

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

Temat badawczy 1

Zapoczątkowanie kultur *in vitro* jabłoni wolnych od wirusów i fitoplazm oraz dalsza optymalizacja mikrorozmnażania

W 2015 roku zapoczątkowano kultury pędów *in vitro* wolne od wirusów i fitoplazm 3 kolejnych odmian: 'Pristina', 'Idared' i 'Lobo'. W sumie używanych jest obecnie 6 odmian do poliploidyzacji i 2 odmiany standardowe do opracowania testów oceny stopnia podatności *in vitro* na *Erwinia amylovora*. Optymalizowano skład pożywki do ukorzenia pędów. Wykazano, że pędy odmian użytych do badań charakteryzują się bardzo niską zdolnością do ukorzenia. Efektywność ukorzenia zwiększono znacząco do 60-80% dla 4 spośród 6 testowanych odmian dzięki zastosowaniu w pożywce kombinacji dwóch auksyn (IBA i IAA) i dodatku putrescyny (50 mg l^{-1}) lub argininy (250 mg l^{-1}).

Temat badawczy 2

Opracowanie efektywnej metody poliploidyzacji *in vitro* jabłoni.

Z udziałem kolejnych 3 odmian opracowywano efektywną metodę regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych, co jest warunkiem do prowadzenia dalszych badań nad poliploidyzacją z wykorzystaniem tego typu eksplantatów. Regulatory wzrostu BAP oraz TDZ stosowane zarówno w pasażu poprzedzającym jak i w trakcie indukowania regeneracji pędów istotnie wpływały na proces morfogenezy. U odmian 'Redchief' i 'Gala Must', o najwyższych zdolnościach regeneracyjnych, niemal 90% liści pochodzących z pędów mnożonych w obecności TDZ a następnie inkubowanych na pożywce regeneracyjnej zawierającej także TDZ wytworzyło po około 14 pędów na eksplantat. Słabszą regeneracją charakteryzowały się liście odm. 'Pristina'. Ponadto optymalizowano metodę traktowania antymitotykami eksplantatów pędowych i liściowych. Wykorzystano pędy 5 odmian. Pędy traktowano antymitotykami poprzez 6-dniową inkubację na pożywce zawierającej kolchicynę (125 i 250 mg l^{-1}), trifluralinę (50 i 100 mg l^{-1}), oryzalinę (5 i 10 mg l^{-1}) lub APM (5 i 10 mg l^{-1}). Poliploidy wykrywano metodą cytometrii przepływowej (FCM). U odmian 'Gala Must' i 'Redchief' zdolności regeneracyjne znacząco obniżyła kolchicyna oraz APM, gdy związki te stosowano w wyższych stężeniach. U odm. 'Sander' działanie fitotoksyczne obserwowano dla kolchicyny użytej w wyższym stężeniu, a u 'Pinova' dla wszystkich związków z wyjątkiem kolchicyny. Tetraploidy uzyskano dla wszystkich odmian, ale tylko gdy stosowano eksplantaty pędowe; najwięcej u 'Free Redstar' (26) i 'Redchief' (27), u pozostałych odmian od 2 do 5. APM okazał się najbardziej skutecznym antymitotykiem. Jego użycie w stężeniu 10 mg l^{-1} skutkowało 12,3% efektywnością poliploidyzacji. W sumie uzyskano 64 tetraploidy.

Temat badawczy 3

Opracowanie metody testowania *in vitro* podatności na *Erwinia amylovora* genotypów jabłoni z wykorzystaniem żywych bakterii

Do badań wykorzystano pędy pozyskiwane z kultur *in vitro* 6 odmian jabłoni o zróżnicowanej podatności na porażenie przez *E. amylovora*: 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Lobo', 'Pinova', 'Redchief' i 'Sander'. Do testów użyto szczep *E. amylovora* 659. Pędy jabłoni wszystkich odmian rosnące na pożywce MS inokulowano bakteriami trzema sposobami: 1. poprzez usunięcie wierzchołka wzrostu skalpelem zanurzonym w zawiesinie bakteryjnej, a następnie aplikowano 3 μl inokulum na zranienie; 2. zawiesinę bakteryjną (5 μl) nanoszono na niezraniony wierzchołek wzrostu; 3. odcięcie wierzchołka wzrostu skalpelem uprzednio zanurzonym w inokulum. Stosowano inokulum o stężeniu bakterii 10^4 i 10^6 jtk/ml. Najsilniej skorelowane wyniki testu *in vitro* ze znaną z warunków naturalnych podatnością badanych genotypów na zarazę ogniową, uzyskano przy zastosowaniu metody inokulacji polegającej na odcięciu wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w zawiesinie bakteryjnej o stężeniu 10^4 jtk/ml.