

# 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](mailto:danuta.kucharska@inhort.pl)

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

# Cele/tematy badawcze projektu w 2022 r.

1. Otrzymanie poliploidów *in vitro* 2 odmian agrestu i 2 odmian czereśni.
2. Określenie poziomu ploidalności pędów zregenerowanych po działaniu antymitotyków oraz potwierdzenie statusu otrzymanych tetraploidów przy użyciu cytometrii przepływowowej (FCM).
3. Otrzymanie roślin z tetraploidalnych pędów agrestu i czereśni indukowanych w 2021 roku.
4. Ocena w warunkach szklarniowych parametrów wzrostu, zawartości chlorofilu oraz liczby i wielkości aparatów szparkowych tetraploidów, w porównaniu do diploidalnych odpowiedników.

Wszystkie cele zostały osiągnięte

# Materiały i metody

Temat 1. W celu indukowania poliploidów, kultury pędowe *in vitro* agrestu ‘Invicta’ i ‘Biały Triumf’ poddano działaniu antymitotyków: kolchicyny i APM, a czereśni ‘Tamara’ i ‘Rita’, 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 metodą cytometrii przepływową (FCM-DAPI).

Temat 2. Materiałem do badań były zregenerowane pędy *in vitro* dwóch odmian agrestu i czereśni poddane działaniu antymitotyków, (temat 1) oraz tetraploidy tych gatunków otrzymane w roku 2021. Młode liście z regenerantów *in vitro* oraz z roślin tetraploidalnych ze szklarni, zostały wykorzystane w analizach cytometrycznych poprzez ocenę poziomu ploidalności (FCM-DAPI). W celu potwierdzenia statusu ploidalności czereśni z wierzchołków korzeni przygotowano preparaty chromosomów somatycznych w fazie metafazowej. Przypadki metafazy obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym, przy użyciu światła UV.

Temat 3. Tetraploidalne pędy uzyskane w 2021 roku rozmnażano *in vitro* na pożywce, która zawierała: 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 agaru 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. Oceniano współczynnik namnażania, liczbę pędów przydatnych do ukorzenia. Dobrze ukształtowane pędy ukorzeniano *in vitro* na pożywce z dodatkiem auksyny IBA. W namnażaniu pędów tetraploidalnych *in vitro*. Oceniano wysokość pędów, liczbę liści, liczbę i długość korzeni oraz procent ukorzenionych pędów w porównaniu do diploidalnych pędów kontrolnych. Ukorzenione *in vitro* rośliny, wysadzano i aklimatyzowano w szklarni.

Temat 4. Materiał badawczy stanowiły 4 tetraploidy czereśni: C5-4x, C7-4x, D4-4x w odmianie ‘Merton Premier’ i C11/5 w odmianie ‘Liliana’. Po aklimatyzacji rozpoczęto pomiary parametrów morfologicznych i fizjologicznych. Określono dynamikę wzrostu roślin, liczbę międzywęźli, średnicę pędu, zawartość chlorofilu oraz gęstość i długość aparatów szparkowych.

