowadzonym doświadczeniu, gdyż stosowano nawodnienie kropłowe roślin.

*Ocena fenotypowa.* W sezonie wegetacyjnym 2019 roku wykonano ocenę fenotypową siewek pod względem siły wzrostu siewek. Pomiar wysokości i szerokości (cm) wykonano w dwóch terminach: wiosną, na początku wegetacji roślin oraz jesienią, po zakończeniu wzrostu i wegetacji. Pomiar wysokości (cm) – siewki mierzono indywidualnie od powierzchni ziemi do wierzchołka rośliny; pomiar szerokości (cm) – siewki mierzono w kierunku poprzecznym do rzędów roślin.

*Zdolność kombinacyjna.* Na podstawie wyników oceny fenotypowej siły wzrostu siewek borówki wysokiej oszacowano ogólną zdolność kombinacyjną (efekty GCA) dla 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej i specyficzną zdolność kombinacyjną (efekty SCA) dla 35 rodzin mieszańcowych.

*Analiza statystyczna.* Uzyskane wyniki (dane) poddano analizie statystycznej w dwóch etapach. Na podstawie obserwacji oraz pomiarów siły wzrostu roślin obliczono średnie arytmetyczne dla każdego poletka doświadczalnego. Średnie te użyto do ich wstępnego opracowania statystycznego metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wg modelu losowanych bloków, w którym czynnikiem są rodziny mieszańców. Po stwierdzeniu istotnego zróżnicowania średnich tej cechy u badanych mieszańców wykonano analizę wariancji dla kompletnego układu czynnikowego ( $\text{♀}7 \times \text{♂}5$ ), w celu oszacowania efektów ogólnej (GCA) i specyficznej (SCA) zdolności kombinacyjnej dla badanej cechy morfologicznej roślin. Wszystkie obliczenia, dotyczące estymacji efektów GCA i SCA w powyższym modelu, analizę wariancji i szczegółowego testowania jednoczesnego wykonano za pomocą programu komputerowego SERGEN, opracowanego przez naukowców z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (Caliński i in., 2003).

## Wyniki

### Ocena fenotypowa

Wyniki oceny siły wzrostu badanych siewek borówki wysokiej (określonej na podstawie pomiaru wysokości i szerokości roślin) przedstawiono w tabeli 2.

Oceniane siewki borówki wysokiej w doświadczeniu polowym wykazywały umiarkowaną siłę wzrostu. Szczegółowa analiza wyników uzyskanych w I terminie (wiosna) i w II terminie (jesień) wskazuje na zwykły trend w sile wzrostu siewek. W sezonie wegetacyjnym 2019 roku siewki wykazywały silniejszy wzrost (wysokość i szerokość roślin) w obrębie poszczególnych rodzin

Tabela 1.

Table 1.

**Minimalne i maksymalne temperatury oraz suma opadów w okresie wegetacji w roku 2019, środkowa Polska**  
**Minimum and maximum temperatures and total precipitation during the growing season in 2019, central Poland**

Miesiące/Months	Temperatura powietrza (°C)/Air temperature (°C)			Suma opadów (mm) Sum of precipitation (mm)
	Minimalna/ Min	Maksymalna/ Max.	Średnia/ Average	
Marzec/March	-3,49	17,35	5,73	34,60
Kwiecień/April	-4,92	27,59	9,51	17,00
Maj/May	-1,99	26,05	12,56	61,00
Czerwiec/June	7,68	36,60	24,63	46,20
Lipiec/July	6,49	33,48	18,24	55,40
Sierpień/August	6,25	33,48	19,74	77,80
Wrzesień/September	2,59	31,44	13,79	82,80
Październik/October	-3,25	23,78	10,23	21,60



mieszkańców, jak i pomiędzy nimi, stwierdzony w II ocenie jesienią, po zakończeniu wegetacji roślin (tab. 2).

Średnie wyniki pomiarów wysokości i szerokości siewek obu terminów wskazują, że najsilniejszym wzrostem charakteryzowały się siewki borówki wysokiej należące do następujących rodzin mieszanych: 'Aurora' x 'Polaris', 'Bluecrop' x 'Polaris', 'Bluecrop' x 'KazPliszka', 'Bluecrop' x 'Toro', 'Bluecrop' x 'Weymouth', 'Chandler' x 'Polaris', 'Duke' x 'Earliblue', 'Duke' x 'Toro', 'Duke' x 'Weymouth', 'Northland' x 'Toro' i 'Northland' x 'Weymouth'. Najniższy wzrost siewek stwierdzono dla 9 rodzin mieszanych pochodzących ze skrzyżowania: 'Aurora' x 'Weymouth', 'Aurora' x 'KazPliszka', 'Brigitta B.' x 'KazPliszka', 'Brigitta B.' x 'Polaris', 'Brigitta B.' x 'Toro', 'Chandler' x 'Earliblue', 'Chandler' x 'KazPliszka', 'Chandler' x 'Weymouth', 'Draper' x 'Toro', 'Northland' x 'KazPliszka' i 'Northland' x 'Polaris'. Rośliny należące do pozostałych rodzin mieszanych cechowały się średnią siłą wzrostu (tab. 2).

#### **Zdolność kombinacyjna (GCA i SCA)**

Wyniki analizy statystycznej dotyczące ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej (GCA i SCA) dla siły wzrostu siewek borówki wysokiej zamieszczono w tabelach 3–4. Efekty GCA i SCA przyjmują dodatnie i ujemne wartości i mogą wpływać pozytywnie lub negatywnie na przekazywanie cech użytkowych u analizowanego potomstwa.

#### **Efekty GCA**

Wartości efektów GCA (dodatnie i ujemne) dla 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej pod względem siły wzrostu określonej na podstawie pomiaru wysokości i szerokości wszystkich siewek wykonanych w 2019 roku przedstawiono w tabeli 3.

Analiza wyników w tabeli 3 pokazuje, że dla wysokości siewek borówki istotne statystycznie i dodatnie wartości efektów GCA uzyskano dla 2 form (odmian) matecznych: 'Bluecrop' i 'Duke'. Oznacza to, że obie odmiany użyte jako formy rodzicielskie w programie krzyżowań przekazują potomstwu zdolność do wytwarzania wyższych krzewów, w porównaniu do pozostałych badanych odmian. Istotnie ujemne wartości efektów GCA dla tej cechy roślin stwierdzono dla jednej odmiany matecznej, tj. 'Brigitta Blue' oraz dla jednej odmiany ojcowskiej 'KazPliszka'. Odmiany te w krzyżowaniach są więc donorami genów warunkujących słaby wzrost u potomstwa siewek borówki wysokiej. W przypadku szerokości krzewów istotne

statystycznie i dodatnie wartości efektów GCA uzyskano dla 2 odmian matecznych: 'Bluecrop' i 'Duke'. Natomiast istotnie ujemne wartości efektów GCA dla tej cechy morfologicznej oszacowano dla 2 innych odmian matecznych: 'Brigitta Blue' i 'Chandler' oraz dla jednej odmiany ojcowskiej 'KazPliszka'. W praktyce te ostatnie trzy formy rodzicielskie użyte w programach krzyżowań z dużym prawdopodobieństwem przekazują potomstwu zdolność do tworzenia krzewów węższych i bardziej wzniesionych (istotne i ujemne efekty GCA), zaś dwie wymienione wcześniej – szerszych i bardziej rozłożystych (istotne i dodatnie efekty GCA).

#### **Efekty SCA**

Efekty specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA) oszacowane dla siły wzrostu siewek, należących do 35 rodzin mieszanych, przedstawiono w tabeli 4. Wartości efektów SCA (dodatnie lub ujemne) oceniane dla konkretnej pary form rodzicielskich mogą wpływać pozytywnie lub negatywnie na uwarunkowanie danej cechy u populacji siewek.

Analiza wyników wskazuje, że oszacowane efekty SCA dla wysokości i szerokości siewek borówki wysokiej były istotnie zróżnicowane dla kilku rodzin mieszanych. Dla wysokości roślin istotne statystycznie i dodatnie wartości efektów SCA w roku 2019 uzyskano tylko dla 2 rodzin mieszanych: 'Aurora' x 'Polaris' i 'Chandler' x 'Polaris'. Należy zatem oczekiwać, że potomstwo uzyskane w wyniku genetycznej interakcji obu form rodzicielskich będzie odznaczać się silnym wzrostem. Istotnie negatywne wartości SCA dla tej cechy roślin obliczono dla innych 4 kombinacji krzyżowań: 'Aurora' x 'Weymouth', 'Draper' x 'Toro', 'Duke' x 'Polaris' i 'Northland' x 'Polaris'. Oznacza to, że w przypadku tych rodzin mieszanych genetyczne współdziałanie obu odmian (form) rodzicielskich warunkuje i słaby wzrost uzyskanego potomstwa (tab. 4).

W przypadku drugiej cechy morfologicznej (szerokości roślin) istotne i dodatnie wartości efektów SCA uzyskano dla 4 rodzin mieszanych: 'Aurora' x 'Polaris', 'Chandler' x 'Polaris', 'Draper' x 'KazPliszka' i 'Northland' x 'Weymouth'. Zatem siewki borówki wysokiej należące do tych rodzin mieszanych będą wytwarzać krzewy szersze i bardziej rozłożyste. Istotne ujemne wartości efektów SCA dla tej cechy roślin uzyskano dla innych 3 rodzin mieszanych: 'Aurora' x 'Weymouth', 'Draper' x 'Toro' i 'Northland' x 'Polaris'. Ujemna wartość oszacowanego efektu SCA wskazuje

na duże prawdopodobieństwo, że siewki należące do tych rodzin mieszańcowych będą cechować się węższymi i bardziej wzniesionymi krzewami (tab. 4).

Tabela 2  
Table 2

Siła wzrostu siewek borówki wysokiej rosnących w doświadczeniu polowym

Growth strength of highbush blueberry seedlings grown in the field

Lp.	Nr kombinacji Combination no	Rodowód Pedigree ♀ x ♂	Siła wzrostu siewek Growth strength of seedlings			
			Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)		Szerokość roślin (cm) Plant width (cm)	
			<i>I termin</i> <sup>a</sup> <i>1<sup>st</sup> term</i> <sup>a</sup>	<i>II termin</i> <sup>b</sup> <i>2<sup>nd</sup> term</i> <sup>b</sup>	<i>I termin</i> <sup>a</sup> <i>1<sup>st</sup> term</i> <sup>a</sup>	<i>II termin</i> <sup>b</sup> <i>2<sup>nd</sup> term</i> <sup>b</sup>
1	1\1	Aurora x Earliblue	40,3	52,6	38,0	57,4
2	1\2	Aurora x KazPliszka	35,1	42,9	38,2	45,7
3	1\3	Aurora x Polaris	50,9	66,5	51,6	65,3
4	1\4	Aurora x Toro	48,7	59,0	51,4	54,2
5	1\5	Aurora x Weymouth	26,4	32,8	29,6	33,7
<i>średnia average</i>			<i>40,3</i>	<i>50,8</i>	<i>41,7</i>	<i>51,2</i>
6	2\1	Bluecrop x Earliblue	42,1	60,5	39,9	56,0
7	2\2	Bluecrop x KazPliszka	46,8	67,1	47,5	66,2
8	2\3	Bluecrop x Polaris	48,4	66,9	48,4	62,7
9	2\4	Bluecrop x Toro	47,0	69,2	45,4	64,1
10	2\5	Bluecrop x Weymouth	52,3	68,3	58,4	71,3
<i>średnia average</i>			<i>47,3</i>	<i>66,4</i>	<i>47,9</i>	<i>64,1</i>
11	3\1	Brigitta B. x Earliblue	42,5	46,8	42,8	58,1
12	3\2	Brigitta B. x KazPliszka	41,2	41,7	37,5	42,4
13	3\3	Brigitta B. x Polaris	32,0	44,1	34,3	45,3
14	3\4	Brigitta B. x Toro	33,9	41,1	36,3	41,3
15	3\5	Brigitta B. x Weymouth	36,1	50,7	37,7	48,7
<i>średnia average</i>			<i>37,1</i>	<i>44,9</i>	<i>37,7</i>	<i>47,2</i>
16	4\1	Chandler x Earliblue	32,7	42,6	32,6	41,6
17	4\2	Chandler x KazPliszka	27,1	34,3	33,7	36,4
18	4\3	Chandler x Polaris	52,8	72,0	48,2	65,8
19	4\4	Chandler x Toro	40,6	54,1	40,6	58,1
20	4\5	Chandler x Weymouth	30,1	40,6	29,6	38,1
<i>średnia average</i>			<i>36,7</i>	<i>48,7</i>	<i>36,9</i>	<i>48,0</i>
21	5\1	Draper x Earliblue	37,7	53,4	38,0	50,5
22	5\2	Draper x KazPliszka	46,3	61,9	54,2	66,9
23	5\3	Draper x Toro	45,6	60,2	49,1	60,7
24	5\4	Draper x Polaris	32,3	43,6	38,4	43,3
25	5\5	Draper x Weymouth	40,7	56,8	41,1	55,4
<i>średnia average</i>			<i>40,5</i>	<i>55,2</i>	<i>44,2</i>	<i>55,4</i>
26	6\1	Duke x Earliblue	49,9	63,2	48,5	61,0
27	6\2	Duke x Polaris	40,6	55,2	40,8	51,4
28	6\3	Duke x KazPliszka	36,3	48,6	39,9	50,2
29	6\4	Duke x Toro	46,3	65,3	51,0	69,5
30	6\5	Duke x Weymouth	51,2	68,5	54,1	64,9
<i>średnia average</i>			<i>44,9</i>	<i>60,2</i>	<i>46,9</i>	<i>59,4</i>
31	7\1	Northland x Earliblue	42,5	49,6	47,8	51,6
32	7\2	Northland x KazPliszka	28,6	41,1	34,1	42,7
33	7\3	Northland x Polaris	32,9	40,5	35,5	43,9
34	7\4	Northland x Toro	44,2	66,2	50,7	66,6
35	7\5	Northland x Weymouth	50,1	65,3	56,8	68,2
<i>średnia average</i>			<i>39,7</i>	<i>52,6</i>	<i>45,0</i>	<i>54,6</i>

<sup>a</sup> – I termin – ocena wykonana 15–16.05.2019 r., <sup>b</sup> – II termin – ocena wykonana 22–24.10.2019 r.

