

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

Celem badań jest uzyskanie tetraploidów o nowych cechach użytkowych, w tym zwiększonej odporności na porażenie przez groźne patogeny jabłoni - *Erwinia amylovora* (sprawcy zarazy ogniowej) oraz *Venturia inaequalis* (sprawcy parcha jabłoniowego). W poprzednich latach badań, dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro*, uzyskano liczne tetraploidy sześciu odmian jabłoni 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', Co-op 32, 'Redchief' i 'Sander'. W roku 2019 celem badań była ocena uzyskanych autotetraploidów po względem cech morfologicznych, parametrów fizjologicznych oraz podatności na ww. patogeny, a także zmian genetycznych. Prace 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.**

Wykorzystano wyizolowany z jabłoni szczep *E. amylovora* nr 659 o średniej wirulencji. Pędy inokulowano bakteriami poprzez usunięcie wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w inokulum ( $10^5$  jtk/ml), następnie inkubowano je przez 6 tyg. na pożywce do namnażania, wykonując cotygodniowe obserwacje stopnia porażenia. Ocenie poddano 31 kolejnych genotypów tetraploidalnych 6 odmian i odmiany referencyjnej 'Lobo' o wysokim stopniu podatności na patogen. U czterech odmian 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova' i 'Redchief' wykryto w sumie 10 klonów tetraploidalnych charakteryzujących się istotnie niższym stopniem porażenia bakteriozą w porównaniu do odmiany macierzystej i referencyjnej.

### **Temat badawczy 2. Ocena efektywności ukorzeniania i aklimatyzacji w warunkach *ex vitro* roślin klonów tetraploidalnych**

Pędy 18 różnych klonów tetraploidalnych sześciu odmian oraz ich diploidalnych genotypów wyjściowych inkubowano przez 6-7 dni na pożywce indukcyjnej z dodatkiem auksyn i putrescyny, po czym sadzono je *ex vitro* w miniszklarenkach; po 6 tyg. wykonywano obserwacje. Mikrosadzonki tetraploidów charakteryzowały się słabszymi zdolnościami do rizogenezy w porównaniu do diploidów. W warunkach *ex vitro* ukorzeniło się 34,8% tetraploidów i 54,3% diploidów. Aktywnie rosnące tetraploidy w liczbie umożliwiającej przeprowadzenie badań nad oceną fenotypową uzyskano dla 11 spośród 18 badanych klonów tetraploidalnych.

### **Temat badawczy 3. Ocena zmian genetycznych/epigenetycznych uzyskanych tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych**

W badaniach wykorzystano neotetraploidy jabłoni 'Free Redstar' wykazujące wysoki stopień odporności na parcha jabłoni (*V. inaequalis*) oraz ich diploidalny genotyp wyjściowy - odmianę względnie odporną na tę chorobę. Badania realizowano w ramach 3 zadań.

W zadaniu 1. przeprowadzono analizę transkryptomów trzech tetraploidalnych genotypów jabłoni 'Free Redstar' metodą cDNA-AFLP w odniesieniu do diploida. Wykonano również sekwencjonowanie fragmentów AFLP ulegających zróżnicowanej ekspresji u tetraploidów i diploida pod wpływem infekcji. Próby do izolacji RNA pobierano przed i po 2 dniach od inokulacji. Transkrypty genów, których ekspresja była zróżnicowana po inokulacji roślin *V. inaequalis* u genotypów tetraploidalnych i diploida zostały wytypowane do reamplifikacji i sekwencjonowania (zsekwencjonowano 30 fragmentów takich genów). Przy pomocy oprogramowania BLAST analizowano stopień podobieństwa reamplifikowanych produktów AFLP do sekwencji genów zebranych w bazie danych NCBI. Wykazano, że spośród genów ulegających nadekspresji u tetraploidalnych roślin infekowanych *V. inaequalis*, 83% genów było homologicznych do genów kodujących znane białka roślinne. Trzy z nich wykazywały podobieństwo do genów kodujących białka zaangażowane w reakcje odpornościowe roślin: czynnik transkrypcyjny RAP2, białko EFR3 oraz hydrolazę ABH. Pozostałe fragmenty cDNA-AFLP wykazywały podobieństwo do genów kodujących białka, które mogą być pośrednio

związane z reakcją roślin na porażenie patogenem; białka regulujące ekspresję genów, białka transportowe oraz białka transdukcji sygnału.

