

## **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 2017 badania prowadzono w ramach 5 tematów badawczych.

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

#### Ocena *in vitro* podatności na porażenie przez *Erwinia amylovora* uzyskanych tetraploidów wytypowanym testem w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych

W bieżącym roku ocenę podatności na zarazę ogniową, najgroźniejszą chorobę bakteryjną jabłoni, której sprawcą jest *E. amylovora*, wykonano poprzez przeprowadzenie jednej serii doświadczenia z udziałem 6 genotypów tetraploidalnych uzyskanych z poliploidyzacji 3 odmian 'Redchief', 'Sander' i 'Pinova' oraz 3 diploidalnych genotypów wyjściowych, a także jednej odmiany referencyjnej - 'Lobo' o wysokiej podatności na zarazę ogniową. Użyto pędów o długości 4-5 cm. Do badań wykorzystano wyizolowany z jabłoni szczep *E. amylovora* nr 659 o średniej wirulencji. Pędy inokulowano bakteriami poprzez usunięcie wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w inokulum ( $10^5$  bakterii w mililitrze), następnie inkubowano je *in vitro* przez 37 dni na standardowej pożywce do namnażania. Istotne różnice w podatności na porażenie przez *E. amylovora* ocenianej według skali od 0 (brak porażenia) do 4 (całkowita nekroza pędu) uzyskano dla dwóch klonów tetraploidalnych otrzymanych dla odmiany 'Redchief'. Tetraploidy te okazały się najmniej podatne na porażenie *E. amylovora* - stopień porażenia wyniósł odpowiednio 0.9 oraz 1,25 i był istotnie niższy w porównaniu do pędów odmiany referencyjnej 'Lobo' (2,13) i diploidalnej odmiany wyjściowej (1,61). U pozostałych odmian klony tetraploidalne nie różniły się istotnie od odmian wyjściowych pod względem podatności na parcha jabłoniowego.

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

#### Optymalizacja ukorzeniania pędów *in vitro* odmian jabłoni oraz uzyskanych tetraploidów a także ich aklimatyzacja w warunkach szklarniowych

W pierwszym etapie badań w ramach dwóch doświadczeń optymalizowano warunki ukorzeniania *in vitro* diploidalnych odmian wyjściowych. W pierwszym doświadczeniu wykazano, że cytokininy: standardowo używana 6-benzyloaminopuryna (BAP) i alternatywna cytokinina - *meta*-Topolina (*mT*), zastosowane w ostatnim cyklu namnożeniowym (poprzedzającym ukorzenianie *in vitro*) znacząco wpłynęły na jakość pędów i następnie wpływały na ich zdolność do ukorzeniania. Standardowe zastosowanie BAP w ostatnim cyklu namnożeniowym w wyższym stężeniu - 4 i 8  $\mu\text{M}$ , jak również *mT* - 4  $\mu\text{M}$ , zwiększało skuteczność ukorzeniania w porównaniu z traktowaniem cytokinina w niższym stężeniu (2  $\mu\text{M}$ ). Najwyższy procent ukorzeniania wynoszący 76% u 'Free Redstar' i 67% u 'Pristine' notowano dla traktowania 4  $\mu\text{M}$  *mT*. Podobnie u 'Gala Must' i 'Redchief', najwyższą efektywność ukorzeniania od 80% do 90% uzyskano dla pędów mnożonych w obecności 4 i 8  $\mu\text{M}$  BAP lub 4  $\mu\text{M}$  *mT*. Natomiast zastąpienie standardowo stosowanej BAP w pożywce w ostatnim cyklu namnożeniowym jej pochodną *mT* pozytywnie wpłynęło na zdolności aklimatyzacyjne roślin. U trzech spośród czterech badanych odmian diploidalnych najwięcej pędów zaaklimatyzowało się, gdy w pożywce do namnażania stosowano *mT*. W drugim doświadczeniu wykazano, że temperatura (21°C i 26°C) i 16-godzinny fotoperiod lub ciemność podczas siedmiodniowej fazy indukcji rizogenezy znacząco wpłynęły na wydajność ukorzeniania pędów odmian o niskich zdolnościach do formowania korzeni - 'Free Redstar' i 'Pinova'. Pożywka indukcyjna – MS o zmniejszonej zawartości azotu zawierała 2,5  $\mu\text{M}$  IBA + 5  $\mu\text{M}$  IAA + 50  $\mu\text{M}$  putrescyny. Po 7 dniach pędy przenoszono z pożywki indukcyjnej na pożywkę bez auksyn i putrescyny, sprzyjającą wyrastaniu korzeni. Obserwacje ukorzeniania *in vitro* przeprowadzono po 3 tyg. a następnie rośliny aklimatyzowano *ex vitro* przez 6 tyg. Po 7-dniowej indukcji rizogenezy w ciemności istotny wzrost efektywności ukorzeniania do 77,5% obserwowano u 'Pinova', podczas gdy prowadzenia indukcji w świetle skutkowało ukorzeniem 48,3% pędów. U 'Free Redstar' procent ukorzenionych pędów - 48% - był najwyższy w ciemności i w wyższej temperaturze 26°C. Światło całkowicie hamowało tworzenie korzeni u tej odmiany.