# Temat 1. Wyniki

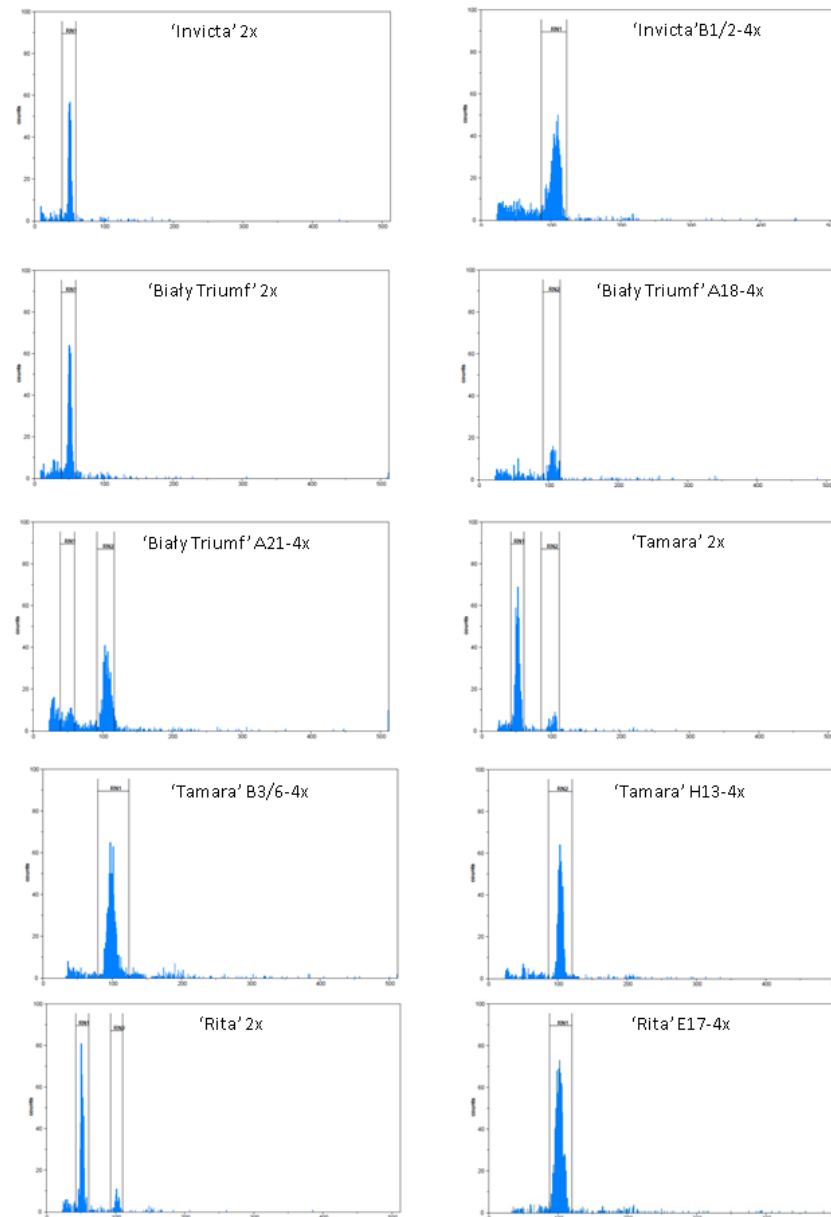
Fitotoksyczność kolchicyny dla agrestu była duża, jednak pojedyncze pędy przeżyły i podjęły namnażanie. APM był fitotoksyczny w dużym stopniu dla odmiany 'Invicta' lecz dla odmiany 'Biały Triumf' nie wykazywał podobnego działania. Dla dwóch odmian czereśni całkowicie fitotoksyczne były trifluralina 100 mg/l oraz oryzalina 10 mg/l, na pozostałych pożywkach część pędów przeżyła i podjęła namnażanie.

Dla dwóch odmian agrestu wykonano łącznie 255 analiz ploidalności. Otrzymano 23 miksploidy, wykryto 3 tetraploidy A18-4x i A21-4x w odmianie 'Biały Triumf' oraz B1/2-4x w odmianie 'Invicta', po traktowaniu 75 oraz 150 mg/l kolchicyny.

Dla dwóch odmian czereśni wykonano łącznie 567 analiz ploidalności. Otrzymano 166 miksploidów, wyselekcjonowano 8 tetraploidów: 7 w odmianie 'Tamara' po traktowaniu 125 i 250 mg/l kolchicyny, 50 mg/l trifluraliny oraz 10 mg/l APM i 1 w odmianie 'Rita' po traktowaniu 5 mg/l oryzaliny (Fot. 1).

## Wnioski

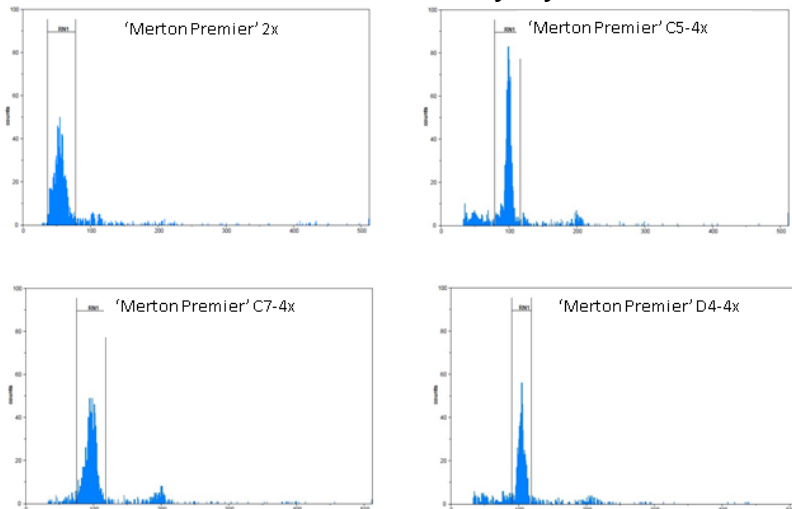
1. Zoptymalizowano procedury indukowania poliploidów *in vitro* dla agrestu 'Biały Triumf', 'Invicta' i czereśni 'Tamara' i 'Rita'.
2. Dla pędów *in vitro* 'Tamara' i 'Rita' fitotoksyczne były trifluralina 100 mg/l oraz oryzalina 10 mg/l.
3. Otrzymano 7 tetraploidów w odmianie 'Tamara' i 1 w odmianie 'Rita', 2 tetraploidy w odmianie 'Biały Triumf' oraz 1 w odmianie 'Invicta'.



