

Zastosowanie poliploidyzacji mitotycznej *in vitro* w indukowaniu zmienności genetycznej oraz możliwości poprawy wybranych cech użytkowych agrestu (*Ribes grossularia* L.) i czereśni (*Prunus avium* L.)

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice

Badania Podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
zadanie 46, okres realizacji 2021 – 2027

Kierownik zadania: Aleksandra Trzewik aleksandra.trzewik@inhort.pl

Wykonawcy: Danuta Kucharska, Małgorzata Podwyszyńska, Marek Szymajda, Monika Marat, Angelika Niewiadomska-Wnuk, Małgorzata Grzelak, Piotr Skręta

Cele/tematy badawcze projektu w 2023 r.

1. Otrzymanie poliploidów *in vitro* 3 genotypów agrestu i 2 odmian czereśni.
2. Określenie poziomu ploidalności pędów zregenerowanych po działaniu antymitotyków oraz potwierdzenie statusu otrzymanych tetraploidów przy użyciu cytometrii przepływowej (FCM).
3. Otrzymanie i dalsza uprawa tetraploidalnych roślin agrestu i czereśni indukowanych w 2022 roku.
4. Rozmnożenie wegetatywne (klonowanie) uzyskanych tetraploidalnych form czereśni poprzez ich szczepienie i okulizację na wegetatywnej podkładce 'Gisela 5'.
5. Ocena w warunkach szklarniowych parametrów wzrostu, zawartości chlorofilu oraz liczby i wielkości aparatów szparkowych tetraploidów, w porównaniu do diploidalnych odpowiedników.

Wszystkie cele zostały osiągnięte

Materiały i metody

Temat 1. W celu indukowania poliploidów, kultury pędowe *in vitro* 3 genotypów agrestu: klonu AGR9, 'Captivator' 'Macurines' poddano działaniu antymitotyków: kolchicyny i APM, a czereśni 'Regina' i 'Liliana', kolchicyny, trifluraliny, oryzaliny oraz APM. Pędy inkubowano w ciemności 2 tyg. Następnie wystawiano na światło 2 tyg. Oceniano fitotoksyczność a pędy, które przeżyły przekładano na pożywki do namnażania, właściwe dla danego gatunku. Po 4 tyg. z regenerantów pobierano młode liście i poddawano ocenie poziomu ploidalności metodą cytometrii przepływowej (FCM-DAPI/PI).

Temat 2. Materiałem badawczym były młode liście pobierane z regenerantów (mikso-ploidów i tetraploidów), 2 odmian agrestu 'Invicta' i 'Biały Triumf' oraz 2 odmian czereśni 'Tamara' i 'Rita' otrzymanych po działaniu antymitotyków w 2022 a także z regenerantów i tetraploidów zaindukowanych w 2023 roku w temacie badawczym 1: czereśni „Regina i 'Liliana' oraz agrestu 'Captivator', 'Macurines' i AGR9. Łącznie 5 genotypów agrestu i 4 odmiany czereśni. Młode liście z regenerantów *in vitro* oraz z roślin tetraploidalnych ze szklarni, zostały wykorzystane w analizach cytometrycznych poprzez ocenę poziomu ploidalności (FCM-DAPI/PI). W celu potwierdzenia statusu tetraploidów agrestu z wierzchołków korzeni przygotowano preparaty chromosomów somatycznych w fazie metafazowej i obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym, przy użyciu światła UV.

Temat 3. Materiałem do badań były pędy tetraploidalne agrestu otrzymane w 2022 i 2023 roku: dla odmiany 'Biały Triumf' A18-4x, A21-4x, A7/2-4x, A8/1-4x, A15/1-4x i A23-4x oraz dla klonu hodowlanego AGR9 A51/1-4x, B15/3-4x i B20/1-4x. Ukorzeniano również pędy tetraploidalne czereśni 'Tamara' B3/6-4x, H13-4x oraz 'Rita' E17-4x. Tetraploidalne pędy rozmnażano *in vitro* na pożywce, która zawierała: dla agrestu sole WPM, 0,2 mg/l mT, 0,1 mg/l GA3, 0,1 mg/l IAA, dla czereśni sole MS; 0,8 mg/l BAP; 1,0 mg/l GA3; 0,01 mg/l IBA. Pędy ukorzeniano *in vitro* na pożywce z dodatkiem auksyny IBA. Oceniano wysokość pędów, liczbę liści, i długość korzeni oraz procent pędów ukorzenionych. Ukorzenione *in vitro* rośliny, aklimatyzowano w szklarni.