<sup>a</sup> – 1<sup>st</sup> term – evaluation done on 15–16.05.2019, <sup>b</sup> – 2<sup>nd</sup> term – evaluation done on 22–24.10.2019.

Tabela 3

Table 3

Wartości efektów GCA 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej dla siły wzrostu siewek w doświadczeniu

Values of GCA effects of 12 highbush blueberry parental cultivars for seedling's growth in the experiment

Nr matki lub ojca No of mother or father	Formy rodzicielskie Parental forms	Wysokość roślin (cm) <sup>a</sup> Plant height (cm)		Szerokość roślin (cm) <sup>a</sup> Plant width (cm)	
		Ocena efektu głównego Main effect evaluation	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect	Ocena efektu głównego Main effect evalu- ation	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect
<i>Analiza względem form matczyńskich Analysis in relation to maternal forms (♀)</i>					
1	Aurora	-3,34	2,70	-3,02	2,88
2	Bluecrop	12,31**	36,67	9,80**	30,44
3	Brigitta Blue	-9,22**	20,57	-7,11**	16,01
4	Chandler	-5,37	6,98	-6,25**	12,39
5	Draper	1,09	0,29	1,10	0,38
6	Duke	6,08*	8,94	5,14*	8,36
7	Northland	-1,55	0,58	0,34	0,04
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,10	2,76	0,10	2,76
Critical values for individual testing at the level		0,05	3,93	0,05	3,93
		0,01	6,89	0,01	6,89
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,10	6,21	0,10	6,21
Critical values for simultaneous testing at the level		0,05	7,54	0,05	7,54
		0,01	10,75	0,01	10,75
<i>Analiza względem form ojcowskich Analysis in relation to paternal forms (♂)</i>					
8	Earliblue	-1,44	0,75	-0,53	0,13
9	KazPliszka	-4,91*	8,76	-4,01*	7,64
10	Polaris	2,90	3,05	2,00	1,91
11	Toro	2,82	2,88	2,47	2,90
12	Weymouth	0,63	0,15	0,06	0,00
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,10	2,76	0,10	2,76
Critical values for individual testing at the level		0,05	3,93	0,05	3,93
		0,01	6,89	0,01	6,89
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,10	5,59	0,10	5,59
Critical values for simultaneous testing at the level		0,05	6,89	0,05	6,89
		0,01	10,06	0,01	10,06

\* – wartości efektów GCA istotnie różne od zera przy poziomie  $\alpha=0,05$ \* – values of GCA effects significantly different from zero at the level of  $\alpha = 0.05$ \*\* – wartości efektów GCA istotnie różne od zera przy poziomie  $\alpha=0,01$ \*\* – values of GCA effects significantly different from zero at the level of  $\alpha = 0.01$ <sup>a</sup> – na podstawie średnich wyników pomiaru siewek wykonanego w II terminie, jesienią 2019 roku<sup>a</sup> – based on average results of seedling measurement done in the second term, in autumn 2019



Tabela 4

Table 4

Wartości efektów SCA dla siły wzrostu siewek borówki wysokiej należących do 35 rodzin mieszańcowych

Values of SCA effects for the growth of highbush blueberry seedlings belonging to 35 hybrid families

Nr rodziny mieszańcowej No of hybrid family	Krzyżowane formy rodzicielskie Crossed parental forms	Wysokość roślin (cm) <sup>a</sup> Plant height (cm)		Szerokość roślin (cm) <sup>a</sup> Plant width (cm)	
		Ocena efektu głównego Main effect value	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect	Ocena efektu głównego Main effect value	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect
1	Aurora x Earliblue	3,26	0,64	6,68	3,53
2	Aurora x KazPliszka	-2,92	0,52	-1,54	0,19
3	Aurora x Polaris	12,87*	10,03	12,05*	11,51
4	Aurora x Toro	5,40	1,77	0,45	0,02
5	Aurora x Weymouth	-18,61**	20,97	-17,64**	24,66
6	Bluecrop x Earliblue	-4,49	1,22	-7,53	4,50
7	Bluecrop x KazPliszka	5,64	1,92	6,15	3,00
8	Bluecrop x Polaris	-2,40	0,35	-3,34	0,88
9	Bluecrop x Toro	-0,04	0,00	-2,43	0,47
10	Bluecrop x Weymouth	1,29	0,10	7,16	4,06
11	Brigitta B. x Earliblue	3,34	0,67	11,42	10,34
12	Brigitta B. x KazPliszka	1,74	0,18	-0,73	0,04
13	Brigitta B. x Polaris	-3,65	0,80	-3,89	1,20
14	Brigitta B. x Toro	-6,62	2,65	-8,28	5,44
15	Brigitta B. x Weymouth	5,19	1,63	1,48	0,17
16	Chandler x Earliblue	-4,71	1,35	-5,86	2,73
17	Chandler x KazPliszka	-9,49	5,45	-7,56	4,53
18	Chandler x Polaris	20,40**	25,2	15,76**	19,69
19	Chandler x Toro	2,56	0,40	7,61	4,60
20	Chandler x Weymouth	-8,76	4,64	-9,95	7,85
21	Draper x Earliblue	-0,37	0,01	-4,34	1,49
22	Draper x KazPliszka	11,63	8,19	15,54**	19,16
23	Draper x Polaris	2,12	0,27	3,31	0,87
24	Draper x Toro	-14,40*	12,55	-14,51**	16,7
25	Draper x Weymouth	1,01	0,06	0,00	0,00
26	Duke x Earliblue	4,49	1,22	2,13	0,36
27	Duke x KazPliszka	-0,06	0,00	-3,99	1,26
28	Duke x Polaris	-14,44*	12,62	-11,18	9,91
29	Duke x Toro	2,29	0,32	7,60	4,59
30	Duke x Weymouth	7,72	3,61	5,44	2,35
31	Northland x Earliblue	-1,51	0,14	-2,48	0,49
32	Northland x KazPliszka	-6,53	2,58	-7,87	4,91
33	Northland x Polaris	-14,92*	13,47	-12,71*	12,81
34	Northland x Toro	10,81	7,08	9,55	7,23
35	Northland x Weymouth	12,15	8,93	13,51**	14,48

\* – wartości efektów SCA istotnie różne od zera przy poziomie  $\alpha=0,05$ \* – values of SCA effects significantly different from zero at the level of  $\alpha = 0.05$ \*\* – wartości efektów SCA istotnie różne od zera przy poziomie  $\alpha=0,01$ \*\* – values of SCA effects significantly different from zero at the level of  $\alpha = 0.01$ <sup>a</sup> – na podstawie średnich wyników pomiaru siewek wykonanego w II terminie, jesienią 2019 roku<sup>a</sup> – based on average results of seedling measurement done in the second term, in autumn 2019

Tabela 4 cd.

Table 4 cd.

## Wartości efektów SCA dla siły wzrostu siewek borówki wysokiej należących do 35 rodzin mieszańcowych

## Values of SCA effects for the growth of highbush blueberry seedlings belonging to 35 hybrid families

Nr rodziny mieszańcowej No of hybrid family	Krzyżowane formy rodzicielskie Crossed parental forms	Wysokość roślin (cm) <sup>a</sup> Plant height (cm)		Szerokość roślin (cm) <sup>a</sup> Plant width (cm)	
		Ocena efektu głównego Main effect value	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect	Ocena efektu głównego Main effect value	Statystyka F dla efektu głównego F statistics for the main effect
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,10	2,76	0,10	2,76
Critical values for individual testing at the level		0,05	3,93	0,05	3,93
		0,01	6,89	0,01	6,89
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,10	9,34	0,10	9,34
Critical values for simultaneous testing at the level		0,05	10,75	0,05	10,75
		0,01	14,12	0,01	14,12

\* – wartości efektów SCA istotnie różne od zera przy poziomie  $\alpha=0,05$

\* – values of SCA effects significantly different from zero at the level of  $\alpha = 0.05$

\*\* – wartości efektów SCA istotnie różne od zera przy poziomie  $\alpha=0,01$

\*\* – values of SCA effects significantly different from zero at the level of  $\alpha = 0.01$

<sup>a</sup> – na podstawie średnich wyników pomiaru siewek wykonanego w II terminie, jesienią 2019 roku

<sup>a</sup> – based on average results of seedling measurement done in the second term, in autumn 2019

## Dyskusja

### Ocena fenotypowa siewek

Borówka amerykańska (wysoka, północnego typu) ma specyficzne wymagania w uprawie. Prawidłowy wzrost i rozwój, kwitnienie oraz plonowanie roślin i wielkość (masa) owoców uzależnione są od czynników genetycznych (genotypu) i warunków środowiska oraz ich współdziałania (interakcji). Współdziałanie genotypu i środowiska (GxE) jest zjawiskiem biologicznym, które definiuje się w kategoriach jego mechanizmów lub zazwyczaj jego efektów fenotypowych dla danej cechy. Jest więc ona określana jako niejednakowa reakcja genotypów na warunki środowiskowe (miejscowości w poszczególnych latach, miejscowości średnio w latach, lata w poszczególnych miejscowościach, lata średnio w miejscowościach) albo jako niejednakowe różnice średnich genotypowych w różnych środowiskach (Mądry i in., 2006).

Do drugiej grupy czynników należy zaliczyć: wybór odpowiedniego stanowiska, kwaśną glebę (pH 4,5–5,5) i jej przygotowanie (wzbogacenie w substancję organiczną) oraz wszystkie zabiegi pielęgnacyjne i agrotechniczne, w tym niezbędne nawadnianie kropłowe (Smolarz, 2003; 2006; Smolarz i Pluta, 2014). Bardzo ważny jest także wpływ czynników genetycznych, gdyż odmiany (genotypy) borówki wysokiej różnią się pod względem siły wzrostu i innych cech użytkowych.

W naszych badaniach stwierdzono wpływ genotypów rodzicielskich borówki wysokiej, używanych w programie krzyżowań, na siłę wzrostu

ocenianej populacji siewek (potomstwa). Wykonana ocena fenotypowa siewek pod kątem w/w cechy morfologicznej roślin była często zgodna z opisami i charakterystyką pomologiczną odmian rodzicielskich borówki wysokiej (Smolarz, 2000; Pliszka, 2002). Ocena siły wzrostu wszystkich siewek w doświadczeniu polowym była zróżnicowana i uzależniona od pochodzenia (odmian rodzicielskich). Uzyskane wyniki oceny fenotypowej (obserwacje i pomiary roślin) siewek potwierdziły przydatność niektórych genotypów rodzicielskich do poprawy siły wzrostu u potomstwa ocenianych roślin. Jest to ważna cecha, gdyż na ogół siewki borówki wysokiej charakteryzują się powolnym i słabszym wzrostem, w porównaniu do siewek porzeczeki czarnej i maliny.

### Efekty GCA i SCA

W 2019 roku wykonano badania nad wartością fenotypową i genetyczną populacji siewek borówki wysokiej na podstawie indywidualnej oceny ich siły wzrostu (pomiar wysokości i szerokości roślin). Potencjał genetyczny wybranych 12 odmian (form) rodzicielskich do programu krzyżowań w układzie czynnikowym (7 – matecznych i 5 – ojcowskich) określono za pomocą ogólnej (GCA) i specyficznej (SCA) zdolności kombinacyjnej (Griffing, 1956 a, b; Mądry i Ubysz-Borucka, 1982; Ubysz-Borucka i in. 1985).

