

Magdalena Kawka-Lipińska, Anna Trojak-Goluch

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

POLIPLOIDY TYTONIU I CHMIELU – METODY OTRZYMYWANIA,  
OCENA FENOTYPU, SKŁADU CHEMICZNEGO ORAZ WYKORZYSTANIE  
W HODOWLI\*

**Słowa kluczowe:** poliploidyżacja, związki antymitotyczne, krzyżowanie międzygatunkowe, chmiel, tytoń, podwojone haploidy, cechy morfologiczne, skład chemiczny

**Wstęp**

Poliploidyżacja jest jednym z najpowszechniejszych zjawisk występujących w procesie ewolucji roślin. Obecnie niemal połowę gatunków uprawnych stanowią poliploidy (48). Są to zazwyczaj autopoliploidy, które powstały poprzez podwojenie jednogatunkowego zestawu chromosomów lub allopoliploidy, u których z kolei zwielokrotnieniu uległy genomy dwóch lub kilku gatunków, prowadząc tym samym do powstania zupełnie nowego gatunku (23). Przykładem naturalnego allopoliploida jest tytoń szlachetny *Nicotiana tabacum* L. ( $2n = 4x = 48$ ), który powstał w wyniku podwojenia liczby chromosomów po hybrydyzacji *N. sylvestris* (Spegazzini i Comes) ( $2n = 2x = 12$ ) i *N. tomentosiformis* (Goodspeed) ( $2n = 2x = 12$ ) (31). Szczególnymi formami poliploidów są autoallopoliploidy oraz segmentalne allopoliploidy (54). Wśród metod uzyskiwania poliploidów należy wymienić spontanicznie występujące zaburzenia mejozy prowadzące do powstania niezredukowanych gamet i zaburzenia mitozy zwykle w komórkach merystematycznych (46) oraz indukcję z wykorzystaniem różnych środków chemicznych, głównie cytostatyków zaburzających działanie wrzeciona kariokinetycznego (18, 53). Rośliny poliploidalne w porównaniu z formami diploidalnymi odznaczają się najczęściej zwiększonym rozmiarem komórek, większymi organami wegetatywnymi oraz większą biomasa. Zazwyczaj także są bardziej odporne na stresy abiotyczne i biotyczne oraz wykazują zmiany w zawartości i jakości

\*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

substancji czynnych (46). Zwielokrotnienie genomów jest zatem często stosowane przez hodowców w celu poprawy wybranych cech roślin użytkowych, uzyskania odporności na choroby, ale także przewycięzania nieżywotności i niepłodności mieszańców międzygatunkowych (46). Otrzymywanie poliploidów, w szczególności triploidów jest alternatywą do osiągnięcia sterylności genetycznej, która została wykorzystana w programach hodowlanych wielu gatunków roślin, np. do produkcji bezpestkowych owoców cytrusowych (10) czy uzyskania niemal beznasiennych szyszek chmielu (1, 64).

### Metody otrzymywania poliploidów tytoniu i chmielu

W świecie roślin istnieje szereg metod zwielokrotnienia genomu. Poliploidyzaacja może zachodzić na skutek zakłóceń podziałów mejotycznych lub mitotycznych. Zaburzenia podziałów mejotycznych mogą powstawać spontanicznie. Właśnie takie zjawisko i pojawienie się niezredukowanych gamet wystąpiło między innymi u bezpłodnych międzygatunkowych mieszańców (amfihaploidów) *N. tabacum* × *N. glauca* Grah. (57). Fuzja gamet  $2n$  tychże mieszańców dała początek płodnym osobnikom amfidiploidalnym. Powielenie genomu i powstawanie gamet  $2n$  może być wywołane także czynnikami zewnętrznymi, wśród których wymieniane są, m.in.: wysoka temperatura, zranienia roślin, niedobór wody czy składników odżywczych (32, 43).

W przypadku zaburzeń mitozy poliploidyzaacja może zachodzić spontanicznie, zwykle poprzez podwojenie liczby chromosomów w komórkach merystematycznych lub w wyniku indukcji z wykorzystaniem związków antymitotycznych, najczęściej kolchicyny lub oryzaliny. Kolchicyna ( $C_{22}H_{25}O_6N$ ) pozyskiwana z nasion i cebulek *Colchicum autumnal* L. zakłóca przebieg tworzenia wrzeciona kariokinetycznego i blokuje rozejście się siostrzanych chromatyd do biegunów komórki w anafazie mitozy. O efektywności tego procesu decyduje wiele czynników, takich jak: genotyp rośliny, rodzaj eksplantatu, warunki wzrostu czy sposób aplikacji, tj. czas ekspozycji i stężenie środka antymitotycznego (13). Optymalną dawkę kolchicyny oraz czas inkubacji dobiera się eksperymentalnie, w zależności od gatunku rośliny i warunków wzrostu (18). Kolchicyna jest stosowana w formie czystych roztworów wodnych lub roztworów wodnych z agarem. Może być używana *in situ* na roślinach rosnących na polu lub w szklarni oraz w warunkach aseptycznych kultur *in vitro*. W przypadku tytoniu najczęściej jest aplikowana *in vivo* podczas kiełkowania nasion lub rozwoju stożków wzrostu (5). Berbeć (4) prowadził 4-godzinną inkubację kiełkujących nasion w 0,2% roztworze kolchicyny w temperaturze  $27^{\circ}C$  i uzyskał tetraploidalne rośliny *N. tabacum* odmiany Nadwiślański Mały ( $2n = 96$ ). Otrzymane poliploidy skrzyżował z *N. alata* Link et Otto ( $2n = 18$ ) i otrzymał seskwidiploidalne formy mieszańcowe. Z kolei El-Morsy i in. (18), mocząc nasiona w wodnym roztworze kolchicyny, otrzymali tetraploidalne formy *N. alata*. Najwyższą wydajność osiągnęli po zastosowaniu 0,5% roztworu kolchicyny przez 48 godzin. Warmke i Blekeslee w roku

1939 (66) użyli kolchicyny *in vivo* do podwojenia liczby chromosomów mieszańców *N. tabacum* × *N. glutinosa* L. Oprócz trucizn mitotycznych innymi czynnikami indukującymi poliploidalność w komórkach somatycznych mogą być bardzo wysokie lub bardzo niskie temperatury, promieniowanie X czy uszkodzenia roślin (39). Poliploidy tytoniu można także otrzymać, stosując technikę regeneracji roślin z fragmentów walca osiowego łodygi. Pierwszą poliploidyzację mitotyczną tytoniu w warunkach *in vitro*, wykorzystującą jako eksplantaty fragmenty walca osiowego łodygi przeprowadzili Murashige i Nakano w 1966 r. (40). W wyniku spontanicznej poliploidyzacji w warunkach *in vitro* otrzymali kalus z komórkami poliploidalnymi i aneuploidalnymi. Również poprzez kulturę na pożywce LS wzbogaconej kinetyną o stężeniu  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  i IAA (kwas indolilo-3-octowy) w ilości  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (37) można zaindukować podział komórek, tworzenie tkanki kalusowej i regenerację pędów (15). Część uzyskanych regeneratów wskutek spontanicznej poliploidyzacji ma podwojoną w stosunku do roślin wyjściowych liczbę chromosomów w komórkach somatycznych. Doroszeńska i Berbec (16) w wyniku kultury fragmentów rdzenia łodygi mieszańców  $F_1$  *N. tabacum* × *N. africana* Merx. ( $2n = 47$ ) uzyskali formy mieszańcowe zawierające podwojoną liczbę chromosomów ( $2n = 94$ ).