Temat 4. Do rozmnożenia tetraploidalnych form czereśni wykorzystano podkładkę 'Gisela 5'. W styczniu wykonano szczepienie zimowe wykorzystując oczka 3 tetraploidalnych linii C5-4x, C7-4x oraz D4-4x odmiany 'Merton Premier'. Zaszczepione podkładki oraz podkładki do lipcowej okulizacji, zostały posadzone w wysokim tunelu foliowym do foliowych cylindrów. Na przełomie lipca i sierpnia wykonano letnią okulizację oczkami tetraploidalnej linii C5-4x odm.'Merton Premier' i 2 tetraploidalnych linii B3/6-4x oraz H13-4x odm. 'Tamara'. Łącznie rozmnożono 5 linii tetraploidalnych i 2 odmiany czereśni jako kontrolę.

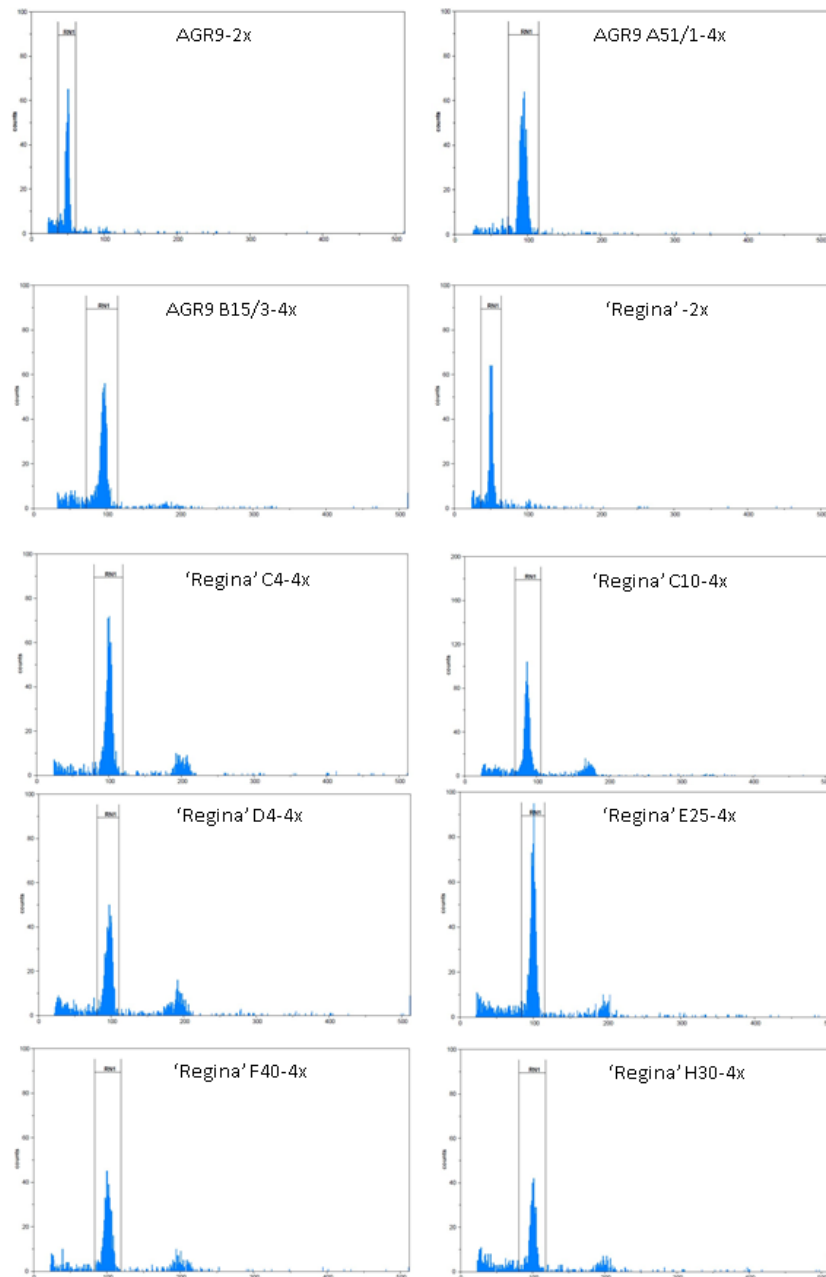
Temat 5. Materiał badawczy stanowiły 2 tetraploidy czereśni: B3/6-4x, H13-4x w odmianie 'Tamara' oraz tetraploidy C5-4x, C7-4x, D4-4x odmiany 'Merton Premier', które rosły odpowiednio w szklarni i w tunelu foliowym. Po aklimatyzacji rozpoczęto pomiary parametrów morfologicznych i fizjologicznych. Określono dynamikę wzrostu roślin, liczbę międzywęźli, średnicę pędu, zawartość chlorofilu oraz gęstość i długość aparatów szparkowych.