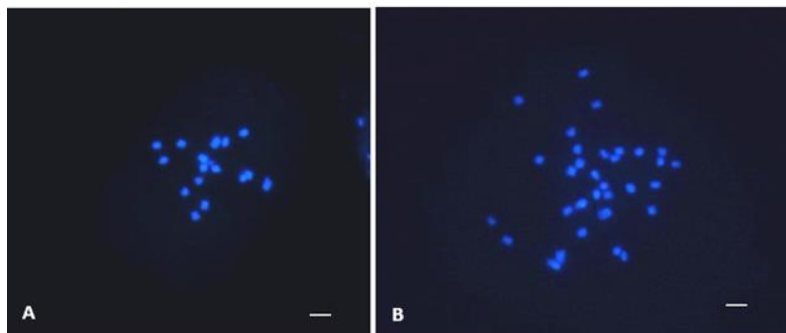
Fot. 1. Histogramy roślin diploidalnych (2x) oraz tetraploidalnych (4x) agrestu i czereśni.

# Temat 2. Wyniki

W temacie badawczym 1 dla 2 odmian czereśni i 2 agrestu, wykonano łącznie 822 analizy cytometryczne. Wykonano 69 analiz potwierdzających tetraploidalność roślin uzyskanych w roku 2021. Tetraploidy agrestu nie podejmują namnażania w kulturach *in vitro*. Z 5 otrzymanych tetraploidów w roku 2021 tylko jeden G15-4x w odmianie 'Macurines' jest rozmnażany *in vitro*, ale badania ploidalności wykazują, że jest miksoploidem. Pozostałe tetraploidy agrestu uzyskane w roku 2021 zmarły. Trzy tetraploidy agrestu otrzymane w 2022 roku są rozmnażane *in vitro*. Z 5 tetraploidów czereśni uzyskanych w 2021 roku, 4 (3 'Merton Premier' i 1 'Liliana') są rozmnażane *in vitro* oraz utrzymywane w szklarni. Mają potwierdzony tetraploidalny status (Tab. 1).



Fot. 2. Histogramy rośliny kontrolnej (2x) i trzech roślin tetraploidalnych (4x) czereśni 'Merton Premier'



Fot. 3. Chromosomy czereśni 'Merton Premier' w podziale metafazowym: A. Roślina kontrolna ( $2n = 2x = 16$ ), B. Roślina tetraploidalna C7/3 ( $2n = 4x = 32$ ).

## Wnioski

1. Z 5 tetraploidów agrestu otrzymanych w roku 2021, 4 nie podjęły namnażania *in vitro* i zmarły.
2. Z 5 tetraploidów czereśni uzyskanych w roku 2021, 4 są rozmnażane i ukorzeniane *in vitro*.
3. Analizy cytometryczne oraz chromosomów w fazie metafazowej potwierdziły podwojenie liczby chromosomów u tetraploidów czereśni (Fot. 2 i 3).

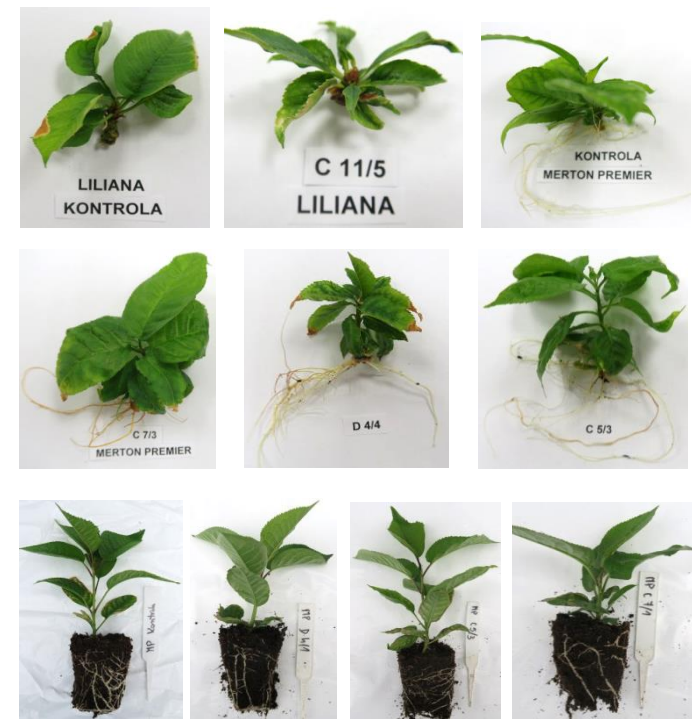
Tab.1. Opis tetraploidów czereśni i agrestu otrzymanych w latach 2021/22