Poliploidy tytoniu można także otrzymać, stosując kontrolowane krzyżowanie międzygatunkowe. Clausen i Goodspeed (9), krzyżując gatunek *N. glutinosa* z *N. tabacum*, uzyskali nowy, syntetyczny, amfidiploidalny gatunek *N. digluta*. Natomiast Ternovsky (56), krzyżując *N. tabacum* z *N. glauca*, otrzymał syntetyczny, amfidiploidalny gatunek *N. ditagla*.

W przypadku chmielu otrzymywanie poliploidów w warunkach *in vivo* zapoczątkował w 1948 r. Dark (12). W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku istotne zasługi dla hodowli poliploidów tego gatunku wnieśli Roborgh (44) i Haunold (26). Roborgh (44) opracował technikę indukcji tetraploidów polegającą na zanurzaniu wierzchołków pędów wraz z trzema parami pąków bocznych w roztworze kolchicyny. Wykazał, że optymalne stężenie antymitotyku wynosi 2 i 3%, natomiast czas inkubacji 6 godzin. Z kolei Haunold (26), stosując raz dziennie przez 4 dni 0,5 lub 0,75% wodny roztwór kolchicyny na pąki boczne, uzyskał szereg tetraploidów odmiany Fuggle. W prace nad uzyskiwaniem poliploidów chmielu zaangażowany był także Roy wraz z zespołem (45). Opracował technikę indukcji poliploidów chmielu odmiany H138 w warunkach *in vitro*. Umieszczał 3–6 mm pąki wierzchołkowe w płynnym podłożu MS zawierającym różne stężenia kolchicyny – 0,01%; 0,05%; 0,1% i 0,5% i inkubował w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  przez 24, 48, 72, 96 i 120 godzin. Najwyższy odsetek roślin (25,6%) z podwojoną zawartością DNA w komórkach uzyskał przy zastosowaniu 0,05% kolchicyny przez 48 godzin. Trojak-Goluch i Skomra (60) w celu indukcji tetraploidów chmielu odmiany Sybilla umieściły merystemy wierzchołkowe pędów w płynnej pożywce MS zawierającej kolchicynę w stężeniach: 0,01%; 0,05% i 0,1%. Inkubacja materiału roślinnego przebiegała na wytrząsarce rotacyjnej przez 24, 48 i 72 godziny. Podobnie

jak w badaniach Roya i in. (45) najwyższą wydajność poliploidyzacji uzyskano, utrzymując merystemy w 0,05% roztworze przez 48 godzin. Švécarová i in. (53) stosowali jeszcze inne techniki indukcji poliploidów. Prowadzili przez 2 tygodnie hodowlę fragmentów pędów z węzłami na podłożu MS wzbogaconym oryzaliną o stężeniach: 1; 5 lub 10  $\mu\text{M}$ . Ponadto umieścili fragmenty pędów na płynnej pożywce MS z dodatkiem oryzaliny o stężeniu 10 i 20  $\mu\text{M}$ . Znacznie bardziej efektywna okazała się pierwsza z metod, zwłaszcza wykorzystanie podłoża zawierającego 10  $\mu\text{M}$  oryzaliny. Natomiast Škof i in. (49) w celu poliploidyzacji genomu chmielu *in vitro* wykorzystali technikę organogenezy pośredniej pędów, w której regenerację pędów poprzedzało powstanie kalusa. Analiza poziomu ploidalności regeneratów wykazała wysoką frekwencję tetraploidów (58,6%). Dodatkową zaletą zastosowanej techniki w porównaniu z metodami wykorzystującymi środki antymitotyczne był całkowity brak miksploidów wśród regeneratów (49). Metodę organogenezy pośredniej do otrzymania tetraploidalnego chmielu wykorzystano także w IUNG-PIB w Puławach. Metoda ta jest uznawana za dość trudną z uwagi na to, że efektywność uzyskiwania poliploidów zależy od szeregu czynników, takich jak: rodzaj eksplantatu, genotyp rośliny, skład pożywki czy zastosowane hormony wzrostowe. W wyniku długotrwałej hodowli kalusa pochodzącego z łodyg i ogonków liściowych chmielu odmiany Iunga Trojak-Goluch i in. (61) otrzymały szereg tetraploidalnych roślin. W badaniu oceniono wpływ typu eksplantatu i regulatorów wzrostu na efektywność regeneracji roślin oraz indukcję poliploidów. Prowadzenie długotrwałej kultury kalusa powyżej 23 tygodni doprowadziło do podwojenia ilości DNA i pojawienia się tetraploidów wśród zregenerowanych roślin. Największą ich liczbę – 9,4%, uzyskano z kalusa pochodzącego z ogonków liściowych. Liczbę tworzących się poliploidów wyraźnie zwiększał dodatek IAA (kwas indolilo-3-octowy) do pożywki regeneracyjnej.

### Metody otrzymywania podwojonych haploidów (DH)

W badaniach nad uzyskiwaniem ulepszonych odmian tytoniu powszechnie stosowane jest zwielokrotnianie genomu i otrzymywanie homozygotycznych linii podwojonych haploidów (DH). Technika ta pozwala wydatnie skrócić czas wyhodowania nowej odmiany tytoniu, przywrócić płodność roślinom, wyeksponować cechy warunkowane przez geny recesywne. Podwojone haploidy tytoniu można uzyskać zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. W metodzie *in vivo* wykorzystuje się pyłek dzikiego gatunku, np.: *N. africana* do zapylania *N. tabacum*. Zapylenie stymuluje podziały partenogenetyczne komórki jajowej i powoduje powstanie haploidalnych zarodków (14). W następnym etapie haploidalne siewki poddaje się działaniu cytostatyków i otrzymuje linie DH. Pierwsze podwojone haploidy tytoniu *in vitro* uzyskano w latach 60. XX wieku w wyniku kultury fragmentów liści (7). Do rutynowego otrzymywania podwojonych haploidów tytoniu w warunkach *in vitro* stosuje się jednak techniki androgenozy z wykorzystaniem niedojrzałych pylników lub izolowanych mikrospor.

Uzyskane haploidalne zarodki poddaje się najczęściej działaniu kolchicyny. Warto nadmienić, że bardzo skutecznym sposobem podwojenia materiału genetycznego haploidów jest organogeneza pośrednia lub bezpośrednia. W metodzie organogenezy pośredniej rozwój zarodków i roślin jest poprzedzony tworzeniem tkanki kalusowej. Z kolei w organogenezie bezpośredniej zarodki somatyczne i młode rośliny tworzą się bezpośrednio na powierzchni eksplantatu. Uzyskane w ten sposób regeneraty stanowią populację złożoną zarówno z haploidów, jak i podwojonych haploidów. Wysoką frekwencję linii DH tytoniu uzyskano po wyłożeniu fragmentów łodyg dojrzałych roślin haploidalnych na pożywkę MS wzbogaconą kinetyną o stężeniu  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  oraz kwasem indoliloctowym (IAA) w stężeniu  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (37). Hamada i in. (24) zastosowali jeszcze inne warunki regeneracji roślin, uzyskując zdecydowanie wyższą frekwencję podwojonych haploidów. Autorzy utrzymywali fragmenty łodyg w ciemności na pożywce MS zawierającej  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  IAA i  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  kinetyny. Następnie eksplantaty po 28 dniach przeniesiono na podłoże MS zawierające  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  IAA i  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  kinetyny lub  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  BAP (6-benzylaminopuryna) i oświetlano światłem fluorescencyjnym o natężeniu  $30,3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### Zmiany morfologii i składu ważnych metabolitów u poliploidów tytoniu i chmielu

Modyfikacja poziomów ploidalności roślin powoduje zmiany wielkości komórek roślinnych, co z kolei prowadzi do zmian w anatomicznej strukturze organów, a także fizjologii roślin i ich składzie chemicznym. Zmiany morfologiczne dotyczą wielkości aparatów szparkowych oraz ich liczby przypadającej na jednostkę powierzchni, wielkości i liczby liści, korzeni, pędów, bulw, kłączy, kwiatów, nasion, pyłku, stosunku długości liści do ich szerokości, a także struktury ściany komórkowej (38). Rośliny poliploidalne różnią się też zwykle wysokością i ogólnym pokrojem od swoich diploidalnych odpowiedników. Zmiany fizjologiczne dotyczą natomiast transpiracji, aktywności fotosyntetycznej czy długości trwania fazy wegetatywnej i generatywnej (52, 55).

