



PODWAJANIE LICZBY CHROMOSOMÓW (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) 'AMELA' METODĄ POLIPLOIDYZACJI MITOTYCZNEJ *IN VITRO*

WSTĘP

Świdośliwa olcholistna (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) jest nowym gatunkiem roślin jagodowych w Polsce. W ostatnich latach obserwuje się zainteresowanie tym gatunkiem, jako uzupełnienie lub alternatywę do uprawy porzeczki czarnej, czerwonej lub aronii, z uwagi na kombajnowy zbiór owoców. Pogłębiona analiza chromosomów w podziale metafazowym istniejących odmian uprawnych świdośliwy wykazała, iż są one tetraploidami ($2n=4x=68$), podobnie jak nowa, polska odmiana tego gatunku 'Amela'. W programach hodowlanych wielu roślin użytkowych często stosowane są poliploidy – genotypy o zwielokrotnionej liczbie chromosomów, które charakteryzują się większymi rozmiarami kwiatów, owoców, bujnym wzrostem oraz większą odpornością na czynniki stresowe biotyczne i abiotyczne.



Fot. 1. Owocujący krzew oraz owoce świdośliwy 'Amela'.

CEL BADAŃ

Celem badań było podwojenie liczby chromosomów i otrzymanie oktoploidów, tetraploidalnej odmiany świdośliwy olcholistej 'Amela', przy wykorzystaniu metody poliploidyzacji mitotycznej *in vitro*, jako rozszerzenie puli poliploidów do dalszych prac hodowlanych, w obrębie gatunku.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem do badań były pędy z 4-tygodniowych kultur *in vitro*, utrzymywane na pożywce do namnażania świdośliwy zawierającej: sole MS, 325 mg L⁻¹ CaCl₂, 175 mg L⁻¹ MgSO₄, 1,0 mg L⁻¹ BA, 1,0 mg L⁻¹ GA₃, 0,1 mg L⁻¹ IAA. Eksplantaty pędowe inkubowano przez 2 tygodnie (6 dni w ciemności i 8 dni w 16-godzinnym fotoperiodzie) na pożywce do namnażania z dodatkiem antymitytyków: kolchicyny (125, 250 mg L⁻¹), lub amiprofosu metylu (APM) (5 i 10 mg L⁻¹). Następnie pędy przekładano na pożywkę bez antymitytyków. Po 4 tygodniach oceniano współczynnik namnażania oraz fitotoksyczność antymitytyków poprzez liczbę pędów nekrotycznych. Poliploidy wykrywano metodą cytometrii przepływowej. Do określenia poziomu ploidalności użyto buforu Partec z barwnikiem DAPI, z wykorzystaniem diody UV (365nm). Status oktoploidów dla uzyskanych 6 klonów świdośliwy 'Amela' potwierdzono poprzez ocenę zawartości jądrowego DNA (około 4,6 pg 2C DNA). Oktoploidy namnażano i ukorzeniano w kulturach *in vitro* na pożywce ½ MS z dodatkiem 1,0 mg L⁻¹ IBA. Ukorzenione pędy poddawano aklimatyzacji i dalszej uprawie w szklarni.

Do analizy chromosomów w fazie metafazowej pobierano wierzchołki korzeni, które traktowano 2 mM 8-hydroksychinoliną przez 4 godziny, utrwalano w roztworze 3:1 etanolu i kwasu octowego 12 godzin, a następnie trawiono mieszaniną enzymów: 20% pektynazy, 1% celulozy i 1% celulozy w 37°C przez godzinę. Merystemy korzeniowe gnieciono w 45% kwasie octowym. Po zamrożeniu w ciekłym azocie, preparaty odwodniano w absolutnym etanolu, suszono i zabarwiono 2,5 g mL⁻¹ 4',6'-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI). Przypadki metafazy fotografowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, przy użyciu światła UV.

WYNIKI

Współczynnik namnażania pędów na pożywce po antymitytykach wynosił od 3,5 do 1,6 i był niższy niż w kontroli, jednak umożliwił rozmnażanie pędów traktowanych antymitytykami. Żaden z zastosowanych antymitytyków nie był fitotoksyczny dla pędów *in vitro* świdośliwy odm. 'Amela' (Tab. 1). Wykonano łącznie 106 analiz ploidalności i otrzymano 18 miksploidów. Pędy pochodzące z rozmnożenia miksploidów poddawano dalszej analizie. Większość z nich okazała się tetraploidalna. Na podstawie analiz cytometrycznych wyselekcjonowano w kulturach *in vitro* 6 oktoploidów: 3 po traktowaniu 250 mg L⁻¹ kolchicyny: B6/2-8x, B21-8x, B23-8x, 2 po traktowaniu 5 mg L⁻¹ APM: H5-8x, H16-8x oraz G10-8x po traktowaniu 10 mg L⁻¹ APM.

Oktoploidy różniły się fenotypowo od swoich odpowiedników tetraploidalnych były krótsze, grubsze, posiadały ciemniejsze i drobniejsze liście. W przypadku oktoploidów zaobserwowano większe trudności w ukorzenieniu pędów *in vitro* (Tab. 2, Fot. 4 a-f). Odszetek ukorzenionych pędów wynosił od 14,6% dla IV klonu do 66,7% dla V klonu. Na tym etapie wystąpiły znaczne różnice w liczbie i długości korzeni oraz procencie pędów ukorzenionych pomiędzy klonem III-B23-8x a pozostałymi. Rośliny oktoploidalne aklimatyzowano i uprawiano w szklarni. Status oktoploidalny uzyskanych klonów został potwierdzony poprzez ocenę zawartości jądrowego DNA (około 4,6 pg 2C DNA) ($2n=8x=136$) (Fot. 3). Ponowne analizy ploidalności wykazały, iż klon III-B23-8x jest tetraploidalny a część roślin klonu V-H16-8x to aneuploidy (Tab. 2, Rys 1 d i Fot. 4 c i e). Rośliny oktoploidalne wykazywały tendencję do przedwczesnego wchodzenia w spoczynek, objawiającego się zahamowaniem wzrostu. U oktoploidów wielkość aparatów szparkowych i ich liczba na 1 mm² powierzchni liścia były mniejsze w porównaniu z tetraploidami (Tab. 3, Fot. 2).

