

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

W roku 2018 badania prowadzono w ramach 3 tematów badawczych:

1. Ocena fenotypowa wyselekcjonowanych mieszańców pod względem plonu i jakości owoców (ich wielkości, jędrności i podatności na szarą pleśń), stopnia porażenia roślin przez choroby liści oraz podstawowe analizy składu chemicznego owoców (substancje rozpuszczalne, kwasy, poziom związków fenolowych ogółem i zawartość barwników antocyjanowych)

Celem tematu była ocena plonowania, jakości zewnętrznej i wewnętrznej owoców oraz podatności roślin na ważne gospodarczo choroby liści dla 180 mieszańców  $F_1$  z rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowanych i rozmnożonych w latach 2016-2017.

Przedmiotem badań były rośliny 180 mieszańców (klonów) truskawki, wyselekcjonowanych i rozmnożonych w latach 2016-2017 po ocenie 12.451 siewek pokolenia  $F_1$ , uzyskanych w wyniku krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Fragaria*. Genotypy te rosły w dwóch doświadczeniach porównawczych. Każdy z wyselekcjonowanych genotypów reprezentowany jest przez 15 roślin. Badane genotypy należą do rodzin: 'Grandarosa' x 'Elsanta', 'Pink Rosa' x 'Elsanta', 'Grandarosa' x 'Pink Rosa', 'Vibrant' x 'Matis', 'Onda' x 'Grandarosa', 'Polka' x 'Matis', 'Camarosa' x 'Pink Rosa', 'Honeoye' x 'Pink Rosa', 'Camarosa' x 'Matis', 'Konfitura' x 'Grandarosa', *Fragaria chiloensis* Del Norte x 'Grandarosa', 'Konfitura' x 'Elsanta', 'Onda' x 'Pink Rosa', 'Roxana' x 'Pink Rosa', 'Sophie' x 'Grandarosa', 'Chandler' x 'Grandarosa', *F. chiloensis* Del Norte x 'Matis', 'Sugar Lia' x 'Grandarosa', 'Onda' x 'Matis', 'Patty' x 'Pink Rosa', 'Patty' x 'Elsanta', 'Roxana' x 'Grandarosa', 'Sophie' x 'Matis', 'Camarosa' x 'Elsanta', 'Cifrance' x 'Grandarosa', 'Clery' x 'Pink Rosa', 'Konfitura' x 'Pink Rosa', 'Madeleine' x 'Pink Rosa', 'Clery' x 'Grandarosa', 'Onda' x 'Panvik', 'Marmolada' x 'Grandarosa', 'Candiss' x 'Panvik', 'Cigaline' x 'Grandarosa', 'Candiss' x 'Matis', 'Camarosa' x 'Panvik', 'Asia' x 'Matis', 'Alba' x 'Grandarosa', 'Alice' x 'Matis', 'Chandler' x 'Matis', 'Patty' x 'Panvik', 'Sophie' x 'Pink Rosa', 'Alice' x 'Pink Rosa', 'Cifrance' x 'Matis', 'Clery' x 'Matis', *Fragaria chiloensis* Del Norte x 'Elsanta', 'Asia' x 'Panvik', 'Cifrance' x 'Panvik', 'Cigaline' x 'Matis', 'Darselect' x 'Grandarosa', *Fragaria chiloensis* Yaquina A x 'Matis', *Fragaria chiloensis* Yaquina B x 'Panvik'.

W roku 2018 wykonano ocenę plonu i masy owoców oraz procentowego udziału owoców porażonych szarą pleśnią w ogólnej liczbie zebranych owoców, ocenę bonitacyjną jakości owoców (ich wielkość, atrakcyjność, kształt, barwa, połysk i jędrność), podstawowe analizy składu chemicznego owoców (zawartość substancji rozpuszczalnych, kwasowość miareczkowa i czynna, zawartość związków fenolowych ogółem oraz zawartość barwników antocyjanowych). Oceniono także stopień porażenia roślin przez białą i czerwoną plamistość liści oraz mączniaka prawdziwego truskawki (infekcja naturalna).