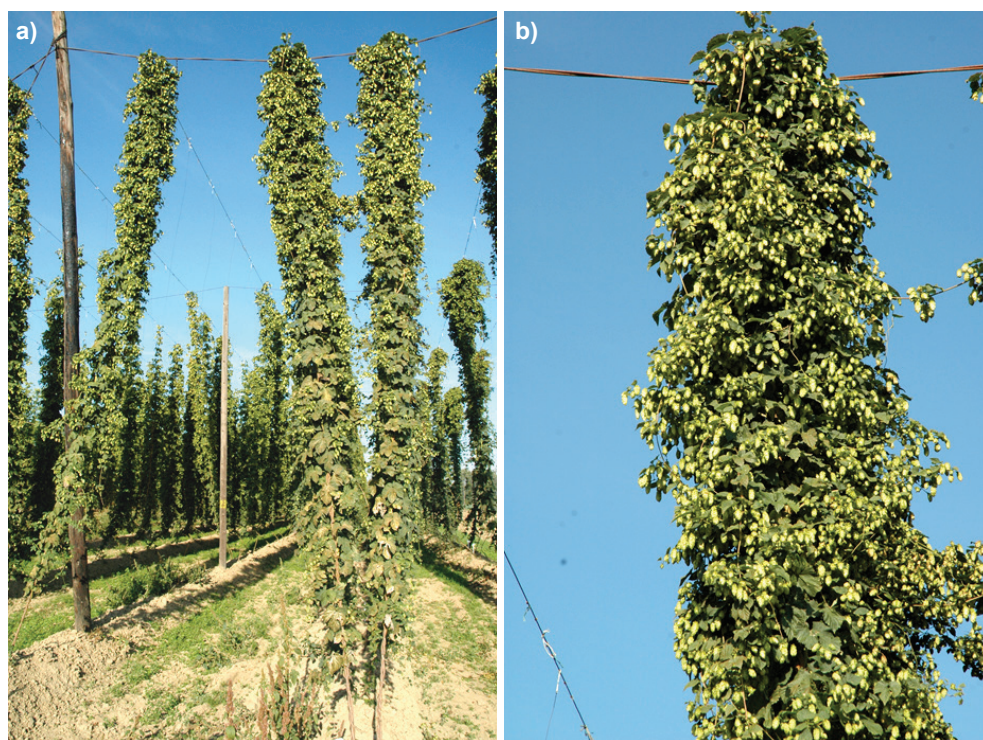
Jak wykazały badania Berbecia (4), tetraploidy *N. tabacum* Nadwiślański Mały ( $2n = 96$ ) charakteryzowały się wolniejszym wzrostem, grubszymi i bardziej kruchymi liśćmi o nieregularnym unaczynieniu oraz większymi pylnikami w stosunku do diploidów. Z kolei tetraploidy *N. alata* miały dłuższe łodygi oraz większą liczbę i długość międzywęźli w porównaniu z diploidami. Były większe, bardziej zielone, a ponadto odznaczały się większą liczbą liści w fazie formowania kwiatów. Dodatkowo tworzyły więcej kwiatów, które posiadały dłuższe szypułki kwiatowe i większą średnicę słupka. Nie wykazywały natomiast znaczących różnic w średnicy łodygi czy liczbie pędów przypadających na roślinę. Ponadto liście tetraploidów *N. alata* w porównaniu z diploidalnymi odpowiednikami zawierały więcej takich makroelementów, jak azot i fosfor (18). Trojak-Goluch i in. (62) przeprowadzili

ocenę morfologiczną oraz analizę składu chemicznego podwojonych haploidów (DH) mieszańców  $F_1$  powstałych ze skrzyżowania linii WGL3 odpornej na *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris z linią PW-834 odporną na TSWV (ang. *Tomato spotted wilt virus*). Podwojone haploidy kwitły później, były zwykle niższe i miały mniej liści niż ich formy rodzicielskie, co było cechą pojawiającą się z największą regularnością. Ich liście były węższe, co w konsekwencji przyczyniło się do spadku plonowania linii DH. Szczególnie wyraźne było zmniejszenie powierzchni środkowych liści. Natomiast połączenie odporności na *Th. basicola* i TSWV w jednym genomie nie miało wpływu na zmiany zawartości nikotyny i innych alkaloidów w porównaniu z formami rodzicielskimi.

Triploidalny chmiel ( $2n = 3x = 30$ ) charakteryzuje się lepszą żywotnością, intensywnym wzrostem w porównaniu z diploidami ( $2n = 2x = 20$ ), a dodatkowo jest bardziej bujny i daje wyższy plon (42, 45). Dowodem na to mogą być przedstawione przez Haunolda (26) rezultaty dotyczące przyrostów diploidalnej i triploidalnej formy chmielu odmiany Fuggle. Autor wykazał, że dzienny przyrost roślin o zwiększonej ploidalności był o 18 mm większy niż ich diploidalnych odpowiedników. Z punktu widzenia producentów chmielu jedną z ważniejszych zalet triploidów jest wyższy potencjał plonowania w porównaniu z formami diploidalnymi. Probasco i in. (42) podali, że triploidalna odmiana Millennium miała o 560,7 kg większy plon niż macierzysta, diploidalna odmiana Nugget. Triploidy mają ponadto dłuższe międzywęzła i pędy owocujące, zmienną długość szyszek i odznaczają się wyższym wskaźnikiem skręcalności pędów, co pozwala im lepiej piąć się po konstrukcji. Najistotniejsze jest jednak to, że charakteryzują się prawie całkowitą beznasiennością. Ponieważ białka i tłuszcze zawarte w nasionach szyszek osobników żeńskich chmielu niekorzystnie wpływają na proces fermentacji piwa (30), surowiec uzyskany z beznasiennych szyszek jest najbardziej odpowiedni do produkcji granulatów i ekstraktów chmielowych. Jak podaje Haunold (26), przy swobodnym zapyleniu średnia liczba nasion w triploidalnych formach odmiany Fuggle wyniosła 1,7, podczas gdy w formach diploidalnych – 12,3. Także średnia masa nasion triploidów była znacznie niższa niż masa nasion diploidów (28). Pędy roślin triploidalnych w przeciwieństwie do tetraploidalnych są ułożone luźniej dzięki dłuższemu międzywęzłom. Wśród zalet chmielu triploidalnego należy wymienić także szybkie zamykanie się szyszek po uformowaniu, co znacznie ogranicza wnikanie do nich patogenicznych grzybów *Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G.W. Wilson powodującego mączniaka rzekomego oraz *Podospheera macularis* (Wallr.) U. Braun & S. Takam. powodującego mączniaka prawdziwego chmielu. Cecha ta przyczynia się do ograniczenia liczby zabiegów profilaktycznych na plantacji. Szyszki triploidów są bardziej wytrzymałe i mniej kruche, co pozwala na zachowanie surowca w lepszym stanie podczas mechanicznego zbioru i transportu (50), z drugiej jednak strony potrzebują one znacznie dłuższego czasu do osiągnięcia dojrzałości technologicznej. Wprowadzenie do uprawy odmian chmielu późno dojrzewających poszerzyłoby asortyment odmianowy

