

## **Zadanie 76    Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria***

W roku 2014 badania prowadzono w ramach 3 tematów badawczych:

### ***Temat badawczy 1***

#### **Ocena stopnia polimorfizmu DNA form rodzicielskich truskawki**

Celem tego tematu badawczego było uzyskanie wiedzy na temat zróżnicowania genetycznego wybranych genotypów z rodzaju *Fragaria*, użytych jako formy rodzicielskie w programie krzyżowań ukierunkowanym na wytworzenie potomstwa o wysokiej zawartości składników bioaktywnych (antyoksydacyjnych) w owocach i utworzenie biblioteki polimorficznych fragmentów DNA umożliwiających zróżnicowanie mieszańców F<sub>1</sub>. Badania molekularne prowadzono na roślinach 15 form rodzicielskich z rodzaju *Fragaria* (odmian truskawki: 'Alice', 'Asia', 'Candiss', 'Chandler', 'Elsanta', 'Grandarosa', 'Madeleine', 'Matis', 'Onda', 'Pink Rosa', 'Polka', 'Sophie', 'Vibrant' oraz gatunków dzikich *F. chiloensis* Del Norte i Yaquina B), wytypowanych z kolekcji IO.

DNA do badań izolowano z w/w roślin metodą opartą na CTAB, opisaną przez Doyle i Doyle. Czystość uzyskanych preparatów określano na podstawie analizy elektroforegramów uzyskanych po elektroforezie horyzontalnej w żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki przy długości fali 230, 260, 280 i 320 nm. Polimorfizm DNA określano w oparciu o wyniki testów SSR, umożliwiających analizę regionów mikrosatelitarnych. Reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze firmy MJ Research, w obecności 25 starterów mikrosatelitarnych, wytypowanych z dostępnych baz danych dla rodzaju *Fragaria*. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym wybarwianym bromkiem etydydy. Dystans genetyczny oznaczono na podstawie analizy kodów binarnych 0/1 (metoda Jaccarda).

Łącznie na matrycach DNA wydzielonych z badanych genotypów rodzicielskich truskawki przeprowadzono 2000 reakcji amplifikacji. W reakcjach z wytypowanymi starterami mikrosatelitarnymi uzyskano polimorficzne amplikony o długości od 80 do 900 pz, różnicujące wszystkie analizowane genotypy. Stopień pokrewieństwa badanych genotypów określono w granicach od 42 do 94%. Wyróżniono trzy klastery pokrewieństwa genetycznego. W pierwszym skupieniu wystąpiły odmiany 'Candiss', 'Asia' i 'Chandler', w drugim 'Madeleine' i 'Grandarosa' oraz 'Pink Rosa' i 'Sophie'. Odmiany te wykazały pokrewieństwo z roślinami 'Matis' i 'Polka', 'Vibrant' i 'Onda', jak również 'Elsanta' i 'Alice'. W trzecim klastrze zgrupowane zostały bardzo blisko spokrewnione rośliny reprezentujące gatunki dzikie tj. *F. chiloensis* Del Norte oraz *F. chiloensis* Yaquina B.

W reakcjach ze starterami, przeznaczonymi do przygotowania profili genetycznych poszczególnych form wyjściowych, uzyskano produkty polimorficzne, stanowiące 98% wszystkich uzyskanych amplikonów. Długość uzyskanych amplikonów wahała się od 80 do 950 pz. Analizowane genotypy truskawki scharakteryzowano na podstawie 11-21 polimorficznych fragmentów DNA, w pełni odróżniających ich DNA od materiału genetycznego pozostałych badanych genotypów.

### ***Temat badawczy 2***

#### **Ocena możliwości hybrydyzacji wybranych genotypów z rodzaju *Fragaria***

Celem tego tematu była ocena możliwości skrzyżowania wybranych form rodzicielskich z rodzaju *Fragaria* na podstawie wyników krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych, ukierunkowanych na uzyskanie mieszańców F<sub>1</sub> o wysokiej zawartości składników bioaktywnych (antyoksydacyjnych) w owocach. Przedmiotem badań były wybrane formy rodzicielskie truskawki odznaczające się wysoką zawartością składników bioaktywnych w owocach ('Alice', 'Asia', 'Camarosa', 'Candiss', 'Chandler', 'Cifrance', 'Clery', 'Elsanta', 'Grandarosa', 'Honeoye', 'Konfitura', 'Madeleine', 'Marina', 'Matis', 'Onda', 'Paladyn', 'Patty', 'Pink Rosa', 'Polka', 'Roxana', 'Sophie', 'Spadeka', 'Sugar Lia', 'Vibrant'), jak również oktoploidalne gatunki dzikie z rodzaju *Fragaria*, jak *F. chiloensis* (formy Del Norte,

Yaquina A, Yaquina B, Yaquina Chile i *ssp. chiloensis* f. *patagonica*). Podjęto także próby hybridyzacji oktoploidalnych odmian truskawki *F. x ananassa* z gatunkami diploidalnymi, jak *F. iinumae* czy *F. nubicola*.