Temat 1. Wyniki

Dla 3 genotypów agrestu wykonano łącznie 124 analizy ploidalności. Otrzymano 40 miksploidów. W klonie agrestu AGR9 wykryto 4 tetraploidy po traktowaniu kolchicyną. Dla 2 odmian czereśni wykonano 439 analiz ploidalności. Otrzymano 147 miksploidów. Pędy pochodzące z rozmnożenia miksploidów poddawano dalszej analizie. Otrzymano 17 tetraploidów w odmianie 'Regina' po traktowaniu trifluraliną, oryzaliną oraz APM oraz 1 tetraploid w odmianie 'Liliana'.

Wnioski

1. Zoptymalizowano procedury indukowania poliploidów *in vitro* dla klonu agrestu AGR9 oraz dla odmian czereśni 'Regina' i 'Liliana'.
2. Dla pędów *in vitro* odmian agrestu 'Captivator' i 'Macurines' antymitotyk kolchicyna w stężeniu 150 mg/l był całkowicie fitotoksyczny.
3. Dla pędów *in vitro* czereśni 'Regina' i 'Liliana' żaden z zastosowanych antymitotyków nie był całkowicie fitotoksyczny, w każdej z kombinacji część pędów przeżyła i podjęła namnażanie.
4. Dla klonu agrestu AGR9 wykryto 4 tetraploidy po traktowaniu kolchicyną.
5. Dla odmiany 'Regina' otrzymano 17 tetraploidów po traktowaniu trifluraliną, oryzaliną oraz APM.
6. Dla odmiany 'Liliana' otrzymano 1 tetraploid po traktowaniu oryzaliną, ale wymaga on dalszego potwierdzenia tetraploidalnego statusu.



Fot. 1. Histogramy roślin diploidalnych (2x) oraz tetraploidalnych (4x) agrestu i czereśni.

Temat 3. Wyniki

Podjęto próbę ukorzenienia tetraploidalnych pędów agrestu 'Biały Triumf' oraz AGR9. W odmianie 'Biały Triumf' wszystkie pędy w liniach A7/2-4x, A8/1-4x, A15/1-4x i A23-4x zamarty. W klonie AGR9 udało się uzyskać 3 rośliny tetraploidalne z linii A51/1-4x (Fot. 2) i 1 roślinę z linii B20/1-4x. Parametry namnażania ukorzeniania *in vitro* pędów tetraploidalnych w obu odmianach czereśni były zbliżone do kontroli, jedynie wysokość pędów była wyraźnie niższa niż pędów kontrolnych (Fot. 3). Odsetek ukorzenionych pędów tetraploidalnych wynosił od 69,4 do 89,6%. Uzyskano ukorzenione tetraploidalne rośliny czereśni, które poddano aklimatyzacji i dalszej uprawie w szklarni. W odmianie 'Tamara' odsetek roślin tetraploidalnych po aklimatyzacji wynosił od 88,1 dla linii B3/6-4x do 61,9 dla linii H13-4x. Uzyskano łącznie 56 roślin tetraploidalnych i 19 roślin kontrolnych. W odmianie 'Rita' Uzyskano 19 roślin kontrolnych oraz 30 roślin linii E17-4x. Jednak analizy potwierdzające status tetraploidalny wykazały, iż genotyp E17 jest diploidalny.



Fot. 2. Tetraploidy A51/1-4x agrestu AGR9 po aklimatyzacji w szklarni.



Fot. 3. Rośliny kontrolne oraz tetraploidy czereśni 'Tamara' po ukorzenianiu *in vitro*.

Wnioski

1. W odmianie agrestu 'Biały Triumf' wszystkie pędy tetraploidalny poddane ukorzenianiu *in vitro* zamarty.
2. W klonie AGR9 pomimo liczego zamierania, udało się uzyskać 3 rośliny tetraploidalne z linii A51/1-4x i 1 roślinę z linii B20/1-4x.
3. Zoptymalizowano pożywkę do ukorzeniania *in vitro* tetraploidalnych pędów agrestu, co zwiększyło procent pędów ukorzenionych do 14,3 dla odmiany 'Biały Triumf' oraz do 52,4 dla klonu agrestu AGR9.
4. Współczynnik namnażania *in vitro* tetraploidalnych pędów czereśni w obu odmianach był zbliżony do kontroli, jedynie wysokość pędów była wyraźnie niższa niż pędów kontrolnych.
5. Odsetek ukorzeniania *in vitro* tetraploidalnych pędów czereśni wynosił od 89,6 u odmiany 'Tamara' do 69,4 u odmiany 'Rita'.
6. Powodzenie aklimatyzacji u roślin tetraploidalnych odmiany 'Tamara' wynosiło 73% i uzyskano łącznie 56 roślin tetraploidalnych dla linii B3/6-4x i H13-4x.
7. W wyniku analiz cytometrycznych potwierdzających status tetraploidalny roślin w szklarni wykryto, iż genotyp E17 w odmianie 'Rita' wrócił do formy diploidalnej.