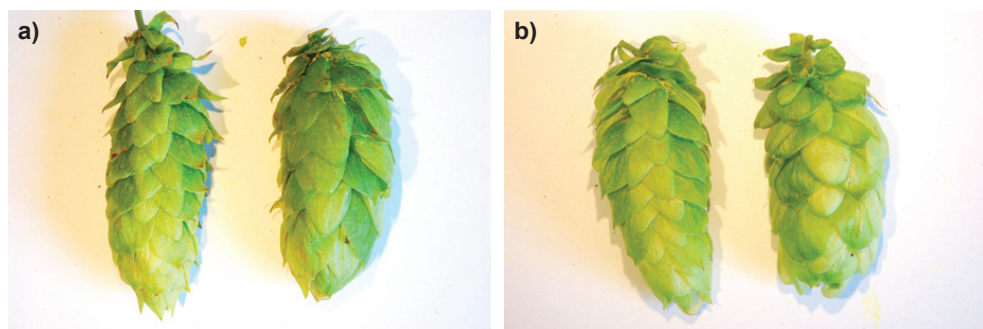


gatunku, co byłoby korzystne dla wielu gospodarstw, szczególnie tych wielkoobszarowych, w których uprawia się kilka odmian chmielu, gdyż pozwoliłoby rozłożyć w czasie zbiór szyszek (64). Krajl (33) donosiła, że w szyszkach triploidalnego chmielu odmiany Atlas zaobserwowała znacznie większą liczbę gruczołów lupulinowych niż w odmianie matecznej. Także średnica gruczołów lupulinowych była większa, co z kolei miało wpływ na zwiększoną zawartość żywic miękkich w szyszkach. Wszystkie triploidy uzyskane przez Trojak-Goluch i Skomrę (64) charakteryzowały się dłuższymi pędami owocującymi i dłuższymi międzywęzłami, co skutkowało luźniejszym pokrojem roślin (rys. 1), wyższym wskaźnikiem skręcalności pędów w porównaniu z diploidalną odmianą mateczną. Większość uzyskanych triploidów zawiązywała niewielką ilość nasion w szyszkach, a tylko dwa osobniki były prawie beznasienne i wytwarzały odpowiednio tylko 1,41 i 1,46 nasion na szyszkę (64) (rys. 2).



Rys. 1. Pokrój ogólny triploidalnych roślin chmielu (a) oraz ich owocostany (b)

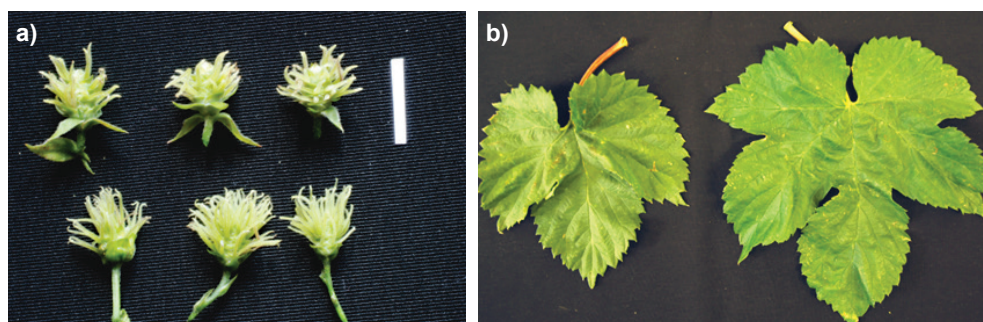
Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB



Rys. 2. Szyszki triploidalnych roślin chmielu: a) szyszka diploidalnej odmiany Sybilla (lewa strona panelu) oraz szyszka triploida ATG 16/33; b) szyszka diploidalnej odmiany Sybilla (lewa strona panelu) oraz szyszka triploida ATG 17/34

Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB

Tetraploidalne formy chmielu charakteryzują się znacznie gorszymi cechami użytkowymi w porównaniu z diploidami oraz triploidami, co sprawia, że nie znajdują zastosowania w produkcji rolniczej. Są niższe, mają znacznie mniejszą średnicę pędów, krótsze międzywęzła, co skutkuje wytwarzaniem krótszych pędów bocznych i bardziej zwartym pokrojem roślin (53, 60). Poza tym słabiej się ukorzeniają i gorzej aklimatyzują do warunków polowych. W badaniach prowadzonych w IUNG-PIB w Puławach z 20 roślin wysadzonych na polu po trzech latach przetrwało tylko 6 (60). Podobnie tetraploidalne sadzonki chmielu uzyskane przez Švécárová i in. (53) były mniejsze i słabiej się ukorzeniały. Dodatkowo tetraploidalny chmiel charakteryzuje się opóźnionym kwitnieniem i wytwarza mniejsze kwiaty żeńskie (rys. 3). Jego szyszki mają zwiększoną masę w stosunku do diploidów, co jednak nie jest korzystne ze względu na problemy w suszeniu takiego surowca. Gruczoły lupulinowe produkujące lupulinę są prawie dwa razy większe, natomiast jest ich znacznie mniej (60).



Rys. 3. Kwiaty i liście diploidalnego i tetraploidalnego chmielu odmiany Sybilla: a) kwiaty żeńskie roślin diploidalnych (dolna część fotografii) i roślin tetraploidalnych (górną część fotografii); b) liść rośliny tetraploidalnej (po lewej) i rośliny diploidalnej (po prawej)

Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB



Chmiel jest źródłem wielu substancji o zróżnicowanej aktywności biologicznej, w tym polifenoli, które wykazują silne działanie antyoksydacyjne i tym samym przeciwnowotworowe (21). Zaobserwowano, że poziom produkcji korzystnych metabolitów wtórnych lub zmiany ich składu i proporcji zależą od stopnia ploidalności roślin. Triploidy chmielu najczęściej wytwarzają znacznie lepszej jakości surowiec browarniczy, tj. o wyższej zawartości żywic miękkich, garbników i polifenoli w porównaniu z diploidami (34). Prabasco i in. (42) donoszą, że zawartość alfa kwasów w szyszkach triploidalnej odmiany Millenium sięga 15,5%, podczas gdy w macierzystej, diploidalnej odmianie Nugget wynosi 13,0%. Wskazują oni także na wyższą zawartość olejków eterycznych humulenu i kariofilenu, co nadaje piwu przyjemny, chmielowy aromat. Triploidalne odmiany chmielu Crystal, Mount Hood i Liberty uzyskane przez Haunolda i in. (29) także charakteryzują się wyższą zawartością alfa i beta kwasów oraz olejków chmielowych w porównaniu z diploidalną odmianą mateczną Hallertauer Mittlefrüh. Populacje triploidalnego chmielu uzyskane przez Trojak-Goluch i Skomrę (64) charakteryzują się zróżnicowaną zawartością alfa kwasów. Występują osobniki o stosunkowo niskiej zawartości tych związków. Ponadto wyselekcjonowano genotypy, które wyróżniają się wysoką zawartością alfa kwasów również w stosunku do roślin diploidalnych. Według doniesień literaturowych wraz z powieleniem genomu zmienia się również skład głównych związków chemicznych odpowiedzialnych za aromat. W przypadku tetraploidów chmielu całkowita zawartość olejków eterycznych ulega obniżeniu, natomiast notuje się wzrost zawartości cennego humulenu, limonenu, kariofilenu i farnezeny (60).

