

Zadanie 77: Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałycza), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*.

W ramach zadania w 2018 r. prowadzono 6 tematów badawczych.

Temat badawczy 1. Analiza żywotności pyłku form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej i ałyczy. Badano żywotność pyłku form ojcowskich, wykorzystanych w zrealizowanym w 2018 r. programie krzyżowań oddalonych (met. 1 – barwienie 2% acetoorceiną) oraz jego zdolność do kiełkowania w warunkach *in vitro* (met. 2) i *in vivo* (met. 3 – wzrost łagiewki pyłkowej). Pierwszą i drugą metodę zastosowano podczas oceny żywotności i zdolności kiełkowania pyłku 13 wybranych genotypów ojcowskich, a do obserwacji wzrostu łagiewki pyłkowej przez tkanki słupka (met. 3) użyto materiału biologicznego z 12 kombinacji krzyżowań (śliwa japońska × morela). Wyniki barwienia acetoorceiną wskazywały na wysoką żywotność pyłku, ale nie przekładały się na jego zdolność do kiełkowania. Zdolność kiełkowania pyłku śliwy japońskiej wynosiła maksymalnie 3%, a genotypów moreli od 30% do 72%. Wyniki te wskazują, że zastosowanie śliwy japońskiej jako formy ojcowskiej może wpływać limitująco na liczbę uzyskiwanych zawiązków owoców. Obserwacje w warunkach *in vivo* wykazały, że łagiewka pyłkowa moreli dociera do komórki jajowej śliwy japońskiej po upływie 72 godzin od zapylenia. Pyłek kiełkował na znamionach słupków w każdej z analizowanych kombinacji krzyżowań, ale tylko dla czterech z dwunastu kombinacji łagiewka pyłkowa osiągnęła poziom bliski położenia komórki jajowej. Największą liczbę słupków, w których łagiewka dotarła do poziomu zalążni zaobserwowano w kombinacjach krzyżowań D17-73 × MII-19 (25% słupków) oraz D17-73 × 'Somo' (20%).

Temat badawczy 2. Ocena możliwości krzyżowania różnych genotypów z rodzaju *Prunus* (ałycza, morela, śliwa japońska, śliwa domowa). Badano możliwość krzyżowania oddalonego wybranych genotypów ałyczy, moreli, śliwy japońskiej i śliwy domowej metodami hodowli klasycznej. Program zapyleń międzygatunkowych wykonany został w polu w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach oraz w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach (warunki częściowo kontrolowane). Wykonano 20 kombinacji krzyżowań i zapyłono 4 740 kwiatów. Uzyskano 642 owoce/zawiązki owoców, co stanowi 13,5% zapyłonych kwiatów. Najlepsze zawiązywanie owoców w stosunku do liczby zapyłonych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach mieszańca (ałycza × śliwa japońska) × śliwa japońska - 42,6% i śliwa japońska × ałycza - 23,6%. Najmniej zawiązanych owoców uzyskano w krzyżowaniu ałycza × morela (5,1%) oraz w krzyżowaniu wstecznym mieszańca (śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska (7,3%). Wyniki badań wskazują, że hybrydyzacja oddalona krzyżowanych gatunków, przeprowadzona metodami hodowli konwencjonalnej, odznacza się małą efektywnością, ale możliwe jest uzyskanie nasion i siewek mieszańcowych.

Temat badawczy 3. Ocena zdolności kiełkowania uzyskanych nasion mieszańcowych. Badano zdolność kiełkowania nasion, uzyskanych z krzyżowań oddalonych wybranych gatunków z rodzaju *Prunus*. Wydobyte z owoców nasiona różnych genotypów śliwy japońskiej, ałyczy oraz mieszańca międzygatunkowego śliwy japońskiej i ałyczy dzielono na dwie grupy: prawidłowo wykształcone - żywotne oraz zdeformowane – niezdolne do kiełkowania. Z uzyskanych 788 nasion 724 szt. (91,9%) było dobrze wykształcone, natomiast 64 nasiona (8,1%) miały zdeformowane liścienie. Nasiona prawidłowo wykształcone zostały odkażone, wymieszane z wilgotnym podłożem do stratyfikacji (perlit) i poddane procesowi stratyfikacji. Pierwsze nasiona skiełkowały po 80 dniach stratyfikacji, jednak najwięcej nasion skiełkowało w 90 dniu stratyfikacji. Łącznie skiełkowały 684 nasiona, co stanowi 94,8% stratyfikowanych nasion. Kiełkowanie nasion było zróżnicowane i zależało od krzyżowanych form rodzicielskich. Najlepiej kiełkowały nasiona genotypów OSL 58, OSL 65 i 'Najdiena' (100% skiełkowanych nasion), natomiast nieco słabiej genotypu 'Trumlar' (92,6% skiełkowanych nasion). Wstępne wyniki potwierdzają, że zdolność kiełkowania nasion uzależniona jest od genotypu krzyżowanych form rodzicielskich.