W drugim etapie badań wykazano, że mikrosadzonki tetraploidów charakteryzują się słabszymi zdolnościami do ukorzeniania *in vitro* i aklimatyzacji w porównaniu do ich diploidalnych

odpowiedników. Użycie w ostatnim cyklu namnożeńiowym 4  $\mu$ M *mT* wpłynęło bardzo korzystnie na zdolności korzeniotwórcze pędów niemal wszystkich genotypów zarówno diploidalnych jak i tetraploidalnych. Najsilniejszy pozytywny wpływ *mT* uzyskano dla 'Pristine' i 'Sander', u których użycie tej cytokininy podczas etapu namnażania wyraźnie poprawiało efektywność ukorzeniania i warunkowało uzyskanie zaaklimatyzowanych aktywnie rosnących roślin. U odmian 'Pinova' i 'Sander' rośliny tetraploidalne wprawdzie aklimatyzowały się w zadowalającym procencie lecz większość z nich nie kontynuowała wzrostu i wchodziła w spoczynek.

### **Temat badawczy 3**

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

Celem badań była ocena wielkości i charakteru zmienności kolejnych nowopowstałych tetraploidów jabłoni w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych. Określano, czy zmienność ma źródło w zmienności epigenetycznej (zmiana stopnia metylacji DNA) czy genetycznej (mutacje DNA, aneuploidalność, delecje). W roku 2017 kontynuowano analizy AFLP oraz analizy MSAP wybranych tetraploidów w celu wykrycia ewentualnych zmian genetycznych oraz zmian w stopniu metylacji DNA. Do badań wykorzystano po 2 genotypy tetraploidalne 4 odmian: 'Pinova', 'Gala Must', 'Redchief' oraz 'Free Redstar' oraz ich genotypy wyjściowe. W sumie analizowano materiał genetyczny pozyskany z 8 tetraploidów i 4 diploidalnych genotypów wyjściowych.

Całkowita liczba produktów amplifikacji uzyskanych w obecności 5 par starterów AFLP wynosiła 769, z czego jedynie 91 było produktami polimorficznymi, co stanowiło 12%. Liczba fragmentów generowanych przy użyciu jednej pary starterów wahała się od 127 dla pary Pst-AA/Mse-AC do maksymalnie 177 dla pary Pst-AT/Mse-AT. Rozmiary uzyskanych prążków wynosiły od 100 do 700 pz. Tetraploidy odmiany 'Redchief' charakteryzowały się najbardziej zróżnicowanym stopniem polimorfizmu w porównaniu do genotypów wyjściowych - ponad 10% zróżnicowaniem genetycznym w porównaniu do roślin macierzystych. Najmniejszym stopniem polimorfizmu charakteryzowały się badane tetraploidy odmiany 'Pinova': klon 3 – 1,1% polimorfizmu oraz klon 6L – 3,4% polimorfizmu w porównaniu do diploidalnych roślin macierzystych.

Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wielkością genomów tetraploidów uzyskanych w obrębie poszczególnych odmian. Różnica wielkości genomów pomiędzy wartością teoretyczną wynoszącą od 2,90 do 2,96 pg 2C DNA a wartościami uzyskanymi z pomiarów cytometrycznych (2,80-2,86 pg) wynosiła od 1,4% do 4,4%. Wskazuje to, że nowo uzyskane poliploidy jabłoni są pełnymi tetraploidami.

