

mgr inż. Monika Działkowska

**Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni pod
względem cech morfologicznych, anatomicznych,
odporności na stres suszy oraz zdolności do
krzyżowania**

Phenotypic evaluation of apple autotetraploids in terms of morphological
and anatomical traits, drought stress tolerance and crossing ability

Praca doktorska

Doctoral thesis

Promotor:

prof. dr hab. Małgorzata Podwyszyńska
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biologii Stosowanej

Promotor pomocniczy:

dr Danuta Wójcik
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Biologii Stosowanej

Praca doktorska została wykonana w ramach programu badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi podczas realizacji zadania badawczego nr 49 pt. „Tetraploidalna jabłoń jako źródło odporności na stresy biotyczne i abiotyczne – analiza mechanizmów odporności na zarzę ogniewą, parcha jabłoni i suszę oraz ocena zdolności do krzyżowania” w latach 2021-2026.

*Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotor **Prof. dr hab. Małgorzacie Podwyszyńskiej**, za nieocenione wsparcie, cierpliwość oraz merytoryczną pomoc na każdym etapie realizacji pracy doktorskiej. Jej wiedza, doświadczenie i zaangażowanie były dla mnie nieocenionym źródłem inspiracji i motywacji do pogłębiania badań naukowych.*

*Szczególne podziękowania kieruję do mojego Promotora pomocniczego **dr Danuty Wójcik**, za cenne wskazówki, życzliwość i wsparcie merytoryczne, które znacząco wpłynęły na jakość niniejszej pracy.*

*Dziękuję także całemu zespołowi **Zakładu Biologii Stosowanej- IO-PIB** za pomoc w realizacji badań oraz stworzenie przyjaznej atmosfery sprzyjającej pracy naukowej.*

Pracę tę dedykuję rodzinie.

Skierniewice, dn. 30.09.2025

Tytuł / stopień naukowy Promotora: dr

Imię i nazwisko Promotora: Danuta Wójcik

Dziedzina naukowa: nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina naukowa: nauki biologiczne

Oświadczenie Promotora pomocniczego o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

mgr inż. Moniki Działkowskiej

(tytuł/stopień / imię i nazwisko Autora rozprawy doktorskiej)

pt.: Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni pod względem cech morfologicznych, anatomicznych, odporności na stres suszy oraz zdolności do krzyżowania

Jako Promotor pomocniczy przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze
- dyscyplinie naukowej: rolnictwo i ogrodnictwo

30.09.2025r., Danuta Wójcik

(data i podpis Promotora pomocniczego)

Skierniewice, dn. 30.09.2025

Tytuł / stopień naukowy Promotora: prof. dr hab.

Imię i nazwisko Promotora: Małgorzata Podwyszyńska

Dziedzina naukowa: nauki rolnicze

Dyscyplina naukowa: rolnictwo i ogrodnictwo

Oświadczenie Promotora o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani

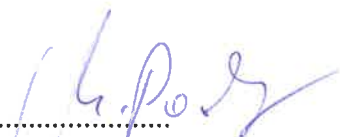
mgr inż. Moniki Działkowskiej

(tytuł/stopień / imię i nazwisko Autora rozprawy doktorskiej)

pt.: Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni pod względem cech morfologicznych, anatomicznych, odporności na stres suszy oraz zdolności do krzyżowania

Jako Promotor przyjmuję niniejszą rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora w:

- dziedzinie nauk: nauki rolnicze
- dyscyplinie naukowej: rolnictwo i ogrodnictwo

30.09.2025r. 

(data i podpis Promotora)

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data: 30.09.2025 Podpis autora rozprawy doktorskiej: 

Spis Treści

Streszczenie	10
Summary	11
Wykaz stosowanych skrótów	13
Wstęp	16
1. Przegląd literatury	18
1.1. Poliplodia i jej znaczenie w ewolucji.....	18
1.1.1. Powstawanie poliploidów.....	19
1.1.2. Wpływ poliploidyzacji na zmiany fenotypowe roślin.....	22
1.1.3. Poliploidy jabłoni	23
1.2. Stres suszy u roślin.....	25
1.2.1. Mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na stres suszy.....	26
1.2.2. Stres suszy u jabłoni	32
1.3. Hodowla roślin	33
1.3.1 Hodowla poliploidalna	34
1.3.2 Hodowla jabłoni	36
2. Hipoteza badawcza i cel pracy	40
3. Materiał i metody	41
3.1. Ocena fenotypowa autotetraploidiów jabłoni.....	41
3.1.1. Materiał roślinny.....	41
3.1.2. Ocena liści	42
<i>Rozmiary liści</i>	42
<i>Zawartość chlorofilu w liściach</i>	42
<i>Wielkość i gęstość aparatów szparkowych</i>	42
3.1.3. Ocena kwitnienia	42
<i>Wielkość kwiatów i liczba kwiatów w kwiatostanie</i>	43
<i>Analiza wielkości, żywotności pyłku i kiełkowanie pyłku</i>	43
3.1.4. Ocena owoców i nasion	43
<i>Masa owoców i powierzchnia rumieńca</i>	44
<i>Masa nasion</i>	44
<i>Jędrność owoców</i>	44
<i>Oznaczanie indeksu skrobiowego</i>	44

<i>Oznaczanie zawartości ekstraktu</i>	45
<i>Oznaczanie kwasowości miareczkowej</i>	45
<i>Statystyka</i>	46
3.2. Ocena tolerancji na stres suszy autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidów.....	46
3.2.1. Materiał roślinny i metodyka doświadczenia	46
<i>Ocena wzrostu roślin</i>	47
<i>Potencjał wody w liściach</i>	47
<i>Wymiana gazowa</i>	47
<i>Zawartość chlorofilu</i>	48
<i>Sprawność aparatu fotosyntetycznego</i>	48
3.2.3. Ocena reakcji na poziomie biochemicznym.....	48
<i>Homogenizacja próbek do oznaczania enzymów antyoksydacyjnych</i>	48
<i>Pomiary zawartości białek rozpuszczalnych</i>	48
<i>Aktywność katalazy</i>	49
<i>Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej</i>	49
<i>Aktywność peroksydazy</i>	49
<i>Zawartość proliny</i>	50
<i>Zawartość MDA</i>	50
3.2.3. Ocena reakcji na poziomie molekularnym	50
<i>Izolacja RNA z liści jabłoni</i>	50
<i>Analiza ekspresji genów metodą qRT-PCR</i>	51
<i>Statystyka</i>	52
3.3. Ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni oraz ocena siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych	52
3.3.1. Materiał roślinny.....	52
3.3.2. Ocena efektywności krzyżowania	53
<i>Analiza poziomu ploidalności</i>	54
<i>Analiza zawartości jądrowego DNA</i>	55
<i>Analiza liczby chromosomów</i>	55
<i>Statystyka</i>	55
4. Wyniki	56
4.1. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni.....	56
4.1.1. Ocena liści	56

<i>Rozmiar liści</i>	56
<i>Zawartość chlorofilu (CCI) w liściach</i>	58
<i>Wielkość i gęstość aparatów szparkowych</i>	58
4.1.2. Ocena kwitnienia	61
<i>Termin i intensywność kwitnienia</i>	61
<i>Wielkość i liczba kwiatów w kwiatostanie</i>	64
<i>Analiza wielkości i żywotności pyłku</i>	67
4.1.3. Ocena owoców i nasion	70
<i>Masa owoców i nasion, powierzchnia rumieńca</i>	70
<i>Jędrność owoców, indeks skrobiowy kwasowość miareczkowa, zawartość ekstraktu</i>	73
4.2. Ocena tolerancji na stres suszy autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidów	75
4.2.1. Ocena wzrostu roślin	75
4.2.1. Ocena reakcji na poziomie fizjologicznym	77
4.2.2. Ocena reakcji na poziomie biochemicznym	80
4.2.3. Ocena reakcji na poziomie molekularnym	82
4.3. Ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni oraz ocena siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych	84
5. Dyskusja	96
6. Wnioski	109
7. Spis literatury	110
Dorobek naukowy autora	132

Streszczenie

Poliploidyacja, czyli zwiększenie liczby zestawów chromosomów w komórkach roślinnych, stanowi istotne narzędzie w nowoczesnej hodowli roślin sadowniczych. W Zakładzie Biologii Stosowanej Instytutu Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach opracowano efektywną metodę wytwarzania tetraploidów jabłoni *in vitro*, w wyniku której uzyskano liczne stabilne genotypy tetraploidalne.

Celem niniejszych badań była szczegółowa ocena ww. tetraploidów w odniesieniu do ich diploidalnych odpowiedników pod względem cech morfologicznych, fizjologicznych, cytologicznych, zdolności do krzyżowania i tolerancji na stres suszy.

Ocenę autotetraploidów jabłoni na poziomie wybranych cech fenotypowych i molekularnych prowadzono na 5-8-letnich drzewach szczepionych na podkładce M.9, w zależności od zagadnienia, z udziałem jednej, dwóch lub trzech odmian ‘Redchief’, ‘Pinova’ i ‘Free Redstar’ oraz ich wybranych klonów tetraploidalnych. Badania wykazały, że autotetraploidy jabłoni znacząco różniły się fenotypowo od swoich diploidalnych odpowiedników. W porównaniu do diploidów liście u autotetraploidów były wyraźnie krótsze i bardziej okrągłe, zawierały istotnie więcej chlorofilu i charakteryzowały się większymi aparatami szparkowymi, ale mniejszą ich liczbą na jednostkę powierzchni, co mogło wskazywać na bardziej oszczędne gospodarowanie wodą w warunkach suszy. Kwiaty autotetraploidów były istotnie większe, a pyłek mniej żywotny niż u diploidów. W porównaniu do diploidów owoce tetraploidów były większe, zawierały więcej ekstraktu ogólnego oraz kwasów organicznych, ale bardziej podatne na zaburzenia fizjologiczne - szklistość miąższu i gorzką plamistość podskórną. W odniesieniu do diploidów autotetraploidy wykazywały wyższą tolerancję na deficyt wody w podłożu na co wskazywały wyższe u tetraploidów poddanych stresowi suszy parametry wzrostu, a także wyższa zawartość chlorofilu, lepsze utrzymanie potencjału wodnego liści, mniejszy spadek fotosyntezy oraz większa stabilność parametrów fluorescencji chlorofilu (Fv/Fm). W odpowiedzi na stres suszy tetraploidy jabłoni wykazywały mniejsze uszkodzenia oksydacyjne niż diploidy. Potwierdziły to obserwowany u tetraploidów wyższy poziom proliny oraz niższa zawartość MDA, a także wyższa aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, POD) i jednocześnie wcześniej indukowana i wyższa ekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (SOD, CAT, APX, GPX). W wyniku krzyżowań interploidalnych uzyskano liczne siewki triploidalne. Jednak efektywność takich krzyżowań u jabłoni zależała od kierunku krzyżowania. Była znacznie wyższa w przypadku, gdy roślinami matecznymi były diploidy, a roślinami ojcowskimi (dawcami pyłku) tetraploidy ($2x \times 4x$) - wynosiła średnio około 0,16 siewki na zapyłony kwiat (78 siewek na 480 zapyłowych kwiatów). W krzyżowaniach odwrotnych ($4x \times 2x$) efektywność ta była czterokrotnie niższa - średnio około 0,04 siewki na zapyłony kwiat (33 siewki na 840 zapyłonych kwiatów). Niemal wszystkie siewki uzyskane z krzyżowań interploidalnych okazały się mieszańcami na co wskazywała ich triploidalność ($3x$), potwierdzona na podstawie analiz cytometrycznych

poziomu ploidalności i zawartości jądrowego DNA (wykonanych metodą cytometrii przepływownej), a także obserwacji mikroskopowych liczby chromosomów ($2n = 3x = 51$).

Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszego wykorzystania wybranych autotetraploidów jabłoni w programach hodowlanych, ze szczególnym uwzględnieniem poprawy odporności na niekorzystne warunki środowiskowe oraz uzyskiwania wartościowych genotypów triploidalnych.

Summary

Polyploidization, i.e. increasing the number of chromosome sets in plant cells, is an important tool in modern fruit plant breeding. The Department of Applied Biology of the National Institute of Horticultural Research (NIHR) in Skierniewice developed an effective method for producing apple tetraploids *in vitro*, resulting in numerous stable tetraploid genotypes.

The aim of this study was to thoroughly evaluate these tetraploids in relation to their diploid counterparts in terms of morphological, physiological, cytological traits, cross-breeding ability, and drought tolerance.

The evaluation of autotetraploid apple trees at the level of selected phenotypic and molecular traits was conducted on 5-8-year-old trees grafted onto M.9 rootstock, depending on the subject, using one, two, or three cultivars: 'Redchief', 'Pinova', and 'Free Redstar', and their selected tetraploid clones. Studies have shown that autotetraploid apples differed significantly phenotypically from their diploid counterparts. Compared to diploids, autotetraploid leaves were shorter and rounder, contained significantly more chlorophyll, and were characterized by larger stomata, but fewer stomata per unit area, which could indicate more efficient water management in drought conditions. Autotetraploid flowers were significantly larger, and pollen was less viable than diploids. Compared to diploids, tetraploid fruits were larger, contained more total solids and organic acids, but were more susceptible to physiological disorders such as glassy pulp and bitter pit. Compared to diploids, autotetraploids demonstrated greater tolerance to water deficit in the soil, as evidenced by higher growth parameters in drought-stressed tetraploids, higher chlorophyll content, better leaf water potential maintenance, lesser photosynthesis decline, and greater stability of chlorophyll fluorescence parameter (Fv/Fm). In response to drought stress, apple tetraploids exhibited less oxidative damage than diploids. This was confirmed by higher proline levels and lower MDA content observed in tetraploids, as well as higher activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD) and, concomitantly, earlier induced and higher expression of genes encoding antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX, GPX). Interploid crosses produced numerous triploid seedlings. However, the efficiency of such crosses in apple trees depended on the direction of the cross. It was significantly higher when the mother plants were diploids and the father plants (pollen donors) were tetraploids ($2x \times 4x$), averaging approximately 0.16 seedlings per pollinated flower (78 seedlings per 480 pollinated flowers). In reciprocal crosses ($4x \times 2x$), this efficiency was four times lower, averaging approximately 0.04 seedlings per pollinated flower (33 seedlings per 840 pollinated flowers). Almost all seedlings obtained from interploid crosses proved to be hybrids, as indicated by their triploidy ($3x$), confirmed by flow cytometric analyses of ploidy level and nuclear DNA content, as well as microscopic observations of chromosome number ($2n = 3x = 51$).

The obtained results constitute the basis for further use of selected autotetraploid apples in breeding programs, with particular emphasis on improving resistance to unfavorable environmental conditions and obtaining valuable triploid genotypes.

Wykaz stosowanych skrótów

2C – zawartość jądrowego DNA w komórce somatycznej (ang. nuclear DNA content in somatic cell)

2n – zgotyczna liczba chromosomów, liczba chromosomów w komórce somatycznej danego genotypu, posiadająca 2 zestawy chromosomów pochodzących od każdego z rodziców (ang. zygotic chromosome number)

2x – diploid (ang. diploid)

4x – tetraploid (ang. tetraploid)

ABA – kwas abscysynowy (ang. abscisic acid)

AFLP – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów DNA (ang. amplified fragment length polymorphism)

APX – askorbinianowa peroksydaza (ang. ascorbate peroxidase)

BBCH – skala rozwojowa roślin (ang. BBCH scale – growth stages of plants)

CAT – katalaza (ang. catalase)

CCI – względna zawartość chlorofilu (ang. chlorophyll content index)

cDNA – komplementarny DNA, uzyskany poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy RNA (ang. complementary DNA)

CRISPR/Cas9 – system edycji genomu (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9)

CTIFL – Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (ang. French Technical Centre for Fruits and Vegetables)

DAPI – barwnik fluorescencyjny wiążący DNA (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

DREB – czynnik transkrypcyjny, białko wiążące element odpowiedzi na odwodnienie (ang. dehydration-responsive element-binding protein)

E – transpiracja (ang. transpiration rate)

ERF – czynnik transkrypcyjny odpowiedzi na etylen (ang. ethylene response factor)

FCM – cytometria przepływowa (ang. flow cytometry)

F_v/F_m – maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II (ang. maximum quantum yield of photosystem II)

FW – świeża masa (ang. fresh weight)

GCA – ogólna zdolność kombinacyjna (ang. general combining ability)

GISH – hybrydyzacja fluorescencyjna z użyciem genomowego DNA (ang. genomic in situ hybridization)

GPX – peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase)

GR – reduktaza glutationowa (ang. glutathione reductase)

GS – sekcja genomowa (ang. genomic section)

Gs – przewodność szparkowa (ang. stomatal conductance)

IO-PIB – Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy (ang. The National Institute of Horticultural Research)

MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase)

MAS – selekcja wspomagana markerami (ang. marker-assisted selection)

MDA – malondialdehyd (ang. malondialdehyde)

mRNA – matrycowy RNA (ang. messenger RNA)

MSAP – polimorfizm metylacji sekwencji amplifikowanych (ang. methylation-sensitive amplified polymorphism)

mSWP – spadek potencjału wodnego łodygi (ang. minimum stem water potential)

MYB – jedna z rodzin czynników transkrypcyjnych (ang. myeloblastosis transcription factors)

MYC – rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. myelocytomatosis transcription factors)

NAC – jedna z rodzin czynników transkrypcyjnych (ang. NAM, ATAF1-2, CUC2 transcription factors)

NIP – białko integralne błony związane z kanałami akwaporynowymi (ang. nodulin-26-like intrinsic protein)

NPQ – niefotochemiczne wygaszanie fluorescencji (ang. non-photochemical quenching)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

PI – jodek propidyny (ang. propidium iodide)

PIP – białko integralne plazmolemy (akwaporyna) (ang. plasma membrane intrinsic protein)

Pn – natężenie fotosyntezy netto (ang. net photosynthetic rate)

POX – peroksydaza (ang. peroxidase)

PXs – peroksydazy klasy III (ang. class III peroxidases)

qRT-PCR – ilościowa odwrotna transkrypcja-reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative reverse transcription PCR)

QTL – locus cechy ilościowej (ang. quantitative trait locus)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)

RNAi – interferencja RNA (ang. RNA interference)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)

RuBP – rybulozo-1,5-bisfosforan (ang. ribulose-1,5-bisphosphate)

SCA – szczególna zdolność kombinacyjna (ang. specific combining ability)

SIP – białko integralne tonoplastu (ang. small basic intrinsic protein)

siRNA – mały interferujący RNA (ang. small interfering RNA)

SOD – dysmutaza nadtlenkowa (ang. superoxide dismutase)

SSR – sekwencje mikrosatelitarne (ang. simple sequence repeats)

TBA – kwas tiobarbiturowy (ang. thiobarbituric acid)

TCA – kwas trikarboksylowy (ang. tricarboxylic acid)

TFs – czynniki transkrypcyjne (ang. transcription factors)

TIP – białko integralne tonoplastu (ang. tonoplast intrinsic protein)

Tr – natężenie transpiracja (ang. transpiration)

WGD – całogenomowa duplikacja (ang. whole genome duplication)

WRKY – rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. WRKY transcription factors)

XIP – białko integralne błony o niejednorodnej charakterystyce (ang. X intrinsic protein)

Wstęp

Jabłoń (*Malus × domestica* Borkh.) jest jedną z najważniejszych roślin sadowniczych na świecie, zarówno pod względem powierzchni upraw, jak i znaczenia gospodarczego.

W Europie Polska zajmuje czołowe miejsce w produkcji jabłek i od lat jest ich największym producentem na kontynencie. Uprawa jabłoni stanowi główny kierunek krajowego sadownictwa, a jabłka mają istotny udział w eksporcie owoców oraz znaczenie społeczne i kulturowe — są powszechnie obecne w diecie, przemyśle spożywczym i tradycji kulinarnej. Dynamiczne zmiany klimatu, coraz częstsze okresy suszy, skrajne temperatury, zmniejszona dostępność wody oraz wzrost presji patogenów i szkodników wpływają negatywnie na plonowanie, jakość owoców oraz trwałość sadów. Wobec tych wyzwań, współczesna hodowla odmian jabłoni stoi przed koniecznością poszukiwania nowych strategii poprawy odporności roślin przy jednoczesnym zachowaniu lub podniesieniu ich wartości użytkowej i handlowej. Jednym z obiecujących podejść wspomagających klasyczną hodowlę jest poliploidyzacja, czyli celowe zwiększanie liczby zestawów chromosomów w genomie roślin. Naturalne i sztuczne poliploidy wykazują szereg zmian fizjologicznych, morfologicznych i molekularnych wynikających z podwojenia materiału genetycznego.

Do najczęstszych efektów poliploidyzacji należą: większe rozmiary komórek, zmiana anatomii liści, łądyg i aparatów szparkowych, zwiększona zawartość metabolitów wtórnych, poprawiona odporność na stesy abiotyczne i biotyczne, wydłużony cykl rozwojowy oraz często – zmniejszona płodność. Poliploidyzacja odgrywa kluczową rolę w ewolucji roślin, a od dziesięcioleci znajduje zastosowanie w hodowli odmian warzyw, zbóż, roślin ozdobnych oraz sadowniczych. U roślin sadowniczych, takich jak jabłoni, poliploidyzacja stwarza nowe możliwości zarówno pod względem modyfikacji cech jakościowych (np. wielkości i trwałości owoców), jak i zwiększania odporności na czynniki środowiskowe. Poliploidy mogą cechować się bardziej stabilnym funkcjonowaniem mechanizmów fizjologicznych i antyoksydacyjnych, lepszą gospodarką wodną oraz zwiększoną tolerancją na suszę czy zasolenie. Ponadto, zmiany w ekspresji genów u roślin poliploidalnych mogą wpływać na ich większą zdolność do adaptacji i skuteczniejszą reakcję na stres. W Zakładzie Biologii Stosowanej Instytutu Ogrodnictwa – PIB, opracowano skuteczną metodę poliploidyzacji *in vitro*, która umożliwiła uzyskanie licznych autotetraploidów sześciu odmian jabłoni. Wstępne badania wykazały, że niektóre z uzyskanych tetraploidów wykazują korzystne zmiany fenotypowe, w tym zwiększoną odporność na suszę i choroby, a także zmodyfikowaną morfologię liści i kwiatów. Uzyskane formy stanowią nie tylko źródło materiału badawczego, lecz także wartościowe komponenty do dalszych prac hodowlanych. Szczególne znaczenie mają również krzyżowania interploidalne ($2x \times 4x$ i $4x \times 2x$), które pozwalają na uzyskiwanie mieszańców triploidalnych – często łączących zalety obu typów rodzicielskich. Triploidy, charakteryzujące się większymi owocami, wysoką jakością handlową oraz ograniczoną płodnością, mogą stanowić cenny materiał dla nowoczesnych sadów towarowych.

Jednak ich efektywne uzyskiwanie wymaga znajomości biologii pyłku, zdolności do krzyżowania oraz dokładnej oceny poziomu ploidalności potomstwa. Zastosowanie poliploidyzacji w hodowli jabłoni otwiera nowe perspektywy dla doskonalenia odmian dostosowanych do zmieniających się warunków klimatycznych i potrzeb rynku. Ocena właściwości fizjologicznych, genetycznych i hodowlanych form poliploidalnych oraz ich udział w krzyżowaniach może w istotny sposób przyczynić się do rozwoju nowoczesnych programów hodowlanych w sadownictwie.

1. Przegląd literatury

1.1. Poliploidia i jej znaczenie w ewolucji

Poliploidia, definiowana jest jako obecność więcej niż dwóch kompletów chromosomów w organizmie, jest kluczowym zjawiskiem w ewolucji i genetyce roślin (Meirmans i Kolář, 2025). Jednym z procesów poliploidyzacji jest duplikacja całego genomu (ang. whole genome duplication, WGD). Poliploidyzacja zwiększa bioróżnorodność i dostarcza nowy materiał genetyczny do ewolucji (Levin, 2002). W przeciwieństwie do mutacji punktowych, które prowadzą do stopniowych zmian w genomie, poliploidyzacja prowadzi do nagłego zwielokrotnienia całego zestawu chromosomów, co może powodować znaczące modyfikacje w ekspresji genów, regulacji epigenetycznej oraz funkcjonalności białek, może także wywoływać mutacje (Jiao i in., 2011; Van De Peer i in., 2017). Zainteresowanie poliploidami sięga początku XX wieku (Hegarty i in., 2013). Szacuje się, że około 95% paproci, 15% nagonasiennych oraz ponad 70% gatunków roślin okrytonasiennych przeszło w swojej historii ewolucyjnej przynajmniej jeden epizod podwojenia liczby chromosomów (Wendel, 2000; Soltis i in., 2014; Chen i in., 2023). Większość eukariotów jest diploidalna ($2n=2x$), posiada dwa zestawy chromosomów. Poliploidia miała fundamentalne znaczenie w ewolucji roślin użytkowych, większość najważniejszych gatunków rolniczych, w tym pszenica (*Triticum aestivum*, 6x), ziemniak (*Solanum tuberosum*, 4x), rzepak (*Brassica napus*, 4x), bawełna (*Gossypium hirsutum*, 4x), truskawka (*Fragaria × ananassa*, 8x) powstało w procesie poliploidyzacji. Poliploidy te cechują się większymi organami i większą produktywnością (Feldman i Levy, 2005; Li, 2024). Wyróżniamy cztery podstawowe typy poliploidów: autopoliploidy, allopoliploidy, autoallopoliploidy i segmentowe allopoliploidy (Grant, 1981; Rogalska i in., 2007; Huang Zhu, 2019). Autoploiploidy obejmują organizmy, które mają zwielokrotniony zestaw chromosomów jednego gatunku, typowy wzór genomu definiujący autoploiploidy zawiera pojedynczą powtarzającą się literę (np. AAAA, BBBB). Autoploiploidy podczas mejozy tworzą multiwalenty, które mogą nieprawidłowo przemieszczać się do komórek potomnych, tworząc gamety o zróżnicowanej liczbie chromosomów, co czasem obniża ich płodność. Mechanizm podwajania liczby chromosomów może zachodzić spontanicznie lub być indukowany chemicznie np. za pomocą kolchicyny, oryzaliny czy trifluraliny (Ramsey i Schemske, 2002; Dhooghe i in. 2011). Przykładami roślin autoallopoliploidalnych są między innymi triploidalne banany (*Musa* spp.), które dzięki bezpłodności nie wytwarzają twardych nasion czy tetraploidalna lucerna (*Medicago sativa*) charakteryzująca się większą biomasą (Parisod i in., 2010). Allopoliploidy i autoallopoliploidy to hybrydy mniej lub bardziej spokrewnionych gatunków, powstają na skutek hybrydyzacji między dwoma różnymi gatunkami, u których następuje podwojenie liczby chromosomów spontanicznie lub indukowane sztucznie w celu przywrócenia płodności. Autoallopoliploidy powstają w wyniku podwojenia genomu po utworzeniu allopoliploidu. Wzorem opisującym tę grupę poliploidów jest AABB, gdzie genom

A pochodzi od jednego, a genom B od drugiego gatunku rodzicielskiego (Ramsey i Schemske, 2002; Tate i in., 2005, Rogalska i in. 2007). Do ekonomicznie ważnych allopoliploidów należą m.in. bawełna (*Gossypium hirsutum* L.), która powstała w wyniku hybrydyzacji między przedstawicielem diploidalnego gatunku z genomem A (np. *Gossypium arboreum*), a gatunkiem z genomem D (np. *Gossypium raimondii*), po czym doszło do spontanicznego podwojenia liczby chromosomów. Innym przykładem jest tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L.), będący wynikiem krzyżowania *Nicotiana sylvestris* i *Nicotiana tomentosiformis* (Hu i in., 2019; Berbec i Doroszevska, 2020; Kong i in., 2025). Segmentalne allopoliploidy, to formy pośrednie między allopoliploidami i autopoliploidami, a ich chromosomy są częściowo homologiczne, co oznacza, że mogą rekombinować, ale w mniejszym stopniu niż u autopoliploidów. Ten typ poliploidii obserwuje się u niektórych gatunków traw i bawełny (Stebbins, 1947; Chester i in., 2012). Segmentalne poliploidy mogą łączyć cechy zarówno autopoliploidów (większa plastyczność genomowa) jak i allopoliploidów (stabilniejsza segregacja chromosomów), co może zwiększać ich zdolność adaptacyjną. Występują też poliploidy aneuploidalne, o nieregularnej liczbie chromosomów co wynika z błędów w segregacji podczas podziałów komórkowych. Przykładem może być truskawka (*Fragaria × ananassa*), która jest oktoploidem ($2n=8x=56$), ale może wykazywać różnice w liczbie chromosomów między odmianami (Hummer i in., 2009). Szczególnym przypadkiem poliploidii jest endopoliploidia (endoreplikacja, endoreduplikacja), gdzie komórki w obrębie jednego organizmu różnią się zawartością jądrowego DNA (Koprivý i in., 2022). Zjawisko to wynika z lokalnego zwielokrotnienia DNA w jądrze komórkowym bez jego podziału, obserwowanego w niektórych tkankach. Endopoliploidia często występuje w tkankach o wysokiej aktywności metabolicznej, jest to strategia adaptacyjna pozwalająca na zwiększenie produkcji białek i metabolitów wtórnych w warunkach stresowych lub zintensyfikowania wzrostu np. owoców (Leitch i Dodsworth, 2017; Qi i Zhang, 2020). Poliploidy mające więcej niż dwa zestawy chromosomów doświadczają istotnych zmian w biologii, fizjologii i zdolnościach adaptacyjnych (Comai, 2005; Van De Peer i in., 2017). Zjawisko poliploidyzacji odgrywa istotną rolę w ewolucji roślin, prowadząc do powstawania nowych gatunków, zwiększania zmienności genetycznej oraz wpływając na wiele cech fenotypowych, takich jak wielkość komórek, nasion czy kwiatów (Soltis i Soltis, 2009; Wendel i in., 2016).

1.1.1. Powstawanie poliploidów

W populacjach naturalnych poliploidy najczęściej powstają w przebiegu dwóch podstawowych procesów. Pierwszy obejmuje podwojenie liczby chromosomów w komórkach merystematycznych, najczęściej merystemu wierzchołkowego dając początek nowym pędom poliploidalnym lub miksploidalnym. Drugi proces to wytwarzanie przez rośliny niezredukowanych gamet - plemników lub komórek jajowych, które po połączeniu z normalną zredukowaną gametą umożliwiają powstanie

roślin triploidalnych lub co zdarza się bardzo rzadko, połączenia dwóch niezredukowanych gamet i powstania płodnego potomstwa (Sattler i in., 2016). Połączenie niezredukowanych gamet tego samego gatunku prowadzi do powstania autopoliploidu, natomiast fuzja niezredukowanych gamet różnych gatunków skutkuje powstaniem allopoliploidu. Formowanie niezredukowanych gamet może mieć podłoże genetyczne, czego przykładem są triploidalne tulipany, tzw. mieszańce Darwina. Powstają one w wyniku krzyżowania diploidalnych gatunków *Tulipa gesneriana* ($2n = 2x = 24$) i *Tulipa fosteriana*, spośród których *T. fosteriana* wykazuje genetyczną skłonność do tworzenia niezredukowanego pyłku ($2n$), co zostało potwierdzone w badaniach cytogenetycznych z wykorzystaniem techniki GISH (Marasek-Ciolakowska i in., 2018).

Poza podłożem genetycznym także czynniki środowiskowe, takie jak dostępność nowych nisz ekologicznych, temperatura, stres wodny, niedobór składników odżywczych i uszkodzenia roślin indukują pewien procent gamet $2n$. Krzyżowania między rasami lub odmianami tego samego gatunku zazwyczaj prowadzą do powstania allopoliploidów segmentalnych, które wyróżniają się obecnością homologicznych segmentów w chromosomach z różnych genomów. W związku z tym homologiczne chromosomy parują w mejozie, tak jak u diploidów, co umożliwia produkcję funkcjonalnych gamet. Ponadto, w procesie crossing-over dochodzi do wymiany odcinków chromatyd pomiędzy chromosomami homologicznymi w czasie mejozy (wymiany materiału genetycznego), w wyniku którego dodatkowo zwiększa się zmienność genetyczną (Zhang i in., 2019; Trojak-Goluch i in., 2021;).

Uznaje się, że poliploidy meiotyczne charakteryzują się większą zmiennością genetyczną niż diploidalni rodzice, wykazują także szerokie spektrum plastyczności genetycznej, które wynika z intensyfikacji/wyciszenia ekspresji genów (Jackson i Chen, 2010; Marburger i in., 2019). Główną przeszkodą w efektywnym stosowaniu poliploidyacji płciowej jest niska częstotliwość powstawania nieredukowalnych gamet ($2n$), które są kluczowe dla generowania potomstwa o zwiększonej liczbie chromosomów. W związku z tym opracowuje się różnorodne metody indukowania produkcji takich gamet. Tradycyjne techniki, takie jak traktowanie roślin z zawiązanymi pąkami kwiatowymi niskimi lub wysokimi temperaturami oraz ekspozycja na podtlenek azotu (N_2O), wpływają na mechanizmy mejozy, powodując jej zaburzenia i w efekcie powstawanie niezredukowanych gamet. Jednak te metody często cechuje ograniczona specyficzność i zmienna skuteczność, co motywuje do poszukiwania bardziej precyzyjnych rozwiązań (Dewitte i in., 2012; Sattler i in., 2016a). W tym kontekście obiecującą strategią jest zastosowanie interferencji RNA (RNAi) do celowego wyciszenia genów kluczowych dla przebiegu mejozy. RNAi działa poprzez specyficzne hamowanie ekspresji docelowych genów za pomocą małych interferujących RNA (siRNA), co pozwala na selektywną modulację procesu podziału komórkowego. Geny takie jak *SPO11*, odpowiedzialny za inicjację podwójnych pęknięć DNA niezbędnych do rekombinacji, *REC8*, uczestniczący w utrzymaniu spójności chromatyd siostrzanych, czy *OSD1*, regulator przejścia między fazami mejozy, są naturalnymi kandydatami do wyciszenia. Obniżenie ich aktywności poprzez RNAi prowadzi do zaburzeń

w prawidłowym przebiegu mejozy, skutkując powstawaniem gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów ($2n$) (Brownfield i Köhler, 2011).

Poliploidia w komórkach somatycznych może być wywołana przez zaburzenie rozdziału chromosomów w anafazie mitozy. W tym celu stosuje się czynniki stresowe takiej jak szok termiczny, uszkodzenie rośliny lub promieniowanie rentgenowskie. Najlepsze rezultaty uzyskuje się stosując bardzo wysokie lub bardzo niskie temperatury na początkowym etapie embriogenezy podczas pierwszych podziałów zygoty (Trojak-Goluch i in., 2021).

Jednak najczęściej wykorzystywaną metodą zwielokrotnienie liczby chromosomów w komórkach somatycznych jest poliploidyzacja mitotyczna przy użyciu związków chemicznych, tzw. antymitotyków, które zakłócają przebieg mitozy. Najdłużej i najczęściej stosowanym środkiem antymitotycznym jest kolchicina (Manzoor i in., 2019). Od kilku dekad coraz częściej stosuje się inne związki antymitotyczne takie, jak trifluralina, amiprofos metylu i oryzalina (Dhooghe i in., 2011; Talebi i in., 2017; Podwyszyńska i in., 2017; Gyani i in., 2025; Zhang i in., 2025). Często stosowaną metodą indukcji poliploidów jest moczenie nasion w wodnych roztworach inhibitorów mitozy. Kurtz i in., (2020) traktowali nasiona konopii siewnych (*Cannabis sativa*) 0,05% kolchiciną przez 12 godzin, co dało wysoki 26-64% wskaźnik indukcji tetraploidów. Oprócz moczenia nasion, można antymitotykami traktować również siewki, czy sadzonki pędowe (Dhamayanthi i in., 2010). Efektywność wytwarzania poliploidów zależy od stężenia antymitotyków. W zbyt wysokich dawkach nasila się ich działanie fitotoksyczne, co skutkuje zmniejszeniem przeżywalności lub nawet całkowitym zamieraniem eksplantatów, w zbyt niskich stężeniach antymitotyki nie indukują poliploidów (Podwyszyńska i in. 2018; Trojak-Goluch i in., 2021). Od wielu lat doskonalone są techniki poliploidyzacji z wykorzystaniem kultur roślinnych *in vitro*. Umożliwiają one większą kontrolę i standaryzację procesu poliploidyzacji, poprawiając wydajność i skracając czas uzyskiwania roślin poliploidalnych. Sukces poliploidyzacji *in vitro* zależy od wielu czynników takich jak dostępność do już opracowanych protokołów regeneracji eksplantatów *in vitro* danego gatunku, rodzaju, stężenia i czasu traktowania środkiem antymitotycznym i rodzaju eksplantatu (Dhooghe i in., 2011). Najczęstszym stosowanym materiałem roślinnym do indukcji poliploidów *in vitro* są wierzchołki pędów, ogonki liściowe, liście, korzenie, kalus (Trojak-Goluch i in., 2021). Poliploidy uzyskane zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* muszą być zbadane pod kątem stopnia poliploidalności. W tym celu stosuje się szybki i niezawodny pomiar zawartości jądrowego DNA za pomocą cytometru przepływowego (Maru i in., 2021). Stopień ploidalności można również określić na podstawie liczby chromosomów w analizie mikroskopowej w komórkach somatycznych, oraz metodami pośrednimi opartymi na ocenie cech morfologicznych roślin, głównie wielkości aparatów szparkowych w odniesieniu do referencyjnego genotypu diploidalnego danego gatunku (Ravandi i in., 2013; He i in., 2018.).

1.1.2. Wpływ poliploidyzacji na zmiany fenotypowe roślin

Zwielokrotnienie całego zestawu chromosomów wywołuje szereg zmian, które oddziałują na strukturę komórkową, funkcjonowanie tkanek oraz fizjologię roślin (Trojak-Goluch i in., 2021). Proces zwielokrotnienia liczby genomów wprowadza nie tylko efekt zwiększonej dawki genowej, ale również modyfikuje regulację genów poprzez mechanizmy epigenetyczne, co w rezultacie wpływa na rozwój morfologiczny oraz adaptacyjne reakcje roślin na warunki środowiskowe. Poliploidyzacja prowadzi do zmian w anatomicznej strukturze roślin. Zwiększenie rozmiaru komórki odgrywa kluczową rolę w zmianach fizjologicznych jak i rozwojowych u roślin przez zmniejszenie stosunku powierzchni komórki do jej objętości i zwykle objawia się najbardziej zauważalnym efektem poliploidyzacji określanym jako efekt 'gigas', który powoduje zmianę fenotypu roślin – obserwuje się większe organy (Doyle i in., 2019). Indukowane poliploidy często wytwarzają większe kłącza, bulwy i korzenie, jak wykazano np. u imbiru (*Zingiber officinale*) (Kun-Hua i in., 2011; Hannweg i in., 2016). Poliploidy charakteryzują się również większymi kwiatami, jak u *Luculia pinceana*, *Hemerocallis* sp. czy *Anthurium andraeanum* (Podwyszyńska i in. 2015; Wang i in., 2025; Zhang i in., 2025), większymi liśćmi, np. u konopi (*Cannabis*) (Jafari i in., 2025) oraz nasionami, co zaobserwowano u poliploidalnych form *Cucumis melo* (Cho i in., 2021). Dodatkowo, poliploidy wykazują lepsze właściwości fotosyntetyczne i wyższą produkcję biomasy w porównaniu do diploidów (Urwin, 2014). Poliploidy często charakteryzują się opóźnionym kwitnieniem i wolniejszym wzrostem, co prowadzi do wydłużenia fazy wegetatywnej oraz zwiększenia produkcji biomasy, jak zaobserwowano np. u autotetraploidów *Arabidopsis thaliana* (Del Pozo i Ramirez-Parra, 2015). Dodatkowo, wykazują one wyższą tolerancję na niedobory składników pokarmowych i stresy abiotyczne, co jest związane m.in. z niższym tempem transpiracji, skuteczniejszą regulacją poziomu ABA i reaktywnych form tlenu (ROS), a także lepszym pobieraniem składników mineralnych. W przypadku ryżu, poliploidy odznaczają się zwiększoną odpornością na czynniki biotyczne i abiotyczne, co wiąże się z podwyższoną ekspresją genów związanych z odpornością, takich jak *WRKY*, *NAC* i *ERF*, oraz z epigenetycznymi modyfikacjami, takimi jak zmiany w metylacji DNA (Levin, 1983; Del Pozo i Ramirez-Parra, 2014; Sun i in., 2025). Wolniejszy wzrost poliploidów może wiązać się ze zwiększoną zawartością DNA (większą liczbą chromosomów). Większa zawartość DNA wymaga więcej czasu na replikację, co wydłuża czas trwania cyklu komórkowego i w rezultacie powoduje opóźnienia wzrostu merystemu wierzchołkowego. Przekłada się to na wydłużoną fazę wegetatywną, która powoduje opóźnienie kwitnienia roślin (Trojak-Goluch i in., 2021).

Poliploidy mają zazwyczaj większe niż u diploidów aparaty szparkowe, ale jest ich znacznie mniej na jednostkę powierzchni (Gomes i in., 2014). Przykładem mogą być konopie siewne (*Cannabis sativa*) w przypadku których rośliny tetraploidalne miały o połowę mniej aparatów szparkowych w porównaniu do diploidów, a ponadto aparaty szparkowe były o około 30% większe (Parsons i in., 2019). Poliploidy zwykle charakteryzują się mniejszą liczbą liści, kwiatów, kłosek czy owoców w porównaniu

do diploidów. U tetraploidalnych roślin *Jatropha curcas* zaobserwowano znaczne zmniejszenie liczby kwiatów na kwiatostan, owoców na owocostan a także nasion w owocach, co przypisuje się obniżonej płodności pyłku u tetraploidów (Niu i in., 2016). Liście poliploidów często wyróżniają się większą szerokością i grubością, intensywniejszym zielonym zabarwieniem oraz większą liczbą włosków w porównaniu do diploidów. Grubsze i ciemnozielone liście obserwowano u tetraploidów *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Vaccinium myrtillus*. Także u tetraploidów *Aloe vera*, *Lavandula angustifolia*, *Allium sativum* L. obserwowano większe, grubsze i bardziej zielone liście niż u ich diploidalnych odpowiedników (Urwin i in., 2007; Omidbaigi i in., 2010; Dixit i Chaudhary, 2014; Navrátilová i in., 2021; Paredes i Narváez, 2021; Podwyszyńska i in., 2021c). Natomiast u tetraploidów chmielu stwierdzono krótsze i węższe liście, zwłaszcza w środkowej części pędów głównych i bocznych (Trojak-Goluch i in., 2013). U szałwii (*Salvia coccinea*) podwojenie liczby chromosomów spowodowało wytwarzanie dużych kwiatostanów ze zwiększoną liczbą elementów kwiatowych (Kobayashi i in., 2008). Tetraploidalne chryzantemy (*Chrysanthemum carinatum*) miały większe kwiaty z grubszymi płatkami oraz wydłużoną trwałość wazonową (Kushwah i in., 2018).

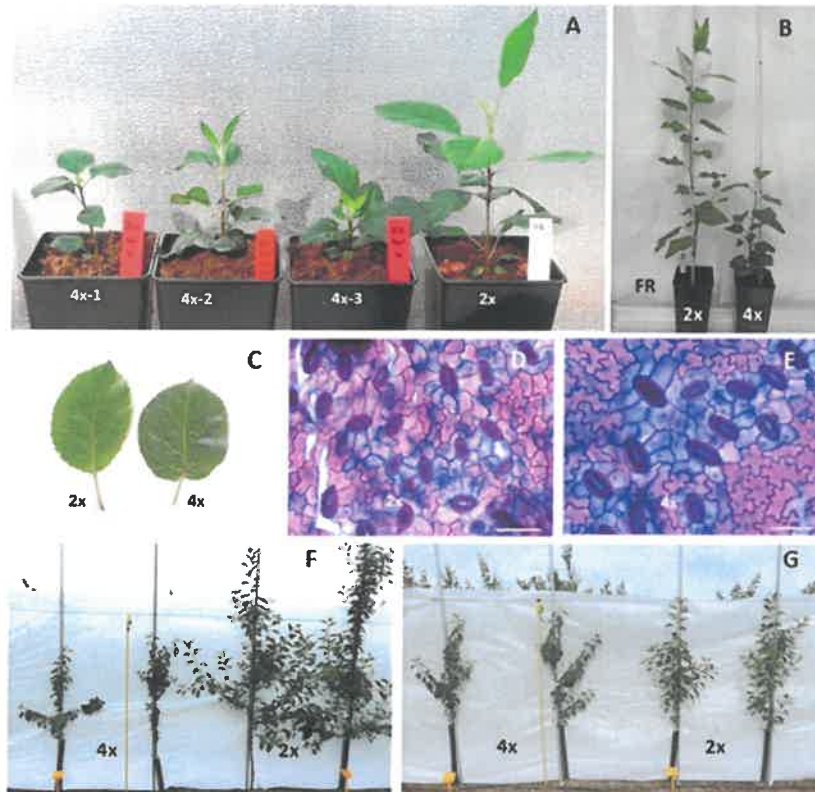
Poliploidyzaacja prowadzi do istotnych zmian fizjologicznych i biochemicznych w roślinach. Jednym z obserwowanych efektów jest zwiększona produkcja metabolitów wtórnych, takich jak związki fenolowe, terpenoidy czy olejki eteryczne. Na przykład w tetraploidalnej *Artemisa annua* zawartość artemisyniny, związku o silnym działaniu przeciwmalarycznym, była znacząco wyższa niż u form diploidalnych, co wiązano z intensyfikacją ekspresji genów biosyntezy tego związku (Madani i in., 2021). Wzrost poziomu ploidalności wpływa także na rozwój trichomów gruczołowych, które odpowiadają za syntezę i magazynowanie olejków eterycznych. W przypadku *Melissa officinalis* i *Mentha spicata* obserwowano istotne zwiększenie liczby oraz wielkości trichomów, co przełożyło się na wzrost produkcji olejków nawet o 64–75% w porównaniu do form diploidalnych (Bharati, i in., 2023a; Bharati i in., 2023b). Poliploidy wykazują większą odporność zarówno na stresy abiotyczne jak i biotyczne. W przypadku tetraploidalnej mięty pieprzowej (*Mentha piperita*), rośliny charakteryzowały się większą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej), co umożliwiło im lepsze przystosowanie się do warunków zasolenia, m.in. przez ograniczenie uszkodzeń oksydacyjnych (Zhao i in., 2022). Podobne korzyści obserwowano także w zakresie odporności na stresy biotyczne — autotetraploidalne formy ziemniaka (*Solanum tuberosum*) wykazywały zwiększoną odporność na *Phytophthora infestans*, sprawcę zarazy ziemniaczanej (Santa i in., 2018).

1.1.3. Poliploidy jabłoni

Jabłoń domowa (*Malus × domestica* Borkh.) należy do rodziny *Rosaceae*, podrodziny *Maloideae* i charakteryzuje się podstawową liczbą chromosomów $x = 17$ (Giovannoni, 2010). Większość gatunków rodzaju *Malus* występuje w formie diploidalnej ($2n = 2x = 34$), jednak spotykane są również formy triploidalne

($2n = 3x = 51$) oraz tetraploidalne ($2n = 4x = 68$) (Korban i in., 2009; Podwyszyńska i in., 2016). Przykładowo, triploidalne genotypy stwierdzono u takich gatunków jak *M. toringoides*, *M. hupehensis* i *M. sieboldii*, natomiast formy wyłącznie tetraploidalne reprezentują m.in. *M. angustifolia*, *M. glaucescens*, *M. lancifolia* oraz *M. platycarpa*. Zawartość jądrowego 2C DNA dla *Malus × domestica* wynosi od 1,50 do 1,78 pg u diploidów, od 2,27 do 2,58 pg u triploidów oraz od 3,13 do 3,37 pg u tetraploidów, co potwierdza wyraźną zależność między poziomem ploidalności, a wielkością genomu (Höfer i Meister, 2010; Podwyszyńska i in., 2016; Podwyszyńska i Marasek-Ciołakowska, 2021). Tetraploidy jabłoni nie są uprawiane komercyjnie, ale przechowywane są w bankach genów w celu zachowania bioróżnorodności oraz do wykorzystania ich w programach hodowlanych (Podwyszyńska i Marasek-Ciołakowska, 2021). W ciągu ostatnich lat w kilku ośrodkach naukowych na świecie uzyskano autotetraploidy jabłoni z wykorzystaniem technik *in vitro* (Ou i in., 2008; Jia, 2009; Xue i in., 2015; Hias i in., 2017). Tetraploidy te wytworzono z wykorzystaniem eksplantatów liściowych, a do podwojenia liczby chromosomów użyto antomitotyków takich jak kolchicina i oryzalina. Po raz pierwszy w Polsce zespół z Instytutu Ogrodnictwa – PIB zastosował z powodzeniem amiprofos metylu (APM) jako czynnik indukujący poliploidyzację jabłoni *in vitro* (Podwyszyńska i in., 2017). W eksperymencie, oprócz klasycznych związków jak kolchicina i oryzalina, wykorzystano także APM do traktowania nie tylko eksplantatów liściowych, ale też pędowych, co pozwoliło na uzyskanie autotetraploidów aż u sześciu odmian jabłoni. Uzyskane tetraploidy wykazywały wyraźne zmiany fenotypowe w porównaniu do form diploidalnych – cechowały się ograniczonym wzrostem, krótszymi pędami oraz mniejszymi, ciemnozielonymi liśćmi o zmodyfikowanym kształcie i istotnie wyższej zawartości chlorofilu. (Podwyszyńska i in., 2021b). Jak informuje Xue i in. (2015, 2017). Zwiększony wigor, większe organy oraz lepsze parametry fizjologiczne obserwowano u mitotycznych neotetraploidów jabłoni odmiany 'Hanfu' dopiero po osiągnięciu fazy dojrzałości generatywnej. Tetraploidy zakwitły w piątym roku uprawy, czyli 2 lata później niż diploidy, a ich kwitnienie w ciągu sezonu wegetacyjnego było opóźnione o 5-7 dni (Xue i in., 2017). Autorzy obserwowali, że tetraploidy w początkowej fazie wzrostu wykazują cechę karłowatości. Przypisywali to zróżnicowanej ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę auksyn i brassinosteroidów, na skutek podwojenia genomu, prowadzącą do obniżonych poziomów tych regulatorów wzrostu (Ma i in., 2016). Podobne cechy karłowatości, typowe dla nowo powstałych autotetraploidów obserwowano Podwyszyńska i in. (2021b) (Rys. 1B). Niektóre klony tetraploidalne wykazywały tendencję do przedwczesnego spoczynku, co przejawiało się zahamowaniem wzrostu po dwóch miesiącach od przeniesienia roślin z warunków *in vitro* do *ex vitro* (Podwyszyńska i in., 2017). Autorzy przypuszczali, że zjawisko to wiązało się z mechanizmami genetycznymi i/lub epigenetycznymi, w tym ze zwiększonym poziomem metylacji DNA, będącym skutkiem podwojenia liczby chromosomów. Analiza AFLP (amplified fragment length polymorphism) wykazała zróżnicowanie genetyczne między tetraploidami a ich diploidalnymi odpowiednikami na poziomie 2,4%. Największe różnice (3,64%) odnotowano dla klonu tetraploidalnego 'Gala Must' GM4 x-21pd.

