

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

Hybrydyzacja gatunków w obrębie rodzaju *Prunus* jest dość trudna, a jeśli już zachodzi, to charakteryzuje się niską efektywnością. Dlatego w Instytucie Ogrodnictwa prowadzone są badania nad możliwością zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus* poprzez zastosowanie hybrydyzacji oddalonej gatunków ałycza, śliwa japońska, morela oraz śliwa domowa metodą hodowli klasycznej przy wykorzystaniu techniki *embryo-rescue*. Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że przy pomocy konwencjonalnych metod hodowli (krzyżowanie tradycyjne) możliwy jest transfer genów warunkujących cenne cechy biologiczne między wymienionymi gatunkami i uzyskanie nowych nie występujących w naturze genotypów, posiadających skumulowane pożądane cechy występujące w obrębie różnych gatunków z rodzaju *Prunus*. Genotypy te pozwolą poszerzyć istniejącą bioróżnorodność w obrębie tego rodzaju. W ramach zadania w 2020 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 2020 r. programie krzyżowań oddalonych (metoda 1 – barwienie 2% acetoorceiną) oraz jego zdolność do kiełkowania w warunkach *in vitro* (metoda 2) i *in vivo* (metoda 3 – wzrost łagiewki pyłkowej). Pierwszą i drugą metodę zastosowano dla oceny jakości pyłku 11 genotypów ojcowskich. W metodzie trzeciej, polegającej na obserwacji wzrostu łagiewki pyłkowej, użyto materiału biologicznego z 14 kombinacji krzyżowań (śliwa japońska × morela). Wyniki barwienia acetoorceiną wskazywały na wysoką żywotność pyłku, ale nie przekładały się na jego zdolność do kiełkowania. Niezależnie od zastosowanej pożywki najniższą zdolność kiełkowania miał pyłek śliwy japońskiej (20-32% kiełkujących ziaren), a najwyższą moreli (50-75%). Wyniki te wskazują, że zastosowanie ocenianych genotypów śliwy japońskiej jako form ojcowskich może wpływać limitująco na liczbę uzyskiwanych owoców. Obserwacje w warunkach *in vivo* wykazały, że łagiewka pyłkowa moreli dociera do komórki jajowej śliwy japońskiej w ciągu 72 godzin od zapylenia. Pyłek kiełkował na znamionach słupków w każdej z analizowanych kombinacji krzyżowań, ale tylko dla 7 z 14 kombinacji łagiewka pyłkowa osiągnęła poziom bliski położenia komórki jajowej. Największą liczbę słupków, w których łagiewka dotarła do poziomu zalążni zaobserwowano w kombinacjach krzyżowań 'Czarnuszka' × MII-42 (20%) oraz 'Czarnuszka' × MII-19 (15%), D17-73 × MII-19 (15%) i 'Trumlar' × 'Early Orange' (15%).

Temat badawczy 2. Ocena możliwości krzyżowania różnych genotypów z rodzaju *Prunus* (ałycza, morela, śliwa japońska).

Badano możliwość i efektywność krzyżowania oddalonego wybranych genotypów moreli, śliwy japońskiej i ałyczy metodami hodowli klasycznej. Program zapyleń międzygatunkowych wykonany został w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach (warunki częściowo kontrolowane) oraz w polu w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Wykonano 15 kombinacji krzyżowań, w których zapylono 6 697 kwiatów. Łącznie uzyskano 860 owoców/zawiązków owoców, co stanowi 12,8% liczby zapylnych kwiatów. Najlepsze zawiązywanie owoców w stosunku do liczby zapylnych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach śliwa japońska × morela (15,5%), a najgorsze w krzyżowaniu wstecznym (śliwa japońska × morela) × morela (3,7%). W krzyżowaniu wstecznym mieszańca międzygatunkowego 'Najdiena' (śliwa japońska × ałycza) ze śliwą japońską uzyskano 7,2% zawiązanych owoców, a w krzyżowaniu śliwa japońska × ałycza uzyskano 7,0% owoców. 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 mieszańcowe śliwy japońskiej, moreli i ałyczy dzielono na dwie grupy; prawidłowo wykształcone – żywotne oraz zdeformowane – niezdolne do kiełkowania. Z uzyskanych 1 047 nasion 751 szt. (71,7%) było dobrze wykształcone, natomiast 296 nasion (28,3%) miało zdeformowane liście. Nasiona prawidłowo wykształcone zostały odkażone, wymieszane z wilgotnym podłożem do stratyfikacji (perlit) i poddane procesowi stratyfikacji. Pomimo długotrwałej stratyfikacji i pozbawienia nasion endokarpów nie wszystkie nasiona były zdolne do kiełkowania. Pierwsze nasiona skiełkowały po 80 dniach stratyfikacji. Łącznie spośród 751 nasion dobrze wykształconych skiełkowało 714 szt., co stanowi 95,1%. Kiełkowanie nasion było zróżnicowane i zależało od krzyżowanych form rodzicielskich. W każdej kombinacji było dość dobre i wynosiło od 84,4% do 100% skiełkowanych nasion. Średnio najlepiej kiełkowały nasiona genotypów śliwy

