



BADANIA NAD WYKORZYSTANIEM TETRAPLOIDÓW JABŁONI W HODOWLI ODPORNOŚCIOWEJ

CEL

Poliploidyacja jest zjawiskiem powszechnym w świecie roślin, mającym istotne znaczenie ewolucyjne, jest również szeroko wykorzystywana w hodowli roślin. Poliploidy jabłoni, a w szczególności triploidy, charakteryzują się lepszymi niż genotypy diploidalne cechami fenotypowymi, w tym także zwiększoną zdolnością adaptacji do czynników stresowych. Autotetraploidy jabłoni odmiany 'Free Redstar', uzyskane w Instytucie Ogrodnictwa-PIB, wykazują mniejszą podatność na parcha jabłoniowego (wywoływanego przez *Venturia inaequalis*) i większą tolerancję na suszę niż diploidalna odmiana wyjściowa. Celem prezentowanych badań jest ocena możliwości krzyżowania autotetraploidów 'Free Redstar' z odmianami diploidalnymi w celu uzyskania genotypów triploidalnych o wysokiej odporności na stropy biotyczne i abiotyczne.

MATERIAŁY I METODY

- Przeprowadzono krzyżowania interploidalne, w których genotypem matecznym była diploidalna odmiana 'Pinova', a genotypem ojcowskim – autotetraploidalny klon 'Free Redstar' 4x-3. Zapylenia poprzedzono zebraniem pyłku z kwiatów genotypów ojcowskich oraz kastracją kwiatów roślin matecznych. Pyłek klonu tetraploidalnego 'Free Redstar' 4x-3 oraz formy diploidalnej 'Free Redstar' przebadano pod względem żywotności i zdolności do kiełkowania na podłożach oraz na znamieniu słupka.
- Uzyskane siewki oceniono pod względem poziomu ploidalności, wielkości genomu i liczby chromosomów:
 - poziom ploidalności oraz zawartość jądrowego DNA (wielkość genomu) badano przy użyciu cytometru przepływowego,
 - liczbę chromosomów u siewek potomnych oceniano na preparatach chromosomowych wykonanych z merystemów korzeni.
- Do potwierdzenia statusu mieszańca genotypów potomnych zastosowano mikrosatelitarne markery molekularne (SSR). Przeprowadzono reakcje PCR z 10 oligonukleotydami komplementarnymi do fragmentów SSR genomu *Malus*: CN581493, BPPCT028, AJ001681, AJ000761, AJ32188, AT000400, AJ187627, AU301431, CN496913, AJ251116, wyznaczonych na podstawie analizy map referencyjnych genomu jabłoni oraz sekwencji dostępnych w bazach danych.
- Triploidalne rośliny potomne oraz rośliny rodzicielskie analizowano pod kątem obecności 4 genów odporności na parcha *Rvi*: *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi11* i *Rvi15*. Reakcje PCR prowadzono z 7 parami starterów. Wielkość i liczbę uzyskanych produktów amplifikacji oceniano na podstawie analizy elektroforogramów.

WNIOSKI

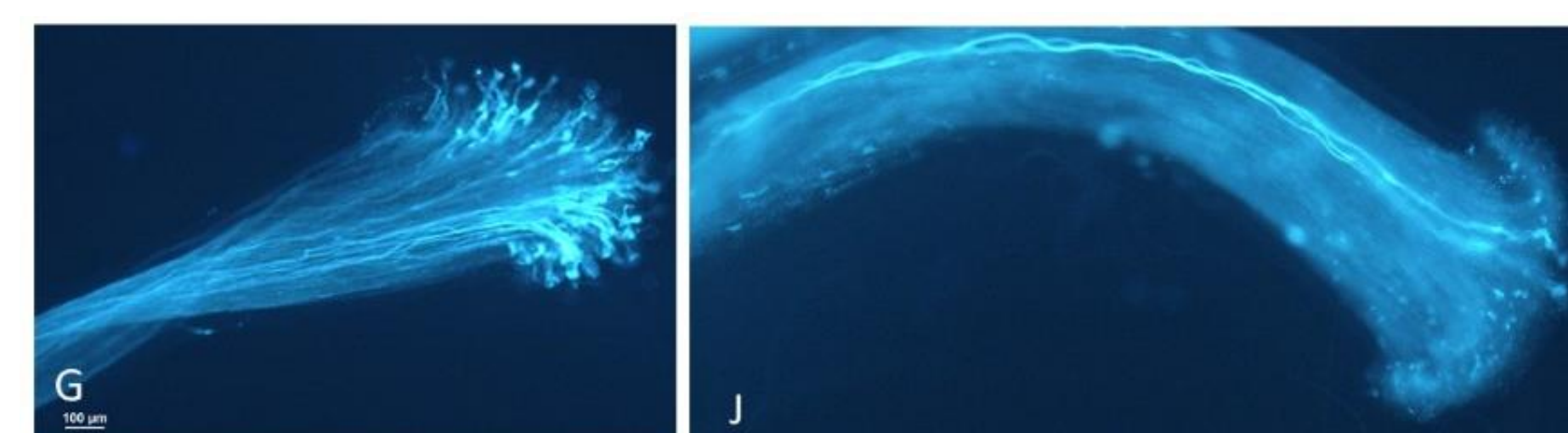
- Pomimo osłabionego kiełkowania i żywotności pyłku tetraploidalnego klonu 'Free Redstar' 4x-3, może być on z powodzeniem użyty w krzyżowaniach.
- Krzyżowania interploidalne 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3 pozwalają na uzyskanie triploidalnego potomstwa o mieszańcowym statusie genetycznym.
- Obecność genów *Rvi* w uzyskanych siewkach triploidalnych wskazuje, że genotypy te mogą charakteryzować się małą podatnością na parcha jabłoniowego.