Temat 4. Wyniki

W szczepieniu zimowym użyto 3 oczka diploidalne odmiany 'Merton Premier' jako kontrola oraz 42 oczka tetraploidów. Oczka kontrolne przyjęły się w 100 procentach, natomiast oczka tetraploidów przyjęły się w 25% dla linii tetraploidalnej C7-4x co dało 5 roślin tetraploidalnych szczepionych i 45,5% dla linii D4-4x co dało 6 roślin szczepionych o statusie tetraploida (Fot. 4A). Za pomocą zimowego szczepienia nie uzyskano roślin tetraploidalnych z linii C5-4x. Do letniej okulizacji zostało użytych 14 oczek kontrolnych i 26 oczek tetraploidalnych (Tab. 3). Stopień przyjęcia się oczek będzie można ocenić wiosną 2024 roku po ruszeniu wegetacji. Podkładki, na których zimowe szczepienie powiodło się w liczbie 13 oraz rośliny tetraploidalne na własnych korzeniach w liczbie 34, posadzono w kwaterze hodowlanej Sadu Doświadczalnego w Dąbrowicach (Tab. 4, Fot. 4B). Zaokulizowane latem podkładki, przez okres zimowy będą przechowywane w tunelu foliowym lub piwnicy szkółkarskiej, następnie uprawiane w wysokim tunelu foliowym a jesienią 2024 roku zostaną wysadzone w Sadzie Doświadczalnym.



Fot. 4. A: wzrost podkładek zaszczepionych zimą, B: rośliny tetraploidalne i kontrolne w kwaterze hodowlanej Sadu Doświadczalnego w Dąbrowicach

Tetraploid	Ilość wykonanych szczepień (oczek)	Ilość udanych szczepień	% udanych szczepień
Szczepienie zimowe			
MP-2x	3	3	100
MP D4-4x	11	5	45,5
MP C5-4x	7	0	0
MP C7-4x	24	6	25,0
Łącznie	45	14	31,1
Lenia okulizacja			
MP-2x	6	*	
MP C5-4x	10		
Tamara-2x	8		
Tamara B3/6-4x	4		
Tamara H13-4x	12		
Łącznie	40		

Tab. 3. Szczepienie zimowe i lenia okulizacja czereśni 'Merton Premier' (MP) i 'Tamara'

Genotyp	Liczba roślin na własnych korzeniach	Liczba roślin szczepionych
MP kontrola	3	3
MP C5-4x	2	0
MP C7-4x	15	6
MP D4-4x	6	4
Tamara kontrola	3	0
Tamara B3/6-4x	3	0
Tamara H13-4x	3	0
Łącznie	34	13

Tab. 4. Liczba i rodzaj roślin posadzonych w kwaterze hodowlanej Sadu Doświadczalnego w Dąbrowicach

Wnioski

1. W szczepieniu zimowym odsetek przyjętych tetraploidalnych oczek odmiany 'Merton Premier' wynosił odpowiednio: dla linii C7-4x i D4-4x 25 i 45,5% co dało łącznie 11 roślin szczepionych o statusie tetraploida.
2. Do letniej okulizacji użyto 14 oczek kontrolnych i 26 oczek tetraploidalnych.
3. Zaszczepione tetraploidalnymi oczkami podkładki oraz kontrolne i tetraploidalne rośliny na własnych korzeniach posadzono w kwaterze hodowlanej Sadu Doświadczalnego w Dąbrowicach.