W zadaniu 2. wykonano analizę obecności czterech genów odporności na parcha *Rvi5* (*Vm*), *Rvi6* (*Vf*), *Rvi11* (*Vbj*) oraz *Rvi15* (*Vr*) u trzech tetraploidów 'Free Redstar'. Wyniki badań potwierdziły obecność ww. genów odporności na tę chorobę, zarówno u diploida, jak i u wszystkich tetraploidów. Przy czym u tetraploidów wykryto znacznie większe ilości produktów amplifikacji DNA w porównaniu do diploida dla 3 genów: *Rvi6*, *Rvi11* i *Rvi15*.

W zadaniu 3. przeprowadzono analizę ekspresji dwóch genów odporności *PR2* oraz *Rvi6* podczas infekcji *V. inaequalis* u jednego genotypu tetraploidalnego 'Free Redstar' metodą real-time PCR. W porównaniu do diploida, u tetraploida wykazano znaczne zwiększenie poziomu ekspresji genów odporności: 5-krotne genu *PR2* oraz 2-krotne genu *Rvi6* (w drugim dniu po inokulacji patogenem).

#### **Temat badawczy 4. Ocena morfologiczna oraz parametrów fizjologicznych wytypowanych tetraploidów w odniesieniu do genotypów wyjściowych**

Ocenie poddano rosące w sadzie 1-2-letnie drzewka (własnokorzeniowe oraz zaszczone na podkładce M 9) 28 tetraploidalnych klonów 5 odmian ('Free Redstar', 'Gala Must', 'Redchief', 'Pinova' i 'Sander') oraz ich diploidalnych odmian wyjściowych. Poliploidyżacja jabłoni spowodowała wyraźną zmianę fenotypu szczególnie widoczną u roślin własnokorzeniowych: tetraploidy były znacznie niższe, miały mniejsze liście i w kilku przypadkach niższą aktywność fotosyntetyczną niż diploidy. Tetraploidy jabłoni szczepione na podkładce M9 charakteryzowały się większym wigorem niż własnokorzeniowe - wskazywały na to wyraźnie mniejsze różnice lub brak różnic pomiędzy tetraploidami i diploidami w wysokości pędów, wielkości liści i aktywności fotosyntetycznej. W poprzednim roku u młodych własnokorzeniowych roślin tetraploidalnych obserwowano wyższe niż u diploidów natężenie transpiracji. Natomiast w bieżącym roku u tetraploidów szczepionych na podkładce wykazano porównywalne lub niższe natężenie transpiracji.

#### **Temat badawczy 5. Ocena podatności uzyskanych poliploidów na porażenie przez *Venturia inaequalis* w warunkach szklarniowych.**

Rośliny 28 genotypów tetraploidalnych 6 odmian inokulowano zawiesiną zarodników *V. inaequalis* o koncentracji ok.  $10^5$  zarodników/ml, umieszczono na 48 godzin w warunkach wysokiej wilgotności powietrza, następnie przenoszono do standardowych warunków szklarniowych. Ocena porażenia liści tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych oraz wrażliwej odmiany referencyjnej 'Lobo' przeprowadzona po 4 tyg. od inokulacji przy użyciu 5-stopniowej skali. Wykazano, że tetraploidy odmian o dużej i średniej podatności na parcha ('Redchief' i 'Gala Must'), charakteryzują się z reguły podobną podatnością na patogen, jak odmiany macierzyste. Natomiast u odmian o małej podatności, tetraploidy nie są w ogóle porażone, jak u 'Free Redstar', podczas gdy odmiana wyjściowa ulega porażeniu. U odmiany 'Co-op 32' o wysokim stopniu odporności na parcha zarówno odmiana wyjściowa jak i jej tetraploidy nie były porażane przez grzyb.