Równolegle wykonana analiza MSAP (methylation-sensitive amplified polymorphism) ujawniła, że poziom metylacji DNA u tetraploidów wynosił aż 22,95%, był on niemal trzykrotnie wyższy niż u diploidów (8,3%). Wyniki te jednoznacznie wskazują, że proces poliploidyzacji wpływa nie tylko na strukturę genomu, ale również na poziom jego metylacji, co może mieć istotne znaczenie dla fenotypowego różnicowania roślin, w tym ich reakcji na warunki środowiskowe (Podwyszynska i in., 2021a).



Rysunek 1 . Fenotyp diploidalnych i tetraploidalnych roślin jabłoni odmiany ‘Free Redstar’: (A) trzymiesięczne i (B) sześciomiesięczne rośliny własnokorzeniowe, (C) liście, (D, E) aparaty szparkowe, (F) trzyletnie rośliny własnokorzeniowe i (G) trzyletnie rośliny szczepione na podkładce M9 rosnące w sadzie doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa - PIB (Skierniewice); (Podwyszynska i in., 2021b).

1.2. Stres suszy u roślin

Stres suszy jest jednym z najpoważniejszych stresów abiotycznych, które negatywnie wpływają na rozwój roślin (Wach i Skowron, 2022). Zdefiniowany jest jako stan, w którym rośliny doświadczają niedoboru wody, co prowadzi do zaburzeń w ich funkcjonowaniu, zmniejszenia wydajności fotosyntezy i ograniczenia wzrostu. Zjawisko to jest szczególnie istotne w kontekście zmian klimatycznych, które powodują częstsze i intensywniejsze okresy suszy na całym świecie (Chaves i in., 2003; Ostrowska i in., 2023). Zmiany klimatyczne są przyczyną deficytów wody związanych ze wzrostem temperatury, zwiększonym parowaniem i zmniejszonymi opadami deszczu w sezonie wegetacyjnym. Wpływ suszy na rolnictwo w dużej mierze zależy od stopnia

i czasu trwania obniżonych opadów, a także od gatunku roślin i ich faz rozwojowych (Tardieu i in., 2018). Najczęściej uprawy doświadczają suszy umiarkowanej, która spowodowana jest długotrwałymi niedoborami opadów, obniżonym poziomem wód gruntowych i ograniczonym dostępem do zasobów wodnych. Stres biotyczny jak i abiotyczny stanowi poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywnościowego, susza powoduje więcej rocznych strat w plonach niż wszystkie inne czynniki, w tym patogeny. Zapotrzebowanie na wodę w rolnictwie może się podwoić do 2050 r., podczas gdy przewiduje się, że dostępność słodkiej wody spadnie o 50% z powodu zmiany klimatu (Gupta i in., 2020). Dlatego też badania nad mechanizmami odporności roślin i poszukiwanie genotypów o wysokiej tolerancji na suszę przyczynią się do znalezienia rozwiązań mających na celu zapewnienie w przyszłości bezpieczeństwa żywnościowego (Eshed i Lippman, 2019).

1.2.1. Mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na stres suszy



Rysunek 2. Strategie adaptacji roślin do suszy (według De Leonardis i in., 2012).

Rośliny w odpowiedzi na stres wykształciły mechanizmy adaptacyjne na poziomie morfologicznym, fizjologicznym, biochemicznym i molekularnym, które pomagają minimalizować jego skutki i utrzymać homeostazę (Rys. 3) (Amudha i Balasubramani, 2011; Hura i in., 2022; Oguz i in., 2022; Haghpanah i in., 2024). Wyróżnia się trzy podstawowe strategie: ucieczki przed suszą, jej unikania oraz tolerowania jej skutków (Rys. 2). Mechanizm ucieczki polega na unikaniu czynnika stresowego poprzez tworzenie barier, które zapobiegają jego przenikaniu do wnętrza rośliny. Przykładem takiej bariery jest dostosowanie cyklu rozwojowego rośliny do sezonowych zmian warunków środowiskowych. Tego rodzaju adaptacja najczęściej

polega na skróceniu okresu wegetacyjnego i zakończeniu fazy reprodukcyjnej przed wystąpieniem dehydratacji komórek spowodowaną deficytem wody (Araus i in. 2002; Kopcewicz i Lewak, 2019; Lewak i in., 2019). Strategia unikania obejmuje procesy, które zapobiegają utracie wody w komórkach, związane zarówno z kontrolą transpiracji, jak mechanizmami wspomagającymi pobór wody przez komórki, zależnymi od efektywności systemu korzeniowego. Zapobieganie dehydratacji komórek związane jest z kontrolowanym procesem transpiracji, który opiera się na mechanizmach zamykania aparatów szparkowych, zmniejszaniu powierzchni liści przez zwijanie blaszek liściowych, ograniczaniu ich rozmiaru, a także zwiększeniu grubości warstw ochronnych liści, takich jak kutikula czy kutner (Kavar i in. 2008; Shohat i in. 2021). Trzecia strategia – tolerancji, dotyczy roślin, które mają wysoki poziom tolerancji na desykację protoplastu i wykształciły mechanizmy łagodzące negatywne skutki stresu. Zjawisko tolerancji opiera się na zmianach zachodzących na poziomie fizjologicznym, biochemicznym i molekularnym (Hura i in., 2022). W ramach tej strategii uruchamiane są mechanizmy osmoregulacyjne, a także aktywowane molekularne mechanizmy odpowiedzi komórkowej, związane z aktywacją genów indukowanych przez suszę (Reddy i in., 2004; Hura i in., 2022). Podczas niedoboru wody systemy roślinne aktywnie utrzymują fizjologiczną równowagę wodną przez zwiększenie pobierania wody przez korzenie, zmniejszenie utraty wody przez zamykanie aparatów szparkowych i regulację procesów osmotycznych w tkankach (Rodrigues i in., 2019). Na deficyt wody w początkowej fazie reagują korzenie i to one koordynują reakcję na suszę. W okresach niedoboru wody w podłożu system korzeniowy ulega zmianom morfologicznym po to, aby zwiększyć zdolność do wchłaniania wody i składników odżywczych (Dinneny, 2019). Niedobór wody w górnej warstwie gleby stymuluje korzenie do głębszej penetracji w poszukiwaniu wilgoci i składników odżywczych, natomiast akumulacja biomasy nadziemnej jest ograniczana (Zhang i in., 2017; Wach i Skowron, 2022). Rozbudowany system korzeniowy, składający się z licznych krótkich korzeni bocznych, zwiększa strefę sorpcji co poprawia pobieranie tlenu i składników odżywczych (Hulugalle i in., 2015).

Aparaty szparkowe pełnią kluczową rolę w regulacji wymiany gazowej i transpiracji u roślin. W warunkach stresu wodnego szybkie zamknięcie szparek jest niezbędnym mechanizmem ograniczającym utratę wilgoci i pozwalającym na utrzymanie równowagi wodnej organizmu (Khan i in., 2018). Ponad 90% wody traczonej przez rośliny ucieka w wyniku transpiracji, zachodzącej przez otwarte szparki. W warunkach wysokiej transpiracji zamykanie aparatów szparkowych stanowi pierwszą linię obrony przed nadmierną utratą wody, co jest kluczowe dla przetrwania roślin w okresach suszy (Wan i in., 2009).

Fotosynteza jest jednym z najważniejszych procesów decydujących o produktywności roślin uprawnych, a jej wydajność znacząco spada w warunkach niedoboru wody. Zamknięcie aparatów szparkowych, będące wczesną reakcją roślin na stres wodny, ogranicza dostęp CO₂ do wnętrza liścia, prowadząc do zmniejszenia aktywności Rubisco i zahamowania wiązania węgla (Wahab i in., 2022; Wang i in., 2024). W efekcie dochodzi do odwodnienia chloroplastów, zmniejszenia tempa fotosyntezy i zaburzeń równowagi wodnej. Ograniczenia transpiracyjne, w połączeniu

z upośledzeniem transportu elektronów przez fotosystem II (PSII), cyklem Calvina i akumulacją węglowodanów, wpływają na obniżenie produktywności fotosyntetycznej (Wahid i Rasul, 2005; Anjum i in., 2011; Li i in., 2013). W warunkach suszy aktywność Rubisco może przejść z funkcji karboksylazy na oksygenazę, co prowadzi do intensyfikacji procesu fotooddychania. Choć fotooddychanie wiąże się z dużym zużyciem energii i utratą związków węgla, może pełnić również funkcję ochronną – umożliwia rozproszenie nadmiaru energii świetlnej, wspiera syntezę glutationu poprzez produkcję glicyny oraz uczestniczy w regeneracji rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP), niezbędnego do kontynuacji cyklu Calvina. Jednocześnie, fotooddychanie staje się istotnym źródłem reaktywnych form tlenu, zwłaszcza nadtlenku wodoru (H_2O_2), co w warunkach stresu wodnego może nasilać uszkodzenia oksydacyjne w komórkach roślin C3 (Farooq i in., 2012; Sharma i in., 2019). Zamknięcie szparek powoduje także wzrost pochłoniętej energii świetlnej bez efektywnego wykorzystania jej w fotosyntezie, co prowadzi do fotoinhibicji. Efektem tego może być zmiana parametrów fluorescencji chlorofilu – wzrost fluorescencji minimalnej (F_0), spadek fluorescencji maksymalnej (F_m), a także zaburzenia w funkcjonowaniu kompleksów PSII (Efeoğlu i in., 2009; Pour-Aboughadareh i in., 2017; Wach i Skowron, 2022). Choć wiele badań pokazuje względną stabilność wskaźnika F_v/F_m (wydajności kwantowej PSII), wzrost gaszenia niefotochemicznego (NPQ) jest powszechnym zjawiskiem ochronnym, redukującym fotoinhibicję poprzez rozpraszanie energii w postaci ciepła (Ruban, 2016).

Regulacja osmotyczna jest jednym z najważniejszych mechanizmów, który pozwala roślinom przystosować się do warunków suszy poprzez utrzymanie turgoru komórkowego i retencji wody. Proces ten polega na akumulacji związków osmotycznych takich jak: prolina, betaina glicynowa czy sorbitol, które nie zakłócają funkcjonowania komórek nawet przy wysokich stężeniach (Ashraf i Foolad, 2007; Tang i in., 2025). W warunkach deficytu wody rośliny obniżają swój potencjał osmotyczny komórek, umożliwiając utrzymanie turgoru niezbędnego do wzrostu i funkcjonowania tkanek (Farooq i in., 2009). Prolina występuje powszechnie w roślinach wyższych i zazwyczaj gromadzi się w dużych ilościach w odpowiedzi na stresy środowiskowe, oprócz roli osmolitu w regulacji osmotycznej, prolina przyczynia się do stabilizacji struktur subkomórkowych np. błon (Kishor i in., 2005; Kucharska i in., 2018). Akumulacja proliny pod wpływem stresu u wielu gatunków roślin jest skorelowana z tolerancją na stres, a jej stężenie jest wyższe u roślin tolerujących stres, niż u roślin wrażliwych. U ogórka (*Cucumis sativus*), wykazano, że niedobór wody prowadzi do zwiększenia stężenia proliny w korzeniach (Fan i in., 2014). Autorzy wykazali, że zastosowanie PEG-6000, spowodowało znaczący wzrost proliny, co towarzyszyło wzrostowi stabilności błon i zwiększonej odporności korzeni na stres. Podobne zależności zaobserwowano w kukurydzy (*Zea mays*), gdzie stres suszy indukował akumulację proliny i askorbinianu, poprawiając zdolność adaptacji roślin i ich regeneracji po przywróceniu nawadniania (Kubiś i in., 2013; Meriem i in., 2021). Jednym ze wskaźników odporności na stres abiotyczny, w tym również na suszę, jest badanie peroksydacji lipidów, która wyrażona jest jako stężenie dialdehydu malonowego (ang. malondialdehyde, MDA) (Rombel-Bryzek i Pisarek, 2017). MDA

jest ostatnim produktem peroksydacji lipidów, głównie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład fosfolipidów - składników budulcowych błon biologicznych, prowadzącym do powstania nadtlenu tych związków, proces ten ma charakter lawinowy i wolnorodnikowy (Morales i Munné-Bosch, 2019). Reakcje peroksydacji nasilają się w komórkach narażonych na działanie stresu oksydacyjnego. MDA działa uszkadzająco na cząsteczki kwasów nukleinowych i białek. Jego wysoki poziom świadczy o silnym uszkodzeniu błon biologicznych i jednocześnie o niskiej odporności na działanie stresu. Oznacza to, że rośliny będą wytwarzać ROS w warunkach stresu, tym samym upośledzając produkcję biocząsteczek takich jak: lipidy, białka i kwasy nukleinowe, co zwiększa zawartość MDA i przepuszczalność błon plazmatycznych. Jest to mechanizm za pomocą którego regulowana jest odporność roślin na suszę (Munnik i in. 1999; Kong i in. 2016; Alché, 2019). W badaniach nad kukurydzą (*Zea mays*) wykazano, że już po 24 godzinach stresu wodnego indukowanego PEG-6000 poziom MDA znacząco wzrasta, szczególnie w liściach. Co istotne, rośliny bardziej wrażliwe na suszę wykazywały wyższy wzrost MDA niż genotypy tolerancyjne, co świadczy o nasileniu peroksydacji lipidów i aktywacji stresu oksydacyjnego (Fan i in., 2024). Podobne zależności zaobserwowano u pszenicy (*Triticum aestivum*), gdzie u wrażliwych odmian stwierdzono silniejszy wzrost MDA oraz uszkodzenia błon komórkowych, podczas gdy genotypy tolerancyjne wykazywały tylko umiarkowany wzrost poziomu tego wskaźnika (Sheoran i in., 2015). Zawartość MDA może stanowić przydatny wskaźnik diagnostyczny w ocenie stresu środowiskowego u roślin, umożliwiając wczesne wykrycie zmian fizjologicznych i podjęcie działań zapobiegawczych wobec suszy (Møller i in., 2007; Zhang i in., 2021).

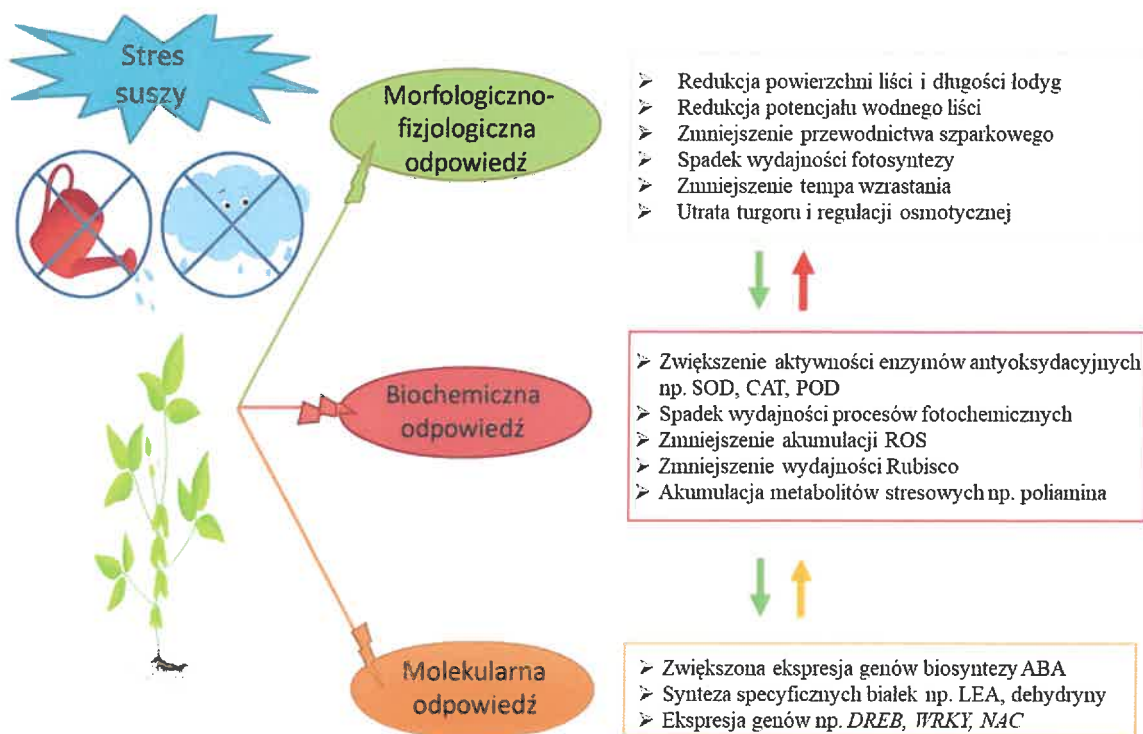
Stres suszy prowadzi do wytwarzania i akumulacji reaktywnych form tlenu (ang. ROS), w tym tlenu singletowego ($\cdot\text{O}$), ponadtlenku (O_2^-), nadtlenu wodoru (H_2O_2) i rodnika hydroksylogowego ($\text{OH}\cdot$). Te wolne rodniki mogą powodować uszkodzenia oksydacyjne komórek roślinnych. Akumulacja ROS powoduje uszkodzenia DNA, białka, lipidów i błony komórkowej, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki (Dumanoğlu i in., 2025). ROS powstają w wyniku pobudzenia lub niepełnej redukcji tlenu cząsteczkowego. W niskich stężeniach ROS są składnikami niezbędnymi szlaków sygnalizacji komórkowej, ale zbyt wysokie wytwarzanie ROS uszkadza makrocząsteczki i prowadzi ostatecznie do śmierci komórki (Gechev i in., 2006). Rośliny, aby zminimalizować szkodliwy wpływ stresu oksydacyjnego, wykształciły złożony system antyoksydacyjny, w którego skład wchodzi enzymy antyoksydacyjne. Enzymy antyoksydacyjne takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydazy (PXs) i katalaza (CAT), stanowią pierwszą linię obrony przed ROS, dlatego ich poziom w tkankach roślin służy jako wskaźnik stresu oksydacyjnego (Kumar i in., 2018; Wach i Skowron, 2022; Konieczna i in., 2023). Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) jest metaloenzymem i jednym z kluczowych elementów systemu obrony antyoksydacyjnej komórek roślinnych przed toksycznymi reaktywnymi formami tlenu. Katalizuje przemianę anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) do tlenu cząsteczkowego (O_2) i nadtlenu wodoru (H_2O_2) zapobiegając uszkodzeniom oksydacyjnym (Mishra i in., 2023). Enzym ten występuje we wszystkich organellach wykorzystujących tlen (w chloroplastach, mitochondriach, jądrach, cytoplazmie) (Mahanty i in., 2012).

Peroksydazy roślinne (POX) to enzymy, które są odpowiedzialne za usuwanie nadtlenu wodoru (H_2O_2). Współdziałają z systemem askorbinian-glutation w utrzymaniu homeostazy redoks i pełnią kluczową rolę w drugiej linii obrony przed stresem oksydacyjnym obok związków fenolowych i flawonoidów. POX syntezowane są w aparacie Golgiego, a następnie kierowane do wakuoli (Rajput i in., 2021). Katalazy (CAT) to tetrameryczne enzymy hemowe, które katalizują rozkład nadtlenu wodoru (H_2O_2) do wody i tlenu. Katalazy są kluczowe w ochronie przed stresem oksydacyjnym poprzez usuwanie H_2O_2 , którego nadmiar powstaje podczas stresu środowiskowego. Katalaza nie wymaga żadnego reduktora do swojej aktywności katalitycznej (Mishra i in., 2023; Rajput i in., 2021). Badania przeprowadzone przez Sun i in. (2015) wykazały, że w liściach truskawek po 6 dniach suszy nastąpił znaczący wzrost aktywności SOD, POX i CAT wraz z podwyższonym stężeniem proliny i cukrów rozpuszczalnych, co sugeruje wzmoczoną obronę antyoksydacyjną. Z kolei rośliny śliwy transformowane genem peroksydazy askorbinianowej pod wpływem suszy wykazywały wyższą aktywność enzymów APX, POX, CAT i SOD nawet od 3 do 7 razy w porównaniu do roślin nietransformowanych (D'Iaz-Vivancos i in., 2016). Skutkowało to obniżeniem poziomu MDA oraz zwiększoną tolerancją na niedobór wody.

Na poziomie molekularnym, rośliny w odpowiedzi na stres środowiskowy aktywują kompleksową sieć sygnałową, która prowadzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (Espinosa-Vellarino i in., 2024). Kluczową rolę w reakcjach odpornościowych odgrywają białka regulatorowe, czynniki transkrypcyjne (TFs, ang. transcription factors), które regulują ekspresję genów związanych z adaptacją do niekorzystnych warunków (Hura i in., 2022). Do głównych rodzin czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w reakcję na suszę należą: MYB, WRKY, NAC, MYC i DREB. Większość z nich działa w sposób zależny od kwasu abscysynowego (ABA), a część niezależnie (Janiak i in., 2016; Erpen i in., 2017; Andersen i in., 2018; Fang i in., 2025). Rodzina MYB uczestniczy zarówno w regulacji procesów fizjologicznych w warunkach optymalnych, jak i w stresie (Sybilska i in., 2025). Przykładowo MYB96 integruje sygnały ABA i auksyn, ograniczając rozwój korzeni bocznych, a wprowadzenie genu *Osmby4* do jabłoni zwiększało odporność na zimno i suszę (Pasquali i in., 2008; Seo i in., 2009). WRKY odpowiadają za kontrolę wielu procesów rozwojowych i reakcji na stres, w tym suszę, zasolenie i niską temperaturę; geny takie jak *WRKY20* czy *WRKY63* zwiększają tolerancję na stres poprzez szlaki ABA (Ren i in., 2010; Zhu i in., 2022; Kumar i in., 2025). Rodzina czynników transkrypcyjnych NAC bierze udział w różnych procesach biologicznych, takich jak wzrost i rozwój roślin, reakcje na stres oraz szlaki metaboliczne (Han i in., 2023). Niektóre z białek NAC biorą udział w regulacji różnych szlaków sygnałowych stresu, co umożliwia roślinom skuteczne reagowanie i adaptację do jednoczesnego działania wielu niekorzystnych czynników środowiskowych (Xiong i in., 2025). SNAC1 kontroluje ruch aparatów szparkowych, ograniczając transpirację (Kurowska i in., 2025). MYC, zwłaszcza MYC2 aktywują geny obronne związane z suszą i modulują odpowiedzi ABA. (Dombrecht i in., 2007; Li i in., 2024). Białka DREB biorą udział głównie w reakcjach roślin na stesy abiotyczne, takie jak zimno, susza czy

wysokie zasolenie, a także w sygnalizacji ABA; w warunkach suszy i szoku cieplnego akumulowane są głównie białka DREB2 (Akhtar i in., 2012).

Do białek ściśle związanych z suszą należą akwaporyny. Są to małe białka które znajdują się prawie we wszystkich rodzajach tkanek (Ahmed i in., 2021). Uczestniczą w różnych procesach fizjologicznych: w pobieraniu i transporcie wody, rozwoju i dojrzewaniu owoców oraz w odpowiedzi na stresy środowiskowe. Akwaporyny stanowią dużą i zróżnicowaną rodzinę białek, która obejmuje od 30 do ponad 70 homologów, występujących u różnych gatunków roślin (Sade i in., 2009). Można je podzielić na pięć podrodzin: PIP-akwaporyny błony komórkowej (ang. plasma membranę intrinsic protein), TIP akwaporyny tonoplastu (ang. tonoplast membranę intrinsic protein), NIP akwaporyny typowe dla kanałów w błonach komórkowych, umożliwiające transport wody. (ang. nodulin 26-like intrinsic protein), SIP oraz niezidentyfikowane białka błonowe XIP (Dąbrowska, 2008; Lopez i in., 2012; Paluch i in., 2015; Sun i in., 2024). Najważniejsze spośród akwaporyn to PIP i TIP, ponieważ pełnią ważną rolę w regulacji przepuszczalności hydraulicznej korzeni i liści oraz osmoregulacji w obrębie cytoplazmy komórkowej; białka PIP mogą regulować cały transport wody w komórkach, a białka TIP mogą mieć kluczową rolę w regulacji osmotycznej w odpowiedzi na stres suszy (Gerbeau i in., 2002; Li i in., 2014; Danelia i in., 2024).



Rysunek 3. Reakcje roślin w warunkach stresu suszy (według Kumar i in., 2018).

1.2.2. Stres suszy u jabłoni

Stres suszy znacząco wpływa na fizjologię, ultrastrukturę i metabolizm jabłoni, a zakres reakcji zależy od genotypu, poziomu ploidalności, rodzaju podkładki oraz nasilenia i czasu trwania deficytu wody. Tworkoski i in. (2016) wskazali, że różne podkładki jabłoni wykazują zróżnicowaną tolerancję na deficyt wody. Jest ona związana m.in. z efektywnym gospodarowaniem wodą, zdolnością do ograniczania transpiracji i zachowaniem integralności fizjologicznej liści. Niektóre podkładki utrzymywały stabilny wzrost drzew oraz wyższą zawartość wody w tkankach, co sugeruje istnienie skutecznych mechanizmów adaptacyjnych. Wang i in. (2018) wykazali, że u jabłoni susza negatywnie wpływa na fotosyntezę oraz funkcjonowanie łańcucha transportu elektronów, powodując spadek aktywności fotosystemu II i zakłócenia w przekształceniach energetycznych. Interesujących obserwacji dostarczyły badania dotyczące anatomii liści — odmiany jabłoni bardziej odporne na suszę mają grubsze liście, większą liczbę aparatów szparkowych oraz lepiej rozwinięte tkanki przewodzące, co sprzyja oszczędzaniu wody - lepszej regulacji jej utraty (Bai i in., 2019). Autotetraploidy jabłoni 'Redchief' cechowały się zmienioną morfologią – miały grubsze liście, większe aparaty szparkowe i wyższą zawartość chlorofilu (Wójcik i in., 2022). W warunkach stresu wodnego wykazywały większą odporność niż diploidy, lepiej utrzymując potencjał wodny, przewodnictwo szparkowe i ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne, takie jak APX. Zmiany te sugerują większy potencjał autotetraploidów do przetrwania okresów niedoboru wody. W krótkotrwałej suszy zmienia się także profil cukrów. Wrażliwe genotypy kumulują sacharozę i glukozę, podczas gdy tolerancyjne utrzymują stabilny poziom tych związków i efektywniej przekształcają węglowodany do pełnienia funkcji osmoregulacyjnych (Yang i in., 2019). Aktywacja systemu antyoksydacyjnego jest kolejnym istotnym elementem obrony przed suszą. Wang i in. (2012) wykazali, że genotypy jabłoni o większej odporności na niedobór wody cechują się wzrostem aktywności enzymów takich jak katalaza czy peroksydaza, co ogranicza uszkodzenia oksydacyjne komórek. Z kolei Šircelj i in. (2007) potwierdzili, że parametry biochemiczne takie, jak zawartość chlorofilu, aktywność peroksydazy i poziomy MDA mogą być efektywnymi wskaźnikami różnic w poziomie stresu suszy. Ich badania wykazały także korelacje między wybranymi parametrami fizjologicznymi, a intensywnością stresu wodnego, co podkreśla znaczenie kompleksowej analizy reakcji roślin jabłoni na suszę. Tempo dziennego przyrostu owoców może służyć jako wczesny wskaźnik wystąpienia łagodnego stresu wodnego. U odmiany 'Gala' obserwowano, że przy spadku dziennego przyrostu owoców poniżej określonego progu (1,2 g/owoc/dzień), jednocześnie występował spadek potencjału wodnego łądygi (mSWP), co wskazywało na pogarszający się stan uwodnienia rośliny (Boini i in., 2019). Prosty pomiar tempa wzrostu owocu może zatem stanowić narzędzie wspomagające decyzje o nawadnianiu w praktyce sadowniczej. Porównanie lokalnego szczepu 'Crvenka' z odmianą 'Golden Delicious Reinders' wykazało, że tradycyjne odmiany mogą wykazywać wyższą odporność na suszę. 'Crvenka' lepiej utrzymywała wilgotność liści, miała stabilniejszy

aparatus fotosyntetyczny i mniejsze uszkodzenia oksydacyjne (Mihajlević i in., 2021). Z kolei drzewa 'Golden Delicious' charakteryzował się większą wrażliwością, co przejawiało się obniżeniem zawartości chlorofilu i wzrostem MDA oraz H₂O₂.

Najnowsze odkrycia skupiają się na genetycznych regulatorach odpowiedzi na suszę. Nadekspresja genu receptora ABA, *MdPYL9*, w transgenicznym genotypie *Malus × domestica* spowodowała zwiększenie tolerancji na suszę w porównaniu do roślin nietransformowanych. Rośliny z nadekspresją *MdPYL9* kumulowały mniej ROS i MDA, zachowywały wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POD, CAT) i lepszą kondycję po nawodnieniu. Na poziomie transkryptomu w stresie suszy obserwowano modulację genów związanych z biosyntezą flawonoidów oraz osmoregulacją, co wskazuje na szeroki wpływ *MdPYL9* na strategie adaptacyjne (Yang i in., 2022).

1.3. Hodowla roślin

Klasyczna hodowla opiera się na selekcji roślin o pożądanych cechach oraz ich krzyżowaniu w celu uzyskania nowych odmian (Moose i Mumm, 2008). W ostatnich dekadach hodowla została wzbogacona o nowe narzędzia biotechnologiczne, takie jak np. selekcja wspomagana markerami (ang. marker-assisted selection, MAS), loci cech ilościowych (ang. quantitative trait loci, QTL), edycja genów przy użyciu CRISPR/Cas9 oraz hodowla z wykorzystaniem kultur *in vitro* (Varshney i in., 2021; Abdul-Aziz i Masmoudi, 2025). Dzięki technikom biotechnologicznym możliwe jest szybsze wprowadzenie korzystnych alleli do nowych odmian oraz zwiększanie odporności na czynniki stresowe takie jak: susza czy zasolenie (Lamaoui i in., 2018).

Szczególnym kierunkiem jest hodowla poliploidalna, która polega na sztucznym zwiększaniu liczby chromosomów, co często prowadzi do zwiększenia wigoru roślin, poprawy jakości plonu oraz tolerancji na stresy środowiskowe. Indukowana poliploidyzacja jest szeroko stosowana w programach hodowlanych (Sattler i in., 2016). Nowoczesna hodowla wykorzystuje również zasoby genetyczne dzikich gatunków roślin uprawnych, które bardzo często posiadają unikalne cechy odporności na stresy biotyczne i abiotyczne. Transfer genów z dzikich gatunków do odmian uprawnych stanowi ważny element adaptacji rolnictwa do zmian klimatycznych (Dempewolf i in., 2017). Często wprowadzenie wartościowych cech z dzikich gatunków jest niemożliwe ze względu na barierę krzyżowalności interploidalnej, tzw. blok triploidalny, występujący u gatunków kilku rodzajów, m.in. u *Vaccinium*. W celu przezwyciężenia tego typu bariery wytwarza się autotetraploidy gatunków dzikich by następnie krzyżować je z naturalnymi tetraploidalnymi gatunkami uprawnymi. Dobrym przykładem takiej praktyki hodowlanej było uzyskanie autotetraploidów borówki czernicy, które z sukcesem zostały użyte do hybrydyzacji z borówką wysoką (Podwyszyńska i in., 2021c; Podwyszyńska i in., 2023).

W obliczu rosnącej populacji ludzkiej i ograniczonych zasobów naturalnych rozwój efektywnych metod hodowli roślin łączących klasyczne, poliploidalne

i nowoczesne podejście biotechnologiczne pozostaje jednym z kluczowych wyzwań XXI wieku.

1.3.1 Hodowla poliploidalna

Indukcja poliploidów do hodowli roślin stosowana jest od kilkudziesięciu lat, ma ona na celu wykorzystanie korzystnych cech poliploidów i wprowadzenie ich do odmian uprawnych. Prace hodowlane rozpoczynają się od produkcji autotetraploidów, które generalnie nie spełniły oczekiwań co do bezpośredniego wykorzystania (Trojak-Goluch i in., 2021). W hodowli roślin poliploidy są często wykorzystywane pośrednio jako narzędzie do generowania pożądanych genotypów lub pokonywania barier genetycznych i następnie wykorzystywania ich do krzyżowań. Tetraploidy są powszechnie stosowane w hodowli roślin jako formy rodzicielskie do produkcji odmian triploidalnych. Rośliny triploidalne mogą być wytwarzane naturalnie, poprzez krzyżowania interploidalne oraz hodowlę bielma *in vitro* (Rys. 4) (Wang i in., 2016; Abdullach i in., 2021). W warunkach naturalnych triploidy powstają w wyniku zapłodnienia z udziałem gamety haploidalnej (n) i diploidalnej ($2n$) wytworzonej w wyniku nieprawidłowej mejozy prowadzącej do powstania gamet niezredukowanych ($2n$) (Ramanna i Jacobsen, 2003). Hodowla bielma i podwajanie liczby chromosomów umożliwiły sztuczną produkcję roślin triploidalnych opartą na technikach *in vitro* (Tränkner i in., 2020). Dzięki zastosowaniu hodowli bielma czy hybrydyzacji somatycznej można pokonać przeszkodę niskiej płodności, produkować i stabilizować rośliny triploidalne (Zulkarnain i in., 2016; Sarma i in., 2023).

Innym sposobem hodowli triploidalnej jest interploidalna hybrydyzacja płciowa, która obejmuje krzyżowanie roślin o różnych poziomach ploidalności. Typową metodą jest stosowanie krzyżowań $2x \times 4x$, $4x \times 2x$ lub $2x \times 3x$ (Birchler, 2014).

W hybrydyzacjach $4x \times 2x$ lub $4x \times 2x$ uzyskuje się trzy rodzaje nasion: nasiona nierozwinięte, nasiona rozwinięte (nasiona normalne) i nasiona rozwinięte małe. Zazwyczaj tylko rozwinięte nasiona normalne mogą kiełkować (Wang i in., 2016). Krzyżowania interploidalne mogą prowadzić do problemów z rozwojem nasion, znanych jako "blok triploidalny", gdzie nieprawidłowy rozwój zarodka i bielma (endospermu) skutkuje silnie obniżoną żywotnością nasion lub nawet powstaniem owoców beznasiennych. W hodowli roślin wykorzystuje się te mechanizmy do tworzenia sterylnych odmian o owocach beznasiennych, gdzie bezpestkowość owoców jest cechą pożądaną, jak np. u triploidalnych odmian arbuza czy banana (Schatlowski i Kohler, 2012).

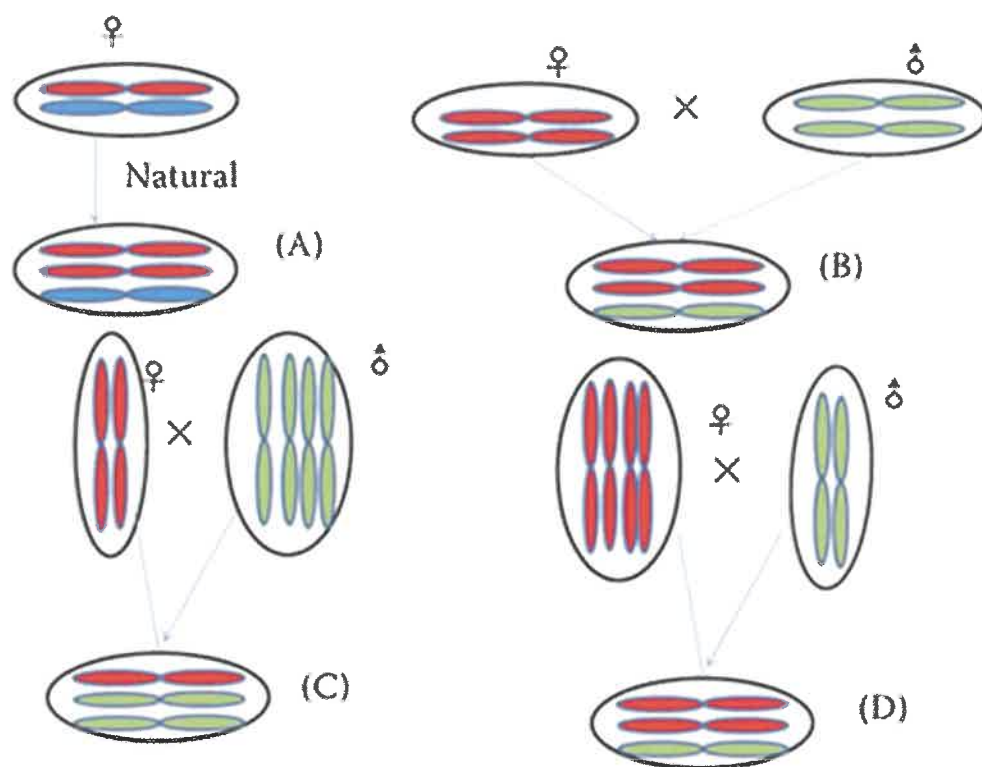
Poliploidyzacja stanowi skuteczne narzędzie do przełamywania barier genetycznych w krzyżowaniach, zwłaszcza w przypadku oddalonych hybrydyzacji międzygatunkowych lub międzyrodzajowych, gdzie jedno z rodziców jest diploidem i nie krzyżuje się z gatunkiem tetraploidalnym. Podwojenie liczby chromosomów umożliwia przezwyciężenie tego typu bariery krzyżowalności, tzw. bloku triploidalnego. W innym przypadku, gdy uzyskuje się bezpłodne mieszańce oddalone, by przywrócić im płodność, poddaje się je poliploidyzacji (Rogalska i in., 2007). Powstałe alloautopoliploidy są płodne, gdyż proces parowania homologicznych

chromosomów w mejozie może przebiegać prawidłowo. Otwiera to drogę do łączenia pożądaných cech, pochodzących z odległych taksonów — niedostępnych w tradycyjnych programach hodowlanych. (Thriveni i in., 2024).

W przypadku roślin ozdobnych poliploidyzacja jest wykorzystana do uzyskania odmian o korzystniejszych cechach dekoracyjnych, takich jak większe kwiaty, intensywniejsze lub nowe barwy oraz zwiększona liczba płatków. Metodę tę z powodzeniem zastosowano m.in. w hodowli róż (*Rosa* spp.), lili (*Lilium* spp.), liliowców (*Heimerocallis* sp.) czy storczyków (*Orchidaceae*), gdzie indukowana poliploidia przyczyniła się do istotnych ulepszeń estetycznych i zwiększenia wigoru roślin, co ma duże znaczenie komercyjne (Podwyszyńska i in., 2015; De, 2017).

Nowoczesne narzędzia, takie jak selekcja genomowa (GS) i edycja genomu CRISPR/Cas9, znacząco zwiększyły efektywność hodowli roślin poliploidalnych. GS pozwala na przewidywanie wartości hodowlanej cech złożonych na podstawie markerów DNA, co przyspiesza selekcję w uprawach takich jak ziemniaki (Borrill i in. 2019). Z kolei CRISPR umożliwia precyzyjną edycję wielokrotnych kopii genów w genomach poliploidalnych, co wykazano m.in. w pszenicy i rzepaku (Schaart i in., 2021). Integracja CRISPR z technikami indukcji haploidów dodatkowo przyspiesza tworzenie nowych odmian o zwiększonej odporności na stres i choroby (Bhowmik i Bilichak, 2021). Obecnie prowadzone są intensywne badania nad odpornością roślin poliploidalnych na stropy środowiskowe oraz choroby o istotnym znaczeniu gospodarczym. Zdolność poliploidów do lepszego przystosowania się do niekorzystnych warunków może być efektywnie wykorzystana w hodowli nowych odmian roślin użytkowych, szczególnie w kontekście adaptacji do postępujących zmian klimatycznych (Griffin i in., 2015; Koide i in., 2020).

Perspektywy wykorzystania poliploidów w hodowli roślin są bardzo szerokie, obejmują takie aspekty jak pokonywanie barier krzyżowalności, wzmocnienie pożądaných już istniejących cech użytkowych (poprzez zwielokrotnienie liczby genów, np. odporności na choroby), wprowadzanie nowych cech w procesie hybrydyzacji oddalonych, czy wytwarzanie nowych odmian o owocach beznasiennych. Różne techniki poliploidyzacji z pewnością nadal będą stanowić cenne narzędzia do wytwarzania nowych ulepszonych odmian.



Rysunek 4. Tworzenie triploidów w wyniku hybrydizacji: triploidalne bielmo powstałe w wyniku typowego krzyżowania $2x \times 2x$ (A), krzyżowanie płciowe pomiędzy diploidnymi roślinami rodzicielskimi, z których jeden wytwarza gamety $2n$ (żeńskie lub męskie) (B), krzyżowanie płciowe pomiędzy diploidalną rośliną mateczną, a tetraploidalną ojcowską (C) oraz krzyżowanie płciowe pomiędzy tetraploidalną rośliną mateczną, a diploidalną ojcowską (D) (Wang i in., 2016).

1.3.2 Hodowla jabłoni

Jabłoń domowa (*Malus × domestica* Borkh.) jest najważniejszym gatunkiem sadowniczym uprawianym w klimacie umiarkowanym. Według danych FAO, w 2023 roku światowa produkcja jabłek wyniosła 97,3 miliona ton, z czego Chiny odpowiadały za około 51% tej produkcji. Polska jest jednym z czołowych producentów jabłek na świecie,

z produkcją sięgającą prawie 4 milionów ton, co plasuje ją na czwartym miejscu globalnie, po Chinach, Stanach Zjednoczonych i Turcji (<https://www.fao.org/faostat/>, 10.07.2025). Najważniejsze regiony upraw jabłoni w Polsce, o łącznej powierzchni około 180 tys. ha, to obszary centralne oraz południowo-zachodnie i południowo-wschodnie, gdzie warunki klimatyczne i glebowe sprzyjają rozwojowi upraw sadowniczych. Dominujące odmiany to ‘Idared’, ‘Šampion’, ‘Jonagold’ oraz ‘Ligol’, które stanowią ponad połowę krajowej produkcji jabłek (Żurawicz i in., 2019). Owoce

jabłoni stanowią źródło składników odżywczych i odgrywają istotną rolę w żywieniu człowieka. Współczesna hodowla jabłoni stawia sobie za cel nie tylko poprawę cech jakościowych owoców, jak ich smak, jędrność czy trwałość przechowalniczą, ale również zwiększenie odporności na patogeny oraz adaptację do zmieniających się warunków klimatycznych (Sestras i Sestras, 2023). W Instytucie Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach prowadzone są intensywne prace badawczo-hodowlane, ukierunkowane na uzyskanie nowych odmian jabłoni o wysokiej jakości owoców, zwiększonej odporności na choroby oraz lepszej adaptacji do warunków środowiskowych (Żurawicz i in., 2019). Jednym z ważnych aspektów hodowli jabłoni jest odporność na groźne choroby - parcha jabłoni, której sprawcą jest *Venturia inaequalis* czy zarazę ogniową, bakteriozę wywoływaną przez *Erwinia amylovora*. Badania prowadzone w IO-PIB wykazały zróżnicowaną podatność nowych odmian i klonów hodowlanych jabłoni na zarazę ogniową i parcha jabłoni (Sobiczewski i in. 2006; Sobiczewski i in. 2015; Masny, 2017; Michalecka i in., 2018; Masny i Sobiczewski, 2025). Wiedza ta ma istotne znaczenie dla doboru materiału hodowlanego do krzyżowań i wytwarzania bardziej odpornych linii hodowlanych. Genotypy zgromadzone w kolekcji banku genów jabłoni IO-PIB cechują się zróżnicowanymi reakcjami na zarazę ogniową, co otwiera możliwości wykorzystania genotypów odpornych w dalszej hodowli. Wykorzystanie materiału hodowlanego o udokumentowanym pokrewieństwie pozwala na skuteczną ocenę parametrów genetycznych i prognozowanie wartości hodowlanych cech jakości owoców, co przekłada się na efektywniejsze programy selekcyjne (Kouassi i in., 2009). Tradycyjne metody hodowlane jabłoni głównie opierają się na selekcji fenotypowej i krzyżowaniach między odmianami o pożądanym cechach, takich jak wielkość owoców, kształt, barwa skórki, a także odporność na choroby. Jednak jednym z głównych ograniczeń tych metod jest długi cykl hodowlany jabłoni, który wynika z długiego okresu juwenilnego wynoszącego od 5 do 10 lat. Nowoczesne techniki biotechnologiczne umożliwiają przyspieszenie procesu hodowlanego (Brown i Maloney, 2009). W związku z tym w IO-PIB prowadzona jest analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus × domestica* Borkh.) dla skrócenia okresu juwenilnego (Lewandowski i in., 2019). Wykorzystywana jest tu analiza ogólnej zdolności kombinacyjnej (efektów GCA) oraz analiza specyficznej zdolności łączenia (SCA, względnej wydajności krzyżowania) dla badanych form rodzicielskich pod względem wybranych cech użytkowych. Z wykorzystaniem markerów SSR tworzone są także mapy genetyczne, które stanowią precyzyjną bazę do dalszych badań nad lokalizacją genów oraz regionów genomów, warunkujących długość fazy juwenilnej i poprawy jakości owoców, a także innych ważnych cech użytkowych badanych odmian jabłoni dla potrzeb hodowli twórczej tego gatunku.

Selekcja wspomagana markerami (MAS) stanowi skuteczne narzędzie umożliwiające precyzyjną identyfikację genów warunkujących istotne cechy takie jak: odporność na choroby, jakość owoców czy tolerancję na stresy abiotyczne. Jednym z dobrze udokumentowanych przykładów zastosowania MAS w hodowli jabłoni jest wykorzystanie we wczesnej selekcji genu *Rvi6* (*Vf*), pochodzącego z *Malus floribunda*, który odpowiada za odporność na parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*). Gen ten

odgrywa kluczową rolę w programach hodowlanych ukierunkowanych na rozwój odmian odpornych na tę powszechną chorobę grzybową (Gessler i in. 2006; Keller-Przybyłkiewicz i Korbin 2013; Michalecka i in. 2018). Źródłem odporności na parcha jabłoni są także inne dzikie gatunki jabłoni, których genomy niosą inne geny odporności typu R, np. *Rvi5* z *Malus micromalus* czy *Rvi11* z *Malus baccata* Jackii (Khajuria i in., 2018). Nowoczesne programy hodowlane integrują odporność pionową (monogeniczną warunkowaną pojedynczymi genami R) z odpornością poziomą (wielogenową), co pozwala na uzyskanie bardziej trwałej odporności w warunkach naturalnego występowania patogenów (Bus i in. 2005; Podwyszyńska i in. 2021b; Mohamed i in. 2025).

Selekcja genomowa (GS) to nowoczesna metoda opierająca się na analizie pełnego genomu rośliny wykorzystywana do przewidywania wartości hodowlanej poszczególnych genotypów. W hodowli jabłoni zastosowanie GS pozwala na szybsze i bardziej precyzyjne wprowadzenie cech złożonych, takich jak odporność na choroby czy jakość owoców, które są trudne do selekcjonowania tradycyjnymi metodami (Satish Kumar i in., 2012). Kolejną metodą wykorzystywaną w hodowli jabłoni jest CRISPR/Cas9, która umożliwia dokonywanie zmian w konkretnych genach odpowiedzialnych za pożądane cechy, co pozwala na szybsze uzyskanie nowych ulepszonych odmian (Jacobson i in., 2023).

Istotnym obszarem hodowli jabłoni jest poprawa jakości owoców w tym smaku, kruchości, ale także parametrów przechowalniczych. Wysoka trwałość po zbiorze, odporność na uszkodzenia mechaniczne i choroby przechowalnicze, a także atrakcyjny wygląd zewnętrzny - intensywne wybarwienie, brak ordzawień są kluczowe dla konkurencyjności rynkowej odmian (Yue i in., 2013).

Jednym z głównych kierunków hodowli jabłoni jest zwiększenie tolerancji na niedobór wody, odmiany odporne na suszę charakteryzują się lepszym utrzymaniem potencjału wodnego liści, wolniejszym tempem transpiracji oraz efektywniejszym zarządzaniem zasobami wodnymi w warunkach deficytu wody. Badania wykazały, że autotetraploidalne odmiany jabłoni, takie jak 'Hanfu' i 'Gala', wykazują większą tolerancję na stres wodny w porównaniu z ich diploidalnymi odpowiednikami (Zhang i in., 2015). Rośliny te charakteryzują się wyższą zawartością wody w liściach, niższym poziomem malondialdehydu (MDA) oraz zwiększoną ekspresją genów akwaporyn, co przyczynia się do lepszego zarządzania gospodarką wodną.