japońskiej 'Trumlar' i D 17-73 (średnio 100,0% oraz 98,3% skielkowanych nasion), natomiast najslabiej genotypu 'Najdiena' (84,4% skielkowanych 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 oddalanej w obrębie rodzaju *Prunus*. Do badań wykorzystano 522 zawiązki owoców, uzyskanych z 9 kombinacji krzyżowań oddalonych. Z uzyskanych zawiązków wyizolowano 422 nasiona mieszańcowe. Kontrolę stanowiły nasiona wyizolowane z 210 zawiązków uzyskanych w wyniku zapłodnienia wewnątrzgatunkowego (z wolnego zapylenia). Wydobyte z pestek nasiona poddawano sterylizacji i wykładano je na 5 pożywek - MS (Murashige i Skoog), ½ MS (Murashige i Skoog), C2d (Lloyd i McCown), WPM (Chee i Pool) oraz Boxus (Boxus). 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 i wyizolowane zarodki przekładano na świeże pożywki o takim samym składzie. Po 10 tygodniach w chłodni pozostało 330 żywotnych zarodków z krzyżowań międzygatunkowych i 189 zarodków z wolnego zapylenia (wewnątrzgatunkowych). Po umieszczeniu w fitotronie w 4 tygodniu wzrostu uzyskano odpowiednio 253 mieszańce oddalone i 124 rośliny kontrolne - wewnątrzgatunkowe. Największą zdolność kiełkowania zarodków i wykształcania roślin zaobserwowano dla kombinacji 'Czarnuszka' × morela, D17-73 × morela i 'Trumlar' × morela. Średnio dla wszystkich kombinacji oddalonych na pożywkach MS, ½MS i WPM, w odniesieniu do wyłożonych zarodków, uzyskano odpowiednio 55%-79%, 55%-82% i 59%-77% mieszańców międzygatunkowych. Najmniej mieszańców uzyskano na pożywce C2d i Boxus (41% - 63%). Wykazano, że efektywność metody *embryo rescue* w hodowli niedojrzałych zarodków uzyskanych w wyniku krzyżowania oddalonego gatunków z rodzaju *Prunus* zależy od genotypu i rodzaju pożywki.