### **Temat badawczy 4**

#### Ocena morfologiczna oraz parametrów fizjologicznych wytypowanych tetraploidów

Do badań użyto po 2 lub 3 genotypy tetraploidalne 4 odmian - 'Free Redstar' (FR), 'Gala Must' (GM), 'Redchief' (RC) i 'Pinova' (Pn) oraz ich genotypy wyjściowe. Największe różnice pomiędzy diploidami a tetraploidami notowano przy ocenie cech morfologicznych. W porównaniu do odmian wyjściowych tetraploidy były istotnie niższe i miały znacznie mniej węzłów. W przypadku średnicy pędu, istotnie cieńsze pędy w porównaniu do diploidów obserwowano tylko dla dwóch tetraploidalnych klonów: FR 4x-3pd oraz RC 4x-13pd. Liście tetraploidów były z reguły mniejsze niż diploidów, przy czym u dwóch odmian GM i RC, różnice pomiędzy diplo- i tetraploidami były istotne. Z kolei zawartość chlorofilu w liściach była istotnie wyższa dla tetraploidów trzech odmian - FR, Pn i RC, w porównaniu do diploidów. Liście tetraploidów różniły się także kształtem – były bardziej okrągłe, o czym świadczą obserwowany u nich istotnie wyższy stosunek szerokości do długości w porównaniu do notowanego u diploidalnych odmian wyjściowych. Pomiar wymiany gazowej i fluorescencji wykonano dla tetraploidów 3 odmian. W obrębie każdej odmiany, obserwowano głównie klony tetraploidalne charakteryzujące się istotnie niższym natężeniem fotosyntezy i znacznie niższą maksymalną wydajnością kwantową PSII w porównaniu do diploidów lub wartości te były porównywalne u roślin diplo- i tetraploidalnych. Istotnie wyższą zarówno aktywność fotosyntetyczną jak i natężenie transpiracji notowano tylko u jednego tetraploidalnego klonu - RC 4x-13pd.

### **Temat badawczy 5**

#### Ocena podatności uzyskanych poliploidów na porażenie przez *Venturia inaequalis* w warunkach szklarniowych

Podatność na porażenie przez *Venturia inaequalis* (sprawca parcha jabłoniowego) oceniano w doświadczeniu szklarniowym prowadzonym na uzyskanych 5-6 miesięcznych i 1-letnich tetraploidach jabłoni. Do badań użyto po 2 lub 3 genotypy tetraploidalne 4 odmian - 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Redchief' i 'Pinova' oraz ich genotypy wyjściowe. Rośliny inokulowano zawiesiną zarodników *Venturia inaequalis* o koncentracji ok.  $10^5$  zarodników/ml, uzyskaną w wyniku zmywania zarodników z silnie porażonych liści jabłoni pobranych z sadu. Wyniki przeprowadzonej w warunkach szklarniowych oceny podatności na parcha diploidalnych odmian wyjściowych, były z reguły zgodne z oceną prowadzoną w warunkach polowych (według danych literaturowych). Badanym odmianom można przyporządkować następującą podatność na parcha: małą - 'Pinova', 'Free Redstar' i 'Pristine', średnią - 'Redchief' i dużą - 'GalaMust'. Dla nowej odmiany 'Sander' test szklarniowy (brak porażenia) nie był zbieżny z oceną polową (średnia podatność). Z kolei tetraploidy odmian o dużej i średniej podatności na parcha ('Redchief', 'Gala Must') charakteryzowały się podobną podatnością na patogena jak odmiany macierzyste. Natomiast w przypadku odmian o małej podatności, tetraploidy 'Free Redstar' nie były w ogóle porażone (podczas gdy odmiana wyjściowa w niewielkim stopniu), a tetraploidy 'Pinova' - w bardzo małym stopniu - podobnie jak odmiana wyjściowa. W przypadku tetraploidów odmiany 'Sander' jeden z tetraploidów nie przejawiał oznak porażenia, natomiast dwa inne były silnie porażone.

Można przypuszczać, że na skutek poliploidyzacji pojawiły się tetraploidy wykazujące mniejszy stopień podatności na porażenie zarazą ogniową lub parchem jabłoniowym. Wyniki te wymagają weryfikacji w kolejnych latach badań.