Podsumowując, w licznych badaniach prowadzonych na świecie oraz w kraju, a także w IO-PIB wykazano, że źródłem zmienności o potencjale do wykorzystania w pracach hodowlanych może być proces poliploidyzacji, który znacząco zmienia genotyp jak i fenotyp roślin (Osborn i in. 2003; Soltis i in. 2014; Kaur i Rishi 2025). Duplikacja genomu skutkuje zmianą struktury DNA, powoduje nie tylko podwojenie liczby tych samych genów, w tym genów związanych z odpornością, jest również źródłem innych typów mutacji – chromosomowych takich jak delecje, translokacje i inwersje czy mutacje punktowe, wywołuje również zmiany wzoru metylacji DNA (Tayalé i Parisod, 2013; Podwyszyńska i in., 2021a, b; Ahmadizadeh i Heidari 2025; Kaur i Rishi 2025). Wiele cech charakteryzujących poliploidy jest korzystnych z punktu widzenia hodowli nowych odmian roślin użytkowych. Uzyskanie w Instytucie

Ogrodnictwa-PIB licznych autotetraploidów 6 odmian jabłoni pozwoliło na rozpoczęcie szczegółowych badań nad konsekwencjami wynikającymi z poliploidyzacji dla tego gatunku. Wstępne prace prowadzone w Instytucie Ogrodnictwa-PIB nad autotetraploidami jabłoni wykazały, że charakteryzują się one mniejszą niż ich odpowiedniki diploidalne podatnością na niektóre choroby - parcha jabłoni i zarzę ogniewą (Podwyszyńska i in , 2021b) oraz wyższą odpornością na suszę (Wójcik i in, 2022), co może stanowić o ich przydatności jako materiałów wyjściowych w hodowli odpornościowej. Celowa wydaje się w związku z tym kontynuacja badań uwzględniająca szczegółową ocenę uzyskanych we wcześniejszych badaniach autotetraploidów jabłoni różnych odmian, ze szczególnym uwzględnieniem ich cech fenotypowych, odporności na suszę oraz możliwości krzyżowania, co jest istotne w perspektywie wykorzystania autotetraploidów w programie hodowlanym jabłoni do uzyskaniu nowych odmian o ulepszonych cechach użytkowych.

2. Hipoteza badawcza i cel pracy

Hipotezy badawcze

1. Formy autotetraploidalne jabłoni różnią się istotnie cechami fenotypowymi od swoich odmian wyjściowych.
2. Zwiększenie poziomu ploidalności u jabłoni zwiększa poziom tolerancji na stres wywołany suszą.
3. Autotetraploidy jabłoni są płodne i zdolne do krzyżowania z odmianami diploidalnymi, co skutkuje uzyskaniem genotypów triploidalnych.

Cel pracy

Aby zweryfikować hipotezy badawcze, wyznaczono następujące cele:

1. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni w porównaniu z ich diploidalnymi odmianami wyjściowymi, obejmująca cechy morfologiczne, anatomiczne, kwitnienie, owocowanie, parametry biochemiczne i fizjologiczne.
2. Porównanie autotetraploidów jabłoni i ich diploidalnych odpowiedników pod względem poziomu odporności na stres wywołany suszą, poprzez ocenę parametrów fizjologicznych i biochemicznych, wskaźników wzrostu roślin oraz analizę poziomu ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres.
3. Ocena zdolności autotetraploidów jabłoni do krzyżowania z genotypami diploidalnymi i określenie poziomu ploidalności i zawartości jądrowego DNA u uzyskanego potomstwa.

3. Materiał i metody

Ocenę autotetraploidów jabłoni na poziomie wybranych cech fenotypowych i molekularnych prowadzono, w zależności od zagadnienia, z udziałem jednej, dwóch lub trzech odmian 'Redchief', 'Pinova' i 'Free Redstar' oraz ich wybranych klonów tetraploidalnych. Rośliny pochodziły z kultur *in vitro* (Podwyszyńska i in., 2017) i były szczepione na podkładce M.9. W badaniach dotyczących zdolności autotetraploidów do krzyżowania użyto dodatkowo innych odmian diploidalnych jabłoni 'Gala Must', 'Gold Milenium' i 'Szampion'.

Badania obejmowały następujące zagadnienia:

- ocenę fenotypu autotetraploidów,
- ocenę tolerancji na stres suszy,
- ocenę zdolności do krzyżowania autotetraploidów z odmianami diploidalnymi.

3.1. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni

Ocenę wpływu podwojenia liczby chromosomów na cechy morfologiczne i fizjologiczne, w tym wybrane cechy użytkowe autotetraploidów jabłoni prowadzono w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych. Badania obejmowały obserwacje i pomiary liści, pędów, kwiatów, terminu oraz intensywności kwitnienia, żywotności i wielkości pyłku, a także masy i jakości owoców.

3.1.1. Materiał roślinny

Do badań wykorzystano diploidalne odmiany wyjściowe jabłoni 'Redchief', 'Pinova' i 'Free Redstar' (2x) oraz po dwa ich klony tetraploidalne (4x). Były to 5-8 letnie drzewa szczepione na podkładce M.9 rosnące w sadzie doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Dąbrowicach, pochodzące z kultur *in vitro* (Podwyszyńska i in., 2017, 2018). Uprawę jabłoni w sadzie prowadzono zgodnie z metodami produkcji integrowanej tego gatunku.

Klony tetraploidalne wybrane do badań:

'Free Redstar' – 4x-2, 4x-4

'Redchief'- 4x-11, 4x-25

'Pinova'- 4x-4, 4x-3L

3.1.2. Ocena liści

Rozmiary liści

Liście pobrano z drzew diploidalnych i klonów tetraploidalnych. Z każdego genotypu pobrano po 20 w pełni rozwiniętych liści ze środkowej części długopędów. Powierzchnię, długość oraz szerokość liścia mierzono przy użyciu planimetru (Area Meter AM350, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK).

Zawartość chlorofilu w liściach

Względną zawartość chlorofilu (CCI) mierzono metodą optyczną z użyciem chlorofilometru CCM-200 Plus (Opti-Sciences Int., Hudson, NH, USA). Pomiaru wykonano w trakcie trwania sezonu wegetacyjnego, na 20 najmłodszych w pełni rozwiniętych liściach z każdego genotypu.

Wielkość i gęstość aparatów szparkowych

Ocenę długości oraz gęstości aparatów szparkowych przeprowadzono zgodnie z procedurą Dyki i Habdas (1996). Wyizolowano epidermę z abaksjalnej (odosiowej) strony liści i wybarwiono 2% błękitem toluidynowym. Dla każdego genotypu określono długość aparatów szparkowych ($n = 3$ powtórzenia \times 100 aparatów szparkowych na genotyp) oraz ich gęstość na 1 mm^2 ($n = 5$ powtórzeń na genotyp). Obserwacje mikroskopowe i pomiary prowadzono pod mikroskopem świetlnym Eclipse 80i (Nikon) z użyciem systemu analizy obrazu (NIS-Elements Basic Research) przy powiększeniu 400x. Pomiary aparatów szparkowych oraz dokumentacja fotograficzna zostały wykonane również w mikroskopie cyfrowym VHX-7000N Keyence (Japonia) przy powiększeniu 400x.

3.1.3. Ocena kwitnienia

Oceniano termin kwitnienia drzew jabłoni w fazie 60 BBCH (otwarte pierwsze kwiaty) (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, Chemische Industrie) oraz intensywność kwitnienia w fazie 65 BBCH (pełnia kwitnienia: przynajmniej 50% kwiatów otwartych, opadają pierwsze płatki) (Bryk i in., 2018). Ocena kwitnienia została wykonana w skali bonitacyjnej 0-4:

- (0) brak kwiatów,
- (1) do 10 kwiatów,

- (2) 11 do 20 kwiatów,
- (3) 21 - 30 kwiatów,
- (4) 31 i więcej kwiatów / drzewo.

Wielkość kwiatów i liczba kwiatów w kwiatostanie

Pomiary średnicy kwiatów wykonane zostały na 20 w pełni rozwiniętych, losowo wybranych kwiatach z każdego genotypu oraz określono liczbę kwiatów w kwiatostanie.

Analiza wielkości, żywotności pyłku i kiełkowanie pyłku

Pyłek pobrano z losowo wybranych pylników z roślin każdego genotypu w fazie pełnego kwitnienia. Analizy cytologiczne wykonywane były w preparatach rozmazowych pyłku barwionych 2% roztworem acetokarminu według Alexander, (1969). Miarą żywotności pyłku był stopień wypełnienia cytoplazmą, a za żywotny uznaje się pyłek, w którym cytoplazma stanowi ponad 75% objętości ziarna pyłku. Zdolność kiełkowania pyłku badano na pożywce z 15% roztworem sacharozy po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej i określano na podstawie liczby kiełkujących ziaren na 50-100 ziaren pyłku (Niles & Quesenberry, 1992). Wielkość pyłku oceniano na podstawie pomiarów długości 50 ziaren pyłku każdego genotypu. Pomiary wielkości, żywotności i kiełkowania pyłku przeprowadzono przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japonia) z użyciem systemu analizy obrazu (NIS - Elements Basic Research) przy powiększeniu 400x. Fotograficzna dokumentacja mikroskopowa wykonana została przez zastosowanie cyfrowej kamery monochromatycznej CCD PS-Fi1 (Nikon, Tokio, Japan).

3.1.4. Ocena owoców i nasion

Ocenę przeprowadzono w 2022 roku. U odmiany 'Redchief' pomiary wykonano tylko dla jednego klonu tetraploidalnego 4x-11, ponieważ drugi klon 4x-25 zakwitł po raz pierwszy dopiero w 2024 i zbyt mała liczba owoców nie pozwoliła na przeprowadzenie wiarygodnych analiz.

Masa owoców i powierzchnia rumieńca

Owoce zbierano 11 i 12 października w roku 2022 z 7 letnich drzew diploidów i tetraploidów 'Free Redstar' oraz 'Redchief'. Oceniano po 15 losowo wybranych owoców każdego genotypu. Obserwacje przeprowadzono bezpośrednio po zbiorze owoców. Każdy owoc ważono indywidualnie na wadze laboratoryjnej. Rumieniec określono wizualnie i wyrażono w procentach powierzchni, jaką zajmowała wybarwiona część owocu.

Masa nasion

Nasiona ekstrahowano i określono masę 10 nasion. Pomiar wykonano w 3 powtórzeniach.

Jędrność owoców

Pomiar jędrności wykonywano po dwóch przeciwległych stronach owocu, po usunięciu skórki. Jędrność jabłek mierzono przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Zwick Roell Z010 (Niemcy), wyposażonej w ruchomą głowicę o maksymalnej sile 500 N i trzpień typ Magness-Taylor o średnicy 11.1 mm. Prędkość poruszania się głowicy podczas pojedynczego pomiaru jędrności wynosiła 100 mm/min. Jędrność określono jako maksymalną siłę potrzebną do zagłębienia trzpienia w miąższ na głębokość 8,7 mm. Wyniki pomiarów wyrażono w niutonach [N]. Pomiar wykonano dla 15 owoców każdego genotypu.

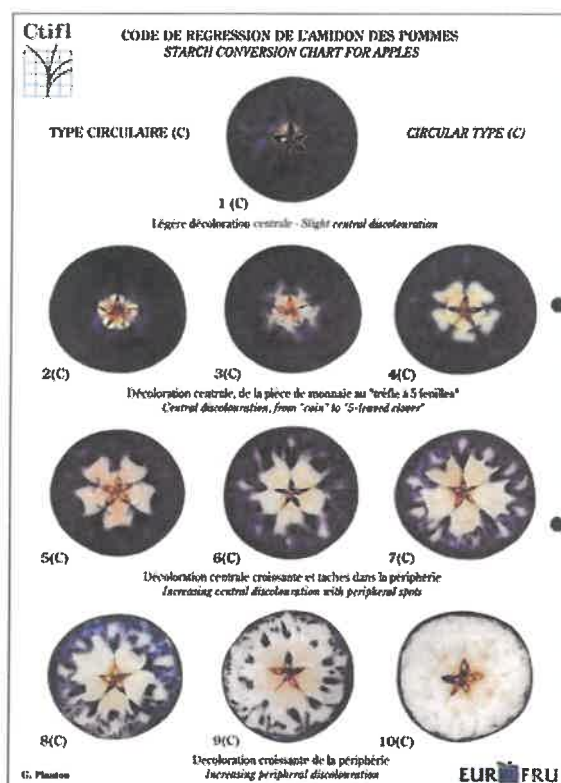
Oznaczanie indeksu skrobiowego

Indeks skrobiowy oceniano wykorzystując barwną reakcję skrobi zawartej w miąższu owoców z roztworem jodu w jodku potasu. W tym celu rozpuszczono 8,8 g jodku potasu w 30 ml ciepłej wody, następnie do przygotowanego roztworu dodano 2,2 g krystalicznego jodu i mieszało do całkowitego rozpuszczenia. Tak przygotowany roztwór rozcieńczono wodą do objętości całkowitej 1 l.

W celu przeprowadzenia testu z każdego owocu z jego środkowej części wycinano plaster, który moczone w przygotowanym roztworze jodu w jodku potasu i po upływie około minuty wyjmowano plastry i oceniano zabarwienie miąższu porównując z tablicą wzorcową (CTIFL) (Rys. 5) (Rozpara i in., 2023). Wartość indeksu skrobiowego podano w sakli 1-10, gdzie indeks skrobiowy 1 - cała powierzchnia miąższu jest zabarwiona na ciemno szaroniebieski kolor, wskazuje na dużą zawartość skrobi charakterystyczną dla jabłek niedojrzałych, indeks skrobiowy

10 - cały przekrój owocu jest jasny, co oznacza jabłka całkowicie dojrzałe lub przejrzyste. Pomiary wykonano dla 15 owoców każdego genotypu.

The Ctifl (France) starch conversion chart for apples



Rysunek 5. Tablica wzorcowa do oznaczania indeksu skrobiowego (CTIFL).

Oznaczanie zawartości ekstraktu

Zawartość ekstraktu zmierzono przy użyciu refraktometru cyfrowego Atago PR-101 (ATAGO, Japonia). Pomiary wykonano w soku wyciśniętym z 5 owoców, analizy wykonano w 3 powtórzeniach wynik wyrażono w procentach [%].

Oznaczanie kwasowości miareczkowej

Kwasowość miareczkową oznaczono wykorzystując titrator DL 21 (Mettler Toledo, Szwajcaria) z soku z wyciśniętych owoców. Metoda polega na miareczkowaniu 0,1 N roztworem wodorotlenku sodu (NaOH) określonej objętości soku do osiągnięcia pH 8,1. Wyniki przedstawiono w procentach [%] w przeliczeniu na kwas jabłkowy. Pomiary wykonano w soku wyciśniętym z 5 owoców, analizy wykonano w 3 powtórzeniach.

Statystyka

Do analizy statystycznej danych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), przeprowadzoną przy użyciu programu Statistica 13.1 (StatSoft, Polska). Różnice między grupami oceniono za pomocą testu Duncana, przy poziomie istotności $p = 0,05$.

3.2. Ocena tolerancji na stres suszy autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidów

Badanie reakcji roślin na deficyt wody w podłożu przeprowadzono na poziomie: morfologicznym, fizjologicznym, biochemicznym oraz molekularnym. Oceniano parametry wzrostu roślin, zawartość chlorofilu w liściach, fluorescencję chlorofilu, potencjał wody w liściach oraz wymianę gazową. Na poziomie biochemicznym skupiono się na określeniu aktywności enzymów antyoksydacyjnych, które odgrywają kluczową rolę w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym. Zmierzono także zawartość proliny oraz dialdehydu malonowego (MDA), które są wskaźnikami stresu osmotycznego oraz uszkodzeń błon komórkowych. Na poziomie molekularnym przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne.

3.2.1. Materiał roślinny i metodyka doświadczenia

Badaniom poddano 2 genotypy jabłoni 'Redchief': diploidalną odmianę wyjściową oraz jej klon tetraploidalny 4x-25. Doświadczenia prowadzono na jednorocznych roślinach szczepionych na podkładce M.9 rosnących w 5 litrowych doniczkach wypełnionych mieszaniną podłoża ogrodniczego (Alonet) i piasku w proporcji 4:1. Rośliny zostały nawiezione wolno uwalniającym się nawozem Osmocote Exact 5-6M Standard (3g/l) (ICL Specjalty Fertilizers, ICL Group). Przed rozpoczęciem doświadczenia uprawiano je w nieogrzewanej szklarni, a następnie przeniesiono na zewnątrz (maj) pod specjalnie skonstruowaną przezroczystą osłonę, chroniącą rośliny przed opadami atmosferycznymi. Rośliny zostały podzielone na dwie grupy, kontrolną - optymalnie nawadnianą oraz poddaną silnemu stresowi suszy. Kombinację doświadczalną reprezentowało po 10 roślin diploidalnych oraz tetraploidalnych każdego genotypu. Rośliny podlewano z zastosowaniem systemu nawadniania kropłowego, a wilgotność oraz potencjał wody w podłożu monitorowano za pomocą sond dielektrycznych (Teros 12 i MPS-6, METER, Pullman, WA, USA). Rośliny kontrolne nawadniano tak, aby utrzymać potencjał wody podłoża na poziomie (-) 10 kPa. Doświadczenie rozpoczęło się 27.06.2022 i trwało do 18.09.2022. Stres suszy indukowano przez zaprzestanie nawadniania przez 23 dni. Po 23 dniach rośliny były nawadniane optymalnie, jak w kontroli. W trakcie doświadczenia prowadzono

pomiary wzrostu roślin oraz parametrów fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych. Próby liści do analiz biochemicznych i molekularnych zbierano w pięciu terminach: przed rozpoczęciem suszy (T0) oraz po 11, 15, 18 i 23 dniach trwania suszy. Każda kombinacja doświadczalna reprezentowana była przez próbę mieszaną, przygotowaną z najmłodszych, w pełni rozwiniętych liści. Z każdego z 10 drzew w danej kombinacji pobierano po 2–3 liście, które następnie łączono w jedną próbę obejmującą łącznie 20-30 liści. Dla każdej kombinacji przygotowano trzy niezależne powtórzenia biologiczne. Zebrane liście cięto na fragmenty, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej (-80 °C) do czasu wykonania analiz.

3.2.2. Ocena reakcji fizjologicznych

Ocena wzrostu roślin

Pomiary parametrów wzrostu roślin prowadzono po jej zakończeniu (w 23 dniu) oraz w połowie września (8 tygodni po zakończeniu suszy) po zakończeniu wzrostu roślin (w fazie 91 według skali BBCH). Zmierzona została wysokość i średnica pędu głównego oraz długość pędów bocznych roślin optymalnie nawadnianych (kontrola) i rosących w stresie suszy. Oceniano po 10 roślin w każdym traktowaniu. Przyrost procentowy obliczano porównując uzyskane wyniki zakończenia wzrostu roślin (w fazie 91 według skali BBCH) do wyników pomiarów przeprowadzonych po zakończeniu stresu suszy (w 23 dniu).

Potencjał wody w liściach

Potencjał wody w liściach wykonano na 5 w pełni wykształconych młodych liściach z każdej z kombinacji doświadczenia, w dwóch terminach: 11. i 23. dniu po zaindukowaniu stresu suszy. Potencjał wody analizowano z wykorzystaniem komór psychrometrycznych (Wescor, USA).

Wymiana gazowa

Pomiary natężenia fotosyntezy (ang. photosynthetic rate - natężenie fotosyntezy netto, Pn [$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]) oraz natężenia transpiracji (ang. transpiration rate, Tr [$\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$]) wykonano trzykrotnie podczas trwania doświadczenia, po 11, 21 i 23 dniach po zaindukowaniu stresu wodnego. Pomiary wykonano na 20 losowo wybranych liściach z każdej kombinacji, wykorzystując przenośny system do pomiaru fotosyntezy LCpro+ (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, UK). Temperaturę, stężenie CO₂

i napromieniowanie w kuwecie podczas analizy ustawiono na zbliżone do warunków otoczenia.

Zawartość chlorofilu

Względną zawartość chlorofilu (CCI) w liściach oceniano pięciokrotnie podczas trwania doświadczenia: przed rozpoczęciem suszy, po 11, 21 i 23 dniach suszy oraz po zakończeniu wzrostu roślin (w fazie 91 BBCH) - 8 tygodni po zakończeniu suszy. Pomiary wykonano metodą optyczną z użyciem chlorofilometru CCM-200 Plus. Pomiary wykonano na pięciu najmłodszych w pełni rozwiniętych liściach z 10 roślin każdej kombinacji.

Sprawność aparatu fotosyntetycznego

Pomiary fluorescencji chlorofilu (ang. maximum quantum yield of photosystem II - maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II, Fv/Fm) wykonano 5 razy podczas trwania doświadczenia: przed rozpoczęciem suszy, po 11, 21 i 23 dniach suszy oraz po zakończeniu wegetacji roślin (w fazie 91 BBCH.) -8 tygodni po zakończeniu suszy. Pomiary wykonywano na pięciu młodych w pełni rozwiniętych liściach z 10 roślin każdej kombinacji przy użyciu fluorymetru OS-30p+ (Opti-Sciences, Inc., Hudson, USA). Aktywność fotosyntetyczną roślin oceniano określając maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II(Fv/Fm). Przed dokonaniem pomiaru próbki umieszczano w ciemności na 20 minut.

3.2.3. Ocena reakcji na poziomie biochemicznym

Homogenizacja próbek do oznaczania enzymów antyoksydacyjnych

Z zamrożonego materiału roślinnego odważono 0,1 g tkanki i homogenizowano w 1 ml 0,05 M buforu fosforanowego o pH 7,0, następnie wirowano w 4°C przy 2800 rpm przez 10 minut i zostawiono na noc w temperaturze ok. 4°C. Supernatant wykorzystywano do poniższych analiz enzymatycznych.

Pomiary zawartości białek rozpuszczalnych

Stężenie białek rozpuszczalnych zostało oznaczone metodą Bradforda, (1976). Mieszaninę reakcyjną stanowiło 10 µl supernatantu i 190 µl odczynnika Bradforda. Po wstrząśnięciu próbki i inkubacji przez około 15 minut, mierzono absorbancję próbki

przy długości fal 595 nm. Wyniki odniesione zostały do krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla BSA (albumina z osocza krwi wołu) (Sigma) i wyrażone w mg na 1 g tkanki roślinnej. Każda kombinacja doświadczalna reprezentowana była przez 3 powtórzenia biologiczne.

Aktywność katalazy

Aktywność katalazy (CAT) w liściach jabłoni oznaczano spektrofotometrycznie metodą Aebigo (1984). Do wykonania analizy zastosowano 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,0, i 0,03 M roztwór H₂O₂ w tym samym buforze. Spektrofotometr zerowano na czystym buforze (1,9 ml), po czym dodawano 0,5 ml roztworu H₂O₂ i oba składniki mieszano. Następnie dodawano 50 µl supernatantu, mieszano i przez 2 minuty mierzono spadek absorbancji przy $\lambda=240$ nm w temperaturze 20°C. Aktywność każdej próbki przeliczono na ilość obecnego w niej białka (aktywność specyficzna). Jednostka: Δ ABS/g białka.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczono metodą cytochromową (McCord i Fridovich, 1969) z użyciem spektrofotometru Epoch (Biotek). Przygotowana została mieszanina reakcyjna składająca się z 0,1 mM EDTA, 1 mM roztworu cytochromu c (Sigma) i 1 mM roztworu ksantyny (Sigma) oraz buforu fosforanowego o pH 7,8. Uzyskaną mieszaninę napowietrzano przez silne mieszanie na mieszadle magnetycznym, co miało na celu maksymalne utlenienie cytochromu. Utleniony cytochrom zredukowano anionorodnikiem ponadtlenkowym wytworzonym przez układ ksantyna/oksydaza ksantynowa. W tym celu do mieszaniny reakcyjnej dodawano $8-10 \times 10^{-3}$ ml oksydazy ksantynowej (aktywność 50U, Grade I, Sigma) i przez 2 minuty badano kinetykę reakcji przy $\lambda=550$ nm. Obecna w roślinach SOD powodowała inhibicję redukcji cytochromu c. Jednostka: Δ ABS/g białka.

Aktywność peroksydazy

Aktywność peroksydazy (POD) wykonano zmodyfikowaną metodą Lúcka (1962). Pomiar przeprowadzono spektrofotometrycznie przy $\lambda=485$ nm. Polegał on na określeniu ilości produktów oksydacji p-fenylendwuaminy (Sigma) w obecności H₂O₂. Mieszanina inkubacyjna zawierała 3 ml supernatantu roślinnego i 2 ml 1% p-fenylendwuaminy w 0,05 M buforze fosforanowym. Reakcję zapoczątkowano dodatkiem 0,05 ml 0,03 mM H₂O₂. Jednostka: Δ ABS/g białka.

Zawartość proliny

Zawartość proliny w liściach oznaczano metodą opracowaną przez Bates i in. (1973). Próbkę 0,1 g materiału roślinnego homogenizowano z 2 ml 3% kwasu sulfosalicylowego i wirowano przez 5 minut przy 14000 obrotów. Do 200 µl odwirowanego ekstraktu roślinnego dodawano 200 µl 98-100% kwasu mrówkowego i 400 µl 3% roztworu ninhydryny w dwumetoksyetanolu. Próbówki inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 100°C przez 30 minut. Po wystudzeniu mierzono absorbancję próbki przy długości fali 514 nm, a zawartość proliny odczytywano z sześciopunktowej krzywej wzorcowej wyznaczonej na podstawie standardu. Jednostka: µg/mg FW liści.

Zawartość MDA

Poziom uszkodzeń oksydacyjnych błon cytoplazmatycznych oceniano poprzez spektrofotometryczny pomiar zawartości produktu peroksydacji lipidów błonowych, tj. dialdehydu malonowego (MDA), reagującego z kwasem triobarbiturowym (TBA) wg Heath i Packer (1968). Około 0,1 g tkanki roślinnej homogenizowano z 1 ml 20% kwasu trichlorooctowego (TCA), próbki wirowano przy 40000 rpm przez 5 minut. Do 1 ml supernatantu dodano 1 ml 20 % TCA zawierający 0,5 TBA. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 95°C przez 25 minut po czym szybko schłodzono i wirowano przy 10000 rpm × g przez 5 minut. Absorbancję próbek zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fal 532, 450 i 600 nm. Jednostka: mM/FW liści.

3.2.3. Ocena reakcji na poziomie molekularnym

Izolacja RNA z liści jabłoni

Izolację RNA z prób liści jabłoni (pobieranie prób opisano w 3.2.1.) przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp.). Izolacja przeprowadzona została według instrukcji podanej przez producenta. Do izolacji użyto ok. 50 mg utartej tkanki roślinnej. Uzyskane preparaty RNA analizowano przy użyciu spektrofotometru Epoch (Biotek) w dwóch powtórzeniach, mierzono wartość absorbancji przy 260, 280 i 320 nm. Wyniki pomiarów posłużyły do oszacowania stężenia całkowitego RNA w preparatach, a wartość współczynnika 260/280 nm do oceny czystości preparatów.

Analiza ekspresji genów metodą RT-qPCR

Do analizy wybrano geny kodujące enzymy antyoksydacyjne – dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), peroksydazę askorbinianową (APX) i peroksydazę glutationową (GPX). Sekencje starterów użytych do analizy ekspresji genów prezentuje Tabela 1. W celu przygotowania cDNA do reakcji, preparaty RNA zostały poddane trawieniu DNAzą (Promega), aby pozbyć się pozostałości DNA. Preparaty RNA oczyszczono z mieszaniny reakcyjnej za pomocą zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) wykorzystując protokół do oczyszczania z mieszanin reakcyjnych (RNA clean up, Qiagen). Uzyskane preparaty poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies). Uzyskane cDNA wykorzystano jako matrycę w reakcjach qRT-PCR. Reakcje RT-qPCR prowadzone były przy użyciu barwnika fluorescencyjnego SYBR Green (KAPA SybrFast qPCR Master Mix Kit, KAPA Biosystems) w aparacie Rotorgene 6000 (Corbett Research). Reakcję amplifikacji przeprowadzono w 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 2 µl 10-krotnie rozcieńczonej matrycy ss cDNA; 1x qPCR Master Mix oraz po 200 nM każdego ze starterów. Reakcje prowadzono przy następującym profilu termicznym: denaturacja wstępna w 95°C przez 3 minuty; 45 cykli reakcji amplifikacji (denaturacja w 95°C przez 3 sekundy, przyłączanie starterów w optymalnej dla każdego startera temperaturze annealingu przez 20 sekund, wydłużanie w 72°C przez 1 sekundę). Na końcu każdej reakcji PCR została zanalizowana krzywa topnienia produktów amplifikacji w zakresie temperatur 72-95°C, przy wzroście temperatury 1/5 sekund. Każdą reakcję real-time PCR przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Poziom transkryptów obliczano na podstawie krzywej standardowej przy współczynniku korelacji >0,99. Poziom ekspresji genów wyrażony został jako względna ilość mRNA, normalizowana w stosunku do genu referencyjnego kodującego aktynę *AC11*. Analizę ekspresji wykonano w trzech biologicznych powtórzeniach.

Tabela 1. Startery wykorzystane w analizie ekspresji genów.

Lp.	Gen	Sekwencja starterów (5'-3')	Temperatura annealingu (°C)
1.	<i>CAT</i>	F: GACTTCTTCTCCCACCATCCAG R: TTGGTAGCGTGGCTGTGATTAG	59
2.	<i>SOD</i>	F: GGGAGATGGCCCAACTACTG R: TTGCCAAGGTCATCAGGGTC	59
3.	<i>APX</i>	F: GCTTTCTTTGCTGACTATGCTGAA R: ATTGGCTTCATCCCTTGTTAGTTCT	58
4.	<i>GPX</i>	F: ATTCCCATGCAACCAGTTTGGAGC R: AGCAGCATTGTCGCCATTCACATC	60
5.	<i>AC11</i>	F: GCTGTTCTTTCCCTCTACGC R: GCATGGGGAAGAGCATATCC	58

Statystyka

Do analizy statystycznej danych zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA), przeprowadzoną przy użyciu programu Statistica 13.1 (StatSoft, Polska). Różnice między grupami oceniono za pomocą testu Duncana, przy poziomie istotności $p = 0,05$.

3.3. Ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni oraz ocena mieszańcowości siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych

Do krzyżowań wykorzystano genotypy diploidalne oraz tetraploidalne jabłoni. Przeprowadzona została szczegółowa ocena efektywności krzyżowania. Badano żywotność oraz kiełkowanie pyłku genotypów użytych do krzyżowań. W celu określenia statusu mieszańca przeprowadzono analizę poziomu ploidalności siewek uzyskanych z tych krzyżowań, wykorzystując do tego metody cytometryczne oraz mikroskopowe. . Badano zawartość jądrowego DNA, by dokładniej ocenić poziom ploidii siewek: ich triploidalność lub ewentualnie aneuploidalność. Przeprowadzono także analizę liczby chromosomów w siewkach aby potwierdzić ich triploidalność.

3.3.1. Materiał roślinny

Do krzyżowań wykorzystano diploidy (2x) i tetraploidy (4x) jabłoni odmian ‘Redchief’, ‘Pinova’, ‘Free Redstar’, i ‘Gala Must’. Były to 5-8 letnie drzewa szczepione na podkładce M.9 rosnące w sadzie doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa - PIB w Dąbrowicach. Każdy genotyp reprezentowany był przez 5 roślin.

Klony tetraploidalne wybrane do krzyżowań:

‘Free Redstar’ - 4x-2, 4x-3, 4x-4

‘Gala Must’- 4x-2, 4x-5

‘Pinova’ – 4x-3, 4x-3L, 4x-4, 4x-5, 4x-16

‘Redchief’- 4x-8, 4x-11, 4x-14, 4x-25

Nasiona, uzyskane z krzyżowań poddano stratyfikacji, polegającej na umieszczeniu ich w styczniu, w wilgotnym płukanym piasku, w perforowanej torebce foliowej, w chłodziarce w temperaturze około 5°C. Po miesiącu przeprowadzono pierwszy przegląd i zarazem wietrzenie nasion, kolejne przeglądy wykonywano w odstępach tygodniowych. Kiełkujące nasiona (marzec, kwiecień) sukcesywnie wyjmowano z piasku i sadzono pojedynczo do doniczek (7x7 cm), wypełnionych

mieszaniną substratu torfowego (Alonet), ziemi kompostowej i piasku w proporcjach 1:1:1. Doniczki z kiełkującymi nasionami umieszczano w szklarni ze zmienną temperaturą (dzień 22°C, noc 18°C), zapewniając 16-godz. fotoperiod poprzez doświetlanie lampami sodowymi. Z przechowywanych w chłodni rocznych triploidalnych siewek oraz genotypów rodzicielskich pobierano zrazy i szczepiono w styczniu/lutym przez stosowanie na podkładce M.9. Szczepy umieszczano na miesiąc w chłodni (4°C) w celu indukcji tworzenia kalusa, a następnie sadzono je w doniczkach wypełnionych mieszaniną podłoża ogrodniczego (Alonet) i piasku w proporcji 4:1.

3.3.2. Ocena efektywności krzyżowania

Przeprowadzono krzyżowania klonów tetraploidalnych z odmianami diploidalnymi (krzyżowania interploidalne), przy czym autotetraploidy występowały zarówno jako rośliny męskie (zapyłane pyłkiem genotypów diploidalnych) jak i ojcowskie (dawcy pyłku do zapyłania genotypów diploidalnych). Schematy zapyleń prezentuje tabela 2. W każdej kombinacji krzyżowań zapyłano po 25-40 kwiatów, w zależności od intensywności kwitnienia genotypów męskich. Zapylenia poprzedzano zebraniem pyłku z roślin ojcowskich oraz kastracją kwiatów genotypów męskich. Zebrany pyłek badano pod względem żywotności i zdolności do kiełkowania (jak opisano w 3.1.3). Ocenę efektywności poszczególnych krzyżowań określano jako procent liczby uzyskanych siewek z liczby zapyłonych kwiatów.

Tabela 2. Schemat zapyleń wykonany w celu oceny zdolności do krzyżowania tetraploidów jabłoni w latach 2021-2024.

Nr kombinacji	Genotyp męski	Genotyp ojcowski
2021		
1.	'Free Redstar' 2x	'Szampion' 2x
2.	'Free Redstar' 2x	'Pinova' 4x-4
3.	'Free Redstar' 4x-2	'Szampion' 2x
4.	'Pinova' 2x	'Szampion'
5.	'Pinova' 2x	'Free Redstar' 4x-2
6.	'Pinova' 4x-4	'Szampion' 2x
7.	'Pinova' 4x-3L	'Szampion' 2x
2022		
1.	'Free Redstar' 2x	'Szampion' 2x
2.	'Free Redstar' 4x-2	'Szampion' 2x
3.	'Free Redstar' 4x-3	'Szampion' 2x
4.	'Pinova' 2x	'Szampion' 2x
5.	'Pinova' 4x-3L	'Szampion' 2x
6.	'Pinova' 4x-4	'Szampion' 2x

2023		
1.	'Free Redstar' 2x	'Gold Milenium' 2x
2.	'Free Redstar' 4x-2	'Gold Milenium' 2x
3.	'Pinova' 2x	'Gold Milenium' 2x
4.	'Pinova' 4x-4	'Gold Milenium' 2x
5.	'Pinova' 4x-5	'Redchief' 2x
6.	'Redchief' 2x	'Pinova' 4x-5
7.	'Redchief' 4x-8	'Pinova' 2x
8.	'Redchief' 4x-14	'Gold Milenium' 2x
2024		
1.	'Gala Must' 2x	'Pinova' 4x-3
2.	'Gala Must' 2x	'Free Redstar' 4x-3
3.	'Gala Must' 4x-2	'Free Redstar' 2x
4.	'Gala Must' 4x-5	'Redchief' 2x
5.	'Free Redstar' 2x	'Gala Must' 4x-1
6.	'Free Redstar' 4x-4	'Redchief' 2x
7.	'Free Redstar' 4x-3	'Pinova' 2x
8.	'Pinova' 2x	'Redchief' 4x-11
9.	'Pinova' 2x	'Gala Must' 4x-8
10.	'Pinova' 4x-16	'Gala Must' 2x
11.	'Pinova' 4x-3	'Gala Must' 2x
12.	'Redchief' 2x	'Pinova' 4x-16
13.	'Redchief' 2x	'Free Redstar' 4x-4
14.	'Redchief' 4x-25	'Gala Must' 2x
15.	'Redchief' 4x-11	'Gold Milenium' 2x

Analiza poziomu ploidalności

Ocenę poziomu ploidalności (FCM/DAPI) siewek przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej. Do badań pobrano młode liście z roślin rosnących w szklarni. W celu ekstrakcji jąder komórkowych, pobrany materiał roślinny został rozdrobniony żyletką, zalany buforem (1,5 ml), filtrowany przez filtr 30 µm i inkubowany w temperaturze pokojowej przez 30 minut w ciemności. Fluorescencję jąder mierzono przy użyciu cytometru przepływowego CyFlow Space (Sysmex Partec, Niemcy) z wykorzystaniem diody UV LED (365 nm). Do analiz użyto buforu ekstrakcyjnego Partec (Śliwińska, 2008), zawierającego 1% PVP z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI). Poziom ploidalności określano na podstawie histogramów - średniej odczytywanej na osi X dla pików fluorescencji DNA reprezentującego zawartość jądrowego DNA danej siewki w odniesieniu do średniej pików roślin rodzicielskich diploidalnych i tetraploidalnych. Dane analizowano za pomocą oprogramowania FloMax (Sysmex Partec GmbH, Niemcy).

Analiza zawartości jądrowego DNA

Analizę wielkości genomu (względnej zawartości jądrowego DNA) przeprowadzono przy użyciu cytometrii przepływownej (FCM/PI). Tkanka liścia (0,5-1 cm²) została rozdrobniona razem z fragmentem liścia (1 cm²) wewnętrznego wzorca roślinnego o znanej wielkości genomu na płytce Petriego w 0,5 ml buforu izolacyjnego Partec, do którego dodano jodek propidyny (PI) (50 mg·ml⁻¹) i RNazę (50 mg·ml⁻¹). Jako wzorzec wewnętrzny wykorzystano kukurydzę *Zea mays* (2C- 5,43 pg). Po dodaniu 1 ml bufora izolacyjnego, próbki przefiltrowano przez filtr 30 µm i inkubowano przez 50-60 minut w temperaturze pokojowej. Fluorescencję jąder komórkowych zmierzono przy użyciu cytometru przepływowego (CyFlow Space, Sysmex) z wykorzystaniem zielonego lasera 532 nm. Dane analizowano za pomocą oprogramowania FloMax (Sysmex Partec GmbH, Niemcy). Wielkość genomu danego genotypu obliczano według wzoru: dane dla położenia na osi X piklu fluorescencji DNA badanego genotypu podzielone przez dane położenia na osi X piklu fluorescencji DNA kukurydzy i pomnożone przez zawartość jądrowego DNA kukurydzy. Analizy przeprowadzono w 5 powtórzeniach.

Analiza liczby chromosomów

Do analizy pobrano wierzchołki korzeni o długości ok. 1 cm, które następnie traktowano 2 mM 8-hydroksychinoliną przez 4 godziny, utrwalano w roztworze 3:1 etanol: lodowaty kwas octowy przez co najmniej 12 godzin, a następnie trawiono mieszaniną enzymów składającą się z 20% pektynazy (Sigma-Aldrich, USA) i 2% celulazy „Onozuka R-10” (Duchefa, Holandia) w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Preparaty chromosomowe wykonano z merystemów korzeni rozgniatanych w kropli 45% (v/v) kwasu octowego i barwione 2,5 g ml⁻¹ DAPI (Serva, Niemcy). Dla każdego genotypu wykonano dokumentację fotograficzną dla 5 płytek chromosomowych w stadium metafazy za pomocą cyfrowej kamery CCD PS-Fi1 (Nikon, Japonia), podłączonej do mikroskopu epifluorescencyjnego Optiphot-2 (Nikon, Japonia), przy użyciu wzbudzenia UV do wizualizacji DAPI.

Statystyka

Do analizy statystycznej danych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), przeprowadzoną przy użyciu programu Statistica 13.1 (StatSoft, Polska). Różnice między grupami oceniono za pomocą testu Duncana, przy poziomie istotności $p = 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni

4.1.1. Ocena liści

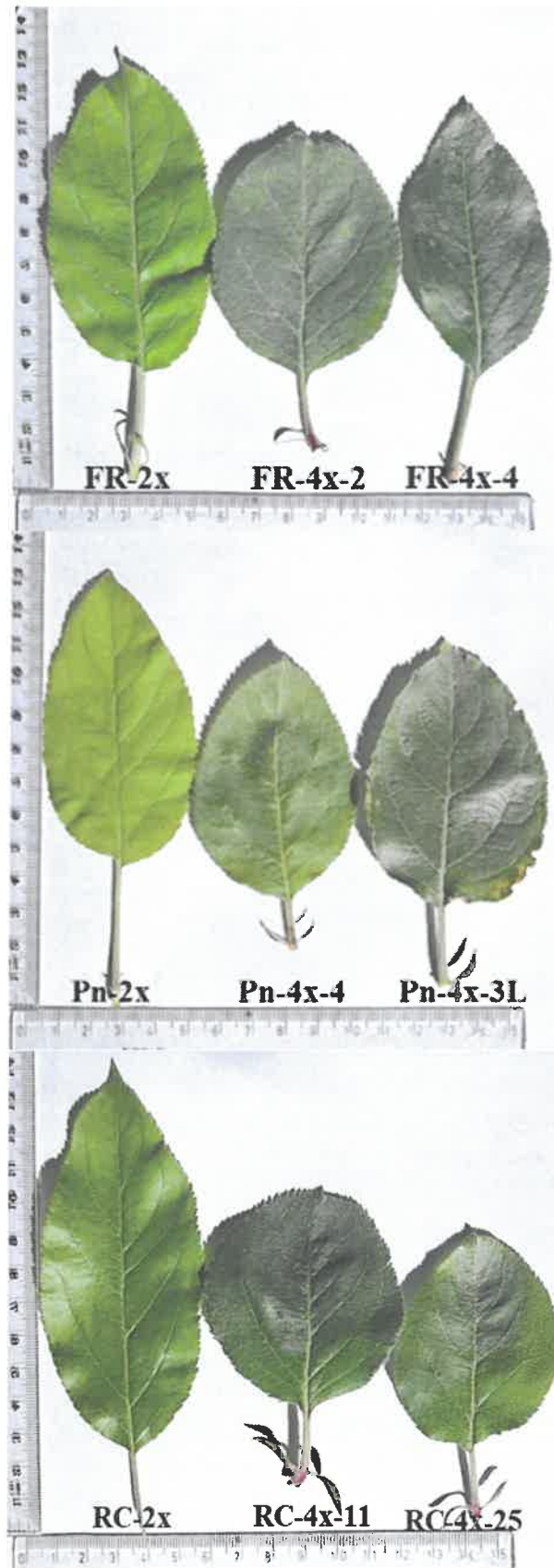
Rozmiar liści

Mierzono powierzchnię, długości oraz szerokości liści u 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova': diploidów (2x) i tetraploidów (4x) (Tab. 3, Rys. 6). U wszystkich odmian, diploidy w porównaniu do tetraploidów charakteryzowały się istotnie większą powierzchnią liści o około 55% u 'Free Redstar', 17 do 30% u 'Redchief' i 20% u 'Pinova'. Z wyjątkiem klonu 'Free Redstar' 4x-4, o liściach podłużnych jak u diploidów, liście pozostałych tetraploidów były bardziej okrągłe, o czym świadczy istotnie niższy niż u diploidów stosunek długości do szerokości liścia. Wykazano także istotne różnice pomiędzy klonami tetraploidalnymi tej samej odmiany pod względem powierzchni liści - klony 'Redchief' 4x-11 i 4x-25.

Tabela 3. Różnice morfologiczne liści tetraploidów i diploidów jabłoni odmian 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova'.

Genotyp	Powierzchnia liści (cm ²)	Długość liści (cm)	Szerokość liści (cm)	Stosunek długości do szerokości liścia
'Free Redstar'				
2x	42,0 ± 10,3 a	8,5 ± 0,6 a	4,2 ± 1,0 b	2,18 ± 0,20 a
4x-2	26,9 ± 5,5 b	6,7 ± 0,7 b	5,5 ± 0,6 a	1,20 ± 0,18 b
4x-4	25,8 ± 4,3 b	6,6 ± 0,8 b	5,3 ± 0,7 a	1,24 ± 0,15 b
'Redchief'				
2x	33,3 ± 8,1 a	9,6 ± 1,1 a	4,3 ± 1,2 c	2,23 ± 0,31 a
4x-11	28,4 ± 3,4 b	8,1 ± 0,9 b	5,4 ± 0,6 a	1,58 ± 0,20 b
4x-25	23,6 ± 3,9 c	7,2 ± 0,9 c	4,9 ± 0,6 b	1,46 ± 0,18 b
'Pinova'				
2x	29,8 ± 3,1 a	9,8 ± 1,0 a	4,1 ± 0,9 a	2,39 ± 0,13 a
4x-4	25,2 ± 2,6 b	5,7 ± 0,6 c	6,2 ± 0,6 a	0,95 ± 0,11 b
4x-3L	25,5 ± 2,1 b	6,8 ± 1,6 b	6,3 ± 0,6 a	1,02 ± 0,15 b

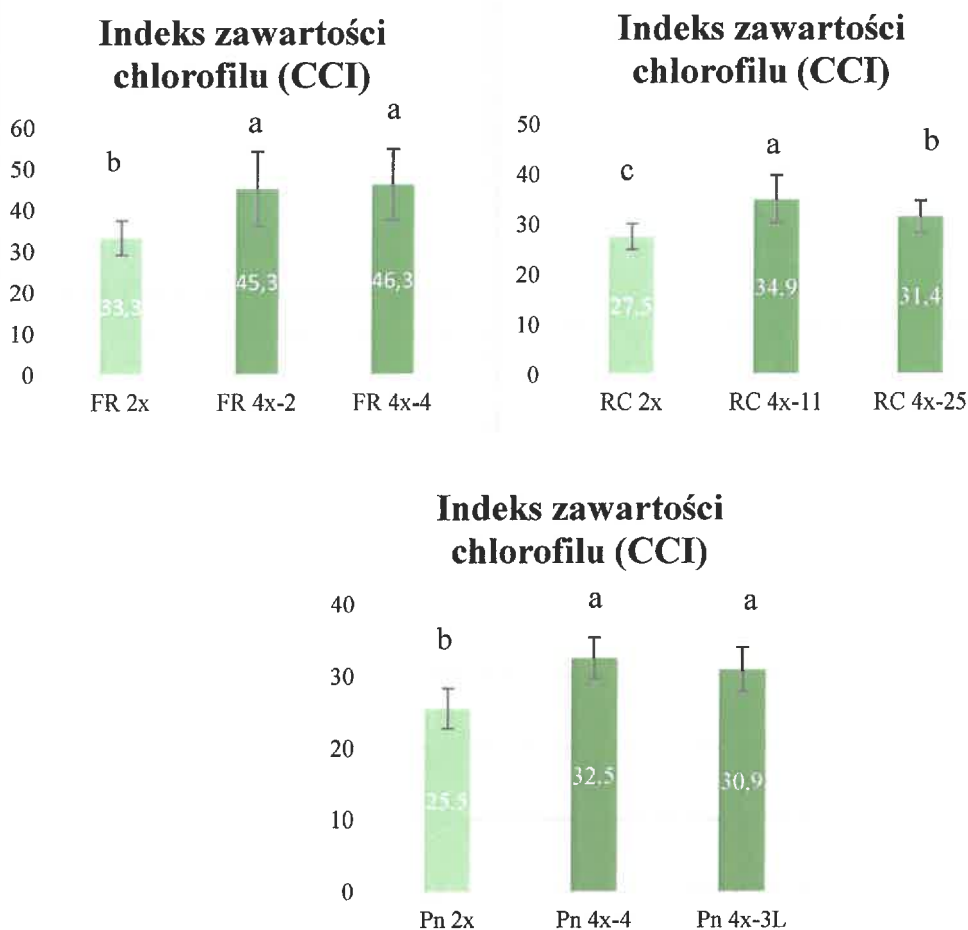
średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.



Rysunek 6. Liście jabłoni diploidalnej (2x) i klonów tetraploidalnych (4x) odmian: 'Free Redstar' (FR), 'Redchief' (RC), 'Pinova' (Pn).

