

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

Streszczenie

Poliploidyzacja, 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 przepływowej), 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.

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

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.