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 uzyskanych w wyniku planowanego krzyżowania oddalonego prowadzonego w poprzednich latach oraz jeden genotyp nowej formy matecznej (klon nr MMG K4 13 2013 27/1). Materiał genetyczny izolowano z młodych liści metodą opartą na CTAB, opisaną przez Doyle i Doyle. Łącznie przeprowadzono 1 928 reakcji amplifikacji, w których wygenerowano 182 amplikony o długości od 110 do 220 pz, w tym 17 monomorficznych. Do opracowania profilu genetycznego klonu nr MMG K4 13 2013 77/13 zastosowano zestaw 20 par oligonukleotydów, w reakcji z którymi uzyskano 37 ampikonów o długość od 90 do 230 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 wszystkich 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 i śliwy japońskiej. W 2020 roku prowadzono ocenę 280 genotypów (siewek mieszańcowych) uzyskanych w latach 2015-2018. Zakwitło 228 siewek mieszańcowych (81,4% ocenionych genotypów). Duża część siewek mieszańcowych śliwy japońskiej i moreli wykazała zaburzenia genetyczne w postaci rozwoju kwiatów. W kwiatach znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. Z mocno zredukowanych pylników nie dochodziło do osypywania się pyłku. W efekcie tego wiele z ocenianych siewek nie owocowało pomimo dobrego kwitnienia. Łącznie zaowocowało 79 siewek czyli 28,2% ocenianej populacji. W 2020 r. zaowocowały wszystkie siewki posadzone w 2015 roku. Ze 112 siewek posadzonych w 2016 roku zaowocowały 52 (46,4%), a z 87 siewek posadzonych w 2017 r. zaowocowało 12 (13,8%). Spośród siewek posadzonych w 2018 r. zaowocowały 4 siewki (5,7%). Podobnie jak w roku poprzednim wyróżniającą się populacją były siewki uzyskane ze skrzyżowania mieszańca śliwy japońskiej i ałyczy 'Najdiena' ze śliwą japońską 'Blue Gigant'. Zarówno w piątym, jak i w czwartym roku wzrostu oceniane siewki owocowały na dobrym poziomie. Siewki mieszańcowe uzyskane z krzyżowania tych rodziców na ogół odznaczały się średnim lub intensywnym owocowaniem oraz 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. Dobre owocowanie tych siewek spowodowane jest zapewne zgodnością genetyczną krzyżowanych form rodzicielskich oraz ich

specyficzną zdolnością kombinacyjną pod względem tej cechy. Dobrym owocowaniem odznaczały się siewki uzyskane ze skrzyżowania ałyczy 'Amelia' i moreli 'Sirena'. Niektóre z tych siewek owocowały na średnim poziomie pomimo wystąpienia przymrozków wiosennych. Niestety wytwarzane przez te siewki owoce były niewielkie i mało atrakcyjne. Znacznie atrakcyjniejsze owoce wytwarzały siewki uzyskane ze skrzyżowania śliwy japońskiej 'Trumlar' z wybranymi genotypami moreli. Siewki te wytwarzały owoce z delikatnym omszeniem, co jest dobrym markerem morfologicznym potwierdzającym, że formą ojcowską tych siewek jest morela, ponieważ owoce śliwy japońskiej są pozbawione omszenia. Owoce części siewek w tej populacji były znacznie atrakcyjniejsze niż owoce siewek mieszańcowych ałyczy i moreli, a ich miąższ częściowo oddzielał się od pestki.

Podsumowanie

Uzyskane genotypy pozwolą poszerzyć istniejącą bioróżnorodność w obrębie rodzaju *Prunus*, a w przyszłości mogą być wykorzystane także w hodowli ukierunkowanej na uzyskanie nowych odmian moreli i śliwy japońskiej lub śliwomoreli, a także podkładek dla tych gatunków.

Publikacja:

Szymajda M., Kuras A., Żurawicz E. 2020. Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców i nasion w hybrydyzacji oddalanej trzech gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza). Biuletyn IHAR 291: 87-92, DOI: 10.37317/biul-2020-PB88

BIULETYN INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN Nr 291 / 2020 : 87–92
E-ISSN: 2657–8913 DOI: 10.37317/biul-2020-PB88



Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców i nasion w hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza)

Influence of selected parental forms on fruit and seed set in distant hybridization of three fruit tree species of the genus *Prunus* (Japanese plum, apricot, myrobalan plum)

Marek Szymajda[✉], Anita Kuras[✉], Edward Żurawicz[✉]

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 98–100 Skierniewice,
✉ e-mail: marek.szymajda@inhort.pl