#### **Wnioski**

- W porównaniu do tetraploidów własnokorzeniowych, tetraploidy jabłoni szczepione na podkładce M9 odznaczają się większym wigorem - wskazują na to wyraźnie mniejsze różnice lub brak różnic w wysokości pędów, wielkości liści i aktywności fotosyntetycznej pomiędzy tetraploidami i diploidami; u roślin własnokorzeniowych, tetraploidy są znacznie niższe, mają mniejsze liście i w kilku przypadkach niższą aktywność fotosyntetyczną niż diploidy.
- Tetraploidy szczepione na podkładce M9 charakteryzują się porównywalnym lub niższym natężeniem transpiracji. Wskazuje to na bardziej oszczędną gospodarkę wodną tetraploidów w porównaniu do diploidów. Te korzystne zmiany ujawniają się dopiero u tetraploidów szczepionych na podkładkach. Wynika to prawdopodobnie z postępującej stabilizacji genomu po zaburzeniach w jego funkcjonowaniu spowodowanych poliploidyżacją.

- Na skutek poliploidyzacji pojawiły się tetraploidy wykazujące mniejszy stopień podatności na porażenie zarazą ogniową lub parchem jabłoniowym. W wyniku podwojenia liczby chromosomów nastąpiło podwojenie liczby kopii tych genów i nie uległy one mutacji.
- Potwierdzeniem podwyższonej odporności na parcha jabłoni tetraploidów 'Free Redstar' jest znaczne zwiększenie poziomu ekspresji genów odporności *PR2* i *Rvi6* u tetraploidów w porównaniu do diploidów. Analizy molekularne dowodzą, że zwiększona odporność może być także wynikiem podwyższonej u tetraploidów w porównaniu do diploida ekspresji innych genów związanych z reakcjami odpornościowymi: czynnika transkrypcyjnego RAP2, białka EFR3 oraz hydrolazy ABH.

Prezentacja i publikacja wyników uzyskanych w ramach zadania nr 70 w roku 2019:

- 1) Podwyszyńska M., Broniarek-Niemiec A., Wojtania A., Klamkowski K., Marasek-Ciołakowska A., Puławska J. 2019. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni ze szczególnym uwzględnieniem podatności na porażenie przez *Venturia inaequalis* i *Erwinia amylovora*. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 5.02 — 8.02.2019 r.; Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Nr 285, 2019, str. 125-126 (**referat**).
- 2) Podwyszyńska M. 2019. The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids. Streszczenia referatów i posterów z Sympozjum Naukowego ISHS “XV EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics”, 3-7 czerwiec 2019, Praga, Czechy; O35 (**referat**).
- 3) Markiewicz M., Podwyszyńska M. 2019. Ocena stopnia metylacji DNA autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych. 58 Zjazd PTB, Kraków, 1-7 lipca 2019 r. (**poster**).
- 4) Podwyszyńska M., Klamkowski K., Matysiak B., Kruczyńska D., Broniarek A., Markiewicz M. 2019. Ocena parametrów fizjologicznych i morfologicznych autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych, porównanie wzrostu roślin rosnących na własnych korzeniach i okulantów. Materiały konferencyjne, V Zjazd PTNO, 16-18.09.2019 r., Warszawa, str. 123 (**referat**).
- 5) Podwyszyńska M., Sowik I., Puławska J. 2020. In vitro testing of apple tetraploids for resistance to fire blight. Acta Hort. (**publikacja oryginalna przyjęta do druku**), zamieszczono 1. stronę publikacji.

MAŁGORZATA PODWYSZYŃSKA  
AGATA BRONIAREK-NIEMIEC  
AGNIESZKA WOJTANIA  
KRZYSZTOF KLAMKOWSKI  
AGNIESZKA MARASEK-CIOŁAKOWSKA  
JOANNA PUŁAWSKA  
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
e-mail: Malgorzata.Podwyszynska@inhort.pl

## Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni ze szczególnym uwzględnieniem podatności na porażenie przez *Venturia inaequalis* i *Erwinia amylovora* \*