### **Wykorzystanie różnych metod poliploidyzacji oraz poliploidów w hodowli tytoniu i chmielu**

W wielu programach hodowlanych do krzyżowania z tytoniem szlachetnym wykorzystuje się dzikie gatunki z rodzaju *Nicotiana*. Znaczna ich część posiada bowiem genetycznie warunkowaną odporność przynajmniej na jedną chorobę bądź szkodnika. Krzyżowanie dzikich krewniaków z gatunkiem uprawnym daje szansę przeniesienia genów, które warunkują odporność na patogeny czy wpływają na lepszy plon. Technika ta wiąże się jednak z wieloma problemami wynikającymi z barier krzyżowalności form rodzicielskich, do których należą niezgodność krzyżówkowa, niska przeżywalność mieszańców czy ich bezpłodność. Bieźpłodność mieszańców *Nicotiana* wywołana jest głównie różnicami w liczbie chromosomów gatunków rodzicielskich oraz strukturalnymi różnicami w chromosomach zaburzającymi ich koniugację. Poliploidyzacja jest wykorzystywana do przywracania płodności sterylnym mieszańcom międzygatunkowym. Przykładem mogą być prace nad przeniesieniem odporności na czarną zgniliznę korzeni z *N. glauca* do genomu Wiślicy, których efektem było uzyskanie początkowo linii hodowlanych WGL, a następnie w wyniku dalszego doskonalenia użytkowego tych linii – odpornej, cytoplazmatycznie męskosterylnej odmiany Wigola. W trakcie

procesu hodowlanego uzyskano bezpłodne mieszańce międzygatunkowe *N. tabacum* Wiślica  $\times$  *N. glauca* (amfihaploidy), których siewki przez 4 godziny poddano działaniu 0,25% roztworu kolchicyny celem podwojenia liczby chromosomów. W efekcie otrzymano częściowo płodne amfidiploidy, które następnie skrzyżowano wstecznie z *N. tabacum* i otrzymano płodne seskwidiploidy (pokolenie BC<sub>1</sub>) (57, 58). Innym przykładem wykorzystania poliploidyzacji do przywrócenia płodności mieszańcom międzygatunkowym są prace nad liniami hodowlanymi BPA. W wyniku spontanicznego podwojenia liczby chromosomów na wczesnym etapie rozwoju międzygatunkowych mieszańców *N. tabacum*  $\times$  *N. africana* uzyskano płodne, zawierające po dwa haploidalne genomy każdego z gatunków, genotypy (16). W kolejnych etapach programu hodowlanego zostały one skrzyżowane z *N. tabacum* i dały początek seskwidiploidom. Dalsze krzyżowanie wsteczne seskwidiploidów z tytoniem pozwoliło uzyskać kolejne pokolenia i ostatecznie doprowadziło do uzyskania stabilnych linii hodowlanych BPA wykazujących tolerancję na PVY (17). Uzyskanie poliploidów, w tym amfidiploidów, następnie ich krzyżowanie z drugim tetraploidalnym gatunkiem rodzicielskim bądź krzyżowanie amfidiploida z gatunkiem diploidalnym pozwala uzyskać częściowo płodne pokolenie seskwidiploidalne i jest najskuteczniejszym sposobem przywracania płodności mieszańcom międzygatunkowym (16).

Rośliny poliploidalne mogą stanowić także formę pomostową w tzw. bridge crossing, kiedy bezpośrednie krzyżowanie dwóch gatunków nie jest możliwe ze względu na niezgodność genetyczną. W charakterze formy pomostowej wykorzystuje się trzeci gatunek, który jest zgodny z docelowymi gatunkami rodzicielskimi bądź formę poliploidalną jednego z gatunków rodzicielskich. W celu przeniesienia reakcji nadwrażliwości na TSWV z *N. alata* do *N. tabacum* jako formy pomostowej użyto *N. otophora* Grise. (20). Amfidiploidy *N. tabacum*  $\times$  *N. alata* skrzyżowano wstecznie z *N. tabacum*, a następnie uzyskane seskwidiploidy skrzyżowano z mieszańcem amfidiploidalnym *N. tabacum*  $\times$  *N. otophora* (19). Uzyskano kilka płodnych linii hodowlanych wykazujących reakcję nadwrażliwości na TSWV, w tym ostatecznie należąca do typu papierosowego ciemnego odmianę Polalta. Nadwrażliwość otrzymanych kreacji hodowlanych była jednak związana z występowaniem deformacji morfologicznych roślin w postaci nieregularnego unerwienia liści, guzów na kwiatostanach. Chaplin i Mann (8) w celu przewyciężenia niezgodności krzyżówkowej pomiędzy *N. tabacum* a dzikimi gatunkami *N. rustica* L. oraz *N. alata* użyli tetraploidalnych form tytoniu. Metoda krzyżowania przy użyciu tetraploidów tytoniu okazała się także przydatna w uzyskiwaniu żywotnych mieszańców *N. tabacum* i *N. alata*, które zamierały w fazie siewki (4). Laskowska i Berbec (35) w swoich badaniach skrzyżowali tetraploidy *N. tabacum* TB-566 z *N. alata*, w wyniku czego uzyskali seskwidiploidalnego mieszańca *N. tabacum* TB-566 tetra  $\times$  *N. alata* o znacznym tempie wzrostu i przeżywalności. Następnie formę seskwidiploidalną krzyżowali wstecznie z *N. alata* i uzyskali żywotnego mieszańca (*N. tabacum* TB-566 tetra  $\times$  *N. alata*)  $\times$  *N. alata*. Zaletą wykorzystania w hodowli tytoniu tetraploidalnych form *N. tabacum*

jest nie tylko możliwość ominięcia barier krzyżowalności, ale także pominięcie etapu otrzymywania amfidiploidów i tym samym skrócenie czasu niezbędnego do uzyskania pokolenia seskwidiploidów (6).

Opracowanie i stosowanie efektywnych metod powielania genomu roślin haploidalnych w celu produkcji płodnych, homozygotycznych linii podwojonych haploidów (DH) jest stałą częścią wielu programów hodowlanych realizowanych w kraju i na świecie. W IUNG-PIB technika androgenezy, następnie podwojenia liczby chromosomów zostały wykorzystane między innymi do otrzymania odpornych na czarną zgniliznę korzeni linii DH. Materiał wyjściowy w badaniach stanowiły mieszańce podatnej na czarną zgniliznę korzeni odmiany K 326 i odpornej odmiany Wentura. Spośród 24 otrzymanych linii DH osobniki odporne stanowiły 20,8%. Ostatecznie do dalszych prac hodowlanych wybrano jedną linię DH wyróżniającą się najlepszymi cechami użytkowymi (59) (rys. 4). Podobne techniki stosowali Laskowska i Berbec (36), którzy uzyskali podwojone haploidy mieszańców  $F_1$  *N. tabacum* Polalta × Wiślica charakteryzujące się pełną odpornością na TSWV pochodzącą od odmiany Polalta oraz brakiem deformacji morfologicznych liści. Wymienione linie DH wykazywały wiele cech charakterystycznych dla tytoniu papierosowego ciemnego reprezentowanego przez odmianę rodzicielską Polalta, dlatego zostały włączone do dalszych prac hodowlanych obejmujących odtworzenie i doskonalenie cech tytoniu papierosowego jasnego reprezentowanego przez odmianę Wiślica. Podwojone haploidy otrzymano także w wyniku kultury fragmentów łodyg haploidów uzyskanych z odmiany Wiślica, linii hodowlanych PW834 i WGL3 oraz dwukierunkowych mieszańców  $F_1$  linii hodowlanych BPA i WGL3, WABPA3 i WGL3, PW834 i WGL3. W zależności od kombinacji mieszańcowej podwojone haploidy stanowiły od 10,61% do 32,99% ogółu regeneratów (63). Techniki poliploidyzacyjne wykorzystano także w IUNG-PIB do szybkiego otrzymania stabilnych, transgenicznych linii podwojonych haploidów odpornych na najważniejsze gospodarczo izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY). Formy haploidalne mieszańców transgenicznych linii hodowlanych z formami nietransformowanymi poddano diploidyzacji, stosując kolchicynę oraz metodę regeneracji pędów z fragmentów łodyg *in vitro*. Druga z zastosowanych metod okazała się wydajniejsza w otrzymaniu linii podwojonych haploidów (11). Również w literaturze światowej można znaleźć wiele przykładów otrzymywania linii DH w tytoniu. Walker i Aycock (65) skrzyżowali tytoń Maryland MD 609 wykazujący odporność na *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Haan) z tytoniem MD 341 odpornym na wirusa mozaiki tytoniu (TMV) i *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wol & Foster) Young et al. Spośród 315 haploidalnych roślin mieszańcowych uzyskanych drogą androgenezy otrzymali 133 podwojone haploidy, z czego 16 (12%) wykazywało poziom odporności równy odmianie MD 609. Z kolei Smalcelj i Curkovic Perica (51) skrzyżowali chorwacką linię GV3 odporną na mączniaka rzekomego tytoniu i PVY z niemiecką, odporną na PVY, ale podatną na mączniaka odmianą Virginia D i uzyskali mieszańca DH10. Mieszaniec ten wyka-