Tab. 1. Rozmnażanie *in vitro* świdośliwy 'Amela' po traktowaniu antymitytykami.

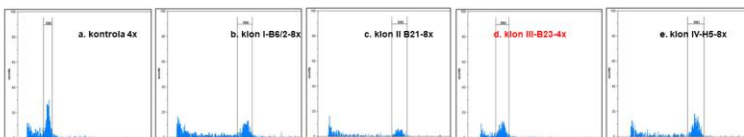
Pożywka	Kontrola	Kolchicyna 125 mg/l	Kolchicyna 250 mg/l	APM 5 mg/l	APM 10 mg/l
Współczynnik namnażania (szt.)	4,5	3,5	2,7	2,3	1,6
Pędy nekrotyczne (%)	0	0	0	0	0

Tab. 2. Ukorzenianie *in vitro* rośliny kontrolnej oraz oktoploidalnych klonów świdośliwy 'Amela'.

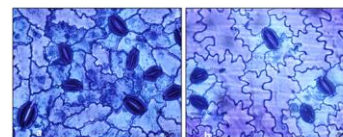
Oktoploid	Wysokość pędu (cm)	Liczba korzeni (szt.)	Długość korzeni (cm)	Procent ukorzenienia (%)
Kontrola 4x	1,9	1,6	1,5	84,5
Klon I B6/2-8x	1,3	0,8	1,7	35,1
Klon II B21-8x	1,3	0,8	1,6	43,8
Klon III B23-8x	1,9	1,4	6,2	75,1
Klon IV H5-8x	1,4	0,2	1,4	14,6
Klon V H16-8x	1,7	1,0	3,7	66,7
Klon VI G10-8x	1,4	0,5	1,9	44,1

Tab. 3. Liczba i długość aparatów szparkowych rośliny kontrolnej oraz oktoploidalnego klonu świdośliwy 'Amela'.

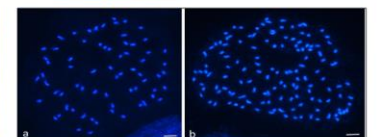
Genotyp	Liczba (mm ²)	Długość (µm)
Kontrola 4x	76,3	422,5
Oktoploid klon III-B218x	44,2	379,5



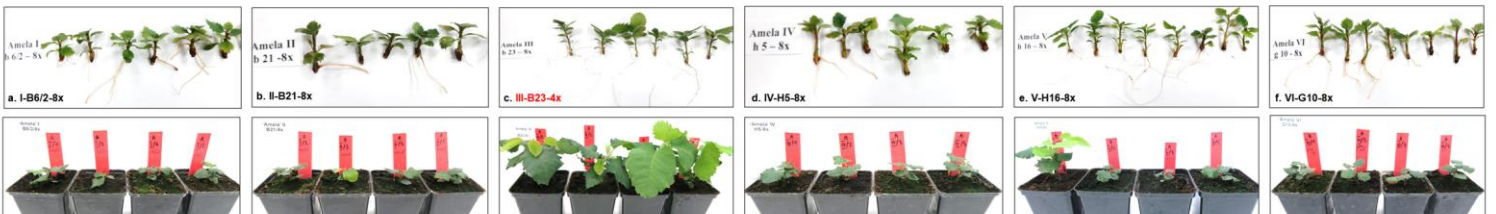
Rys. 1. a-e. Histogramy cytometrii przepływowej zawartości 2C DNA wybranych klonów świdośliwy 'Amela': a. kontrola 4x, b. klon I-B6/2-8x, c. klon II-B21-8x, d. III-B23-4x, e. IV-H5-8x.



Fot. 2. Aparaty szparkowe świdośliwy 'Amela': a. kontrola 4x, b. oktoploid klon III-B21-8x.



Fot. 3. Chromosomy w podziale metafazowym: a. kontrola ($2n=4x=68$), b. oktoploid ($2n=8x=136$).



Fot. 4 a-f. Ukorzenianie pędów *in vitro* i aklimatyzacja oktoploidalnych klonów świdośliwy 'Amela': a. I-B6/2-8x, b. II-B21-8x, c. III-B23-4x, d. IV-H5-8x, e. V-H16-8x, f. VI-G10-8x.

WNIOSKI

- Opisana metoda poliploidyzacji okazała się skuteczna i pozwoliła na otrzymanie oktoploidów świdośliwy olcholistej odmiany 'Amela'.
- Oktoploidy otrzymano po traktowaniu 250 mg L⁻¹ kolchicyny oraz 5 i 10 mg L⁻¹ APM.
- U dwóch z sześciu otrzymanych oktoploidów, pod wpływem rozmnażania w kulturach *in vitro*, odnotowano powrót do statusu tetraploidalnego.
- Nowo uzyskane oktoploidy świdośliwy wykazywały powolny wzrost i tendencję do przedwczesnego spoczynku.
- Przypuszcza się, że zjawisko powolnego wzrostu i przedwczesnego spoczynku nowo powstałych oktoploidów może być związane ze zmianą poziomu wzorca metylacji DNA.

