

Zastosowanie poliploidyzacji mitotycznej *in vitro* w indukowaniu zmienności genetycznej oraz możliwości poprawy wybranych cech użytkowych agrestu (*Ribes grossularia* L.) i czereśni (*Prunus avium* L.).

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice

Badania Podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
zadanie 46, okres realizacji 2021 – 2027

Kierownik zadania: Danuta Kucharska danuta.kucharska@inhort.pl

Wykonawcy: Małgorzata Podwyszyńska, Mirosława Cieślińska, Aleksandra Trzewik,
Marek Szymajda, Stanisław Pluta, Monika Marat, Angelika Niewiadomska-Wnuk,
Katarzyna Mynett



Cele/zadania projektu w 2021 r.

1. Badanie roślin matecznych na obecność wirusów, sprawców najczęściej występujących chorób wirusowych; agrestu GVBV oraz czereśni PDV i PNRSV.
2. Określenie poziomu ploidalności roślin donorowych przy użyciu cytometrii przepływowej (FCM).
3. Uzyskanie ustabilizowanych, proliferujących kultur *in vitro* 5 genotypów agrestu i 5 odmian czereśni.
4. Otrzymanie poliploidów *in vitro* 2 odmian agrestu i 3 odmian czereśni.

Wszystkie cele zostały osiągnięte

Materiały i metody

Materiał badawczy to rośliny donorowe 5 genotypów agrestu: 'Captivator', AGR 9, 'Macurines', 'Invicta' i 'Biały Triumf oraz 5 odmian czereśni: 'Merton Premier', 'Tamara', 'Irena', 'Liliana' i 'Rita'.

Zadanie 1. Od maja do lipca pobierano liście, jako materiał do testów wirusologicznych. Do wykrywania GVBV stosowano metodę PCR. Do wykrywania PDV i PNRSV stosowano test ELISA.

Zadanie 2. W maju pobierano próbki liści i poddawano analizie cytometrycznej (FCM) przy użyciu diody UV LED 365 nm, buforu ekstrakcyjnego Partec i barwnika DAPI. Poziom ploidalności określano na podstawie histogramów. Przeprowadzono obserwacje mikroskopowe liczby i długości aparatów szparkowych dla każdego genotypu.

Zadanie 3. Eksplantaty inicjalne pobierano od marca do czerwca. Po sterylizacji powierzchniowej wykładano na pożywkę inicjalną : ½ MS, 30 g/l sacharozy, 250 mg/l albuminy mlecznej 0,5 mg/l BAP dla czereśni oraz 0,3 mg/l *meta*-topoliny (*mT*) dla agrestu, po 3 tyg. na pożywkę do stabilizacji kultur jw. o pełnym składzie MS. Pędy, które przeżyły, przenoszono na pożywkę do namnażania pędów dla agrestu: sole MS, 0,5 mg/l *mT*, 0,1 mg/l GA3, 0,1 mg/l IAA, 30 g/l sacharozy, 8,5 g/l agar Bacto, dla czereśni: sole MS, 0,8 mg/l BAP, 1,0 mg/l GA3, 0,01 mg/l IBA, 20 g/l sacharozy, 7,5 g/l agaru Plant. Określano liczbę zakażeń, procent wypadów i współczynnik namnażania pędów.

Zadanie 4. Kultury pędowe *in vitro* agrestu 'Captivator' i 'Macurines' oraz czereśni 'Liliana', 'Merton Premier' i 'Tamara', w celu indukowania poliploidów, poddano działaniu antymitotyków, kolchicyny, trifluraliny, oryzaliny oraz APM. Pędy inkubowano w ciemności 2 tyg. Następnie wystawiano na światło 2 tyg. Oceniano fitotoksyczność a pędy, które przeżyły przekładano na pożywki do namnażania, właściwe dla danego gatunku. Po 4 tyg. z regenerantów pobierano młode liście i poddawano ocenie poziomu ploidalności. W miesiącach wrzesień – listopad wykrywano tetraploidy metodą cytometrii przepływowowej (FCM-DAPI).

Zdanie 1. Wyniki

Badane rośliny agrestu nie wykazywały objawów chorobowych, które mogłyby wskazywać na porażenie przez wirusy w tym wirus otaśmienia nerwów agrestu. Na liściach nie obserwowano przebarwień, chlorotycznych plam, nekroz, czy deformacji, a wielkość blaszek liściowych była typowa dla zdrowych roślin poszczególnych odmian agrestu. Przeprowadzone badania z zastosowaniem techniki PCR nie wykazały obecności wirusa otaśmienia nerwów agrestu w żadnej z badanych prób liści agrestu. Wynik dodatni, świadczący o obecności wirusa w próbie, uzyskano tylko dla kontroli pozytywnej.