zywał odporność na PVY. Hamada i in. (24), stosując połączoną technikę androgenezy oraz naświetlanie wiązką jonów, otrzymali haploidalne mutanty odporne na wirusa PVY, a następnie, stosując metodę regeneracji fragmentów łodyg, uzyskali podwojone haploidy z frekwencją 45,7% ogółu badanych. Spośród roślin następnego pokolenia uzyskanych w wyniku samozapylenia około 50% wykazywało odporność na PVY (24). Indukcją podwojonych haploidów zajmowali się także Shahadati-Moghaddam i in. (47). Do badań wybrali odporną na PVY odmianę VAM i wysokiej jakości, ale podatną na PVY odmianę K326. Pylniki mieszańców  $F_1$  wyłożono na pożywkę MS, a następnie powstałe zarodki somatyczne poddano działaniu kolchicyny (0,4%) przez 8 godzin. Powstałe sadzonki przeniesiono ze szklarni na pole i poddano samozapyleniu. Ostatecznie uzyskano trzy odporne na PVY linie DH o pożądanych cechach morfologicznych i chemicznych.



Rys. 4. Podwojony haploid wyprowadzony z mieszańca tytoniu odmian K326 i Wentura:

a) pokrój ogólny rośliny i b) wygląd liścia

Źródło: A. Trojak-Goluch, zasoby własne ZHiBR IUNG-PIB

Formy poliploidalne roślin przemysłowych takich jak tytoń i chmiel są wykorzystywane nie tylko jako narzędzie do pokonywania barier krzyżowalności, ale także



do generowania genotypów o pożądanym cechach użytkowych. W hodowli chmielu tetraploidy są wykorzystywane jako formy rodzicielskie do produkcji odmian triploidalnych, które pod względem genotypowym i fenotypowym są zbliżone do odmiany matecznej. Jest to bardzo istotne w hodowli tej rośliny, ponieważ pozwala zachować korzystne cechy odmiany matecznej, a jednocześnie daje możliwość pewnej zmienności gatunku, np. wprowadzenia nowych cech użytkowych pochodzących od genotypu męskiego. Większość triploidalnych odmian chmielu otrzymano w wyniku kontrolowanego lub naturalnego zapylenia tetraploidalnych form żeńskich uznanej odmiany diploidalnym pyłkiem męskim (3, 42). Rośliny triploidalne mogą także powstać w potomstwie roślin uzyskanych w wyniku niekontrolowanego zapylenia triploidów pyłkiem roślin diploidalnych (2). Ponadto uzyskano triploidalną roślinę chmielu, w wyniku krzyżowania diploidalnej odmiany *Talisman* z osobnikiem męskim, który powstał z kolei ze skrzyżowania diploidalnej odmiany *Lubelski* z chmielem męskim pochodzącym z Jugosławii (22). Wymieniony poliploidalny osobnik chmielu powstał prawdopodobnie w wyniku połączenia gamet, z których jedna nie uległa redukcji w procesie mejozy. Na plantacjach chmielu nadal przeważają odmiany diploidalne ( $2n = 2x = 20$ ), ale wieloletnie prace nad uzyskaniem pożądanym odmian triploidalnych ( $2n = 3x = 30$ ) zaowocowały wprowadzeniem ich do uprawy w wielu krajach świata. Próby uprawy chmielu triploidalnego były podejmowane w Stanach Zjednoczonych już w latach 70. XX wieku (25). *Haunold* (25), krzyżując tetraploidalne formy odmiany *Fuggle* z diploidalnymi osobnikami męskimi, uzyskał 778 mieszańców roślin, z których większość, bo aż 76,3% stanowiły triploidy, natomiast 20,8% – aneuploidy. Badania te doprowadziły do uzyskania i wprowadzenia do uprawy w 1977 r. aromatycznych, triploidalnych odmian chmielu *Willamette* i *Columbia*, które charakteryzowały się intensywnym wzrostem i dawały wysoki plon (27). *Haunold* i *Nickerson* (28) prowadzili także badania nad wykorzystaniem triploidalnego pyłku do poprawy plonowania, a także poprawy jakości surowca chmielowego na plantacjach. Zapylenie diploidalnych roślin żeńskich *Brewer's Gold* pyłkiem triploidalnym spowodowało istotny wzrost plonu uzyskiwanego z jednostki powierzchni w wyniku zwiększenia wielkości i masy szyszek chmielowych. W uzyskanym surowcu stwierdzono także istotnie mniejszą ilość nasion, które zawierały 23% mniej tłuszczu i 14% mniej białka niż w przypadku surowca uzyskanego w wyniku wolnego zapylenia odmiany *Brewer's Gold* męskim pyłkiem diploidalnym. Innymi odmianami triploidalnymi uzyskanymi przez *Haunolda* i in. (29) były *Crystal*, *Mount Hood* i *Liberty*. Odmiany te w porównaniu z aromatyczną, diploidalną odmianą *Hallertauer Mittlefrüh*, z której się wywodzą dawały prawie dwukrotnie większe plony. *Beatson* i *Brewer* (1) uzyskali triploidalne, wartościowe odmiany *Pacific Gem*, *Wakatu* i *Pacifica*. Wszystkie były niemal beznasienne i zawierały znacznie większe ilości alfa kwasów niż ich formy rodzicielskie. *Krajl* (41) w latach 90. uzyskał szereg triploidalnych odmian aromatycznych, m.in.: *Cekin*, *Celeia*, *Cerea*, *Cicero* (41). Prace hodowlane nad uzyskaniem wysokogoryczkowych i aromatycznych triploidalnych

odmian chmielu prowadzone są także w IUNG-PIB. Przeprowadzono konwencjonalne krzyżowanie tetraploidalnych form aromatycznej odmiany Sybilla z diploidalnymi osobnikami męskimi i otrzymano 6 populacji mieszańcowych  $F_1$ , z czego 83,8% stanowiły formy triploidalne, natomiast 15,2% – aneuploidy. Wyselekcjonowano genotypy charakteryzujące się lepszymi cechami morfologicznymi oraz wyższą zawartością alfa kwasów w porównaniu z formą diploidalną. Genotypy te mogą być źródłem surowca dla przemysłu piwowarskiego (64).