Ogólna zdolność kombinacyjna (GCA) pod względem rozpatrywanej cechy określa ogólną przydatność form rodzicielskich do tworzenia

nowych odmian roślin uprawnych. Specyficzna zdolność kombinacyjna (SCA) dla rozpatrywanej cechy odnosi się do pary form rodzicielskich i jest interakcją (współdziałaniem) obu form rodzicielskich, ujawnianą w postaci zachowania tej cechy w potomstwie. Istotnie pozytywne lub negatywne efekty SCA oszacowane są tylko w niektórych kombinacjach krzyżowań i wskazują na poprawę (dodatnie) lub pogorszenie (ujemne) wartości cech u potomstwa. Wysokie i istotne wartości efektów SCA, stwierdzone w poszczególnych populacjach mieszańcowych dotyczą najczęściej pojedynczych cech użytkowych roślin (Spangelo i in., 1971).

W praktyce najwartościowsze potomstwo pod względem pożądanego cechy uzyskuje się w wyniku krzyżowania form rodzicielskich, które odznaczają się istotnymi i dodatnimi (pozytywnymi) wartościami efektów GCA (Griffing, 1956 a, b). W naszych badaniach genetycznych stwierdzono, że wśród 12 genotypów rodzicielskich (7x5) borówki wysokiej większość form matecznych miało istotne (na plus lub minus) wartości efektów GCA dla badanych cech morfologicznych roślin. W przypadku siły wzrostu dla odmian: 'Bluecrop' i 'Duke' oszacowano istotne i dodatnie efekty GCA, a dla 'Brigitta Blue', 'Chandler' i 'KazPliszka' istotne i ujemne efekty GCA. Odmiany te użyte w programach krzyżowań są z dużym prawdopodobieństwem donorami cech wytwarzania wyższych/niższych lub węższych/szerszych krzewów u potomstwa. Oszacowane wartości efektów GCA 12 wybranych form rodzicielskich borówki wysokiej oraz wyniki oceny fenotypowej badanych cech siewek rosnących w doświadczeniu polowym są często skorelowane. Na przykład siewki, które w swoim rodowodzie miały odmiany 'Bluecrop' lub 'Duke', charakteryzowały się silniejszym wzrostem, w porównaniu do ogólnej średniej wartości dla tej cechy morfologicznej roślin.

Wartość efektów SCA i ich zróżnicowanie w obrębie badanego układu krzyżowań świadczy o dużym znaczeniu genetycznego współdziałania obu form rodzicielskich w uwarunkowaniu cech w potomstwie (Baker, 1978). Wysokie i istotne statystycznie wartości efektów SCA, stwierdzone w konkretnych krzyżowaniach (rodzinach mieszańców), dotyczą najczęściej pojedynczych cech użytkowych. Sprawia to, że uzyskanie nowych odmian o poprawionych kilku cechach jednocześnie jest bardzo trudne, jak np. u truskawki (Spangelo i in., 1971; Hortyński, 1987; Simpson i Sharp, 1988; Masny i in., 2008; Żurawicz, 1990), czy porzeczki czarnej (Pluta, 1994; Żurawicz i in., 1996; Mądry

i in., 2004; Pluta i in., 1993; 2008).

W naszych badaniach nad zdolnością kombinacyjną 12 form rodzicielskich borówki wysokiej stwierdzono kilka istotnych wartości efektów SCA (dodatnie lub ujemne) dla siły wzrostu siewek. Dla tej cechy (określonej jako wysokość i szerokość roślin) istotnie dodatnie wartości efektów SCA dla wysokości roślin oszacowano tylko dla 2 rodzin mieszańców, a istotnie ujemne dla innych 4 rodzin. Więcej istotnych efektów SCA oszacowano dla szerokości siewek, dla 4 rodzin mieszańców były to wartości dodatnie, zaś dla 3 rodzin – ujemne. Oznacza to, że genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich w ramach tych rodzin mieszańcowych warunkuje z dużym prawdopodobieństwem wysoki/niski lub szeroki/wąski charakter wzrostu u potomstwa (siewek). Należy podkreślić, że wyniki oceny fenotypowej w/w cech morfologicznych siewek borówki wysokiej rosnących w doświadczeniu były zgodne w większości przypadków z oszacowanymi wartościami efektów SCA rozpatrywanych rodzin mieszańcowych.

W przeglądzie krajowej literatury brak jest informacji i doniesień naukowych dotyczących zdolności kombinacyjnej form (genotypów) rodzicielskich borówki wysokiej. Podobnie literatura zagraniczna przedstawiająca te zagadnienia dla omawianego gatunku uprawnego jest bardzo uboga. Jest to związane głównie z trudnościami wykonania kompletnego programu krzyżowań (układ dialleliczny lub czynnikowy) i uzyskania dużej populacji siewek  $F_1$  do oceny fenotypowej. Barię do prowadzenia tego typu badań jest także duża pracochłonność wykonania indywidualnej obserwacji, pomiarów i oceny wielu cech użytkowych dla kilku tysięcy siewek, co jest powiązane z dużymi nakładami finansowymi.

Na podstawie uzyskanych wyników badań określono wartość hodowlaną oraz przydatność wybranych form rodzicielskich do programów krzyżowań borówki wysokiej, w celu uzyskania wartościowego potomstwa. W wyniku przeprowadzonej oceny fenotypowej i genotypowej populacji siewek pokolenia  $F_1$  wyselekcjonowano ponad 30 wartościowych pojedynków, które posadzone będą w kolekcji klonów.

### Wnioski

1. Ocena fenotypowa siewek borówki wysokiej wskazuje na ich zróżnicowanie pod względem siły wzrostu.
2. Badane odmiany rodzicielskie borówki wysokiej różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem ocenianej cechy



morfologicznej siewek.

3. Oszacowane wartości efektów GCA dla 12 wybranych odmian (form) rodzicielskich borówki wysokiej oraz efektów SCA dla 35 rodzin mieszańcowych przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Zatem odmiany te, użyte w programach krzyżowań, mogą przyczynić się do poprawy lub pogorszenia wartości analizowanej cechy u potomstwa.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 72.*

## Literatura

- Baker, R.J. (1978). Issues in diallel analysis. *Crop Science*, 18 (4): 533–536. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1978.0011183x001800040001x>
- Bestfleisch, M., Möhring, J., Hanke, M.V. (2014). A diallel crossing approach aimed on selection for ripening time and yield in breeding of new strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars. *Plant Breeding* 133: 115–120. <https://doi.org/10.1111/pbr.12120>
- Caliński, T., Czajka, S., Kaczmarek, Z., Krajewski, P. (2003). Podręcznik użytkownika programu SERGEN 4. Metodyka statystyczna i obsługa programu SERGEN (Wersja 4 dla Windows) przeznaczonego do serii doświadczeń odmianowych i genetyczno-hodowlanych. Wyd. IGR PAN w Poznaniu. ss 77.
- Griffing, B. (1956)a. A generalised treatments of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10:31–50 <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1956.2>
- Griffing, B. (1956)b. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austr. J. Biol. Sci.* 9: 463–493. <http://dx.doi.org/10.1071/bi9560463>
- Hortyński, J.A., 1987. Dziedziczenie niektórych cech ilościowych truskawki (*Fragaria x ananassa* Duch.). Metody i problemy oszacowań. Praca hab. Wyd. AR Lublin.
- Masny, A., Mądry, W., Żurawicz, E. (2005). Combining ability analysis of fruit field and fruit quality in ever-bearing strawberry cultivars using an incomplete diallel cross design. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13: 5–17.
- Masny, A., Mądry, W., Żurawicz, E. (2008). Combining ability for important horticultural traits in medium and late-maturing strawberry cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16: 133–152.
- Masny, A., Mądry, W., Żurawicz, E. (2014). Combining ability of selected dessert strawberry cultivars with different fruit ripening periods. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 13 (1): 67–78.
- Masny, A., Pruski, K., Żurawicz, E., Mądry, W. (2016). Breeding value of selected dessert strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars for ripening time, fruit yield and quality. *Euphytica* 207: 224–243. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-016-1690-6>
- Mądry, W., Ubysz-Borucka, L. (1982). Biometryczna analiza zdolności kombinacyjnej w niekompletnym układzie diallel cross. Cz. I. Model stały dla cech ilościowych. *Rocz. Nauk Roln. Ser. A* 105: 9–27.
- Mądry, W., Krajewski, P., Pluta, S., Żurawicz, E. (2004). Wielocechowa analiza wartości hodowlanej i różnicowania genetycznego odmian porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) na podstawie efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej. *Acta Scient. Polon. Hortorum. Cultus* 3: 93–109.
- Mądry, W., Talbot, M., Ukalski, K., Drzazga, T., Iwańska, M. (2006). Podstawy teoretyczne znaczenia efektów genotypowych i interakcyjnych w hodowli roślin na przykładzie pszenicy ozimej. *Biuletyn IHAR*, nr 240/241: 13–32.
- Pliszka, K. (2002). Borówka wysoka, czyli amerykańska. Wyd. Działkowiec sp. z o.o. Warszawa.
- Pluta, S., Mądry, W., Żurawicz, E. (1993). Zdolność kombinacyjna w hodowli twórczej porzeczki czarnej. *Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu, Rolnictwo LVIII*, nr 223: 367–373.
- Pluta, S. (1994). Analiza dialleliczna wybranych form rodzicielskich porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) pod względem najważniejszych cech użytkowych. Praca doktorska, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach.
- Pluta, S., Mądry, W., Żurawicz, E. (2008). General combining ability of selected blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) genotypes in breeding for dessert quality fruit *Acta Hort.* 777: 57–62. <http://dx.doi.org/10.17660/actahortic.2008.777.4>
- Pluta, S., Studnicki, M., Mądry, W., Żurawicz, E. (2014). Combining Ability Analysis for Selected Plant Traits in Gooseberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 139: 325–335. <http://dx.doi.org/10.21273/jashs.139.3.325>
- Pluta, S. and Żurawicz, E. (2014). The high-bush (*Vaccinium corymbosum* L.) breeding programme in Poland. *Acta Hort.* 1017:177–180 <http://dx.doi.org/10.17660/actahortic.2014.1017.20>.
- Sherrif, N.M., Appadurai, R., Rangasamy, M. (1985). Combining ability in sunflower. *Indian, J. Agric. Sci.* 55: 315–318.
- Simpson, D.W. and Sharp, D.S. (1988). The inheritance of fruit yield and stolon production in everbearing strawberries. *Euphytica* 38: 65–74. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00024812>.
- Smolarz, K. (2000). Borówka wysoka. *Zeszyty Pomologiczne*. ISK Skierniewice.
- Smolarz, K. (2003). Wybór i przygotowanie pola pod plantację borówki. *Hasło Ogrodnicze* 10: 61–62.
- Smolarz, K. (2006). History of highbush blueberry (*V. corym-*

- bosum* L.) growing in Poland. Acta Hort. 715: 313–316. <http://dx.doi.org/10.17660/actahort.2006.715.46>.
- Smolarz, K. and Pluta, S. (2014). Cultivation of the high-bush blueberry in Poland. Acta Hort. 1017: 199–204 <http://dx.doi.org/10.17660/actahort.2014.1017.24>.
- Spangelo, L.P., Watkins, R., Hsu, C.S., Fejer, S.O. (1971). Combining ability analysis in the cultivated strawberry. Can. J. Plant Sci. 51: 377–383 <http://dx.doi.org/10.4141/cjps71-075>.
- Sprague, G.F. and Tatum, L.A. (1942). General vs. Specific combination ability in single crosses of corn. J. Amer. Soc. Agron. 34: 923–932 <http://dx.doi.org/10.2134/agronj.1942.00021962003400100008x>.
- Ubysz-Borucka, L., Mądry, W., Muszyński, S. (1985). Podstawy statystyczne genetyki cech ilościowych w hodowli roślin. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa: ss 220.
- Vieira, R.A., Scapim, C.A., Moterle, L.M., Tessmann, D.J., Conrado, T.V., Amaral Jnior, A.T. (2009). Diallel analysis of leaf disease resistance in inbred Brazilian popcorn cultivars. Genetics and Molecular Research. Genetics and Molecular Research 8 (4): 1427–36 <http://dx.doi.org/10.4238/vol8-4gmr655>
- Żurawicz, E. (1990). Dziedziczenie najważniejszych cech użytkowych truskawki (*Fragaria x ananassa* Duch.). Praca hab., ISK Skierniewice.
- Żurawicz, E., Mądry, W., Pluta, S. (1996). Variation and heritability of economically important traits in black currant (*Ribes nigrum* L.) evaluated in a diallel cross design. Euphytica 91: 219–224.
- Żurawicz, E., Masny, A., Madry, W. (2006). Usefulness of selected strawberry (*Fragaria-ananassa*) genotypes for breeding late ripening cultivars. Acta Hort. 708:501–505 <http://dx.doi.org/10.17660/actahort.2006.708.88>.

# Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców i nasion w hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza)

Influence of selected parental forms on fruit and seed set in distant hybridization of three fruit tree species of the genus *Prunus* (Japanese plum, apricot, myrobalan plum)

Marek Szymajda<sup>✉</sup>, Anita Kuras<sup>ORCID</sup>, Edward Żurawicz<sup>ORCID</sup>

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,  
✉ e-mail: marek.szymajda@inhort.pl

Celem badań była ocena efektywności hybrydyzacji oddalonej wybranych genotypów drzew owocowych należących do trzech gatunków z rodzaju *Prunus* – śliwa japońska (*P. salicina* Lindl.), morela (*P. armeniaca* L.) i ałycza (*P. cerasifera* Ehrh.). Program hybrydyzacji wykonano w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, wiosną 2019 r. Do badań użyto 8 genotypów rodzicielskich, tj. morela – 4 genotypy ('Early Orange', 'Harcot', 'Sirena', 'Somo'), śliwa japońska – 3 genotypy ('Czarnuszka', 'Trumlar', 'D 17–73') oraz ałycza – 1 genotyp ('Amelia'). Program hybrydyzacji wykonano w układzie: śliwa japońska × morela – 12 kombinacji krzyżowań, śliwa japońska × ałycza – 3 kombinacje krzyżowań. Uzyskane wyniki pokazały, że wpływ genotypu śliwy japońskiej jako formy matecznej jest większy niż moreli jako formy ojcowskiej na zawiązywanie owoców w hybrydyzacji oddalonej tych gatunków. Śliwa japońska 'Czarnuszka' znacznie lepiej zawiązywała owoce niż 'Trumlar' po zapyleniu pyłkiem tych samych form ojcowskich moreli. W dojrzałych owocach znajdowały się zarówno nasiona wykształcone prawidłowo (żywotne), jak i takie, które miały pomarszczoną okrywą nasienną i w różnym stopniu zniekształcone zarodki (nieżywotne). Udział owoców z niewykształconymi nasionami był różny i zależał od krzyżowanych gatunków oraz od genotypu formy matecznej. W kombinacjach krzyżowań śliwa japońska × ałycza uzyskano więcej wykształconych nasion niż w kombinacjach śliwa japońska × morela, w stosunku do całkowitej liczby uzyskanych nasion (pestek). Obumieranie zarodków i nieprawidłowe wykształcenie otrzymanych nasion wskazuje na istnienie postzygotycznych barier krzyżowalności w krzyżowaniu śliwy japońskiej, moreli i ałyczy.

**Słowa kluczowe:** ałycza, krzyżowanie międzygatunkowe, morela, *Prunus*, śliwa japońska

**The aim of the study** was to evaluate the efficiency of distant hybridization of selected fruit tree varieties in three species of the genus *Prunus* – Japanese plum (*P. salicina* Lindl.), apricot (*P. armeniaca* L.) and myrobalan plum (*P. cerasifera* Ehrh.). The hybridization programme was carried out in a high plastic tunnel in the Pomological Orchard of the Research Institute of Horticulture in Skierniewice, in the spring of 2019. Eight parental genotypes, i.e. apricot – 4 genotypes ('Early Orange', 'Harcot', 'Sirena', 'Somo'), Japanese plum – 3 genotypes ('Czarnuszka', 'Trumlar', 'D 17–73') and myrobalan plum – 1 genotype ('Amelia') were used for the study. The hybridization programme was carried out while following the system of Japanese plum × apricot – 12 cross combinations, Japanese plum × myrobalan plum – 3 cross combinations. The obtained results showed that the influence of the Japanese plum genotype as a maternal form was greater than that of apricot as a paternal form on fruit-setting in the distant hybridization of these species. Furthermore, Japanese plum 'Czarnuszka' set fruit much better than 'Trumlar' after pollination with pollen of the same paternal forms of apricot. The ripe fruit also contained both properly developed seeds (viable), as well as those that had a wrinkled seed coat and malformed embryos (non-viable). The proportion of fruits with underdeveloped seeds varied and depended on the crossed species and on the genotype of the maternal form. In the crossing of Japanese plum × myrobalan plum, less underdeveloped seeds were obtained in relation to the total number of seeds (stones) obtained than in the crossing of Japanese plum × apricot. Embryo mortality and abnormal seed formation indicate the existence of post-zygotic barriers to crossability in the crossing of Japanese plum, apricot and myrobalan plum.

**Keywords:** apricot, interspecific crossing, Japanese plum, myrobalan plum, *Prunus*,

## Wstęp

Krzyżowanie roślin należących do odległych genetycznie gatunków (hybrydyzacja oddalona) umożliwia uzyskanie nowych genotypów,

charakteryzujących się innowacyjnymi cechami, jak np. zwiększona odporność/tolerancja na czynniki biotyczne i abiotyczne, mniejsza siła wzrostu roślin lub lepsza jakość owoców. Metoda



ta znajduje zastosowanie zwłaszcza wówczas, gdy w obrębie określonego gatunku roślin brak jest źródeł genów, warunkujących pożądane cechy lub ich ekspresja jest niewystarczająca (Layne i Sherman, 1986).

Hybrydyzację oddaloną stosuje się także w hodowli roślin sadowniczych, w tym w hodowli drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (Layne i Sherman, 1986, Duval i in., 1994; Hakoda i in., 1998). Jednak z krzyżowań oddalonych w obrębie rodzaju *Prunus* zazwyczaj otrzymuje się bardzo mało owoców w stosunku do liczby zapylonych kwiatów (Yoshida i in., 1975; Jun i Chung, 2007). Powodem niskiej efektywności hybrydyzacji oddalanej jest istnienie licznych barier o charakterze morfologicznym, anatomicznym i fizjologiczno-biochemicznym (Zenkteler, 1990). Bariery te uniemożliwiają zapłodnienie i powstanie zarodka (bariery prezygotyczne) lub zaburzają jego rozwój (bariery postzygotyczne) (Perez i More, 1985; Rubio-Cabates, Socias i Company, 1996; Liu i in., 2007).

Literatura dotycząca otrzymywania mieszańców międzygatunkowych drzew owocowych w rodzaju *Prunus* nie jest bogata, ale są doniesienia o mieszańcach śliwy japońskiej (*P. salicina* Lindl.), ałyczy (*P. cerasifera* Ehrh.) lub ich mieszańców z morelą (*P. armeniaca* L.), które nazwano plumcot (Okie, 2005). W wyniku krzyżowania wstecznego (śliwa japońska × morela) × śliwa japońska otrzymano mieszańce, którym nadano nazwę pluot. Przykładem takich mieszańców są odmiany 'Flavor Fall' i 'Flavorich', otrzymane i uprawiane w ciepłym klimacie Kalifornii (Top i in., 2012).

Brak odmian moreli i śliwy japońskiej dobrze przystosowanych do uprawy w warunkach chłodniejszej strefy klimatu umiarkowanego stanowi jeden z najważniejszych problemów w uprawie tych gatunków w krajach środkowej i północnej Europy, w tym w Polsce. Drzewa tych gatunków nie posiadają dostatecznej wytrzymałości na ujemne temperatury w czasie zimy, w wyniku czego często przemarzają ich pąki kwiatowe (Szabó i Nyeki, 1994; Szabó, 2003; Yao, 2011; Szymajda i in., 2013). Hybrydyzacja oddalona może umożliwić transfer genów warunkujących wyższą wytrzymałość na mrozy zimowe np. z gatunków *P. spinosa* (tarnina) lub *P. cerasifera* do gatunków *P. armeniaca* i *P. salicina* (Duval i in., 1994; Layne i Sherman, 1986; Neumüller, 2011). Dobrym przykładem takich możliwości są ukraińskie odmiany 'Kometa' i 'Najdiena', które są mieszańcami śliwy japońskiej i ałyczy. Odmiany te odznaczają się większą tolerancją na mrozy zimowe niż tradycyjne odmiany śliwy japońskiej.

Celem prezentowanych badań jest ocena efektywności hybrydyzacji oddalanej wybranych genotypów drzew owocowych należących do trzech gatunków z rodzaju *Prunus* – śliwa japońska, morela i ałycza.

## Material i Metody

### Lokalizacja badań i materiał roślinny

Badania prowadzono w 2019 r. w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Krzyżowano 8 genotypów rodzicielskich należących do rodzaju *Prunus*, tj. morela – 4 genotypy ('Early Orange', 'Harcot', 'Sirena', 'Somo'), śliwa japońska – 3 genotypy ('Czarnuszka', 'Trumlar', 'D 17-73') oraz ałycza – 1 genotyp ('Amelia').

### Program zapyleń

Zapylenia wykonano na drzewach rosnących w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach (Polska Centralna). Prowadzono je na kwiatach wykastrowanych w fazie białego, mocno nabrzmiałego zamkniętego pąka. Słabo wykształcone pąki kwiatowe usuwano. Bezpośrednio po kastracji na znamiona słupków wykastrowanych kwiatów nanoszono, przy pomocy pędzelka, pyłek o znanej żywotności. Nakładanie pyłku powtarzano w drugim dniu. Program zapyleń wykonano w następującym układzie: śliwa japońska × morela – 12 kombinacji krzyżowań, śliwa japońska × ałycza – 3 kombinacje krzyżowań.

Przed zapyleniami zbadano zdolność kiełkowania ziaren pyłku form ojcowskich moreli i ałyczy. W celu pozyskania pyłku wybierano pylniki z mocno nabrzmiałych pąków kwiatowych (tuż przed ich otwarciem). Pylniki suszono w temperaturze pokojowej na papierowych tackach przez kilkanaście godzin. Wysuszone ziarna pyłku wykładano na sztuczną pożywkę według Sharafi (2011), o składzie: sacharoza (15%),  $H_3BO_3$  (5 mg  $L^{-1}$ ) i Bactoagar (1%). Wzrost łagiewek oceniano po 20 godzinach inkubacji ziaren pyłku w ciemności, w temperaturze 24°C. Za żywotne uznawano te ziarna, dla których długość wyrastającej łagiewki co najmniej dwukrotnie przekraczała średnicę ziarna pyłku (Khan i Perveen, 2008). Żywotność pyłku oceniano na minimum 100 ziarnach pyłku, pobranych losowo z większej próby, w obrębie każdego genotypu.

### Zawijywanie owoców i nasion

Uzyskane owoce liczono w fazie ich dojrzałości zbiorczej, a ich zawijanie wyrażono w procentach w stosunku do zapylonych kwiatów. Wydobyte

z dojrzałych owoców pestki dokładnie oczyszczono z resztek miąższu poprzez kilkakrotne ich mycie pod bieżącą wodą oraz pozbawiono endokarpów za pomocą imadła stołowego w celu wydobycia nasion. Nasiona dzielono na dwie grupy – prawidłowo wykształcone oraz zdeformowane. Do dalszych badań (ocena zdolności kiełkowania nasion) przeznaczono tylko nasiona prawidłowo wykształcone. Wykształcanie nasion wyrażono w procentach w stosunku do całkowitej liczby otrzymanych nasion (pestek).

### **Stratyfikacja nasion**

Prawidłowo wykształcone nasiona odkażono w 0,5% roztworze fungicydu Kaptan zawieszinowy 50 WP (50% kaptan) (Arysta Life Science North America Co., San Francisco, USA) poprzez moczenie przez okres 45–60 minut. Po odkażeniu nasiona wymieszano z wilgotnym podłożem do stratyfikacji (perlit), zapakowano do foliowych torebek i poddano stratyfikacji, którą prowadzono w inkubatorze do stratyfikacji nasion ‘MIR-554’ (‘SANYO’, Moriguchi, Japan) w temperaturze ok. 5°C. Nasiona z poszczególnych kombinacji poddawano stratyfikacji w różnych terminach w zależności od terminu dojrzewania owoców. Pierwsze dwa przeglądy nasion wykonano po 30 i 60 dniach od rozpoczęcia stratyfikacji, a następne co 10 dni. W trakcie tych przeglądów wybierano i liczono kiełkujące nasiona. Za skielkowane uznawano nasiona z widocznym 5–15 mm korzonkiem zarodkowym. Stratyfikację nasion prowadzono do 160 dnia. Zdolność kiełkowania nasion wyrażono w procentach w stosunku do liczby nasion poddanych stratyfikacji.

### **Wyniki i Dyskusja**

#### **Ocena efektywności wykonanej hybrydyzacji**

W wykonanych 15 kombinacjach krzyżowań oddalonych uzyskano 1047 owoców, co stanowi 15,2% liczby zapylnych kwiatów. W krzyżowaniu śliwa japońska × morela i śliwa japońska × ałycza zawiązanie owoców było podobne, uzyskano 15,6% oraz 12,1% owoców (Tabela 1). Ponieważ były to krzyżowania międzygatunkowe, w których występują różne bariery krzyżowalności, wynik ten można uznać za dobry. Pozytywny wpływ na zawiązanie owoców na pewno miał wybór, dokonany na podstawie badań przeprowadzonych w poprzednich latach (Szymajda i in. 2015), krzyżowań w kierunku śliwa japońska × morela oraz śliwa japońska × ałycza zamiast w kierunku odwrotnym oraz genotypów śliwy japońskiej zgodnych

z formami ojcowskimi moreli i ałyczy. Więcej owoców w krzyżowaniu śliwa japońska × morela niż w krzyżowaniu odwrotnym uzyskali również Yoshida i in. (1975) oraz Jun i Chung (2007). Potwierdza to większą przydatność śliwy japońskiej niż moreli jako form matecznych w programach krzyżowań oddalonych tych gatunków.