Celem badań była ocena efektywności hybrydyzacji oddalonej wybranych genotypów drzew owocowych należących do trzech gatunków z rodzaju *Prunus* – śliwa japońska (*P. salicina* Lindl.), morela (*P. armeniaca* L.) i ałycza (*P. cerasifera* Ehrh.). Program hybrydyzacji wykonano w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, wiosną 2019 r. Do badań użyto 8 genotypów rodzicielskich, tj. morela – 4 genotypy ('Early Orange', 'Harcot', 'Sirena', 'Somo'), śliwa japońska – 3 genotypy ('Czarnuszka', 'Trumlar', D 17–73) oraz ałycza – 1 genotyp ('Amelia'). Program hybrydyzacji wykonano w układzie: śliwa japońska × morela – 12 kombinacji krzyżowań, śliwa japońska × ałycza – 3 kombinacje krzyżowań. Uzyskane wyniki pokazały, że wpływ genotypu śliwy japońskiej jako formy matecznej jest większy niż moreli jako formy ojcowskiej na zawiązywanie owoców w hybrydyzacji oddalonej tych gatunków. Śliwa japońska 'Czarnuszka' znacznie lepiej zawiązywała owoce niż 'Trumlar' po zapyleniu pyłkiem tych samych form ojcowskich moreli. W dojrzałych owocach znajdowały się zarówno nasiona wykształcone prawidłowo (żywotne), jak i takie, które miały pomarszczoną okrywą nasienną i w różnym stopniu zniekształcone zarodki (nieżywotne). Udział owoców z niewykształconymi nasionami był różny i zależał od krzyżowanych gatunków oraz od genotypu formy matecznej. W kombinacjach krzyżowań śliwa japońska × ałycza uzyskano więcej wykształconych nasion niż w kombinacjach śliwa japońska × morela, w stosunku do całkowitej liczby uzyskanych nasion (pestek). Obumieranie zarodków i nieprawidłowe wykształcenie otrzymanych nasion wskazuje na istnienie postzygotycznych barier krzyżowalności w krzyżowaniu śliwy japońskiej, moreli i ałyczy.

Słowa kluczowe: ałycza, krzyżowanie międzygatunkowe, morela, *Prunus*, śliwa japońska

The aim of the study was to evaluate the efficiency of distant hybridization of selected fruit tree varieties in three species of the genus *Prunus* – Japanese plum (*P. salicina* Lindl.), apricot (*P. armeniaca* L.) and myrobalan plum (*P. cerasifera* Ehrh.). The hybridization programme was carried out in a high plastic tunnel in the Pomological Orchard of the Research Institute of Horticulture in Skierniewice, in the spring of 2019. Eight parental genotypes, i.e. apricot – 4 genotypes ('Early Orange', 'Harcot', 'Sirena', 'Somo'), Japanese plum – 3 genotypes ('Czarnuszka', 'Trumlar', D 17–73) and myrobalan plum – 1 genotype ('Amelia') were used for the study. The hybridization programme was carried out while following the system of Japanese plum × apricot – 12 cross combinations, Japanese plum × myrobalan plum – 3 cross combinations. The obtained results showed that the influence of the Japanese plum genotype as a maternal form was greater than that of apricot as a paternal form on fruit-setting in the distant hybridization of these species. Furthermore, Japanese plum 'Czarnuszka' set fruit much better than 'Trumlar' after pollination with pollen of the same paternal forms of apricot. The ripe fruit also contained both properly developed seeds (viable), as well as those that had a wrinkled seed coat and malformed embryos (non-viable). The proportion of fruits with underdeveloped seeds varied and depended on the crossed species and on the genotype of the maternal form. In the crossing of Japanese plum × myrobalan plum, less underdeveloped seeds were obtained in relation to the total number of seeds (stones) obtained than in the crossing of Japanese plum × apricot. Embryo mortality and abnormal seed formation indicate the existence of post-zygotic barriers to crossability in the crossing of Japanese plum, apricot and myrobalan plum.

Keywords: apricot, interspecific crossing, Japanese plum, myrobalan plum, *Prunus*,

Wstęp

Krzyżowanie roślin należących do odległych genetycznie gatunków (hybrydyzacja oddalona) umożliwia uzyskanie nowych genotypów,

charakteryzujących się innowacyjnymi cechami, jak np. zwiększona odporność/tolerancja na czynniki biotyczne i abiotyczne, mniejsza siła wzrostu roślin lub lepsza jakość owoców. Metoda



ta znajduje zastosowanie zwłaszcza wówczas, gdy w obrębie określonego gatunku roślin brak jest źródeł genów, warunkujących pożądane cechy lub ich ekspresja jest niewystarczająca (Layne i Sherman, 1986).