Zawartość chlorofilu (CCI) w liściach

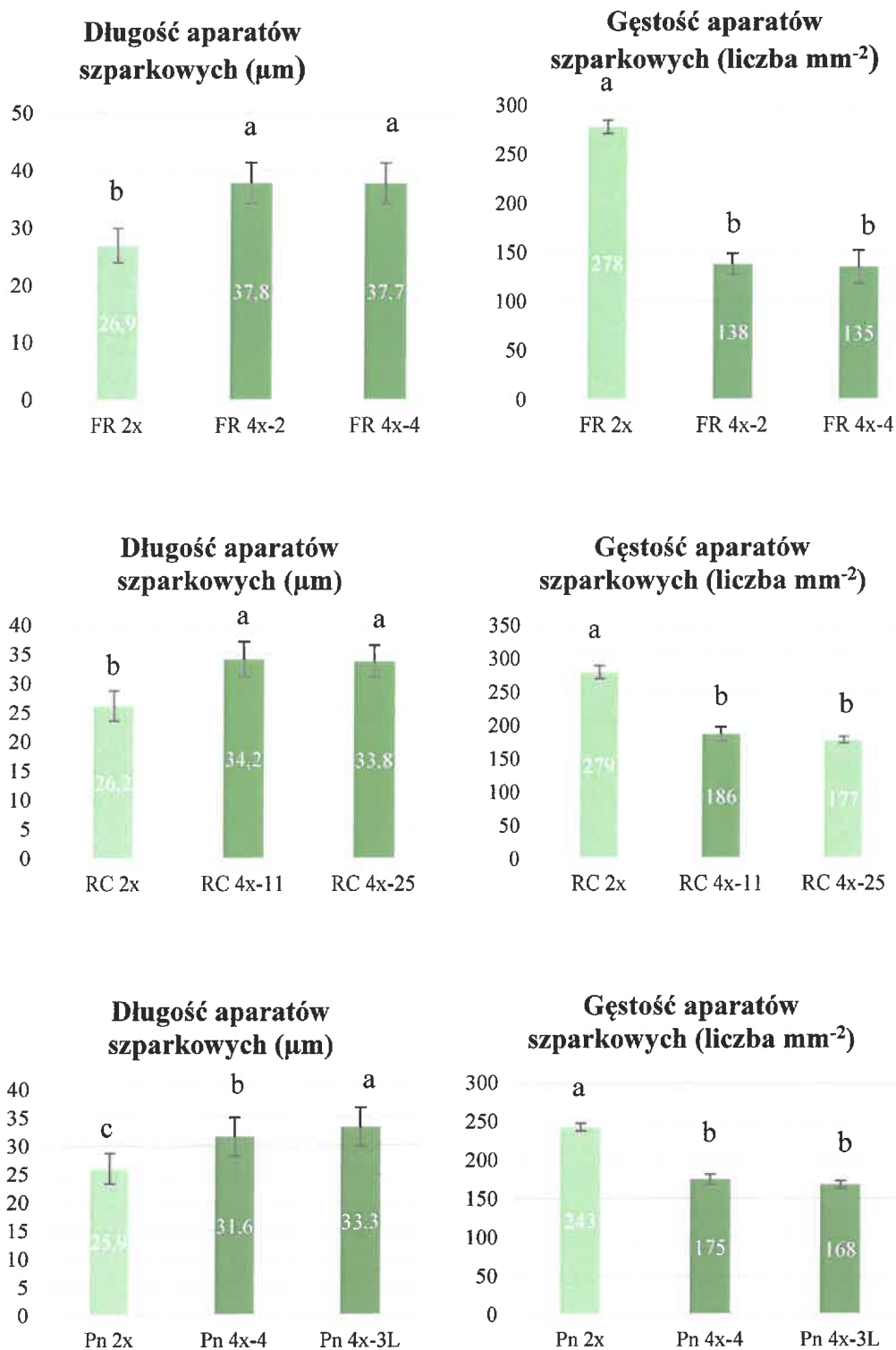
Pomiary zawartości chlorofilu przeprowadzono u trzech odmian jabłoni 'Free Redstar', 'Redchief', 'Pinova' dla diploidów (2x) i tetraploidów (4x). Liście tetraploidów wszystkich odmian zawierały istotnie więcej chlorofilu w porównaniu do diploidów o około 37% u 'Free Redstar', 20% u 'Pinova' oraz 27% i 12% u 'Redchief'; u ostatniej odmiany różnice pomiędzy klonami tetraploidalnymi były istotne. (Rys. 7).



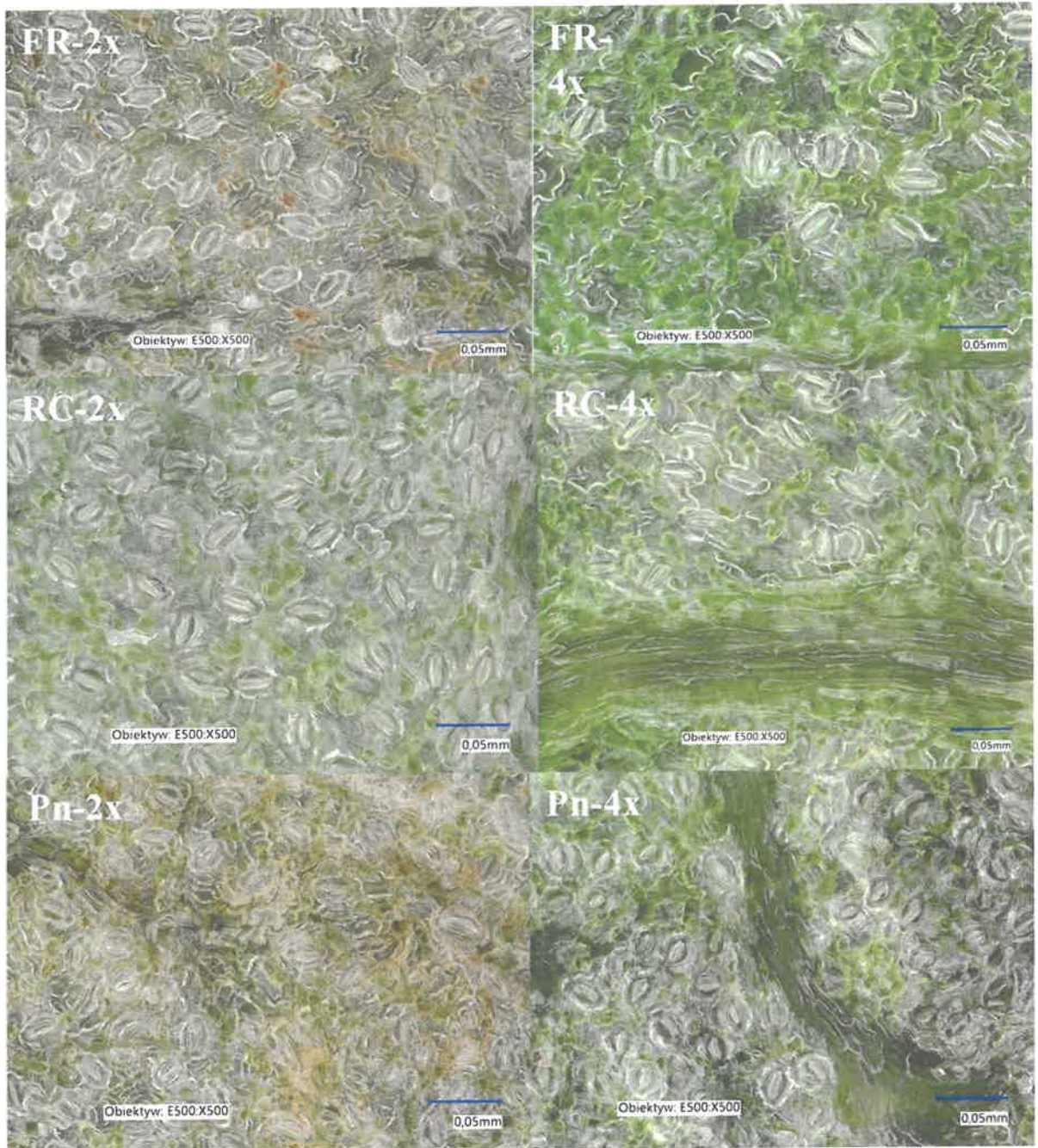
Rysunek 7. Zawartość chlorofilu (CCI) w liściach diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmian 'Free Redstar' (FR), 'Redchief' (RC), 'Pinova' (Pn); średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.

Wielkość i gęstość aparatów szparkowych

Z przeprowadzonych analiz wynika, że aparaty szparkowe tetraploidów wszystkich badanych odmian są istotnie dłuższe niż u diploidów o około 40% u 'Free Redstar', o 30% u 'Redchief' i 26% u 'Pinova'. Natomiast gęstość aparatów szparkowych jest istotnie wyższa u diploidów niż u klonów tetraploidalnych o średnio 103% u 'Free Redstar', o 54% u 'Redchief' i o 42% u 'Pinova' (Rys. 8).



Rysunek 8. Długość oraz gęstość aparatów szparkowych u diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmian ‘Free Redstar’ (FR), ‘Redchief’ (RC), ‘Pinova’ (Pn); średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.

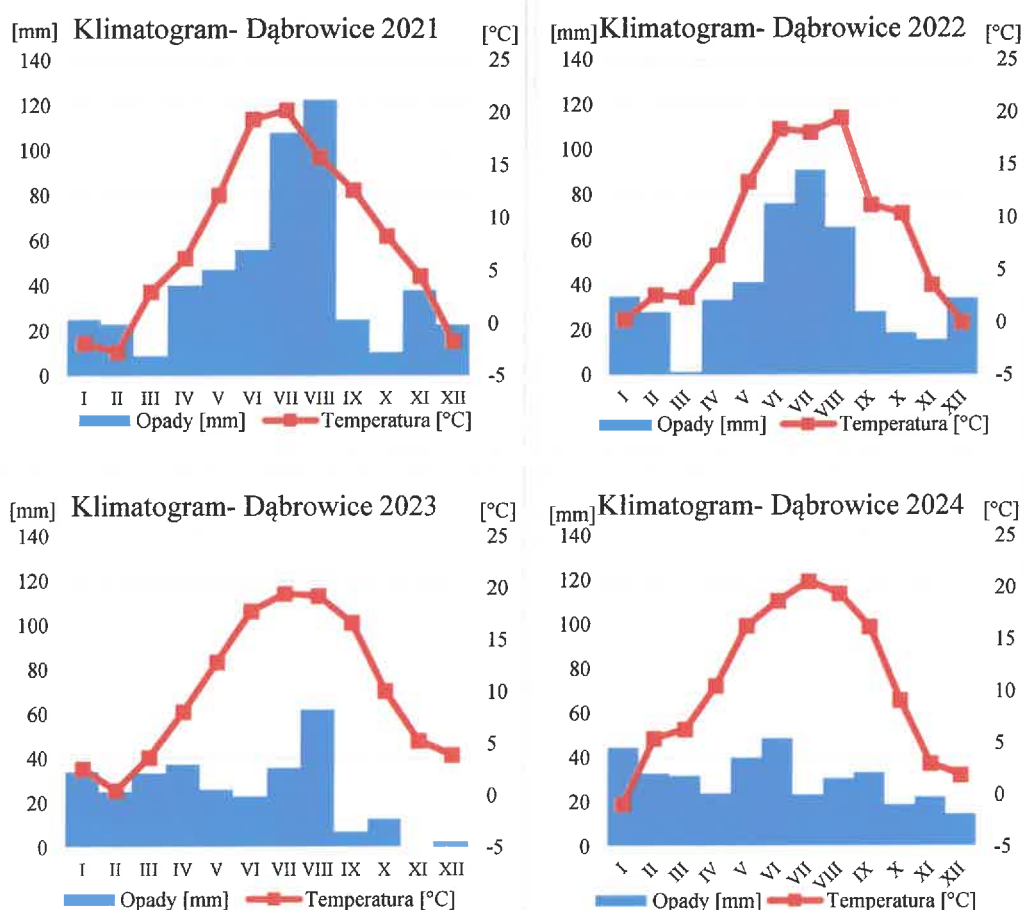


Rysunek 9. Aparaty szparkowe diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmian ‘Free Redstar’(FR), ‘Redchief’ (RC), ‘Pinova’ (Pn); skala 0,05 mm; powiększenie 500x.

4.1.2. Ocena kwitnienia

Termin i intensywność kwitnienia

Obserwacje terminu oraz intensywności kwitnienia w fazie 61 BBCH - (otwarcia pierwszych kwiatów) prowadzono w kolejnych latach od 2021 do 2024, odpowiednio u 5-, 6-, 7- i 8-letnich drzew (Tab. 4, Rys. 11). Rok 2021 to pierwszy sezon, w którym drzewa zakwitły i ze względu na młody wiek roślin (5-letnie drzewa) kwitnienie było mało intensywne. Formy diploidalne (2x) wszystkich badanych odmian kwitły intensywniej niż tetraploidy (4x). U odmiany 'Redchief' żaden z badanych klonów tetraploidalnych nie zakwitł; pierwsze kwitnienie u jednego z klonów obserwowano w 2022 r., a drugiego (4x-25) w 2024 roku. U 'Free Redstar' i 'Pinova' w kolejnych latach 2022 - 2024 obserwowano wzrost intensywności kwitnienia zarówno u diploidów jak i tetraploidów. W trzecim i czwartym roku obserwacji diploidy tych odmian kwitły już obficie, a tetraploidy nieco słabiej; intensywność kwitnienia oceniono według skali na 4 i 3, odpowiednio u diploidów i tetraploidów. Tetraploidy wszystkich odmian rozpoczęły kwitnienie o 2 do 4 dni później w ciągu sezonu wegetacyjnego niż ich diploidalne formy wyjściowe. Ponadto stwierdzono duże różnice w terminach kwitnienia jabłoni w kolejnych latach obserwacji. Wiązało się to z wyjątkowo różnymi warunkami atmosferycznymi wpływającymi na rozwój roślin, o czym świadczą dane na klimatogramach (Rys. 10). W 2022 i 2023 roku kwitnienie rozpoczęło się typowo - w pierwszym tyg. maja. W 2021 roku jabłonie zakwitły bardzo późno, w drugiej połowie maja, szczególnie chłodny kwiecień, z przeciętną temperaturą około 6°C spowodował znaczne opóźnienie kwitnienia, dopiero wzrost temperatury w maju umożliwił rozpoczęcie kwitnienia. W 2024 roku warunki pogodowe charakteryzowały się wyjątkowo ciepłym początkiem kwietnia. Jak pokazują dane meteorologiczne, średnie temperatury w marcu i kwietniu osiągnęły odpowiednio około 7-10°C, co sprzyjało wcześniejszemu przejściu drzew ze spoczynku zimowego do fazy aktywnego wzrostu. W efekcie pierwsze kwiaty pojawiły się już w drugim tygodniu kwietnia.



Rysunek 10. Klimatogramy dla Dąbrowic w latach 2021-2024.

Tabela 4. Ocena terminu początku kwitnienia oraz intensywności kwitnienia drzew jabłoni rosnących w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach w latach 2021-2024.

Genotyp	Termin kwitnienia	Intensywność kwitnienia*
2021		
‘Free Redstar’		
2x	17-05-2021	3
4x-2	20-05-2021	2
4x-4	18-05-2021	1
‘Redchief’		
2x	17-05-2021	3
4x-11	-	-
4x-25	-	-
‘Pinova’		
2x	17-05-2021	4
4x-4	18-05-2021	1
4x-3L	19-05-2021	1

2022		
'Free Redstar'		
2x	03-05-2022	4
4x-2	06-05-2022	2
4x-4	06-05-2022	2
'Redchief'		
2x	06-05-2022	4
4x-11	09-05-2022	3
4x-25	-	-
'Pinova'		
2x	04-05-2022	4
4x-2	08-05-2022	3
4x-4	08-05-2022	3
2023		
'Free Redstar'		
2x	29-04-2023	4
4x-2	02-05-2023	3
4x-4	03-05-2023	3
'Redchief'		
2x	03-05-2023	4
4x-11	07-05-2023	1
4x-25	-	-
'Pinova'		
2x	03-05-2023	4
4x-2	05-05-2023	3
4x-4	05-05-2023	3
2024		
'Free Redstar'		
2x	09-04-2024	4
4x-2	09-04-2024	3
4x-4	09-04-2024	3
'Redchief'		
2x	09-04-2024	4
4x-11	12-04-2024	3
4x-25	12-04-2024	1
'Pinova'		
2x	09-04-2024	4
4x-2	12-04-2024	3
4x-4	12-04-2024	3

*skala bonitacyjna 0-4, gdzie: 0-brak kwiatów, 1-do 10 kwiatów, 2-11-20 kwiatów, 3-21-30 kwiatów, 4-31 i więcej kwiatów.



Rysunek 11. Kwitnienie diploidów (2x) i tetraploidów (4x) drzew jabłoni ‘Pinova’ i ‘Redchief’ w 2022 roku.

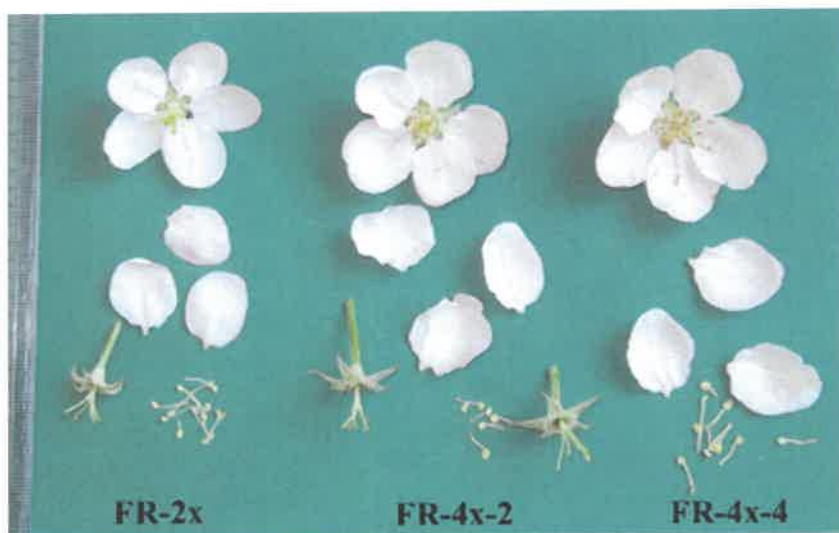
Wielkość i liczba kwiatów w kwiatostanie

Kwiaty wszystkich klonów tetraploidalnych miały istotnie większą średnicę niż kwiaty diploidów tych samych odmian (Tab. 5) o około 8% u ‘Free Redstar’, 21% i 32% u ‘Redchief’ oraz 14% u ‘Pinova’. Poszczególne elementy kwiatów takie jak: działki kielicha, płatki korony, pręciki, słupek u klonów tetraploidalnych były większe niż u ich diploidalnych odmian wyjściowych (Rys. 12, 13, 14). Klony tetraploidalne charakteryzowały się mniejszą liczbą kwiatów w kwiatostanie, ale nie zawsze obserwowane różnice były istotne statystycznie. Klony tetraploidalne ‘Redchief’ różniły się istotnie między sobą, zarówno wielkością kwiatów jak i liczbą kwiatów w kwiatostanie (Tab. 5).

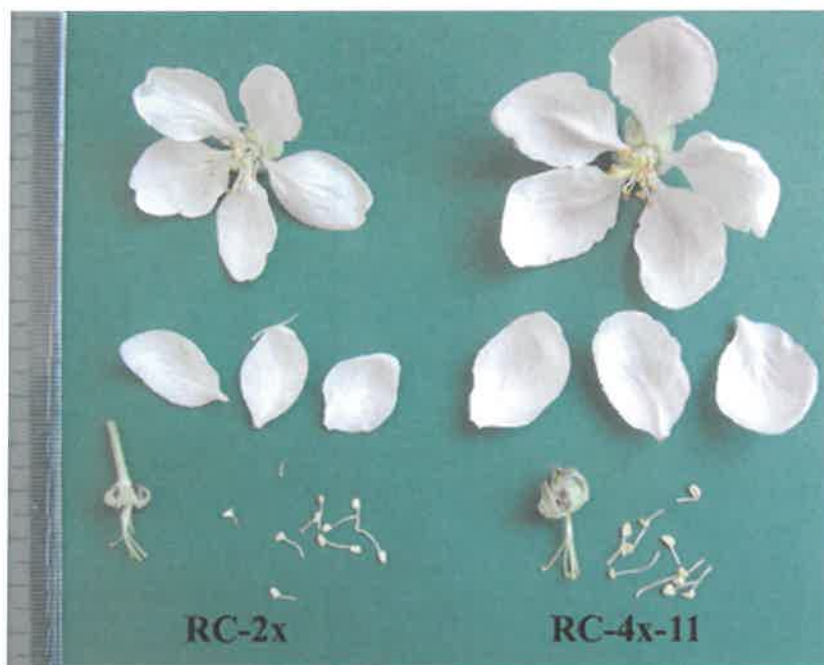
Tabela 5. Charakterystyka kwiatów i kwiatostanów diploidów (2x) i tetraploidów (4x) trzech odmian jabłoni.

Genotyp	Średnica kwiatu (mm)	Liczba kwiatów/kwiatostan
'Free Redstar'		
2x	51,2 ± 3,3 b	4,7 ± 0,5 a
4x-2	56,0 ± 1,7 a	4,2 ± 0,5 b
4x-4	54,6 ± 2,5 a	4,6 ± 0,6 ab
'Redchief'		
2x	49,4 ± 2,5 c	5,6 ± 0,7 a
4x-11	59,9 ± 3,0 b	5,2 ± 0,7 ab
4x-25	65,4 ± 3,6 a	4,9 ± 0,9 b
'Pinova'		
2x	53,9 ± 2,6 b	5,1 ± 0,6 a
4x-4	60,7 ± 3,9 a	4,7 ± 0,9 ab
4x-3L	61,6 ± 3,1 a	4,4 ± 0,9 b

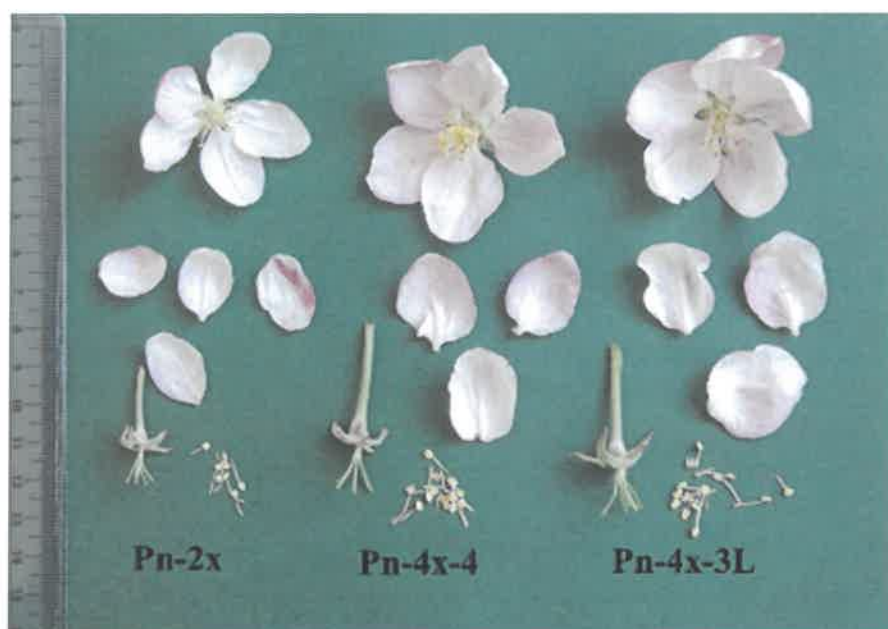
średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.



Rysunek 12. Kwiaty diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmiany 'Free Redstar'.



Rysunek 13. Kwiaty diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmiany ‘Redchief’.



Rysunek 14. Kwiaty diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmiany ‘Pinova’.

Analiza wielkości i żywotności pyłku

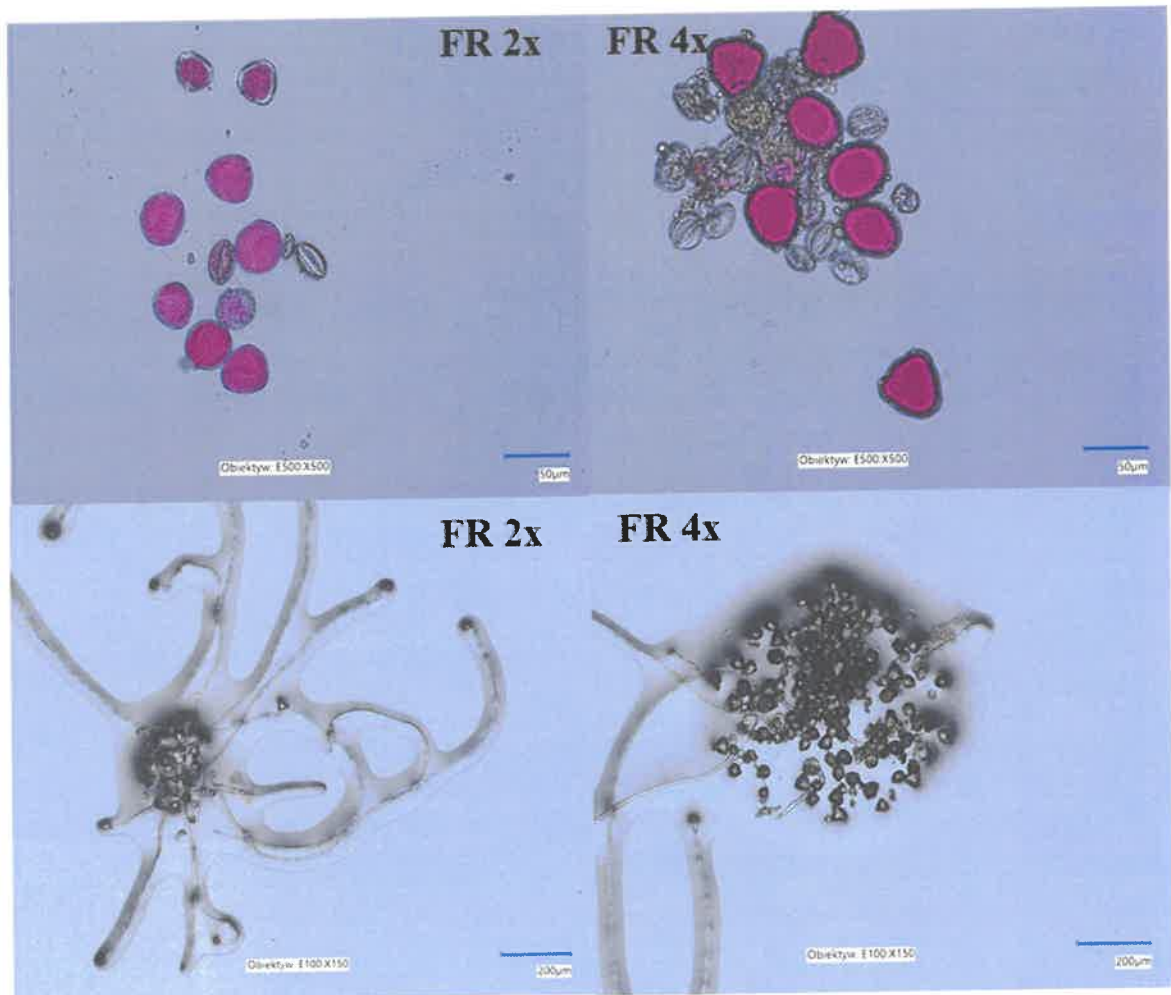
Przeprowadzono mikroskopowe obserwacje wielkości, żywotności oraz kiełkowania pyłku trzech odmian jabłoni: 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova'. W analizie uwzględniono genotypy diploidalne (2x) oraz tetraploidalne (4x). U wszystkich odmian, które zostały poddane analizie obserwowano wyraźną różnicę w długości ziaren pyłku pomiędzy diploidami, a tetraploidami (Tab. 6; Rys. 15, 16, 17). Ziarna pyłku tetraploidów były o około 25 do 30% dłuższe niż u diploidów.

Zaobserwowano spadek żywotności pyłku u genotypów tetraploidalnych w porównaniu z diploidami. U odmiany 'Free Redstar' żywotność pyłku diploidów wynosiła 92%, podczas gdy u tetraploidów wartości te spadały do 63% i 55%. U 'Redchief' żywotność pyłku u diploida wynosiła 86%, a u form tetraploidalnych 69% i 75%, u 'Pinova' odpowiednio 87% u diploida oraz 68% i 69% u tetraploidów. Również kiełkowanie pyłku na pożywkach było znacznie niższe u wszystkich badanych klonów tetraploidalnych w porównaniu do diploidów o około 37% u 'Free Redstar', 57% u 'Redchief' i 30-40% u 'Pinova'.

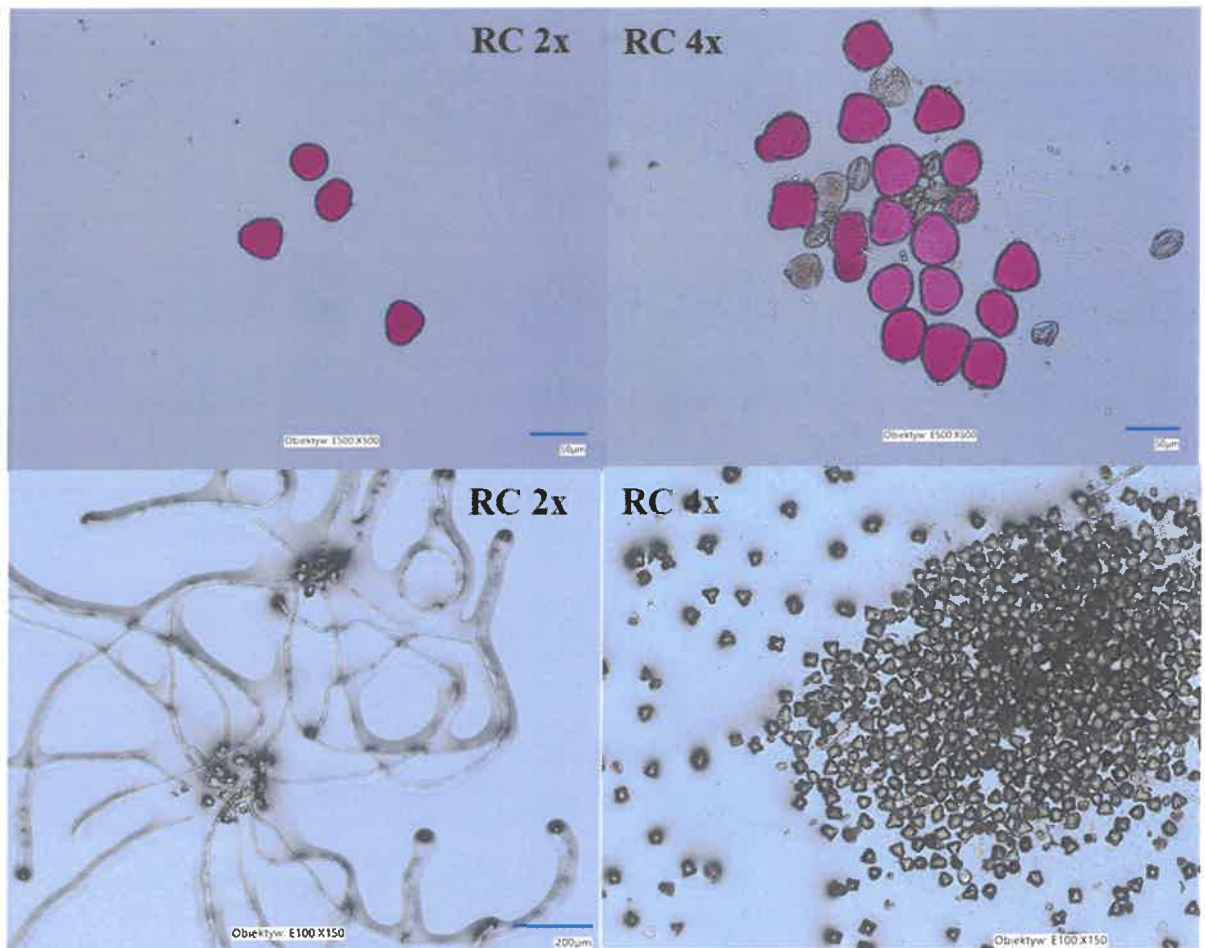
Tabela 6. Charakterystyka pyłku kwiatowego diploidów (2x) i tetraploidów (4x) trzech odmian jabłoni.

Genotyp	Długość ziaren pyłku (µm)	Żywotność (%)	Kiełkowanie pyłku (%)
‘Free Redstar’			
2x	27,8 ± 2,9 b	92 ± 2 a	72 ± 2 a
4x-2	40,6 ± 3,9 a	63 ± 3 b	46 ± 5 b
4x-4	41,5 ± 2,7 a	55 ± 5 c	44 ± 4 b
‘Redchief’			
2x	30,9 ± 2,7 b	86 ± 5 a	81 ± 5 a
4x-11	41,5 ± 5,4 a	69 ± 6 b	34 ± 3 b
4x-25	40,1 ± 3,4 a	75 ± 3 b	33 ± 6 b
‘Pinova’			
2x	33,8 ± 1,9 b	87 ± 3 a	82 ± 2 a
4x-4	45,5 ± 3,9 a	68 ± 5 b	56 ± 5 b
4x-3L	44,6 ± 3,2 a	69 ± 4 b	48 ± 3 c

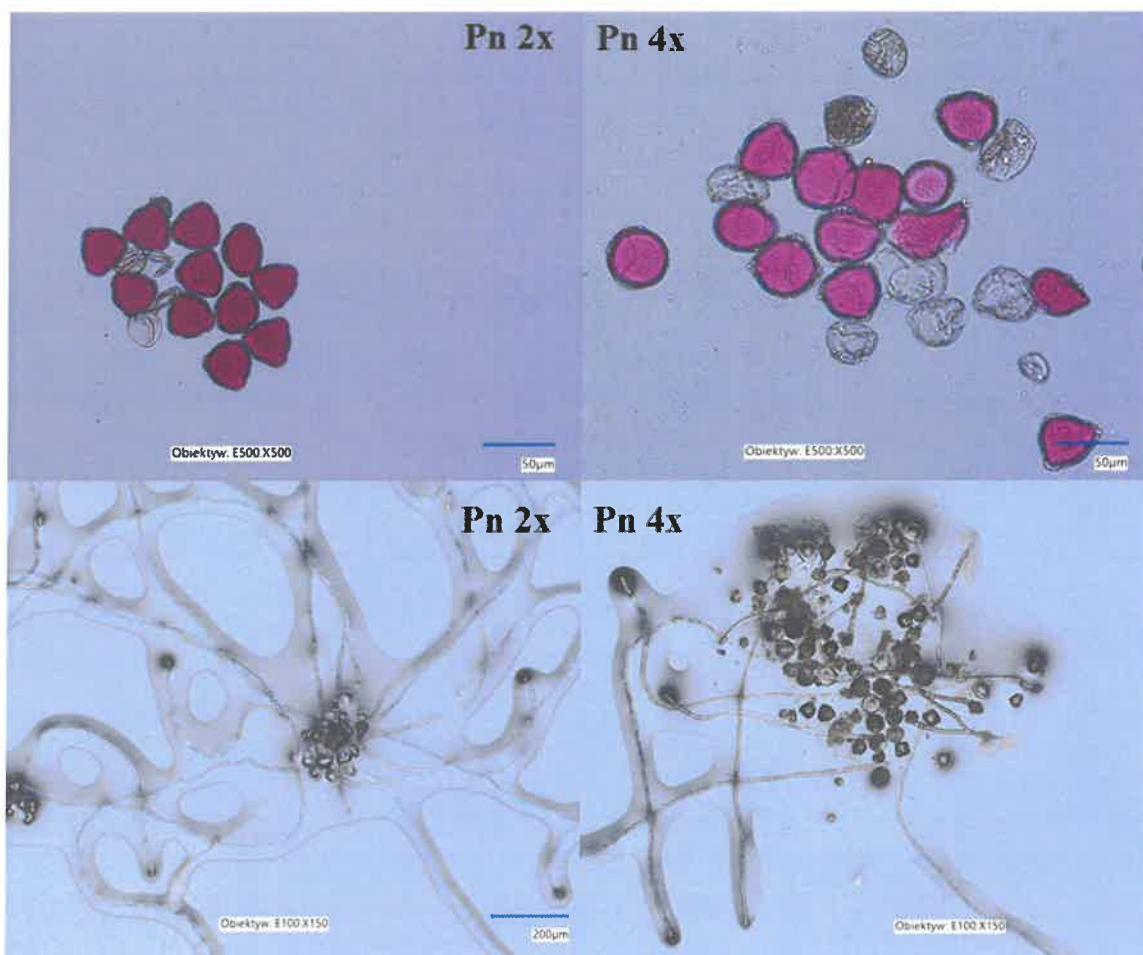
średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p=0,05; test Duncana.



Rysunek 15. Różnice pomiędzy wielkością, żywotnością i kiełkowaniem ziaren pyłku diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) formy jabłoni 'Free Redstar'; skala: 50µm i 200µm; powiększenie: 500x.



Rysunek 16. Różnice pomiędzy wielkością, żywotnością i kiełkowaniem ziaren pyłku diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) formy jabłoni 'Redchief'. skala: 50µm i 200µm; powiększenie: 500x.



Rysunek 17. Różnice pomiędzy wielkością, żywotnością i kiełkowaniem ziaren pyłku diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) formy jabłoni ‘Pinova’. skala: 50µm i 200µm; powiększenie: 500x.

4.1.3. Ocena owoców i nasion

Masa owoców i nasion, powierzchnia rumieńca

W tabeli 7 przedstawiono wyniki dotyczące trzech odmian jabłoni ‘Free Redstar’, ‘Redchief’ oraz ‘Pinova’. Tetraploidy (4x) charakteryzowały się istotnie większą masą owoców w porównaniu do diploidów (Rys. 18). U odmiany ‘Free Redstar’ tetraploid - klon 4x-2 charakteryzował się największą masą owocu - 248,6 g, podczas gdy u diploida wynosiła ona 178,4 g. W przypadku tej odmiany wykazano istotne różnice pod względem wielkości owoców pomiędzy klonami tetraploidalnymi. Należy zaznaczyć, że owoce tetraploidów tej odmiany wykazywały objawy choroby fizjologicznej szklistości miąższu owoców i gorzkiej plamistości podskórnej. Podsumowując, średnia masa owoców u klonów tetraploidalnych była większa niż u ich diploidalnych odpowiedników o około 33% u ‘Free Redstar’, 23% u ‘Redchief’ i 38% u ‘Pinova’. Nie wykazano istotnych różnic w powierzchni rumieńca pomiędzy owocami

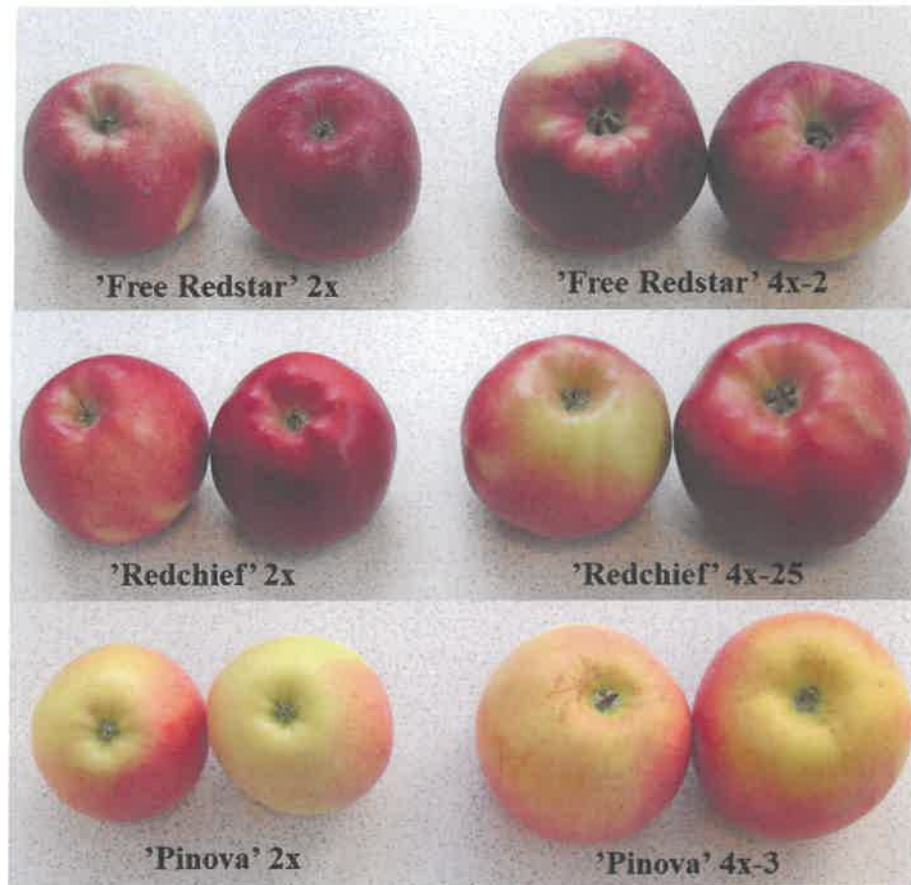
z tetraploidów (4x) i diploidów (2x) u odmiany 'Redchief' i 'Pinova'. W przypadku odmiany 'Free Redstar' owoce klonu 4x-2 miały istotnie mniejszą powierzchnię rumieńca niż diploidy tej odmiany i klon 4x-3.

Nasiona tetraploidów (4x) wszystkich badanych odmian były wizualnie większe niż nasiona diploidów (Rys. 19), jednak nie zawsze przekładało się to na ich większą masę, jak w przypadku tetraploidów 'Free Redstar' czy tetraploida 'Redchief' 4x-25, u których masa 10 nasion nie różniła się istotnie w porównaniu do diploidów. Nasiona wizualnie większe, ale lżejsze były „nie w pełni wypełnione” (nieprawidłowo uformowane). Pozostałe tetraploidy charakteryzowały się istotnie większymi nasionami w porównaniu do diploidów.

Tabela 7. Charakterystyka owoców diploidów (2x) oraz tetraploidów (4x) jabłoni odmian 'Free Redstar' i 'Redchief'.

Genotyp	Masa owocu (g)	Powierzchnia rumieńca (%)	Masa 10 nasion (g)
'Free Redstar'			
2x	178,4 ± 19,4 c	83,7 ± 10,1 a	0,60 ± 0,02 a
4x-2	248,6 ± 29,1 a	65,7 ± 15,2 b	0,55 ± 0,06 a
4x-4	224,5 ± 29,5 b	73,5 ± 15,6 ab	0,60 ± 0,19 a
'Redchief'			
2x	185,9 ± 34,4 b	89,5 ± 9,3 a	0,46 ± 0,02 b
4x-11	217,6 ± 23,1 a	83,1 ± 14,9 a	0,54 ± 0,01 a
4x-25	238,9 ± 30,2 a	88,9 ± 11,0 a	0,50 ± 0,005 ab
'Pinova'			
2x	138,3 ± 13,1 b	55,7 ± 15,0 a	0,42 ± 0,03 b
4x-4	178,6 ± 50,0 a	43,5 ± 24,4 a	0,56 ± 0,02 a
4x-3L	204,4 ± 55,2 a	54,0 ± 26,1 a	0,60 ± 0,01 a

średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p=0,05; test Duncana



Rysunek 18. Porównanie owoców diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmian 'Free Redstar', 'Redchief', 'Pinova'.



Rysunek 19. Nasiona diploidów (2x) i tetraploidów (4x) trzech odmian jabłoni: 'Free Redstar', 'Redchief', 'Pinova'.

Jędrność owoców, indeks skrobiowy kwasowość miareczkowa, zawartość ekstraktu

Analizy jakości owoców przeprowadzono dla dwóch odmian 'Free Redstar' oraz 'Redchief', gdyż tylko u tetraploidów tych odmian można było zebrać niezbędną liczbę owoców do wykonania wiarygodnych analiz. Badania wykazały, że podwojenie liczby chromosomów istotnie wpłynęło na cechy jakościowe owoców. Pod względem jędrności owoców klony tetraploidalne różniły się istotnie od diploidów. U 'Free Redstar' genotyp diploidalny (2x) charakteryzował się istotnie wyższą jędrnością niż klon tetraploidalny 4x-2, z kolei klon 4x-4 wykazywał jędrność zbliżoną do diploida i klony te różniły się istotnie pod względem tej cechy (Tab. 8). W przypadku odmiany 'Redchief' owoce diploidów (2x) charakteryzowały się najniższą jędrnością. Jeden z tetraploidów (4x-24) tej odmiany wykazywał istotnie większą jędrności owoców w porównaniu do diploida i drugiego klonu - 4x-11.

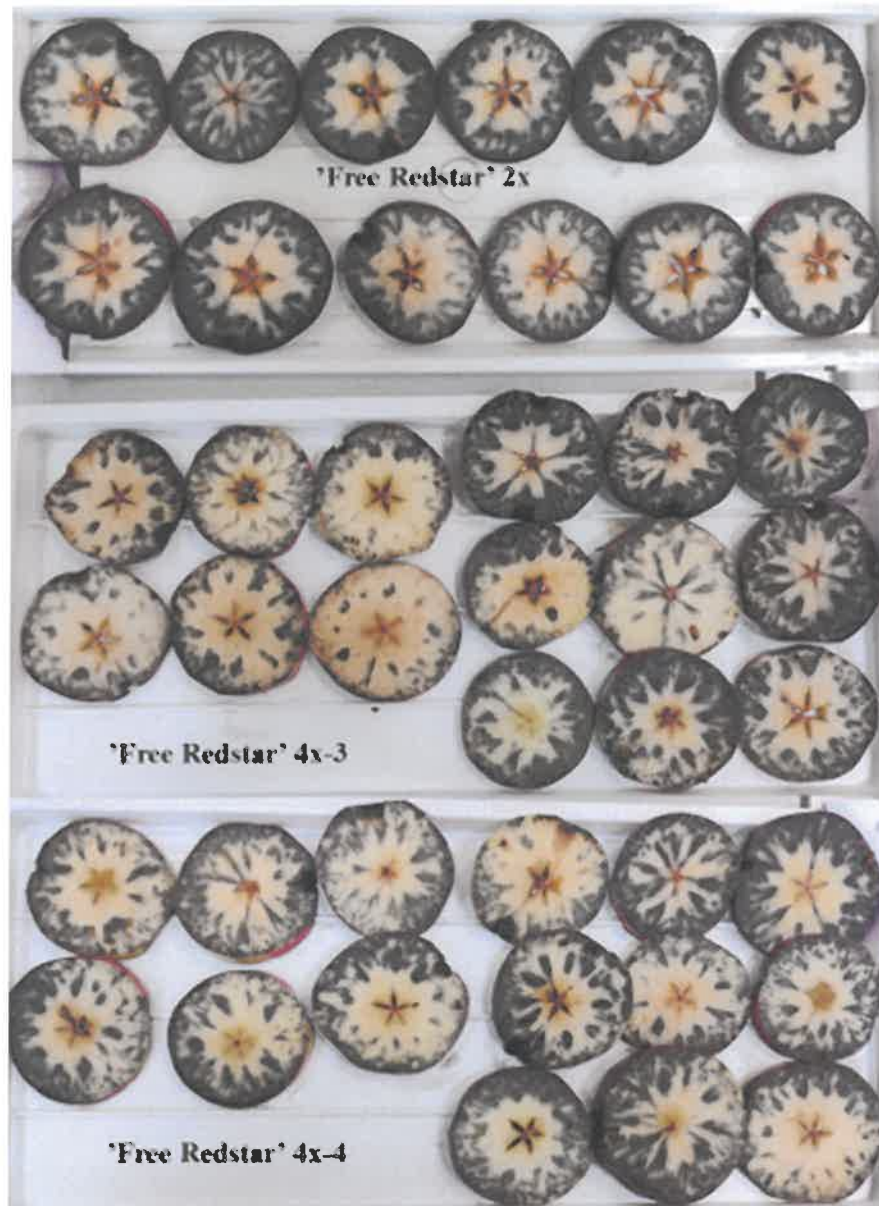
W przypadku kolejnych cech jakościowych wykazano, że owoce klonów tetraploidalnych obu badanych odmian charakteryzowały się bezpośrednio po zbiorze istotnie wyższymi wartościami kwasowości oraz zawartości ekstraktu niż owoce form diploidalnych (Tab. 8). Średnia kwasowość była wyższa u tetraploidów średnio o około 45%, a u 'Redchief' nawet o 54%. Różnice w zawartości ekstraktu pomiędzy diploidami, a tetraploidami były podobne u obu odmian i wynosiły średnio około 12% na korzyść tetraploidów. Indeks skrobiowy wskazuje na stopień dojrzałości owoców, im jest on wyższy tym owoce bardziej dojrzałe. Przeprowadzone badania wykazały, że podwojenie liczby chromosomów wpłynęło na termin dojrzewania owoców. Bezpośrednio po zbiorze owoce klonów tetraploidalnych 'Free Redstar' były bardziej dojrzałe niż owoce diploidów (Rys. 20), z kolei u odmiany 'Redchief' owoce diploidów dojrzewały szybciej niż u tetraploidów (Rys. 21).

Tabela 8. Jakość owoców diploidów (2x) oraz tetraploidów (4x) jabłoni odmian 'Free Redstar' i 'Redchief'.