Przyczyną dobrego zawiązywania owoców w krzyżowaniu śliwa japońska × morela mogła być także większa zdolność do szybszego wzrostu łagiewek pyłkowych moreli niż łagiewek śliwy japońskiej (Perez i Moore, 1985). Ponadto kwiaty śliwy japońskiej i ałyczy posiadają krótszy słupek niż kwiaty moreli w związku z czym łagiewka pyłkowa moreli, aby dotrzeć do zalążni ma do przebycia krótszą drogę niż łagiewka śliwy japońskiej w krzyżowaniu tych gatunków (Jun i Chung, 2007; Perez i Moore, 1985). Czynniki te, w mało sprzyjających warunkach pogodowych w czasie zapylenia, mogły mieć znaczący wpływ na zawiązanie owoców.

Powstawanie owoców zależało od formy matecznej śliwy japońskiej. Genotypy śliwy japońskiej ‘Czarnuszka’ i D 17–73, średnio dla użytych form ojcowskich moreli, dużo lepiej zawiązywały owoce niż śliwa japońska ‘Trumlar’. Wyniki te sugerują, że wpływ genotypu śliwy japońskiej jako formy matecznej jest większy niż moreli jako formy ojcowskiej na zawiązywanie owoców w hybrydyzacji oddalonej tych gatunków. Ocena zdolności kiełkowania pyłku na sztucznej pożywce wykazała, że pyłek każdej formy ojcowskiej posiadał wysoką zdolność kiełkowania. Żywotność pyłku nie miała więc wpływu na różnice w zawiązywaniu owoców u form matecznych śliwy japońskiej.

Zawiązywanie owoców zależało też od krzyżowanych form rodzicielskich. Śliwa japońska ‘Czarnuszka’ bardzo dobrze zawiązywała owoce po zapyleniu pyłkiem moreli ‘Somo, ’ natomiast D 17–73 po zapyleniu pyłkiem moreli ‘Early Orange’. Świadczy to o różnej zgodności genetycznej krzyżowanych form rodzicielskich śliwy japońskiej i moreli oraz o ich specyficznej zdolności kombinacyjnej pod względem tej cechy. Różną zgodność genetyczną form rodzicielskich wykazano też w krzyżowaniu śliwa japońska × ałycza. Genotyp ‘Trumlar’ zawiązywał lepiej owoce niż genotyp ‘Czarnuszka’ i D 17–73 po zapyleniu pyłkiem ałyczy ‘Amelia’. W badaniach Arbeola i in. (2006) zawiązywanie owoców w krzyżowaniu ałyczy i moreli także było uzależnione od krzyżowanych form rodzicielskich i wynosiło od 0,9% do 18,7%.



Tabela 1.

Table 1.

## Efektywność hybrydyzacji oddalonych śliwy japońskiej, ałyczy i moreli (Skierniewice, 2019 r.)

## Effectiveness of distant hybridization of Japanese plum, apricot and myrobalan plum (Skierniewice, 2019 r.)

Krzyżowane formy rodzicielskie Crossed parental forms ♀ × ♂	Zapylone kwiaty (szt.) Pollinated flowers (No.)	Uzyskane owoce Obtained fruit		Wykształcone nasiona Developed seeds		Skiełkowane nasiona Germinated seeds	
		(szt.) (No.)	(%) <sup>z</sup>	(szt.) (No.)	(%) <sup>y</sup>	(szt.) (No.)	(%) <sup>x</sup>
śliwa japońska × morela							
Czarnuszka × Early Orange	720	162	22,5	68	42,0	60	88,2
Czarnuszka × Harkot	730	143	19,6	75	52,4	70	93,3
Czarnuszka × Sirena	200	17	8,5	15	88,2	6	40,0
Czarnuszka × Somo	790	208	26,3	173	83,2	158	91,3
Suma Total	2440	530	21,7	331	62,5	294	88,8
Trumlar × Early Orange	170	18	10,6	9	50,0	9	100,0
Trumlar × Harkot	220	8	3,6	5	62,5	5	100,0
Trumlar × Sirena	110	7	6,4	6	85,7	6	100,0
Trumlar × Somo	85	6	7,1	5	83,3	5	100,0
Suma Total	585	39	6,7	25	64,1	25	100,0
D 17-73 × Early Orange	570	158	27,7	110	69,6	108	98,2
D 17-73 × Harkot	830	82	9,9	63	76,8	60	95,2
D 17-73 × Sirena	750	23	3,1	21	91,3	21	100,0
D 17-73 × Somo	860	109	12,7	104	95,4	104	100,0
Suma Total	3010	372	12,4	298	80,1	293	98,3
Suma Total (śliwa japońska × morela)	6035	941	15,6	654	69,5	612	93,6
śliwa japońska × ałycza							
Czarnuszka × Amelia	150	10	6,7	10	100,0	6	60,0
Trumlar × Amelia	133	35	26,3	34	97,1	34	100,0
D 17-73 × Amelia	590	61	10,3	54	88,5	52	96,3
Suma Total (śliwa japońska × ałycza)	873	106	12,1	98	92,5	92	93,9
Suma (dla wszystkich kombinacji krzyżowań) Total (for all crosses)	6908	1047	15,2	752	71,8	704	93,6

<sup>z</sup> procent z liczby zapylonych kwiatów<sup>z</sup> percentage of the number of pollinated flowers<sup>y</sup> procent z liczby z całkowitej liczby uzyskanych nasion<sup>y</sup> percentage of the total number of seeds obtained<sup>x</sup> procent z liczby z liczby nasion zastratyfikowanych<sup>x</sup> percentage of the total number of seeds subjected to stratification

W dojrzałych owocach znajdowały się zarówno nasiona wykształcone prawidłowo – żywotne, jak i takie, które miały pomarszczoną okrywą nasienną i niewykształcone zarodki – czyli uznane za nieżywotne. Z 15 kombinacji krzyżowań łącznie uzyskano 752 prawidłowo wykształcone nasiona mieszańcowe śliwy japońskiej i moreli lub ałyczy, co stanowi 71,8% całkowitej liczby otrzymanych

nasion oraz tylko 10,9% liczby zapylonych kwiatów. Udział owoców z niewykształconymi nasionami był różny i zależał od krzyżowanych gatunków oraz od genotypu formy matecznej (Tabela 1). W krzyżowaniu śliwa japońska × ałycza uzyskano więcej wykształconych nasion niż w krzyżowaniu śliwa japońska × morela w stosunku do całkowitej liczby uzyskanych nasion (pestek). Natomiast



spośród form matecznych genotyp śliwy japońskiej D 17–73, bez względu na użytą formę ojcowską, lepiej wykształcał nasiona niż genotypy ‘Czarnuszka’ i ‘Trumlar’. Obumieranie zarodków i nieprawidłowe wykształcenie nasion wskazuje na istnienie postzygotycznych barier krzyżowalności, co wcześniej obserwowali w swoich badaniach także inni autorzy (Rubio-Cabates, Socias i Company, 1996; Liu i in., 2007). Pokonanie barier postzygotycznych i uratowanie przynajmniej części zarodków mieszańcowych jest możliwe poprzez zastosowanie techniki *embryo-rescue* (Golis i in., 2002; Kukharчыk i Kastrickaya, 2006; Liu i in., 2007). Umożliwia ona rozwój niedojrzałych zarodków i ich wzrost w warunkach *in vitro*, przez co staje się bardzo użytecznym narzędziem w hybrydyzacji oddalonej roślin z rodzaju *Prunus* (Arbeola i in., 2003).

#### **Zdolność kiełkowania uzyskanych nasion mieszańcowych**

Nasiona gatunków z rodzaju *Prunus* w chwili wydobycia z owoców nie są zdolne do kiełkowania, ponieważ znajdują się w fazie głębokiego spoczynku fizjologicznego (Suszka 1962, 1967). Nasiona te nie kiełkują, nawet jeżeli warunki środowiskowe, tj. temperatura, wilgotność podłoża i dostęp tlenu są odpowiednie do ich skielkowania (Baskin i Baskin, 2004). Spoczynek ten jest przełamany w trakcie stratyfikacji (Szymajda i Żurawicz, 2014; Szymajda i in. 2019b) pod wpływem chłodu, który powoduje rozkład związków chemicznych zwanych inhibitorami kiełkowania. Z poddanych stratyfikacji 752 nasion skielkowało 704 czyli 93,9%. Choć nie wszystkie nasiona wykiełkowały, to ich zdolność kiełkowania była dość dobra. Zdolność ta zależała bardziej od genotypu formy matecznej niż ojcowskiej. Niezależnie od formy ojcowskiej moreli lub ałyczy nasiona śliwy japońskiej ‘Trumlar’ posiadały większą zdolność kiełkowania niż nasiona śliwy japońskiej ‘Czarnuszka’. Wpływ genotypu formy matecznej na zdolność kiełkowania nasion gatunków z rodzaju *Prunus* stwierdzono także w badaniach własnych (Szymajda i in., 2019a; 2019b) oraz innych autorów (Jensen i Kristiansen, 2009; Seliga i Żurawicz, 2011; Souza i in., 2017).

#### **Wnioski**

1. Tradycyjna hybrydyzacja oddalona śliwy japońskiej i moreli lub ałyczy odznacza się małą efektywnością, w wyniku czego uzyskuje się małą liczbę owoców i nasion mieszańcowych w stosunku do zapylnych kwiatów.
2. Genotyp śliwy japońskiej użytej jako forma mateczna ma większy wpływ niż genotyp

ojcowski moreli na zawiązywanie owoców w hybrydyzacji oddalonej tych gatunków.

3. Duża część nasion uzyskanych w krzyżowaniach oddalonych śliwa japońska × morela oraz śliwa japońska × ałycza jest nieprawidłowo wykształcona (nieżywotna).
4. Nie wszystkie dobrze wykształcone nasiona mieszańcowe krzyżowanych genotypów śliwy japońskiej i moreli lub ałyczy, pomimo długotrwałej stratyfikacji, są zdolne do kiełkowania. Przy niedużej liczbie uzyskiwanych nasion jest to dużym utrudnieniem w uzyskaniu siwek mieszańcowych krzyżowanych gatunków.
5. Zdolność kiełkowania nasion uzyskanych w krzyżowaniu śliwa japońska × morela uzależniona jest od genotypu matecznego śliwy japońskiej.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 77.*

#### **Literatura**

- Arbeola, A., Daorden, M. E., Garcia, E., Marín, J. A. (2003). Successful establishment of *in vitro* culture of *Prunus cerasifera* hybrids by embryo culture of immature fruits. *Acta Hort.* 616: 375–378.
- Arbeola, A., Daorden, M. E., Garcia, E., Wunsch, A., Hormaza, J. I., Marín, J. A. (2006). Significant effect of accidental pollinations on progeny of setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica* 147: 389–394. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-005-9035-x>
- Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.
- Duval, H., Poëssel, J. L., Olivier, G. (1994). Evaluation and selection of progeny of an interspecific cross between *Prunus cerasifera* and *Prunus salicina*. *Acta Hort.* 359: 87–92.
- Golis, A., Korbin, M., Pluta, S. (2002). The development of *Ribes* embryos by interspecific hybridisation. *Acta Hort.* 585: 155–158.
- Hakoda, N., Toyoda, R., Tabuchi, T., Ogiwara, I., Ishikawa, S., Shimura, I. (1998). Morphological characteristics of the interspecific hybrids between Japanese apricot (*Prunus nume*) and Plum (*P. salicina*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 708–714. <http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.67.708>
- Jensen, M., Kristiansen, K. (2009). Removal of distal part of cotyledons or soaking in BAB overcomes embryonic dormancy in sour cherry. *Propagation of Ornamental Plants Vol. 9* (3): 135–142.
- Jun, J. H., Chung, K. H. (2007). Interspecific cross compatibility among plum, apricot and plumcot. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 25 (3): 217–222.