Hybrydyzację oddaloną stosuje się także w hodowli roślin sadowniczych, w tym w hodowli drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (Layne i Sherman, 1986; Duval i in., 1994; Hakoda i in., 1998). Jednak z krzyżowań oddalonych w obrębie rodzaju *Prunus* zazwyczaj otrzymuje się bardzo mało owoców w stosunku do liczby zapylonych kwiatów (Yoshida i in., 1975; Jun i Chung, 2007). Powodem niskiej efektywności hybrydyzacji oddalanej jest istnienie licznych barier o charakterze morfologicznym, anatomicznym i fizjologiczno-biochemicznym (Zenkteler, 1990). Bariery te uniemożliwiają zapłodnienie i powstanie zarodka (bariery prezygotyczne) lub zaburzają jego rozwój (bariery postzygotyczne) (Perez i More, 1985; Rubio-Cabates, Socias i Company, 1996; Liu i in., 2007).

Literatura dotycząca otrzymywania mieszańców międzygatunkowych drzew owocowych w rodzaju *Prunus* nie jest bogata, ale są doniesienia o mieszańcach śliwy japońskiej (*P. salicina* Lindl.), ałyczy (*P. cerasifera* Ehrh.) lub ich mieszańców z morelą (*P. armeniaca* L.), które nazwano plumcot (Okie, 2005). W wyniku krzyżowania wstecznego (śliwa japońska × morela) × śliwa japońska otrzymano mieszańce, którym nadano nazwę pluot. Przykładem takich mieszańców są odmiany 'Flavor Fall' i 'Flavorich', otrzymane i uprawiane w ciepłym klimacie Kalifornii (Top i in., 2012).

Brak odmian moreli i śliwy japońskiej dobrze przystosowanych do uprawy w warunkach chłodniejszej strefy klimatu umiarkowanego stanowi jeden z najważniejszych problemów w uprawie tych gatunków w krajach środkowej i północnej Europy, w tym w Polsce. Drzewa tych gatunków nie posiadają dostatecznej wytrzymałości na ujemne temperatury w czasie zimy, w wyniku czego często przemarzają ich pąki kwiatowe (Szabó i Nyeki, 1994; Szabó, 2003; Yao, 2011; Szymajda i in., 2013). Hybrydyzacja oddalona może umożliwić transfer genów warunkujących wyższą wytrzymałość na mrozy zimowe np. z gatunków *P. spinosa* (tamina) lub *P. cerasifera* do gatunków *P. armeniaca* i *P. salicina* (Duval i in., 1994; Layne i Sherman, 1986; Neumüller, 2011). Dobrym przykładem takich możliwości są ukraińskie odmiany 'Kometa' i 'Najdienna', które są mieszańcami śliwy japońskiej i ałyczy. Odmiany te odznaczają się większą tolerancją na mrozy zimowe niż tradycyjne odmiany śliwy japońskiej.

Celem prezentowanych badań jest ocena efektywności hybrydyzacji oddalanej wybranych genotypów drzew owocowych należących do trzech gatunków z rodzaju *Prunus* – śliwa japońska, morela i ałycza.

Material i Metody

Lokalizacja badań i materiał roślinny

Badania prowadzono w 2019 r. w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Krzyżowano 8 genotypów rodzicielskich należących do rodzaju *Prunus*, tj. morela – 4 genotypy ('Early Orange', 'Harcot', 'Sirena', 'Somo'), śliwa japońska – 3 genotypy ('Czarnuszka', 'Trumlar', 'D 17-73') oraz ałycza – 1 genotyp ('Amelia').

Program zapyleń

Zapyleń wykonano na drzewach rosnących w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach (Polska Centralna). Prowadzono je na kwiatkach wykastrowanych w fazie białego, mocno nabrzmiałego zamkniętego pąka. Słabo wykształcone pąki kwiatowe usuwano. Bezpośrednio po kastracji na znamiona słupków wykastrowanych kwiatów nanoszono, przy pomocy pędzelka, pyłek o znanej żywotności. Nakładanie pyłku powtarzano w drugim dniu. Program zapyleń wykonano w następującym układzie: śliwa japońska × morela – 12 kombinacji krzyżowań, śliwa japońska × ałycza – 3 kombinacje krzyżowań.