	Odmiana	Nazwa-4x	Opis	
Agrest	'Captivator'	G6	brak namnażania, zmarł	
		G8	brak namnażania, zmarł	
	'Macurines'	G15	rozmnażany <i>in vitro</i> , w dalszym badaniu miksoploid	
		H7	brak namnażania, zmarł	
	2022	'Biały Triumf'	A18	rozmnażany <i>in vitro</i> ,
			A21	rozmnażany <i>in vitro</i> ,
Czereśnia	'Invicta'	B1/2	rozmnażany <i>in vitro</i> ,	
		C11/5	rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność	
	'Liliana'	C12/8	brak namnażania, zmarł	
		'Merton Premier'	C5	rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność
	C7		rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność	
	D4		rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność	
	2022	'Tamara'	A3/12/2	rozmnażany <i>in vitro</i> , w dalszym badaniu miksoploid
			A3/22/1	rozmnażany <i>in vitro</i> , w dalszym badaniu miksoploid
			B3/6	rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność
			B3/42/1	rozmnażany <i>in vitro</i> , w dalszym badaniu miksoploid
'Rita'		B8	brak namnażania, zmarł	
		C2	brak namnażania, zmarł	
		H13	rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność	
		E17	rozmnażany <i>in vitro</i> , potwierdzona tetraploidalność	

## Temat 3. Wyniki

Tylko tetraploid G15-4x w odmianie 'Macurines' jest rozmnażany *in vitro*, badania ploidalności wykazują, że jest miksoploidem i nie ukorzeniano tego genotypu.

Współczynnik namnażania *in vitro* dla tetraploidów czereśni C11/5-4x w odmianie 'Liliana' i C5-4x, C7-4x, D4-4x w odmianie 'Merton Premier' wynosił od 2,6 do 3,0 i był dużo wyższy w porównaniu do kontroli (1,2-1,3) w obu odmianach. W odmianie 'Merton Premier' liczba i długość korzeni u tetraploidów była mniejsza w porównaniu do kontroli. Podobnie odsetek pędów ukorzenionych u tetraploidów wynosił od 57,4 do 70,8% i były mniejsze w stosunku do kontroli (100%). W odmianie 'Merton Premier' uzyskano łącznie 59 roślin tetraploidalnych i 5 roślin kontrolnych (Tab. 2). W odmianie 'Liliana', pomimo braku ukorzeniania *in vitro*, wysadzono do szklarni 11 roślin kontrolnych i 5 pędów tetraploidalnych C11/5-4x z czego 1 ukorzeniono *ex vitro*.



Fot. 4. Rośliny kontrolne oraz tetraploidy czereśni 'Liliana' i 'Merton Premier' po ukorzenianiu *in vitro* (u góry) i aklimatyzacji (na dole).

## Wnioski

1. Współczynnik namnażania *in vitro* tetraploidalnych pędów czereśni był wyższy w porównaniu do kontroli w obu odmianach.
2. Tetraploidalne oraz kontrolne pędy odmiany 'Liliana' nie podjęły ukorzeniania *in vitro* (Fot. 4).
3. Powodzenie aklimatyzacji u roślin odmiany 'Merton Premier' wynosiło 70,3 procent i uzyskano łącznie 59 roślin tetraploidalnych i 5 roślin kontrolnych.
4. Powodzenie aklimatyzacji u roślin odmiany 'Liliana' wynosiło 6,3 procent i uzyskano 1 roślinę tetraploidalną ukorzenioną *ex vitro*.

Tab. 2. Aklimatyzacja tetraploidów czereśni 'Merton Premier' i 'Liliana'.

