

MAŁGORZATA PODWYSZYŃSKA

MONIKA MARKIEWICZ

IWONA SOWIK

AGNIESZKA WOJTANIA

KRZYSZTOF KLAMKOWSKI

AGATA BRONIAREK-NIEMIEC

DOROTA KUCZYŃSKA

TADEUSZ MALINOWSKI

JOANNA PUŁAWSKA

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

Kierownik Tematu: dr hab. Małgorzata Podwyszynska Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice tel. +48 468345353, e-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.20.2018, Zadanie 70.

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

Induction of genetic variability of apple via polyploidization *in vitro* and phenotypic and genetic assessment of polyploids obtained in relation to their diploid counterparts

Słowa kluczowe: *Malus × domestica*, *in vitro*, poliploidyzacja, tetraploidy, zmienność genetyczna,
AFLP, MSAP

WSTĘP

Jednym z ważnych źródeł zmienności jest proces poliploidyzacji. Poliploidy — genotypy o wielokrotnej 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 ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pinova’, Co-op 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). W roku 2018 badania obejmowały ocenę uzyskanych autotetraploidów po względem cech morfologicznych, parametrów fizjologicznych oraz podatności na ww. patogeny, a także zmian w strukturze i stopniu metylacji DNA oraz wielkości genomu. Prace prowadzono w ramach 5 tematów badawczych.

TEMAT 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 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 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⁻¹]), 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 (jw.). 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 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 zmienione genetycznie według AFLP) w porównaniu do diploida wykonano, wykorzystując '1D Ligation Sequencing Kit', na sekwencjonatorze 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. Natomiast nie wykryto zmian w zawartości jądrowego DNA. 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 5000–25000 nt.

TEMAT 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 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' przeprowadzono 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.