

## **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 2018 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.**

W poprzednich latach badań, dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro*, uzyskano liczne tetraploidy sześciu odmian jabłoni 'Free Redstar', 'Gala Must', 'Pinova', 'Cop 32 ('Pristine'), 'Redchief' i 'Sander'. 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). Wykorzystano wyizolowany z jabłoni szczep *E. amylovora* nr 659 o średniej wirulencji. Pędy długości 4-5 cm inokulowano bakteriami poprzez usunięcie wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w inokulum ( $10^5$  jtk/ml), następnie pędy inkubowano przez 6 tyg. na pożywce do namnażania, wykonując cotygodniowe obserwacje stopnia porażenia. Doświadczenie wykonano z udziałem 17 kolejnych genotypów tetraploidalnych 6 odmian; do badań włączono także odmianę referencyjną 'Lobo' o wysokim stopniu podatności na patogen. U trzech odmian 'Free Redstar', 'Pinova' i 'Sander' wykryto w sumie 8 klonów tetraploidalnych charakteryzujących się istotnie niższym stopniem porażenia bakteriozą w porównaniu do odmiany macierzystej i referencyjnej 'Lobo'.

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

Porównywano efektywność aklimatyzacji pędów klonów tetraploidalnych w odniesieniu do ich diploidalnych odpowiedników w zależności od metody ukorzenia pędów: 1) *in vitro* oraz 2) *ex vitro*. Metodą *in vitro* ukorzeniano pędy 15 klonów tetraploidalnych 5 odmian. Pędy inkubowano przez 6-7 dni na pożywce indukcyjnej (1 IBA + 1 IAA + putrescyna 13 [mg l<sup>-1</sup>]), następnie 14-21 dni na pożywce bez auksyn, po czym sadzono je *ex vitro* w miniszklarenkach; po 6 tyg. wykonywano obserwacje. W drugiej metodzie pędy sadzono *ex vitro* bezpośrednio po 6-7-dniowej indukcji ukorzenia na pożywce indukcyjnej (j.w.). Wykorzystano 38 klonów tetraploidalnych 6 odmian. W porównaniu do metody ukorzenia *in vitro*, dzięki zastosowaniu bezpośredniego ukorzenia poprzedzonego 6-dniową indukcją rizogenezy *in vitro*, znacznie zwiększono efektywność aklimatyzacji mikrosadzonek jabłoni zarówno diploidów (np. u odm. 'Redchief' z 28,5% do 58%), jak i tetraploidów - średnio z 29% do 45,7%.

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

Zmiany genetyczne oceniano wykorzystując analizę AFLP, do której użyto 5 par starterów. Badano 12 kolejnych genotypów tetraploidalnych 4 odmian. Podjęto także próbę wykrycia mutacji u autotetraploidów metodą sekwencjonowania genomowego DNA. Sekwencjonowanie DNA klonu tetraploidalnego odmiany 'Redchief' (najbardziej zmienionego genetycznie według AFLP) w porównaniu do diploida wykonano, wykorzystując '1D Ligation Sequencing Kit', na sekwenatorze MinION sterowanym za pomocą komputera. Ponadto w celu wykrycia zmian spowodowanych dużymi delecjami/inwersjami czy aneuploidalnością, u kolejnych tetraploidów oceniano wielkość genomu (zawartość jądrowego DNA), wykorzystując analizę cytometrii przepływową. Z kolei zmienność epigenetyczną oceniano wykonując analizę stopnia metylacji z wykorzystaniem markerów MSAP. Analizę tę prowadzono w celu wyjaśnienia przyczyn zahamowania wzrostu niektórych tetraploidów. Analizowano po 2 genotypy tetraploidalne dwóch odmian charakteryzujących się skłonnością do przedwczesnego wchodzenia w spoczynek (rośliny o zahamowanym wzroście, będące w spoczynku i aktywnie rosnące, przed i po chłodzeniu) w odniesieniu do