- Khan, S. A., Perveen, A. (2008). Germination capacity of stored pollen of *Ficus carica* (Moraceae) and their maintenance. *Pak. J. Bot.* 40 (6): 2251–2254.
- Kukharchyk, N., Kastrickaya, M. (2006): Embryo rescue techniques in *Prunus*, L. breeding. *J. Fruit Ornament Plant Res.* 14 (1): 129–135.
- Layne, R. E., Sherman, C. W. B. (1986): Interspecific hybridization of *Prunus*. *HortScience.* 21 (1): 48–51.
- Liu, W., Chen, X., Liu, G., Liang, Q., He, T., Feng, J. (2007). Interspecific hybridization of *Prunus persica* with *P. armeniaca* and *P. salicina* using embryo rescue. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 88: 289–299. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9201-z>
- Neumüller, M. (2011). Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica* L.) breeding. W: Flachowsky, H., Hanke, V. M. (eds). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology.* Global Science Books, s. 139–154.
- Okie, W. R. (2005). ‘Spring Satin’ plumcot. *J. Amer. Pomol. Soc.* 59: 119–124.
- Perez, S., Moore, J. N. (1985). Prezygotyczne bariery endogenne do interspecific hybridizacji w *Prunus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110 (2): 267–273.
- Rubio-Cabates, M. J., Socias i Company, R. (1996). Fertilization assessment and postzygotyczne development w several intra- and interspecific *Prunus* hybrids. *Euphytica* 90: 325–330.
- Seliga, S., Żurawicz, E. (2011). Wpływ warunków stratyfikacji na kiełkowanie nasion wiśni (*Prunus cerasus* L.). *Zesz. Nauk. Inst. Sad. i Kw. im. Sz. Pieniążka* 19: 5–14.
- Sharafi, Y. (2011). Pollen viability and longevity w some selected genotypes of peach, plum, prune and sour cherry. *J. Med. Plants Res.* 5 (2): 275–279.
- Souza, A. G., Spinelli, V. M., Souza, R. O., Smiderle, O. J., Bianchi, V. B. (2017). Optimization of germination and initial quality of seedlings of *Prunus persica* tree rootstocks. *Journal of Seed Science* 39: 66–173. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n2171687>
- Suszka, B. (1962). Wpływ czynnika termicznego na ustępowanie spoczynku nasion czereśni dzikiej. *Arboretum Kórnickie* 7: 189–275.
- Suszka, B. (1967). Studia nad spoczynkiem i kiełkowaniem nasion różnych gatunków z rodzaju *Prunus*, L. *Arboretum Kórnickie* 12: 221–282.
- Szabó, Z., Nyeki, J. (1994). Frost injury to European and Japanese plum flower buds in Hungary. *Kerteszeti Tudomány* 26 (1): 1–15.
- Szabó, Z. (2003). Frost injuries of the reproductive organs in fruit species. W: Kozma, P., Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. *Floral biology, pollination and fertilisation in temperate zone fruit species and grape.* Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 59–74.
- Szymajda, M., Pruski, K., Żurawicz, E., Sitarek, M. (2013). Freezing injuries to flower buds and their influence on yield of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and peach (*Prunus persica* L.). *Can. J. Plant Sci.* 93: 191–198. <http://dx.doi.org/10.4141/cjps2012-238>
- Szymajda, M., Żurawicz, E. (2014). Seed genotypes for harvesting seeds in the production of generative rootstocks for peach cultivars. *Horticultural Science* 41 (4): 160–166.
- Szymajda, M., Sitarek, M., Pruski, K., Żurawicz, E. (2019)a. A potential of new peach (*Prunus persica* L.) seed tree genotypes for the production of generative rootstocks. *Sci. Hortic.* 256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108618>.
- Szymajda, M., Żurawicz, E., Maciorowski, R., Pruski, K. (2019) b. Stratification period combined with mechanical treatments increase *Prunus persica* and *Prunus armeniaca* seed germination. *Dendrobiology* 81: 47–57.
- Szymajda, M., Napiórkowska, B., Korbin, M., Żurawicz, E. (2015). Studies on the interspecific crossing compatibility among three *Prunus* species and their hybrids. *Horticultural Science* 42 (2): 70–82. <https://doi.org/10.17221/273/2014-HORTSCI>
- Top, B.L., Russell, D.M., Neumüller, M., Dalbó, M.A., Liu, W. (2012). Plum. W: Badenes, M. L., Byrne, D. H. *Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding* 8. Springer Science+Business Media, LLC, p. 576–621. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9>
- Yoshida, M., Kyotani, H., Yasuno, M. (1975). Studies on interspecific crossing in *Prunus* spp. I. Cross compatibility. *Jpn. J. Breeding.* 25 (1): 17–23.
- Yao, S. (2011). Winter 2011 low-temperature injury to stone fruit buds in New Mexico. *HortTechnology* 21 (6): 767–772
- Zenkter, M. (1990). *In vitro* fertilization and wide hybridization in higher plants. *Plant Sci.* 9: 267–279. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689009382290>

# Ocena obiektów cebuli (*Allium cepa* L.) pod względem tolerancji na suszę w fazie kiełkowania i wzrostu siewek

Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) accessions for drought tolerance at germination and seedling growth

Urszula Kłosińska  

Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice

✉ e-mail: urszula.klosinska@inhort.pl

Celem badań była ocena wpływu niedoboru wody na zdolność kiełkowania nasion i wzrost siewek cebuli oraz identyfikacja obiecujących obiektów do wykorzystania w przyszłych programach hodowli nowych odmian cebuli tolerancyjnych na stres suszy. Oceniono 150 linii/odmian cebuli pochodzących z polskich i zagranicznych firm hodowlano-nasiennych oraz z Banku Genów Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Doświadczenia prowadzono w warunkach laboratoryjnych indukując stres suszy przez zastosowanie 18% poliglikolu etylenowego (PEG<sub>8000</sub>) w fazie kiełkowania nasion i 10% PEG w fazie siewek. Badane obiekty cebuli wykazały istotne zróżnicowanie pod względem tolerancji na stres suszy, potwierdzone wysokimi wartościami współczynnika zmienności (CV) dla ocenianych parametrów: maksymalny procent skielkowanych nasion (35,3%), świeża masa siewek (38,5%), długość liści siewek (42,9%) i długość korzeni siewek (56,3%). Zanolowano, że niedobór wody najmniej ograniczył kiełkowanie nasion o 23%, następnie długość korzeni o 36%, a najbardziej świeżą masę siewek i długość liści, odpowiednio o 52% i 53,5%. Stwierdzono silną korelację ( $r = 0,81-0,86$ ) między cechami opisującymi wzrost siewek w warunkach suszy, wskazując, że deficyt wody redukuje wzrost całych siewek. Natomiast zależności pomiędzy nimi a kiełkowaniem w stresie suszy okazały się nieistotne ( $r = 0,19-0,24$ ). Spośród 150 obiektów cebuli, genotyp 171026 wykazał wysoki poziom tolerancji na suszę zarówno w fazie kiełkowania, jak i w fazie siewek.

**Słowa kluczowe:** *Allium cepa*, glikol polietylenowy (PEG), niedobór wody, tolerancja

The aim of this study was to assess the effect of water deficiency on germination ability and growth of onion seedlings, and identify promising accessions for use in future breeding programs of new onion varieties with drought tolerance. We evaluated 150 onion lines/cultivars derived from Polish and foreign breeding and seed companies and from the Gene Bank of the Institute of Horticulture in Skierniewice. Experiments were performed under laboratory conditions inducing drought stress by using 18% polyethylene glycol (PEG<sub>8000</sub>) in the seed germination phase and 10% PEG in the seedling phase. Significant differences in reaction to drought stress were observed among onion accessions, confirmed by the high values of the coefficient of variation (CV) for the assessed parameters: maximum percentage of germinated seeds (35,3%), fresh weight of seedling (38,5%), cotyledons length of seedling (42,9%) and root length of seedling (56,3%). The received results showed, that water deficiency reduced seed germination the least by 23%, then the root length by 36%, and the fresh weight of seedling and cotyledon length by 52% and 53,5%, respectively. A high correlation ( $r = 0,81-0,86$ ) between the features describing the growth of seedlings under drought conditions was found, indicating that water deficit reduced growth of whole seedlings. However, no correlation ( $r = 0,19-0,24$ ) between them and germination under drought conditions was observed. Among 150 onion accessions, genotype 171026 showed a high level of drought tolerance, both in seed germination stage and in seedling growth stage.

Keywords: *Allium cepa*, polyethylene glycol (PEG), tolerance, water deficit

## Wstęp

Cebula należy do gatunków warzyw o największym znaczeniu pod względem wielkości produkcji, zarówno w Polsce, jak i na świecie. Polska z rocznymi plonami przekraczającymi 650 tysięcy ton, jest trzecim producentem cebuli w UE, po Holandii i Hiszpanii (EUROSTAT 2017). Pod względem areału uprawy warzyw w naszym kraju, cebula zajmuje pierwsze miejsce (GUS 2018). Gatunek ten jest szczególnie

wrażliwy na stres suszy w fazie kiełkowania nasion i wschodów oraz w fazie wiązania i przyrostu cebul (Addai i in., 2014; Hanci i Cebeci, 2015). Niedobór wody występujący w fazie kiełkowania nasion powoduje opóźnienie wschodów, zmniejszenie liczby roślin na jednostce powierzchni, a w konsekwencji obniżenie plonu. Okresy suszy występujące przed i w trakcie wiązania, a następnie przyrostu cebul prowadzą do zahamowania ich wzrostu, skutkując nie tylko



redukcją wysokości plonu, ale także obniżeniem jakości przechowalniczej. Najlepszą metodą zabezpieczającą uprawy cebuli przed negatywnymi skutkami suszy jest hodowla odmian o podwyższonej tolerancji na stres niedoboru wody. Jest to szczególnie ważne w związku z prognozowanym wzrostem deficytu wody wskutek postępujących zmian klimatu (Ziarnicka-Wojtaszek, 2015).

W ostatnim czasie podjęto w Instytucie Ogrodnictwa (IO) w Skierniewicach badania, których pierwszym etapem było opracowanie metody testowania cebuli w fazie kiełkowania nasion i wzrostu siewek przy użyciu glikolu polietylenowego (PEG) – substancji osmotycznie czynnej obniżającej potencjał wody (Michel, 1983). PEG jest polimerem indukującym stres osmotyczny w warunkach *in vitro* powszechnie stosowanym w testach tolerancji różnych gatunków roślin na niedobór wody: kukurydzy (Hohl i Schopfer, 1991), sosny (Zhu i in., 2006), pszenicy (Kolasińska, 2009), sorga (Bibi i in., 2012), ryżu (Wang i in., 2013), soczewicy (Muscolo i in., 2014), pomidora (Brdar-Jokanović i Zdravković, 2015) i ogórka (Kłosińska i in., 2016).

Biorąc pod uwagę szeroką pulę zarejestrowanych odmian cebuli (Rejestr COBORU odnotowuje 57 odmian, a rejestr EU – ok. 1200 odmian) oraz kolekcję tego gatunku w Banku Genów IO, istnieje duże prawdopodobieństwo identyfikacji materiałów o wysokiej tolerancji na deficyt wody. Dlatego też podjęto badania, których celem była ocena kiełkowania nasion i wzrostu siewek 150 linii/odmian cebuli różnego pochodzenia w warunkach symulowanej suszy przy użyciu PEG.

## Material i Metody

Materiałem badawczym było 150 obiektów pochodzących z polskich i zagranicznych firm hodowlano-nasiennych oraz z Banku Genów Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach (tab. 1). Badania przeprowadzono w roku 2019 w fazie kiełkowania nasion oraz w fazie siewek w warunkach laboratoryjnych. Stres suszy indukowano przez zastosowanie poliglikolu etylenowego (PEG<sub>8000</sub>) obniżającego potencjał wody według metody zoptymalizowanej w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach (Kłosińska i in., 2019).

### Faza kiełkowania nasion

Nasiona 150 obiektów cebuli wykładano do szalek wyłożonych bibułą nasączoną 4 ml PEG w stężeniu 18% oraz 4 ml dH<sub>2</sub>O (kontrola). Test przeprowadzono w 3 powtórzeniach, w każdym po 50 nasion × 2 kombinacje (18% PEG i dH<sub>2</sub>O). Szalki umieszczono w ciemności w fitotronie w temperaturze 18°C. Na podstawie liczby skielkowanych nasion notowanych codziennie od wysiewu przez 14 dni, obliczono: wskaźnik gMAX (maksymalny% skielkowanych nasion), oraz procent skielkowanych nasion w 18% PEG w odniesieniu do kontroli.

### Faza siewek

Skielkowane nasiona (dł. 10–15 mm) 150 obiektów cebuli wykładano do szalek wyłożonych bibułą nasączoną 4 ml PEG w stężeniu 10% oraz 4 ml dH<sub>2</sub>O (kontrola). Test przeprowadzono w 3 powtórzeniach, w każdym po 10 nasion × 2 kombinacje

Tabela 1  
Table 1

Pochodzenie i liczebność badanych obiektów cebuli  
Origin and accessions number of onion used in study

Pochodzenie Origin	Liczba obiektów Accessions number
Bank Genów, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice	34
„Polan”, Kraków	22
„Plantico”, Zielonki	59
„Spójnia”, Nochowo	20
PNOS, Ożarów Mazowiecki	2
Bejo Zaden	8
Enza Zaden	2
Nunhems Bayer	2
Syngenta	1

(10% PEG i dH<sub>2</sub>O). Szalki umieszczono w fitotronie typu walk-in w temperaturze 24°C/dzień i 20°C/noc oraz 12 h fotoperiodzie. Po 12 dniach wykonano pomiary długości korzenia i liścieni oraz świeżej masy.