Stwierdzono duże zróżnicowanie genotypów w obu doświadczeniach pod względem badanych cech. Plon owoców dla roślin dwuletnich wynosił od 4 do 320 g/roślinę (najwyższy plon w tej grupie uzyskano u klonu T-201462-01), zaś dla roślin jednorocznych – od 2,3 g do 46 g (najlepiej plonował klon T-201511-01). Masa owoców wahała się od 2,1 do 21,3 g; owocami o największej masie (powyżej 15 g) odznaczały się następujące klony: T-201456-11, T-201536-15, T-201428-01, T-201537-01, T-201536-16, T-201456-12, T-201458-02 i T-201488-20. Oprócz instrumentalnego pomiaru masy owoców wykonano także ocenę bonitacyjną wielkości owoców; owoce 5 klonów (T-201427-01, T-201436-05, T-201437-02, T-201456-11 oraz T-201560-07) oceniono jako bardzo duże (ocena 5 w skali bonitacyjnej 1-5). Porażenie owoców przez szarą pleśń wynosiło od 0 do 33,3%; tylko w przypadku trzech klonów: T-201514-02, T-201457-13 oraz T-201571-02 odnotowane porażenie owoców było wyższe od 10% i wynosiło odpowiednio 12%, 22,2% oraz 33,3%. Owoce 128 badanych klonów były zdrowe. Oceniając atrakcyjność owoców zwracano uwagę zwłaszcza na kształt owocu i jego jednolitość (brak deformacji), pomarańczowoczerwoną lub jasnoczerwoną barwę skórki oraz jej silny połysk. Najbardziej atrakcyjnymi owocami (ocena 5 w skali 1-5) w grupie badanych genotypów odznaczały się: T-201428-01, T-201430-01, T-201436-05, T-201443-01, T-201446-02, T-201446-03 T-201457-18, T-201560-07 oraz T-201560-08.

Większość badanych klonów wytwarzała owoce o kształcie sercowatym, dość liczna grupa genotypów posiadała owoce stożkowate lub sercowatokuliste. Barwa owoców mieściła się w zakresie od 4,0 do 5,0. Najciemniejszymi owocami (ocena co najmniej 4,75) odznaczały się klon: T-201488-07, T-201580-01, T-201512-03, T-201512-04, T-201555-02, T-201514-08, T-201506-02. Połysk owoców oceniono od 1,0 do 5,0; 45 klonów (25% badanej populacji) posiadało owoce o bardzo silnym połysku. Jędrność owoców wahała się od 3,67 do 5,0; najbardziej jędrnymi owocami (ocena 5 w skali 1-5) wyróżniały się klon: T-201407-04, T-201428-01, T-201436-01, T-201436-02, T-201436-04, T-201436-05, T-201444-02, T-201446-03, T-201449-01, T-201456-10, T-201456-11, T-201457-18, T-201458-01, T-201458-02, T-201486-04, T-201501-02, T-201501-03, T-201512-05, T-201536-06, T-201536-15, T-201536-17, T-201555-06, T-201560-05, T-201560-07, T-201560-08 oraz T-201590-01.

Zawartość ekstraktu refraktometrycznego w owocach mieściła się w zakresie od 5,7 do 14,3%; najwyższą zawartość ekstraktu stwierdzono w owocach klonów: T-201536-05, T-201526-04, T-201567-01, T-201536-01 oraz T-201536-04 (powyżej 12%), a następnie T-201486-04 i T-201458-22. Kwasowość miareczkowa wynosiła od 0,48 do 1,17%. Najwyższą kwasowością miareczkową (powyżej 1,1 %) odznaczały się owoce: T-201571-01, a następnie T-201571-02 i T-201536-16. Zawartość barwników antocyjanowych stwierdzono na poziomie od 5 do 31 mg/100 g; Najwięcej antocyjanów (powyżej 25 mg/100 g) zawierały owoce klonów: T-201462-01, T-201488-07, T-201444-01 i T-201437-01, a także T-201536-09, T-201506-02, T-201508-01, T-201514-02, T-201514-08, T-201512-03, T-201513-03 i T-201560-11. Zawartość związków fenolowych wynosiła od 83 do 208 mg/100 g; najwięcej związków fenolowych stwierdzono w owocach klonów: T-201486-04 i T-201458-01. Zawartość kwasu askorbinowego mieściła się w zakresie od 10 do 90 mg/100 g. Najwyższą zawartością kwasu L-askorbinowego (powyżej 80 mg/100 g) odznaczały się owoce klonów: T-201488-12, T-201459-01 i T-201536-16. Zawartość kwasu jabłkowego stwierdzono na poziomie od 62 do 435 mg/100 g; najwięcej kwasu jabłkowego (powyżej 400 mg/100 g) zawierały owoce klonów: T-201424-01, T-201458-07, T-201456-03 oraz T-201536-05. Zawartość kwasu cytrynowego wynosiła od 442 do 1344 mg/100 g; najwyższą zawartością kwasu cytrynowego w owocach (powyżej 1200 mg/100 g) wyróżniały się klon: T-201487-03 oraz T-201488-20.

