

## **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 2016 badania prowadzono w ramach czterech tematów badawczych.

### **Temat badawczy 1**

#### Opracowanie metody poliploidyzacji jabłoni *in vitro*

Bazując na opracowanej uprzednio metodzie regeneracji *in vitro* roślin z eksplantatów liściowych dokonano oceny typu regeneracji w zależności od stosowanych regulatorów wzrostu (TDZ lub BAP). Analiza histo-morfologiczna wykazała, że bez względu na stosowane regulatory wzrostu regeneracja bezpośrednia miała charakter embriogenezy somatycznej. Już w ciągu dwóch tygodni w tkankach liści, z komórek epidermalnych oraz miękiszu gąbczastego odróżnicowały się komórki merystematyczne, które dzieląc się tworzyły najpierw agregaty komórek embriogennych, a następnie formowały się zarodki somatyczne w stadium globularnym, które po 4 tygodniach rozwijały się do stadium torpedy. Nie obserwowano połączeń waskularnych tworzących się struktur roślinnych z tkanką macierzystą. Ponadto optymalizowano metodę poliploidyzacji *in vitro* eksplantatów pędowych i liściowych z 6-dniowym traktowaniem antymitotykami: kolchicyną (125, 250), trifluraliną (50 i 100 mg l<sup>-1</sup>), oryzaliną (5 i 10 mg l<sup>-1</sup>) i APM (5 i 10 mg l<sup>-1</sup>). W wyniku poliploidyzacji eksplantatów pędowych dwóch odmian uzyskano 13 tetraploidów u odm. 'Pristina' i 26 u 'Gala Must'. Z wyjątkiem trifluraliny (najbardziej fitotoksycznej) pozostałe antymitotyki indukowały podwajanie liczby chromosomów. Najwięcej tetraploidów uzyskano poprzez traktowanie kolchicyną i APM. Gdy poliploidyzacji poddano eksplantaty liściowe pięciu odmian, tetraploidy uzyskano dla trzech z nich, najwięcej u 'Pinova' - 58, następnie u 'Redchief' - 38 i 'Sander' - 6. Najwyższą efektywność poliploidyzacji uzyskano dla kolchicyny, po jej zastosowaniu uzyskano 82 tetraploidy. Dzięki użyciu APM otrzymano 14 tetraploidów. Najmniej skuteczne okazały się trifluralina i oryzalina. Podsumowując, w ciągu trzech lat badań uzyskano tetraploidy u wszystkich 6 badanych odmian w liczbie wystarczającej do prowadzenia dalszych badań.

### **Temat badawczy 2**

#### Optymalizowanie metody testowania *in vitro* podatności na porażenie przez *Erwinia amylovora* genotypów jabłoni z wykorzystaniem żywych bakterii

Celem doświadczenia realizowanego w 2016 r. było sprawdzenie, czy podatność na porażenie przez *E. amylovora* dwóch kolejnych odmian oceniana w teście *in vitro* była także odzwierciedleniem ich podatności określonej *in vivo*. W doświadczeniu wykorzystano 8 odmian jabłoni o zróżnicowanej podatności na zarazę ogniową: 6 odmian, dla których uzyskano tetraploidy: 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', 'Pristina', 'Redchief' i 'Sander' oraz dwie odmiany standardowe 'Lobo' i 'Idared'. Po przeanalizowaniu danych testów *in vitro* przeprowadzonych w 2015 r. i 2016 r. wykazano, iż wyniki oceny podatności badanych genotypów na *E. amylovora* przeprowadzonej *in vitro* są dość dobrze skorelowane z wynikami oceny prowadzonej w warunków naturalnych. W 2016 r. testy *in vitro* wykazały, że najmniej porażone przez *E. amylovora* były pędy odmian 'Free Redstar', 'Pristina' i 'Gala Must', średnio porażone 'Redchief' i 'Sander', a najbardziej 'Idared', 'Pinova' i 'Lobo'. Podobnie w 2015 stopień porażenia był najniższy dla 'Gala Must' i 'Free Redstar', średni dla 'Pinova' nieco wyższy dla 'Redchief' i 'Sander', a najwyższy również dla 'Lobo'. Dla odmian najmniej i najbardziej podatnych wyniki okazały się powtarzalne. W związku z tym wydaje się, że testy *in vitro* są wiarygodną metodą oceny podatności na zarazę ogniową genotypów jabłoni i mogą być wykorzystane do dalszych badań, w których takiej ocenie będą poddawane nowo uzyskane tetraploidy.