Jednym z ważnych źródeł zmienności dla hodowli, w Polsce niedocenianym, jest proces poliploidyzacji. Poliploidy — genotypy o wielokrotnej liczbie chromosomów są szeroko wykorzystywane w programach hodowlanych wielu roślin użytkowych, gdyż charakteryzują się bujnym wzrostem, większymi rozmiarami organów, np. kwiatów, owoców, mniejszą liczbą kwiatów w kwiatostanie, czasem krótszymi pędami i bardziej zwartym pokrojem, wyższą zawartością chlorofilu, późniejszym kwitnieniem oraz zwiększonymi zdolnościami adaptacyjnymi na stresowe czynniki biotyczne (patogeny i szkodniki) i abiotyczne (np. deficyt wody w podłożu). W naszym kraju jabłoni jest najważniejszym gatunkiem sadowniczym uprawianym na dużą skalę. Wielkim zagrożeniem dla sadów jabłoniowych są choroby grzybowe i bakteryjne. Spośród chorób grzybowych jabłoni duże straty w plonie powoduje parch jabłoni wywołany przez *Venturia inaequalis*. Z kolei najpoważniejszą chorobą bakteryjną jest zaraza ogniowa, powodowana przez *Erwinia amylovora*. Bakteria ta ma status organizmu kwarantannowego w materiale rozmnożeniowym roślin żywicielskich. W związku z brakiem skutecznych środków ochrony przeciwko zarazie ogniowej niezwykle istotnym jest wprowadzenie do produkcji odmian o zmniejszonej podatności na tego patogena. Z kolei regulacje prawne oraz informacje o przełamaniu genetycznie uwarunkowanej odporności na choroby takie jak parch czy mączniak skłaniają do poszukiwania nowych

\* Badania finansowane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej (MRIRW, zad. 70)

metod uzyskiwania odmian jabłoni o bardziej ustabilizowanej odporności a jednocześnie o wysokich walorach produkcyjnych.

W pierwszych latach realizacji badań opracowano metodę poliploidyzacji *in vitro* jabłoni, w wyniku której uzyskano tetraploidy 6 odmian. Należy zaznaczyć, że są to pierwsze tetraploidy jabłoni uzyskane w kraju. Dokonano też wstępnej oceny fenotypowej i genetycznej uzyskanych tetraploidów.

Celem prezentowanego zakresu badań jest ocena wielkości i charakteru zmian fenotypowych jakie pojawiły się u autotetraploidów oraz ocena tych zmian pod względem użytkowym, zwłaszcza odporności na ww. groźne choroby jabłoni.

Do badań wykorzystano tetraploidy 6 odmian: 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', 'Redchief', 'Sander' i 'Co-op 32'. Ich fenotyp oceniano w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych. W przypadku oceny stopnia odporności na choroby, w testach dodatkowo stosowano odmiany referencyjne o dużej wrażliwości na badane choroby 'Idared' i 'Lobo'.

W naszych badaniach, podwojenie liczby chromosomów spowodowało wyraźną zmianę fenotypu. Korelacja pomiędzy zwielokrotnieniem liczby chromosomów a wartościami kilku cech morfologicznych była ujemna. W porównaniu z diploidami, nowo otrzymane autotetraploidy miały krótsze pędy i mniejsze liście o zmienionym kształcie. Jednak zawartość chlorofilu w liściach była znacząco wyższa, także wydajność fotosyntezy i fluorescencja były zwiększone w roślinach autotetraploidalnych.

Podatność na parcha jabłoni oceniano w doświadczeniu szklarniowym prowadzonym na uzyskanych 5–6 miesięcznych i 1-letnich tetraploidach. Rośliny inokulowano zawiesiną zarodników *V. inaequalis* o koncentracji ok.  $10^5$  zarodników/ml, uzyskaną w wyniku zmywania zarodników z silnie porażonych liści jabłoni pobranych z sadu. Po inokulacji rośliny umieszczano na 48 godzin w warunkach sprzyjających infekcji (98–100% wilgotności względnej powietrza i temperaturze 20–25°C). Po tym czasie rośliny przenoszono do standardowych warunków szklarniowych (temperatura 18–25°C). Ocena porażenia liści została przeprowadzona po 4 tyg. od inokulacji przy użyciu 6-stopniowej skali od 0 (brak objawów porażenia) do 5 (75,0% powierzchni liścia zajętej przez grzyb). Wykazano, że spośród diploidalnych odmian wybranych do poliploidyzacji, mniej podatne na porażenie przez *V. inaequalis* okazały się 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova', dla których porażenie według skali bonitacyjnej wyniosło od 2,8 do 3,7. Należy zaznaczyć, że mniejsza podatność na parcha jabłoniowego odmian 'Pinova' i 'Free Redstar' warunkowana jest obecnością genów *Vf* (*Rvi6*), *Vr* (*Rvi15*), *Vbj* (*Rvi11*) i *Vm* (*Rvi 5*). Bardziej podatne okazały się odmiany 'Gala Must' i 'Sander' (stopień porażenia powyżej 4,8). Spośród 25 testowanych tetraploidalnych klonów badanych odmian, wykryto 8 klonów, które okazały się istotnie mniej podatne na parcha w porównaniu do odmian wyjściowych (stopień porażenia pędów wynosił od 0 do 0,8). Obniżoną podatność obserwowano u tetraploidalnych klonów następujących odmian: 'Free Redstar' (wszystkie 4 badane klony), 'Pinova' (2 klony spośród 7), 'Redchief' (1 klon spośród 6) i 'Sander' (1 spośród 6). W przypadku odmiany 'Free Redstar', tetraploidy testowano dwukrotnie w 2017 i 2018 r. i w żadnym z testów nie stwierdzono objawów porażenia w