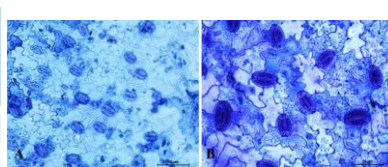
Temat 5. Wyniki

Największą dynamikę wzrostu wykazywały kontrolne rośliny czereśni odmiany 'Tamara', które po pięciu miesiącach wzrostu w szklarni osiągnęły średnią wysokość 161 cm. Podobnie największą liczbę międzywęźli oraz średnicę pędu po tym okresie, odnotowano u roślin kontrolnych (Tab. 5). Najmniejszymi aparatami szparkowymi (22,4 μm) i największą ich gęstością (91,3/mm²) charakteryzował się diploidalny genotyp kontrolny czereśni odmiany 'Tamara'. U genotypów tetraploidalnych aparaty szparkowe były większe, jednak ich gęstość była mniejsza w porównaniu do diploidalnej kontroli (Tab. 6, Fot. 5). Indeks zawartość chlorofilu u genotypów tetraploidalnych był wyższy w porównaniu do diploidalnego odpowiednika zarówno po 2, jak i 5 miesiącach wzrostu w szklarni (Tab. 6). Tetraploidy obu linii cechowały się dużym zróżnicowaniem we wzroście (Fot. 6). Tetraploidy agrestu AGR9 20/1-4x i AGR9 51-4x klonu AGR9 cechowały się mniejszą dynamiką wzrostu w porównaniu do diploidalnej kontrolnego. Średnia wysokość AGR9 20/1-4x wynosiła 3,0 cm, AGR9 51-4x 8,6 cm, a roślin kontrolnych klonu AGR9 45,5 cm.

Pomiary parametrów morfologicznych i fizjologicznych tetraploidów C5-4x, C7-4x, D4-4x odmiany 'Merton Premier' i ich diploidalnych odpowiedników, które zimowały w tunelu foliowym wykazały, że przyrost wysokości i średnicy pędu roślin kontrolnych był większy w porównaniu do genotypów tetraploidalnych. Najmniejszymi aparatami szparkowymi i największą ich gęstością charakteryzował się diploidalny genotyp kontrolny czereśni odmiany 'Merton Premier'. Indeks zawartość chlorofilu u genotypów tetraploidalnych był wyższy w porównaniu do diploidalnego odpowiednika (Tab. 7).

Tetraploidy	Wysokość pędów po wysadzeniu (cm)	Liczba międzywęźli (szt.)	Średnica pędu (mm)
Kontrola-2x	161,0	48,0	13,0
B3/6-4x	69,0	21,0	10,9
H13-4x	56,5	19,0	9,9

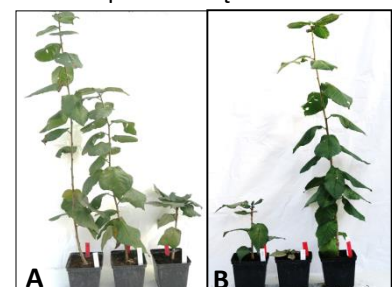
Tab. 5. Wysokość pędów, liczba międzywęźli oraz średnica pędu tetraploidów i roślin kontrolnych czereśni odmiany 'Tamara' po 5 miesiącach wzrostu w szklarni



Fot. 5. Wielkość i gęstość aparatów szparkowych czereśni odmiany 'Tamara'; A: diploid, B: tetraploid B3/6-4x; Bar 10 μm

Tetraploid	Aparaty szparkowe		Indeks chlorofilu po 2 miesiącach wzrostu	Indeks chlorofilu po 5 miesiącach wzrostu
	Gęstość (szt./1mm ²)	Długość (μm)		
Kontrola-2x	91,3	22,4	15,9	19,1
B3/6-4x	42,8	37,8	20,4	24,0
H13-4x	45,0	36,0	21,3	24,3

Tab. 6. Gęstość i długość aparatów szparkowych, zawartość chlorofilu u tetraploidów i roślin kontrolnych czereśni odmiany 'Tamara'



Fot. 6. Zróżnicowanie wzrostu roślin tetraploidalnych odpowiednio u linii A: B3/6-4x; B: H13-4x

Tetraploidy	Przyrost wysokości pędu (cm)	Przyrost średnicy pędu (cm)	Aparaty szparkowe		Powierzchnia liści (cm ²)	Indeks zawartości chlorofilu po 3 miesiącach wzrostu
			Gęstość (szt./1 mm ²)	Długość (μm)		
Kontrola-2x	103,3	5,1	137	26,0	116,3	17,0
C5-4x	82,3	3,3	112	29,1	119,2	19,2
C7-4x	74,5	2,5	94	28,6	170,4	17,7
D4-4x	78,9	2,5	76	30,2	136,1	18,3

Tab. 7. Przyrost wysokości i średnicy pędu, gęstość i długość aparatów szparkowych, powierzchnia liści, indeks zawartości chlorofilu u tetraploidów i roślin kontrolnych czereśni odmiany 'Merton Premier' po trzech miesiącach wzrostu w tunelu