### **Temat badawczy 3**

#### Optymalizacja ukorzenia *in vitro* trudno ukorzeniających się odmian oraz wykrytych tetraploidów czterech genotypów a także ich aklimatyzacja w warunkach szklarniowych

Celem doświadczeń było poszukiwanie optymalnych warunków do ukorzenia pędów *in vitro* oraz ich aklimatyzacja. Stosowano system 2-stopniowego ukorzenia z wykorzystaniem pożywki indukcyjnej zawierającej 5  $\mu\text{M}$  IBA lub 1,3-5,2  $\mu\text{M}$  NAA stosowanych oddzielnie lub łącznie z 5  $\mu\text{M}$  IAA i 50  $\mu\text{M}$  putrescyny. Użycie IBA oddzielnie lub łącznie z IAA nie poprawiło ukorzenia pędów trudno ukorzeniających się odmian 'Free Redstar' i 'Pinova' oraz odmian standardowych 'Idared' i 'Lobo'. Znaczący postęp w efektywności ukorzenia pędów 'Free Redstar' i 'Pinova' do 60-85% uzyskano dopiero poprzez aplikację NAA oddzielnie lub łącznie z IAA. Tetraploidy dwóch odmian 'Free Redstar' i 'Pinova' charakteryzowały się niższymi zdolnościami do formowania korzeni w porównaniu do ich diploidalnych odpowiedników, a w przypadku odmian 'Redchief' i 'Gala Must' nie stwierdzono różnic w zdolnościach rizogennych pomiędzy diploidami i tetraploidami. Poprzez łączną aplikację auksyn (IAA z IBA lub NAA) i putrescyny oraz stosowanie dwuetapowego ukorzenia, uzyskano zwiększenie efektywności ukorzenia pędów *in vitro* większości badanych odmian. Jednak indukcja rizogenezy *in vitro* w pędach tetraploidów i odmian standardowych oraz aklimatyzacja roślin do warunków *ex vitro* wymagają dalszej optymalizacji.

### **Temat badawczy 4**

#### Ocena zmian genetycznych/epigenetycznych uzyskanych tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych genotypów wyjściowych.

Celem badań była ocena wielkości i charakteru zmienności nowopowstałych mitotycznych tetraploidów jabłoni w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych - czy ma ona źródło w zmienności epigenetycznej (zmiana stopnia metylacji DNA) czy genetycznej (mutacje DNA, aneuploidalność, delecje). Do badań wykorzystano po 2 genotypy tetraploidalne 4 odmian oraz ich diploidalne genotypy wyjściowe. Analiza markerów AFLP i MSAP potwierdziła tożsamość genetyczną roślin macierzystych pochodzących z sadu oraz roślin matecznych badanych odmian, które utrzymywane są w kulturach *in vitro*. Średni stopień zróżnicowania genetycznego badanych 8 tetraploidów 4 odmian wynosił 2% w porównaniu do diploidalnych roślin wyjściowych w analizie markerów AFLP. Jeden z tetraploidalnych klonów odmiany 'Gala Must' wykazywał ponad 10-cio procentową różnicę w porównaniu z genotypem wyjściowym w analizie markerów AFLP. Analiza MSAP wykazała, że średni stopień metylacji DNA obydwu badanych odmian jest na zbliżonym poziomie: 5,3% dla 'Redchief' i 5,1% dla 'Free Redstar'. W przypadku odmian 'Redchief' i 'Free Redstar' wyższy stopień metylacji wykazywał jeden z dwóch tetraploidalnych klonów każdej z odmian. Przedstawiono wstępny wzór metylacji DNA dla badanych genotypów jabłoni. Ponadto analiza cytometryczna wykazała, że zawartość jądrowego DNA dla wszystkich badanych odmian wyjściowych (2x) wynosiła około 1,65 pg, a dla nowo uzyskanych tetraploidów (4x) od 3,17 pg do 3,22 pg. Niewielkie procentowe różnice w zawartości jądrowego DNA (nie przekraczające 4%) pomiędzy wartościami teoretycznymi dla tetraploidów danej odmiany a ocenionymi cytometrycznie u nowo uzyskanych tetraploidów raczej nie świadczą o znaczących ubytkach DNA, np. wyeliminowaniu pojedynczych chromosomów i powstaniu aneuploidów. Mogą natomiast wskazywać na niewielkie delecje, często zdarzające się na skutek procesu poliploidyzacji.