### Podsumowanie

Poliploidyżacja jest powszechnym, cennym narzędziem w programach hodowlanych wielu roślin, w tym także chmielu i tytoniu, a jej zastosowanie nie ogranicza się do poprawy potencjału plonowania. Poliploidy są ważne jako formy pomostowe dla transferu genetycznego między gatunkami, u których bezpośrednie krzyżowanie nie jest możliwe, jak również do przywracania płodności sterylnym mieszańcom. Zastosowanie przez hodowców poliploidyżacji jako narzędzia pozwoliło na uzyskanie nowych, lepiej plonujących i odpornych odmian. Od czasu odkrycia kolchicyny zwielokrotnianie genomów *in vitro* z zastosowaniem tego antymitotyku jest najczęściej stosowane, ponieważ daje możliwość większej kontroli tego procesu, co zwiększa efektywność i tempo powstawania roślin poliploidalnych. W przypadku pozostałych metod poliploidyżacji głównymi przeszkodami są niska częstotliwość wytwarzania niezredukowanych gamet czy pracochłonność, długi czas trwania oraz niska efektywność organogenezy w kulturach *in vitro*. Jednym z priorytetów programów hodowlanych chmielu jest pozyskanie nowych, beznasiennych odmian triploidalnych i tym samym surowca dobrej jakości. W hodowli tytoniu krzyżowanie międzygatunkowe i połączenie metod hodowli tradycyjnej z technikami biotechnologicznymi, w tym poliploidyżacją w warunkach *in vitro*, wpływa na skrócenie procesu hodowlanego i daje szansę na uzyskanie ulepszonych, odpornych genotypów tytoniu, które decydują o opłacalności produkcji. Poza tym w ostatnich dekadach dzięki wykorzystaniu najnowszych technik biologii molekularnej nastąpił znaczny postęp w badaniach wyjaśniających, w jaki sposób zmiany wielkości genomu, w tym poliploidyżacja, wpływają na cechy fenotypowe i fizjologię roślin oraz skład chemiczny surowca.

### Literatura

1. Beaton R.A., Brewer V.R.: Regional trial evaluation and cultivar selection of triploid hop hybrids. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 1994, **22**: 1-6.
2. Beaton R.A., Ferguson A.R., Weir I.E., Graham K.A., Ansell K.A., Ding H.: Flow cytometric identification of sexually derived polyploids in hop (*Humulus lupulus* L.) and their use in hop breeding. *Euphytica*, 2003, **134**: 189-194.

3. Beaton R.A., Alspach P.: Breeding and development of triploid aroma cultivars. Proceedings of the Scientific Commission IHGC, Tettngang, Germany, June 24–28, 2007, pp. 19-21.
4. Berbeć A.: Cytogenetical study on *Nicotiana tabacum* L. cv. Nadwiślański Mały (2x and 4x) × *Nicotiana alata* Link et Otto hybrids. *Genetica Polonica*, 1987, **28(3)**: 251-261.
5. Berbeć A., Doroszevska T.: Formy tetraploidalne dzikich gatunków *Nicotiana* uzyskane w Zakładzie Hodowli i Uprawy Tytoniu IUNG w Puławach. *Pamiętnik Puławski*, 1991, **99**: 195-204.
6. Berbeć A., Doroszevska T.: The Use of *Nicotiana* species in tobacco improvement. In book: *The Tobacco Plant Genome*, 2020, pp. 101-146.
7. Bourgin J.P., Nitsch J.P.: Production of haploids *Nicotiana* from excised stamens. *Annales de Physiologie Vegetale*, 1967, **9(9)**: 377-382.
8. Chaplin J.F., Mann T.J.: Interspecific hybridization, gene transfer and chromosomal substitution in *Nicotiana*. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, 1961, **128**: 1-31.
9. Clausen R.E., Goodspeed T.H.: Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid glutinosa-tabacum hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics*, 1925, **10**: 278-284.
10. Cuencá J., Aleza P., Juárez J., Pina J.A., Navarro L.: Mandarin: A new citrus mid-late triploid hybrid. *HortScience*, 2010, **45(6)**: 977-980.
11. Czubačka A., Doroszevska T.: Uzyskiwanie transgenicznych linii podwojonych haploidów tytoniu metodą kultur tkankowych. *Biotechnologia*, 2004, **2(65)**: 16-24.
12. Dark S.O.S.: The use of polyploidy in hop breeding. Department of Hop Research. Annual Report, Wye College, University of London, 1952, p. 34-42.
13. Dhooche E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J.: Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, **104**: 359-373.
14. Doroszevska T.: Studia nad mieszańcami międzygatunkowymi *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana africana* Merxm. Praca doktorska, IUNG w Puławach, AR w Lublinie, 1994.
15. Doroszevska T.: Możliwości transferu czynników odporności na nekrotyczny szczep ziemniaczanego wirusa Y (PVY<sup>NZ</sup>) od *Nicotiana africana* Merxm. do tytoniu uprawnego. *Mat. II Kraj. Symp. „Odporność roślin na choroby, szkodniki i niesprzyjające czynniki środowiska”*. IHAR Radzików, 1995, ss. 77-79.
16. Doroszevska T., Berbeć A.: Cytogenetical investigation of poliploid interspecific hybrids of *Nicotiana africana* with different cultivars of *N. tabacum*. *Journal of Genetics and Breeding*, 2000, **54**: 77-82.
17. Doroszevska T.: Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. *Plant Breeding*, 2009, **129**: 76-81.
18. El-Morsy S.I., Dorra M.D.M., Elham A.A.A.E.H., Atef A.A.H., Ahmed Y.M.: Comparative studies on diploid and tetraploid levels of *Nicotiana alata*. *Academic Journal of Plant Sciences*, 2009, **2**: 182-188.
19. Gajos Z.: Próby wykorzystania mieszańców *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana otophora* Gris. w hodowli tytoniu odpornego na *Peronospora tabacina* Adam (PT-2) i inne choroby (in Polish). *Biuletyn Informacyjny Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1979, **1-2**: 11-23.
20. Gajos Z.: Przeniesienie odporności na wirus brązowej plamistości pomidora (Tomato Spotted Wilt Virus) z *Nicotiana alata* Link. et Otto. do tytoniu szlachetnego przez skrzyżowanie obu gatunków (in Polish). *Biuletyn Informacyjny Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego*, 1981, **1-2**: 3-24.
21. Gerhäuser C.: Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of the hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition Food Research*, 2005, **49(9)**: 827-831.