Temat badawczy 4. Optymalizacja i prowadzenie hodowli zarodków *in vitro*. Optymalizowano warunki do prawidłowego rozwoju 10-tygodniowych zarodków, uzyskanych w wyniku hybrydyzacji oddalonej w obrębie rodzaju *Prunus*. Do badań wykorzystano 105 zawiązków owoców, uzyskanych z 10 kombinacji krzyżowań. Z uzyskanych zawiązków wyizolowano 81 nasion mieszańcowych. Kontrolę stanowiły zarodki wyizolowane ze 180 zawiązków uzyskanych w wyniku zapłodnienia wewnątrzgatunkowego (z wolnego zapylenia). Po wydobyciu z owoców pestki poddawano sterylizacji i wydobywano z nich nasiona, które wykładano na pożywki MS (Murashige i Skoog) i WPM (Lloyd i McCown) i C2d (Chee i Pool). W celu przełamania spoczynku nasiona poddano 10-tygodniowej

stratyfikacji w temperaturze 2°C, prowadząc równocześnie obserwacje zmian morfologicznych. Po okresie stratyfikacji z nasion usuwano okrywę nasienną, a zarodki przekładano na świeże pożywki o takim samym składzie. Po 10 tygodniach w chłodni żywotnych pozostało 57 zarodków z krzyżowań międzygatunkowych i 145 zarodków z wolnego zapylenia. Po przełożeniu zarodków na świeżą pożywkę i umieszczeniu ich w fitotronie, w ciągu 4 tygodni z kontrolnych zarodków genotypów śliwy japońskiej 'Czernuszka' × wolne zapylenie oraz D17-73 × wolne zapylenie na każdej pożywce otrzymano 55%-70% roślin z liczby wyłożonych zarodków, natomiast z zarodków genotypu ałyczy 'Amelia' × wolne zapylenie uzyskano 40%-55% roślin. Z zarodków uzyskanych z krzyżowań międzygatunkowych uzyskano mniej roślin niż z zarodków uzyskanych w wyniku zapłodnienia wewnątrzgatunkowego (z wolnego zapylenia). Najmniejszą zdolność kiełkowania nasion i wykształcania roślin zaobserwowano dla kombinacji 'Amelia' × morela (28% na MS i 14% na C2d) oraz 'Czernuszka' × morela na C2d (20%). Dla nasion z pozostałych kombinacji krzyżowań zdolność rozwoju w roślinę zawierała się w przedziale 40%-67%, bez względu na pożywkę. Dla wszystkich kombinacji międzygatunkowych najniższy stopień regeneracji roślin uzyskano na pożywce C2d (14%-40%). Łącznie uzyskano 31 roślin z 57 zarodków uzyskanych z krzyżowań oddalonych oraz 105 roślin ze 145 zarodków kontrolnych.

Temat badawczy 5. Analizy molekularne form rodzicielskich i uzyskanych siewek mieszańcowych. Opracowano profile genetyczne oraz potwierdzono status mieszańca wybranych genotypów uzyskanych w wyniku hybrydyzacji oddalanej. Materiał do analiz stanowiły rośliny z rodzaju *Prunus*: 40 genotypów potomnych uzyskanych w wyniku planowanego krzyżowania oddalonego prowadzonego w poprzednich latach oraz jeden genotyp nowej formy matecznej (klon nr MMG K4 13 2013 22/1). Materiał genetyczny izolowano z młodych liści metodą opartą na CTAB, opisaną przez Doyle i Doyle. Łącznie przeprowadzono 1.722 reakcje amplifikacji, w których wygenerowano 192 amplikony, w tym 173 polimorficznych o długości od 120 do 520 pz. Do opracowania profilu genetycznego klonu nr MMG K4 13 2013 22/1 zastosowano zestaw 20 par oligonukleotydów, w reakcji z którymi uzyskano 44 amplikony o długość od 90 do 300 pz. Do identyfikacji mieszańców międzygatunkowych z rodzaju *Prunus* zastosowano zestaw 7 par starterów, wytypowanych w pierwszym roku badań. Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla 38 z 40 testowanych genotypów.

Temat badawczy 6. Ocena wybranych cech biologicznych mieszańców i ich form rodzicielskich. Oceniono wybrane cechy biologiczne siewek mieszańcowych, uzyskanych w wyniku krzyżowania oddalonego różnych genotypów ałyczy, moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej. W 2018 roku prowadzono ocenę 180 genotypów (siewek mieszańcowych) uzyskanych w latach 2013-2016. Zakwitło 118 siewek mieszańcowych (65,6% ocenionych genotypów). Dużo siewek tak jak w roku poprzednim wykazywało zaburzenia w rozwoju kwiatów. W kwiatach znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. Łącznie zaowocowało 69 siewek czyli 38,3% z ogólnej liczby ocenionych genotypów. Z 19 siewek uzyskanych w 2013 roku zaowocowało 12 (63,2%), z 73 siewek uzyskanych w 2014 roku zaowocowały 32 (43,9%), a z 31 siewek uzyskanych w 2015 roku zaowocowało 25 (87,1%). W 2018 r. nie owocowały siewki uzyskane w roku 2016. Wyróżniającą się populacją były siewki z kombinacji krzyżowania mieszańca śliwy japońskiej i ałyczy 'Najdiena' ze śliwą japońską 'Blue Gigant'. W trzecim roku wzrostu (drugi rok po posadzeniu w polu) każda z ocenionych siewek w tej kombinacji zawiązała owoce. Z 14 ocenionych siewek 7 genotypów odznaczyło się średnim lub intensywnym owocowaniem i wytwarzaniem atrakcyjnych owoców. Wytwarzane przez niektóre z tych siewek owoce odznaczały się dobrym odchodzeniem miąższu od pestki, co w przypadku owoców śliwy japońskiej jest rzadką cechą. W roku 2018 rozmnożono kolejnych 40 genotypów siewek mieszańcowych, które jesienią w liczbie 149 drzew posadzono w kwaterze selekcyjnej w Dąbrowicach. Każdy genotyp siewki został posadzony w liczbie od 2 do 4 drzewek.