Przed zapyleńmi zbadano zdolność kiełkowania ziaren pyłku form ojcowskich moreli i ałyczy. W celu pozyskania pyłku wybierano pylniki z mocno nabrzmiałych pąków kwiatowych (tuż przed ich otwarciem). Pylniki suszono w temperaturze pokojowej na papierowych tackach przez kilkanaście godzin. Wysuszone ziarna pyłku wykładano na sztuczną pożywkę według Sharafi (2011), o składzie: sacharoza (15%), H_3BO_3 (5 mg L^{-1}) i Bactoagar (1%). Wzrost łagiewek oceniano po 20 godzinach inkubacji ziaren pyłku w ciemności, w temperaturze 24°C. Za żywotne uznawano te ziarna, dla których długość wyrastającej łagiewki co najmniej dwukrotnie przekraczała średnicę ziarna pyłku (Khan i Perveen, 2008). Żywotność pyłku oceniano na minimum 100 ziarnach pyłku, pobranych losowo z większej próby, w obrębie każdego genotypu.

Zawijanie owoców i nasion

Uzyskane owoce liczone w fazie ich dojrzałości zbiorczej, a ich zawijanie wyrażono w procentach w stosunku do zapylonych kwiatów. Wydobyte

z dojrzałych owoców pestki dokładnie oczyszczono z resztek miąższu poprzez kilkakrotne ich mycie pod bieżącą wodą oraz pozbawiono endokarpów za pomocą imadła stołowego w celu wydobycia nasion. Nasiona dzielono na dwie grupy – prawidłowo wykształcone oraz zdeformowane. Do dalszych badań (ocena zdolności kiełkowania nasion) przeznaczono tylko nasiona prawidłowo wykształcone. Wykształcanie nasion wyrażono w procentach w stosunku do całkowitej liczby otrzymanych nasion (pestek).

Stratyfikacja nasion

Prawidłowo wykształcone nasiona odkażono w 0,5% roztworze fungicydu Kaptan zawieszinowy 50 WP (50% kaptan) (Arysta Life Science North America Co., San Francisco, USA) poprzez moczenie przez okres 45–60 minut. Po odkażeniu nasiona wymieszano z wilgotnym podłożem do stratyfikacji (perlit), zapakowano do foliowych torebek i poddano stratyfikacji, którą prowadzono w inkubatorze do stratyfikacji nasion 'MIR-554' ('SANYO', Moriguchi, Japan) w temperaturze ok. 5°C. Nasiona z poszczególnych kombinacji poddawano stratyfikacji w różnych terminach w zależności od terminu dojrzewania owoców. Pierwsze dwa przeglądy nasion wykonano po 30 i 60 dniach od rozpoczęcia stratyfikacji, a następne co 10 dni. W trakcie tych przeglądów wybierano i liczone kiełkujące nasiona. Za skielkowane uznawano nasiona z widocznym 5–15 mm korzonkiem zarodkowym. Stratyfikację nasion prowadzono do 160 dnia. Zdolność kiełkowania nasion wyrażono w procentach w stosunku do liczby nasion poddanych stratyfikacji.

Wyniki i Dyskusja

Ocena efektywności wykonanej hybrydyzacji

W wykonanych 15 kombinacjach krzyżowań oddalonych uzyskano 1047 owoców, co stanowi 15,2% liczby zapylnych kwiatów. W krzyżowaniu śliwa japońska × morela i śliwa japońska × ałycza zawiązanie owoców było podobne, uzyskano 15,6% oraz 12,1% owoców (Tabela 1). Ponieważ były to krzyżowania międzygatunkowe, w których występują różne bariery krzyżowalności, wynik ten można uznać za dobry. Pozytywny wpływ na zawiązanie owoców na pewno miał wybór, dokonany na podstawie badań przeprowadzonych w poprzednich latach (Szymajda i in. 2015), krzyżowań w kierunku śliwa japońska × morela oraz śliwa japońska × ałycza zamiast w kierunku odwrotnym oraz genotypów śliwy japońskiej zgodnych

z formami ojcowskimi moreli i ałyczy. Więcej owoców w krzyżowaniu śliwa japońska × morela niż w krzyżowaniu odwrotnym uzyskali również Yoshida i in. (1975) oraz Jun i Chung (2007). Potwierdza to większą przydatność śliwy japońskiej niż moreli jako form matecznych w programach krzyżowań oddalonych tych gatunków.