Spośród 180 badanych genotypów, niewielkie objawy porażenia liści przez białą plamistość liści stwierdzono w przypadku 48 klonów. Dla 40 klonów, powierzchnia liści zajęta przez plamy nie przekraczała 1%. Do 5% powierzchni liści z objawami białej plamistości odnotowano w przypadku 7 klonów, zaś nieco silniejszą infekcję, na poziomie około 20% powierzchni liści zajętej przez plamy, zaobserwowano tylko na roślinach klonu T-201411-02. Na roślinach 78 badanych klonów zaobserwowano objawy infekcji przez czerwoną plamistość liści. Najsilniej porażone przez czerwoną plamistość liści (od 20 do 50% powierzchni liści zajętej przez plamy) były rośliny genotypów: T-201430-01, T-201442-01, T-201443-01, T-201444-02 i T-201457-11. W przypadku 126 klonów, na roślinach nie odnotowano żadnych fenotypowych objawów mączniaka prawdziwego truskawki. Niewielkie ślady porażenia (1-20% powierzchni liści z objawami porażenia przez mączniaka) stwierdzono na liściach 35 genotypów. Na roślinach klonów T-201437-01 i T-201458-08 stwierdzono ponad 80% zniszczeń, spowodowanych przez mączniaka.

## 2. Ocena owoców wybranych 30 genotypów (o najwyższych zawartościach w owocach polifenoli i antocyjanów ogółem) pod względem zawartości procynidyn i kwasu elagowego oraz wykonanie profili i analizy ilościowej antocyjanów i monomerycznych polifenoli.

Celem tematu była szczegółowa analiza zawartości wybranych związków z grupy polifenoli w owocach 30 genotypów, dla których podstawowa analiza składu chemicznego potwierdziła w latach 2017-2018 najwyższą zawartość polifenoli i antocyjanów ogółem.

Badano owoce 30 genotypów, wytypowanych spośród 90 klonów, rosnących w doświadczeniu porównawczym I (założonym jesienią 2016 roku), które odznaczały się najwyższą zawartością polifenoli i antocyjanów ogółem, stwierdzoną w latach 2017-2018. Owoce do analiz pobrano losowo z większej puli owoców wysokiej jakości, zebranych w siedmiu terminach zbiorów ze wszystkich roślin każdego genotypu, a następnie przygotowano z nich próby mieszane. Analizy wykonywano na próbach zamrożonych i przechowywanych do czasu analiz w -80°C, w dwóch powtórzeniach technicznych (30 prób x 2 powtórzenia, łącznie 60 prób). Przed analizą owoce rozdrobiono w stałym CO<sub>2</sub> za pomocą młynka Blixer 3. W koniecznych przypadkach przeprowadzono dodatkowe rozdrabnianie próbek

w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$  w ciekłym azocie. Powstałe w ten sposób średnie próbki laboratoryjne poddano analizom chemicznym. Oznaczono monomeryczne związki polifenolowe, procyanidyny, kwas elagowy i profil antocyjanów. Najwyższą zawartość większości związków bioaktywnych stwierdzono w owocach genotypów: T-201458-06 i T-201458-17. Najniższy poziom tych składników zawierały owoce klonu T-201436-06.