Badane rośliny czereśni nie wykazywały objawów chorobowych, które mogłyby wskazywać na porażenie przez wirusy w tym wirusa karłowatości śliwy i wirusa nekrotycznej plamistości pierścieniowej wiśni. Na liściach nie obserwowano przebarwień, chlorotycznych plam, nekroz, czy deformacji, a wielkość blaszek liściowych była typowa dla zdrowych roślin poszczególnych odmian czereśni. W żadnej z badanych prób nie wykryto tych wirusów, co stwierdzono na podstawie niskich odczytów absorbancji (0,07-0,11) porównywalnych z wartościami uzyskanymi dla kontroli negatywnej

Wnioski

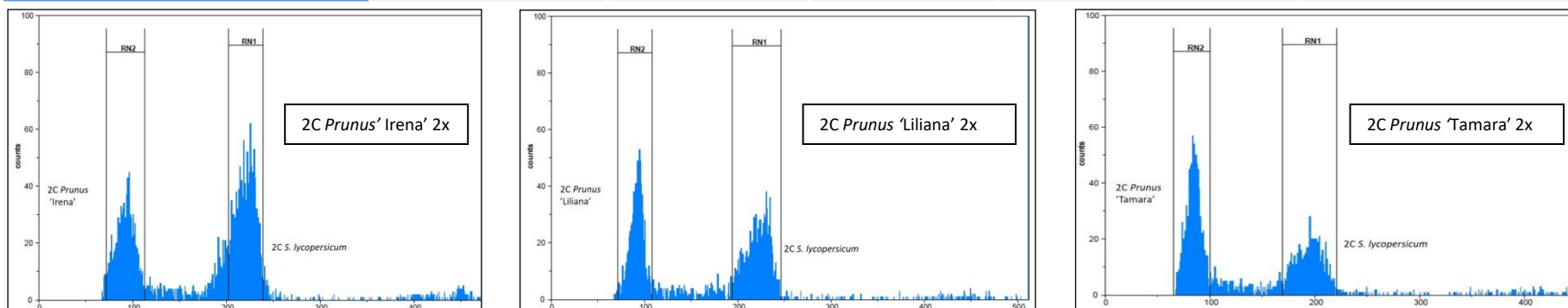
1. Zdrowotność badanego materiału roślinnego agrestu i czereśni potwierdzono wynikami testów PCR lub ELISA. Wszystkie badane rośliny agrestu były wolne od GVBV, zaś rośliny czereśni – od PDV i PNRSV.

Zdanie 2. Wyniki

Potwierdzono diploidalność wszystkich badanych odmian agrestu i czereśni. Zawartość 2C DNA dla czereśni wahała się od 0,80 do 0,86 pg wskazując na ich diploidalną liczbę chromosomów, zawartość 2C DNA dla tetraploidalnej czerechy (*P. cerasus* L.x*P. avium* L.) wynosiła 1,54 pg.

Tabela 1. Zawartość 2C DNA, poziom ploidalności oraz liczba i długość aparatów szparkowych czereśni.

Gatunek	Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności	Liczba aparatów szparkowych/1 mm ²	Długość aparatów szparkowych (μm)
Czereśnia <i>P. avium</i> L.	,Irena'	0,83	2x	103,0	22,2
	,Liliana'	0,80	2x	117,3	23,6
	,Merton Premier'	0,81	2x	66,3	27,7
	,Rita'	0,86	2x	141,0	22,0
	,Tamara'	0,83	2x	125,3	22,0
Czerecha <i>P. cerasus</i> L. x <i>P. avium</i> L.	,Czudowiśnia'	1,54	4x	76,0	31,2



Rys. 1. Histogramy diploidalnych 3 odmian czereśni (2x).

Wnioski

1. Wszystkie wybrane do badań genotypy agrestu są diploidami ($2n=2x=16$).
2. Wszystkie przeznaczone do poliploidyacji odmiany czereśni są diploidami ($2n=2x=16$).
3. U roślin diploidalnych odnotowano większą liczbę i mniejszą długość aparatów szparkowych w porównaniu do genotypu tetraploidalnego.