Wykonano zestawienie uzyskanych wyników, obliczając średnie arytmetyczne dla cech badanych odmian w warunkach kontrolnych i stresowych. Oddzielnie dla każdej linii/odmiany przeprowadzono analizę wpływu deficytu wody na wielkość badanych parametrów wyrażoną w procentach względem kontroli oraz obliczono współczynnik zmienności (CV) i współczynnik korelacji (r).

## Wyniki i Dyskusja

Proces kiełkowania i wzrost siewek to najbardziej krytyczne fazy w cyklu życiowym roślin (Ahmed i in., 2009). Narażenie nasion na niekorzystne warunki takie jak susza ma destrukcyjny wpływ na wykształcanie siewek i często dalszy

przebieg rozwoju roślin (Albuquerque i Carvalho, 2003). W celu symulacji suszy, w niniejszych badaniach w fazie kiełkowania cebuli zastosowano 18% PEG, natomiast w fazie siewek – 10% PEG. Substancje te w znaczny sposób obniżyły zdolność kiełkowania nasion (tab. 2), a także zahamowały wzrost siewek (tab. 3). Badane obiekty cebuli istotnie różniły pod względem tolerancji na niedobór wody, co potwierdzają wysokie wartości współczynnika zmienności (CV) dla ocenianych parametrów: maksymalny procent skiełkowanych nasion (35,3%), świeża masa siewek (38,5%), długość liścieni siewek (42,9%) i długość korzeni siewek (56,3%) (tab. 2, 3).

Nasiona 150 testowanych odmian/linii cebuli odznaczały się dobrą zdolnością kiełkowania w warunkach kontrolnych (0% PEG), o czym świadczy średnia wartość parametru gMAX (maksymalny% kiełkowania nasion) wynosząca 76,1% (tab. 2). Zastosowany w niniejszych badaniach 18% PEG

Tabela 2  
Table 2

**Maksymalny% kiełkowania nasion (gMAX) 150 obiektów cebuli w warunkach kontrolnych (0% PEG) i stresu suszy (18% PEG) oraz liczba skiełkowanych nasion w 18% PEG względem kontroli w%**

**Maximum% of seed germination (gMAX) of 150 onion accessions under control treatment (0% PEG) and drought stress (18% PEG); and number of seed germinated under 18% PEG treatment relative to control in%**

Parametr Parameter	gMAX (%)		% kontroli % control
	kontrola control	stres stress	
Średnia Mean	76,1	58,6	77,0
Zakres Range	11,3–100	4,7–96,7	7,5–139,3
CV* (%)	23,0	35,3	30,0

\*współczynnik zmienności; the coefficient of variation

Tabela 3  
Table 3

**Świeża masa, długość liścieni i długość korzeni siewek 150 obiektów cebuli w warunkach kontrolnych (0% PEG) i stresu suszy (10% PEG) oraz wartości tych parametrów w 18% PEG względem kontroli w%**

**Fresh weight, cotyledons length and root length of seedlings of 150 onion accessions under the control treatment (0% PEG) and drought stress (10% PEG); and values of these parameters under the 10% PEG treatment relative to control in%**

Parametr Parameter	Świeża masa siewek Fresh weight of seedlings			Długość liścieni siewek Cotyledons length of seedlings			Długość korzeni siewek Root length of seedlings		
	kontrola control (mg)	stres stress (mg)	% kontroli % control	kontrola control (cm)	stres stress (cm)	% kontroli % control	kontrola control (cm)	stres stress (cm)	% kontroli % control
Średnia Mean	37,0	17,5	48,1	4,8	2,2	46,5	4,3	2,7	64,0
Zakres Range	24,0–55,5	7,4–35,9	19,3–89,6	2,6–7,6	0,7–5,1	15,2–112,1	1,4–7,4	0,5–7,7	16,7–149,5
CV* (%)	18,8	38,5	40,6	20,3	42,9	44,8	29,6	56,3	48,1

\*współczynnik zmienności; the coefficient of variation

został także użyty w badaniach nad ogórkiem przez Zhang i wsp. (2013) oraz Kłosińską i wsp. (2016). Jednakże porównując otrzymane wyniki z wynikami ww. autorów stwierdzono, że cebula jest bardziej wrażliwa na stres suszy w fazie kiełkowania nasion niż ogórek. U sześciu obiektów cebuli zanotowano większy wskaźnik kiełkowania w warunkach stresowych względem kontroli średnio od 10 do 36,3% (tab. 4), co może wskazywać na ich wysoki poziom tolerancji na suszę. Najbardziej wrażliwe na deficyt wody w fazie kiełkowania okazały się trzy linie, u których% skielkowanych nasion po 14 dniach traktowania 18% PEG mieścił się w przedziale od 7,5 do 12,7% w porównaniu do kontroli (tab. 4).

Ze względu na zróżnicowaną siłę wzrostu siewek w warunkach kontrolnych, oddzielnie dla każdej linii/odmiany przeprowadzono analizę wpływu 10% PEG na wielkość badanych cech w odniesieniu do kontroli. Pozwoliło to na wytypowanie linii charakteryzujących się skrajną reakcją na stres suszy. U 33 genotypów cebuli zanotowano długość korzenia na poziomie 90–149,5% w stosunku do kontroli, z czego u 14 obiektów długość korzenia w 10% PEG przekroczyła 110% kontroli (tab. 4). Na szczególne wyróżnienie zasługują trzy linie: ZS/113, ZS/109 i 171026, których długość korzeni w stresie suszy była wyższa odpowiednio o 49,5, 42,4 i 33,6% względem kontroli, co może wskazywać na ich wysoki poziom tolerancji na badany stres, zważywszy że również u linii tych odnotowano niewielki spadek świeżej masy. Natomiast największą redukcję długości korzenia, o ponad 80% w stosunku do kontroli, obserwowano u sześciu obiektów (tab. 4). Badano również wpływ 10% PEG na długość liścieni siewek cebuli. U dwóch linii ZS/105 i ZS/117 obserwowano wzrost tej cechy odpowiednio o 12 i 11% względem kontroli, natomiast u pozostałych 148 stres suszy spowodował zahamowanie wzrostu liścieni, które było największe u sześciu linii i przekroczyło 80% w stosunku do kontroli (tab. 4). Zastosowanie 10% stężenia PEG także u wszystkich obiektów zmniejszyło świeżą masę siewek. Spośród 150 ocenianych linii najmniejszy stopień redukcji świeżej masy w stosunku do kontroli (10 – 24%) stwierdzono u 12 obiektów, natomiast najwyższy (80%) u dwóch genotypów NOE/61 i 171009.

Na podstawie średnich wartości z wszystkich linii stwierdzono, że stres niedoboru wody najmniej ograniczył kiełkowanie nasion – o 23% (tab. 2), następnie długość korzeni – o 36%, natomiast świeża masa i długość liścieni były zahamowane odpowiednio o 52 i 53,5%, co stanowiło 48 i 46,5% względem kontroli (tab. 3). Wiele

doniesień literaturowych podkreśla, że deficyt wodny w podłożu bardziej obniża wzrost części nadziemnej niż wzrost korzeni roślin różnych gatunków: fasoli (Turkan i in., 2004), melona (Tuna i in., 2010), pomidora (Prokic i Stikic, 2012) i sorgo (Bibi in. 2012), co potwierdziły również niniejsze badania dotyczące cebuli. Dlatego też zahamowanie wzrostu części nadziemnej i zwiększenie wzrostu korzeni jest jednym z ważniejszych wskaźników tolerancji na stres suszy.

Wyniki badań sugerują, że takie parametry, jak kiełkowanie nasion, świeża masa siewek, długość korzenia i liścieni mogą być wykorzystane do szybkiej selekcji genotypów tolerancyjnych na stres suszy we wczesnej fazie wzrostu. Na podstawie pozytywnie lub negatywnie wyróżniającego się przynajmniej jednego z ocenianych parametrów, badane linie klasyfikowano jako tolerancyjne lub wrażliwe (tab. 4). Spośród 150 obiektów cebuli, wytypowano 23 linie/odmiany tolerancyjne i 13 wrażliwych, a pozostałe 114 obiektów charakteryzowało się średnim stopniem tolerancji lub wrażliwości na niedobór wody. Najwięcej tolerancyjnych obiektów (14) pochodziło z firmy „Plantico”, co może wynikać z dużej liczby testowanych obiektów (59), które stanowiły aż 40% wszystkich badanych. Na drugiej pozycji uplasowały się tolerancyjne obiekty z Banku Genów (6), natomiast najmniej obiektów tolerancyjnych pochodziło z firm: „Spójnia”, „Polan” i PNOS (tab. 4). Wśród 23 linii tolerancyjnych, aż 20 odznaczało się dobrą i bardzo dobrą zdolnością kiełkowania w stresie suszy wynoszącą od 77,4 do 136,3% względem kontroli (tab. 4). Jednakże dwie z nich ZS/131 i 171007 o najwyższych parametrach kiełkowania w warunkach deficytu wody, przewyższających kontrolę odpowiednio o 21,4 i 36,3%, cechowały się silną redukcją świeżej masy siewek, długości liścieni i korzeni, od 63,3 do 73,4%. Podobną zależność zaobserwowano u większości linii wrażliwych, które także przy dobrych parametrach kiełkowania od 73,4 do 105,6% względem kontroli charakteryzowały się silnym zahamowaniem wzrostu siewek. Wśród linii wrażliwych było 6 linii z Banku Genów, po trzy z „Plantico” i „Spójni” oraz jedna z „Polana” (tab. 4). Wytypowane linie ze skrajną reakcją na stres suszy posłużą do badań fizjologicznych i biochemicznych czynników warunkujących tolerancję cebuli na deficyt wody.

W celu poznania zależności pomiędzy badanymi cechami w warunkach stresu suszy obliczono współczynnik korelacji ( $r$ ) (tab. 5). Stwierdzono silną korelację między świeżą masą siewek a długością ich liścieni i korzeni w warunkach niedoboru wody,



Tabela 4

Table 4

**Charakterystyka tolerancyjnych i wrażliwych obiektów cebuli w warunkach stresu suszy (18% PEG – faza kielkowania; 10% PEG – faza siewek) względem kontroli w%**

**Characteristics of tolerant and sensitive onion accessions under drought stress conditions (18% PEG – germination stage; 10% PEG – seedlings stage) relative to control in%**

Obiekt Accession	Pochodzenie Origin	Kielkowanie % kontroli Germination % control	Świeża masa siewek % kontroli Fresh weight of seedlings % control	Długość liścieni siewek % kontroli Cotyledons length of seedlings % control	Długość korzeni siewek % kontroli Root length of seedlings % control
<b>Tolerancyjne Tolerant</b>					
ZS/105	„Plantico”, Zielonki	80,6	80,3	112,1	124,2
ZS/109	„Plantico”, Zielonki	89,1	77,5	64,4	142,4
ZS/110	„Plantico”, Zielonki	100,8	75,6	64,4	121,4
ZS/111	„Plantico”, Zielonki	81,6	88,2	68,5	120,0
ZS/113	„Plantico”, Zielonki	65,3	83,0	72,8	149,5
ZS/115	„Plantico”, Zielonki	90,8	37,6	81,0	112,5
ZS/117	„Plantico”, Zielonki	91,0	67,0	111,0	104,7
ZS/118	„Plantico”, Zielonki	64,1	57,4	70,7	113,2
ZS/119	„Plantico”, Zielonki	81,6	69,2	90,9	120,5
ZS/131	„Plantico”, Zielonki	121,4	26,6	29,7	36,7
ZS/134	„Plantico”, Zielonki	116,7	61,8	61,5	94,7
ZS/135	„Plantico”, Zielonki	112,8	57,8	69,6	84,4
ZS/138	„Plantico”, Zielonki	85,9	83,4	80,2	116,1
ZS/158	„Plantico”, Zielonki	86,2	58,6	65,2	113,9
171007	Bank Genów, IO	136,3	29,6	31,0	33,6
171011	Bank Genów, IO	91,7	85,4	66,2	91,0
171017	Bank Genów, IO	102,4	88,7	79,0	86,1
171018	Bank Genów, IO	103,1	89,6	79,9	116,9
171026	Bank Genów, IO	112,2	82,0	75,8	133,6
171099	Bank Genów, IO	63,5	86,8	71,9	116,9
NOE/64	„Spójnia”, Nochowó	92,6	82,2	71,9	87,9
P/37	„Polan”, Kraków	77,4	52,8	54,6	115,5
Bolero F <sub>1</sub>	PNOS, Ożarów Maz.	115,3	39,2	35,3	40,1
<b>Wrażliwe Sensitive</b>					
ZS/46	„Plantico”, Zielonki	8,1	53,8	49,3	36,9
ZS/159	„Plantico”, Zielonki	12,7	38,3	39,2	47,0
ZS/181	„Plantico”, Zielonki	7,5	41,4	33,8	35,3
171009	Bank Genów, IO	73,4	19,7	15,2	18,0
171035	Bank Genów, IO	74,4	25,6	21,3	16,7
171036	Bank Genów, IO	82,6	28,3	16,4	22,1
171040	Bank Genów, IO	105,6	25,2	18,7	24,1
171042	Bank Genów, IO	83,4	25,7	25,8	18,6
171051	Bank Genów, IO	95,7	23,5	19,0	21,5
NOE/59	„Spójnia”, Nochowó	67,5	27,9	18,7	19,9
NOE/60	„Spójnia”, Nochowó	83,4	23,4	16,9	21,3
NOE/61	„Spójnia”, Nochowó	84,9	19,3	23,0	18,2
P/32	„Polan”, Kraków	77,6	35,0	22,7	18,2