#### Prezentacja i publikacja wyników uzyskanych w ramach zadania nr 70 w roku 2016 oraz 2017:

- 1) Podwyszyńska M., Markiewicz M. 2017. Phenotypic and genetic evaluation of apple neotetraploids obtained by *in vitro* method. Materiały konferencyjne: Fourth International Horticulture Research Conference. 16-20th July 2017, East Malling, United Kingdom, #HortRes17, P3-11, str. 94  
*Prezentacja posterowa została nagrodzona za najbardziej interesujące wyniki, do których zastosowanie najnowszej generacji sekwenatora byłoby najbardziej przydatne; nagrodę w postaci sekwenatora MinION ufundowała firma Oxford Nanopore Technologies z Wielkiej Brytanii (#HortRes17) - Poster*
- 2) Markiewicz M., Podwyszyńska M. 2017. Ocena zmian genetycznych/ epigenetycznych uzyskanych tetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych genotypów wyjściowych. Materiały konferencyjne. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa (30-Lecie PTNO) „Ziemia – Roślina – Człowiek”, 20-21 września 2017, Kraków, str. 107 - **Poster**
- 3) Podwyszyńska M., Sowik I., Machlańska A., Kruczyńska D., Dyki B., 2017. *In vitro* tetraploid induction of *Malus x domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. Sci. Hort. 226: 379-388 - **Publikacja oryginalna**
- 4) Podwyszyńska, M., Cieślińska, M., 2018. *In vitro* shoot rooting optimization of apple scion cultivars and rooting ability evaluation of their neotetraploids. Acta. Sci. Pol., Hortorum Cultus 17 (1) (w druku) (w wersji elektronicznej załączono pierwszą stronę publikacji) - **Publikacja oryginalna**

# Phenotypic and genetic evaluation of apple neotetraploids obtained by *in vitro* method

Małgorzata Podwyszyńska and Monika Markiewicz

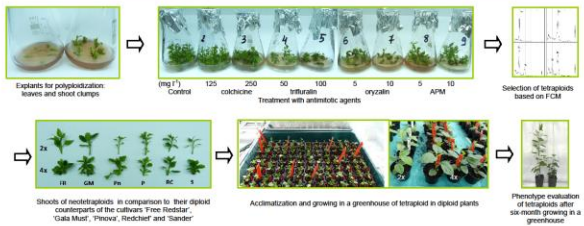
Research Institute of Horticulture, Department of Applied Biology, Skierniewice, Poland

## INTRODUCTION



Apple (*Malus x domestica* Borkh.) is the most important fruit species cultivated in Poland. In search of genotypes with new valuable traits, extensive breeding works have been carried out at the Institute of Horticulture in Skierniewice, Poland. One of the methods applied was the induction of variation via mitotic polyploidisation, which in addition to doubling the number of chromosomes, can also cause functional and/or structural changes in DNA such as point mutations, deletions, duplications, or epigenetic changes. The aim of the study is evaluation of newly obtained tetraploids for their suitability for further breeding.

## MATERIALS AND METHODS

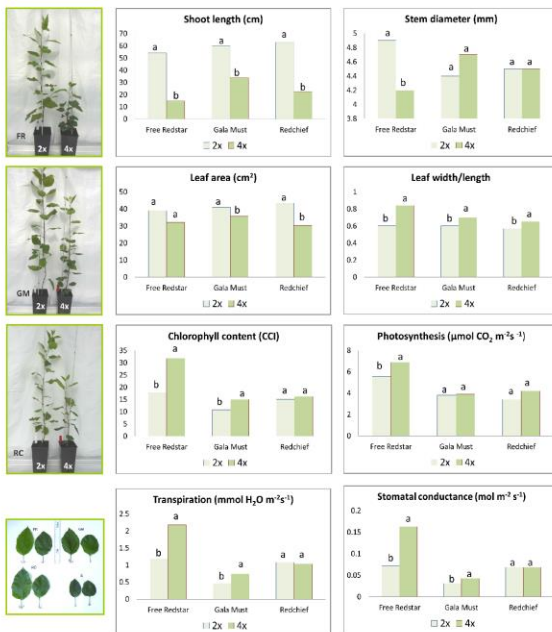


Tetraploids were induced *in vitro* using shoot cultures and one of the antimetabolic agents: colchicine, trifluralin, oryzalin or amiprofos-methyl (APM). Microcuttings of selected tetraploids and their diploid counterparts were rooted *in vitro* and then planted *ex vitro*. Phenotypic observations were performed after six months growing in a greenhouse. In this report, we wish to present results obtained for three cultivars: 'Free Redstar', 'Gala Must' and 'Redchief'.