genotypów wyjściowych. Wykorzystano 8 par starterów MSAP. Wyniki badań potwierdziły, iż proces poliploidyzacji indukuje zmiany genetyczne. Średni stopień zróżnicowania genetycznego badanych 8 tetraploidów 4 odmian analizowany przy użyciu markerów AFLP wynosił 2,4% w porównaniu do diploidalnych roślin wyjściowych. Z kolei wyższy stopień metylacji wykazywały rośliny tetraploidów wchodzące w okres spoczynku. Wykorzystując platformę Oxford Nanopore MinION odczytano sekwencje dwóch bibliotek cDNA przygotowanych dla diploida i tetraploida odmiany 'Redchief'. Jednak uzyskane stosunkowo niskie całkowite liczby odczytów oraz poziom pokrycia sekwencji referencyjnych nie pozwoliły na przeprowadzenie wiarygodnej analizy ewentualnych mutacji w badanym tetraploidzie. Mimo to uzyskane wyniki wskazują na wielki potencjał tej metody – ponad 70% uzyskanych odczytów miało długości z przedziału 5 000-25 000 nt.

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

Ocenie morfologicznej poddano 6-7-miesięczne rośliny 22 kolejnych tetraploidów, a parametry fizjologiczne badano u 12 tetraploidalnych genotypów. Poliploidyzacja jabłoni spowodowała wyraźną zmianę fenotypu. W porównaniu z diploidami, nowo otrzymane autotetraploidy miały krótsze pędy i mniejsze liście o zmienionym kształcie, natomiast zawartość chlorofilu u tetraploidów była wyższa. Natężenie transpiracji i przewodność szparkowa były z reguły wyższe u tetraploidów. Aktywność fotosyntetyczna i maksymalna wydajność kwantowa PSII (Fv/Fm), u tetraploidów były porównywalne do obserwowanych u diploidów.

**Temat badawczy 5.** Ocena podatności uzyskanych poliploidów na porażenie przez *Venturia inaequalis* w warunkach szklarniowych. Rośliny 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. Ocenę 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. Doświadczenie wykonano z udziałem 25 kolejnych genotypów tetraploidalnych 5 odmian. Tetraploidy odmian o dużej i średniej podatności na parcha ('Redchief' i 'Gala Must'), charakteryzowały się podobną podatnością na *V. inaequalis* jak odmiana macierzysta i odmiana referencyjna 'Lobo'. Natomiast u odmian o małej podatności: 'Free Redstar' – badane tetraploidy w ogóle nie były porażone, natomiast u 'Pinova' – połowa badanych tetraploidów była porażona w znikomym stopniu a pozostałe – podobnie jak diploid.

Badania wykazały, że w wyniku poliploidyzacji uzyskano kilka genotypów tetraploidalnych wykazujących znacznie mniejszy stopień porażenia przez *E. amylovora* oraz *V. inaequalis* niż odmiany wyjściowe. Ponadto wszystkie uzyskane tetraploidy w mniejszym lub większym stopniu różniły się morfologicznie od swoich diploidalnych odpowiedników. Zasadnicze różnice morfologiczne (krótsze pędy, zmieniony kształt liści, większe aparaty szparkowe i wyższa zawartość chlorofilu) wynikają z podwojenia liczby chromosomów. Ponadto wykazano, że tetraploidy tej samej odmiany różnią się pomiędzy sobą, np. pod względem podatności na choroby. Różnice w obrębie tetraploidów danej odmiany są prawdopodobnie wynikiem zmian genetycznych i epigenetycznych na co wskazuje zmienność w strukturze DNA i stopniu metylacji, wykryta przy użyciu analizy AFLP i MSAP.