Tetraploidy	Liczba roślin wysadzonych do szklarni (szt.)	Liczba roślin po aklimatyzacji (szt.)	Aklimatyzacja (%)
<b>'Merton Premier'</b>			
<b>Kontrola-2x</b>	5	5	100
<b>C5-4x</b>	6	2	33,3
<b>C7-4x</b>	54	36	66,6
<b>D4-4x</b>	26	21	80,8
<b>Łącznie</b>	<b>91</b>	<b>64</b>	<b>70,3</b>
<b>'Liliana'</b>			
<b>Kontrola-2x</b>	11	0	0
<b>C11/5-4x</b>	5	1	20
<b>Łącznie</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>6,3</b>

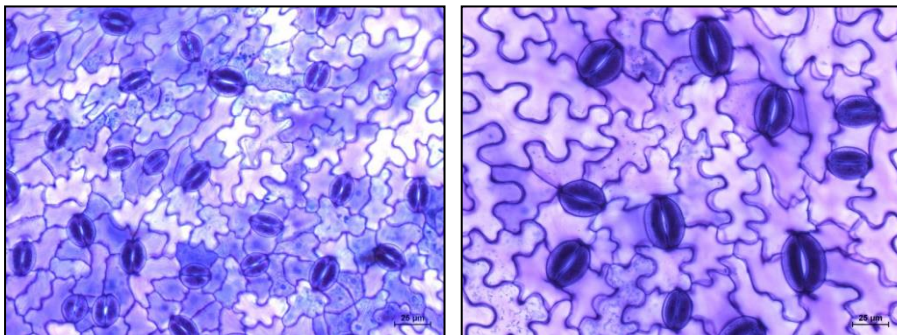


## Temat 4. Wyniki

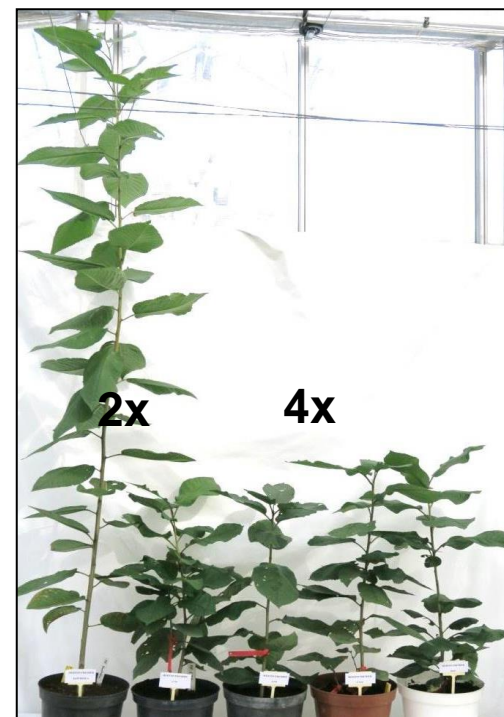
Największą dynamikę wzrostu, liczbę międzywęźli oraz średnicę pędu po czterech miesiącach wzrostu w szklarni wykazywały rośliny kontrolne. Średnia wysokość pędów diploidalnych wynosiła 184 cm a tetraploidalnych od 24 cm do 55 cm (Fot. 5). U genotypów tetraploidalnych aparaty szparkowe były większe a ich gęstość dużo mniejsza niż w kontroli (Fot. 6). Zawartość chlorofilu u genotypów tetraploidalnych po dwóch miesiącach wzrostu w szklarni była dużo wyższa w porównaniu do kontroli. W miarę wzrostu roślin te różnice nie były już widoczne. Rośliny tetraploidalne miały tendencje do wcześniejszego wchodzenia w spoczynek. W celu przeciwdziałania temu zjawisku, rośliny były trzykrotnie opryskiwane gibereliną  $GA_3$ .

## Wnioski

1. Największą dynamikę wzrostu, liczbę międzywęźli oraz średnicę pędu po 4 miesiącach wzrostu w wykazywały rośliny kontrolne. Wysokość roślin kontrolnych po tym czasie wynosiła 184 a tetraploidalnych od 24 do 55 cm.
3. U genotypów tetraploidalnych aparaty szparkowe były większe a ich gęstość dużo mniejsza niż w kontroli.
4. Zawartość chlorofilu u genotypów tetraploidalnych po dwóch miesiącach wzrostu w szklarni była dużo wyższa w porównaniu do kontroli.
5. Rośliny tetraploidalne miały tendencje do wcześniejszego wchodzenia w spoczynek.