22. Grabowska-Jaochimiak A., Śliwińska E., Pigula M., Skomra U., Joachimiak A.J.: Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold and Zucc. [Cannabaceae]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, Tow. Bot., 2006, **75**: 207-2014.
23. Grant V.: Plant speciation. Columbia University Press: New York, NY, USA, 1981, pp. 564.
24. Hamada K., Inoue M., Tanaka A., Watanabe H.: Potato Virus Y – resistance in the progeny of haploid mutants obtained by the culture of *Nicotiana tabacum* L. anthers exposed to ion beams. Plant Biotechnology, 2001, **18**: 251-257.
25. Haunold A.: Cytology, sex expression, and growth of a tetraploid x diploid cross in hop (*Humulus lupulus* L.). Crop Science, 1971, **11**: 868-871.
26. Haunold A.: Polyploidy breeding with hop *Humulus lupulus* L. Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas, 1972, **9(1)**: 36-40.
27. Haunold A., Likens S.T., Horner C.E., Nickerson G.B., Zimmermann C.E.: Columbia and Willamette, two new aroma-type hop varieties. Brewers Digest, 1977, **52(11)**: 36-39.
28. Haunold A., Nickerson G.B.: Hop yield stimulation by triploid males under field conditions. Science, 1979, **19**: 27-31.
29. Haunold A., Nickerson G.B., Gampert U., Kling D., Kenny S.T.: Liberty and Crystal – Two new U.S.-developed aroma hops. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1995, **53**: 9-13.
30. Hildebrand R.P., Kavanagh T.E., Clarke B.J.: Hop lipids and beer quality. Brewers Digest, 1975, **50**: 58-60.
31. Kostoff D.: Studies on polyploid plants. XVIII. Cytogenetic studies on *Nicotiana sylvestris* × *N. tomentosiformis* hybrids and amphidiploids and their bearings on the problem of the origin of *N. tabacum*. Crit. Rev. Acad. Sci., 1938, **18**: 459-462.
32. Kostoff D.: Cytogenetics of the genus *Nicotiana*. State Printing House, Sofia, 1943, pp. 1071.
33. Krájl D.: Diploid and tetraploid crossing of hop (*Humulus lupulus* L.). Kmetijstvo, 1973, **21**: 155-174.
34. Krájl D.: Diploid and polyploid breeding with hop. EUCARPIA Meeting Section on Mutation and Poliploidy, Novi Sad, 1976.
35. Laskowska D., Berbeć A.: Cytology and fertility of viable hybrids of *Nicotiana tabacum* L. cv. TB-566 with *N. alata* Link et Otto. Journal of Applied Genetics, 2005, **46**: 11-18.
36. Laskowska D., Berbeć A.: TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between ‘Polalta’ and ‘Wiślica’. Plant Breeding, 2010, **129**: 731-733.
37. Lloyd R.: Tissue culture as a means of circumventing lethality in an interspecific *Nicotiana* hybrid. Tobacco Science, 1975, **19**: 4-6.
38. Mansouri H., Bagheri M.: Induction of polyploidy and its effect on *Cannabis sativa* L. In: Botany and biotechnology, S. Chandra, H. Lata, M. El Sohly (eds). Springer: Cham, Switzerland, 2017, pp. 365-383.
39. Moutschen-Dahmen J., Moutschen-Dahmen M.: Radiation Induced Polyploidy in *Nigella damascena*. Caryologia, 1970, **23**: 501-513.
40. Murashige T., Nakano R.: Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploidy plants. Journal of Heredity, 1966, **57**: 115-118.
41. Patzak J., Henychová A.: Hop breeding and composition of hop varieties around the world. Published by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Prague 2016, p. 45-50.
42. Probasco G., Varnum S., Hysert D.: Millennium-a new hop variety. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2006, **64**: 155-157.
43. Ramsey J., Schemske D.W.: Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 1998, **29**: 467-501.
44. Roborgh R.H.J.: The Production of seedless varieties of hop (*Humulus lupulus*) with colchicine. New Zealand Journal of Agricultural Research 1969, **12**: 256-259.



45. Roy A.T., Leggett G., Koutoulis A.: *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 2001, **20**: 489-495.
46. Sattler M.C., Carvalho C.R., Clarindo W.R.: The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta, 2016, **243**: 281-296.
47. Shahadati-Moghaddam Z., Hosseini A., Soorni J., Trojak-Goluch A.: Development of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) doubled haploids lines resistant to potato virus Y<sup>o</sup>. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2016, **76(3)**: 333-340.
48. Simmonds N.W.: Polyploidy in plant breeding. SPAN, 1980, **23**: 73-75.
49. Škof S., Bohanec B., Kastelec D., Luthar Z.: Spontaneous induction of tetraploidy in hop using adventitious shoot regeneration method. Plant Breeding, 2007, **126(4)**: 416-421.
50. Skomra U., Przybyś M., Trojak-Goluch A.: Kierunki badań naukowych wspierające doskonalenie genotypów chmielu. Studia i Raporty IUNG-PIB, 2012, **31(5)**: 21-37.
51. Šmalcelj B., Čurković Perica M.: Development of Anther-Derived Flue-Cured Tobacco Dihaploids from PVY Resistant DH10 Hybrid. Die Bodenkultur, 2000, **51(1)**: 11-17.
52. Stebbins G.L.: Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnolds Publ.: London, UK, 1971, p. 43-46.
53. Švécařová M., Navrátilová B., Hašler P., Ondřej V.: Artificial induction of tetraploidy in *Humulus lupulus* L. using oryzalin. Acta Agrobotanica, 2019, **72**: 1764.
54. Tate J.A., Soltis D.E., Soltis P.S.: Polyploidy in plants. In: The evolution of the genome, T.R. Gregory (ed.). Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2005, pp. 371-426.
55. teBeest M., LeRoux J.J., Richardson D.M., Brysting A.K., Suda J., Kubešová M., Pyšek P.: The more the better? The role of poliploidy in facilitating plant invasions. Annals of Botany, 2012, **109**: 19-45.
56. Ternovsky M.F.: Die Fragen der Immunitat bei Vertretern der Gattung *Nicotiana*. Der Zuchter, 1934, **6**: 140-144.
57. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Cytological investigations of the interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. Journal of Applied Genetics, 2003, **44**: 45-54.
58. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Meiosis and fertility in interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. and their derivatives. Plant Breeding, 2007, **126(2)**: 201-206.
59. Trojak-Goluch A., Berbeć A.: Resistance to black root rot (*Chalara elegans* Nag. Raj and Kendrick) and some growth characteristics in doubled haploid derivatives of the F<sub>1</sub> hybrid of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Polish Journal of Agronomy, 2009, **1**: 52-55.
60. Trojak-Goluch A., Skomra U.: Artificially induced polyploidization in *Humulus lupulus* L. and its effect on morphological and chemical traits. Breeding Science, 2013, **63**: 393-399.
61. Trojak-Goluch A., Kawka M., Czarnicka D.: The effects of explant source and hormone content on plant regeneration and induction of tetraploids in *Humulus lupulus* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 2015, **51**: 152-159.
62. Trojak-Goluch A., Laskowska D., Kursa K.: Morphological and chemical characteristics of doubled haploids of flue-cured tobacco combining resistance to *Thielaviopsis basicola* and TSWV. Breeding Science, 2016, **66**: 293-299.
63. Trojak-Goluch A.: Regeneracja pędów i stopień ploidalności roślin uzyskanych w kulturach *in vitro* fragmentów walca osiowego haploidalnych łodyg tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.). Polish Journal of Agronomy, 2020, **41**: 3-10.
64. Trojak-Goluch A., Skomra U.: Ploidy variation and agronomic performance of F<sub>1</sub> hybrids of tetraploid and diploid forms of *Humulus lupulus* L. Breeding Science, 2020, **70**: 176-182.
65. Walker D.R., Aycock M.K.: Development of anther-derived dihaploids to combine disease resistance in Maryland tobacco. Crop Science, 1994, **34(2)**: 335-338.

66. W a r m k e H.E., Blakeslee A.F.: Induction of tetraploidy in *Nicotiana glauca* and in the sterile hybrid *N. tabacum* × *N. glutinosa*. *Genetics*, 1939, **24**: 109-110.
- 

Adres do korespondencji:

*mgr Magdalena Kawka-Lipińska; dr hab. Anna Trojak-Goluch*  
*Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin*  
*IUNG-PIB*  
*ul. Czartoryskich 8*  
*24-100 Puławy*  
*tel.: 81 4786 934; 81 4786 933*  
*e-mail: Magdalena.Kawka@iung.pulawy.pl;*  
*Anna.Trojak-Goluch@iung.pulawy.pl;*

---

AUTOR	ORCID
Magdalena Kawka-Lipińska	0000-0003-1039-5280
Anna Trojak-Goluch	0000-0002-5191-4414