Zdanie 3. Wyniki

Odnotowano małą liczbę zakażeń pochodzenia grzybowego. Liczba zakażeń bakteryjnych była większa. U agrestu największy odsetek wypadów podczas inicjowania kultur zaobserwowano w odmianie 'Captivator', a podczas stabilizacji w odmianie 'Macurines'. U czereśni podczas inicjowania kultur największe straty odnotowano w odmianach 'Irena', 'Liliana' i 'Rita', a podczas stabilizacji u odmiany 'Tamara'. Udało się zainicjować kultury *in vitro* wszystkich badanych genotypów. Istnieją różnice w efektywności mikrorozmnażania poszczególnych odmian (Tab. 2.).

Tabela 2. Efektywność etapu inicjowania i stabilizacji kultur *in vitro* oraz namnażania pędów agrestu i czereśni.

Gatunek	Odmiana	Liczba wypadów ogółem (%)		Współczynnik namnażania
		Inicjowanie kultur <i>in vitro</i>	Stabilizacja kultur <i>in vitro</i>	
Agrest	Agr. 9	14,7	23,2	1,8
	,Biały Triumf'	13,9	21,8	1,6
	,Captivator'	42,9	17,1	3,7
	,Invicta'	36,6	5,2	2,9
	,Macurines'	34,6	41,6	3,0
Czereśnia	,Irena'	45,8	23,5	0,7
	,Liliana'	46,9	0	2,3
	,Merton Premier'	11,8	32,6	4,2
	,Rita'	46,9	37,8	1,8
	,Tamara'	9,4	40,0	3,9

Wnioski

1. Zainicjowano kultury *in vitro* wszystkich badanych genotypów agrestu i czereśni.
2. Odsetek wypadów podczas inicjowania kultur wynosił od 9,4 do 46,9 procent, a podczas stabilizacji od 0 do 41,6 procent.
3. Istnieją duże różnice w efektywności mikrorozmnażania pędów poszczególnych odmian w obrębie gatunków.



Fot. 1. Etap inicjowania kultur *in vitro* agrestu odm. ,Biały Triumf'.

Zdanie 4. Wyniki

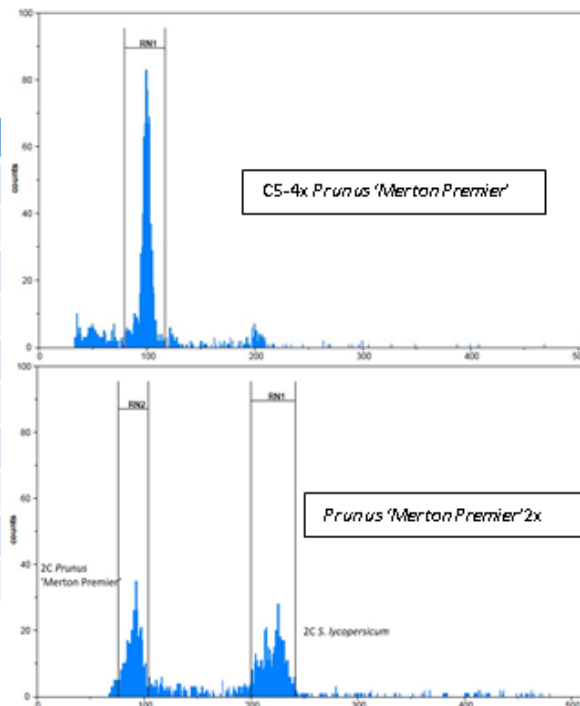
Dla pędów agrestu *in vitro* całkowicie fitotoksyczne były trifluralina i oryzalina. Pozostałe kolchicina i APM były fitotoksyczne w dużym stopniu, jednak pojedyncze pędy przeżyły i podjęły namnażanie. Dla czereśni żaden z antymitotyków nie był całkowicie fitotoksyczny, na wszystkich pożywkach część pędów przeżywała i podejmowała namnażanie (Tab. 3).