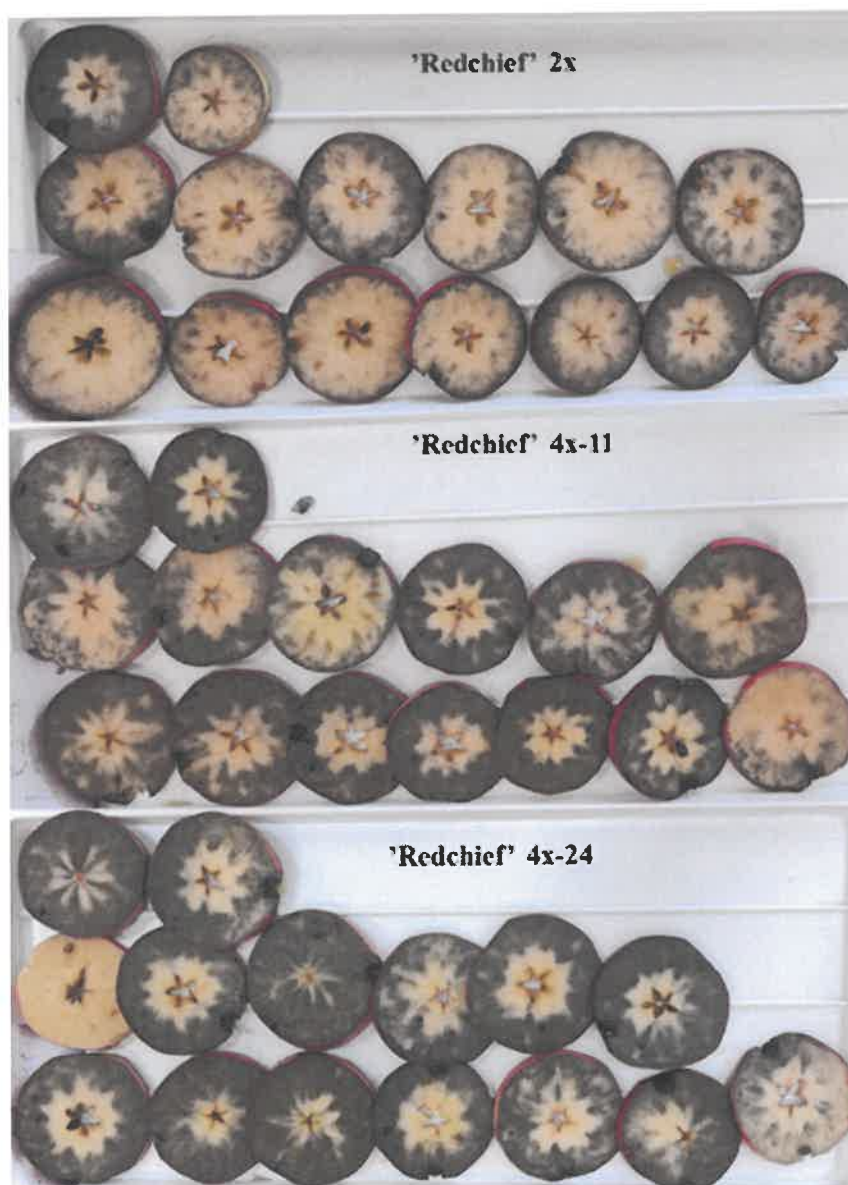
Genotyp	Jędrność (N)	Kwasowość (%)	Zawartość ekstraktu (%)	Indeks skrobiowy *
'Free Redstar'				
2x	82 ± 8,8 ab	0,52 ± 0,02 b	12,6 ± 0,5 b	7 ± 0,9 c
4x-2	76,4 ± 11 b	0,75 ± 0,07 a	14,4 ± 0,1 a	9 ± 0,4 a
4x-4	83,5 ± 12,3 a	0,76 ± 0,05 a	13,8 ± 0,5 a	8 ± 0,3 b
'Redchief'				
2x	70,6 ± 7,9 b	0,35 ± 0,01 b	13,3 ± 0,7 b	9 ± 0,8 a
4x-11	72,8 ± 8,6 b	0,52 ± 0,03 a	15,1 ± 1,4 a	6 ± 0,5 b
4x-24	80,4 ± 9,5 a	0,56 ± 0,02 a	14,7 ± 0,5 a	6 ± 0,5 b

średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p=0,05; test Duncana

*Indeks skrobiowy oceniano w skali 1-10, gdzie 1-owoce niedojrzałe, 10-owoce całkowicie dojrzałe lub przejrzałe według skali CTIFL (Rys. 5)



Rysunek 20. Ocena dojrzałości owoców diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmiany 'Free Redstar' według indeksu skrobiowego CTIFL.



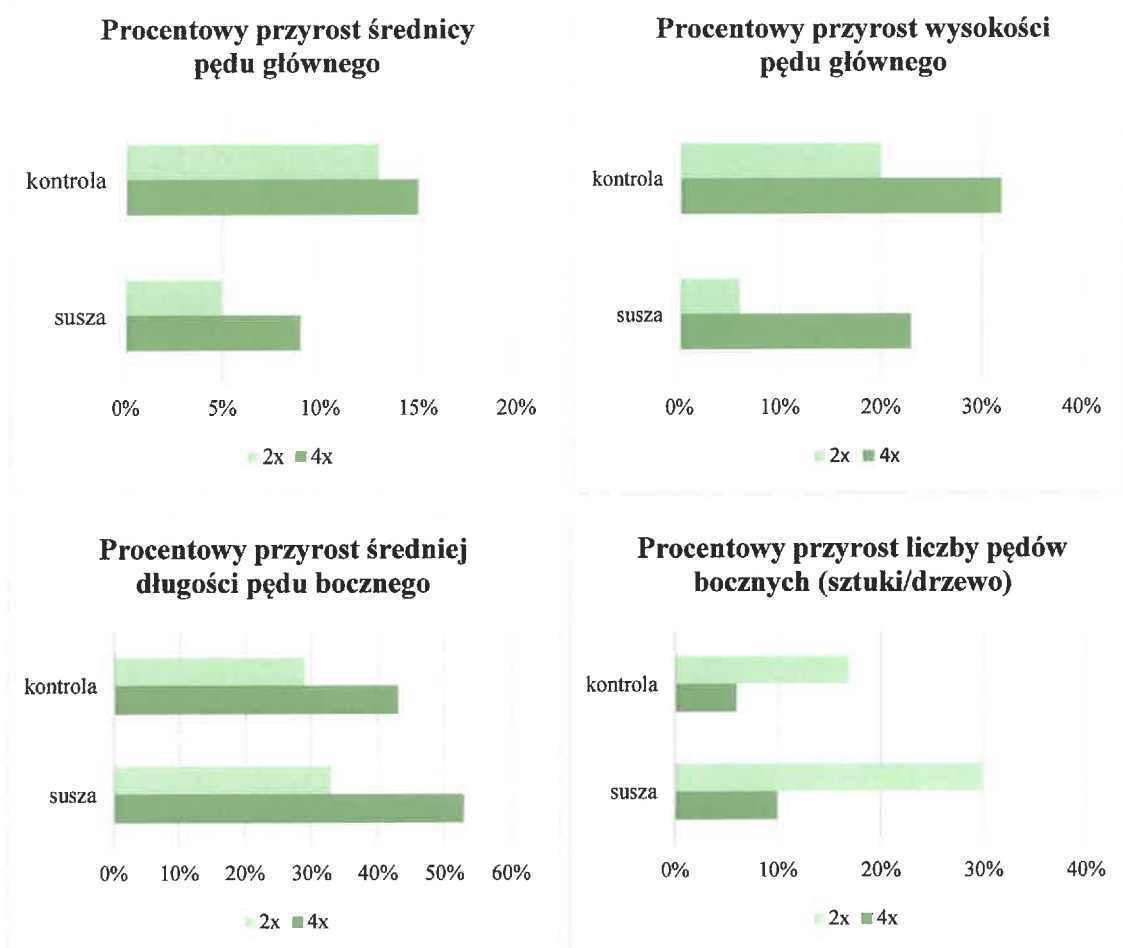
Rysunek 21. Ocena dojrzałości owoców diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni odmiany 'Redchief' według indeksu skrobiowego CTIFL.

4.2. Ocena tolerancji na stres suszy autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidów

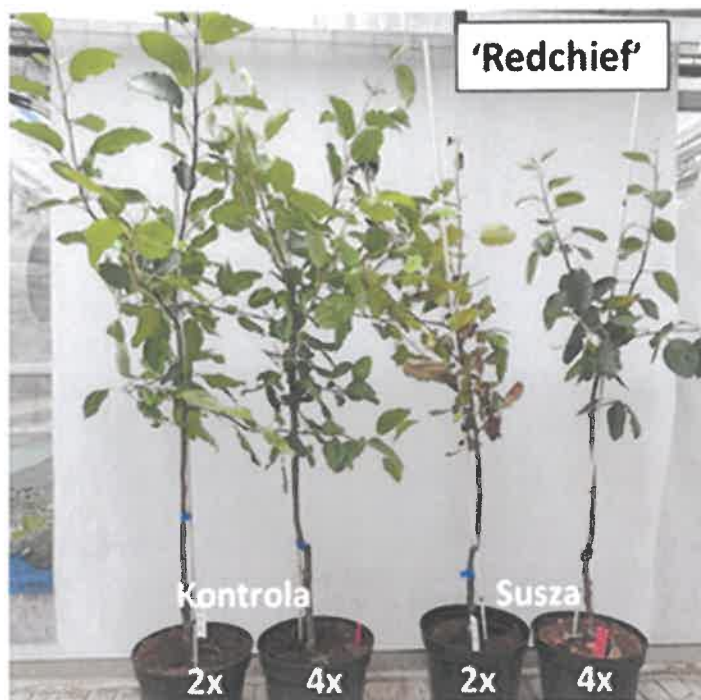
4.2.1. Ocena wzrostu roślin

Pomiary parametrów wzrostu prowadzono bezpośrednio przed rozpoczęciem suszy, po jej zakończeniu (w 23. dniu) oraz w połowie września (8 tygodni po zakończeniu suszy) po zakończeniu wzrostu roślin (w fazie 91 według skali BBCH). Analiza procentowego przyrostu parametrów wzrostu diploidów (2x) i tetraploidów (4x) jabłoni wykazała istotne różnice pomiędzy poziomami ploidalności i pomiędzy

warunkami uprawy (kontrola i susza). Przyrost średnicy pędu głównego w warunkach kontrolnych był nieco wyższy u tetraploidów (15%) niż u diploidów (13%), a u roślin poddanych stresowi suszy różnica w przyroście średnicy pędu była większa – 9% u tetraploidów i 5% u diploidów (Rys. 22, 23). Przyrost wysokości pędu głównego również wykazał przewagę tetraploidów (4x). W warunkach optymalnego nawadniania tetraploidy osiągnęły 32% przyrost wysokości, podczas gdy diploidy przyrosły o 20%. U roślin poddanych stresowi suszy różnica była jeszcze bardziej wyraźna, tetraploidy osiągnęły przyrost o 23%, a diploidy zaledwie o 6%. Przyrost średniej długości pędu bocznego także był wyższy u tetraploidów w warunkach kontrolnych jak i w warunkach deficytu wody. W warunkach optymalnego nawadniania długość ta wzrosła o 43% u tetraploidów wobec 29% diploida. W przypadku roślin poddanych stresowi suszy, u tetraploidów długość pędu bocznego wzrosła o 53%, a u diploida o 33%. W warunkach kontrolnych diploidy wykazały 17% przyrost liczby pędów bocznych, a tetraploidy jedynie 6%. U roślin poddanych stresowi suszy różnica była jeszcze większa, 30% przyrost liczby pędów bocznych u diploidów wobec 10% przyrostu u tetraploidów.



Rysunek 22. Procentowe przyrosty parametrów wzrostów diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) jabłoni ‘Redchief’ poddanej stresowi suszy oraz optymalnie nawadnianej (kontrola); pomiary wykonano po zakończeniu stresu suszy oraz po wznowieniu podlewania w fazie zakończenia wzrostu, w połowie września.



Rysunek 23. Różnice we wzroście diploidalnych (2x) i tetraploidalnych (4x) drzew jabłoni ‘Redchief’ rosnących w warunkach optymalnego nawadniania (kontrola) i poddanych stresowi suszy; wygląd roślin po zakończeniu wzrostu, w połowie września (po wznowieniu nawadniania roślin poddanych stresowi suszy).

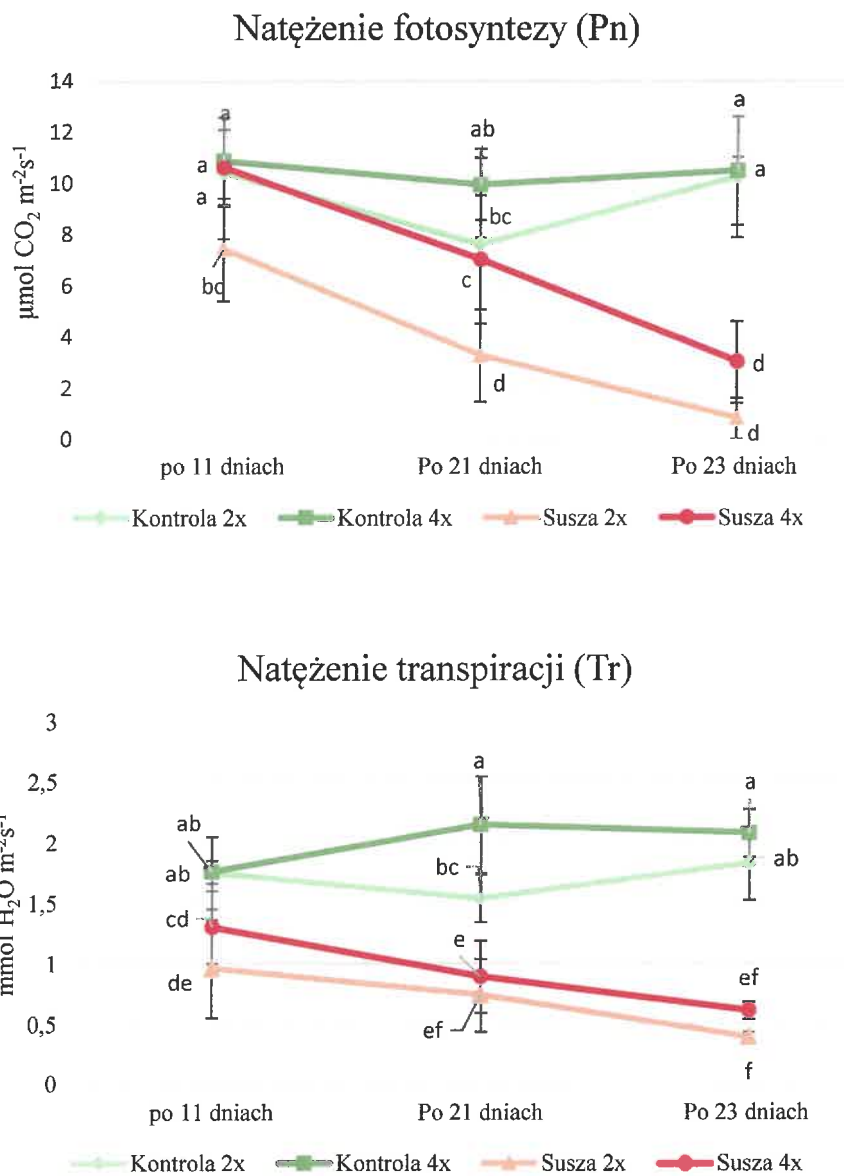
4.2.2. Ocena reakcji na poziomie fizjologicznym

Pomiary potencjału wody w liściach wykonano przed rozpoczęciem suszy i po jej zakończeniu, po 23 dniach eksperymentu. Wraz z ograniczeniem nawadniania potencjał wody w liściach spadał, zarówno u diploidów (2x) jak i tetraploidów (4x). Po 11 dniach niedoboru wody w podłożu potencjał wody w liściach tetraploidów (4x) utrzymywał się na wyższym poziomie w porównaniu do diploidów (Tab. 9). Po 23 dniach diploidy (2x) w warunkach niedoboru wody w podłożu obniżyły potencjał wody w liściach o około 215% w porównaniu do kontroli, w przypadku tetraploidów (4x) był to spadek o około 108% w porównaniu do kontroli. Wskazywało to na wyższy poziom tolerancji na niedobór wody w podłożu tetraploidów niż diploidów.

Tabela 9. Potencjał wody w liściach diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) jabłoni ‘Redchief’ optymalnie nawadnianej oraz poddanej stresowi suszy, oceniony 11 i 23 dni po zaindukowaniu stresu.

Termin	Potencjał wody (MPa)			
	2x		4x	
	Kontrola	Susza	Kontrola	Susza
po 11 dniach	-1,11	-1,34	-0,99	-1,29
po 23 dniach	-0,76	-2,40	-0,74	-1,54

Na rysunku 24 przedstawiono wyniki dotyczące natężenia fotosyntezy (Pn) oraz transpiracji (Tr) u diploidów (2x) oraz tetraploidów (4x) w warunkach kontrolnych oraz w warunkach niedoboru wody w podłożu, analizy przeprowadzono w trzech terminach 11, 21 i 23 dniu eksperymentu. Natężenie fotosyntezy i transpiracji spadało u diploidów (2x) jak i tetraploidów (4x) rosnących w warunkach niedoboru wody w porównaniu z roślinami, które były optymalnie nawadniane. W warunkach deficytu wody wartości Pn były istotnie wyższe u roślin tetraploidalnych niż u diploidów, a Tr nie różniła się istotnie pomiędzy genotypami. W 23 dniu stresu natężenie fotosyntezy u diploidów spadło prawie 13-krotnie, a u tetraploidów Pn 4-krotnie w porównaniu do wartości początkowych (sprzed suszy).

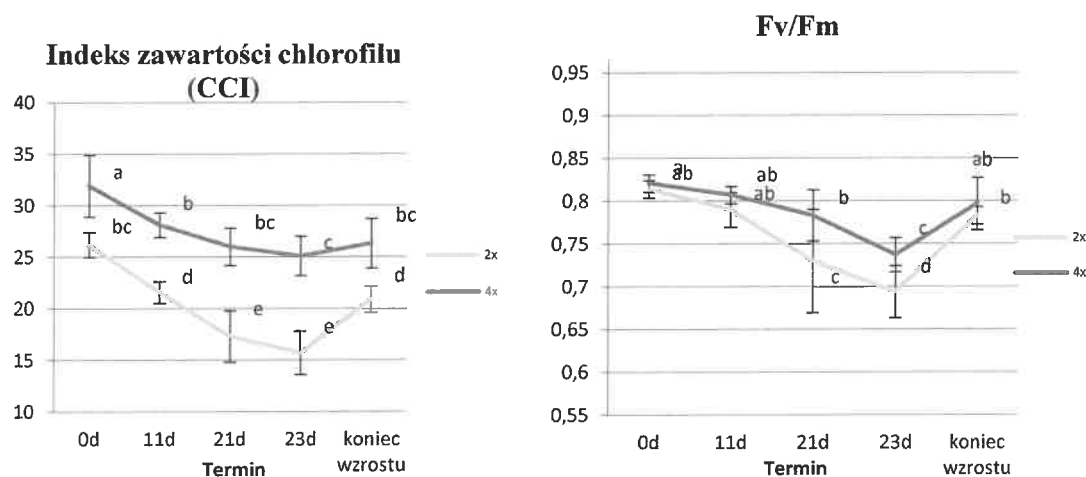


Rysunek 24. Natężenie fotosyntezy (Pn) i transpiracji (Tr) w liściach diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) jabłoni ‘Redchief’ poddanej stresowi niedoboru wody w podłożu oraz optymalnie nawadnianej 11, 21 i 23 dni po zaindukowaniu stresu; średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.

Stres związany z deficytem wody w podłożu powodował istotne obniżenie zawartości chlorofilu (CCI) oraz maksymalnej wydajności reakcji fotochemicznej fotosystemu II (Fv/Fm) w liściach drzew diploidów jak i tetraploidów (Rys. 25). U diploidów (2x) obserwowano gwałtowny spadek zawartości chlorofilu już po 11 dniach stresu, u tetraploidów (4x) spadek zawartości chlorofilu był mniej wyraźny i jego istotnie wyższy poziom, w porównaniu do diploidów, utrzymywał się przez cały okres suszy, nawet w najbardziej krytycznym okresie deficytu wody, czyli w po 21 i 23 dniach trwania suszy. Pomiary wykonane w połowie września w fazie 91 BBCH - zakończenia wzrostu roślin, kiedy po zakończeniu suszy wznowiono nawadnianie,

wykazały, że zarówno diploidy jak i tetraploidy poddane działaniu suszy, charakteryzowały się zdolnością do częściowej odbudowy zawartości chlorofilu.

Na początku doświadczenia diploidy (2x) i tetraploidy (4x) posiadały optymalne wartości wydajności reakcji fotochemicznej fotosystemu II ($F_v/F_m \sim 0,850$) (Rys. 25). Podczas trwania suszy obserwowano spadek fluorescencji chlorofilu. U diploidów spadek F_v/F_m był bardziej wyraźny niż u tetraploidów. Pomiary wykonane w połowie września, w fazie 91 BBCH zakończenia wzrostu, rośliny poddane działaniu stresu suszy, a następnie optymanie nawadniane, zarówno w przypadku diploidów jak i tetraploidów wykazały zdolność do regeneracji funkcji PSII.



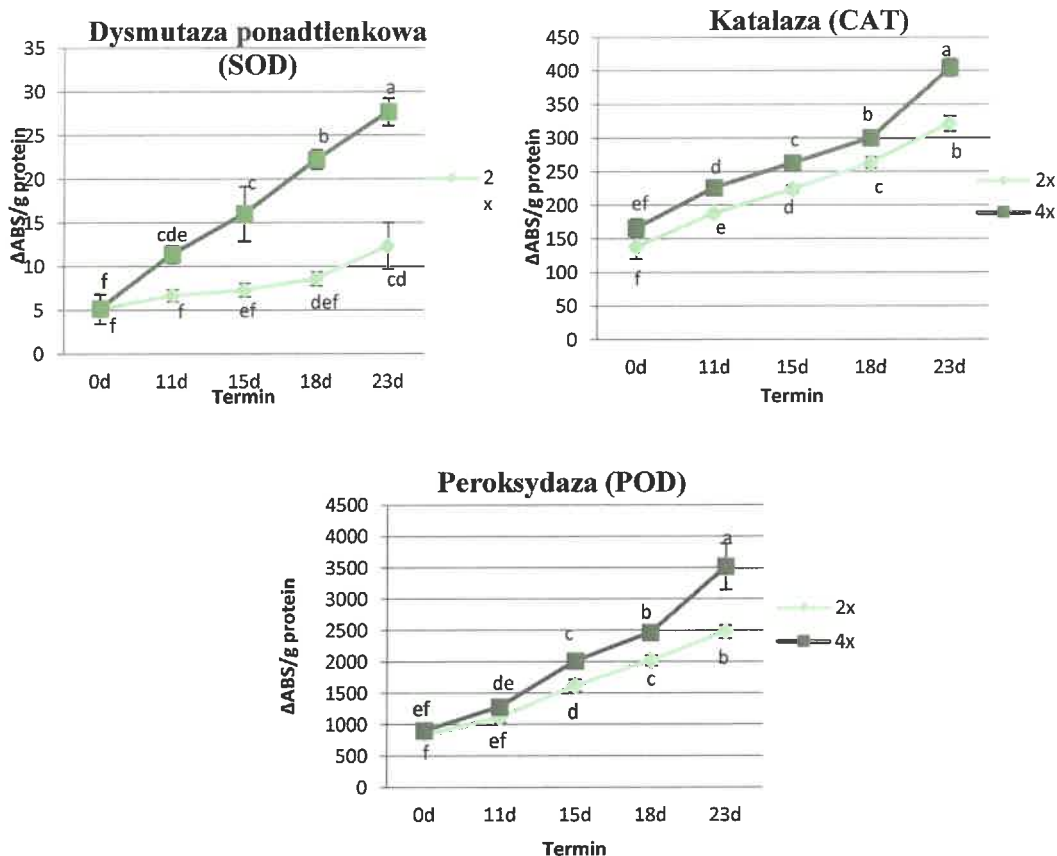
Rysunek 25. Indeks zawartości chlorofilu oraz maksymalna wydajność reakcji fotochemicznej fotosystemu II (F_v/F_m) w liściach diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) jabłoni 'Redchief' przed suszą (0d), 11 i 21 i 23 dni po zaindukowaniu suszy oraz ostatniego dnia eksperymentu) - w połowie września w fazie 91 BBCH - zakończenia wzrostu roślin (po zakończeniu suszy wznowiono nawadnianie); średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.

4.2.3. Ocena reakcji na poziomie biochemicznym

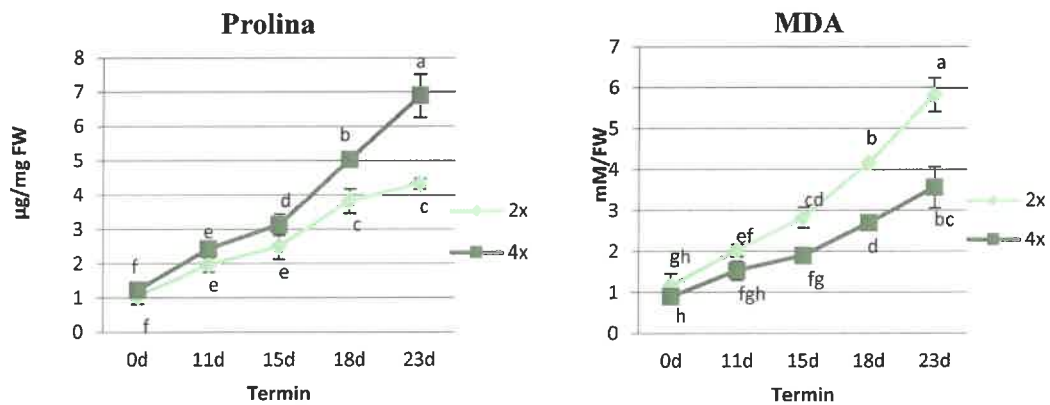
W odpowiedzi na stres związany z deficytem wody w podłożu obserwowano zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy (POD) (Rys. 26). Wyniki pokazują wyraźne różnice w aktywności enzymów antyoksydacyjnych pomiędzy diploidami (2x), a tetraploidami (4x). Należy zaznaczyć, że przed rozpoczęciem suszy poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz zawartości proliny i MDA były podobne u roślin diploidalnych i tetraploidalnych. W reakcji na stres suszy wykazano jednakże wyraźne różnice dla wszystkich badanych parametrów biochemicznych pomiędzy diploidami (2x), a tetraploidami (4x). Aktywność wszystkich enzymów antyoksydacyjnych i zawartość proliny w trakcie suszy stopniowo rosły, osiągając najwyższe wartości u obu form ploidalności w ostatnim dniu suszy, przy czym u tetraploidów dynamika wzrostu była znacznie wyższa niż u diploidów, u których

poziom podczas suszy był istotnie wyższy niemal we wszystkich terminach pomiarów, zwłaszcza w przypadku SOD. Aktywność tego enzymu wzrosła istotnie już w 11. dniu suszy u tetraploida, podczas gdy u diploida istotny wzrost obserwowano dopiero w ostatnim 23. dniu pomiaru. W ostatnim dniu suszy aktywność SOD u tetraploida wzrosła ponad 5-krotnie, a diploida około 2,5-krotnie, w odniesieniu do wartości notowanych przed rozpoczęciem suszy. Podobnie w przypadku aktywności pozostałych enzymów CAT i POD oraz zawartości proliny, największe różnice pomiędzy diploidami i tetraploidami obserwowano w ostatnim dniu suszy: aktywność CAT w porównaniu do 1. dnia pomiaru była odpowiednio u diploida i tetraploida 2,3 i 2,5 razy większa, a w przypadku POD - 2,5 i 3,5 razy większa (Rys. 26).

Podobnie zawartość proliny w ostatnim dniu suszy w odniesieniu do 1 dnia pomiaru była niemal 7-krotnie wyższa u tetraploida i nieco ponad 4-krotnie wyższa u diploida (Rys. 27). W przeciwieństwie do wyższej aktywności enzymów antyoksydacyjnych i zawartości proliny u tetraploidów, poziom MDA - wskaźnika uszkodzenia błon komórkowych, był istotnie wyższy u diploidów niż u tetraploidów już w 15. dniu suszy (Rys. 27). Dynamika wzrostu tego związku była znacznie wyższa u diploida, w ostatnim dniu obserwowano u niego prawie 6-krotny wzrost MDA natomiast u tetraploida 3,5-krotny.



Rysunek 26. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych peroksydazy, katalazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej w liściach diploidalnej (2x) jabłoni ‘Redchief’ oraz jej klonu tetraploidalnego (4x) przed suszą (0d) oraz 11, 15, 18 i 23 dni po zaindukowaniu stresu suszy; średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.



Rysunek 27. Zawartość prolina oraz dialdehydu malonowego (MDA) w liściach diploidalnej jabłoni 'Redchief' oraz jej klonu tetraploidalnego (4x) przed suszą (0d) oraz 11, 15, 18 i 23 dni po zaindukowaniu stresu suszy; średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.

4.2.4. Ocena reakcji na poziomie molekularnym

Wyniki przedstawione na rysunku 28 pokazują zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne: dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), peroksydazę askorbinianową (APX) i peroksydazę glutationową (GPX), w roślinach poddanych stresowi suszy - tetraploidalnych w odniesieniu do diploidalnych.

Ekspresja genu *SOD* przed zapoczątkowaniem suszy była niska, podobna u diploidów (2x) i tetraploidów (4x). W 18. dniu trwania suszy poziom ekspresji u tetraploida gwałtownie wzrósł, osiągając najwyższą wartość - 2,5-krotnie wyższą niż początkowa, a następnie poziom ekspresji spadł do poziomu 1,5-krotnie wyższego niż przed suszą. U diploidów zmiany w ekspresji genu *SOD* były mniej wyraźne, poziom ekspresji pozostawał stosunkowo stabilny (do 18. dnia suszy nie różnił się istotnie od wartości początkowej), osiągając najwyższą wartość dopiero w 23. dniu, istotnie większą niż obserwowana u tetraploida.

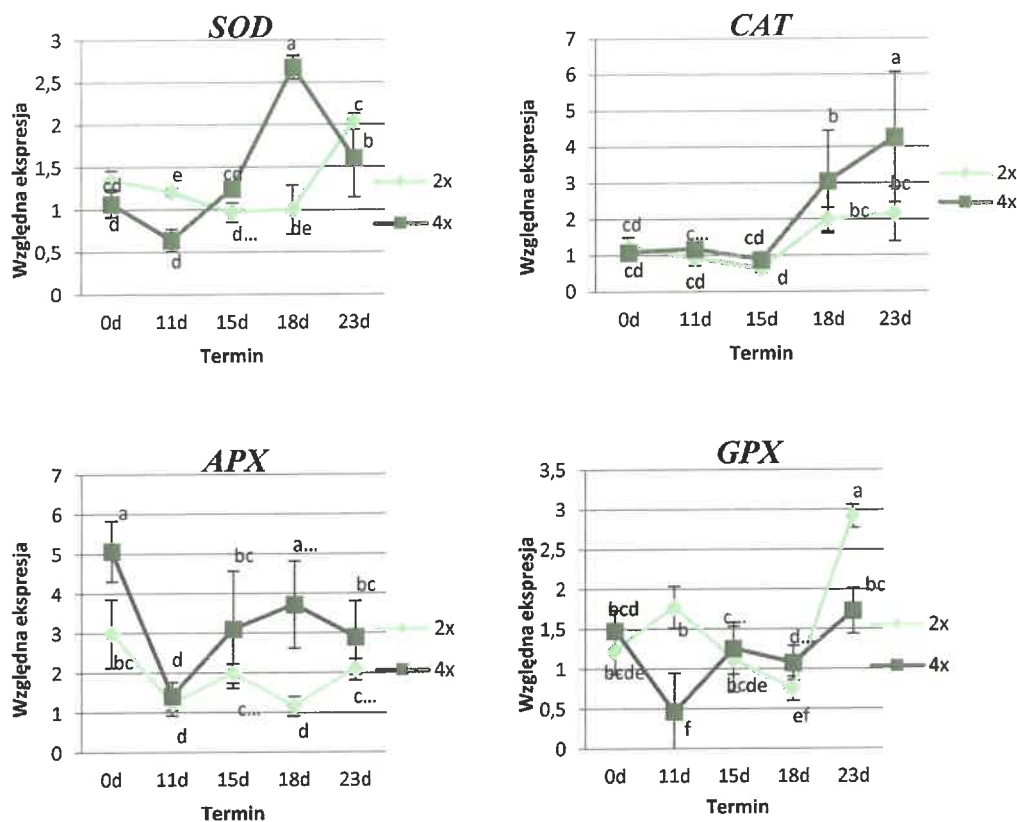
Poziom ekspresji genu *CAT* w pierwszych 15 dniach suszy był niski i podobny u obu genotypów. W 18. dniu eksperymentu obserwowano dynamiczny wzrost poziomu ekspresji, u tetraploida (4x), osiągający najwyższą wartość 23. dnia (2-krotnie wyższą niż u diploida w tym terminie). W tym samym okresie u diploida poziom ekspresji *CAT* wzrósł nieznacznie, przy czym różnice w poziomie ekspresji tego genu w ciągu całego okresu suszy były nieistotne w porównaniu do wartości początkowej.

Przed zapoczątkowaniem suszy ekspresja genu *APX* była najwyższa u tetraploida i zarazem około 1,7-raza wyższa w porównaniu do diploida. W 11 dniu eksperymentu ekspresja genu gwałtownie spadła u tetraploida, po czym znacząco wzrosła i od 15. dnia do końca suszy utrzymywała się na podobnie wysokim poziomie, wyższym niż u diploida. U diploida wahania w poziomie ekspresji tego genu były niewielkie, istotny spadek w porównaniu do wartości początkowej obserwowano

jedynie w 11. dniu suszy, po czym poziom ekspresji wykazywał niewielkie zmiany.

Dynamika ekspresji genu *GPX* różniła się pomiędzy badanymi genotypami. Przed zapoczątkowaniem suszy (0 d) poziom ekspresji był zbliżony u diploidów (2x) i tetraploidów (4x). W 11. dniu eksperymentu ekspresja genu kodującego peroksydazę glutationową u tetraploidów spadła do najniższego obserwowanego poziomu, po czym znacząco wzrosła w 15. dniu i następnie do ostatniego dnia suszy utrzymywała się na podobnym poziomie jak przed suszą. Inaczej u diploida, w 11 dniu poziom ekspresji *GPX* wzrósł do poziomu prawie 2-krotnie wyższego niż u tetraploida, następnie obniżał się stopniowo do wartości podobnych jak u tetraploida, po czym gwałtownie wzrósł w ostatnim dniu suszy do najwyższego notowanego poziomu, istotnie wyższego niż u tetraploida.

Podsumowując, analiza ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (*CAT*, *SOD*, *APX* i *GPX*) w odpowiedzi na stres związany z deficytem wody w podłożu wykazała zróżnicowane zmiany w trakcie trwania eksperymentu oraz istotne różnice między genotypami diploidalnymi (2x) i tetraploidalnymi (4x). W przypadku tetraploida, poziom ekspresji genów *SOD*, *CAT* i *APX* był istotnie wyższy w ostatnich dniach suszy (w 18. lub 23. dniu) niż u diploidów, co sugeruje ich większą zdolność do adaptacji w warunkach stresu abiotycznego.



Rysunek 28. Względna ekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne: *SOD*, *CAT*, *APX* i *GPX* w liściach diploidalnej (2x) i tetraploidalnej (4x) jabłoni 'Redchief' przed suszą (0d), 11, 15, 18 i 23 dni po zaindukowaniu stresu; średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncan.

4.3. Ocena zdolności do krzyżowania autotetraploidów jabłoni oraz ocena siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych

Przeprowadzono badania żywotności i kiełkowania pyłku genotypów diploidalnych (2x) jak i tetraploidalnych (4x) wykorzystywanych do krzyżowań w kolejnych latach badań.

Diploidy charakteryzowały się wyższą żywotnością pyłku w porównaniu z tetraploidami. Wartości dla 'Free Redstar' 2x i 'Szampion' 2x były jednymi z najwyższych w całym okresie badań, osiągając kolejno 95% i 98% w pierwszym roku oraz stabilnie wysokie wartości w kolejnych latach (Tab. 10). Genotypy tetraploidalne jak 'Free Redstar' 4x-2 czy 'Pinova' 4x-4 charakteryzowały się znacznie niższą żywotnością, szczególnie w latach 2022-2023, gdzie odnotowano jej spadek nawet do poziomu 38-55%. W 2024 roku zaobserwowano znaczną poprawę żywotności pyłku u wszystkich genotypów. Wyróżnia się tutaj 'Gold Milenium' 2x, którego żywotność wzrosła z 70% w 2023 roku do 91% w roku 2024. Diploidy wszystkich badanych odmian charakteryzowały się wysoką żywotnością pyłku w ostatnim roku badań.

Podobnie jak w przypadku żywotności pyłku, zdolność kiełkowania na pożywce także różniła się pomiędzy genotypami diploidalnymi i tetraploidalnymi. Wyraźnie wyższe wartości kiełkowania były obserwowane u diploidów.

Analiza danych wskazuje na istotne zmiany w żywotności i kiełkowaniu pyłku w zależności od lat, na co wpłynęły warunki atmosferyczne takie jak temperatura, opady i wilgotność powietrza w trakcie rozwoju pyłku. Obserwowana zmienność w kiełkowaniu i żywotności pyłku ma bezpośrednie przełożenie na skuteczność krzyżowań. Pyłek o wyższych parametrach zwiększa prawdopodobieństwo zapylenia, szczególnie w przypadku krzyżowań interploidalnych.

Tabela 10. Żywotność oraz kiełkowanie pyłku diploidów (2x) (wiersze zaznaczone na zielono) oraz tetraploidów (4x) jabłoni trzech odmian: 'Free Redstar', 'Redchief', 'Pinova' w latach 2021 - 2024, który został wykorzystany w krzyżowaniach intrerploidalnych.

Genotyp	Żywotność (%)	Kiełkowanie pyłku (%)
2021		
'Free Redstar' 2x	95	75
'Free Redstar' 4x-2	60	50
'Pinova' 2x	78	72
'Pinova' 4x-3L	70	68
'Pinova' 4x-4	72	56
'Szampion' 2x	98	82

2022		
'Free Redstar' 2x	66	67
'Free Redstar' 4x-2	38	35
'Free Redstar' 4x-3	41	26
'Pinova' 2x	86	81
'Pinova' 4x-3L	55	52
'Pinova' 4x-4	42	46
'Szampion' 2x	75	68
2023		
'Free Redstar' 2x	65	51
'Free Redstar' 4x-2	50	20
'Redchief' 2x	71	65
'Redchief' 4x-8	60	35
'Redchief' 4x-14	58	40
'Pinova' 2x	70	50
'Pinova' 4x-4	65	35
'Pinova' 4x-5	60	30
'Gold Milenium' 2x	70	52
2024		
'Free Redstar' 2x	98	75
'Free Redstar' 4x-3	79	51
'Free Redstar' 4x-4	68	48
'Gala Must' 2x	95	85
'Gala Must' 4x-2	74	69
'Gala Must' 4x-5	75	75
'Gala Must' 4x-8	70	65
'Redchief' 2x	85	72
'Redchief' 4x-11	74	48
'Redchief' 4x-25	79	62
'Pinova' 2x	89	74
'Pinova' 4x-3L	74	55
'Pinova' 4x-16	71	51
'Gold Milenium' 2x	91	80

W latach 2021- 2024 przeprowadzono krzyżowania pomiędzy wybranymi genotypami jabłoni o różnym poziomie ploidalności. Analizowano skuteczność zapylenia, zawiązywanie owoców, tworzenie nasion oraz liczbę uzyskanych siewek, oceniano także efektywność krzyżowania jako stosunek liczby siewek do liczby zapyzonych kwiatów.

W krzyżowaniach, gdzie diploidalne genotypy mateczne zapyłano pyłkiem pochodzącym od tetraploidów (Tab. 11) obserwowano wyższą efektywność krzyżowań – średnio 0,1625 siewki na zapyłony kwiat - niż w krzyżowaniach odwrotnych, w których wynosiła ona średnio 0,039 (Tab. 12). W krzyżowaniach interploidalnych, w których diploidalne genotypy występowały jako rośliny mateczne (Tab. 11), w 2021 i 2023 roku nie uzyskano żadnych owoców ani siewek. W 2022 r. uzyskano 13 siewek z efektywnością 0,325 w krzyżowaniu ‘Pinova’ z ‘Free Redstar’, a w 2024 uzyskano 65 siewek, najwięcej - 36 siewek na 40 zapyłowych kwiatów (z efektywnością 0,9) w krzyżowaniu ‘Free Redstar’ $2x \times$ ‘Gala Must’ $4x-2$.

Krzyżowania tetraploidalnych roślin matecznych z diploidami jako dawcami pyłku (Tab. 12) cechowały się znacznie niższą efektywnością, która średnio wynosiła 0,039 siewek na zapyłony kwiat. Największą efektywność krzyżowania odnotowano w 2024 roku w kombinacji ‘Pinova’ $4x-3 \times$ ‘Gold Milenium’ $2x$ (0,20 siewek na zapyłony kwiat) oraz ‘Free Redstar’ $4x-3 \times$ ‘Pinova’ $2x$ (0,13 siewek na zapyłony kwiat). W większości pozostałych kombinacji nie uzyskano żadnych siewek.

Rok 2023 przyniósł całkowite niepowodzenie w krzyżowaniach. Brak owoców i nasion z krzyżowań mógł być spowodowany niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Analiza danych meteorologicznych z Dąbrowic (Rys. 10) wskazuje, że w okresie kwitnienia (kwiecień–maj) warunki pogodowe były dalekie od optymalnych. W kwietniu odnotowano stosunkowo niską średnią temperaturę (ok. 10°C) oraz wysokie sumy opadów, które mogły niekorzystnie wpływać na skuteczność zapylenia manualnego i przebieg zapłodnienia. W maju opady nadal utrzymywały się na podwyższonym poziomie, a zmienność pogodowa mogła dodatkowo zakłócać rozwój zawiązków owoców.

Tabela 11. Efektywność krzyżowań diploidalnej jabłoni (rośliny mateczne) z klonami tetraploidalnymi jabłoni (rośliny ojcowskie) w latach 2021 - 2024.

	Krzyżowania	Liczba zapylnych kwiatów	Liczba owoców	Liczba nasion	Liczba uzyskanych siewek	Efektywność krzyżowania (1. siewek/l. zapylnych kwiatów)
2021						
1.	'Free Redstar' 2x × 'Pinova' 4x-4	40	0	0	0	0
2.	'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3	40	0	0	0	0
	Suma	80	0	0	0	
	Średnia efektywność krzyżowania					<u>0</u>
2022						
1.	'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3	40	3	15	13	0,325
	Suma	40	3	15	13	
	Średnia efektywność krzyżowania					<u>0,325</u>
2023						
1.	'Redchief' 2x × 'Pinova' 4x-5	40	0	0	0	0
	Suma	40	0	0	0	
	Średnia efektywność krzyżowania					<u>0</u>
2024						
1.	'Gala Must' 2x × 'Pinova' 4x-3	40	6	16	4	0,1
2.	'Gala Must' 2x × 'Free Redstar' 4x-3	40	3	3	3	0,075
3.	'Free Redstar' 2x × 'Gala Must' 4x-2	40	8	40	36	0,90
4.	'Pinova' 2x × 'Redchief' 4x-11	40	6	16	12	0,30
5.	'Pinova' 2x × 'Gala Must' 4x-8	40	0	0	0	0
6.	'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3	40	1	1	1	0,025
7.	'Redchief' 2x × 'Pinova' 4x-16	40	3	3	2	0,05
8.	'Redchief' 2x × 'Free Redstar' 4x-4	40	6	7	7	0,175
	Suma	280	33	86	65	
	Średnia efektywność krzyżowania					<u>0,232</u>
	Suma całkowita	480	36	101	78	
	Średnia efektywność krzyżowania z 4 lat					0,1625

Tabela 12. Efektywność krzyżowań tetraploidów jabłoni (rośliny mateczne) z diploidami jabłoni (rośliny ojcowskie) w latach 2021 - 2024.

	Krzyżowania	Liczba zapylnych kwiatów	Liczba owoców	Liczba nasion	Liczba uzyskanych siewek	Efektywność krzyżowania (l. siewek/l. zapylnych kwiatów)
2021						
1.	'Free Redstar' 4x-2 × 'Szampion' 2x	40	0	0	0	0
2.	'Pinova' 4x-4 × 'Szampion' 2x	40	2	13	3	0,075
3.	'Pinova' 4x-3L × 'Szampion' 2x	40	1	7	4	0,1
	Suma	120	3	20	7	
Średnia efektywność krzyżowania						<u>0,058</u>
2022						
1.	'Free Redstar' 4x-2 × 'Szampion' 2x	40	4	20	0	0
2.	'Free Redstar' 4x-3 × 'Szampion' 2x	40	0	0	0	0
3.	'Free Redstar' 4x-3 × 'Pinova' 2x	40	3	15	0	0
4.	'Pinova' 4x-3L × 'Szampion' 2x	40	4	11	3	0
5.	'Pinova' 4x-4 × 'Szampion' 2x	40	1	1	4	0,1
	Suma	200	8	36	7	
Średnia efektywność krzyżowania						<u>0,035</u>
2023						
1.	'Free Redstar' 4x-2 × 'Gold Milenium' 2x	40	0	0	0	0
2.	'Pinova' 4x-4 × 'Gold Milenium' 2x	40	0	0	0	0
3.	'Pinova' 4x-5 × 'Redchief' 2x	40	0	0	0	0
4.	'Redchief' 4x-8 × 'Pinova' 2x	40	0	0	0	0
5.	'Redchief' 4x-14 × 'Gold Milenium' 2x	40	0	0	0	0
	Suma	200	0	0	0	
Średnia efektywność krzyżowania						<u>0</u>
2024						
1.	'Gala Must' 4x-2 × 'Free Redstar' 2x	40	0	0	0	0
2.	'Gala Must' 4x-5 × 'Redchief' 2x	40	1	0	0	0
3.	'Free Redstar' 4x-4 × 'Redchief' 2x	40	0	0	0	0
4.	'Free Redstar' 4x-3 × 'Pinova' 2x	40	1	2	5	0,13
5.	'Pinova' 4x-16 × 'Gala Must' 2x	40	1	1	0	0
6.	'Pinova' 4x-3 × 'Gold Millenium' 2x	40	4	11	8	0,2
7.	'Redchief' 4x-25 × 'Gala Must' 2x	40	0	0	0	0
8.	'Redchief' 4x-11 × 'Gold Milenium' 2x	40	1	6	6	0
	Suma	320	8	20	19	
Średnia efektywność krzyżowania						<u>0,059</u>
	Suma całkowita	840	19	76	33	
Średnia efektywność krzyżowania dla 4 lat						0,039

Wszystkie siewki uzyskane w wyniku krzyżowań interploidalnych zostały poddane analizie poziomu ploidalności z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Wyniki wykazały, że większość siewek była triploidalna, co świadczy o tym, że są one mieszańcami interploidalnymi (Rys. 29).

Siewki uzyskane w 2021 i 2022 r. zostały również poddane analizie wielkości genomu w odniesieniu do diploidalnych i tetraploidalnych form rodzicielskich. Siewki te pochodziły z poniższych krzyżowań. W 2021 roku uzyskano trzy siewki: S4/2021 oraz S6/2021 pochodzące z krzyżowania 'Pinova' 4x-3L × 'Szampion' 2x, a także siewkę S5/2021 uzyskaną z kombinacji 'Pinova' 4x-4 × 'Szampion' 2x. Natomiast w 2022 roku, w efekcie krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3, uzyskano osiem siewek: S1/2022, S3/2022, S4/2022, S5/2022, S8/2022, S9/2022, S10/2022 oraz S12/2022.

Wielkość genomu (zawartość jądrowego DNA, 2C DNA w pg) dla genotypów diploidalnych, wynosiła od 1,59 pg do 1,63 pg, tetraploidy charakteryzowały się niemal dwukrotnie większą zawartością jądrowego DNA od 3,05 pg do 3,30 pg. Siewki triploidalne, uzyskane w wyniku krzyżowań, miały pośrednią wielkość genomu, wynoszącą od 2,19 pg do 2,59 pg (Tab. 13, 14). Analiza wielkości genomu potwierdziła, że badane siewki zawierają potrójny zestaw chromosomów (Rys. 30).

W roku 2024 wykonano analogiczne analizy dla kolejnych siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych. W tej grupie większość siewek również miała charakter triploidalny, jednak stwierdzono także obecność form diploidalnych oraz tetraploidalnych (Tab. 14).

Siewki mieszańcowe z wszystkich krzyżowań interploidalnych charakteryzowały się dużą zmiennością fenotypową (Rys. 31).

Tabela 13. Zawartość jądrowego (2C) DNA oraz poziom ploidalności siewek, uzyskanych z krzyżowań interploidalnych oraz genotypów rodzicielskich (wiersze zaznaczone na zielono) w latach 2021 - 2022.

Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności
'Pinova' 2x	1,59 ± 0,01 c	2x
'Szampion' 2x	1,62 ± 0,04 c	2x
'Free Redstar' 4x-3	3,18 ± 0,03 a	4x
'Pinova' 4x-3	3,08 ± 0,01 a	4x
'Pinova' 4x-4	3,05 ± 0,02 a	4x
Siewka S4/2021	2,37 ± 0,07 b	3x
Siewka S5/2021	2,59 ± 0,02 b	3x
Siewka S6/2021	2,44 ± 0,03 b	3x
Siewka S1/2022	2,46 ± 0,01 b	3x
Siewka S3/2022	2,44 ± 0,02 b	3x
Siewka S4/2022	2,44 ± 0,01 b	3x
Siewka S5/2022	2,49 ± 0,05 b	3x
Siewka S8/2022	2,45 ± 0,05 b	3x
Siewka S9/2022	2,31 ± 0,03 b	3x
Siewka S10/2022	2,39 ± 0,02 b	3x
Siewka S12/2022	2,40 ± 0,01 b	3x

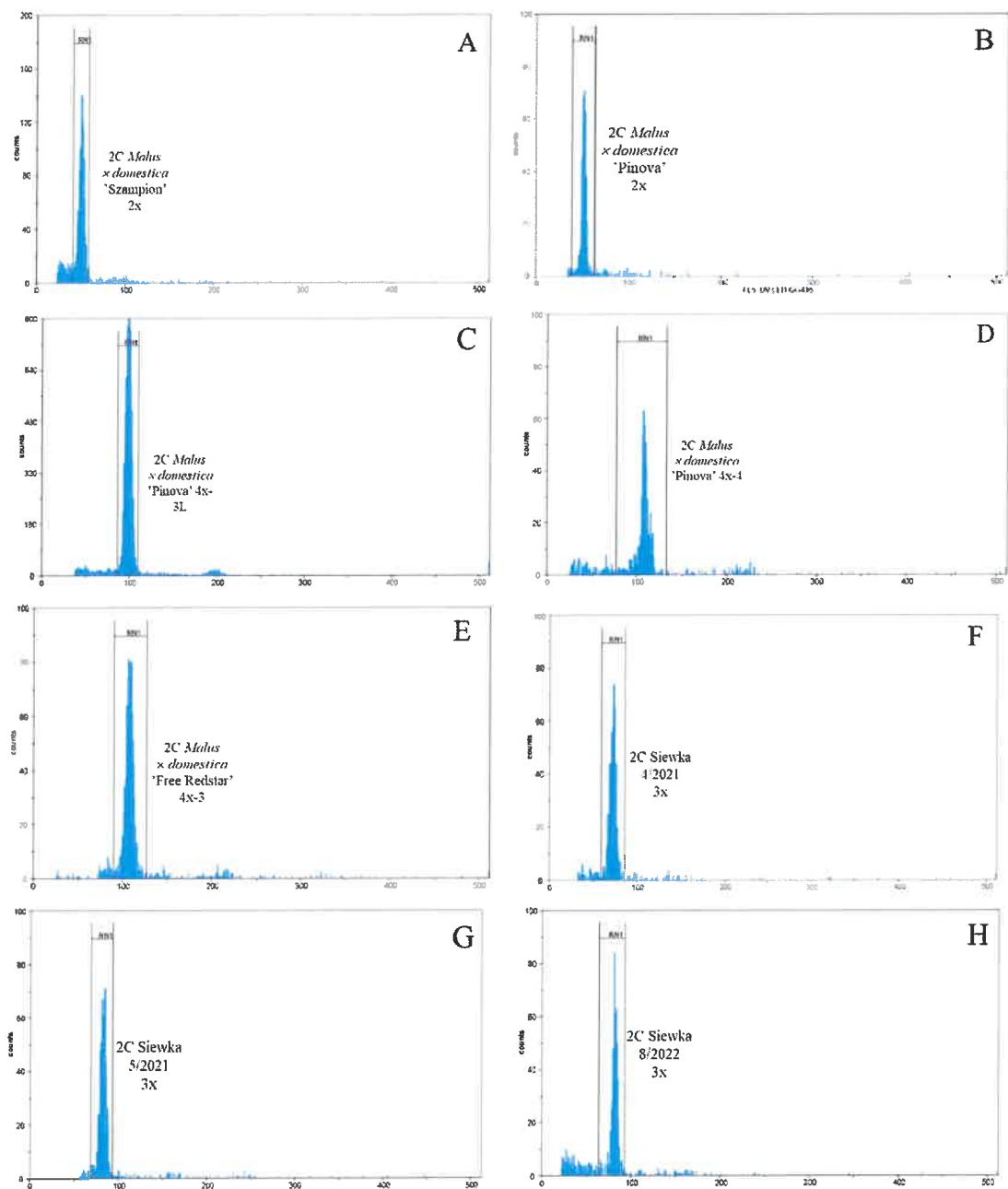
średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.