We also assessed the range and nature of changes in newly obtained apple tetraploids in relation to their diploid donor genotypes (standards) - whether these changes are due to epigenetic or genetic variation. For each cultivar studied, two tetraploid genotypes (tetraploid clones) were used and compared with diploid standard. Plant samples were collected from *in vitro* shoot cultures. In order to evaluate genetic changes in tetraploid plants, the AFLP analysis (amplified fragment length polymorphism) was performed using the 5 pairs of primers that differentiate tested cultivars: three cultivars were analysed. To evaluated epigenetic changes resulting from DNA methylation, the MSAP analysis (methylation-sensitive amplification polymorphism) was performed using 8 pairs of primers according with Xiong et al. (1999), Peraza-Echeverria et al. (2001) and Fulneček i Kovařík (2014). The analysis was done for 'Free Redstar' and 'Redchief'. Nuclear DNA content was examined by flow cytometry for all of the genotypes.

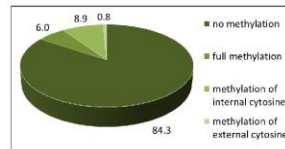
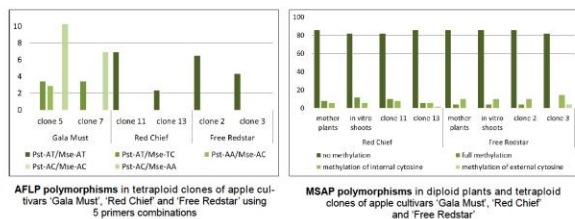
## RESULTS

### Phenotypic evaluation



- Compared to diploids, the newly obtained tetraploids had shoots shorter by 30-60%, stem diameter similar or smaller by 20% and leaf area slightly smaller. Besides, leaf blades were rounder (shorter and wider) in tetraploids.
- Chlorophyll content was higher in tetraploids of 'Free Redstar' and 'Gala Must', by approximately 40% and 20%, respectively.
- Transpiration and stomatal conductance were considerably increased in tetraploids compared to diploids in two of three cultivars tested.
- Photosynthetic activity was higher in tetraploids of 'Free Redstar'.

### Genetic evaluation



Polymorphism pattern in cytosine methylation of DNA in apple

- Analysis of AFLP markers showed that the degree of genetic diversity of the six tetraploid genotypes tested was on average 2% compared to the standards. The exception was one of the tetraploid obtained for the 'Gala Must', which was more than 10% different compared to the standard.
- The MSAP analysis revealed that the average DNA methylation level in both cultivars tested was similar: 5.3% for 'Redchief' and 5.1% for 'Free Redstar'. One tetraploid genotype of 'Redchief' and one tetraploid genotype of 'Free Redstar' showed higher degree of methylation than their diploid counterparts.
- Minimal differences in nuclear DNA contents (not exceeding 4%) between the theoretical values for tetraploids of a given cultivar and cytometrically evaluated in newly obtained tetraploids did not indicate significant DNA losses, such as the elimination of single chromosomes. Slight differences may indicate minor deletions often occurring as a result of the polyploidisation process.

## CONCLUSIONS

- Tetraploids differ significantly from diploids in terms of morphological and physiological features.
- Genetic variation between tetraploids derived from the same diploid genotype, confirmed by AFLP analysis, may result from structural changes in DNA.
- Some of the phenotypic changes observed in tetraploids may be due to the varying degree of DNA methylation.
- The neotetraploids obtained are currently being evaluated for diseases' resistance, and in the following years their suitability for further breeding will be assessed.

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

Monika Markiewicz, Małgorzata Podwyżyska

Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice; e-mail: monika.markiewicz@inhort.pl

### Wstęp

Jabłoń jest jednym z najważniejszych gatunków sadowniczych uprawianym w naszym kraju na dużą skalę. W poszukiwaniu genotypów o nowych, wartościowych cechach użytkowych, w Instytucie Ogrodnictwa prowadzone są szeroko zakrojone prace hodowlane. Jedną z metod uzyskania zmienności jest uzyskiwanie mitotycznych poliploidów. Mimo, że proces ten nie wprowadza nowych genów, to powoduje poważne zmiany funkcjonalne i/lub strukturalne DNA (mutacje punktowe, delecje, duplikacje).