WYNIKI

- Zaobserwowano, że żywotność i kiełkowanie pyłku klonu tetraploidalnego 'Free Redstar' 4x-3 było osłabione w porównaniu z diploidalną odmianą wyjściową 'Free Redstar'.
- W wyniku krzyżowania interploidalnego 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3 uzyskano 12 żywotnych siewek.
- Analiza cytometryczna oraz obserwacje liczby chromosomów wykazały, że wszystkie uzyskane siewki są triploidalne. W jądrach metafazowych siewek obserwowano 51 chromosomów, co u jabłoni stanowi potrójny garnitur chromosomów.
- Analiza markerów SSR potwierdziła, że wszystkie siewki pochodzą od form rodzicielskich użytych w krzyżowaniach.
- Analiza pod kątem obecności genów odporności na parcha jabłoniowego *Rvi* wykazała, że genotyp ojcowski 'Free Redstar' 4x-3 oraz większość siewek triploidalnych charakteryzuje się obecnością 3 spośród badanych genów.

TAB. 1. Charakterystyka pyłku formy diploidalnej (2x) i tetraploidalnego klonu 'Free Redstar'.

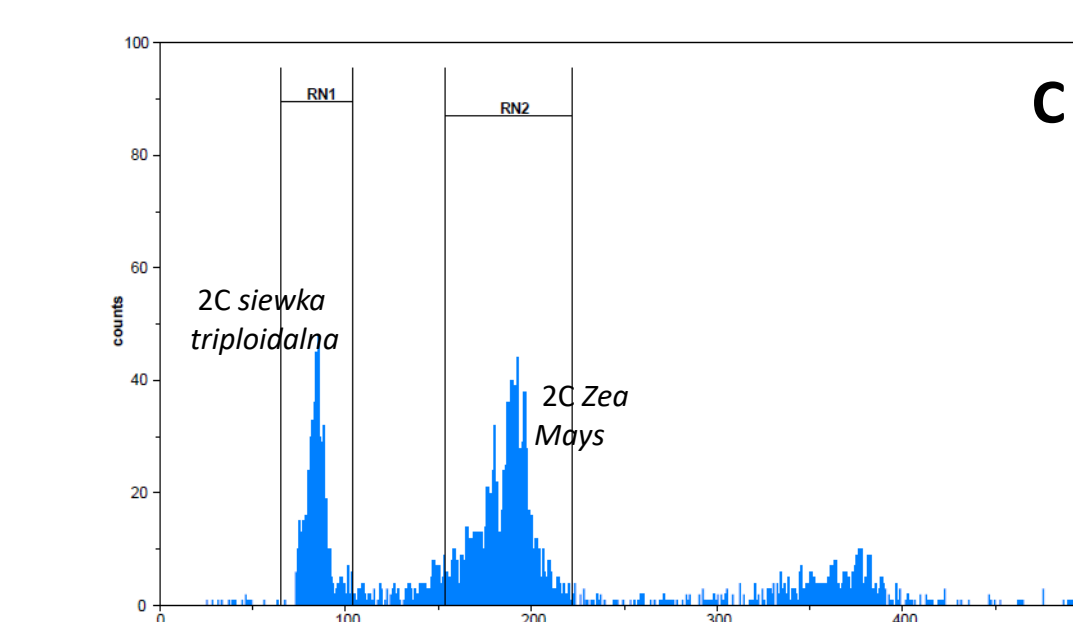
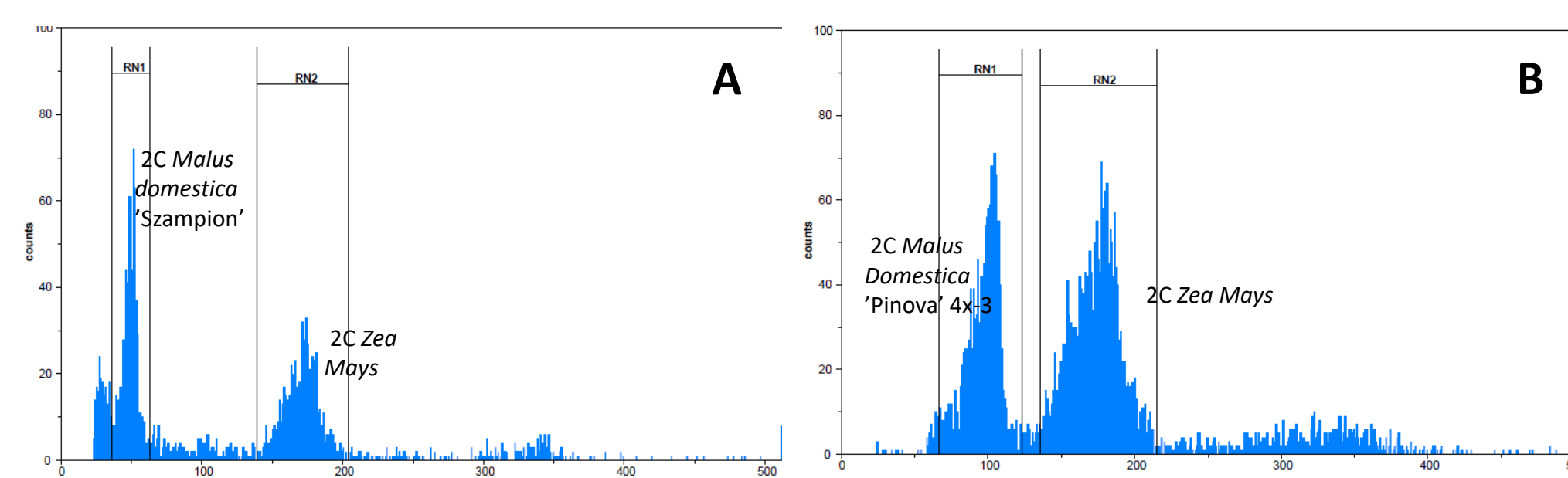
Genotyp	Żywotność pyłku (%)	Kiełkowanie pyłku na pożywce (%)
'Free Redstar' 2x	66	67
'Free Redstar' 4x-3	41	26



RYS. 1. Obserwacje mikroskopowe kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu i wzrostu łagiewek pyłkowych w słupkach.



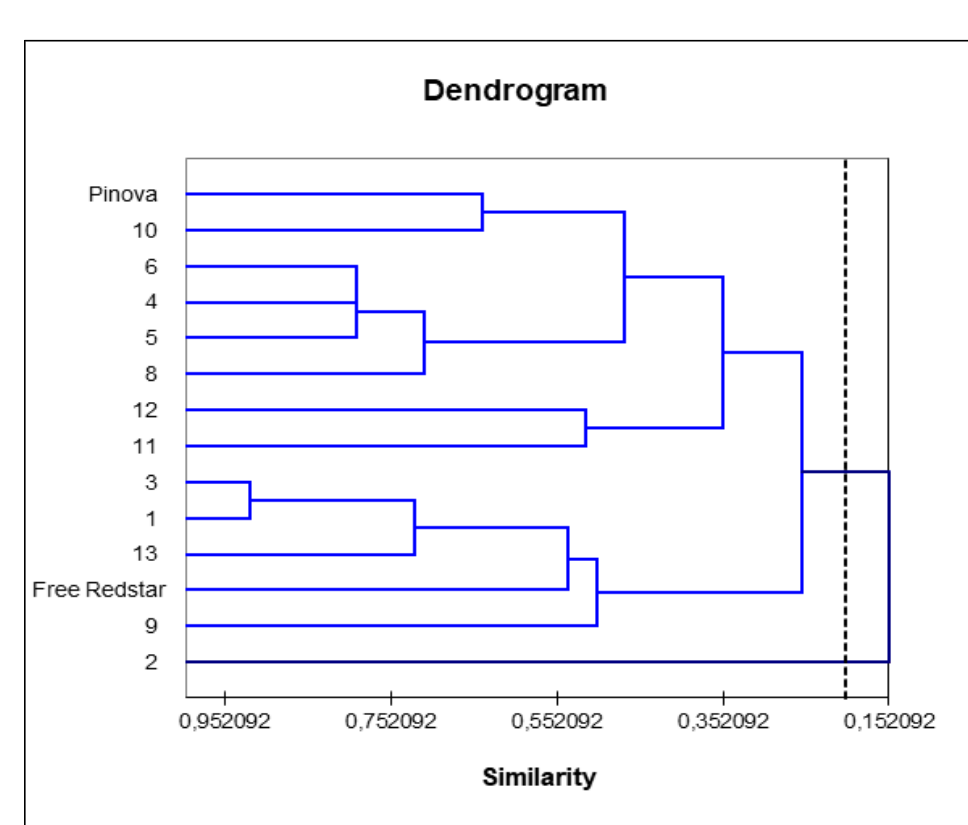
RYS. 2. Siewki uzyskane z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3.