Po wykonaniu analizy zawartości wybranych monomerycznych związków fenolowych stwierdzono, że najwyższy procentowy udział w analizowanej grupie związków miała (+)-katechina (od 1,7 mg/100 g do 18,4 mg/100 g). Najwyższą zawartością (+)-katechiny charakteryzowały się owoce genotypów: T-201458-01 (18,4 mg/100 g) i T-201458-06 (17,4 mg/100 g). Oprócz (+)-katechiny, w badanych próbach owoców odnotowano również śladowe ilości innych monomerów flawanoli takich jak: (-)-epikatechina, (+)-afzelechina i (-)-epiafzelechina. Zawartość kwasu elagowego w większości prób owoców badanych genotypów truskawki wahała się od 30 do 40 mg/100 g. Trzy genotypy T-201458-06, T-201437-01 i T-201458-17 wyróżniały się wysoką (powyżej 50 mg/100 g) zawartością tego składnika w owocach. Najniższą zawartość kwasu elagowego oznaczono w owocach genotypu T-201436-02 (17 mg/100 g). Zawartość procyanidyn w owocach badanych genotypów truskawki wahała się od 53,4 mg/100 g do 259,4 mg/100 g. Średni poziom polimeryzacji oznaczonych procyanidyn wynosił 5,2 DP. Najwięcej oligomerów procyanidyn (powyżej 200 mg/100 g) zawierały owoce genotypów: T-201458-06, T-201458-01, T-201458-17 i T-201407-04. Najniższą zawartość tego składnika stwierdzono w owocach genotypu T-201436-02 (53,4 mg/100 g). Badane genotypy różniły się profilem antocyjanów, jednak zawsze dominującym związkiem był glukozyd-3-pelargonidyny, którego udział procentowy wynosił od 66,7% do 91,1% ogólnej zawartości antocyjanów. Następnym antocyjanem był malonyloglikozyd-3-pelargonidyny, którego zawartość mieściła się w przedziale 1,4% - 25,3%. Pozostałe antocyjany: glukozyd-3-cyjanidyny, rutozyd-3-pelargonidyny i malonyloglukozyd-3-cyjanidyny stanowiły odpowiednio maksymalnie 13,2%; 8,3% i 1,7% ogólnej zawartości antocyjanów. Najwyższą sumaryczną zawartość antocyjanów stwierdzono w owocach pięciu genotypów: T-201488-07 (62 mg/100 g), T-201442-01 i T-201458-06 (47 mg/100 g) oraz T-201437-01 i T-201449-01 (41 mg/100 g). Bardzo niski poziom antocyjanów w owocach, w porównaniu z pozostałymi badanymi genotypami, wynoszący odpowiednio 7 mg/100 g i 9 mg/100 g wykazano w przypadku genotypów T-201436-02 i T-201458-01.

### 3. Potwierdzenie statusu mieszańca dla 20 genotypów z rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowanych ze względu na dużą zawartość polifenoli, antocyjanów, procyanidyn i kwasu elagowego, w oparciu o testy mikrosatelitarne oraz analizę bioinformatyczną uzyskanych wzorów DNA pod kątem oceny stopnia powinowactwa genetycznego wytypowanych genotypów i ich form rodzicielskich.

Celem tematu badawczego było zweryfikowanie statusu mieszańca dla 20 genotypów z rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowanych w latach 2017-2018, w oparciu o dwuletnie wyniki analizy składu chemicznego owoców, potwierdzające dużą zawartość związków polifenolowych i antocyjanów. Badania prowadzono w oparciu o testy mikrosatelitarne oraz analizę bioinformatyczną uzyskanych wzorów DNA pod kątem oceny stopnia powinowactwa genetycznego wytypowanych genotypów i ich form rodzicielskich.

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 0,8% żelu agarozowym oraz w oparciu o pomiar współczynników ekstynkcji próbki przy długości fali 230, 260, 280 i 320 nm. Koncentrację DNA w preparacie oznaczano poprzez porównanie z DNA faga  $\lambda$  o znanej koncentracji po elektroforezie w żelu agarozowym oraz spektrofotometrycznie, przy długości fali 260 nm. Polimorfizm DNA określano w oparciu o wyniki testów SSR, umożliwiających analizę regionów mikrosatelitarnych, w obecności 9 par starterów mikrosatelitarnych: BFACT045, ARSFL009, ARSFL015, COBRA-R, EMFvi003, EMFv003, FAC001, FrH4177, FrH4163, wytypowanych w poprzednich latach trwania badań.

Łącznie przeprowadzono 1674 reakcje amplifikacji. W reakcji amplifikacji z testowanymi parami starterów uzyskano 468 amplikonów, z których 89% było polimorficznych. Długość amplikonów wahała się od 170 do 450 pz. Analizowane genotypy truskawki scharakteryzowano na podstawie 8-18 polimorficznych fragmentów DNA. Status mieszańca potwierdzono dla 19 z 20 testowanych. Określono również procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej, który wynosił od 100% do 18%. Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy matecznej obserwowano na matrycy DNA wydzielonych z genotypów nr: 3, 6 ('Grandarosa' x 'Elsanta') oraz 10, 12 i 15 ('Pink Rosa' x 'Elsanta'), najniższy zaś dla siewek nr 13 i 14 ('Pink Rosa' x 'Elsanta').