Fot. 6. Wielkość i gęstość aparatów szparkowych u czereśni 'Merton Premier': diploid (z lewej) i tetraploid (z prawej).



Fot. 5. Dynamika wzrostu roślin czereśni 'Merton Premier' po 2 (u góry) i 4 (na dole) miesiącach wzrostu w szklarni. Rośliny kontrolne (2x) i tetraploidy (4x).

## Mierniki zadania – stopień realizacji

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
<b>Temat badawczy 1</b>				
1.1	Liczba odmian poddanych poliploidyzacji (2 odmiany agrestu i 2 odmiany czereśni)	4	4	1,0
1.2	Liczba kombinacji pożywek do poliploidyzacji czereśni (4 antymitotyki x 2 stężenia)	8	8	1,0
1.3	Liczba kombinacji pożywek do poliploidyzacji agrestu (2 antymitotyki x 2 stężenia)	4	4	1,0
<b>Temat badawczy 2</b>				
2.1	Liczba analizowanych odmian (2 odmiany agrestu i 2 odmiany czereśni).	4	4	1,0
2.2	Liczba analiz (FCM-DAPI i FCM-PI).	2	3*	1,5
<b>Temat badawczy 3</b>				
3.1	Liczba rozmnażanych tetraploidów in vitro (5 agrestu i 5 czereśni).	10	5	0,5
3.2	Liczba otrzymanych roślin tetraploidalnych (8 genotypów x 5 roślin/genotyp).	40	59	1,5
<b>Temat badawczy 4</b>				
4.1	Liczba pomiarów parametrów morfologicznych (wysokość, liczba międzywęźli, dynamika wzrostu).	3	3	1,0
4.2	Liczba pomiarów parametrów fizjologicznych (zawartość chlorofilu).	1	1	1,0
4.3	Liczba analiz mikroskopowych (liczba i wielkość aparatów szparkowych).	2	2	1,0
			Średnia	1,05
			<b>% realizacji zadania</b>	<b>105</b>

\* wykonano dodatkowo analizy chromosomów somatycznych



# Prezentacja wyników



Konferencja krajowa:  
59 Zjazd Polskiego Towarzystwa  
Botanicznego Warszawa, 26 czerwca –  
3 lipca 2022 Streszczenia referatów i  
plakatów str. 105  
Poster pt.:  
„Ocena wybranych cech fenotypowych  
u tetraploidalnych klonów czereśni  
*Prunus avium* L”.

Autorzy:  
Monika Marat, Danuta Kucharska,  
Małgorzata Podwyszyńska, Angelika  
Niewiadomska-Wnuk, Marek  
Szymajda.

## OCENA WYBRANYCH CECH FENOTYPOWYCH U TETRAPLOIDALNYCH KLONÓW CZEREŚNI *PRUNUS AVIUM* L.

### WSTĘP

Czereśnia (*Prunus avium*) jest wysoko cenionym i ważnym gatunkiem sadowniczym. Jest jednym z najpopularniejszych owoców letnich w umiarkowanych regionach Europy, wysoko cenionym przez konsumentów. Proces poliploidyzacji jest jedną z metod wykorzystywanych w programach hodowlanych tego gatunku, dzięki niemu jest możliwe uzyskanie genotypów o delikatniejszych i większych owocach. Poliploidy charakteryzują się większymi rozmiarami kwiatów, owoców, bujnym wzrostem oraz większą odpornością na czynniki stresowe biotyczne i abiotyczne. Celem badań było wytworzenie, metodą poliploidyzacji *in vitro*, tetraploidalnych czereśni (*Prunus avium* L.) z przeznaczeniem do krzyżowania z wiśnią (*Prunus cerasus* L.) i uzyskania plennych mieszańców międzygatunkowych o wysokich walorach smakowych owoców oraz zróżnicowanej porze dojrzewania.

### MATERIAŁY I METODY

W celu podwojenia liczby chromosomów pędy czereśni w kulturach *in vitro* inkubowano na pożywce do namnażania z dodatkiem jednego z antymitotyków: kolchicyny trifluraliny, oryzaliny i amiprofosu metylu (APM), w dwóch stężeniach każdy. Tetraploidy wykrywano metodą cytometrii przepływowej. 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 diploidalnej o znanej liczbie chromosomów ( $2n=2x=16$ ).