## The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids

### Author(s):

Malgorzata Podwyszynska, Research Institute of Horticulture, Konstytucji 2 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland; malgorzata.podwyszynska@inhort.pl (presenting author)

Monika Ms. Markiewicz, Research Institute of Horticulture, 96-100 Skierniewice, Poland; monika.markiewicz@inhort.pl (co-author)

Krzysztof Klamkowski, Research Institute of Horticulture, 96-100 Skierniewice, Poland; krzysztof.klamkowski@inhort.pl (co-author)

Agata Broniarek-Niemiec, Research Institute of Horticulture, 96-100 Skierniewice, Poland; agata.broniarek@inhort.pl (co-author)

Agnieszka Wojtania, Research Institute of Horticulture, 96-100 Skierniewice, Poland; agnieszka.wojtania@inhort.pl (co-author)

### Abstract:

One of the important sources of variation is the polyploidization process. Polyploids - genotypes with the multiplied chromosome sets are widely used in breeding programs of many crop plants, because they are characterized by a lush growth and often greater resistance to biotic or abiotic stress factors. The aim of the research is to obtain tetraploids with new functional traits, including increased resistance to infection by dangerous apple pathogens. In the previous studies using the in vitro techniques, numerous tetraploids were obtained for six apple cultivars: 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', Co-op 32, 'Redchief' and 'Sander'. The six-month-old plants of tetraploid clones of all apple cultivars were subjected to evaluation of morphological traits and physiological parameters. Polyploidization caused a marked change in the phenotype. In comparison with diploids, the newly obtained autotetraploids had shorter shoots and smaller leaves of altered shape; the chlorophyll content of the tetraploids was higher. Transpiration rate and stomatal conductivity were generally higher in tetraploids. The photosynthetic activity and maximum PSII quantum yield ( $F_v / F_m$ ) in tetraploids were comparable to those observed in diploids. In addition, several tetraploid genotypes have been found showing a significantly lower degree of infection by *Erwinia amylovora* and *Venturia inaequalis* than the diploid cultivars. Molecular analysis confirmed that the differences within tetraploids of a given cultivar are associated with genetic and epigenetic changes as indicated by the variation in DNA structure and methylation degree, detected using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) analysis. The mean degree of genetic differentiation of the tetraploids tested in the four cultivars analyzed with the AFLP markers was 2.4% compared to the diploid counterparts. The analysis of MSAP was carried out to explain the reasons for the inhibition of the growth of some tetraploids. The tetraploid genotypes of two cultivars characterized by the tendency to early (premature) dormancy (plants with inhibited growth) or plants actively growing, cooled and uncooled were analyzed in relation to their diploid counterparts. Higher DNA methylation levels were exhibited by tetraploid plants entering early dormancy.

Acknowledgements. This work was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development (Biological Progress – Basic Research, task 70/2015).

### Keywords:

*Malus x domestica*, polyploidization, *Erwinia amylovora*, *Venturia inaequalis*, DNA methylation, AFLP

## Ocena stopnia metylacji DNA autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych



Monika Markiewicz, Małgorzata Podwyszyńska  
Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
✉ monika.markiewicz@inhort.pl ☎ 46 83 45 447



### Wstęp i cel badań

Jabłoni jest jednym z najważniejszych gatunków sadowniczych uprawianych w Polsce 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 wytwarzanie mitotycznych poliploidów, które mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych, gdyż charakteryzują się bujnym wzrostem i często większą odpornością na czynniki stresowe biotyczne lub abiotyczne. Mimo, że proces poliploidyzacji nie wprowadza nowych genów, to powoduje poważne zmiany funkcjonalne i/lub strukturalne DNA (mutacje punktowe, delekcje, duplikacje). Dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro* uzyskano liczne tetraploidy dla kilku odmian jabłoni, jednak u wielu tetraploidalnych klonów, szczególnie u odmiany 'Sander' oraz Co-op 32 obserwowano silną tendencję młodych roślin do przedwczesnego wchodzenia w spoczynek, co przejawiało się zahamowaniem wzrostu.