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

- 1) Sowik I., Podwyszyńska M., Puławska J. 2018. In Vitro testing of apple tetraploids for resistance to *Erwinia amylovora*. 30th International Horticultural Congress, 12-16 August, Istanbul, Turkey, S20-P23 - poster

2) Markiewicz M., Podwyszyńska M. 2018. Genetic evaluation of apple neotetraploids cultivar 'Redchief' obtained by in vitro method and preliminary phenotypic observations. 30th International Horticultural Congress, 12-16 August, Istanbul, Turkey, S20 - **referat**



## IN VITRO TESTING OF APPLE TETRAPLOIDS FOR RESISTANCE TO FIRE BLIGHT



**Małgorzata Podwyszyńska, Iwona Sowik, Joanna Puławska**  
 Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland  
 Małgorzata.Podwyszyńska@inhort.pl

### INTRODUCTION

The most severe bacterial disease of apple trees is the fire blight caused by the bacterium *Erwinia amylovora* (a quarantine organism in the host plant propagation material). Due to the lack of effective disease control methods, it is extremely important to introduce apple cultivars with reduced susceptibility to this pathogen. One of the methods of creating new cultivars is production of tetraploids. In our previous studies, several neotetraploids for six apple cultivars have been obtained using *in vitro* method (Podwyszyńska et al. 2017). Most of these parental cultivars used for polyploidisation characterized with the high or moderate resistance level to *E. amylovora*. We supposed that newly obtained tetraploids may show increased disease resistance as a result of doubling the resistance genes.

### AIM

The aim of the study was to evaluate the *E. amylovora* resistance level of the apple tetraploids in relation to their diploid counterparts using *in vitro* assay. In the first stage of the research, a method for *in vitro* testing resistance to fire blight was developed using parental diploid cultivars of known varying resistance levels. Then using the most reliable method, tetraploids were evaluated for the resistance level.

### MATERIAL AND METHODS

#### Stage I: Development of the *in vitro* method of testing apple cultivars for resistance to fire blight

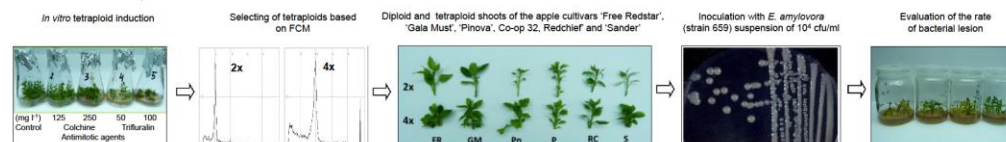
**Plant material.** Shoots (3–4 cm in length) derived from *in vitro* cultures of six parental diploid cultivars of apple (for which tetraploids were obtained) with varying susceptibility to *E. amylovora* were used: the less susceptible 'Free Redstar', Co-op 32 and 'Redchief', moderately susceptible 'Gala Must' and the most susceptible 'Pinova' as well as 'Sander' of the unknown susceptibility. In addition, reference cultivars were used such as moderately susceptible 'Lobo' and highly susceptible 'Idared'.

**Inoculation with pathogen.** The *E. amylovora* (strain 659) suspensions of  $10^4$  or  $10^6$  cfu/ml were prepared for tests. Shoots were inoculated by applying 3 or 5  $\mu$ l of bacterial suspension directly to the undamaged shoot apex or by cutting off the shoot apex with a scalpel previously immersed in the bacterial suspension. After inoculation, the shoots were incubated on standard multiplication MS medium containing BA, IBA and GA<sub>3</sub>, at 21°C and 16/8 h photoperiod.

**Evaluation of the rate of bacterial lesion** (necrosis). The rate of shoot infestation was assessed based on a 5-step scale from 0 (no signs of shoot necrosis) to 4 (totally necrotic shoots and leaves); observations were performed every 7 days from 12<sup>th</sup> to 79<sup>th</sup> day post-inoculation; replications: 60 shoots of each diploid cultivar per each treatment.