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

### PODSUMOWANIE

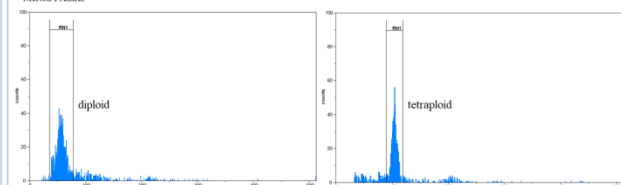
Otrzymanie w wyniku poliploidyzacji *in vitro*, tetraploidalnych roślin dwóch odmian czereśni, są znaczącym krokiem w pracach hodowlanych nad poszerzeniem puli zmienności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*. Pozwola, w niedalekiej przyszłości, na otrzymanie bardzo pożądaných i poszukiwanych, ze względu na walory smakowe, mieszańców wiśni i czereśni.

### WYNIKI

- Współczynnik namnażania *in vitro* dla tetraploidów (2,6-3,0) był dużo wyższy w porównaniu do kontroli (1,2-1,3) w obu odmianach.
- W odmianie 'Liliana' u tetraploidalnego genotypu C12/8 odnotowano brak podjęcia mikrorozmnażania i wypadnięcia genotypu.
- W odmianie 'Merton Premier' liczba i długość korzeni u oraz odsetek pędów ukorzenionych (57,1-70,8%) u tetraploidów były niższe w porównaniu do kontroli (100%) jednak pozwoliło to otrzymać ukorzenione tetraploidalne rośliny czereśni, które poddano aklimatyzacji i dalszej uprawie w szklarni. Zastosowanie warunków ukorzeniania *in vitro* nie spowodowały wyrastania korzeni u odmiany 'Liliana' zarówno w kontroli jak u genotypu tetraploidalnego.
- Najmniejszymi aparatami szparkowymi (23,9 μm) i największą ich gęstością (254,5) charakteryzował się diploidalny genotyp kontroli. U genotypów tetraploidalnych aparaty szparkowe były większe (37,6-39,6 μm) jednak ich gęstość dużo mniejsza (71,2-138 szt./mm<sup>2</sup>).
- Zawartość chlorofilu u genotypów tetraploidalnych wynosiła od 57,0 do 63,8 i była dużo wyższa w porównaniu do diploidalnego odpowiednika (35,3).



Rys 1. Zawartość chlorofilu w liściach diploidów (2x) i tetraploidów (4x) czereśni 'Merton Premier'



Rys 4. Histogramy diploida (2x) i tetraploida (4x) czereśni odmiany 'Merton Premier'

Tab 1. Parametry namnażania *in vitro* diploidów (2x) i tetraploidów (4x) czereśni 'Merton Premier' i 'Liliana'

Parametr	Merton Premier 2x	Merton Premier 4x D4/4	Merton Premier 4x C5/3	Merton Premier 4x C7	Liliana 2x	Liliana 4x C11/5	Liliana 4x C12/8
Współczynnik namnażania (liczba pędów/eksplantat)	1,2	3,0	2,9	2,6	1,3	2,2	0
Liczba pędów przydatnych do ukorzenienia (szt.)	1	0,9	0,9	0,9	0,7	0,9	0

Tab 2. Parametry ukorzeniania pędów *in vitro* diploidów (2x) i tetraploidów (4x) czereśni 'Merton Premier' i 'Liliana'

Parametr	Merton Premier 2x	Merton Premier 4x D4/4	Merton Premier 4x C5/3	Merton Premier 4x C7	Liliana 2x	Liliana 4x C12/8
Wysokość pędów (cm)	1,6	1,6	2,0	2,0	1,3	0,7
Liczba liści (szt.)	11	11	10	11	8,8	8,3
Liczba korzeni (szt.)	5,4	1,8	2,3	1,9	0	0
Długość korzeni (cm)	7,4	4,1	4,9	4,4	0	0
Ukorzenianie pędów (%)	100	70,8	57,1	65,4	0	0



# Prezentacja wyników cd.

## Konferencja zagraniczna:

31 International Horticultural Congress 14-20 sierpnia 2022, Angers Francja

Poster pt.: “Extending the genetic variability of the sweet cherry (*Prunus avium* L.) by *in vitro* polyploidization”

Autorzy: Aleksandra Trzewik, Danuta Kucharska, Małgorzata Podwyszyńska, Monika Marat, Agnieszka Marasek-Ciołakowska



## Extending the genetic variability of the sweet cherry (*Prunus avium* L.) by *in vitro* polyploidization

Aleksandra Trzewik, Danuta Kucharska, Małgorzata Podwyszyńska, Monika Marat, Agnieszka Marasek-Ciołakowska

### Introduction

The sour cherry (*Prunus cerasus*) and the sweet cherry (*Prunus avium*) are important species of fruit plants. Hybrids of sour cherries and sweet cherries produce very tasty fruits. The sweet cherry is a diploid ( $2n = 2x = 16$ ) and sour cherry is a tetraploid ( $2n = 4x = 32$ ). Their natural hybrids are triploids. Such genotypes, however, are characterized by the low fertility and productivity. To obtain fertile tetraploid hybrids, it is necessary to double the number of chromosomes in the sweet cherry cultivars selected for crossing with sour cherry.