Tabela 3. Fitotoksyczne działanie antymitotyków

Antymitotyki (mg/l) (agrest/czereśnia)	Liczba pędów nekrotycznych (%)	
	Agrest	Czereśnia
Kolchicina 75/125	81,4	42,6
Kolchicina 150/250	92,6	74,5
Trifluralina 25/50	100	58,7
Trifluralina 50/100	100	82,4
Oryzalina 2,5/5	100	49,2
Oryzalina 5/10	100	79,5
APM 2,5/5	62,5	63,8
APM 5/10	88,4	79,2
Kontrola	0	0

Wnioski

1. Zoptymalizowano procedury indukowania poliploidów *in vitro* agrestu i czereśni.
2. Dla pędów agrestu *in vitro* całkowicie fitotoksyczne były trifluralina i oryzalina.
3. Dla czereśni *in vitro* żaden z antymitotyków nie był całkowicie fitotoksyczny.
4. Dla agrestu wykryto pięć tetraploidów po traktowaniu 2,5 oraz 5,0 mg/l APM, jeden w odmianie 'Captivator' i cztery w odmianie 'Macurines'.
3. Dla czereśni uzyskano pięć tetraploidów po traktowaniu 50 i 100 mg/l trifluraliny, dwa w odmianie 'Liliana' i trzy w odmianie 'Merton Premier'.



Rys. 2. Histogramy czereśni odm. 'Merton Premier': tetraploid C5-4x (u góry) kontrola 2x (na dole)

Prezentacja wyników

OCENA WIELKOŚCI GENOMU I POZIOMU PLOIDALNOŚCI WYBRANYCH GENOTYPÓW *PRUNUS CERASUS* L. I *PRUNUS AVIUM* L. ORAZ ICH MIESZAŃCÓW

Konferencja:

„Genetyka aplikacyjna roślin - wyzwania XXI wieku”.

SGGW Warszawa 22-24 września 2021.

Poster pt.:

„Ocena wielkości genomu i poziomu ploidalności wybranych genotypów *Prunus cerasus* L. i *Prunus avium* L. oraz ich mieszańców”.

Autorzy:

M. Marat, D. Kucharska, M. Szymajda

WSTĘP

Czerśnia *Prunus cerasus* oraz wiśnia *Prunus avium* są ważnymi gatunkami roślin sadowniczych w Polsce. Produkcji wiśni poszukują nowych odmian deserowych, szczególnie odmian wczesnych o atrakcyjnych owocach. Bardzo smaczne i atrakcyjne owoce wytwarzają mieszańce wiśni i czereśni, tzw. czerechy. Wiśnie i czereśnie należą do rodzaju *Prunus*, u których podstawowa liczba chromosomów $x=8$. Czerśnia jest diploidem ($2n=2x=16$), a wiśnia tetraploidem ($2n=4x=32$). Ich naturalne mieszańce są triploidami. Genotypy takie charakteryzują się niską płodnością i słabo owocują. Aby uzyskać plenne tetraploidalne mieszańce (czerechy), konieczne jest podwojenie liczby chromosomów u wytypowanych do krzyżowań odmian czereśni. Celem badań było określenie poziomu ploidalności i porównanie wielkości genomu wiśni, czereśni oraz ich mieszańców, jako roślin donorowych dla hodowli poliploidalnej.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem do analizy metodą cytometrii przepływowej (FCM) były młode liście 16 genotypów z rodzaju *Prunus*. Do określenia poziomu ploidalności użyto buforu ekstrakcyjnego Partec z dodatkiem barwnika DAPI, z wykorzystaniem diody UV (488nm). Poziom ploidalności określono na podstawie histogramów dla pików standardu zewnętrznego - genotypu referencyjnego - odmiany wiśni Lutowka o znanej liczbie chromosomów ($2n=4x=32$). Ocenę zawartości jądrowego DNA (FCM-PI) wykonano z wykorzystaniem barwnikiem PI i zielonego lasera (532nm). Fragmenty liści genotypów *Prunus* rozdrabniano ze standardem wewnętrznym - fragmentem liścia rośliny referencyjnej o znanej wielkości genomu - *Solanum lycopersicum* (2C DNA=1,96 pg).

Przeprowadzono obserwacje mikroskopowe gęstości i długości aparatów szparkowych. Izolowaną epidermę umieszczano na szkiełkach i barwiono błękitem toluidyny. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego.

PODSUMOWANIE

U wszystkich wybranych do badań odmian wiśni, potwierdzono tetraploidalną liczbę chromosomów. Uznane za czerechy: 'Czudowienia', 'Królowa Hortensja' i 'Gubieńska' okazały się tetraploidami, odmiana 'Książęca' - pentaploidem, a niska plenna siewka hodowlana KD4/8117 - triploidem.