Tabela 14. Zawartość jądrowego (2C) DNA oraz poziom ploidalności siewek, uzyskanych z krzyżowań interploidalnych oraz genotypów rodzicielskich (wiersze zaznaczone na zielono) w roku 2024.

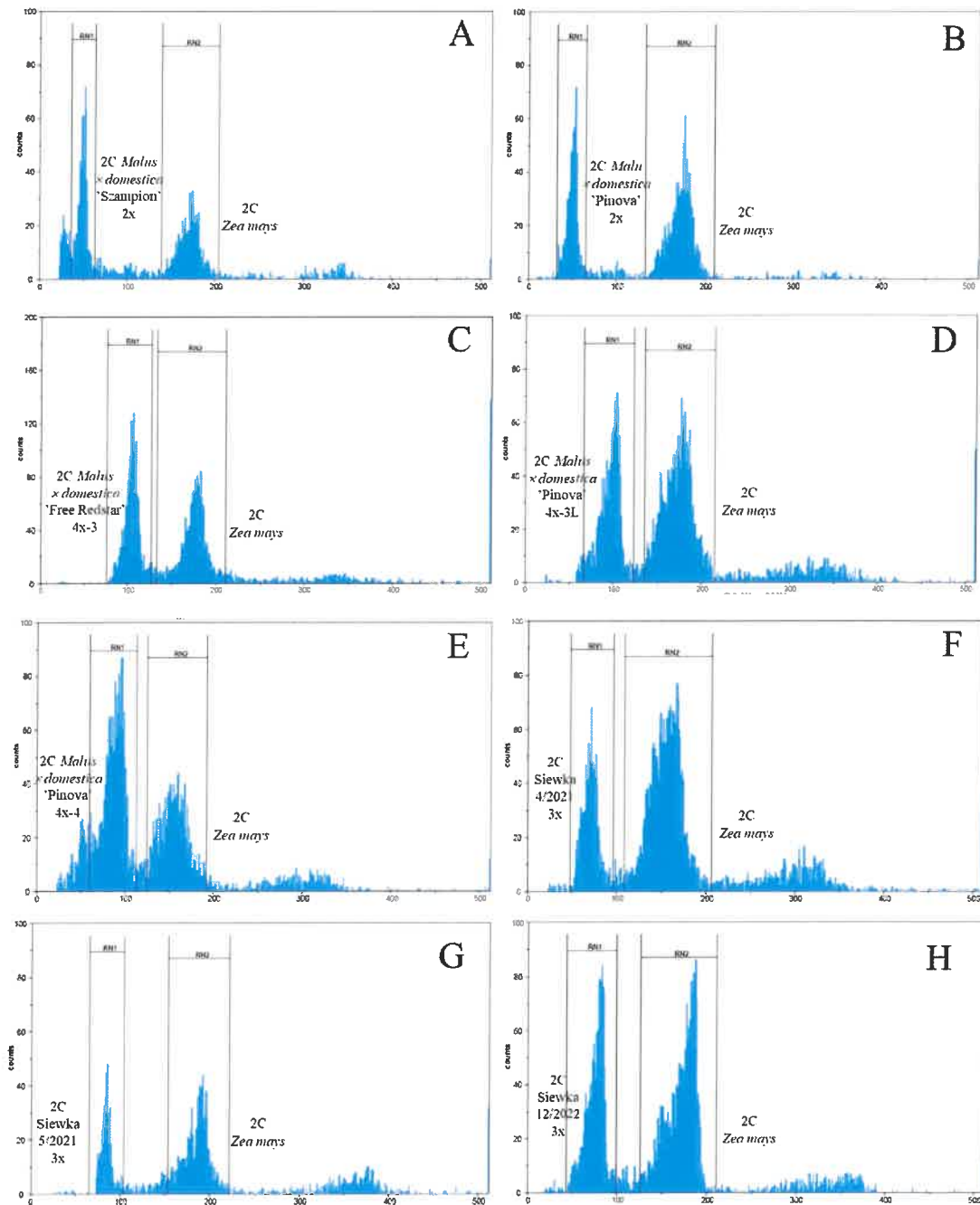
Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności	Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności
Gala Must' 2x	1,63 ± 0,01 c	2x	FG 52/2025	2,29 ± 0,01 b	3x
Free Redstar' 4x-4	3,19 ± 0,01 a	4x	FG 53/2025	2,28 ± 0,02 b	3x
GF 1/2025	2,30 ± 0,02 b	3x	FG 54/2023	2,29 ± 0,02 b	3x
GF 8/2025	2,31 ± 0,01 b	3x	FG 55/2025	2,33 ± 0,01 b	3x
Redchief' 2x	1,60 ± 0,02 c	2x	FG 67/2025	2,27 ± 0,01 b	3x
Sander' 4x-3	3,21 ± 0,03 a	4x	FG 68/2025	2,37 ± 0,02 b	3x
RS 2/2025	-	3x	FG 69/2025	2,31 ± 0,02 b	3x
RS 9/2025	-	3x	FG 70/2025	2,37 ± 0,03 b	3x
RS 19/2025	-	3x	Pinova' 4x-3	3,22 ± 0,01 a	4x
RS 20/2025	-	3x	GP 6/2025	2,31 ± 0,03 b	3x
RS 40/2025	-	3x	GP 37/2025	1,60 ± 0,05 c	2x

RF 10/2025	2,30 ± 0,01 b	3x	GP 38/2025	2,23 ± 0,04 b	3x
RF 11/2025	2,33 ± 0,02 b	3x	GP 80/2025	2,28 ± 0,01 b	3x
RF 12/2025	2,23 ± 0,02 b	3x	GP 81/2025	2,30 ± 0,02 b	3x
RF 42/2025	2,32 ± 0,01 b	3x	GP 82/2025	2,34 ± 0,02 b	3x
RF 65/2025	2,35 ± 0,02 b	3x	Pinova' 2x	1,55 ± 0, 01 c	2x
Free Redstar '2x	1,52 ± 0,02 c	2x	Redchief' 4x-11	3,16± 0,04 a	4x
Gala Must' 4x-1	3,17 ± 0,01 a	4x	PR 39/2025	2,28 ± 0,05 b	3x
FG 4/2025	2,24 ± 0,01 b	3x	PR 60/2025	2,33 ± 0,04 b	3x
FG 5/2025	2,27 ± 0,02 b	3x	PR 61/2025	2,37 ± 0,01 b	3x
FG 13/2025	2,26 ± 0,02 b	3x	PR 62/2025	2,31 ± 0,05 b	3x
FG 14/2025	2,28 ± 0,03 b	3x	PR 63/2025	2,34 ± 0,03 b	3x
FG 15/2025	2,33 ± 0,02 b	3x	PR 83/2025	1,60 ± 0,01 c	2x
FG 16/2025	2,31 ± 0,01 b	3x	PR 84/2025	1,62 ± 0,02 c	2x
FG 22/2025	2,24 ± 0,02 b	3x	PR 85/2025	2,33 ± 0,01 b	3x
FG 23/2025	2,32 ± 0,01 b	3x	PR 86/2025	2,35 ± 0,01 b	3x
FG 24/2025	2,26 ± 0,01 b	3x	PR 87/2025	2,30 ± 0,02 b	3x
FG 25/2025	2,19 ± 0,02 b	3x	PR 91/2025	2,30 ± 0,01 b	3x
FG 26/2025	2,33 ± 0,02 b	3x	Pinova' 4x-16L	3,18 ± 0,02 a	4x
FG 27/2025	2,32 ± 0,03 b	3x	RP 18/2025	2,31 ± 0,03 b	3x
FG 28/2025	2,32 ± 0,01 b	3x	RP 59/2025	2,33 ± 0,02 b	3x
FG 29/2025	2,26 ± 0,02 b	3x	Free Redstar' 4x-3	3,22 ± 0,03 a	4x
FG 30/2025	2,30 ± 0,01 b	3x	FP 41/2025	2,35 ± 0,05 b	3x
FG 31/2025	2,35 ± 0,02 b	3x	Gold Milenium'	1,59 ± 0,01 c	2x
FG 32/2025	2,21 ± 0,03 b	3x	PG 33/2025	2,31 ± 0,02 b	3x
FG 43/2025	2,35 ± 0,01 b	3x	RG 35/2025	3,21 ± 0,02 a	4x
FG 44/2025	2,23 ± 0,02 b	3x	RG 36/2025	3,25 ± 0,03 a	4x
FG 45/2025	2,33 ± 0,02 b	3x	RG 56/2023	3,21 ± 0,05 a	4x
FG 46/2025	2,20 ± 0,01 b	3x	RG 77/2025	3,24 ± 0,04 a	4x
FG 47/2025	2,26 ± 0,01 b	3x	RG 78/2025	3,31 ± 0,02 a	4x
FG 48/2023	2,32 ± 0,03 b	3x	RG 79/2025	3,30 ± 0,01 a	4x
FG 49/2023	2,30 ± 0,03 b	3x	SR 66/2025	-	3x
FG 50/2023	2,37 ± 0,03 b	3x	PF 76/2025	2,30 ± 0,02 b	3x
FG 51/2025	2,31 ± 0,01 b	3x			

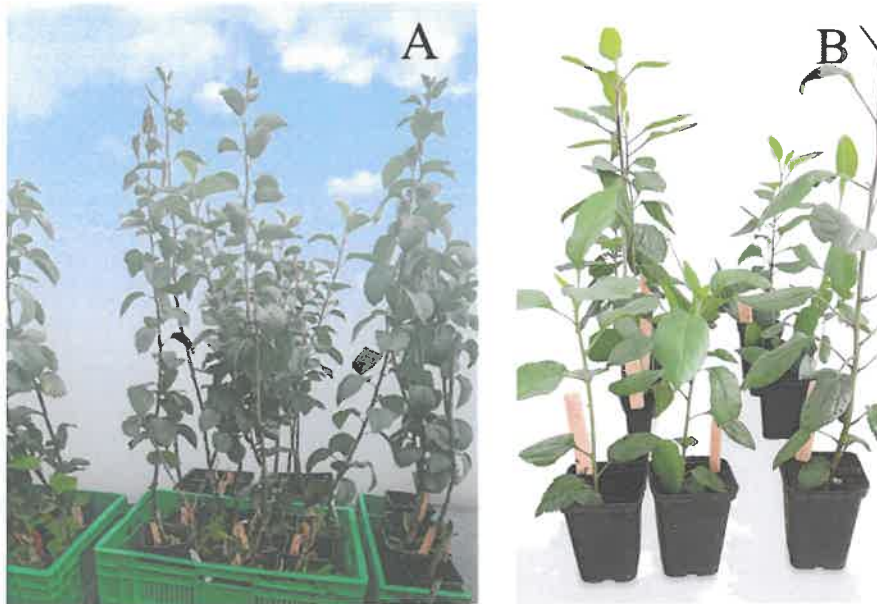
średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p=0,05$; test Duncana.



Rysunek 29. Przykładowe histogramy analizy cytometrycznej poziomu ploidalności siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych oraz genotypów rodzicielskich: genotypy diploidalne (A, B), klony tetraploidalne 'Pinova' 4x-3L (C), 'Pinova' 4x-4 (D), 'Free Redstar' 4x-3 (E), siewki triploidalne (F, G, H).

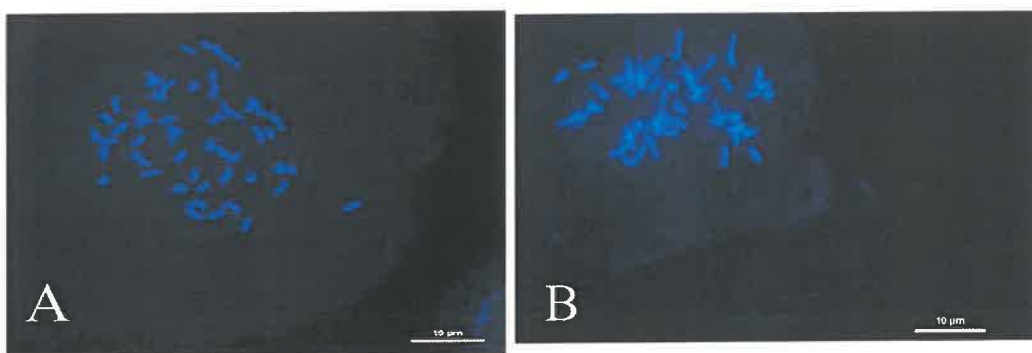


Rysunek 30. Przykładowe histogramy oceny wielkości genomu siewek uzyskanych z krzyżowań interploidalnych oraz genotypów rodzicielskich: genotypów diploidalnych (A, B), klonów tetraploidalnych (C, D, E) oraz siewek triploidalnych (F, G, H).

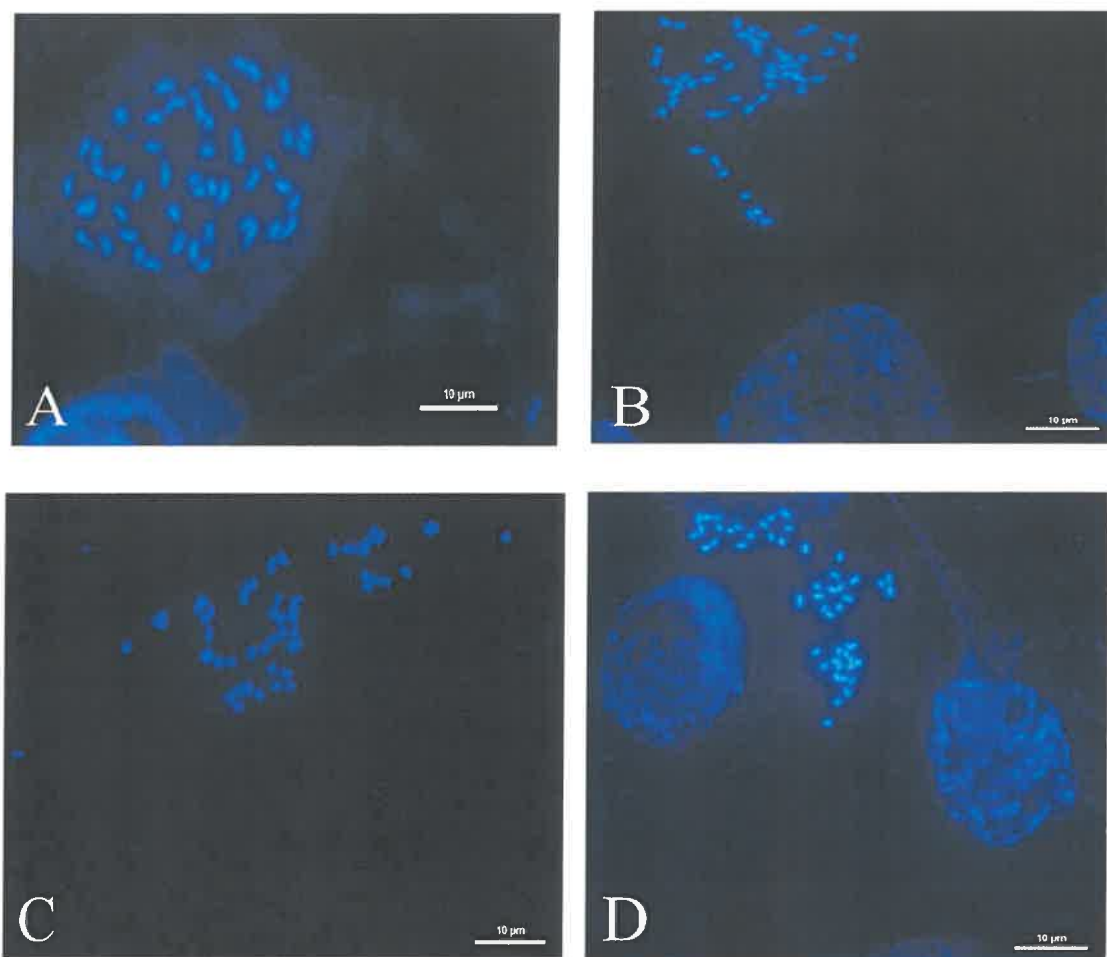


Rysunek 31. Siewki mieszańcowe triploidalne: szczepione na podkładce M.9. (A) oraz własnokorzeniowe (B).

Przeprowadzono analizy liczby chromosomów siewek pochodzących z krzyżowań wykonanych w 2021 roku: ‘Pinova’ 4x-3L × ‘Szampion’ 2x i ‘Pinova’ 4x-4 × ‘Szampion’ 2x (Rys. 32) oraz w 2022: ‘Pinova’ 2x × ‘Free Redstar’ 4x-3 (Rys. 33). Analiza liczby chromosomów w badanych siewkach potwierdziła wyniki uzyskane metodą cytometrii przepływowej. Wszystkie preparaty wykonane z merystemów wierzchołkowych korzeni genotypów triploidalnych wykazały obecność 51 chromosomów w jądrach metafazowych, co odpowiada potrójnemu zestawowi chromosomów (3n).



Rysunek 32. Mikroskopowe obserwacje liczby chromosomów w merystemach wierzchołkowych korzeni siewek jabłoni z krzyżowań ‘Pinova’ 4x-3L × ‘Szampion’ 2x: S6/2021 (A) i ‘Pinova’ 4x-4 × ‘Szampion’ 2x: S5/2021 (B); skala = 10 µm, powiększenie 60x.



Rysunek 33. Mikroskopowe obserwacje liczby chromosomów w merystemach wierzchołkowych korzeni siewek jabłoni z krzyżowania ‘Pinova’ 2x × ‘Free Redstar’ 4x-3: S3/2022 (A), S9/2022 (B), 10/2022 (C), 12/2022 (D) ; skala = 10 µm, powiększenie 60x.

5. Dyskusja

Jabłoń domowa (*Malus × domestica* Borkh.) jest jednym z najważniejszych gatunków sadowniczych na świecie, zarówno pod względem wielkości produkcji jak i powierzchni upraw. Według danych FAO, światowa produkcja jabłek przekracza 93 miliony ton rocznie (FAOSTAT, 2023; dostęp: 22.08.2025). Również w Polsce jabłoń stanowi podstawowy gatunek sadowniczy, a kraj należy do czołowych producentów jabłek w Europie. W ostatnich dekadach rozwój hodowli przyczynił się do powstania wielu nowych odmian, jednak ze względu na częste wykorzystywanie wspólnych form rodzicielskich znaczna część obecnie uprawianych odmian wywodzi się z wąskiej puli genetycznej (Daccord i in., 2017). Zmniejszona różnorodność genetyczna zwiększa ryzyko podatności roślin na stropy biotyczne i abiotyczne. W tym kontekście znaczenia nabiera poliploidyacja jako narzędzie umożliwiające poszerzenie zmienności genetycznej oraz wprowadzenie cech korzystnych z punktu widzenia hodowlanego - odporności na stropy czy poprawy jakości owoców (Daccord i in., 2017; Sattler i in., 2016). Autotetraploidy jabłoni mogą być nie tylko źródłem zmienności dla hodowli, ale także komponentem w krzyżowaniach interploidalnych prowadzących do powstawania triploidów o korzystnych cechach użytkowych takich jak większe owoce, wyższa tolerancja na stropy środowiskowe (Sedov i in., 2014; 18; Sedysheva i Gorbacheva, 2013; Podwyszyńska i in., 2016). W związku z tym, kompleksowa ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni – obejmująca cechy morfologiczne, anatomiczne, odporność na stres suszy oraz zdolność do krzyżowania – stanowi istotny element badań nad wykorzystaniem poliploidyacji w hodowli tego gatunku.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że podwojenie liczby chromosomów istotnie wpłynęło na fenotyp autotetraploidów jabłoni. Zmiany fenotypowe dotyczyły przede wszystkim cech morfologicznych liści, zawartości chlorofilu oraz budowy i właściwości aparatów szparkowych. W porównaniu z formami diploidalnymi, liście tetraploidów miały wyraźnie zmieniony kształt – były krótsze, bardziej szerokie i zaokrąglone. Podobne obserwacje poczynili Sedysheva i Gorbacheva (2013) oraz Xue i in. (2017), którzy opisali liście autotetraploidów jako bardziej masywne, z tendencją do zwiększenia grubości blaszki liściowej i bardziej okrągłe. Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach wskazują również, że liście autotetraploidów jabłoni były przeciętnie mniejsze niż u ich odpowiedników diploidalnych, co kontrastuje z doniesieniami wyżej wymienionych autorów, według których poliploidyacja może prowadzić do zwiększenia powierzchni liści. Odmienne obserwacje mogą wynikać zarówno z różnic genotypowych, jak i warunków środowiskowych, w jakich prowadzone były badania. Podobnie jak w przypadku tetraploidów 'Free Redstar' i 'Hanfu', liście tetraploidów odmian 'Redchief', 'Free Redstar' i 'Pinova' zawierały więcej chlorofilu, ich aparaty szparkowe były większe, ale ich gęstość była mniejsza niż u diploidów (Hias i in., 2017; Xue i in., 2017; Podwyszyńska i in., 2021b). Wzrost wielkości aparatów szparkowych oraz zwiększona zawartość chlorofilu są powszechnie obserwowane u nowopowstałych poliploidów różnych gatunków roślin. Zmiany takie występowały między innymi u neotetraploidów

takich gatunków, jak: mango (*Mangifera indica*) (González-Rodríguez i Grajal-Martín, 2013), liliowiec (Podwyszyńska i in., 2015) czy mieczyk (*Gladiolus grandiflorus*) (Manzoor i in., 2018). Co więcej, silna dodatnia korelacja pomiędzy wielkością aparatów szparkowych, a poziomem ploidalności została uznana za jedno z kryteriów morfologicznych umożliwiających identyfikację poziomu ploidalności w wielu gatunkach roślin, w tym również u jabłoni (Korban i in., 2009; Podwyszyńska i in., 2016). Wzrost wielkości aparatów szparkowych i zawartości chlorofilu może być korzystny w kontekście adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych w tym suszy, ponieważ większe komórki szparkowe, mimo mniejszej gęstości mogą lepiej regulować wymianę gazową i ograniczać transpirację. Zmniejszenie gęstości aparatów szparkowych jest cechą często obserwowaną u tetraploidów, co może wskazywać na poprawę efektywności gospodarki wodnej (Mo i in., 2020).

W życiowym cyklu rozwojowym drzewiastych roślin sadowniczych rozmnażanych z nasion (w celach hodowlanych), w tym także jabłoni występuje stosunkowo długi okres juwenilny (młodociany), który obejmuje początkową fazę życia roślin, podczas której nie jest ona jeszcze zdolna do kwitnienia i owocowania (Goldschmidt i Samach, 2004; Kumar i in., 2024). W tym czasie siewki wytwarzają wyłącznie organy wegetatywne. Nawet w sprzyjających warunkach środowiskowych nie dochodzi do rozwoju organów generatywnych. Faza juwenilna jest szczególnie długa w przypadku tetraploidów, które w wielu przypadkach wykazują późniejsze przejście do fazy generatywnej nawet o dwa lata w porównaniu do ich diploidalnych odpowiedników. By skrócić okres juwenilny w praktyce sadowniczej stosuje się szczepienie na podkładkach skarłających.

Wieloletnie obserwacje (2021–2024) prowadzone w ramach prezentowanych badań wykazały, że tetraploidalne formy jabłoni 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova' szczepione na karłowej podkładce M.9 charakteryzowały się jednakże wyraźnie późniejszym i mniej intensywnym kwitnieniem w porównaniu do diploidów także szczepionych na tej podkładce. Tetraploidy kwitły o 2 do 6 dni później w sezonie i około 1-2 lata później osiągały fazę rozwoju generatywnego. Podobne zjawisko notowano u klonów tetraploidalnych odmiany 'Hanfu', które zakwitły średnio o dwa sezony później i 5-7 dniowym opóźnieniem w sezonie wegetacyjnym względem diploidów (Xue i in., 2017). Opóźnienie to może być związane z modyfikacją gospodarki hormonalnej i zmianami w regulacji ekspresji genów związanych z indukcją kwitnienia, co zostało dowiedzione również w przypadku innych gatunków roślin, np. żurawka, kiwi czy rzodkiewka (Segraves i Thompson, 1999; Zhong i in. 2015; Pei i in., 2019;). Zastosowanie odpowiednich podkładek może skrócić okres juwenilny. Badania Lewandowskiego i Żurawicza (2000) wykazały, że szczepienie siewek na bardzo karłowych podkładkach, takich jak P22 znacznie przyspieszało kwitnienie, nawet u genotypów charakteryzujących się opóźnionym rozwojem generatywnym. W kontekście hodowli triploidów poprzez krzyżowania interploidalne, znajomość dynamiki fazy juwenilnej oraz strategii jej skracania jest kluczowa dla skutecznej selekcji form o wysokim potencjale użytkowym.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że tetraploidalne formy jabłoni charakteryzowały się wyraźnie większymi kwiatami w porównaniu do diploidalnych

odpowiedników. Zmiany te obejmowały zarówno średnicę całego kwiatu, jak i wielkość poszczególnych jego organów, takich jak płatki korony, pręciki czy słupki. Analogiczne rezultaty uzyskali Xue i in. (2017), którzy badając autotetraploidy jabłoni, odnotowali znaczne zwiększenie rozmiarów kwiatów, przy jednoczesnym zmniejszeniu ich liczby w kwiatostanie. Efekt większych kwiatów na skutek podwojenia liczby chromosomów został również odnotowany u innych gatunków roślin, m.in. u borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.), gdzie kwiaty u form autotetraploidalnych były większe o około 64% (Podwyszynska i in., 2021), a także u arbuza (*Citrullus lanatus*) (Saminathan i in., 2015) oraz liliowca (*Heimerocallis* sp.) (Podwyszyńska i in., 2015).

Jednym z istotnych efektów poliploidyzacji roślin jest zmiana wielkości oraz żywotności ziaren pyłku. W przeprowadzonych badaniach na trzech odmianach jabłoni: 'Free Redstar', 'Redchief' i 'Pinova' wykazano, że u genotypów autotetraploidalnych długość ziaren pyłku była istotnie większa w porównaniu do form diploidalnych. Obserwacja ta jest zgodna z ogólną tendencją występującą u roślin poliploidalnych, gdzie zwiększenie poziomu ploidalności skutkuje wzrostem rozmiarów komórek, w tym komórek generatywnych (Parisod i in. 2010). Jednocześnie w moich badaniach wykazałam, że żywotność pyłku oraz jego zdolność kiełkowania u tetraploidów jabłoni była wyraźnie niższa. Spadek żywotności pyłku u form tetraploidalnych wynosił średnio około 25%, natomiast kiełkowanie zmniejszyło się przeciętnie o 43% względem diploidów. Niższa żywotność ziaren pyłku u roślin poliploidalnych tłumaczy się zaburzeniami w procesie mejozy. Milan (2008) wykazał, że obniżona żywotność pyłku może być efektem nieprawidłowości mejozycznych, takich jak: opóźnienia segregacji chromosomów i w rezultacie tworzenie gamet o nieregularnej liczbie chromosomów, co przejawia się powstawaniem, oprócz regularnych, także mniejszych i większych ziaren pyłku, często nieżywotnych. Podobne zmiany w morfologii i żywotności ziaren pyłku po indukcji poliploidii obserwowano również u innych gatunków. U autotetraploidalnych roślin borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus* L.) stwierdzono istotnie większe ziarna pyłku w porównaniu do diploidów, przy jednoczesnym obniżeniu ich żywotności i zdolności do kiełkowania (Podwyszyńska i in., 2021c). U tulipana (*Tulipa gesneriana* L.) ziarna pyłku tetraploidów były o 25% większe niż u diploidów, lecz ich zdolność kiełkowania była znacznie niższa – wynosiła 6,3% wobec 30,3% u form diploidalnych (Podwyszyńska i in., 2018). W przypadku wyki kosmatej (*Vicia villosa* Roth) ziarna pyłku tetraploidów również były większe i różniły się morfologicznie – diploidy wytwarzały ziarna eliptyczne, a tetraploidy trójkątne (Tulay i Unal, 2010). Żywotność pyłku u diploidów tego gatunku sięgała 99%, podczas gdy u tetraploidów wynosiła 81%. Również u mieczyka (*Gladiolus grandiflorus* L.) ziarna pyłku były większe u tetraploidów, przy jednoczesnym obniżeniu żywotności z 82,9% do 71,9% (Manzoor i in., 2019).

Jakość owoców stanowi jeden z kluczowych czynników warunkujących wartość handlową i konsumpcyjną jabłek, determinując atrakcyjność wizualną, właściwości smakowe oraz przydatność do przechowywania i przetwórstwa (Musacchi i Serra, 2018). Na cechy te wpływają zarówno uwarunkowania genetyczne jak i czynniki środowiskowe, a także poziom ploidalności. Zmiany liczby chromosomów mogą prowadzić do istotnych modyfikacji metabolicznych i morfologicznych w roślinie, co

w konsekwencji oddziałuje na jakość owoców (Parisod i in., 2010; Sattler i in., 2016). Jakość jabłek jest cechą wieloskładnikową, determinowaną zarówno przez czynniki genetyczne jak i środowiskowe oraz agrotechniczne. Wśród najważniejszych atrybutów jakości wyróżnia się: rozmiar owoców, barwę skórki, jędrność miąższu, zawartość ekstraktu oraz kwasowość miareczkową (Morariu i in. 2025). W moich badaniach tetraploidy wszystkich trzech odmian – ‘Free Redstar’, ‘Redchief’ i ‘Pinova’ – wykazywały istotnie wyższą masę owoców w porównaniu do diploidalnych odpowiedników, co wiąże się z efektem zwiększania objętości komórek charakterystycznym dla poliploidów. Podobne obserwacje poczynili Liu i in. (2006), którzy wykazali, że owoce autotetraploidalnej odmiany ‘Royal Gala’ charakteryzowały się większym rozmiarem i wyższą zawartością rozpuszczalnych substancji stałych w porównaniu do jej diploidalnej formy. Również w przypadku odmiany ‘Hanfu’, owoce autotetraploidów jabłoni cechowały się istotnym wzrostem masy (o 23,6%), długości, kształtu i zawartości ekstraktu, przy jednoczesnym niewielkim zmniejszeniu szerokości owocu w porównaniu do diploidów (Xue i in., 2017). Autorzy ci stwierdzili, że wzrost masy nasion i brak istotnych różnic w jędrności owoców wskazują, że zmiana poziomu ploidalności może oddziaływać selektywnie na poszczególne cechy jakościowe. Co ciekawe, tetraploidy wykazywały również istotnie wyższy wskaźnik opadania owoców, co może mieć znaczenie praktyczne w kontekście zbioru i trwałości przechowalniczej (Xue i in., 2017).

Istotnym parametrem wpływającym na atrakcyjność wizualną jabłek jest barwa skórki, a szczególnie powierzchnia rumieńca. Intensywność i rozległość rumieńca zależą głównie od dostępności światła i ekspozycji owoców, ale także od aktywności genów związanych z biosyntezą antocyjanin (Musacchi i Serra, 2018). W przeprowadzonych badaniach nie obserwowano istotnych różnic w powierzchni rumieńca między diploidami a tetraploidami u odmian ‘Redchief’ i ‘Pinova’, natomiast u odmiany ‘Free Redstar’ jeden z klonów tetraploidalnych miał rumieniec istotnie słabiej rozwinięty. Może to sugerować, że zwiększenie ploidalności niekoniecznie przekłada się na wyraźne zmiany w intensywności zabarwienia skórki, a efekt może być zależny od interakcji genotypu i środowiska. Jędrność miąższu u jabłoni jest cechą kluczową dla trwałości pozbiornej, jego silne zróżnicowanie zależne jest od odmiany, praktyk uprawowych czy terminu zbioru (Bryk i in., 2013; Szpadzik i in., 2023). W naszych analizach niektóre klony tetraploidalne charakteryzowały się jędrnością porównywalną lub wyższą od diploidów, natomiast niektóre wykazywały znaczące zmniejszenie jędrności. Wyniki te pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi wskazującymi, że jędrność może nie ulegać istotnym zmianom w wyniku podwojenia liczby chromosomów (Xue i in., 2017). Jednym z klasycznych wskaźników dojrzałości jabłek jest określanie indeksu skrobiowego, który pozwala ocenić stopień rozkładu skrobi w miąższu. Skrobia jest głównym węglowodanem zapasowym, który odkłada się w owocu w czasie jego wzrostu, a podczas dojrzewania ulega hydrolizie do cukrów prostych, co ma bezpośredni wpływ na słodkość oraz jakość smakową owoców (Mesa i in., 2016; Deng i in. 2025). Ocena rozkładu skrobi może być pomocna nie tylko w określaniu optymalnego terminu zbioru, ale również w prognozowaniu trwałości przechowalniczej. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że u tetraploidów

'Redchief' skrobia rozkłada się w nieco mniejszym stopniu niż u ich diploidalnych odpowiedników, co może wskazywać na późniejsze dojrzewanie. Opóźnione dojrzewanie i większa trwałość pozbiorcza mogą stanowić korzystną cechę handlową. Istotnym parametrem smakowym jabłek jest zawartość ekstraktu oraz kwasowość, które decydują o profilu sensorycznym owocu. Wartości te zależą od cech odmianowych, jak i warunków środowiskowych, w tym dostępności wody i światła (Musacchi i Serra, 2018). W naszych analizach tetraploidy jabłoni charakteryzowały się wyższą zawartością ekstraktu i większą kwasowością w porównaniu do diploidów. Podobne wyniki uzyskali Sedov i Makarkina (2008), którzy wykazali, że owoce niektórych tetraploidów charakteryzowały się wyższą całkowitą zawartością cukrów, kwasów organicznych i kwasu askorbinowego w porównaniu do ich diploidalnych odpowiedników. Co więcej, niektóre z tych cech, takie jak wysoka zawartość kwasu askorbinowego, były przekazywane ich mieszańcowemu potomstwu triploidalnemu w wyniku krzyżowań płciowych między genotypami tetraploidalnymi i diploidalnymi.

U wszystkich analizowanych odmian jabłoni nasiona genotypów tetraploidalnych były wizualnie większe niż u ich diploidalnych odpowiedników, co potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące zwiększonego rozmiaru komórek i organów jako jednej z konsekwencji poliploidyzacji (Sattler i in., 2016). Moje badania wykazały jednak, że zauważalna różnica w wielkości nasion nie zawsze wiązała się z proporcjonalnym wzrostem ich masy. W przypadku tetraploidów 'Free Redstar' (4x-2 i 4x-4) oraz klonu 'Redchief' 4x-11 masa 10 nasion nie różniła się istotnie od wartości notowanej u diploidów, mimo że nasiona były wizualnie większe. Może to sugerować, że część z nich nie była dostatecznie wypełniona czy prawidłowo uformowana, co mogło wynikać z zaburzeń w rozwoju zarodka i/lub bielma (Zhang i in., 2019). Z kolei u pozostałych genotypów tetraploidalnych – zwłaszcza u tetraploidalnych klonów 'Redchief' 4x-25 i 'Pinova' 4x-4 i 4x-3L – masa 10 nasion była istotnie wyższa w porównaniu do diploidów. Może to wskazywać na większą sprawność procesu embriogenezy i powstawania bielma u tych genotypów tetraploidalnych i zarazem ich większą zdolność do produkcji pełnowartościowych nasion. Podobnie Xue i in. (2017), wykazali, że nasiona tetraploidalnych klonów jabłoni 'Hanfu' charakteryzowały się większym rozmiarem i masą w porównaniu do diploidów.

Moje wyniki pokazały, że owoce tetraploidalnych genotypów jabłoni są większe niż u diploidów. Spostrzeżenie to znajduje potwierdzenie w licznych badaniach prowadzonych na innych gatunkach roślin sadowniczych i warzywnych. U *Actinidia chinensis* (kiwi) podwojenie poziomu ploidalności prowadziło do uzyskania owoców o 50–60% cięższych niż u form diploidalnych, bardziej kulistych i z grubszą skórką (Wu i in., 2013). Tetraploidalne owoce kiwi charakteryzowały się jednak niższą jędrnością, mniejszą zawartością suchej masy oraz słabszym wybarwieniem miąższu, co wskazuje na możliwe kompromisy jakościowe, towarzyszące zwiększeniu rozmiarów owoców. Podobne wyniki uzyskano także w innym badaniu tego samego gatunku, gdzie potwierdzono stabilność cechy większej masy owoców tetraploidów w kolejnych sezonach, choć zauważono również występowanie deformacji owoców, co wskazuje na konieczność selekcji klonalnej (Wu i in., 2012). Również u tetraploidalnego melona (*Cucumis melo*) stwierdzono około 30% wzrost masy owoców w porównaniu do

diploidów, a także poprawę takich parametrów jakości jak: zawartość cukrów rozpuszczalnych, witaminy C i masy nasion (Zhang i in., 2010). Takie zmiany sugerują korzystny wpływ poliploidyzacji nie tylko na cechy morfologiczne, ale i sensoryczne owocu. W przypadku karamboli (*Averrhoa carambola* L.) formy poliploidalne (zarówno triploidy, jak i tetraploidy) miały większe i cięższe owoce oraz wydłużony okres trwałości pozbiorczej w porównaniu do diploidów. Jednakże liczba owoców na kwiatostan zmniejszyła się, co może świadczyć o większym koszcie fizjologicznym tworzenia owoców o zwiększonej masie (Hu i in., 2021). Wielkość owoców jabłoni zawsze była krytycznym czynnikiem przy określaniu wartości rynkowej (Szot i Lipa, 2019).

Środowiskowe czynniki stresogenne, takie jak susza stanowią jedno z najpoważniejszych wyzwań ograniczających wzrost i produktywność roślin na całym świecie (Koua i in., 2021; Khan i in., 2024; Koziara-Ciupa i Trojak-Goluch, 2025). Globalne ocieplenie prowadzi do wzrostu temperatur, co nasila parowanie, zmniejsza dostępność wód powierzchniowych i przyspiesza wysychanie gleby, w efekcie powodując narastający stres suszy. Zmiany klimatyczne sprawiają, że susze stają się coraz częstsze i bardziej intensywne, co bezpośrednio wpływa na funkcjonowanie ekosystemów oraz rolnictwa, zagrażając globalnemu bezpieczeństwu żywnościowemu. Według prognoz, do 2050 roku aż 50% gruntów ornych może być narażonych na stres suszy. Obecnie susza znacząco ogranicza produkcję roślinną na świecie i powoduje istotne, coroczne wahania plonów (Ali i in., 2025; Matysiak i in., 2025). Susza wywiera złożony wpływ na rośliny, zaburzając relacje wodne i efektywność wykorzystania wody, a w rezultacie naturalne wzorce rozwoju. Prowadzi do zmian fizjologicznych, takich jak ograniczenie aktywności aparatów szparkowych, zahamowanie fotosyntezy, zaburzenia wymiany gazowej, spadek natężenia transpiracji oraz wzrost stresu oksydacyjnego, co skutkuje zahamowaniem wzrostu (Gudys i in., 2018; Raza i in., 2023). Stres suszy wpływa również na integralność błon i ścian komórkowych, powodując ich uszkodzenia, a nawet śmierć komórek oraz objawy widoczne gołym okiem, takie jak: zwijanie i więdnienie liści, wczesne starzenie się roślin czy wysychanie tkanek (Kopcewicz i Lewak, 2019; Corso i in., 2020;).

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzi rola poliploidyzacji jako potencjalnego mechanizmu zwiększającego tolerancję roślin na niekorzystne warunki środowiskowe, w tym deficyt wody. Zmiany wynikające ze wzrostu stopnia ploidii dotyczą zarówno budowy anatomicznej, jak i fizjologii oraz ekspresji genów, co pozwala roślinom poliploidalnym na efektywniejsze radzenie sobie z niedoborem wody (Schwachtje i in., 2019). Na poziomie morfologicznym rośliny poliploidalne często charakteryzują się większymi komórkami i grubszymi liśćmi, kutykulą i epidermą zmniejszoną gęstością aparatów szparkowych oraz ich większym rozmiarem. Tego rodzaju zmiany strukturalne prowadzą do ograniczenia transpiracji przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniego poziomu wymiany gazowej, co stanowi istotny mechanizm oszczędzania wody w warunkach stresu (Tossi i in., 2022). Poliploidy wykazują również zwiększoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza (POD), co skutkuje skuteczniejszą eliminacją reaktywnych form tlenu (ROS) generowanych w warunkach

stresu (Tossi i in., 2022; Koziara-Ciupa i Trojak- Goluch, 2025). Dzięki temu poziom uszkodzeń oksydacyjnych mierzony m.in. poprzez zawartość malonaldehydu (MDA) jest u poliploidów niższy niż u diploidów. Dodatkowo, rośliny o wyższej ploidalności często akumulują większe ilości proliny – osmoprotektantu wspomagającego stabilizację struktur komórkowych oraz regulację potencjału osmotycznego (Lourkisti i in., 2022). Na poziomie molekularnym, u poliploidów obserwuje się zmienioną ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres abiotyczny, takich jak geny kodujące enzymy antyoksydacyjne czy akwaporyny odpowiedzialne za transport wody (Santoro i in., 2025).

Niedobór wody prowadzi do zmniejszenia tempa podziałów komórkowych, skutkuje zahamowaniem wzrostu pędów oraz redukcją biomasy. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że tetraploidy jabłoni poddane stresowi suszy wykazywały lepsze parametry wzrostu niż diploidy. Szczególnie wyraźna różnica pomiędzy tetraploidami, a diploidami była widoczna pod względem procentowego przyrostu długości pędu głównego (23% vs. 6%) i długości pędów bocznych (53% vs. 33%). Jednak nie wszystkie parametry wzrostu wykazywały przewagę tetraploidów. Diploidy poddane stresowi suszy wykazywały wyższy przyrost liczby pędów bocznych. Może to sugerować różnice w strategiach wzrostowych pomiędzy genotypami o różnym poziomie ploidalności. Tetraploidy mogły preferencyjnie inwestować w wydłużanie już istniejących pędów, co potencjalnie umożliwia im skuteczniejsze konkutowanie o światło, podczas gdy diploidy wykazywały większą zdolność do inicjacji nowych pędów bocznych, co może być strategią przetrwania poprzez rozgałęzianie. Podobne zmiany parametrów wzrostu pod wpływem stresu suszy, takie jak istotne ograniczenie wzrostu i produkcji biomasy notowano u owsa (*Avena sativa* L.) oraz większości jego mieszańców z kukurydzą (*Zea mays*) (Skrzypek i in., 2018; Warzecha i in., 2023). Obserwowano wyraźne zmniejszenie wysokości roślin, powierzchni liści oraz akumulacji suchej masy. Spośród uzyskanych w tych krzyżowaniach płodnych mieszańców tzw. OMA, zawierających cały genom owsa i pojedyncze chromosomy kukurydzy, wyselekcjonowano linie, których rośliny wykazywały wyższy potencjał plonowania (skorelowany ze stabilnym parametrem Fv/Fm) w warunkach stresu suszy, niż odmiana rodzicielska owsa (Warzecha i in., 2023). W przeciwieństwie do kukurydzy o fotosyntezie C4, owies posiadających fotosyntezę C3 (ze znacznym występowaniem fotooddychania) wykazuje dużą podatność na stres suszy, która w obecnych warunkach klimatycznych zmniejsza potencjał produkcyjny roślin o 40%. Wyselekcjonowane mieszańce z komponentem genetycznym kukurydzy o zwiększonej tolerancji na suszę mają zdaniem autorów duży potencjał hodowlany. U roślin strączkowych, takich jak groch i soczewica, deficyt wody skutkowało obniżeniem tempa wzrostu pędów i liści oraz ograniczeniem produktywności (Sung i in. 2023; Yan i in. 2023). Potencjał wody w liściach jest istotnym wskaźnikiem fizjologicznej reakcji roślin na niedobór wody w środowisku. Stres suszy prowadzi do obniżenia potencjału wodnego, co skutkuje spadkiem turgoru komórkowego, ograniczeniem fotosyntezy i wzrostu, a w skrajnych przypadkach – zahamowaniem rozwoju całej rośliny (Oguz i in., 2022). Wyniki moich badań wykazały, że w porównaniu do diploidów, tetraploidy utrzymywały wyższe wartości tego parametru, co sugeruje ich lepsze przystosowanie do warunków

stresowych. Podobne wyniki uzyskano w przypadku *Spathiphyllum wallisii*. U tego gatunku tetraploidy wykazywały wyższy potencjał wody i mniejszy spadek RWC w warunkach suszy w porównaniu do diploidów (van Laere i in., 2011). W badaniu przeprowadzonym przez Da Silva Costa i in. (2025) na cytrusach wykazano, że tetraploidalne podkładowki *Citrus* charakteryzowały się istotnie wyższą wartością RWC w warunkach suszy w porównaniu do swoich diploidalnych odpowiedników. Wskazuje to na wyższą zdolność tetraploidów do ograniczania transpiracji lub bardziej efektywnego gospodarowania wodą. Autorzy podkreślili, że zwiększona wartość RWC u tetraploidów może być wynikiem mniejszego przewodzenia wody i bardziej ograniczonej transpiracji, a także sprawniejszego funkcjonowania aparatów szparkowych. Podobne wyniki uzyskano u jabłoni w badaniu Zhang i in. (2015). Autorzy porównali diploidalne oraz autotetraploidalne formy dwóch odmian jabłoni ('Hanfu' i 'Gala') i obserwowali, że w warunkach stresu wodnego tetraploidy utrzymywały wyższą względną zawartość wody w liściach niż diploidy. Różnica ta była wyraźna już po kilku dniach stresu indukowanego PEG-6000. Potwierdza to, że podniesienie poziomu ploidii może poprawiać fizjologiczną odporność roślin na deficyt wody. Wyniki te są spójne z obserwacjami uzyskanymi w niniejszym badaniu, gdzie tetraploidalne genotypy jabłoni również charakteryzowały się lepszym bilansem wodnym w porównaniu do diploidów.

Susza istotnie wpłynęła na inne parametry fizjologiczne zarówno u diploidów jak i tetraploidów jabłoni. W warunkach deficytu wody w podłożu obserwowano istotny spadek natężenia fotosyntezy (P_n) jak i transpiracji (T_r) przy czym reakcja diploidów była silniej zaznaczona niż w przypadku tetraploidów. Równolegle stres suszy prowadził do wyraźnego obniżenia zawartości chlorofilu (CCI) oraz wydajności reakcji fotochemicznej fotosystemu II (F_v/F_m). U diploidów jabłoni zawartość chlorofilu gwałtownie spadała już po 11 dniach stresu i utrzymywała się na niskim poziomie aż do 23 dnia suszy, natomiast tetraploidy wykazywały istotnie wyższą zawartość chlorofilu w całym okresie niedoboru wody, nawet w najbardziej krytycznej fazie stresu. Podobnie, parametr F_v/F_m , będący wskaźnikiem integralności fotosystemu II, ulegał obniżeniu w czasie stresu, jednak spadek był mniej intensywny u tetraploidów. Może to świadczyć o większej stabilności ich aparatu fotosyntetycznego w warunkach deficytu wody. Po zakończeniu suszy i wznowieniu nawadniania (faza 91 BBCH – zakończenie wzrostu, w połowie września), zarówno diploidy jak i tetraploidy wykazały częściową zdolność do odbudowy parametrów fotosyntezy, zawartości chlorofilu i funkcji fotosystemu II. Zdolność do regeneracji tych procesów była jednak bardziej wyraźna u tetraploidów, co sugeruje ich wyższy potencjał adaptacyjny do warunków stresu wodnego. Uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów. Sun i in. (2022) obserwowali, że tolerancja na suszę u różnych podkładek jabłoni była związana z wyższą zawartością chlorofilu, większą grubością liści i wyższym natężeniem fotosyntezy, co było szczególnie widoczne w przypadku odpornych genotypów. Wang i in. (2018) stwierdzili, że w liściach młodych drzew jabłoni susza prowadzi do ograniczenia fotosyntezy w wyniku zarówno mechanizmów związanych z otwieraniem i zamykaniem aparatów szparkowych jak i innych, obniżając parametry takie jak P_n , G_s (ang. stomatal conductance- przewodnictwo szparkowe), E (ang. transpiration rate-

transpiracja) oraz Fv/Fm, przy jednoczesnym wzroście NPQ (ang. non-photochemical quenching - niefotochemiczne wygaszanie fluorescencji) jako elementu ochrony fotochemicznej. Co istotne, ograniczenie fotosyntezy pojawiało się już przy potencjale wody Ψ_n powyżej $-1,5$ MPa, co potwierdza również wyniki uzyskane w niniejszych badaniach. Stwierdzono również, że autotetraploidy dwóch odmian jabłoni, 'Hanfu' i 'Gala', charakteryzowały się wyższą niż diploidy tolerancją na suszę i zasolenie. W innych badaniach Zhang i in. (2015) oraz Xue i in. (2015) informują, że w trakcie trwania stresu suszy tetraploidy jabłoni wykazywały wyższą zawartość chlorofilu w liściach oraz większą fluorescencję chlorofilu w porównaniu do diploidów. W badaniach nad podkładkami *Citrus* wykazano, że tetraploidalne formy cechowały się bardziej efektywną niż diploidy regulacją transpiracji poprzez szybsze zamykanie aparatów szparkowych w odpowiedzi na stres suszy, co wiązano z intensywniejszą produkcją ABA (da Silva Costa i in. 2025). Tetraploidy te charakteryzowały się niższymi wartościami niż diploidy przewodnictwa szparkowego (Gs), transpiracji (E) i natężenia fotosyntezy netto (P_n) w warunkach deficytu wody, co wskazuje na strategię ograniczania strat wody kosztem intensywności fotosyntezy.