Tabela 5

Table 5

**Współczynnik korelacji (r) pomiędzy badanymi cechami 150 obiektów cebuli w warunkach stresu suszy (18% PEG)**  
**Correlation coefficient (r) between the studied features of 150 onion accessions under drought stress conditions (18% PEG)**

Parametr Parameter	Kielkowanie Germination (%)	Świeża masa siewek Fresh weight of seedlings (mg)	Długość liścieni siewek Cotyledons length of seedlings (cm)	Długość korzeni siewek Root length of seedlings (cm)
Kielkowanie Germination (%)	1	0,2363 <sup>ns</sup>	0,1919 <sup>ns</sup>	0,2116 <sup>ns</sup>
Świeża masa siewek Fresh weight of seedlings (mg)	0,2363 <sup>ns</sup>	1	0,8645*	0,8322*
Długość liścieni siewek Cotyledons length of seedlings (cm)	0,1919 <sup>ns</sup>	0,8645*	1	0,8116*
Długość korzeni siewek Root length of seedlings (cm)	0,2116 <sup>ns</sup>	0,8322*	0,8116*	1

\*istotne na poziomie  $\alpha = 0,01$ ; significant at  $\alpha = 0,01$  level

o czym świadczą wartości wynoszące odpowiednio 0,8645 i 0,8322. Zanotowano także istotny związek liścieni z długością korzeni (0,8116). Jest to zgodne z wynikami Kłosińskiej i wsp. (2016), którzy także zaobserwowali tę samą zależność dla siewek ogórka traktowanych 18% PEG. Podobne wyniki otrzymano dla melona (Kavas i in., 2013). Autorzy stwierdzili silną korelację między długością korzenia a długością części nadziemnej w warunkach suszy. Natomiast zależność pomiędzy kiełkowaniem a parametrami opisującymi wzrost siewek (świeża masa, długość liścieni i korzeni) w stresie deficytu wody okazała się nieistotna. Potwierdzają to niskie wartości współczynnika korelacji wynoszące odpowiednio 0,2363, 0,2116 i 0,1919 (tab. 5). Otrzymane wyniki mogą wskazywać, iż mechanizmy warunkujące tolerancję na stres suszy w fazie kiełkowania są prawdopodobnie inne od tych, które determinują tę cechę w fazie siewek. Podobną hipotezę sformułowała Kłosińska i in. (2016) w przypadku badań dotyczących ogórka.

Dzięki dużej zmienności pod względem tolerancji na deficyt wody, oceniane obiekty będą użyte jako materiał do badań polimorfizmu genomowego cebuli przy wykorzystaniu platformy DArTseq. Uzyskane wyniki pozwoliły także na wskazanie obiektów, które mogą być wykorzystane jako cenny materiał wyjściowy w programach hodowli twórczej nowych odmian cebuli tolerancyjnych na suszę. Do najbardziej tolerancyjnych w fazie kiełkowania nasion zaklasyfikowano sześć linii/odmian: ZS/131, ZS/134, ZS/135, 171007, 171026 i Bolero F<sub>1</sub>, a w fazie wzrostu siewek dziewięć: ZS/105, ZS/109, ZS/110, ZS/111, ZS/113, ZS/138, 171018, 171026 i 171099. Obiekty te pochodziły z firmy „Plantico”

i z Banku Genów, a odmiana Bolero F<sub>1</sub> z firmy PNOS. Na szczególną uwagę zasługuje genotyp 171026, który wyróżnił się wysokim poziomem tolerancji na suszę zarówno w fazie kiełkowania, jak i w fazie siewek.

## Wnioski

1. Badane obiekty cebuli okazały się istotnie zróżnicowane pod względem tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania i wzrostu siewek. Dzięki temu stanowią cenny materiał do genotypowania, a następnie identyfikacji regionów genomu odpowiedzialnych za tolerancję cebuli na deficyt wody.
2. Zwiększenie długości korzenia pod wpływem stresu suszy może być wskaźnikiem tolerancji cebuli na deficyt wody.
3. Stwierdzono silną korelację między świeżą masą siewek a długością ich liścieni i korzeni w warunkach niedoboru wody. Natomiast zależności pomiędzy kiełkowaniem a parametrami opisującymi wzrost siewek (świeża masa, długość liścieni i korzeni) w stresie suszy okazały się nieistotne. Może to wskazywać na zupełnie inne mechanizmy warunkujące tolerancję cebuli w poszczególnych fazach wzrostu.
4. Wytypowano obiekty cebuli, które mogą być cennym materiałem wyjściowym do wykorzystania w programach hodowli cebuli z tolerancją na stres suszy.

*Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej. Zadanie nr 104.*

## Literatura

- Addai, I. K., Takyi, H., Oduro, G. (2014). Influence of Bulb Weight at Planting and Drought Stress on Growth and Development of onion (*Allium cepa* L.) in the Northern Region of Ghana. *British Journal of Applied Science & Technology*, 4 (14): 2125–2135.
- Ahmad, S., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Ashraf, M., Waraich, E. A. (2009). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and growth stages. *Pak. J. Bot.* 41: 647–654.
- Albuquerque, F. M. C. D., Carvalho, N. M. D. (2003). Effect of type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annuus* L.), soyabean (*Glycine max* L.) Merrill and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. *Seed Sci Technol.* 31: 65–467.
- Bibi, A., Sadaqat, H. A., Tahir, M. H. N., Akram, H. M. (2012). Screening of sorghum (*Sorghum bicolor* Var Moench) for drought tolerance at seedling stage in polyethylene glycol. *J. Anim. Plant Sci.* 22 (3): 671–678.
- Brdar-Jokanović, M., Zdravković, J. (2015). Germination of tomatoes under PEG-induced drought stress. *Ratar. i Povrtar.* 52 (3): 108–113.
- Hanci, F., Cebeci, E. (2015). Comparison of salinity and drought stress effects on some morphological and physiological parameters in onion (*Allium cepa* L.) during early growth phase. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21 (6): 1204–1210.
- Hohl, M., Schopfer, P. (1991). Water relations of growing maize coleoptiles. Comparison between mannitol and polyethylene glycol 6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol.* 95: 716–722.
- Kavas, M., Baloglu, M. C., Akca, O., Kose, F. S., Gorcay, D. (2013). Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. *Turkish Journal of Biology* 37: 491–498.
- Kłosińska, U., Kozik, E. U., Treder, W., Klamkowski, K. (2016). Differential effects of drought stress on germination and seedling growth of cucumber accessions. In: Kozik, E. U., Paris, H. S. (eds) *Proceedings of Cucurbitaceae 2016*. Warsaw: 217–221.
- Kłosińska, U., Nowakowska, M., Szczechura, W., Nowak, K., Treder, W., Klamkowski, K., Wójcik, K. (2019). Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody. *Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimatyzacji Roślin NR 286*: 309–312.
- Kolasińska, K. (2009). Wartość siewna i reakcja ziarniaków zbóż jarych wyprodukowanych na ekologicznych plantacjach nasiennych na stres suszy symulowanej glikolem polietylenowym. *Biul. Instyt. Hod. i Aklimat. Rośl.* Nr 251: 53–66.
- Michel, B. E. (1983). Evaluation of the water potentials of solutio of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiol.* 72: 66–70.
- Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C., Maggio, A. (2014). Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interactions*, 9 (1): 354–363.
- Prokic, L. J., Stikic, R. (2012). Effects of different drought treatments on root and shoot development of the tomato wildtype and flacca mutant. *Arch. Biol. Sci.* 63 (4): 1167–1171.
- Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M. (2010). Potassium sulfate improves water deficit tolerance in melon plants grown under glasshouse conditions. *J Plant Nutr* 33: 1276–1286.
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H. (2004). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought tolerant *P. acutifolius* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci* 168: 223–231.
- Wang, H., Ma, J., Li X., Zhang, R., Li, Y. (2013). Study on drought resistance and screening of the drought resistance assessment indexes at germinating stage of rice. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 17 (5): 594–599.
- Ziernicka-Wojtaszek, A. (2015). Klimatyczny bilans wodny na obszarze Polski w świetle współczesnych zmian klimatu. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, T. 15. Z. 4 (52): 93–100.
- Zhang, N., Zhao, B., Zhang, H. J., Weeda, S., Yang, C., Yang, Z. C., et al. (2013). Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*, 54 (1): 15–23.
- Zhu, J., Kang, H., Tan, H., Xu, M. (2006). Effects of drought stresses induced by polyethylene glycol on germination of *Pinus sylvestris* var. mongolica seeds from natural and plantation forests on sandy land. *Journal of Forest Research*, 11 (5): 319–328.



# SPIS TREŚCI

## CONTENTS

- Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Agnieszka Masny, Bogusława Idczak, Krystyna Strączyńska, Abdelrahmen Mostafa Abdelwahab Mohamed 3
- Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ dla analizy regionów QTL sprzężonych z wybranymi cechami użytkowymi gatunku *Fragaria*.  
Preparation of the mapping population derived from the cross of ‘Elsanta’ and ‘Senga Sengana’ suitable for analysis of QTL regions linked to selected *Fragaria* traits.
- Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Mariusz Lewandowski 21
- Odczytanie profilu ekspresji genów kandydujących w podkładkach jabłoni o odmiennym stopniu tolerancji mrozowej  
Evaluation of changes in the expression profile of candidate genes in apple rootstocks with a different degree of frost tolerance
- Danuta Kucharska, Danuta Wójcik, Aleksandra Trzewik 33
- Analiza czynników warunkujących organogenezę agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro* i *in vivo* oraz ocena genetyczna i fenotypowa otrzymanego materiału.  
The analysis of factors determining *in vitro* and *in vivo* organogenesis of gooseberry (*Ribes grossularia* L.), genetic and phenotypic assessment of obtained material.
- Anita Kuras, Bogumiła Badek 41
- Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczki czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)  
Analysis of genome regions linked to the resistance of blackcurrant (*Ribes nigrum*) to blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)
- Mariusz Lewandowski, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz 47
- Wartość hodowlana wybranych odmian jabłoni (*Malus domestica*) pod względem odporności na parcha i mączniaka jabłoni  
Breeding value of selected apple cultivars (*Malus domestica*) for the resistance to apple scab and powdery mildew
- Agnieszka Masny, Edward Żurawicz, Jolanta Kubik 53
- Wstępne wyniki oceny wybranych klonów maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) poszerzających zmienność genetyczną pod względem ważnych cech fenotypowych  
Preliminary results of the evaluation of selected red raspberry (*Rubus idaeus* L.) clones extending existing genetic variability in terms of important phenotypic features
- Agnieszka Masny, Monika Mieszczakowska-Frąc 63
- Możliwości poprawy jakości owoców truskawki metodą hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*  
Possibilities of improvement the quality of strawberry fruit by intra- and interspecific hybridization within the *Fragaria* genus

- Stanisław Pluta, Łukasz Seliga 75  
Ocena zdolności kombinacyjnej wybranych form rodzicielskich borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) dla siły wzrostu siewek  
Assessment of the combining ability of selected highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) parental forms for seedling's growth
- Małgorzata Podwyszyńska, Monika Markiewicz, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Agnieszka Wojtania, Bożena Matysiak, Agata Broniarek-Niemiec, Dorota Kruczyńska, Joanna Puławska 87  
Indukowanie zmienności genetycznej jabłoni na drodze poliploidyzacji *in vitro* oraz ocena fenotypowa i genetyczna uzyskanych poliploidów w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych  
Induction of genetic variability of apple via polyploidization *in vitro* and phenotypic and genetic assessment of polyploids obtained in relation to their diploid counterparts
- Marek Szymajda, Anita Kuras, Edward Żurawicz, 93  
Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców i nasion w hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza)  
Influence of selected parental forms on fruit and seed set in distant hybridization of three fruit tree species of the genus *Prunus* (Japanese plum, apricot, myrobalan plum)