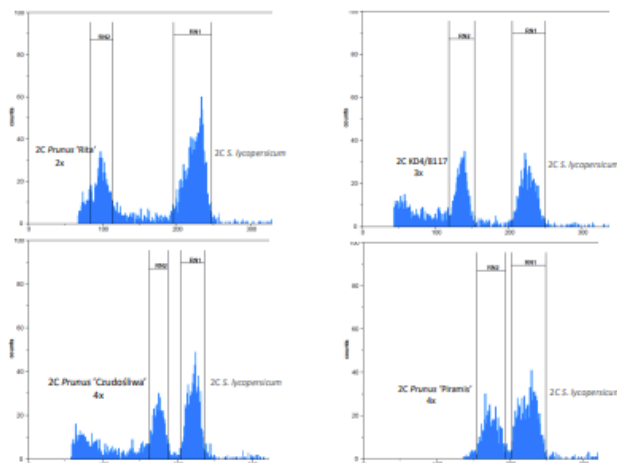
O ile wykazano pewną korelację pomiędzy długością aparatów szparkowych a poziomem ploidalności, to wielkość aparatów szparkowych nie może służyć hodowcom za wiarygodny marker poziomu ploidalności mieszańców pomiędzy wiśnią i czereśnią.

WYNIKI

- Zawartość 2C DNA dla czereśni wahała się od 0,80 do 0,86 pg, wskazując na ich diploidalną liczbę chromosomów.
- Wiśnie oraz czerechy są tetraploidami o zawartości 2C DNA pomiędzy 1,51-1,64 pg z wyjątkiem czerechy 'Książęca' (1,88 pg), która jest pentaploidem. Badana siewka hodowlana KD4/8117 jest triploidem o zawartości jądrowego DNA wynoszącej 1,17 pg.
- Najmniejszymi aparatami szparkowymi i największą ich gęstością charakteryzowały się diploidalne genotypy - odmiany czereśni (22-23,6 μm); wyjątek stanowiła odmiana Merton Premier (27,6 μm). U genotypów tetraploidalnych (wiśnie), triploida i pentaploida (czerechy) aparaty szparkowe były większe (ok. 25-31 μm).



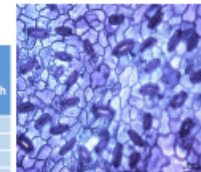
Fot. 1. Owoce czereśni 'Rita'



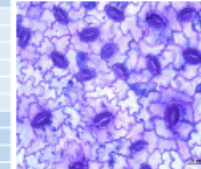
Fot. 2. Histogramy cytometrii przepływowej zawartości 2C DNA wybranych gatunków rodzaju *Prunus* w odniesieniu do wzorca wewnętrznego *S. lycopersicum*

Tab. 1. Zawartość 2C DNA, poziom ploidalności oraz liczba i długość aparatów szparkowych badanych genotypów *Prunus cerasus* L. i *Prunus avium* L.

Gatunek	Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności	Liczba aparatów szparkowych/ 1 mm ²	Długość aparatów szparkowych (μm)
Czerśnia <i>Prunus avium</i> L.	Irena	0,83	2x	103,0 bc	22,2 a
	Liliana	0,80	2x	117,3 cd	23,6 ab
	Merton Premier	0,81	2x	66,3 a	27,7 d-f
	Rita	0,86	2x	141,0 e	22,0 a
Wiśnia <i>Prunus cerasus</i> L.	Tamara	0,83	2x	125,3 de	22,0 a
	Debreczeni Böttermő	1,54	4x	85,7 ab	28,0 d-f
	Dukat	1,59	4x	102,0 bc	28,6 ef
	Erdi Koral	1,58	4x	80,7 ab	25,5 b-d
	Lutowka	1,53	4x	113,0 cd	26,5 c-f
Czerecha <i>P. cerasus</i> L. x <i>P. avium</i> L.	Nefris	1,51	4x	102,3 bc	24,8 bc
	Piramis	1,51	4x	84,3 ab	28,5 ef
	Czudowienia	1,54	4x	76,0 a	31,2 g
Czerecha <i>P. cerasus</i> L. x <i>P. avium</i> L.	Gubieńska	1,64	4x	73,0 a	31,1 g
	KD4/8117	1,17	3x	113,7 cd	26,3 cd
	Królowa Hortensja	1,56	4x	85,0 ab	28,2 d-f
	Książęca	1,88	5x	87,0 ab	29,0 fg



Fot. 3. Aparaty szparkowe u czereśni 'Rita'



Fot. 4. Aparaty szparkowe u czerechy 'Czudowienia'