Celem badań była ocena stopnia metylacji DNA u nowopowstałych autotetraploidów jabłoni dwóch odmian w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych oraz wyjaśnienie czy przedwczesne zahamowanie wzrostu roślin może mieć związek z zmiennością epigenetyczną powodowaną zmianą wzoru i stopnia metylacji materiału genetycznego.



### Materiał i metody



Genotypy jabłoni diploidalne oraz tetraploidalne:

- 'Sander' (S 2L 4x, S 6L 4x, S 2x)
- Co-op 32 (P 3pd 4x, P13pd 4x, P 2x)



Próby do analiz:

- rośliny aktywnie rosące: przechłodzone (5°C, 10 tyg.) i niechłodzone,
- rośliny z zahamowanym wzrostem: przechłodzone (5°C, 10 tyg.) i niechłodzone



Analiza MSAP (methylation-sensitive amplification polymorphism)

- trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi (*EcoRI* + *HpaII*; *EcoRI* + *MspI*; *EcoRI* + *HpaII* + *MspI*)
- ligacja adapterów
- reakcje wstępnych i różnicujących PCR z 8 parami starterów wzbogaconych o 2 nukleotydy (wg Xiong i wsp. 1999, Peraza-Echeverria i wsp. 2001)



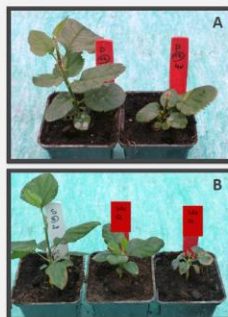
Analiza wyników

(wg Fulneček i Kowalik, 2014)

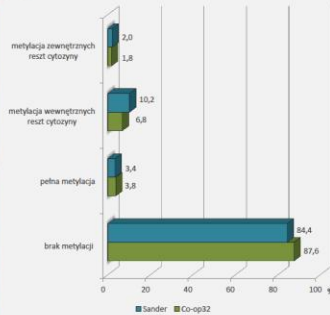
- pełna metylacja – 5'-mCmCGG-3'
- brak metylacji – 5'-CCGG-3'
- metylacja wewnętrznych reszt cytozyny – 5'-CmCGG-3'
- metylacja zewnętrznych reszt cytozyny – 5'-mCCGG-3'

### Wyniki

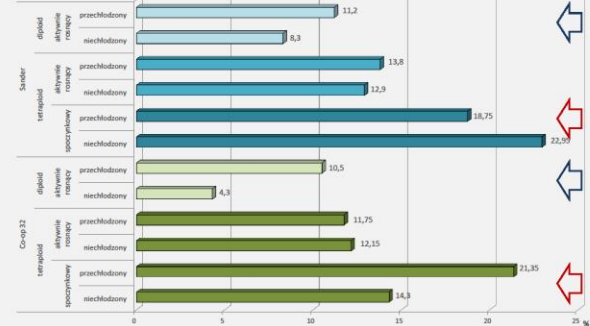
Analiza MSAP wykazała, że średni stopień metylacji wynosił 13,4% dla odmiany Co-op 32 i 15,6% dla odmiany 'Sander'. Określono także wzór rodzaju metylacji dla badanych odmian – średnio 86% DNA nie ulegało metylacji, 3,6% ulegało pełnej metylacji, natomiast 8,5% DNA wykazywało metylację wewnętrznych reszt cytozyny, a 1,9% – zewnętrznych reszt cytozyny.