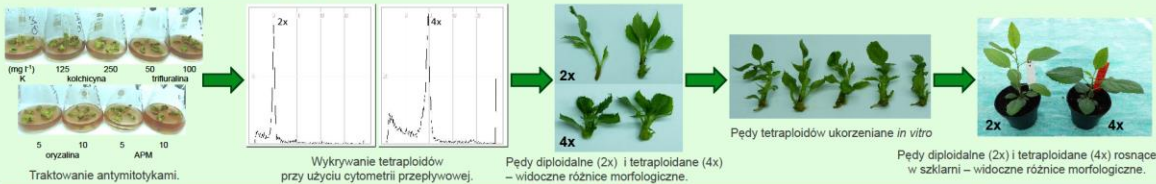


### Cel badań

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.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły po dwa genotypy tetraploidalne uzyskane dla czterech odmian diploidalnych: 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova' i 'Red Chief'. Tetraploidy indukowano w kulturach *in vitro* poprzez traktowanie pędów kolchicyną, trifluraliną, oryzaliną lub amiprofossem metylowym (APM). Uzyskane tetraploidy były ukorzeniane *in vitro* oraz aklimatyzowane. Próbkę roślin do analiz pobierano zarówno z roślin diploidalnych (standardów) rosnących w sadzie oraz w mateczniku *in vitro*, a także z roślin tetraploidalnych. W pierwszym etapie badań wykonano analizę różnicującą odmiany wyjściowe metodą AFLP z wykorzystaniem 10 par primerów, a w celu oceny zmian genetycznych u tetraploidów, przeprowadzono analizę AFLP z wykorzystaniem 5 par primerów oraz MSAP z wykorzystaniem 8 par primerów. Oceniono także zawartość jądrowego DNA u nowopowstałych tetraploidów przy pomocy cytometrii przepływowej.



### Wyniki

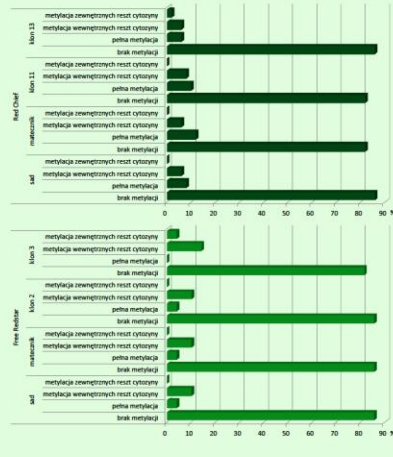
Analiza markerów AFLP wykazała, że stopień różnicowania genetycznego badanych odmian diploidalnych wynosił 20,1%, natomiast pomiędzy badanymi tetraploidami wynosił średnio 2% w porównaniu do standardów. Podczas analiz AFLP genotypów tetraploidalnych uzyskano 749 produktów AFLP, z czego jedynie 17 było fragmentami polimorficznymi. Liczba fragmentów generowanych przy użyciu jednej pary starterów wahała się od 124 dla pary Pst-AA/Mse-AC do maksymalnie 176 dla pary Pst-AT/Mse-AT. Wielkości uzyskanych prążków wynosiły od 100 do 700pz.

Analiza MSAP wykazała, że średni stopień metylacji wynosił 5,3% dla odmiany 'Red Chief' i 5,1% dla odmiany 'Free Redstar'. W sumie w dwóch badanych odmian jabłoni brak metylacji wykazano dla 84,3% produktów, pełną metylację dla 6% amplifikowanego DNA. Zewnętrzne reszty cytozyny metylowane były średnio u 0,8% DNA, natomiast wewnętrzne reszty cytozyny metylowane były u 8,9% amplifikowanego DNA.