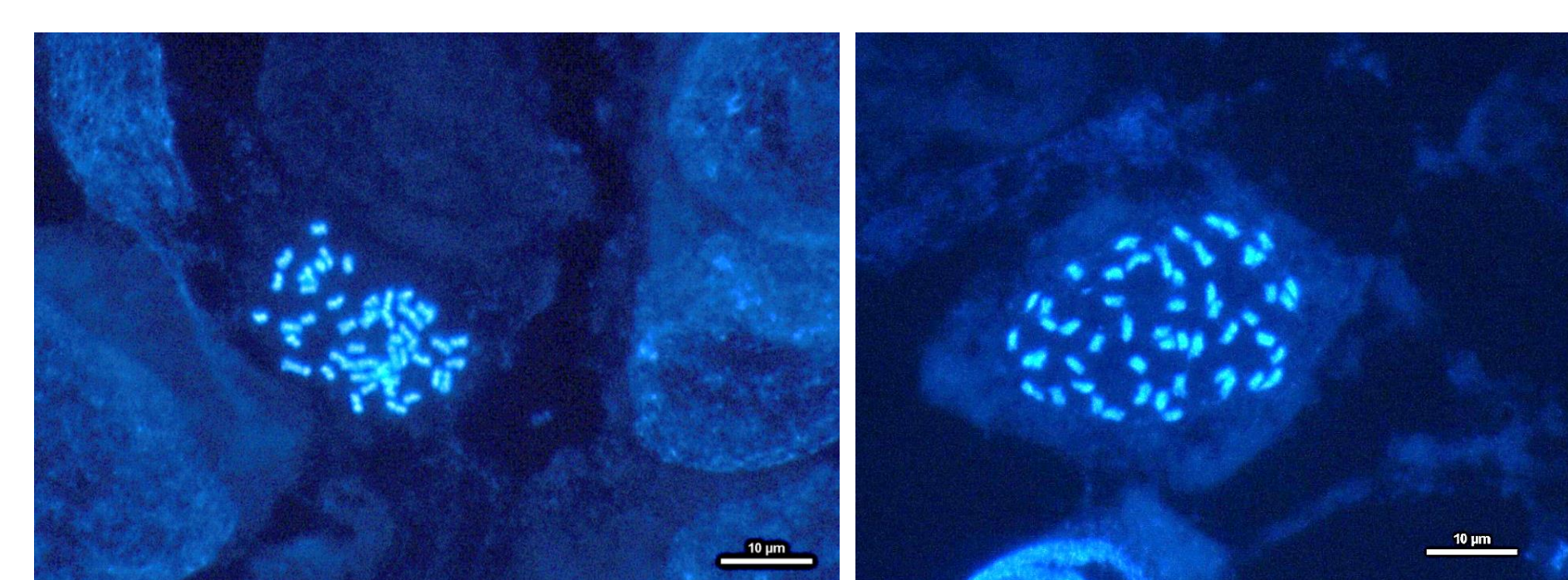
RYS. 3. Przykładowe histogramy analizy cytometrycznej genotypów jabłoni o różnym poziomie ploidalności: A - diploid (odmiana 'Szampion'), B - genotyp tetraploidalny ('Pinova' 4x-3), C - genotyp triploidalny (siewka 1 z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3).

TAB. 2. Zawartość jądrowego DNA oraz poziom ploidalności wybranych siewek triploidalnych oraz diploidalnego genotypu matecznego 'Pinova'.