Moje badania wykazały, że w warunkach suszy tetraploidy jabłoni wykazywały silniejszą aktywację mechanizmów obronnych – aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, POD) i zawartości proliny, które rosły szybciej i osiągały wyższe wartości niż u diploidów. Jednocześnie poziom MDA, wskaźnika uszkodzeń oksydacyjnych błon cytoplazmatycznych, był istotnie niższy u tetraploidów, co może świadczyć o ich skuteczniejszej ochronie przed stresem oksydacyjnym. Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych na cytrusach, gdzie tetraploidalne podkładki charakteryzowały się wyższą aktywnością dysmutazy nadadtlenkowej i katalazy, co korelowało z niższym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych oraz zwiększoną tolerancją na deficyt wody (da Silva Costa i in. 2025). Również w przypadku *Ficus carica* stwierdzono, że tetraploidy gromadziły więcej proliny i wykazywały wyższą aktywność enzymów antyoksydacyjnych w porównaniu do diploidów, co przekładało się na większą odporność na suszę {Formatting Citation}. W pracy Wei i in. (2019) wykazano, że naturalne autotetraploidy *Poncirus trifoliata* były bardziej odporne na stres deficytu wody niż formy diploidalne, co było związane z większą zdolnością do usuwania reaktywnych form tlenu, akumulacją cukrów i proliny oraz mniejszym poziomem peroksydacji lipidów. Z kolei Zhang i in. (2015) dowiedli, że autotetraploidy jabłoni charakteryzują się niższą akumulacją MDA w liściach, co potwierdza nasze obserwacje. Podobne mechanizmy obronne aktywowane w odpowiedzi na stres suszy obserwowano również u siewek jabłoni traktowanych nanocząstkami tlenku ceru (CeO_2) (Luo et al., 2022). Autorzy ci wykazali, że działanie tych nanocząstek prowadziło do znacznego zwiększenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, POD, CAT), akumulacji proliny oraz zmniejszenia poziomu MDA w warunkach suszy (Soleymani i in., 2025). Warto podkreślić, że podobne tendencje obserwowano w badaniach porównawczych *Malus prunifolia* (forma tolerancyjna na stres suszy) i *Malus hupehensis* (forma wrażliwa) – odmiany odporne utrzymywały lepszą integralność komórkową (chloroplastów i mitochondrii) oraz silniej aktywowały enzymy takie jak SOD, POD, APX czy GR (Wang i in., 2012). Ich

komórki wykazywały niższą akumulację ROS i MDA, co przekładało się na mniejsze uszkodzenia błon cytoplazmatycznych i utrzymanie sprawności metabolicznej w czasie stresu. Podsumowując, wyniki jednoznacznie wskazują, że tetraploidalne formy jabłoni uruchamiają bardziej efektywne mechanizmy obrony biochemicznej w warunkach deficytu wody. Zwiększona aktywność enzymów antyoksydacyjnych, większa akumulacja proliny oraz niższa zawartość MDA sugerują, że tetraploidy lepiej radzą sobie z utrzymaniem równowagi redoks i ograniczaniem uszkodzeń oksydacyjnych niż ich diploidalne odpowiedniki.

Przeprowadzone w niniejszych badaniach analizy na poziomie molekularnym potwierdziły wyniki wyżej opisanej aktywności enzymów antyoksydacyjnych u tetraploidów i diploidów jabłoni. W odpowiedzi na stres suszy obserwowano wyraźne różnice w ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne między roślinami diploidalnymi, a tetraploidalnymi. W przypadku tetraploidów zauważono wcześniejszą i silniejszą indukcję ekspresji genów *SOD*, *CAT* i *APX* w porównaniu do diploidów, co sugeruje ich bardziej efektywny mechanizm neutralizacji wolnych rodników tlenowych w warunkach deficytu wody. W analizowanym materiale roślinnym aktywność genu *GPX* wykazywała bardziej złożoną dynamikę — u tetraploidów poziom ekspresji wzrósł w początkowym okresie stresu suszy, natomiast u diploidów najwyższy poziom ekspresji obserwowano dopiero w końcowej fazie suszy. Może to sugerować różnice w strategii odpowiedzi między genotypami, gdzie tetraploidy szybciej aktywują szlaki detoksykacyjne, a diploidy odpowiadają wolniej, lecz silniej w późniejszych etapach stresu. Podobne reakcje obserwowano u innych gatunków. U jęczmienia (*Hordeum vulgare*), intensywny stres suszy wywołał wcześniejszą i silniejszą ekspresję genów *SOD*, *CAT* i *GPX* u odmian tolerujących suszę, podczas gdy wrażliwe odmiany reagowały wolniej (Harb i in., 2015). Analogiczne wyniki raportowano u pszenicy (*Triticum aestivum*) – krótkotrwały stres osmotyczny indukował ekspresję genów *SOD*, *APX*, *GPX* oraz regulatorowych genów transdukcji sygnału (*MAPK* i *NAC*) {Formatting Citation}. W przypadku autotetraploidalnych jabłoni, badania (Zhang i in., 2015) wskazują też na związek zwiększonej tolerancji na suszę z wyższym poziomem ekspresji genów akwaporyn (np. *MdPIP1;1*, *MdTIP1;1*). Przekładało się to na wyższą zawartość wody (RWC) i niższy poziom MDA, a wyższy proliny u tetraploidów w porównaniu do roślin diploidalnych. W odpowiedzi roślin na stres suszy istotną rolę odgrywają również czynniki transkrypcyjne oraz receptory hormonów roślinnych. Wykazano na przykład, że nadekspresja genu *MdNAC29* u jabłoni spowodowała obniżenie poziomu tolerancji na suszę poprzez hamowanie ekspresji *MdDREB2A*, genu regulatora odpowiedzi na stres (Li i in., 2023). Z kolei podwyższony poziom ekspresji genu receptora ABA *MdPYL9* u transgenicznej jabłoni (*Malus × domestica* Borkh.) prowadził do aktywacji szlaków związanych z obroną antyoksydacyjną i przyczyniał się do zwiększenia odporności roślin na warunki niedoboru wody (Yang i in., 2022).

Zgromadzone dane, w połączeniu z doniesieniami literaturowymi wskazują, że tetraploidy mogą dysponować bardziej kompleksową i skuteczną siecią mechanizmów odpowiedzi na stres suszy – obejmującą zarówno fizjologiczną oszczędność wody, jak i szybszą aktywację szlaków antyoksydacyjnych oraz adaptacyjną regulację ekspresji genów związanych z homeostazą komórkową i gospodarką wodną. Poliploidalizacja

może zatem stanowić wartościowe narzędzie hodowlane w kierunku poprawy odporności jabłoni na suszę.

Krzyżowania są podstawową metodą stosowaną w klasycznej i nowoczesnej hodowli jabłoni (*Malus × domestica* Borkh.), umożliwiającą uzyskanie genotypów o pożądanym zestawie cech (Pereira-Lorenzo i in., 2018). Dobór odpowiednich kombinacji rodzicielskich ma kluczowe znaczenie dla skuteczności programów hodowlanych. Współczesna hodowla jabłoni koncentruje się nie tylko na cechach jakościowych owoców, ale coraz częściej na cechach adaptacyjnych, w tym zdolności do efektywnego gospodarowania wodą, odporności na patogeny oraz plastyczności genetycznej w zmieniających się warunkach klimatycznych. W tym kontekście rośnie zainteresowanie wykorzystaniem krzyżowań interploidalnych (między genotypami o różnym poziomie ploidalności) jako strategii zwiększającej zakres zmienności genetycznej oraz możliwości łączenia korzystnych cech z różnych źródeł (Howard i in., 2023). Choć krzyżowania między genotypami o różnym poziomie ploidalności mogą napotykać bariery w zakresie zgodności krzyżowej i żywotności gamet, liczne badania wskazują, że ich skuteczność może być znacząca – zwłaszcza przy użyciu diploidów jako roślin matecznych i tetraploidów jako źródła pyłku (Sedysheva i Gorbacheva, 2013). Krzyżowania interploidalne ($2x \times 4x$ lub $4x \times 2x$) prowadzące do uzyskiwania siewek triploidalnych ($3x$), które wykazują szereg korzystnych cech fenotypowych, takich jak większe owoce, lepsza jakość handlowa i wyższa tolerancja na czynniki stresowe (Howard i in., 2023; Podwyszyńska i Marasek, 2021).

Analizy żywotności i zdolności kiełkowania pyłku, przeprowadzone w latach 2021-2024 w ramach prezentowanej pracy wykazały, że diploidy jabłoni cechowały się wyższą i stabilniejszą żywotnością pyłku niż tetraploidy, u których wartości były wyraźnie niższe i bardziej zmienne w poszczególnych latach badań. Zmienność w zdolności kiełkowania pyłku pomiędzy sezonami była najprawdopodobniej związana z warunkami środowiskowymi, takimi jak temperatura, wilgotność powietrza i opady, które mogą wpływać na żywotność i jakość ziarna pyłku (Ramírez i Davenport, 2013; Iovane i in., 2021). Zmniejszona żywotność i kiełkowanie pyłku u tetraploidów może ograniczać ich skuteczność jako dawców gamet męskich, co jest szczególnie istotne w kontekście planowania krzyżowań interploidalnych. Jednak nawet pyłek o obniżonych parametrach żywotności może pełnić funkcję efektywnego zapłodnienia, szczególnie w warunkach sprzyjających zapyleniu i jeśli jest stosowany w odpowiednio dużej ilości (Matsumoto, 2014).

W niniejszych badaniach obserwowano wyraźne różnice w efektywności krzyżowań interploidalnych jabłoni, w zależności od kierunku krzyżowania oraz warunków środowiskowych w poszczególnych latach. Największą skuteczność uzyskano w kombinacjach, w których rośliną mateczną były diploidy ($2x$), a zapyłaczami tetraploidy ($4x$) – średnia efektywność wyniosła 0,1625 siewki na zapyłony kwiat. W niektórych przypadkach, takich jak 'Free Redstar' $2x \times$ 'Gala Must' $4x-2$, uzyskano bardzo wysoką efektywność (0,90), co świadczy o wysokim potencjale wykorzystania określonych genotypów do krzyżowań interploidalnych. Znacznie niższą efektywność stwierdzono dla krzyżowań, w których rośliną mateczną był tetraploid ($4x$), a zapyłaczem diploid ($2x$) – średnio wyniosła ona zaledwie 0,039 siewki na

zapyłony kwiat. Niska skuteczność w tej grupie krzyżowań może wynikać z odrzucania gamet o niższym poziomie ploidalności przez rośliny mateczne lub z zaburzeń w rozwoju zarodka triploidalnego. Co istotne, w niektórych kombinacjach, np. 'Pinova' $4x \times$ 'Gold Milenium' $2x$, mimo wszystko uzyskano siewki z efektywnością 0,20, co pokazuje, że również ten kierunek krzyżowań może być wykorzystany, choć z mniejszym powodzeniem. Ponadto, rok 2023 okazał się szczególnie niekorzystny dla wszystkich typów krzyżowań interploidalnych. Brak owoców i siewek w tym sezonie był prawdopodobnie związany z chłodną wiosną (średnia temperatura w kwietniu około 10°C) i zwiększonymi opadami w kwietniu i maju, co utrudniło przebieg zapylenia, zapłodnienia i rozwój owoców. Warunki te mogły również wpływać na fizjologiczną receptywność słupków oraz żywotność pyłku, co łącznie skutkowało niską skutecznością krzyżowań.

Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach potwierdzają wysoką efektywność krzyżowań między diploidalnymi formami jako roślinami matecznymi, a tetraploidami formami ojcowskimi ($2x \times 4x$) jako metody uzyskiwania triploidalnych siewek jabłoni. Skuteczność tych krzyżowań została również wykazana w badaniach przeprowadzonych przez Sedov i in. (2018), gdzie na drodze krzyżowań $2x \times 4x$ uzyskano ponad 9000 siewek, z których aż 69,5% stanowiły triploidy, przy zaledwie 30,3% diploidów i marginalnym udziale tetraploidów oraz aneuploidów. W badaniach prowadzonych na przestrzeni 40 lat w All-Russian Institute of Fruit Crop Breeding, z 634 tys. zapyłonych kwiatów uzyskano 118 tys. siewek (z efektywnością krzyżowań wynoszącą 0,186 siewki na zapyłony kwiat), z których po roku przeżyło 42,2 tys. (efektywność finalna wynosił 0,067 siewki na zapyłony kwiat) (Sedov 2014). Doniesienia tego autora wskazują, że efektywność krzyżowań jabłoni z udziałem poliploidów jest porównywalna z uzyskaną w moich badaniach. Sedov (2014) informuje również, że w wyniku krzyżowań, w których genotypem matecznym był tetraploid, udział uzyskanych siewek triploidalnych w potomstwie wynosił 55,1% i był niższy niż w krzyżowaniach, w których tetraploid był genotypem ojcowskim, triploidalnych siewek uzyskano więcej - 69,5%. Wyniki tego autora są więc zbieżne z moimi. Jak informuje Sedov i in. (2020), w programie hodowlanym, trwającym kilkadziesiąt lat, wyhodowano 54 odmiany jabłoni, w tym serię odmian triploidalnych o wysokiej wartości rynkowej owoców, regularnym owocowaniu i częściowej samopłodności. Odmiany te zdaniem autorów, odpowiadają rosnącym wymaganiom rynkowym oraz trendom intensyfikacji sadownictwa. Szczególną uwagę zwraca się tam na triploidy odporne na parcha oraz o kolumnowym pokroju wzrostu, co pozwala na uprawę w systemach supergęstych i osiągnięcie szybkiego plonu. (Sedov i in., 2020).

Wszystkie siewki uzyskane w moich badaniach w krzyżowaniach pomiędzy genotypami diploidalnymi, a tetraploidalnymi zostały poddane analizie zawartości jądrowego DNA (2C) oraz poziomu ploidalności przy użyciu cytometrii przepływowej. Zawartość DNA mieściła się w zakresie 2,19–2,59 pg, co odpowiada wartościom pośrednim pomiędzy diploidem (1,59–1,63 pg), a tetraploidem (3,05–3,30 pg) i potwierdza triploidalność i zarazem mieszańcowość analizowanych siewek. Należy zaznaczyć, że wielkości genomu ocenione w niniejszych badaniach dla diploidów, triploidów i tetraploidów są podobne do uzyskanych wcześniej przez innych badaczy

(Dickson i in., 1992; Korban i in., 2009; Podwyszyńska i in., 2016; Hofer i Meister, 2020), a drobne różnice, mieszczące się granicach błędu, wynikają z zastosowani innych standardów wewnętrznych oraz innych warunków prowadzonych analiz – innych buforów, czasów inkubacji i innych typów cytometrów (Podwyszyńska i Marasek, 2021). Ostatnim elementem potwierdzającym status ploidii jest cytologiczna analiza liczby chromosomów. W niniejszych badaniach wszystkie analizowane siewki pochodzące z krzyżowań interploidalnych wykazywały liczbę 51 chromosomów w jądrach metafazowych, co jednoznacznie wskazuje na ich triploidalność ($3n = 51$). Podobne wyniki uzyskali Borodkina i in. (2023) w badaniach, w których oceniano poziom ploidalności siewek pochodzących z krzyżowań typu $2x \times 4x$. Autorzy ustalili, że średnio 94% badanego potomstwa miało status triploidalny, potwierdzony cytologiczną analizą liczby chromosomów — każda z tych roślin zawierała 51 chromosomów.

Przeprowadzone badania oraz szeroka analiza literatury potwierdzają, że krzyżowania interploidalne ($2x \times 4x$ oraz $4x \times 2x$) stanowią skuteczną strategię w nowoczesnej hodowli jabłoni. Ich główną zaletą jest możliwość generowania siewek triploidalnych, które często łączą korzystne cechy obu rodziców — zarówno pod względem jakości owoców, jak i odporności na stresy środowiskowe oraz choroby. Choć żywotność i zdolność kiełkowania pyłku tetraploidów jest zazwyczaj niższa niż u diploidów, odpowiedni dobór genotypów oraz sprzyjające warunki pogodowe, a także nakładanie na słupek dużej ilości pyłku mogą znacznie zwiększyć skuteczność zapylania. Wyniki niniejszego badania potwierdziły, że najwyższą efektywność osiągnięto w krzyżowaniach z diploidem jako rośliną mateczną, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami innych badaczy (Sedov i in. 2014; Sedov i in. 2018). Wszystkie uzyskane siewki zostały potwierdzone jako triploidalne zarówno na podstawie zawartości jądrowego DNA (2,31–2,59 pg), jak i analizy liczby chromosomów ($3n = 51$). Pomimo ograniczeń związanych z barierami krzyżowalności i zmiennością pogodową, krzyżowania interploidalne umożliwiają uzyskanie licznych, żywotnych siewek triploidalnych, które mogą stanowić wartościowy materiał wyjściowy do dalszej hodowli. Potwierdza to ich znaczenie jako narzędzia zwiększającego zmienność genetyczną oraz potencjał uzyskiwania odmian nowej generacji, dostosowanych do wymagań współczesnego sadownictwa i zmieniającego się klimatu.

6. Wnioski

1. Autotetraploidy jabłoni znacząco różnią się od swoich diploidalnych odpowiedników pod względem cech fenotypowych. W przypadku większości badanych parametrów, autotetraploidy jabłoni wykazują cechy typowe dla genotypów poliploidalnych (zmieniony kształt liści, większe ziarna pyłku, kwiaty, owoce i nasiona, zwiększona zawartość chlorofilu, większe aparaty szparkowe o mniejszej gęstości).
2. Poliploidyzacja wpływa na rozwój generatywny jabłoni, skutkując wydłużeniem okresu juwenilnego, zmiana terminu zakwitania oraz zmniejszeniem intensywności kwitnienia u tetraploidów.
3. Poliploidyzacja wpływa istotnie na proces dojrzewania owoców oraz ich cechy jakościowe, powodując zwiększenie zawartości ekstraktu ogólnego oraz kwasów organicznych.
4. Autotetraploidy jabłoni wykazują wyższą tolerancję na suszę w porównaniu do diploidów. Wskazują na to obserwowane u tetraploidów lepsze niż u diploidów parametry fizjologiczne i biochemiczne oraz wskaźniki wzrostu u roślin poddanych stresowi wodnemu.
5. Mechanizmem odpowiedzialnym za zwiększoną tolerancję tetraploidów jabłoni na stres wywołany suszą jest wydajniejsza niż u diploidów aktywacja mechanizmów antyoksydacyjnych. Potwierdzeniem tego jest wyższa aktywność enzymów antyoksydacyjnych i wcześniej indukowana i wyższa ekspresja genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (SOD, CAT, APX, GPX) oraz obserwowany u tetraploidów wyższy poziom proliny oraz niższa zawartość dialdehydu malonowego (MDA), wskazująca na mniejsze uszkodzenia oksydacyjne błon komórkowych.
6. Autotetraploidy jabłoni są płodne pomimo zredukowanej, w porównaniu do diploidów, żywotności ziaren pyłku i poziomu jego kiełkowania.
7. Krzyżowania interploidalne z udziałem autotetraploidów jabłoni umożliwiają skuteczne otrzymywanie siewek triploidalnych. Jednak efektywność takich krzyżowań zależy od kierunku krzyżowania, jest ona wyższa w przypadku, gdy roślinami matecznymi są diploidy a roślinami ojcowskimi (dawcami pyłku) tetraploidy
8. Niemal wszystkie siewki uzyskane z krzyżowań interploidalnych są mieszańcami na co wskazuje ich triploidalność ($3x$), potwierdzona na podstawie analiz cytometrycznych, a także obserwacji mikroskopowych liczby chromosomów ($2n = 3x = 51$).
9. Autotetraploidy jabłoni mogą stanowić cenne źródło cech użytkowych, zwłaszcza pod względem jakości owoców i odporności na suszę.

7. Spis literary

- Abdolinejad, R., Shekafandeh, A. (2022). Tetraploidy confers superior *in vitro* water-stress tolerance to the fig tree (*figus carica*) by reinforcing hormonal, physiological, and biochemical defensive systems. *Frontiers in Plant Science*, 12, 796215.
- Abdul Aziz, M., Masmoudi, K. (2025). Molecular breakthroughs in modern plant breeding techniques. *Horticultural Plant Journal*, 11(1), 15–41.
- Abdullah, M., Sliwinska, E., Góralski, G., Latocha, P., Tuleja, M., Widyna, P., Popielarska-Konieczna, M. (2021). Effect of medium composition, genotype and age of explant on the regeneration of hexaploid plants from endosperm culture of tetraploid kiwiberry (*Actinidia arguta*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 147(3), 569-582.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126.
- Ahmadizadeh, M., Heidari, P. (2025). Roles of polyploidy in the metabolic and genetic improvement of medicinal plants. *Biotechnology, Multiple Omics, and Precision Breeding in Medicinal Plants*, 465–474.
- Ahmed, S., Kouser, S., Asgher, M., Gandhi, S. G. (2021). Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1089–1105.
- Akhtar, M., Jaiswal, A., Taj, G., Jaiswal, J. P., Qureshi, M. I., Singh, N. K. (2012). DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *Journal of genetics*, 91(3), 385–395.
- Alché, J. de D. (2019). A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox biology*, 23.
- Alexander, M. P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology*, 44(3), 117–122.
- Ali, S., Mir, R. A., Haque, M. A., Danishuddin, Almalki, M. A., Alfredan, M., Khalifa, A., Mahmoudi, H., Shahid, M., Tyagi, A., Mir, Z. A. (2025). Exploring physiological and molecular dynamics of drought stress responses in plants: challenges and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1565635.
- Amudha, J., Balasubramani, G. (2011) Recent molecular advances to combat abiotic stress analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress, *Plant and Soil* 333, 491-505.
- Andersen, E. J., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., Nepal, M. P. (2018). Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes*, 9(7).
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C., Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026–2032.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Reynolds, M. P., Royo, C. (2002). Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for? *Annals of Botany*, 89(SPEC. ISS.), 925–940.
- Ashraf, M., Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving

- plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206–216.
- Bai, T., Li, Z., Song, C., Song, S., Jiao, J., Liu, Y., Dong, Z., Zheng, X., Li, H., Song, Z. Y., Song, C. H., Liu, J., Dong, Y. C., Zheng, Z. D., Bai, T. H. (2019). Contrasting drought tolerance in two apple cultivars associated with difference in leaf morphology and anatomy. *American Journal of Plant Sciences*, 10(05), 709–722.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207.
- Berbeć, A., Doroszewska, T. (2020). The use of *nicotiana* species in tobacco improvement. eds: N.V. Ivanov, N. Sierro, M.C. Peitsch; *Springer*.
- Bharati, R., Fernández-Cusimamani, E., Gupta, A., Novy, P., Moses, O., Severová, L., Svoboda, R., Šrédl, K. (2023a). Oryzalin induces polyploids with superior morphology and increased levels of essential oil production in *Mentha spicata* L. *Industrial Crops and Products*, 198, 116683.
- Bharati, R., Gupta, A., Novy, P., Severová, L., Šrédl, K., Žiarovská, J., Fernández-Cusimamani, E. (2023b). Synthetic polyploid induction influences morphological, physiological, and photosynthetic characteristics in *Melissa officinalis* L. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1332428.
- Bhowmik, P., Bilichak, A. (2021). Advances in gene editing of haploid tissues in crops. *Genes*, 12(9).
- Birchler, J. A. (2014). Interploidy hybridization barrier of endosperm as a dosage interaction. *Frontiers in Plant Science*, 5(JUN), 80041.
- Boini, A., Manfrini, L., Bortolotti, G., Corelli-Grappadelli, L., Morandi, B. (2019). Monitoring fruit daily growth indicates the onset of mild drought stress in apple. *Scientia Horticulturae*, 256, 108520.
- Borodkina, A. G., Gennadevna, A., Lavrusevich, N. G., Gennadewna, H., Zubkova, M. A., Alexandrovna, M. (2023). Cytological screening of apple hybrid seedlings from heterochromosomal crosses. *Contemporary horticulture*, 0(3), 47–52.
- Borrill, P., Harrington, S. A., Uauy, C. (2019). Applying the latest advances in genomics and phenomics for trait discovery in polyploid wheat. *Plant Journal*, 97(1), 56–72.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Brown, S. K., Maloney, K. E. (2009). Genetic improvement of apple: breeding, markers, mapping and biotechnology. *Apples: Botany, Production And Uses*, 31–59.
- Brownfield, L., Köhler, C. (2011). Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1659–1668.
- Bryk H., Głos H., Hołdaj, M., Lisek, J., Łabanowska, B., Tartanus, M., Warabieda, W. 2018. Program ochrony jabłoni. Instytut Ogrodnictwa - PIB, Skierniewice: 3-4
- Bryk, H., Kruczyńska, D. E., Rutkowski, K. P. (2013). Jakość i zdolność przechowalnicza jabłek kilku odmian z sadu ekologicznego. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 58(3), 59–65.

- Bus, V. G. M., Laurens, F. N. D., Van De Weg, W. E., Rusholme, R. L., Rikkerink, E. H. A., Gardiner, S. E., Bassett, H. C. M., Kodde, L. P., Plummer, K. M. (2005). The Vh8 locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the Vh2 locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytologist*, 166(3), 1035–1049.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology: FPB*, 30(3), 239–264.
- Chen, H., Fang, Y., Zwaenepoel, A., Huang, S., Van de Peer, Y., Li, Z. (2023). Revisiting ancient polyploidy in leptosporangiate ferns. *New Phytologist*, 237(4), 1405–1417.
- Chen, Z. J. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 377–406.
- Chester, M., Gallagher, J. P., Symonds, V. V., Da Silva, A. V. C., Mavrodiev, E. V., Leitch, A. R., Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2012). Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (*Asteraceae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1176–1181.
- Cho, W. Y., Deepo, D. M., Islam, M. M., Nam, S. C., Kim, H. Y., Han, J. S., Kim, C. K., Chung, M. Y., Lim, K. B. (2021). Induction of polyploidy in *cucumis melo* ‘chammel’ and evaluation of morphological and cytogenetic changes. *Horticultural Science and Technology 2021 39:5*, 39(5), 625–636.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 836–846.
- Corso, D., Delzon, S., Lamarque, L. J., Cochard, H., Torres-Ruiz, J. M., King, A., Brodribb, T. (2020). Neither xylem collapse, cavitation, or changing leaf conductance drive stomatal closure in wheat. *Plant Cell and Environment*, 43(4), 854–865.
- D’Iaz-Vivancos, P., Faize, L., Nicolás, E., Clemente-Moreno, M. J., Bru-Martinez, R., Burgos, L., Hernández, J. A. (2016). Transformation of plum plants with a cytosolic ascorbate peroxidase transgene leads to enhanced water stress tolerance. *Annals of Botany*, 117(7), 1121.
- da Silva Costa, L., Coelho Filho, M. A., Araújo da Silva, M. A., Moreira, A. S., dos Santos Soares Filho, W., Freschi, L., da Silva Gesteira, A. (2025). Revisiting citrus rootstocks polyploidy as a means to improve drought resilience: sometimes less is more. *Plant, Cell & Environment*, 48(1), 149–163.
- Dąbrowska G, M. P. (2008). Przeszukiwanie bazy danych EST w celu zidentyfikowania pełnej sekwencji cDNA genu kodującego akwaporynę *Pharbitis nil* Choisy (PnPIP1) - Prolib Integro. *Biotechnologia*, 2, 190–198.
- Daccord, N., Celton, J. M., Linsmith, G., Becker, C., Choisne, N., Schijlen, E., Van De Geest, H., Bianco, L., Micheletti, D., Velasco, R., Di Pierro, E. A., Gouzy, J., Rees, D. J. G., Guérif, P., Muranty, H., Durel, C. E., Laurens, F., Lespinasse, Y., Gaillard, S., Bucher, E. (2017). High-quality de novo assembly of the apple

- genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics*, 49(7), 1099–1106.
- Danelia, G. V., Emelyanov, V. V., Shishova, M. F. (2024). The role of water-transporting aquaporins of the PIP and TIP subfamilies in plant development and adaptation to stress factors. *Ecological Genetics*, 22(4), 343–368.
- De, L. (2017). Improvement of ornamental plants - A Review. *International Journal of Horticulture*, 7(0).
- De Leonardis, A. M., Petrarulo, M., De Vita, P. (2012). Genetic and molecular aspects of plant response to drought in annual crop species. *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*.
- Del Pozo, J. C., Ramirez-Parra, E. (2014). Deciphering the molecular bases for drought tolerance in *Arabidopsis* autotetraploids. *Plant, Cell and Environment*, 37(12), 2722–2737.
- Dempewolf, H., Baute, G., Anderson, J., Kilian, B., Smith, C., Guarino, L. (2017). Past and Future Use of Wild Relatives in Crop Breeding. *Crop Science*, 57(3), 1070–1082.
- Deng, H., Xie, P., Han, Y., Song, X., Ge, Y. (2025). Starch-sugar metabolism in response to wound stress in apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 227, 110142.
- Dewitte, A., Laere, K. Van, Huylenbroeck, J. Van, Dewitte, A., Laere, K. Van, Huylenbroeck, J. Van. (2012). Use of 2n gametes in plant breeding. *Plant Breeding*.
- Dhamayanthi, K., Gotmare, V. (2010). Induction of polyploidy in two diploid wild cotton (*G. armourianum* and *G. aridum*) species by colchicine treatment. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(4), 966.
- Dhooghe, E., van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 359–373.
- Dinneny, J. R. (2019). Developmental responses to water and salinity in root systems. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 35:239-257
- Dixit, V., Chaudhary, B. R. (2014). Colchicine-induced tetraploidy in garlic (*Allium sativum* L.) and its effect on allicin concentration. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(5), 585–591.
- Dombrecht, B., Gang, P. X., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., Fitt, G. P., Sewelam, N., Schenk, P. M., Manners, J. M., Kazana, K. (2007). Myc2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(7), 2225–2245.
- Doyle, J., Coate J. (2019). Polyploidy, the nucleotype, and novelty: the impact of genome doubling on the biology of the cell. *International Journal Of Plant Sciences*, 180(1), 1–52.
- Dudziak, K., Zapalska, M., Börner, A., Szczerba, H., Kowalczyk, K., Nowak, M. (2019). Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.

- Dumanoğlu, H., Şahin, Ö., Sarıkamış, G. (2025). Drought stress response of pears and quince as pear rootstocks induced by D-mannitol assessed with proliferation and growth, antioxidant enzymes and mineral elements of *in vitro* microshoots. *South African Journal of Botany*, 178, 382–389.
- Dyki B., Habdas, H. 1996. Metoda izolowania epidermy liści pomidora i ogórka dla mikroskopowej oceny rozwoju grzybów patogenicznych. The method of isolation of epidermis of tomato and cucumber leaves for microscopic investigation of pathogenic fungus development. *Acta Agrobotanica* 49: 123–129.
- Efeoğlu, B., Ekmekçi, Y., Çiçek, N. (2009). Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African Journal of Botany*, 75(1), 34–42.
- Erpen, L., Devi, H. S., Grosser, J. W., Dutt, M. (2017). Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2017 132:1*, 132(1), 1–25.
- Eshed, Y., Lippman, Z. B. (2019). Revolutions in agriculture chart a course for targeted breeding of old and new crops. *Science*, 366(6466).
- Espinosa-Vellarino, F. L., Garrido, I., Casimiro, I., Silva, A. C., Espinosa, F., Ortega, A. (2024). Enzymes involved in antioxidant and detoxification processes present changes in the expression levels of their coding genes under the stress caused by the presence of antimony in tomato. *Plants*, 13(5), 609.
- Fan, X., Hu, X., Ma, Y., Pang, Y., Sun, J., Hou, P., Nicholas Johnson, G., Jacquelyn Burgess, A. (2024). Influence of high temperature and drought stress at jointing stage on crop physiological responses and growth in summer maize plants (*Zea mays* L.). *Frontiers in Plant Physiology*, 2, 1331421.
- Fang, X., Zhang, J., Fan, C., Liu, B., Kong, F., Li, H. (2025). Molecular regulatory network of soybean responses to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K. H. M. (2012). Drought stress in plants: An overview. *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*, 9783642326530, 1–33.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29:1, 29(1), 185–212.
- Feldman, M., Levy, A. A. (2005). Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1–3), 250–258.
- Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28(11), 1091–1101.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P., Maurel, C. (2002). The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 30(1), 71–81.
- Gessler, C., Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S., Gianfranceschi, L. (2006). *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(6), 473–503.

- Giovannoni, J. (2010). Harvesting the apple genome. *Nature Genetics* 2010 42:10, 42(10), 822–823.
- Goldschmidt, E. E., Samach, A. (2004). Aspects of flowering in fruit trees. *Acta Horticulturae*, 653, 23–27.
- Gomes, S. S. L., Saldanha, C. W., Neves, C. S., Trevizani, M., Raposo, N. R. B., Notini, M. M., de Oliveira Santos, M., Campos, J. M. S., Otoni, W. C., Viccini, L. F. (2014). Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 45–56.
- González-Rodríguez, A. M., Grajal-Martín, M. J. (2013). Physiological behaviour of mangos with different ploidy levels. *Acta Horticulturae*, 992, 155–158.
- Grant, V. Speciation plant ; Columbia University Press: Nowy Jork, NY, USA, 1981
- Griffin, A. R., Chi, N. Q., Harbard, J. L., Son, D. H., Harwood, C. E., Price, A., Vuong, T. D., Koutoulis, A., Thinh, H. H. (2015). Breeding polyploid varieties of tropical acacias: progress and prospects. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 77(1), 41–50.
- Gudys, K., Guzy-Wrobelska, J., Janiak, A., Dziurka, M. A., Ostrowska, A., Hura, K., Jurczyk, B., Żmuda, K., Grzybkowska, D., Śróbka, J., Urban, W., Biesaga-Koscielniak, J., Filek, M., Koscielniak, J., Mikołajczak, K., Ogrodowicz, P., Krystkowiak, K., Kuczyńska, A., Krajewski, P., Szarejko, I. (2018). Prioritization of candidate genes in qtl regions for physiological and biochemical traits underlying drought response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 326641
- Gupta, A., Rico-Medina, A., Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266–269.
- Gyani, P. C., Mahato, R., Yadav, P., Patidar, O. P., Kushwaha, N., Prajapat, R. K., Roy, A., Gayan, P., Maity, A., Pakhira, R. (2025). Applications of artificial polyploid induction for genetic improvement of plants. *Asian Journal of Current Research*, 10(1), 114–130.
- Haghpanah, M., Hashemipetroudi, S., Arzani, A., Araniti, F. (2024). Drought Tolerance in Plants: Physiological and Molecular Responses. *Plants* 2024, Vol. 13, Page 2962, 13(21), 2962.
- Han, K., Zhao, Y., Sun, Y., Li, Y. (2023). NACs, generalist in plant life. *Plant Biotechnology Journal*, 21(12), 2433–2457.
- Hannweg, K., Visser, G., de Jager, K., Bertling, I. (2016). *In vitro*-induced polyploidy and its effect on horticultural characteristics, essential oil composition and bioactivity of *Tetradenia riparia*. *South African Journal of Botany*, 106, 186–191.
- Harb, A., Awad, D., Samarah, N. (2015). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* l.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 109–116.
- Hassan, M. J., Najeeb, A., Zhou, M., Raza, M. A., Ali, U., Cheng, B., Ling, Y., Li, Z. (2024). Diethyl aminoethyl hexanoate reprogrammed accumulations of organic metabolites associated with water balance and metabolic homeostasis in white clover under drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1430752.

- He, P., Li, L., Cheng, L., Wang, H., Chang, Y. (2018). Variation in ploidy level and morphological traits in the progeny of the triploid apple variety Jonagold. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54(3), 135–142.
- Heath, R. L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189–198.
- Hegarty, M., Coate, J., Sherman-Broyles, S., Abbott, R., Hiscock, S., Doyle, J. (2013). Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants. *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2–4), 204–225.
- Hias, N., Leus, L., Davey, M. W., Vanderzande, S., Van Huylenbroeck, J., Keulemans, J. (2017). Effect of polyploidization on morphology in two apple (*Malus × domestica*) genotypes. *Horticultural Science*, 44(2).
- Höfer, M., Meister, A. (2010). Genome size variation in *malus* species . *Journal of Botany*, 2010, 1–8.
- Howard, N. P., Micheletti, D., Luby, J. J., Durel, C. E., Denancé, C., Muranty, H., Ordidge, M., Albach, D. C. (2023). Pedigree reconstruction for triploid apple cultivars using single nucleotide polymorphism array data. *Plants People Planet*, 5(1), 98–111.
- Hu, Yan, Chen, J., Fang, L., Zhang, Z., Ma, W., Niu, Y., Ju, L., Deng, J., Zhao, T., Lian, J., Baruch, K., Fang, D., Liu, X., Ruan, Y. ling, Rahman, M. ur, Han, J., Wang, K., Wang, Q., Wu, H., Zhang, T. (2019). *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. *Nature Genetics*, 51(4), 739–748.
- Hu, Yulin, Sun, D., Hu, H., Zuo, X., Xia, T., Xie, J. (2021). A comparative study on morphological and fruit quality traits of diploid and polyploid carambola (*Averrhoa carambola* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 277, 109843.
- Huang, G., Zhu, Y. X. (2019). Plant polyploidy and evolution. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(1), 4–6.
- Hulugalle, N. R., Broughton, K. J., Tan, D. K. Y. (2015). Fine root production and mortality in irrigated cotton, maize and sorghum sown in vertisols of northern New South Wales, Australia. *Soil and Tillage Research*, 146(PB), 313–322.
- Hummer, K. E., Hancock, J., Hummer, K. E. (2009). Strawberry genomics: botanical history, cultivation, traditional breeding, and new technologies. *Genetics and Genomics of Rosaceae*, 6, 413–435.
- Hura, T., Hura, K., Ostrowska, A. (2022). Drought-stress induced physiological and molecular changes in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 4698, 23(9), 4698.
- Iovane, M., Cirillo, A., Izzo, L. G., Di Vaio, C., Aronne, G. (2021). High Temperature and Humidity Affect Pollen Viability and Longevity in *Olea europaea* L. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 1, 12(1), 1.
- Jackson, S., Chen, Z. J. (2010). Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 153–159.
- Jacobson, S., Bondarchuk, N., Nguyen, T. A., Canada, A., McCord, L., Artlip, T. S., Welser, P., Klocko, A. L. (2023). Apple CRISPR-Cas9—a recipe for successful

- targeting of agamous-like genes in domestic apple. *Plants*, 12(21), 3693.
- Jafari, M., Paul, N., Hesami, M., Jones, A. M. P. (2025). Machine learning-aided optimization of *in vitro* tetraploid induction in *cannabis*. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 1746, 26(4), 1746.
- Janiak, A., Kwaśniewski, M., Szarejko, I. (2016). Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of Experimental Botany*, 67(4), 1003–1014.
- Jia, S. (2009) *In vitro* induction and identification of tetraploid in *Malus zumi* and its evaluation of stresstolerance. Master's Thesis, Agricultural University of Hebei, China
- Jiao, Y., Wickett, N. J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A. S., Landherr, L., Ralph, P. E., Tomsho, L. P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P. S., Soltis, D. E., Clifton, S. W., Schlarbaum, S. E., Schuster, S. C., Ma, H., Leebens-Mack, J., Depamphilis, C. W. (2011). Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 2011 473:7345, 473(7345), 97–100.
- Kaur, R., Rishi, V. (2025). Transcription factors and genome biases in polyploid crops. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 143, 301–321.
- Kavar, T., Maras, M., Kidrič, M., Šuštar-Vozlič, J., Meglič, V. (2008). Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding*, 21(2), 159–172.
- Keller-Przybyłkiewicz, S., Korbin, M. U. (2013). The history of mapping the apple genome. *Folia Horticulturae*, 25(2), 161–168.
- Khajuria, Y. P., Kaul, S., Wani, A. A., Dhar, M. K. (2018). Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics and Genomes*, 14(2), 1–20.
- Khan, A., Pan, X., Najeeb, U., Tan, D. K. Y., Fahad, S., Zahoor, R., Luo, H. (2018). Coping with drought: stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. *Biological Research* 51:1, 51(1), 1–17.
- Khan, Z., Jan, R., Asif, S., Farooq, M., Jang, Y. H., Kim, E. G., Kim, N., Kim, K. M. (2024). Exogenous melatonin induces salt and drought stress tolerance in rice by promoting plant growth and defense system. *Scientific Reports*, 14(1), 1–14.
- Kim, J. S., Kidokoro, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2024). Regulatory networks in plant responses to drought and cold stress. *Plant Physiology*, 195(1), 170–189.
- Kishor, P., Sangam, S., Naidu, K., Rao, K., Rao, S., Reddl, J., Theriappan, P., Sreenivasulus, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Biology, Environmental Science*, Vol. 88, No. 3: 424-438.
- Kobayashi, N., Yamashita, S., Ohta, K., Hosoki, T. (2008). Morphological characteristics and their inheritance in colchicine-induced *Salvia* polyploids. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(2), 186–191.
- Koide, Y., Kuniyoshi, D., Kishima, Y. (2020). Fertile tetraploids: new resources for future rice breeding? *Frontiers in Plant Science*, 11, 554469.
- Kong, J., Wang, J., Nie, L., Tembrock, L. R., Zou, C., Kan, S., Ma, X., Wendel, J. F.,

- Wu, Z. (2025). Evolutionary dynamics of mitochondrial genomes and intracellular transfers among diploid and allopolyploid cotton species. *BMC biology*, 23(1), 9.
- Kong, W., Liu, F., Zhang, C., Zhang, J., Feng, H. (2016). Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–8.
- Konieczna, W., Mierek-Adamska, A., Warchoń, M., Skrzypek, E., Dąbrowska, G. B. (2023). The involvement of metallothioneins and stress markers in response to osmotic stress in *Avena sativa* L. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 209(3), 371–389.
- Kopcewicz, J., Lewak, S. (2019). *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Koprivý, L., Fráková, V., Kolarčík, V., Mártonfióvá, L., Dudáš, M., Mártonfi, P. (2022). Genome size and endoreplication in two pairs of cytogenetically contrasting species of *Pulmonaria* (*Boraginaceae*) in Central Europe. *AoB plants*, 14(5), 1–16.
- Korban, S. S., Wannarat, W., Rayburn, C. M., Tatum, T. C., Rayburn, A. L. (2009). Genome size and nucleotypic variation in *Malus germplasm*. *Genome*, 52(2).
- Koua, A. P., Oyiga, B. C., Baig, M. M., Léon, J., Ballvora, A. (2021). Breeding driven enrichment of genetic variation for key yield components and grain starch content under drought stress in winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 12, 684205.
- Kouassi, A. B., Durel, C. E., Costa, F., Tartarini, S., van de Weg, E., Evans, K., Fernandez-Fernandez, F., Govan, C., Boudichevskaja, A., Dunemann, F., Antofie, A., Lateur, M., Stankiewicz-Kosyl, M., Soska, A., Tomala, K., Lewandowski, M., Rutkovski, K., Zurawicz, E., Guerra, W., Laurens, F. (2009). Estimation of genetic parameters and prediction of breeding values for apple fruit-quality traits using pedigreed plant material in Europe. *Tree Genetics and Genomes*, 5(4), 659–672.
- Koziara-Ciupa, M., Trojak-Goluch, A. (2025). The effect of polyploidisation on the physiological parameters, biochemical profile, and tolerance to abiotic and biotic stresses of plants. *Agronomy* 2025, Vol. 15, Page 1918, 15(8), 1918.
- Kubiś, J., Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M. (2013). Polyamines induce adaptive responses in water deficit stressed cucumber roots. *Journal of Plant Research*, 127(1), 151.
- Kucharska, D., Orlikowska, T., Maciorowski, R. (2018). Zmiany poziomu proliny w liściach maliny czerwonej (*Rubus idaeus* L.) w warunkach stymulowanego stresu suszy. *Zeszyty Naukowe Instytutu Ogrodnictwa*, 26, 17–32.
- Kumar, A., Mushtaq, M., Kumar, P., Sharma, D. P., Gahlaut, V. (2024). Insights into flowering mechanisms in apple (*Malus × domestica* Borkh.) amidst climate change: An exploration of genetic and epigenetic factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1868(5), 130593.
- Kumar, P., Alok, A., Kaur, K., Gawłowska, M., Tiwari, S., Singh, H., Swiecicki, W. K., Awasthi, P. (2025). Genome-wide identification of wrky transcription factors in pea (*Pisum sativum* l.) and their response to sulfur and water stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 43(2), 674–687.
- Kumar, S., Sachdeva, S., Bhat, K. V., Vats, S. (2018). Plant responses to drought stress:

- Physiological, biochemical and molecular basis. *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, 1–25.
- Kumar, S., Chagné, D., Bink, M. C. A. M., Volz, R. K., Whitworth, C., Carlisle, C. (2012). Genomic selection for fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plos One*, 7(5),
- Kun-Hua, W., Jian-Hua, M., He-Ping, H., Shan-Lin, G. (2011). Generation of autotetraploid plant of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its quality evaluation. *Pharmacognosy Magazine*, 7(27), 200–206.
- Kurowska, M., Janiak, A., Sitko, K., Potocka, I., Gajecka, M., Sybilska, E., Płociniczak, T., Lip, S., Rynkiewicz, M., Wiecha, K., Nawrot, M., Daszkowska-Golec, A., Szarejko, I. (2025). Functional analysis of HvSNAC1 in stomatal dynamics and drought adaptation. *Journal of Applied Genetics*, 1–24.
- Kurtz, L., Brand, M., HortScience, Lubell-Brand J.,D. (2020). Production of tetraploid and triploid hemp. *HortScience*, 55(10), 1703–1707.
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, 311598.
- Leitch, I. J., Dodsworth, S. (2017). Endopolyploidy in Plants. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–10.
- Levin, D. (2002). *The role of chromosomal change in plant evolution*. New York, NY, USA: OUP).
- Levin, D. A. (1983). *Polyploidy And Novelty In Flowering Plants*. *American Naturalist*, 122(1), 1–25.
- Lewak, S., Kopcewicz, J., Jaworski, K. (2019). *Fizjologia Roślin. Wprowadzenie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Lewandowski, M., Keller-Przybyłkiewicz, S., Korbin, M., Żurawicz, E. (2019). Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juvenilnego i poprawy jakości owoców. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (286), 419-424.
- Lewandowski, M., Żurawicz, E. (2000). Shortening the juvenile period in apple seedlings by grafting on P22 dwarfing rootstock. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research (Poland)*, 8(1).
- Li, G., Santoni, V., Maurel, C. (2014). Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(5), 1574–1582.
- Li, S., Jing, X., Tan, Q., Wen, B., Fu, X., Li, D., Chen, X., Xiao, W., Li, L. (2023). The NAC transcription factor MdNAC29 negatively regulates drought tolerance in apple. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1173107.
- Li, Y., Zhang, L., Wang, X., Zhang, W., Hao, L., Chu, X., Guo, X. (2013). Cotton GhMPK6a negatively regulates osmotic tolerance and bacterial infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*, and plays a pivotal role in development. *The FEBS Journal*, 280(20), 5128–5144.
- Li, Zewei, Huang, Y., Shen, Z., Wu, M., Huang, M., Hong, S. B., Xu, L., Zang, Y. (2024). Advances in functional studies of plant MYC transcription factors. *Theoretical and Applied Genetics* 2024 137:8, 137(8), 1–62.
- Li, Zhen. (2024). Impact of polyploidy on the evolution and diversity of cotton. *Cotton*

- Genomics and Genetics*, 15(0), 197–206.
- Liu, Q.Z., Yuan, K., J., Zhang, L., S., Zhao, H., J., Liu, P., Huan, Z., H. (2006). Growth and fruit characteristics of autotetraploid plants of Royal Gala apple. *Journal of Fruit Science.*, 23 (1) (2006), pp. 102-104.
- Lopez, D., Bronner, G., Brunel, N., Auguin, D., Bourgerie, S., Brignolas, F., Carpin, S., Tournaire-Roux, C., Maurel, C., Fumanal, B., Martin, F., Sakr, S., Label, P., Julien, J. L., Gousset-Dupont, A., Venisse, J. S. (2012). Insights into Populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *Journal of experimental botany*, 63(5), 2217–2230.
- Lourkisti, R., Froelicher, Y., Morillon, R., Berti, L., Santini, J. (2022). Enhanced photosynthetic capacity, osmotic adjustment and antioxidant defenses contribute to improve tolerance to moderate water deficit and recovery of triploid citrus genotypes. *Antioxidants 2022, Vol. 11, Page 562, 11(3)*, 562.
- Lück, H. 1962. Methoden der enzymatischen analyse. (Ed. H. U. Bergmeyer) Verlag Chemie, GmbH Weinheim, 895-897.
- Ma, Y., Xue, H., Zhang, L., Zhang, F., Ou, C., Wang, F., Zhang, Z. (2016). Involvement of auxin and brassinosteroid in dwarfism of autotetraploid apple (*Malus × domestica*). *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–14.
- Madani, H., ESCRICH, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A., Palazon, J. (2021). Effect of Polyploidy Induction on Natural Metabolite Production in Medicinal Plants. *Biomolecules*, 11(6), 899.
- Mahanty, S., Kaul, T., Pandey, P., Reddy, R. A., Mallikarjuna, G., Reddy, C. S., Sopory, S. K., Reddy, M. K. (2012). Biochemical and molecular analyses of copper–zinc superoxide dismutase from a C4 plant *Pennisetum glaucum* reveals an adaptive role in response to oxidative stress. *Gene*, 505(2), 309–317.
- Manzoor, A, Ahmad, T., Bashir, M., Hafiz, I., Silvestri C. (2019). Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. *Plants*, 8 (7).
- Manzoor, Ayesha, Ahmad, T., Bashir, M. A., Baig, M. M. Q., Quresh, A. A., Shah, M. K. N., Hafiz, I. A. (2018). Induction and identification of colchicine induced polyploidy in *Gladiolus grandiflorus* 'White Prosperity'. *Folia Horticulturae*, 30(2), 307–319.
- Marasek-Ciolakowska, A., Nishikawa, T., Shea, D. J., Okazaki, K. (2018). Breeding of lilies and tulips—interspecific hybridization and genetic background—. *Breeding Science*, 68(1), 35.
- Marburger, S., Monnahan, P., Seear, P. J., Martin, S. H., Koch, J., Paajanen, P., Bohutínská, M., Higgins, J. D., Schmickl, R., Yant, L. (2019). Interspecific introgression mediates adaptation to whole genome duplication. *Nature Communications*, 10(1), 5218.
- Maru, B., Parihar, A., Kulshrestha, K., Vaja, M. (2021). Induction of polyploidy through colchicine in cotton (*Gossypium herbaceum*) and its conformity by cytology and flow cytometry analyses. *Journal of Genetics*, 100(2).
- Masny, S. (2017). Occurrence of *Venturia inaequalis* races in Poland able to overcome specific apple scab resistance genes. *European Journal of Plant Pathology*, 147(2),

313-323.