Zawartość jądrowego DNA mierzona cytometrycznie u wszystkich badanych odmian wyjściowych (2x) wynosiła około 1,65 pg, a dla nowo uzyskanych tetraploidów (4x) od 3,17 pg u tetraploida 'Redchief' nr 11 do 3,22 pg u tetraploida 'Free Redstar' nr 3. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wielkością genomów tetraploidów uzyskanych w obrębie danych odmian. Różnica wielkości genomów pomiędzy wartością teoretyczną wynoszącą około 3,30 pg, a wartościami uzyskanymi z pomiarów cytometrycznych wynosiła od 2,4% do 3,9%. Te niewielkie procentowe różnice w zawartości jądrowego DNA pomiędzy wartościami teoretycznymi dla tetraploidów danej odmiany raczej nie świadczą o znaczących zmianach na poziomie DNA, np. wyeliminowanie pojedynczych chromosomów, czy ich fragmentów. Takie nieznaczne różnice mogą sugerować niewielkie delecje często zachodzące podczas poliploidyzacji.

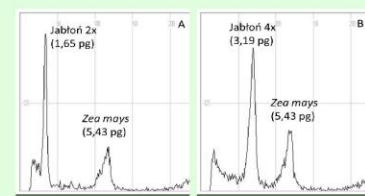
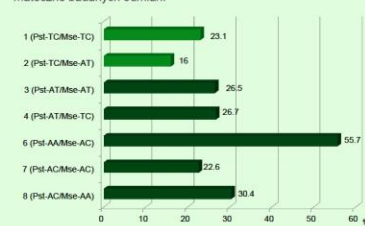


Wykres. Ocena zmian genetycznych tetraploidów w odniesieniu do genotypów wyjściowych metodą AFLP.



Wykres. Ocena rodzaju metylacji roślin wyjściowych diploidalnych oraz tetraploidów dla odmian 'Red Chief' i 'Free Redstar' metodą MSAP.

Wykres. Analiza markerów AFLP różnicujących diploidalne rośliny mateczne badanych odmian.



Rys. Analiza zawartości jądrowego DNA. Standard wewnętrzny: kukurydza CE 777 (2C=2,54 pg).



## Research paper

**In vitro tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants**Małgorzata Podwyszyńska<sup>a</sup>, Iwona Sowik, Aleksandra Machlańska, Dorota Kruczyńska, Barbara Dyki<sup>a</sup> Research Institute of Horticulture, Koszycy 3 Maja, 96-100 Skierniewice, Poland

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Apple  
Chromosome doubling  
Colchicine  
Oryzalin  
APM  
Trifluralin

## ABSTRACT

Triploids and tetraploids of *Malus × domestica* Borkh. are widely used in breeding programmes because they are characterised by lush growth, larger organs and greater resistance to biotic and abiotic stress. The aim of this study was to develop an *in vitro* method of apple polyploidisation using leaf and shoot explants of six cultivars. At first, the procedure of efficient *in vitro* shoot regeneration from leaves was optimised. The leaf regeneration capacity was generally increased by preculture of donor shoots with 4.5 µM thidiazuron (TDZ) compared to a standard preculture in the presence of 4.5 µM benzyladenine (BA). Therefore, for polyploidisation, the leaf explants were collected from four-week shoot cultures that were pretreated with TDZ and the shoot explants derived from standard four-week multiplication subculture. The explants were incubated for six days in darkness on induction medium containing 2.5 µM 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 4.5 µM TDZ or 18 µM BA (leaves) or and 0.5 µM indole-3-butyric acid (IBA) and 4.5 µM BA (shoots) and one antimetabolic agent: colchicine, trifluralin, oryzalin or amiprofos methyl (APM). Subsequently, the explants were cultured for four weeks in darkness on the medium without antimetabolic agents and then subcultured on multiplication medium containing BA over a 16-h photoperiod. From leaf explants, 58, 38 and 6 tetraploids were obtained for three out of six cultivars, 'Pinova', 'Redchief' and 'Sander', respectively. For leaf explants, the highest polyploidisation efficiency, approximately 20%, was recorded for colchicine at 125 and 250 mg l<sup>-1</sup>. For shoot explants, tetraploids were detected for all the cultivars with the higher tetraploid numbers – 13, 26 and 27, for Co-op 32, 'Free Redstar' and 'Redchief', respectively – and a few tetraploids were obtained for other genotypes ('Gala Must', 'Sander' and 'Pinova'). For shoot explants, treatment with 10 mg l<sup>-1</sup> APM resulted in the highest polyploidisation efficiency of 9.8%. Additionally, mixploids were detected three times more than tetraploids when shoots were used for polyploidisation, compared to the sporadic occurrence of mixploids when leaf explants were used.