Wnioski

1. Tetraploidy czereśni 'Tamara' i agrestu AGR9 rosnące w szklarni oraz tetraploidy czereśni 'Merton Premier' rosnące w tunelu foliowym miały mniejszą dynamikę wzrostu niż ich diploidalne odpowiedniki.
2. Gęstość aparatów szparkowych diploidalnych roślin kontrolnych agrestu i czereśni była większa w porównaniu do roślin tetraploidalnych, natomiast długość aparatów szparkowych była większa u tetraploidów.
3. Indeks zawartość chlorofilu u genotypów tetraploidalnych czereśni był wyższy niż u roślin diploidalnych.
4. Tetraploidalne rośliny czereśni miały większą powierzchnię liści w porównaniu do diploidalnych roślin kontrolnych.

Mierniki zadania – stopień realizacji

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
Temat badawczy 1				
1.1	Liczba odmian poddanych poliploidyacji (3 odmiany agrestu i 2 odmiany czereśni)	4	5	1,25
1.2	Liczba kombinacji pożywek do poliploidyacji czereśni (4 antymitotyki x 2 stężenia)	8	8	1,0
1.3	Liczba kombinacji pożywek do poliploidyacji agrestu (2 antymitotyki x 2 stężenia)	4	4	1,0
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba analizowanych odmian (5 odmian agrestu i 3 odmiany czereśni).	8	9	1,13
2.2	Liczba analiz (FCM-DAPI i FCM-PI)	2	2	1,0
Temat badawczy 3				
3.1	Liczba rozmnażanych tetraploidów in vitro (3 agrestu i 3 czereśni)	6	10	1,6
3.2	Liczba otrzymanych roślin tetraploidalnych (6 genotypów x 5 roślin/genotyp)	30	60	2
Temat badawczy 4				
4.1	Liczba rozmnożonych linii czereśni (MP kontrola + 3 linie MP tetraploidalne, 'Tamara' kontrola+2 linie tetraploidalne 'Tamara')	8	7	0,88
4.2	Liczba zaokulizowanych oczek	80	85	1,1
Temat badawczy 5				
5.1	Liczba pomiarów parametrów morfologicznych (wysokość, liczba międzywęźli, dynamika wzrostu)	3	3	1,0
5.2	Liczba pomiarów parametrów fizjologicznych (zawartość chlorofilu)	1	1	1,0
5.3	Liczba analiz mikroskopowych (liczba i wielkość aparatów szparkowych)	2	2	1,0
Średnia				1,16
% realizacji zadania				116

Prezentacja wyników



Danuta Kucharska, Monika Marat, Aleksandra Trzewik
Instytut Ogródnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice



Indukowanie poliploidów agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro*

WSTĘP

Poliploidy są szeroko wykorzystywane w programach hodowlanych wielu roślin użytkowych. Charakteryzują się bujnym wzrostem, większą zawartością chlorofilu czy większą odpornością na biotyczne lub abiotyczne czynniki stresowe.

Celem badań było opracowanie metody poliploidyzacji *in vitro* agrestu (*Ribes grossularia* L.) oraz wytworzenie tetraploidów o nowych cechach takich jak zwiększone parametry wielkości i jakości owoców, przydatnych do dalszej hodowli twórczej. Do badań wybrano 4 odmiany agrestu 'Captivator', 'Invicta', 'Macurines' i 'Biały Triumf', różniące się kolorem owoców, obecnością kolców oraz odpornością na amerykańskiego mączniaka agrestu (*Podosphaera mors-uvae*).



MATERIAL I METODY

Do badań wykorzystano 4-tygodniowe kultury pędów bocznych, inkubowane na pożywie do namnażania z dodatkiem jednego z antymityków: kolchicyny trifluraliny, oryzaliny i amiprofosu metylu (APM) w dwóch stężeniach każdy. Podstawowa pożywa do namnażania agrestu zawierała: sole Murashige i Skoog (MS), 0,5 mg/l meta-topoliny (mT), 0,1 mg/l gibereliny (GA3), 0,1 mg/l kwas indolilo-3-octowy (IAA). Na pożywkach z antymitykami pędy inkubowano przez cztery tygodnie (dwa tygodnie w ciemności następnie na świetle). Oceniano fitotoksyczność i współczynnik namnażania pędów. Pędy, które przeżyły przekładano na standardową pożywkę do mikrorozmnażania agrestu.

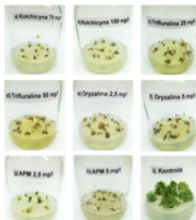
Po czterech tygodniach z regeneratów różniących się fenotypowo tzn. krótszych, grubszych, mających ciemniejsze i drobniejsze liście pobierano próby liściowe, które analizowano metodą cytometri przepływowej FCM-DAPI.