Krzyżowanie odmian przeprowadzono wiosną 2014 roku w warunkach polowych. W czerwcu w szklarni dokonano wysiewu nasion, a przez kolejne tygodnie produkowano i pielęgnowano siewki. Jesienią wszystkie siewki posadzono w kwaterze polowej.

Łącznie wykonano 89 kombinacji krzyżowań, w tym 67 krzyżowań wewnątrzgatunkowych i 22 krzyżowania międzygatunkowe. Zapyłono 1003 kwiaty i uzyskano 651 owoców (średnio 54,7% owoców w stosunku do liczby zapyłonych kwiatów). Jednak w przypadku 3 kombinacji krzyżowań wewnątrzgatunkowych oraz 19 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych z zapyłonych kwiatów nie uzyskano żadnego owocu. W przypadku pozostałych 3 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych: *F. chiloensis* Del Norte x 'Grandarosa', *F. chiloensis* Del Norte x 'Matis' oraz *F. chiloensis* Yaquina B x 'Grandarosa', uzyskano łącznie 25 owoców oraz 309 mieszańców. Kiełkowanie nasion większości kombinacji krzyżowań było dość słabe. Łącznie otrzymano 6.354 siewki. Średnio, w przeliczeniu na 1 owoc, uzyskano 7,5 siewki. W przypadku 10 kombinacji krzyżowań wewnątrzgatunkowych nasiona w ogóle nie kiełkowały. Podsumowując, siewki otrzymano tylko w przypadku 57 kombinacji, co stanowi 64% ogólnej liczby wykonanych kombinacji krzyżowań.

### **Temat badawczy 3**

#### Ocena fenotypowa siewek pod względem zdrowotności roślin

Celem tego tematu badawczego była ocena stopnia porażenia uzyskanych mieszańców  $F_1$  truskawki dla określenia ich odporności na ważne gospodarczo choroby liści. Przedmiotem badań były 6.354 siewki pokolenia  $F_1$ , uzyskane w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych wybranych form rodzicielskich z rodzaju *Fragaria*, odznaczających się wysoką zawartością składników bioaktywnych w owocach.

Wszystkie siewki oceniono pod kątem ich podatności na białą i czerwoną plamistość liści oraz mączniaka prawdziwego truskawki. Do oceny stopnia porażenia siewek przez patogeny wywołujące choroby liści użyto skali bonitacyjnej 0-5.

Bardzo niewielkie objawy porażenia liści przez grzyb *Mycosphaerella fragariae*, sprawcę białej plamistości liści stwierdzono u 136 siewek; 129 siewek (2,9% potomstwa wszystkich rodzin mieszańców) zaliczono do klasy 1 (bardzo mało wrażliwe), zaś 7 siewek (0,2%) - do klasy 2 (mało wrażliwe). U pozostałych 6.218 mieszańców (96,9%) nie obserwowano żadnych objawów tej choroby (klasa 0-odporne). W przypadku 33 rodzin mieszańców wszystkie siewki były zdrowe.

Porażenie siewek przez grzyb *Diplocarpon earliana*, sprawcę czerwonej plamistości liści było również stosunkowo niewielkie (0,14). U 5.503 mieszańców (87,5% potomstwa wszystkich rodzin mieszańców) nie zaobserwowano objawów porażenia roślin przez ten patogen (klasa 0). Bardzo niewielkie objawy choroby (klasa 1-bardzo mało wrażliwe) stwierdzono na liściach 762 mieszańców (11,2%). Do klasy 2 (mało wrażliwe) zaliczono 76 mieszańców (1,2%), zaś do klasy 3 (średnio wrażliwe) – 13 siewek (0,2%). W przypadku 16 rodzin mieszańców wszystkie siewki (100% populacji) uznano za odporne i zaklasyfikowano do klasy 0.

Badana populacja mieszańców truskawki, należących do 57 rodzin, była w umiarkowanym stopniu porażona przez grzyb *Sphaerotheca macularis*, sprawcę mączniaka prawdziwego truskawki (0,80). Nieco ponad połowa mieszańców (3.457 szt. stanowiących 53,9% ogółu populacji) nie wykazywała żadnych objawów infekcji przez ten patogen (klasa 0 - odporne). Nieznaczące ślady porażenia liści (klasa 1- bardzo mało wrażliwe) stwierdzono u 1.550 mieszańców (25,6% populacji). Za genotypy mało wrażliwe na mączniaka prawdziwego truskawki (klasa 2) uznano 769 siewek (12,0% populacji). Do klasy 3 (średnio wrażliwe) zaliczono 356 mieszańców (5,2%), do klasy 4 (wrażliwe) - 150 mieszańców (2,2%), zaś do klasy 5 (bardzo wrażliwe) - 72 mieszańce (1,1%).