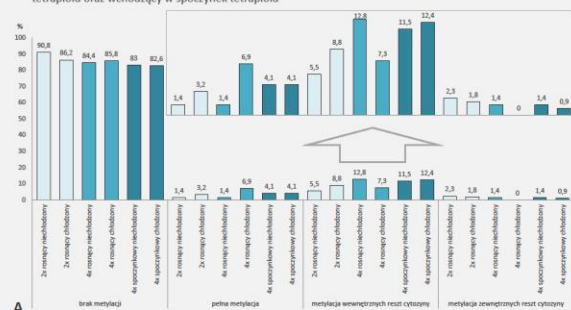
Fot. Tetraploidy odmiany Co-op 32 (A): od lewej - rośliny aktywnie rosące i wchodzący w spoczynek oraz 'Sander' (B): od lewej - aktywnie rosący diploid i tetraploid oraz wchodzący w spoczynek tetraploid



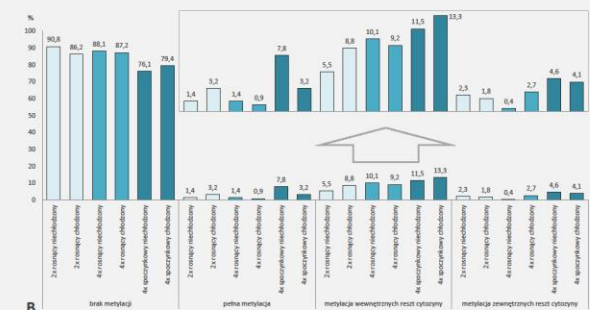
Wykres. Wzór metylacji DNA dla dwóch badanych odmian jabłoni 'Sander' oraz Co-op 32.



Wykres. Średni stopień metylacji roślin wyjściowych diploidalnych oraz tetraploidów dla odmian 'Sander' i Co-op 32.



Wykres. Ocena rodzaju metylacji u roślin diploidalnych i tetraploidalnych odmiany 'Sander': klon 2L: (A) oraz klon 6L (B), aktywnie rosących oraz przedwczesnie wchodzących w okres spoczynku, niechłodzonych oraz chłodzonych.



### Podsumowanie

- ✓ wyższy stopień metylacji wykazano dla roślin tetraploidalnych szybko wchodzących w przedwczesny spoczynek, z zahamowanym wzrostem;
- ✓ aktywnie rosące genotypy diploidalne charakteryzowały się niższym stopniem metylacji DNA niż uzyskane genotypy tetraploidalne;
- ✓ potwierdzono wzór metylacji DNA dla jabłoni: 5'-mCCGG-3' > 5'-CmCGG-3' > 5'-mCmCGG-3' > 5'-mCCGG-3'

Prace finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach zadania nr 70 Badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej.

**Ocena parametrów fizjologicznych i morfologicznych autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych - porównanie wzrostu roślin rosnących na własnych korzeniach i okulantów**

Małgorzata Podwyszyńska<sup>1</sup>, Krzysztof Klamkowski<sup>2</sup>, Bożena Matysiak<sup>1</sup>, Dorota Kruczyńska<sup>3</sup>,  
Agata Broniarek<sup>4</sup>, Monika Markiewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

<sup>2</sup> Zakład Agrotechnologii, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

<sup>3</sup> Zakład Zasobów Genowych Roślin Ogrodniczych, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

<sup>4</sup> Zakład Fitopatologii, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Małgorzata.Podwyszynska@inhort.pl

Jednym z ważnych źródeł zmienności jest proces poliploidyzacji. Poliploidy – genotypy o wielokrotnionej liczbie chromosomów są szeroko wykorzystywane w programach hodowlanych wielu roślin użytkowych, gdyż charakteryzują się bujnym wzrostem i często większą odpornością na czynniki stresowe biotyczne lub abiotyczne. W poprzednich latach badań, dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro*, uzyskano liczne tetraploidy sześciu odmian jabłoni. Celem badań jest uzyskanie tetraploidów o nowych cechach użytkowych, w tym zwiększonej odporności na porażenie przez groźne patogeny jabłoni, m.in. *Venturia inaequalis* (sprawcy parcha jabłoniowego). Ocenie poddano 6-miesięczne oraz 1,5-letnie rośliny tetraploidów rosnących na własnych korzeniach oraz zaszczepionych na podkładce M-9. Poliploidyzacja jabłoni spowodowała wyraźną zmianę fenotypu. W porównaniu z diploidami, nowo otrzymane autotetraploidy miały krótsze pędy oraz liście o zmienionym kształcie i znacznie wyższej zawartości chlorofilu. Natężenie transpiracji i przewodność szparkowa były z reguły wyższe u tetraploidów. Aktywność fotosyntetyczna i maksymalna wydajność kwantowa PSII (Fv/Fm), u tetraploidów własnokorzeniowych były porównywalne, a zaszczepionych na podkładce wyższe w odniesieniu do diploidów. Z kolei wstępna ocena podatności uzyskanych tetraploidów na porażenie przez *V. inaequalis* w warunkach polowych potwierdziła wcześniejsze obserwacje podatności na chorobę wykonywane w teście szklarniowym. Tetraploidy odmian o dużej i średniej podatności na parcha, z reguły charakteryzowały się podobną podatnością na *V. inaequalis* jak odmiana macierzysta, natomiast u odmiany o małej podatności: 'Free Redstar' – badane tetraploidy były porażone w niewielkim stopniu, znacznie niższym niż rośliny diploidalnej odmiany. Obserwowano również wyraźne różnice fenotypowe w obrębie tetraploidów danej odmiany. Są one prawdopodobnie wynikiem zmian genetycznych i epigenetycznych, na co wskazuje zmienność w strukturze DNA i stopniu metylacji, wykryte przy użyciu analizy AFLP i MSAP.