WYNIKI

Fitotoksyczne działanie antymityków było zróżnicowane i zależne od odmiany agrestu. Trifluralina i oryzalina okazały się całkowicie fitotoksyczne dla wszystkich badanych odmian agrestu. Kolchicina i APM były fitotoksyczne w dużym stopniu, jednak pojedyncze pędy przetrwały i podjęły namnażanie (Tab. 1, Rys. 1). Zastosowanie AMP dla odmiany 'Biały Triumf' nie powodowało nekrozy pędów.

Tab. 1. Ocena fitotoksycznego działania antymityków po 4 tygodniach inkubacji

ANTYMITYK (mg/l)	% PĘDÓW NEKROTYCZNYCH			
	BIAŁY TRIUMF	CAPTIVATOR	INVICTA	MACURINES
AMP 2,5	0	12	62	33
AMP 5,0	0	88	88	68
KOLCHICYNINA 75	61	40	81	45
KOLCHICYNINA 150	82	80	92	91
ORYZALINA 2,5	100	100	100	100
ORYZALINA 5,0	100	100	100	100
TRIFLURALINA 25	100	100	100	100
TRIFLURALINA 50	100	100	100	100
KONTROLA	0	0	0	0

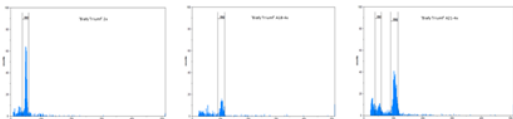


RYS. 1. Wykresy obrazujące dodanie antymityków na fitotoksyczność kultur *in vitro* agrestu odm. 'Captivator'

Otrzymano tetraploidy po traktowaniu kolchicyną i APM: 6 dla odmiany 'Biały Triumf', 4 dla odmiany 'Macurines' oraz po 1 dla odmian 'Captivator' i 'Invicta' (Tab. 2). Tetraploidy agrestu w małym stopniu podejmują namnażanie w kulturach *in vitro*. Tetraploidy odmiany 'Captivator' i 3 tetraploidy odmiany 'Macurines' nie podjęły namnażania *in vitro* i zamary, jeden tetraploid G15-4x w odmianie 'Macurines' jest rozmnażany *in vitro*, ale nie można potwierdzić jego tetraploidnego statusu, gdyż badania płodności wykazują, że jest miksploidem, podobnie tetraploidy B12-4x w odmianie 'Invicta'. Tetraploidy w odmianie 'Biały Triumf': A 72-4x, A 81-4x, A 151-4x, A 18-4x, A 21-4x i A 23-4x są rozmnażane *in vitro* i będą poddawane dalszym analizom w celu potwierdzenia ich tetraploidnego statusu (Rys. 2).

Tab. 2. Wykrywalność mikro- i tetraploidów agrestu

ANTYMITYK (mg/l)	LICZBA ANALIZ PŁODNOŚCI	LICZBA WYKRYTYCH MIKSPLOIDÓW	LICZBA WYKRYTYCH TETRAPLOIDÓW	LICZBA POTWIERDZONYCH TETRAPLOIDÓW
BIAŁY TRIUMF	120	9	6	6
CAPTIVATOR	58	2	1	0
INVICTA	135	14	1	0
MACURINES	65	3	4	0



RYS. 2. Histogramy diploidnej odmiany 'Biały Triumf' (2x) oraz roślin tetraploidnych (4x).

Badania finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej Zadanie 46

www.inhort.pl

Załącznik nr 1. VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogródniczych „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka” 21-22 czerwiec 2023 Olsztyn „Indukowanie poliploidów agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro*” Autorzy: Danuta Kucharska, Monika Marat, Aleksandra Trzewik



Aleksandra Trzewik, Danuta Kucharska,
Monika Marat, Agnieszka Marasek-Ciołakowska
The National Institute of Horticultural Research, Poland
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice



Extending the genetic variability of the gooseberry (*Ribes grossularia* L.) by *in vitro* polyploidization

INTRODUCTION

Gooseberry (*Ribes grossularia* L.) belongs to the genus *Ribes* L., which includes more than 150 different species. Its fruits are attractive due to their low caloric content, high content of health-promoting substances, i.e. mineral salts, vitamins and phenolic substances - flavones and anthocyanins. The basic number of chromosomes of all *Ribes* species is $x = 8$ and in diploid genotypes $2n = 2x = 16$.