Genotyp	Zawartość 2C DNA (pg)	Poziom ploidalności
'Pinova'	1,61	2x
Siewka 1	2,46	3x
Siewka 3	2,44	3x



RYS. 4. Dendrogram podobieństwa genetycznego roślin potomnych (1-13) oraz ich form rodzicielskich 'Pinova' 2x i 'Free Redstar' 4x-3 na podstawie identyfikacji loci markerów mikrosatelitarnych.

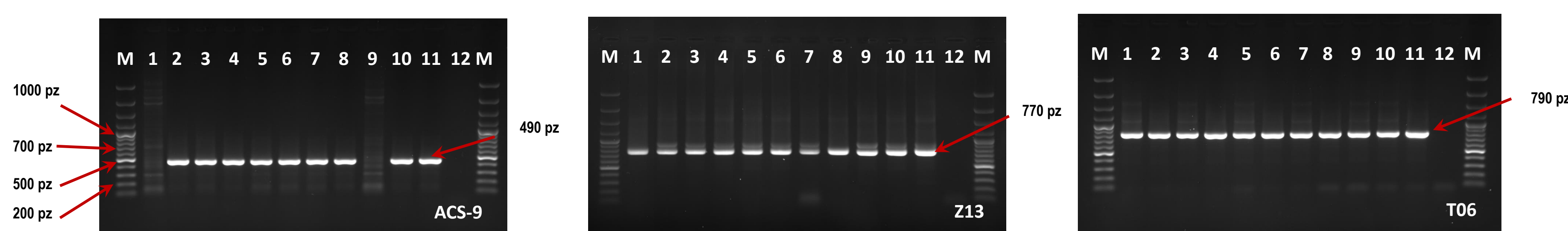


RYS. 5. Zdjęcia chromosomów triploidalnych genotypów hybrydowych uzyskanych z krzyżowania 'Pinova' 2x × 'Free Redstar' 4x-3.

TAB. 3. Startery użyte do analizy obecności genów odporności na parcha jabłoniowego *Rvi*.

Gen <i>Rvi</i>	Nazwa startera	Sekwencja starterów (5'-3')	Wielkość produktów (bp)
<i>Rvi5</i> (<i>Vm</i>)	OBP12	F: CCTTGACGCAGCTT	690 (R)
		R: CCTTGACGCATCTACG	
<i>Rvi6</i> (<i>Vf</i>)	ACS-7	F: GTGCCAATGTAATCAGAGTGACGTG R: ATGTAGGTGGTGTGATCTGGATT	320
	ACS-9	F: ACATGGAAGATGAAGGAGAAGGAG R: GATAAATGAGTGACTGCAAGCG	490
<i>Rvi11</i> (<i>Vbj</i>)	K08	F: GAACACTGGGCAAAGGAAAC R: TAAAGCCACGTTCTCTCGC	740 (R), 900
	T06	F: CGTTCAACTCATAAGTGGTCC R: AAGGGCAGAATGATAAAGCC	400 (R), 790
	Z13	F: CCCTAGCATGCCATAAACC R: CCCAGTGAATATTCGAGG	770 (R)
<i>Rvi15</i> (<i>Vr</i>)	AD13	F: GGTTCCTCTGTAAGCTAG R: GGTTCCTCTGCCAACA	950 (R), 1100, 1200, 1300

R - fragment sprzężony z odpornością na parcha jabłoni



RYS. 6. Elektroforogramy produktów uzyskanych w reakcji PCR ze starterami: ACS-9 (specyficznym dla genu *Rvi6*), Z13 i T06 (specyficznymi dla genu *Rvi11*). M - marker wielkości DNA 100 pz (Thermo Scientific); 1 - 'Pinova' 2x; 2 - 'Free Redstar' 4x-3; 3 - Siewka 1; 4 - siewka 2; 5 - siewka 4; 6 - siewka 5; 7 - siewka 8; 8 - siewka 9; 9 - siewka 11; 10 - siewka 12; 11 - siewka 13; 12 - kontrola negatywna reakcji.

TAB. 4. Obecność genów odporności na parcha jabłoniowego *Rvi* w genotypach rodzicielskich i triploidalnych siewkach potomnych.

Genotyp	Gen <i>Rvi</i>			
	<i>Rvi5</i>	<i>Rvi6</i>	<i>Rvi11</i>	<i>Rvi15</i>
'Pinova' 2x	-	-	+	+
'Free Redstar' 4x-3	-	+	+	+
Siewka 1	-	+	+	+
Siewka 2	-	+	+	+
Siewka 4	-	+	+	+
Siewka 5	-	+	+	+
Siewka 8	-	+	+	+
Siewka 9	-	+	+	+
Siewka 11	-	-	+	+
Siewka 12	-	+	+	+
Siewka 13	-	+	+	+