## 1. Introduction

One of the important sources of variability is the process of polyploidisation. Polyploids are the genotypes that contain more than two sets of chromosomes. They are widely used in breeding programmes for crops because they result in lush growth, larger flowers and fruits, a smaller number of flowers per inflorescence, sometimes shorter and more compact shoot habit or greater resistance to biotic or abiotic stress (Chen, 2007; Dhooche et al., 2011; Mason, 2016).

Polyploidisation has been used to breed crops for decades (Mason, 2016). It is well documented that polyploidisation leads to novel phenotypes through several mechanisms; for example, alterations in dose-regulated gene expression and rapid genetic and epigenetic changes (Parisod et al., 2010; Mason, 2016). Recently, several *in vitro* methods

of mitotic chromosome doubling have been developed for plants such as *Pyrus communis* (Sun et al., 2011), *Actinidia* sp. (Wu et al., 2011), *Humulus lupulus* (Trojak-Goluch et al., 2013), *Hemerocallis* (Podwyszyńska et al., 2015), raphanobrassica (Niimi et al., 2015) and *Populus* (Xu et al., 2016).

Apple species and cultivars differ in the number of chromosome sets. The majority of the apple cultivars are diploids (2x = 34), but there are some triploids (3x = 51) and a few tetraploids (4x = 68) (Korban et al., 2009; Considine et al., 2012; Podwyszyńska et al., 2016). Triploid and tetraploid apple genotypes are generally characterized by their large fruits and often display other phenotypes that are valuable to both growers and consumers (Janick et al., 1996; Sedysheva and Gorbacheva, 2013; Podwyszyńska et al., 2016). The mentioned above authors estimated that approximately 10% of the commonly grown

\* Corresponding author.

E-mail address: [malgorzata.podwyszynska@ihort.pl](mailto:malgorzata.podwyszynska@ihort.pl) (M. Podwyszyńska).<https://doi.org/10.1016/j.scihorti.2017.08.042>

Received 19 June 2017; Received in revised form 24 August 2017; Accepted 26 August 2017

Available online 18 September 2017

0304-4238/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## ROOTING SHOOTS OF APPLE VARIETIES AND THEIR TETRAPLOIDS OBTAINED BY THE *IN VITRO* TECHNIQUE

Małgorzata Podwyszyńska, Mirosława Cieślińska  
Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
[Małgorzata.Podwyszynska@inhort.pl](mailto:Malgorzata.Podwyszynska@inhort.pl)

**Abstract.** For breeding purposes, the number of neo-tetraploids of apple cultivars have been derived by *in vitro* technique. The first attempts at rooting and acclimatization of tetraploid shoots failed. The aim of the study was to develop an effective method for rooting microcuttings of apple neo-tetraploids. In the first stage of the study, *in vitro* rooting method was optimized for the shoots of diploid donor cultivars. Shoots were rooted on Murashige and Skoog (1962) (MS) medium with a reduced content of nitrogen, in the presence of auxins alone or in combination (indole-3-butyric acid – IBA, 1-naphthaleneacetic acid – NAA and indole-3-acetic acid – IAA) with addition of putrescine, arginine or ornithine. The compounds were applied continuously for 25 days (one-step rooting system) or for seven days with subsequent transplanting shoots onto a medium without these compounds (two-step rooting method). Tetraploid microcuttings of the cultivars ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pinova’ and ‘Redchief’ were evaluated for rooting on the selected medium considered optimal for their diploid counterparts. The shoots of all diploid apple scion cultivars had low rooting capacity. IBA alone poorly stimulated root formation. Significant improvement of rooting to 60-80% was achieved through the application of auxins, 2.5  $\mu\text{M}$  IBA or 1.3  $\mu\text{M}$  NAA combined with 5  $\mu\text{M}$  IAA and 50  $\mu\text{M}$  putrescine in the two-step rooting system with darkness and increased temperature of 26°C during seven-day induction phase. The replacement of benzyladenine (BA) by *meta*-Topolin (*m*-T) in the last multiplication subculture influenced positively shoot acclimatization. Tetraploids had comparable or slightly lower rooting and acclimatization ability compared to their diploid counterparts.

**Key words:** *Malus x domestica*, tetraploids, auxins, *meta*-Topolin, putrescine, arginine, darkness

Acta. Sci. Pol., Hortorum Cultus 17(1) 2018 (w druku)