5.

## **In vitro testing of apple tetraploids for resistance to fire blight**

M. Podwyszyńska, I. Sowik, J. Puławska

Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland

### **Abstract**

The most severe bacterial disease of apple tree is the fire blight caused by *Erwinia amylovora*. Due to the lack of effective disease control methods, it is extremely important to introduce into cultivation apple cultivars with reduced susceptibility to this disease. In our previous studies, several neotetraploids for 6 apple cultivars ('Free Redstar', 'Gala Must', Co-op 32, 'Pinova', 'Redchief' and 'Sander') have been obtained using in vitro method. Most of the cultivars used for polyploidisation exhibited high or moderate resistance level to *E. amylovora*. We suppose that due to the resistance gene duplication, some tetraploids with enhanced resistance to *E. amylovora* could be achieved. The aim of the study was to evaluate the level of *E. amylovora* resistance in the apple tetraploids compared to their diploid counterparts using in vitro assay. In the first stage of research, an in vitro method for apple resistance to fire blight assessment was developed. Eight apple cultivars including those used for polyploidisation and the reference cultivars highly susceptible to *E. amylovora* ('Idared' and 'Lobo') were used for experiments. Shoots from in vitro cultures were inoculated with pathogen (isolate 659) inoculum at various concentrations with different inoculation methods. The best correlation of in vitro test with the assessments performed in natural conditions were obtained using the pathogen inoculation on the cut surface of shoot apex with a scalpel immersed in a bacterial inoculum of  $10^4$  cfu mL<sup>-1</sup>. This method was selected for evaluation of resistance level to *E. amylovora* of the neotetraploids compared to their diploid counterparts. Two to five tetraploid clones of four cultivars were tested. The individual tetraploid clones within the cultivar differed in the resistance level. Most of the tetraploid clones showed similar resistance level to their diploid counterparts and some of tetraploids revealed a significantly greater or lower resistance to the pathogen.

**Keywords:** fire blight, *Malus × hybrida*, susceptibility, in vitro assay, inoculation

### **INTRODUCTION**

The most serious bacterial disease of apple tree is fire blight, caused by *Erwinia amylovora* (having the status of a quarantine organism in propagation material) (Nybom et al., 2012). One of the ways to reduce the occurrence of diseases is, inter alia, selection of apple cultivars with lower susceptibility to diseases (Sobiczewski et al., 2015). The legal regulations as well as information about breaking the genetically determined resistance to fire blight tend to search for new methods of obtaining apple varieties with more stable immunity and, at the same time, high production values.

Due to the use of in vitro testing and selection techniques, a number of interesting genotypes were obtained with increased resistance to the diseases caused by e.g. *Phytophthora cactorum* and *Verticillium dahliae* (strawberry and apple), and *Rhizoctonia fragariae* and *Botrytis cinera* (strawberry) (Sowik et al., 2001; 2008; Rai et al., 2011). There have also been several attempts to develop testing methods for *E. amylovora* susceptibility using in vitro shoot cultures of pear and apple genotypes (Duron et al., 1987; Chevreau et al., 1998; Abdollahi et al., 2004; Paprstein et al., 2011; Sedlak et al., 2015).