#### Stage II: *In vitro* evaluation of tetraploid clones for resistance to fire blight

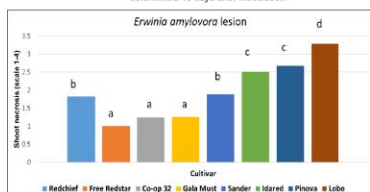
Shoot (3–4 cm in length) of neotetraploid clones obtained in the previous study (Podwyszyńska et al., 2017) were inoculated with *E. amylovora* with the method considered most reliable (developed during the first stage of the study), i.e., pathogen inoculation by removing the shoot apex with a scalpel immersed in a bacterial suspension at the concentration of  $10^4$  cfu/ml; reference cultivars: 'Lobo' and 'Idared'; the rate of shoot necrosis was evaluated every 7 days from 12<sup>th</sup> to 79<sup>th</sup> day post-inoculation; replications: 20–30 shoots of each tetraploid clone.



### RESULTS

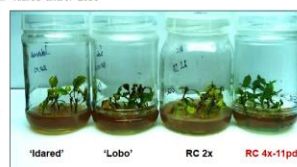
- The most convergent results of *in vitro* resistance tests with the known resistance level of each apple cultivar evaluated *in vivo* (reported by several authors) were obtained using the inoculation method based on the cutting off the shoot apex with a scalpel immersed in a bacterial suspension of  $10^4$  cfu/ml with the observations performed 26–40 days after inoculation. This method was chosen for evaluation tetraploid clones.
- The individual tetraploid clones within the cultivar differed in the resistance level. Some of the tetraploid clones showed similar resistance level to their diploid counterparts and some of tetraploids revealed a significantly greater resistance to fire blight: all the tetraploid clones of 'Redchief' (RC 4x-11pd, -23pd, -26pd and -51L) and tetraploid clone of 'Pinova' (Pn 4x-17L).

Susceptibility to fire blight of apple diploid cultivars tested with the *in vitro* assay determined 40 days after inoculation



Susceptibility to fire blight of the apple tetraploid clones tested in the *in vitro* assay determined with respect to their diploid counterparts and the reference cultivar 'Idared' and/or 'Lobo'

Cultivar, tetraploid clone	Bacterial lesion (shoot necrosis)	Cultivar, tetraploid clone	Bacterial lesion (shoot necrosis)
'Lobo' 2x	2.06 a	'Lobo' 2x	2.08 b
'Gala Must' 2x	1.89 a	'Redchief' (RC) 2x	2.83 a
GM 4x-2pd	2.27 a	RC 4x-11pd	0.99 c
GM 4x-4pd	2.03 a	RC 4x-23pd	0.97 bc
		RC 4x-26	1.53 bc
		RC 4x-51L	1.33 c
'Lobo' 2x	2.13 a	'Lobo' 2x	2.08 a
'Sander' 2x	1.79 a	'Pinova' (Pn) 2x	2.06 a
S 4x-2pd	1.81 a	Pn 4x-7pd	1.83 ab
S 4x-6pd	2.17 a	Pn 4x-17L	1.2 b



Duncan's multiple range test; the means marked with the same letter do not differ at P=0.05  
 Rate of bacterial lesion (necrosis) of the shoots was evaluated according to the scale: 0 - no signs of shoot necrosis, 1 - hypersensitivity reaction, 2 - necrosis of shoots up to 50% of its length, 3 - necrosis of shoots from 51% to 100% of its length, 4 - totally necrotic shoots and leaves

### CONCLUSION

- The results obtained indicate that tetraploids with lower susceptibility to fire blight can be obtained as a result of polyploidisation. However, these results require verification by further testing the selected tetraploids for resistance to fire blight in the greenhouse and field conditions.

Reference: Podwyszyńska, M., Sowik, I., Machlajska, A., Kruczyńska, D., & Dyki, B. (2017). *In vitro* tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. *Scientia Horticulturae*, 226, 379–388.

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