- Masny, S., Sobiczewski, P. (2025). Comparison of the actual release dates of ascospores of the fungus *Venturia inaequalis* with those predicted by selected simulation models in an apple orchard in Central Poland. *Plant Protection Science*, 61(3), 278-290.
- Matsumoto, S. (2014). Apple pollination biology for stable and novel fruit production: search system for apple cultivar combination showing incompatibility, semicompatibility, and full-compatibility based on the S-RNase allele database. *International Journal of Agronomy*, 2014(1), 138271.
- Matysiak, K., Zubek, J., Michel, M., (2025). Znaczenie biostymulatorów w adaptacji słonecznika (*Helianthus annuus* L.) do warunków stresowych. Progress in *Plant Protection*, 65(2), 0–0.
- McCord, J., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22):6049-55.
- Meriem, S., Mulyah, E., Angio, M. H., Triadiati, T. (2021). The physiological responses of *zea mays* l. And *cucumis sativus* l. On drought stress and re-watering. *Jurnal Biodjati*, 6(2), 190–202.
- Mesa, K., Serra, S., Masia, A., Gagliardi, F., Bucci, D., Musacchi, S. (2016). Seasonal trends of starch and soluble carbohydrates in fruits and leaves of ‘Abbé Fétel’ pear trees and their relationship to fruit quality parameters. *Scientia Horticulturae*, 211, 60–69.
- Michalecka, M., Masny, S., Leroy, T., Puławska, J. (2018). Population structure of *Venturia inaequalis*, a causal agent of apple scab, in response to heterogeneous apple tree cultivation. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–15.
- Mihaljević, I., Vuletić, M. V., Šimić, D., Tomaš, V., Horvat, D., Josipović, M., Zdunić, Z., Dugalić, K., Vuković, D. (2021). Comparative study of drought stress effects on traditional and modern apple cultivars. *Plants 2021, Vol. 10, Page 561, 10(3)*, 561.
- Milan, P. R. (2008). Chromosome behaviour and fertility in induced polyploids of grain amaranths. *Caryologia*, 61(3), 199–205.
- Mishra, N., Jiang, C., Chen, L., Paul, A., Chatterjee, A., Shen, G. (2023). Achieving abiotic stress tolerance in plants through antioxidative defense mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1110622.
- Mo, L., Chen, J. hao, Chen, F., Xu, Q. wei, Tong, Z. Kang, Huang, H. hong, Dong, R. hui, Lou, X. zhen, Lin, E. pei. (2020). Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(8), 2016–2026.
- Mohamed, O. A., Rithesh, L., Kumar, A., Pooja. (2025). Harnessing innate immunity: PR proteins expression in *Malus domestica* as an important defense mechanism against scab incited by *Venturia inaequalis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 132(1), 1–11.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58(Volume 58, 2007),

459–481.

- Moose, S. P., Mumm, R. H. (2008). Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*, 147(3), 969–977.
- Morales, M., Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246–1250.
- Morariu, P. A., Mureşan, A. E., Sestras, A. F., Dan, C., Andrecean, A. F., Borsai, O., Militaru, M., Mureşan, V., Sestras, R. E. (2025). The impact of cultivar and production conditions on apple quality. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 53(1), 14046–14046.
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *The Plant Journal*, 20(4), 381–388.
- Musacchi, S., Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409–430.
- Navrátilová, B., Švécarová, M., Bednář, J., Ondřej, V., (2021). *In vitro* polyploidization of *Thymus vulgaris* L. and its effect on composition of essential oils. *Agronomy* 11(3).
- Niles, W. L., Quesenberry, K. H. (1992). Pollen germination of rhizoma peanut cv. Florigrazel. *Peanut Science*, 19(2), 105–107.
- Niu, L., Tao, Y., Chen, M., Fu, Q., Dong, Y., He, H., Xu, Z. (2016). Identification and characterization of tetraploid and octoploid *Jatropha curcas* induced by colchicine. *Caryologia*, 69(1), 58–66.
- Oguz, M. C., Aycan, M., Oguz, E., Poyraz, I., Yildiz, M. (2022). Drought stress tolerance in plants: interplay of molecular, biochemical and physiological responses in important Development Stages. *Physiologia 2022, Vol. 2, Pages 180-197*, 2(4), 180–197.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E., Moghadam, M. S. (2010). Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production*, 4(2), 1735–8043.
- Osborn, T. C., Chris Pires, J., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V., Martienssen, R. A. (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics*, 19(3), 141–147.
- Ostrowska, A., Hura, K., Hura, T. (2023). Different patterns of the photosynthetic apparatus recovery during early rehydration following drought stress in two types of intergeneric hybrid of triticale. *Environmental and Experimental Botany*, 214, 105475.
- Ou, C.Q., Li, L.G., He, P., Zhang, Z., H. (2008) *In vitro* adventitious shoot regeneration and induction of tetraploid from leaves of Hanfu apple. *Journal of Fruit Science* 25:293–297
- Paluch, E., Lubawy, J., Polcyn, W. (2015). Akwaporyny roślinne - funkcje i czynniki regulujące ich aktywność. *Postępy Biologii Komórki*, 42(2).
- Paredes, T. M., Vilorio, M. (2021). Morphological characteristics and aloin production

- in polyploid plants of *Aloe vera* (L.) burm. f. (*Asphodelaceae*). *Bioagro*, 33(1), 41–50.
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C. (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 186(1), 5–17.
- Parsons, J. L., Martin, S. L., James, T., Golenia, G., Boudko, E. A., Hepworth, S. R. (2019). Polyploidization for the genetic improvement of *Cannabis sativa*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 449166.
- Pasquali, G., Biricolti, S., Locatelli, F., Baldoni, E., Mattana, M. (2008). Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples. *Plant Cell Reports*, 27(10), 1677–1686.
- Pei, Y., Yao, N., He, L., Deng, D., Li, W., Zhang, W. (2019). Comparative study of the morphological, physiological and molecular characteristics between diploid and tetraploid radish (*Raphanus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 257, 108739.
- Pereira-Lorenzo, S., Fischer, M., Ramos-Cabrera, A. M., Castro, I. (2018). Apple (*Malus* spp.) breeding: Present and future. *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*, 3, 3–29.
- Podwyszyńska, M., Mynett, K., Markiewicz, M., Pluta, S., Marasek-Ciołakowska, A. (2023). Assessment of the ability to cross bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) autotetraploids with highbush blueberry (*V. corymbosum* L.). *Acta Horticulturae*, 1381, 81–88.
- Podwyszyńska, M., Marasek-Ciołakowska, A. (2021). Ploidy, Genome Size, and Cytogenetics of Apple.
- Podwyszynska, M., Markiewicz, M., Klamkowski, K., Broniarek, A., Marasek-Ciołakowska, A. (2021a). The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids. *Acta Horticulturae*, 1307, 177–186.
- Podwyszyńska, M., Markiewicz, M., Broniarek-Niemiec, A., Matysiak, B., Marasek-Ciołakowska, A. (2021b). Apple autotetraploids with enhanced resistance to apple scab (*Venturia inaequalis*) due to genome duplication-phenotypic and genetic evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2).
- Podwyszynska, M., Mynett, K., Markiewicz, M., Pluta, S., Marasek-Ciołakowska, A. (2021c). Chromosome doubling in genetically diverse bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) accessions and evaluation of tetraploids in terms of phenotype and ability to cross with highbush blueberry (*V. corymbosum* L.). *Agronomy*, 11(12), 2584.
- Podwyszyńska, M., Trzewik, A., Marasek-Ciołakowska, A. (2018). *In vitro* polyploidisation of tulips (*Tulipa gesneriana* L.) — Phenotype assessment of tetraploids. *Scientia Horticulturae*, 242, 155–163.
- Podwyszyńska, M., Sowik, I., Machlańska, A., Kruczyńska, D., Dyki, B. (2017). *In vitro* tetraploid induction of *Malus × domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. *Scientia Horticulturae*, 226.
- Podwyszyńska, M., Kruczyńska, D., Machlańska, A., Dyki, B., Sowik, I. (2016). Nuclear DNA content and Ploidy level of apple cultivars including Polish ones in relation to some morphological traits. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 58(1).

- Podwyszyńska, M., Gabryszewska, E., Dyki, B., Stępowska, A. A., Kowalski, A., Jasiński, A. (2015). Phenotypic and genome size changes (variation) in synthetic tetraploids of daylily (*Heemerocallis*) in relation to their diploid counterparts. *Euphytica*, 203(1).
- Podwyszyńska, M., Gabryszewska, E., Sochacki, D., Jasiński, A. (2011). Histogenic identification by cytological analysis of colchicine-induced polyploids of *Heemerocallis*. *Acta Horticulturae*, 886.
- Pour-Aboughadareh, A., Ahmadi, J., Mehrabi, A. A., Etminan, A., Moghaddam, M., Siddique, K. H. M. (2017). Physiological responses to drought stress in wild relatives of wheat: implications for wheat improvement. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(4), 1–16.
- Pourkheirandish, M., Golicz, A. A., Bhalla, P. L., Singh, M. B. (2020). Global role of crop genomics in the face of climate change. *Frontiers in Plant Science*, 11, 522800.
- Qi, F., Zhang, F. (2020). Cell cycle regulation in the plant response to stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 498388.
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S. (2021). Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology 2021*, Vol. 10, Page 267, 10(4), 267.
- Ramanna, M. S., Jacobsen, E. (2003). Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. *Euphytica*, 133(1), 3–8.
- Ramírez, F., Davenport, T. L. (2013). Apple pollination: A review. *Scientia Horticulturae*, 162, 188–203.
- Ramsey, J., Schemske, D. W. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 589–639.
- Ravandi, E. G., Rezanejad, F., Zolala, E., Dehghan, E. (2013). The effects of chromosome-doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intybus* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(6), 701–709.
- Raza, A., Mubarik, M. S., Sharif, R., Habib, M., Jabeen, W., Zhang, C., Chen, H., Chen, Z. H., Siddique, K. H. M., Zhuang, W., Varshney, R. K. (2023). Developing drought-smart, ready-to-grow future crops. *Plant Genome*, 16(1), e20279.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161(11), 1189–1202.
- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q., Hong, X., Zhu, J. K., Gong, Z. (2010). ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 63(3), 417–429.
- Rodrigues, J., Inzé, D., Nelissen, H., Saibo, N. J. M. (2019). Source–sink regulation in crops under water deficit. *Trends in Plant Science*, 24(7), 652–663.
- Rogalska, S., Achrem, M., Kalinka, A. (2007). Mechanizmy zmian genomowych i zmian w ekspresji genów w mieszańcowych poliploidach roślin. *Kosmos*, 56(3–4),

421–433.

- Rombel-Bryzek, A., Pisarek, I. (2017). Wpływ kwasów huminowych na aktywność metaboliczną buraka cukrowego w warunkach suszy. *Proceedings of ECOpole, Vol. 11, No. 1*.
- Rozpara E., Bielicki, P., Cieślińska, M., Danelski, W., Filipczak, J., Głos, H., Kruczyńska, D. (2023). *Metodyka ekologicznej uprawy jabłoni*. Instytut Ogrodnictwa - PIB, Skierniewice: 109-110 (ISBN 978-83-67039-27-7)
- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiology, 170*(4), 1903–1916.
- Sade, N., Vinocur, B. J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., Wallach, R., Karchi, H., Moshelion, M. (2009). Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytologist, 181*(3), 651–661.
- Saminathan, T., Nimmakayala, P., Manohar, S., Malkaram, S., Almeida, A., Cantrell, R., Tomason, Y., Abburi, L., Rahman, M. A., Vajja, V. G., Khachane, A., Kumar, B., Rajasimha, H. K., Levi, A., Wehner, T., Reddy, U. K. (2015). Differential gene expression and alternative splicing between diploid and tetraploid watermelon. *Journal of Experimental Botany, 66*(5), 1369–1385.
- Santa, J. D., Berdugo-Cely, J., Cely-Pardo, L., Soto-Suárez, M., Mosquera, T., Galeano, C. H. M. (2018). QTL analysis reveals quantitative resistant loci for *Phytophthora infestans* and *Tecia solanivora* in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *PLOS ONE, 13*(7), e0199716.
- Santoro, D. F., Marconi, G., Capomaccio, S., Bocchini, M., Anderson, A. W., Finotti, A., Confalonieri, M., Albertini, E., Rosellini, D. (2025). Polyploidization-driven transcriptomic dynamics in *Medicago sativa* neotetraploids: mRNA, smRNA and allele-specific gene expression. *BMC Plant Biology 2025 25:1, 25*(1), 1–18.
- Sarma, M. K., Sharma, A. A., Samantara, K., Wani, S. H. (2023). *In vitro* techniques in plant breeding. *Advanced Crop Improvement: Volume 1: Theory and Practice, 1*, 185–215.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. (2016a). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta, 243*(2), 281–296.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. (2016b). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta, 243*(2), 281–296.
- Schaart, J. G., van de Wiel, C. C. M., Smulders, M. J. M. (2021). Genome editing of polyploid crops: prospects, achievements and bottlenecks. *Transgenic Research, 30*(4), 337–351.
- Schatlowski, N., Kohler, C. (2012). Tearing down barriers: understanding the molecular mechanisms of interploidy hybridizations. *Journal of Experimental Botany, 63*(17), 6059–6067.
- Schwachtje, J., Whitcomb, S. J., Firmino, A. A. P., Zuther, E., Hinch, D. K., Kopka, J. (2019). Induced, imprinted, and primed responses to changing environments: Does metabolism store and process information? *Frontiers in Plant Science, 10*, 427560.
- Sedov, E. N., Yanchuk, T. V., Kornryeva, S. A. (2020). Stages, methods and results of

- apple breeding at the russian research institute of fruit crop breeding. *Agrarian science*, (2):69-73
- Sedov, E. N., Sedysheva, G. A., Serova, Z. M., Yanchuk, T. V. (2018). Intervalent crosses: the main way of creating triploid apple cultivars. *Russian Agricultural Sciences* 2018 44:4, 44(4), 306–309.
- Sedov, E. N. (2014). Apple breeding programs and methods, their development and improvement. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(1), 43–51.
- Sedov, E. N., Sedysheva, G. A., Serova, Z. M., Gorbacheva, N. G., Melnik, S. A. (2014). Breeding assessment of heteroploid crosses in the development of triploid apple varieties. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 4(1), 52–59.
- Sedov, E. N., Makarkina, M. A. (2008). Biochemical composition of fruit of apple cultivar clones and tetraploid forms. *Russian Agricultural Sciences* 2008 34:2, 34(2), 71–73.
- Sedysheva, G. A., Gorbacheva, N. G. (2013). Estimation of new tetraploid apple forms as donors of diploid gametes for selection on a polyploidy level. *Universal Journal of Plant Science*, 1(2), 49–54.
- Segraves, K. A., Thompson, J. N. (1999). Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, 53(4), 1114-1127.
- Seo, P. J., Xiang, F., Qiao, M., Park, J. Y., Lee, Y. N., Kim, S. G., Lee, Y. H., Park, W. J., Park, C. M. (2009). The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151(1), 275–289.
- Sestras, R. E., Sestras, A. F. (2023). Quantitative traits of interest in apple breeding and their implications for selection. *Plants*, 12(4), 903.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Singh Sidhu, G. P., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Yadav, P., Khanna, K., Bakshi, P., Rehman, A., Kohli, S. K., Khan, E. A., Parihar, R. D., Yuan, H., Thukral, A. K., Bhardwaj, R., Zheng, B. (2019). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: A review. *Journal of Plant Growth Regulation* 2019 39:2, 39(2), 509–531.
- Sheoran, S., Thakur, V., Narwal, S., Turan, R., Mamrutha, H. M., Singh, V., Tiwari, V., Sharma, I. (2015). Differential activity and expression profile of antioxidant enzymes and physiological changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(6), 1282–1298.
- Shohat, H., Cheriker, H., Kilambi, H. V., Illouz Eliaz, N., Blum, S., Amsellem, Z., Tarkowská, D., Aharoni, A., Eshed, Y., Weiss, D. (2021). Inhibition of gibberellin accumulation by water deficiency promotes fast and long-term ‘drought avoidance’ responses in tomato. *New Phytologist*, 232(5), 1985–1998.
- Silva, D. V., Cabral, C. M., Ferreira, E. A., de Carvalho, F. P., dos Santos, J. B., Dombroski, J. L. D. (2018). Anatomical adaptations to different soil moisture contents in palisade grass and smooth pigweed. *Revista Ceres*, 65(4), 306–313.
- Singh Kushwah, K., Verma, R. C., Patel, S., Chandra Verma, R., Jain, N. (2018). Colchicine induced polyploidy in *Chrysanthemum carinatum* L. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 06(01).

- Šircelj, H., Tausz, M., Grill, D., Batič, F. (2007). Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*, 113(4), 362–369.
- Skrzypek, E.; Warzecha, T.; Noga, A.; Warchol, M.; Czyczyło-Mysza, I.; Dziurka, K.; Marcinska, I.; Kaploniak, K.; Sutkowska, A.; Nita, Z.; Complex characterization of oat (*Avena sativa* L.) lines obtained by wide crossing with maize (*Zea mays* L.). *PeerJ* 2018, 6, e5107.
- Sobiczewski, P., Żurawicz, E., Berczyński, S., Lewandowski, M. (2006). Fire blight susceptibility of new apple cultivars and clones from Poland. *Acta Horticulturae*, 704, 551–556.
- Sobiczewski, P., Mikiciński, A., Richter, K., Lewandowski, M., Żurawicz, E., Kellerhals, M. (2015). Susceptibility of apple genotypes from European genetic resources to fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 141(1), 51–62.
- Soleymani, S., Piri, S., Aazami, M. A., Salehi, B. (2025). Cerium oxide nanoparticles alleviate drought stress in apple seedlings by regulating ion homeostasis, antioxidant defense, gene expression, and phytohormone balance. *Scientific Reports 2025 15:1*, 15(1), 1–23.
- Soltis, P. S., Liu, X., Marchant, D. B., Visger, C. J., Soltis, D. E. (2014). Polyploidy and novelty: Gottlieb's legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1648), 818–830.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 561–588.
- Stebbins, G. L. (1947). Types of Polyploids: Their Classification and Significance. *Advances in Genetics*, 1(C), 403–429.
- Sun, C. H., Li, X. H., Hu, Y. L., Zhao, P., Xu, T., Sun, J., Gao, X. L. (2015). Proline, Sugars, and Antioxidant Enzymes Respond to Drought Stress in the Leaves of Strawberry Plants. *Horticultural Science and Technology 2015 33:5*, 33(5), 625–632.
- Sun, L., Ghouri, F., Jin, J., Zhong, M., Huang, W., Lu, Z., Wu, J., Liu, X., Shahid, M. Q. (2025). Interspecific Hybridization Enhanced Tolerance to Salinity and Cadmium Stress Through Modifying Biochemical, Physiological, and Resistance Gene Levels, Especially in Polyploid Rice: A Sustainable Way for Stress-Resilient Rice. *Rice*, 18(1), 1–20.
- Sun, P., Tahir, M. M., Lu, X., Liu, Z., Zhang, X., Zuo, X., Shao, Y., Xiao, X., An, N., Wang, C., Zhang, D., Yang, W. (2022). Comparison of leaf morphological, anatomical, and photosynthetic responses to drought stress among eight apple rootstocks. *Fruit Research*, 2(1), 1–13.
- Sun, Q., Liu, X., Kitagawa, Y., Calamita, G., Ding, X. (2024). Plant aquaporins: Their roles beyond water transport. *The Crop Journal*, 12(3), 641–655.
- Sung, J., Barna, B., Luo, J., Mangena, P., Mushadu, P. N. (2023). Colchicine-induced polyploidy in leguminous crops enhances morpho-physiological characteristics for drought stress tolerance. *Life 2023, Vol. 13, Page 1966*, 13(10), 1966.
- Sybilska, E., Haddadi, B. S., Mur, L. A. J., Beckmann, M., Hryhorowicz, S., Suszynska-

- Zajczyk, J., Knauer, M., Pławski, A., Daszkowska-Golec, A. (2025). Mapping the molecular signature of ABA-regulated gene expression in germinating barley embryos. *BMC Plant Biology*, 25(1), 1–24.
- Szot, I., Lipa, T. (2019). Apple trees yielding and fruit quality depending on the crop load, branch type and position in the crown. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 18(2), 205–215–205–215.
- Szpadzik, E., Molska-Kawulok, K., Krupa, T., Przybyłko, S. (2023). Physico-chemical analysis of the fruits and consumer preferences of new apple (*Malus × domestica* Borkh) hybrids bred in Poland. *Agriculture* 2024, Vol. 14, Page 1, 14(1), 1.
- Śliwińska, E. 2008. Zastosowanie cytometrii przepływowej do oznaczania zawartości DNA u roślin (Estimation of DNA content in plants using flow cytometry). *Postępy Biologii Komórki* 35, Suppl 24: 165–176
- Talebi, S. F., Saharkhiz, M. J., Kermani, M. J., Sharafi, Y., Fatemeh, & Fard, R., Farahnaz Talebi, S., Fard, F. R. (2017). Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). *Caryologia*, 70(2), 184–193.
- Tang, H., Zhang, L., Xie, X., Wang, Y., Wang, T., Liu, C. (2025). Resilience of Maize to environmental stress: insights into drought and heat tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(11), 5274.
- Tardieu, F., Simonneau, T., Muller, B. (2018). The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach.
- Tate, J. A., Soltis, P. S., Soltis, D. E. (2005). Polyploidy in plants. *The Evolution of the Genome*, 371–426.
- Tayalé, A., Parisod, C. (2013). Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2–4), 79–96.
- Thriveni, V., Paul, M., Voruganti, C., Kumar, V. V., Kumar, J. V., Reddy, B. S. K., Kumar, M. (2024). Impact of polyploidy on crop improvement and plant breeding strategies: A review. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 27(11), 714–725.
- Tossi, V. E., Martínez Tosar, L. J., Laino, L. E., Iannicelli, J., Regalado, J. J., Escandón, A. S., Baroli, I., Causin, H. F., Pitta-Álvarez, S. I. (2022). Impact of polyploidy on plant tolerance to abiotic and biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Tränkner, C., Günther, K., Sahr, P., Engel, F., Hohe, A. (2020). Targeted generation of polyploids in *Hydrangea macrophylla* through cross-based breeding. *BMC Genetics*, 21(1), 1–13.
- Trojak-Goluch, Anna, Kawka-Lipińska, M., Wielgusz, K., Praczyk, M. (2021). Polyploidy in industrial crops: applications and perspectives in plant breeding. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 2574, 11(12), 2574.
- Trojak-Goluch, A, Skomra, U. (2013). Artificially induced polyploidization in *Humulus lupulus* L. and its effect on morphological and chemical traits. *Breeding Science*, 63(4), 393–399.
- Tulay, E., Unal, M. (2010). Production of colchicine induced tetraploids in *Vicia villosa* roth. *Caryologia*, 63(3), 292–303.

- Twořkoski, T., Fazio, G., Glenn, D. M. (2016). Apple rootstock resistance to drought. *Scientia Horticulturae*, 204, 70–78.
- Urwin, N. A. R. (2014). Generation and characterisation of colchicine-induced polyploid *Lavandula* \times *intermedia*. *Euphytica*, 197(3), 331–339.
- Urwin, N., Horsnell, J., Moon, T. (2007). Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica*, 156(1–2), 257–266.
- Van De Peer, Y., Mizrachi, E., Marchal, K. (2017). The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics* 2017 18:7, 18(7), 411–424.
- van Laere, K., Franęa, S. C., Vansteenkiste, H., van Huylenbroeck, J., Steppe, K., van Labeke, M. C. (2011). Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4), 1149–1156.
- Varshney, R. K., Bohra, A., Yu, J., Graner, A., Zhang, Q., Sorrells, M. E. (2021). Designing future crops: genomics-assisted breeding comes of age. *Trends in Plant Science*, 26(6), 631–649.
- Wach, D., Skowron, P. (2022). An overview of plant responses to the drought stress at morphological, physiological and biochemical levels. *Polish Journal of Agronomy*, 50, 25–34.
- Wahab, A., Abdi, G., Saleem, M.H., Ali, B., Ullah, S., Shah, W., Mumtaz, S., Yasin, G., Muresan, C.C., Marc, R.A., 2022. Plants' physio-biochemical and phyto-hormonal responses to alleviate the adverse effects of drought stress: a comprehensive Review. *Plants* 2022, 11, 1620.
- Wahid, A., Rasul, E. (2005). Photosynthesis in leaf, stem, flower, and fruit. *Books in Soils, Plants, and the Environment*.
- Wan, J., Griffiths, R., Ying, J., McCourt, P., Huang, Y. (2009). Development of drought-tolerant canola (*Brassica napus* L.) through genetic modulation of ABA-mediated stomatal responses. *Crop Science*, 49(5), 1539–1554.
- Wang, C., Zhou, X., Qin, J., Wang, X., Yu, H., Zhu, Q., Lee, D., Chen, L., 2024. Comprehensive Response Mechanisms of Plants to Water Deficit: A Physiological, Biochemical, Molecular, and Ecological Review. *Molecular Soil Biology* 15, 205–215
- Wang, L., Li, Y., Li, H., Li, S., Song, J., Guan, W. (2025). Comparison of the morphological and physiological characteristics of diploid and tetraploid *Luculia pinceana* Hook. *BMC Plant Biology*, 25(1), 1–16.
- Wang, S., Liang, D., Li, C., Hao, Y., Ma, F., Shu, H. (2012). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 81–89.
- Wang, X., Cheng, Z.-M., Zhi, S., Xu, F. (2016). Breeding triploid plants: a review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 52(2), 41–54.
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*, 7(11).
- Warzecha, T., Bocianowski, J., Warchoř, M., Bathelt, R., Sutkowska, A., & Skrzypek,

- E. (2023). Effect of soil drought stress on selected biochemical parameters and Yield of Oat × Maize Addition (OMA) lines. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 13905, 24(18), 13905.
- Wei, T., Wang, Y., Xie, Z., Guo, D., Chen, C., Fan, Q., Deng, X., Liu, J. H. (2019). Enhanced ROS scavenging and sugar accumulation contribute to drought tolerance of naturally occurring autotetraploids in *Poncirus trifoliata*. *Plant Biotechnology Journal*, 17(7), 1394–1407.
- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Evolution*, 42, 225–249.
- Wendel, J. F., Jackson, S. A., Meyers, B. C., Wing, R. A. (2016). Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology* 2016 17:1, 17(1), 1–14.
- Wójcik, D., Marat, M., Marasek-Ciołakowska, A., Klamkowski, K., Buler, Z., Podwyszyńska, M., Tomczyk, P. P., Wójcik, K., Treder, W., Filipczak, J. (2022). Apple autotetraploids phenotypic characterisation and response to drought stress. *Agronomy*, Vol. 12, Page 161, 12(1), 161.
- Wu, J. H., Ferguson, A. R., Murray, B. G., Duffy, A. M., Jia, Y., Cheng, C., Martin, P. J. (2013). Fruit quality in induced polyploids of *Actinidia chinensis*. *HortScience*, 48(6), 701–707.
- Wu, J. H., Ferguson, A. R., Murray, B. G., Jia, Y., Datson, P. M., Zhang, J. (2012). Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Annals of Botany*, 109(1), 169–179.
- Xiong, H., He, H., Chang, Y., Miao, B., Liu, Z., Wang, Q., Dong, F., Xiong, L. (2025). Multiple roles of NAC transcription factors in plant development and stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 67(3), 510–538.
- Xue, H., Zhang, B., Tian, J. R., Chen, M. M., Zhang, Y. Y., Zhang, Z. H., Ma, Y. (2017). Comparison of the morphology, growth and development of diploid and autotetraploid ‘Hanfu’ apple trees. *Scientia Horticulturae*, 225, 277–285.
- Xue, H., Zhang, F., Zhang, Z. H., Fu, J. F., Wang, F., Zhang, B., Ma, Y. (2015). Differences in salt tolerance between diploid and autotetraploid apple seedlings exposed to salt stress. *Scientia Horticulturae*, 190, 24–30.
- Yan, S., Weng, B., Jing, L., Bi, W. (2023). Effects of drought stress on water content and biomass distribution in summer maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1118131.
- Yang, Jie, Wang, M., Zhou, S., Xu, B., Chen, P., Ma, F., Mao, K. (2022). The ABA receptor gene MdPYL9 confers tolerance to drought stress in transgenic apple (*Malus domestica*). *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104695.
- Yang, Jingjing, Zhang, J., Li, C., Zhang, Z., Ma, F., Li, M. (2019). Response of sugar metabolism in apple leaves subjected to short-term drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 164–171.
- Yue, C., Gallardo, R. K., Luby, J., Rihn, A., McFerson, J. R., McCracken, V., Bedford, D., Brown, S., Evans, K., Weebadde, C., Sebolt, A., Iezzoni, A. F. (2013). An investigation of U.S. Apple Producers’ Trait Prioritization—Evidence from Audience Surveys. *HortScience*, 48(11), 1378–1384.
- Zhang, F., Xue, H., Lu, X., Zhang, B., Wang, F., Ma, Y., Zhang, Z. (2015).

- Autotetraploidization enhances drought stress tolerance in two apple cultivars. *Trees - Structure and Function*, 29(6), 1773–1780.
- Zhang, H., Khan, A., Tan, D. K. Y., Luo, H. (2017). Rational water and nitrogen management improves root growth, increases yield and maintains water use efficiency of cotton under mulch drip irrigation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 243606.
- Zhang, K., Wang, X., Cheng, F. (2019). Plant Polyploidy: Origin, Evolution, and Its Influence on Crop Domestication. *Horticultural Plant Journal*, 5(6), 231–239.
- Zhang, W., Hao, H., Ma, L., Zhao, C., Yu, X. (2010). Tetraploid muskmelon alters morphological characteristics and improves fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 396–400.
- Zhang, Y., Luan, Q., Jiang, J., Li, Y. (2021). Prediction and utilization of malondialdehyde in exotic pine under drought stress using near-infrared spectroscopy. *Frontiers in Plant Science*, 12, 735275.
- Zhang, Y., Qiao, Y., Zhang, W., Liu, X., Gong, R., Wang, Z., Zhang, Y. (2025). In vitro induction and characterization of *Anthurium andraeanum* ‘Pink Champion’ tetraploids. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 61(2), 249–257.
- Zhang, Y., Chen, G., Shen, R., Li, Q., Shen, X. (2025). Identification and morphophysiological characterization of oryzalin-induced polyploids and variants in *Lysimachia xiangxiensis*. *Horticulturae 2025, Vol. 11, Page 654*, 11(6), 654.
- Zhang, Z., Fu, T., Liu, Z., Wang, X., Xun, H., Li, G., Ding, B., Dong, Y., Lin, X., Sanguinet, K. A., Liu, B., Wu, Y., Gong, Lei. (2019). Extensive changes in gene expression and alternative splicing due to homoeologous exchange in rice segmental allopolyploids. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(8), 2295–2308.
- Zhao, Z., Wei, Y., Li, L., Liu, B., Yang, K., Yang, H., Li, J. (2022). Chromosome doubling influences the morphological, physiological, biochemical and genetic traits related to essential oil biosynthesis of peppermint (*Mentha piperita*) under salinity stress. *Journal of Plant Research*, 135(1), 93–104.
- Zhong, C.H., Li, D.W., Han, F., Wang, S.M., Huang, H.W. (2015). Impacts of polyploidy on blooming and flower morphological traits of kiwifruit cultivars. *Acta Hort.* 1096, 229-240
- Zhu, L., Li, S., Ouyang, M., Yang, L., Sun, S., Wang, Y., Cai, X., Wu, G., Li, Y. (2022). Overexpression of watermelon CIWRKY20 in transgenic *Arabidopsis* improves salt and low-temperature tolerance. *Scientia Horticulturae*, 295, 110848.
- Zulkarnain, Z., Tapingkae, T., Taji, A. (2016). Applications of *in vitro* techniques in plant breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*, 1, 293–328.
- Żurawicz, E., Kubik, J., Lewandowski, M., Rutkowski, K. P., Zmarlicki, K. (2019). The apple industry in Poland. *Acta Horticulturae*, 1261, 13–20.

Dorobek naukowy autora

• Publikacje naukowe

1. Dreger, M., Markiewicz, M., Deja, A., Szalata, M., **Marat, M.**, Podwyszyńska, M., Słomski, R. (2025). Clonal propagation of hemp and assessment of genetic stability in long-term *in vitro* culture. *Industrial Crops and Products*, 232, 121242. [IF = 6.2, 200 pkt MNiSW] <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2025.121242>
2. Wójcik, D., **Marat, M.**, Keller-Przybyłkiewicz, S., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2024). Preliminary study on interploid crossing of apple (*Malus x domestica* Borkh.) to obtain triploid genotypes. *Acta Horticulturae*, 1(1412), 251–260. [20 pkt MNiSW] <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2024.1412.39>
3. Wójcik, D., **Marat, M.**, Marasek-Ciołakowska, A., Klamkowski, K., Buler, Z., Podwyszyńska, M., Tomczyk, P. P., Wójcik, K., Treder, W., Filipczak, J. (2022). Apple autotetraploids phenotypic characterisation and response to drought Stress. *Agronomy*, Vol. 12, Page 161, 12(1), 161. [IF = 3,4, 100 pkt MNiSW] <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12010161>

• Doniesienia konferencyjne:

1. Wójcik, D., **Działkowska, M.**, Broniarek-Niemiec, A., Sobiczewski, P., Górąj- Koniarska, J., Podwyszyńska, M. (2025). Studies on the increased tolerance of apple polyploids to biotic stresses. 12th PSEPB 2025 Conference, 09-12.09.2025, Warszawa.
2. **Działkowska, M.**, Wójcik, D., Lewandowski, M. (2025). Ocena krzyżowalności tetraploidów jabłoni i charakterystyka uzyskanych hybryd. „Natura zmian... z botaniką w przyszłość” LX Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego. 29.06 – 04.07.2025, Katowice.
3. Trzewik, A., **Działkowska, M.** (2025). Ocena fenotypowa tetraploidalnych roślin agrestu (*Ribes glossularia* L.). „Natura zmian... z botaniką w przyszłość” LX Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego. 29.06 – 04.07.2025, Katowice.
4. Matysiak B., **Działkowska M.**, Nowakowska M. (2025). Architektoniczny ideotyp pomidora karłowego *Solanum lycopersicum* do wielopoziomowej uprawy z oświetleniem LED. Konferencja Naukowa „Wyzwania Współczesnego Ogrodnictwa” połączona z Jubileuszem 55-lecia Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, 04-06.06.2025, Lublin.
5. Wójcik D., **Działkowska M.**, Broniarek-Niemiec A., Marasek-Ciołakowska A., Trzeciak J., Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Podwyszyńska M. (2025). Przydatność poliploidów jabłoni do hodowli genotypów odpornych na porażenie *Venturia inaequalis*. Konferencja Naukowa „Wyzwania Współczesnego Ogrodnictwa”

połączona z Jubileuszem 55-lecia Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, 04-06.06.2025, Lublin.

6. **Działkowska, M.**, Wójcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2025). Flow cytometric and microscopic evaluation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) seedlings from interploid crosses. 13th Annual Academic Research Conference, 11-13.03.2025, Alabama, USA.
7. **Marat, M.**, Wójcik, D., Broniarek-Niemiec, A. (2024). Research on resistant reactions of apple tetraploids to infection with the fungus *Venturia inaequalis*. Dni Młodego Naukowca 2024, 24–25.10.2024, IHAR-PIB, Radzików.
8. Trzewik, A., **Marat M.**, Grzelak, M., Szymajda, M. (2024). Phenotypic assessment of tetraploids of sweet cherry (*Prunus avium* L.). European Congress of Life Sciences Eurobiotech, 27-28.06.2024, Kraków.
9. **Marat, M.**, Trzewik, A., Niewiadomska-Wnuk, A. (2024). Wykorzystanie cytometrii przepływowej w poszukiwaniu poliploidów agrestu (*Ribes grossularia* L.) i czereśni (*Prunus avium* L.) otrzymanych metodą *in vitro*. Ogólnopolska konferencja naukowa „Innowacyjne Ogrodnictwo Źródłem Produktów Wysokiej Jakości”, 04–06.06.2024, Lublin.
10. Wójcik, D., **Marat, M.**, Keller-Przybyłkiewicz, S., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2024). Badania nad wykorzystaniem tetraploidów jabłoni w hodowli odpornościowej. Ogólnopolska konferencja naukowa „Innowacyjne Ogrodnictwo Źródłem Produktów Wysokiej Jakości”, 04–06.06.2024, Lublin.
11. **Marat, M.**, Wójcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2024). Use of tetraploid forms of apple in breeding and evaluation of progeny seedlings. V European Horticulture Congress, 12-16.05.2024, Bukareszt, Rumunia.
12. Sochacki, D., Marciniak, P., Marasek-Ciołakowska, A., Podwyszyńska, M., **Marat, M.**, Zajączkowska, M. (2024). Evaluation of ploidy level and genome size of *Hippeastrum*. XIV International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials, 14-19.04.2024, Warszawa.
13. **Marat, M.**, Wójcik, D., Klamkowski, K., Marasek-Ciołakowska, A., Wójcik, K., Podwyszyńska, M., Treder, W. (2024). Study on the mechanisms of increased tolerance of apple tetraploids to drought stress. 12th annual University Research Symposium (URS), 04-05.03.2024, Alabama, USA.
14. **Marat M.**, Wójcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2023). Możliwość wykorzystania tetraploidalnych form jabłoni w hodowli i ocena uzyskanych siewek potomnych. Dni Młodego Naukowca, 09-10.11.2023, IHAR-PIB, Radzików.
15. Wójcik, D., **Marat, M.**, Keller-Przybyłkiewicz, S., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2023).

- Preliminary study on interploid crossing of apple (*Malus × domestica* Borkh.) to obtain triploid genotypes. XVI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 11-16.09.2023, Dresden-Pillnitz, Niemcy.
16. Trzewik, A., Kucharska, D., **Marat, M.**, Marasek-Ciołakowska, A. (2023). Extending the genetic variability of the gooseberry (*Ribes grossularia* L.) by *in vitro* polyploidization. XVI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 11-16.09.2023, Dresden-Pillnitz, Niemcy.
 17. **Marat, M.**, Wójcik, D., Klamkowski, K., Podwyszyńska, M., Wójcik, K., Treder, W. (2023). Badanie mechanizmów zwiększonej tolerancji autotetraploidów jabłoni na stres suszy. Konferencja naukowa „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” zorganizowanej w ramach VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 21-22.06.2023, Olsztyn.
 18. Wójcik, D., **Marat, M.**, Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M. (2023). Wpływ poliploidyzacji na rozwój generatywny jabłoni. Konferencja naukowa „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” zorganizowanej w ramach VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 21-22.06.2023, Olsztyn.
 19. Kucharska, D., **Marat, M.**, Marasek-Ciołakowska, A., Seliga, Ł. (2023). Podwajanie liczby chromosomów (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) ‘Amela’ metodą poliploidyzacji mitotycznej *in vitro*. Konferencja naukowa „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” zorganizowanej w ramach VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 21-22.06.2023, Olsztyn.
 20. Kucharska D., **Marat, M.**, Trzewik, A. (2023). Indukowanie poliploidów agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro*. Konferencja naukowa „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” zorganizowanej w ramach VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 21-22.06.2023, Olsztyn.
 21. **Marat M.**, Wójcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Buler, Z., Lewandowski, M., Podwyszyńska, M., Tomczyk, P., Filipczak, J. (2022). Phenotypic evaluation of autotetraploid apple. XXXI International Horticultural Congress, 14-20.08.2022, Angers, Francja.
 22. Trzewik, A., Kucharska, D., Podwyszyńska, M., **Marat, M.**, Marasek-Ciołakowska, A. (2022). Extending the genetic variability of the sweet cherry (*Prunus avium* L.) by *in vitro* polyploidization. XXXI International Horticultural Congress, 14-20.08.2022, Angers, Francja.
 23. **Marat, M.**, Wójcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Lewandowski M., Podwyszyńska, M. (2022). Ocena kwitnienia autotetraploidalnych klonów jabłoni odmiany ‘Pinova’ oraz możliwości krzyżowania z diploidalną odmianą jabłoni ‘Szampion’. „*Amor plantarum nos unit*”

LIX Zjazd w Stulecie Polskiego Towarzystwa Botanicznego, 26.06-03.07.2022, Warszawa.

24. Wójcik D., **Marat M.**, Góraj-Koniarska J., Klamkowski, K., Tomczyk, P., Podwyszyńska, M., Wójcik, K., Treder, W. (2022). Badanie reakcji odpornościowych autotetraploidów jabłoni na stres suszy. „*Amor plantarum nos unit*” LIX Zjazd w Stulecie Polskiego Towarzystwa Botanicznego, 26.06-03.07.2022, Warszawa.
25. **Marat, M.**, Kucharska, D., Podwyszyńska, M., Niewiadomska-Wnuk, A., Szymajda, M. (2022). Ocena wybranych cech fenotypowych u tetraploidalnych klonów czereśni *Prunus avium* L. „*Amor plantarum nos unit*” LIX Zjazd w Stulecie Polskiego Towarzystwa Botanicznego, 26.06-03.07.2022, Warszawa.
26. Kucharska, D., **Marat, M.**, Podwyszyńska, M., Marasek-Ciołakowska, A., Seliga, Ł. (2022). Indukowanie oktoploidów świdośliwy olcholistnej (*Amelanchier alnifolia* NUTT.) metodą poliploidyzacji *in vitro*. „*Amor plantarum nos unit*” LIX Zjazd w Stulecie Polskiego Towarzystwa Botanicznego, 26.06-03.07.2022, Warszawa.
27. **Marat, M.**, Wójcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Podwyszyńska, M. (2022). Phenotypic Differences Between Diploids and Autotetraploid Clones of Apple (*Malus × domestica* Borkh.). 11th annual University of West Alabama Research Symposium (URS), 08-09.03.2022, Alabama, USA.
28. **Marat, M.**, Wojcik, D., Marasek-Ciołakowska, A., Podwyszyńska, M. (2021). Ocena tetraploidów jabłoni w fazie generatywnej. Konferencja naukowa „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, 22-24.09.2021, Warszawa.
29. Wójcik, D., Podwyszyńska, M., Markiewicz, M., **Marat, M.**, Marasek-Ciołakowska, A., Buler, Z., Filipczak, J. (2021). Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni. Konferencja naukowa „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, 22-24.09.2021, Warszawa.
30. **Marat, M.**, Kucharska, D., Szymajda, M. (2021). Ocena wielkości genomu i poziomu ploidalności wybranych genotypów *Prunus cerasus* L. i *Prunus avium* L. oraz ich mieszańców. Konferencja naukowa „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku”, 22-24.09.2021, Warszawa.
31. **Marat, M.**, Wójcik, D., Podwyszyńska, M., Marasek-Ciołakowska, A. (2021). Evaluation of flowering apple tetraploids. 4th International Scientific Conference ‘Sustainable horticulture from plant to products: challenges in temperate climate’, 25-26.08.2021, Dobeles, Łotwa.

- **Projekty badawcze:**

1. Projekty finansowane w ramach funduszy europejskich – Program Rozwoju Obszarów Wiejskich:

- Opracowanie i wdrożenie innowacji w zakresie produkcji rabarbaru ogrodowego (*Rheum x hybridum*) o udoskonalonych cechach prozdrowotnych, sensorycznych i przetwórczych. (2023-2024), udział w projekcie – **wykonawca**.
 - Nowatorska technologia produkcji *in vitro* zdrowych, wysokiej jakości sadzonek rabarbaru (*Rheum rhaponticum* L.). (2020-2023), udział w projekcie – **wykonawca**.
2. Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, finansowane przez MRiRW:
- zadanie nr 45: Wytwarzanie autotetraploidów borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*) zdolnych do krzyżowania z borówką wysoką (*Vaccinium corymbosum*) oraz badanie mechanizmu molekularnego biosyntezy antocyjanów w miąższu owoców. (2021-2027), udział w projekcie – **wykonawca**.
 - zadanie nr 46: Zastosowanie poliploidyacji mitotycznej *in vitro* w indukowaniu zmienności genetycznej oraz możliwości poprawy wybranych cech użytkowych agrestu (*Ribes grossularia* L.) i czereśni (*Prunus avium* L.). (2021-2027), udział w projekcie- **wykonawca**.
 - zadanie nr 49: Tetraploidalna jabłoń jako źródło odporności na stesy biotyczne i abiotyczne – analiza mechanizmów odporności na zarzę ogniwą, parcha jabłoni i suszę oraz ocena zdolności do krzyżowania. (2021-2026), udział w projekcie – **wykonawca**.
3. Zadania realizowane w ramach DOTACJI CELOWEJ Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w roku 2025:
- zadanie 3.18. Opracowanie systemu edycji genomu techniką CRISPR/Cas oraz optymalizacja metod regeneracji i transformacji wybranych gatunków roślin jagodowych. (2025), udział w projekcie – **wykonawca**.
4. Projekty statutowe Instytutu Ogrodnictwa – Państwowego Instytutu Badawczego:
- Badania nad opracowaniem nowego modelu uprawy pomidora (*Lycopersicon esculentum*) w systemie wertykalnym w kontrolowanych warunkach ze sztucznym oświetleniem (2024-2027), udział w projekcie – **wykonawca**.
- **Kursy i staże:**
 1. 03-07.07.2023 - Wageningen University & Research- Image analysis for Plant Phenotyping
 2. 17-28.10.2022 - Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk – spektrofotometryczne metody oznaczania i analizy zawartości dialdehydu malonowego, proliny oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych
 3. 27.09-01.10.2021 - Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk - spektrofotometryczne metody oznaczania i analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych, zawartości białek, związków fenolowych, barwników i cukrów rozpuszczalnych w materiale roślinnym
 - **Zgłoszenia patentowe:**
 1. Trzewik, A., Kucharska, D., Podwyszyńska, M., **Marat, M.**, Szymajda M. (2024). Sposób otrzymywania tetraploidów czereśni (*Prunus avium* L.) w kulturach *in vitro* wniosek o udzielenie patentu na wynalazek o nr P.448893 z dn. 19.06.2024r.

- **Działalność naukowo-wdrożeniowa, upowszechnieniowa oraz popularyzacyjna:**
 1. Komitet organizacyjny: XIV International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials, 14-17.04.2024, Warszawa.
 2. Festiwal Młodych Naukowców organizowany w ramach Święta Kwiatów, Owoców i Warzyw, 2022, Skierniewice.
- **Wyróżnienia:**
 1. **The Third Place in Graduate Posters of The 2022 University Research Symposium:** Marat M., Wójcik D., Marasek-Ciołakowska A., Podwyszyńska M. 2022. Phenotypic differences between diploids and autotetraploid clones of apple (*Malus × domestica* Borkh.). 11th Annual University Research Symposium, 8-9 marca 2022, the University of West Alabama, Livingston, AL., USA
- **Przygotowane projekty badawcze, które nie uzyskały finansowania:**
 1. NCN PRELUDIUM 23 - Morfologiczne, fizjologiczne, biochemiczne i molekularne reakcje jabłoni (*Malus × domestica* Borkh.) o różnym poziomie ploidalności na stres wywołany deficytem wody
 2. NCN PRELUDIUM 22 - Badanie mechanizmów odporności jabłoni (*Malus × domestica* Borkh.) na stres suszy u genotypów o różnym poziomie ploidalności