

## **Zadanie 70 Indukowanie zmienności genetycznej jabłoni na drodze poliploidyzacji *in vitro* oraz ocena fenotypowa i genetyczna uzyskanych poliploidów w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych**

W roku 2014 badania prowadzono w ramach dwóch tematów badawczych

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

Testowanie na obecność najważniejszych wirusów i fitoplazm roślin donorowych oraz zapoczątkowanie kultur *in vitro* jabłoni i optymalizacja warunków kultury dla poszczególnych genotypów

Otrzymanie sterylnych kultur pędów *in vitro* jabłoni wolnych od patogenów oraz uzyskanie informacji o wymaganiach poszczególnych genotypów co do warunków kultury w celu szybkiego rozmnożenia materiału służącego do dalszych badań nad uzyskaniem poliploidów. W pierwszym etapie testowano drzewa donorowe jabłoni 7 genotypów na obecność wirusa mozaiki jabłoni (*Apple mosaicvirus*, ApMV) i wirusa chlorotycznej plamistości liści jabłoni (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) metodą DAS-ELISA; wirusa jamkowatości pnia jabłoni (*Apple stem pitting virus*, ASPV) i wirusa żłobkowatości pnia jabłoni (*Apple stem grooving virus*, ASGV) metodą RT-PCR oraz fitoplazm metodą PCR. Z powodu porażenia przez wirusy jednej odmiany, do zapoczątkowania kultur *in vitro* wykorzystano 6 odmian ('Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', 'Sander', 'Ariwa', 'Redchief'), których drzewa uznano za wolne od patogenów. Jako eksplantaty inicjalne użyto pąki boczne i szczytowe izolowane z długopędów przechowywanych w chłodni w temperaturze 5°C. Średnia efektywność zapoczątkowania kultur *in vitro* wynosiła 16,4% czystych eksplantatów rozwijających się w rozkrzewione pędy. Najwyższą efektywnością charakteryzowała się odm. 'Sander' (41,7%) a najniższą 'Redchief' (1,4%) i 'Ariwa' (6,1%). Badano wpływ BAP (1; 1,5 i 2 mg l<sup>-1</sup>) oraz dodatku argininy na efektywność namnażania pędów. Najwięcej pędów uzyskano dla odmian 'Free Redstar', 'Gala Must' i 'Redchief' na pożywce zawierającej 2 mg l<sup>-1</sup> BAP z dodatkiem argininy - uzyskiwano ponad 10 pędów potomnych z jednego pędu matecznego w ciągu 5 tygodni. Najniższym współczynnikiem, o połowę niższym niż u ww. odmian, charakteryzowała się 'Pinova'. Dłuższe pędy (powyżej 30 mm), niezbędne do badań nad opracowaniem testów *in vitro* podatności na *Erwinia amylovora*, uzyskano na pożywce zawierającej BAP w stężeniu 1-1,5 mg l<sup>-1</sup>. Natomiast do namnażania pędów w celu zwiększenia współczynnika rozmnażania można okresowo stosować dodatek argininy. Jednak ciągłe stosowanie tego aminokwasu nasilało objawy szklistości.

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

Indukowanie tetraploidów *in vitro* - optymalizacja warunków regeneracji i poliploidyzacji *in vitro* dla poszczególnych genotypów

Celem badań było wytypowanie optymalnych warunków do regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych wykorzystywanych następnie do indukowania poliploidów oraz optymalizacja sposobu traktowania antymitotykami eksplantatów liściowych i pędowych. Badania nad optymalizacją regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych z udziałem trzech odmian ('Free Redstar', 'Gala Must' i 'Sander') wykazały, że regulatory wzrostu BAP oraz TDZ stosowane zarówno w pasażu poprzedzającym jak i w trakcie indukowania regeneracji pędów istotnie wpływały na ten proces. Znacznie wyższą efektywność regeneracji uzyskano dzięki zastosowaniu w pożywce regeneracyjnej TDZ zamiast BAP. Najwięcej eksplantatów liściowych regenerujących pędy – 89% oraz największą liczbę zregenerowanych pędów na eksplantat – 14,2 obserwowano u odm. 'Gala Must'. Z kolei badania nad opracowaniem metody poliploidyzacji (wykorzystano 1 odmianę 'Gala Must') pokazały, że wszystkie antymitotyki w zastosowanych stężeniach (kolchicina – 125 i 250 mg l<sup>-1</sup>, oryzalina i amiprofos metylu - po 5 i 10 mg l<sup>-1</sup> oraz trifluralina -50 i 100 mg l<sup>-1</sup>) ograniczały w mniejszym lub większym stopniu zdolności regeneracyjne zarówno

eksplantatów liściowych jak i pędowych. Spośród badanych antymitotyków zdolności regeneracyjne znacząco obniżyło traktowanie kolchicyną oraz APM, gdy związki te zastosowano w wyższych stężeniach. Obserwowano silniejsze zamieranie eksplantatów pędowych jak i liściowych. Po traktowaniu kolchicyną  $250 \text{ mg l}^{-1}$  oraz APM  $10 \text{ mg l}^{-1}$  przeżyło nieco ponad 60% pędów, podczas gdy w kontroli 100%. Ponadto traktowania te spowodowały istotne zmniejszenie współczynników rozmnażania do 5,1-5,7 z 8 uzyskanego w kontroli. Należy zaznaczyć, że wyraźny efekt fitotoksyczny ujawnił się dopiero 8 tyg. po zakończeniu traktowania tymi antymitotykami. Jednak ich użycie w badanych stężeniach nie prowadziło do silnego zamierania eksplantatów. O ich przydatności do indukowania tetraploidów będzie można wnioskować w 2015 r. po wykonaniu analizy cytometrycznej poziomu ploidalności uzyskanych regenerantów.