The aim of the study was to develop an *in vitro* polyploidization method for gooseberry and to produce tetraploids with new traits such as increased fruit size and quality parameters, suitable for further breeding. Five gooseberry genotypes 'Captivator', 'Invicta', 'Macurines' and 'White Triumph' and clone AGR9 were selected for the study. The genotypes differed in fruit color, presence of thorns and resistance to American gooseberry powdery mildew (*Podosphaera mors-uvae*).

MATERIAL AND METHODS

In order to induce chromosome doubling, 4-week-old lateral shoots were treated with colchicine (75 and 150 mg L⁻¹) and aminoprofos methyl (AMP, 2.0 and 5.0 mg L⁻¹). Standard propagation medium containing Lloyd and McCown (WPM) salts and 0.2 mg L⁻¹ meta-topoline. Four weeks after antimitotic treatments, the leaf samples were collected from regenerants that differed phenotypically, i.e. shorter, thicker, having darker and finer leaves, and were analyzed by flow cytometry (FCM-DAPI). *In vitro* rooting was carried out using medium containing 1/4 MS salts and MS vitamins, 30 g L⁻¹ sucrose, 4 g L⁻¹ active carbon. After 4 weeks rooted shoots were acclimatized in greenhouse in a substrate (Klasmann-Deilmann TS1) in plastic boxes, initially covered with polyethylene foil, shaded and kept in high humidity which was gradually reduced. To confirm ploidy status of gooseberry stage preparation for somatic chromosome analysis root tips were pre-treated with 2 mM 8-hydroxyquinoline for 4 h, fixed in 3:1 ethanol:glacial acetic acid solution for at least 12 h, and then digested in a mixture of enzymes comprised of 20% pectinase, 1% cellulase, and 1% cellulose 'Onozuka R-10' at 37 °C for 1 h. Root meristems were squashed in a drop of 45% (v/v) acetic acid. After freezing in liquid nitrogen, cover slips were removed using a razor blade, and the preparations were dehydrated in absolute ethanol, air dried, and stained with 2.5 g mL⁻¹ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

RESULTS

Tetraploids were obtained after treatment with colchicine only. 5 tetraploids were obtained for the cultivar 'White Triumph' and 3 for the clone AGR9 (Fig. 1). The obtained tetraploids were rooted *in vitro* and then acclimatized to greenhouse conditions. After this period, cytometric analysis was repeated, confirming the tetraploid status of the plants (Tab. 1, Fig. 2). Additionally the ploidy status was confirmed by somatic chromosome analysis (Fig. 3).

Tab. 1. Detectability of micro- and tetraploids of *Ribes grossularia*

GENOTYPE	NUMBER OF PLOIDY ANALYSES	NUMBER OF MIXOPLLOIDS DETECTED	NUMBER OF TETRAPLOIDS DETECTED	NUMBER OF CONFIRMED TETRAPLOIDS DURING <i>IN VITRO</i> MULTIPLICATION
WHITE TRIUMPH	176	23	6	5
CAPTIVATOR	58	2	1	0
INVICTA	138	14	1	0
MACURINES	65	17	4	0
AGR9	41	21	3	3



Fig. 1. Tetraploid plant of *Ribes grossularia* clone AGR9 4 weeks after acclimatization.

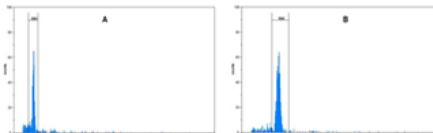


Fig. 2. FCM histograms of *Ribes grossularia* clone AGR9: A - diploid control, B - tetraploid 511

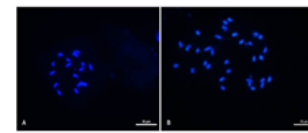


Fig. 3. Chromosomes count of *Ribes grossularia* clone AGR9: (A) Diploid control ($2n = 2x = 16$), (B) Tetraploid genotype 511 ($2n = 4x = 32$). Bars represent 10 μm.

CONCLUSIONS

- Tetraploids were obtained in two out of five *Ribes grossularia* L. cultivars which indicates that gooseberry is difficult species for polyploidization.
- After *in vitro* rooting only tetraploids clone AGR9 were successfully acclimatized in greenhouse whereas tetraploid plants of cultivar 'White Triumph' died.

This research was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development as grant for Biological Progress in Crop Production (No 46)

www.inhort.pl

Załącznik nr 2. XVI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. "Extending the genetic variability of the gooseberry (*Ribes grossularia* L.) by *in vitro* polyploidization. September 11–16, 2023, Dresden-Pillnitz. Autorzy: Aleksandra Trzewik, Danuta Kucharska, Monika Marat, Agnieszka Marasek-Ciołakowska