The aim of the study was to develop a polyploidization method for sweet cherry.

### Material and Methods

The *in vitro* shoot cultures of 'Merton Premier' and 'Liliana' sweet cherry cultivars were used. Shoots were multiplied on standard propagation medium containing MS salts,  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  BAP,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  GA3 and  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  IBA. In order to induce chromosome doubling, the shoots were treated with antimetabolic agents (colchicine, trifluralin, oryzalin, and amiprophos methyl, APM) by incubation on the antimetabolic containing media for four weeks (two weeks in the dark then in the 16 h photoperiod). Phytotoxicity of the antimetotics was assessed four weeks after treatments. Then the shoots were subcultured every four weeks on standard multiplication medium. Eight weeks after antimetotic treatments, the leaf samples were collected from regenerants and analysed by flow cytometry (FCM). To confirm ploidy status of sweet cherry slide preparation for somatic chromosome analysis was performed as described by Marasek-Ciołakowska et al. (2012).

### Results

The antimetotics showed a strong phytotoxic effect on the *in vitro* shoot cultures of sweet cherries. In all polyploidization treatments, however, some shoots survived and produced the new shoots. A total of 398 shoots were tested by FCM. Two homogeneous tetraploids and 113 mixoploids were detected. From the mixoploids that were characterised, based on FCM analysis, by a higher proportion of tetraploid genome, three additional homogeneous tetraploids were selected following further mixoploid shoot multiplication and FCM analysis. Finally, two and three tetraploids were obtained for 'Liliana' and 'Merton Premier', respectively, after the treatment with trifluralin ( $50$  and  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). The shoots of tetraploids differed significantly compared to their diploid counterparts. Tetraploids were dark green in colour, they had shorter and thicker shoots, and larger leaves.

Tab. 1. Assessment of phytotoxic effects of antimetotics

Antimetotics (mg/l)	% of necrotic shoots of sweet cherry
Colchicine 125	42,6
Colchicine 250	74,5
Trifluralin 50	58,7
Trifluralin 100	82,4
Oryzalin 5	49,2
Oryzalin 10	79,5
APM 5	63,8
APM 10	79,2
Control (without antimetotics)	0



Fig. 2. Plants of *Prunus avium* 'Merton Premier' after three-month growth in a greenhouse

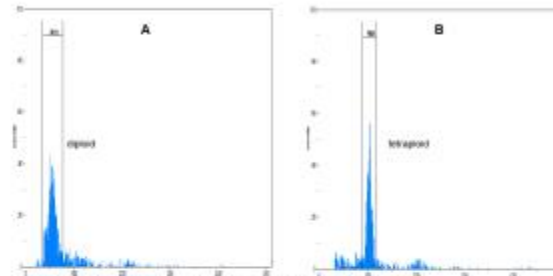


Fig. 1. FCM histograms of *Prunus avium* 'Merton Premier': A – diploid control, B – tetraploid genotype

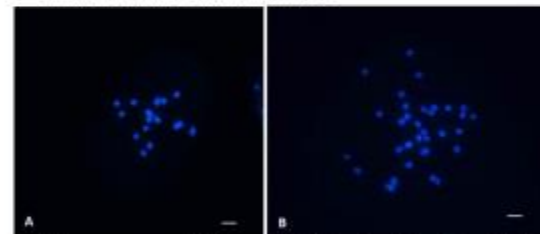


Fig. 3. Chromosomes count of *Prunus avium* 'Merton Premier' genotypes: (A) Diploid control ( $2n = 2x = 16$ ), (B) Tetraploid genotype C7/3 ( $2n = 4x = 32$ ). Bars represent  $2 \mu\text{m}$ .

### Conclusions and perspectives

Obtaining tetraploid plants of two cherry cultivars, as a result of *in vitro* polyploidization, are a significant step in breeding work on expanding the pool of genetic variability within the *Prunus* genus. After phenotype evaluation, the autotetraploid of sweet cherry will be used for hybridization with sour cherry.