Przyczyną dobrego zawiązywania owoców w krzyżowaniu śliwa japońska × morela mogła być także większa zdolność do szybszego wzrostu łagiewek pyłkowych moreli niż łagiewek śliwy japońskiej (Perez i Moore, 1985). Ponadto kwiaty śliwy japońskiej i ałyczy posiadają krótszy słupek niż kwiaty moreli w związku z czym łagiewka pyłkowa moreli, aby dotrzeć do zalążni ma do przebycia krótszą drogę niż łagiewka śliwy japońskiej w krzyżowaniu tych gatunków (Jun i Chung, 2007; Perez i Moore, 1985). Czynniki te, w mało sprzyjających warunkach pogodowych w czasie zapylenia, mogły mieć znaczący wpływ na zawiązanie owoców.

Powstawanie owoców zależało od formy matecznej śliwy japońskiej. Genotypy śliwy japońskiej 'Czarnuszka' i D 17-73, średnio dla użytych form ojcowskich moreli, dużo lepiej zawiązywały owoce niż śliwa japońska 'Trumlar'. Wyniki te sugerują, że wpływ genotypu śliwy japońskiej jako formy matecznej jest większy niż moreli jako formy ojcowskiej na zawiązywanie owoców w hybrydyzacji oddalonych tych gatunków. Ocena zdolności kiełkowania pyłku na sztucznej pożywce wykazała, że pyłek każdej formy ojcowskiej posiadał wysoką zdolność kiełkowania. Żywotność pyłku nie miała więc wpływu na różnice w zawiązywaniu owoców u form matecznych śliwy japońskiej.

Zawiązywanie owoców zależało też od krzyżowanych form rodzicielskich. Śliwa japońska 'Czarnuszka' bardzo dobrze zawiązywała owoce po zapyleniu pyłkiem moreli 'Somo', natomiast D 17-73 po zapyleniu pyłkiem moreli 'Early Orange'. Świadczy to o różnej zgodności genetycznej krzyżowanych form rodzicielskich śliwy japońskiej i moreli oraz o ich specyficznej zdolności kombinacyjnej pod względem tej cechy. Różną zgodność genetyczną form rodzicielskich wykazano też w krzyżowaniu śliwa japońska × ałycza. Genotyp 'Trumlar' zawiązywał lepiej owoce niż genotypy 'Czarnuszka' i D 17-73 po zapyleniu pyłkiem ałyczy 'Amelia'. W badaniach Arbeola i in. (2006) zawiązywanie owoców w krzyżowaniu ałyczy i moreli także było uzależnione od krzyżowanych form rodzicielskich i wynosiło od 0,9% do 18,7%.

Tabela 1.

Table 1.

Efektywność hybridyzacji oddalonych śliwy japońskiej, ałyczy i moreli (Skierniewice, 2019 r.)

Effectiveness of distant hybridization of Japanese plum, apricot and myrobalan plum (Skierniewice, 2019 r.)

Krzyżowane formy rodzicielskie Crossed parental forms ♀ × ♂	Zapylone kwiaty (szt.) Pollinated flowers (No.)	Uzyskane owoce Obtained fruit		Wykształcone nasiona Developed seeds		Skielkowane nasiona Germinated seeds	
		(szt.) (No.)	(%) ^a	(szt.) (No.)	(%) ^b	(szt.) (No.)	(%) ^c
śliwa japońska × morela							
Czarnuszka × Early Orange	720	162	22,5	68	42,0	60	88,2
Czarnuszka × Harkot	730	143	19,6	75	52,4	70	93,3
Czarnuszka × Sirena	200	17	8,5	15	88,2	6	40,0
Czarnuszka × Somo	790	208	26,3	173	83,2	158	91,3
Suma Total	2440	530	21,7	331	62,5	294	88,8
Trumlar × Early Orange	170	18	10,6	9	50,0	9	100,0
Trumlar × Harkot	220	8	3,6	5	62,5	5	100,0
Trumlar × Sirena	110	7	6,4	6	85,7	6	100,0
Trumlar × Somo	85	6	7,1	5	83,3	5	100,0
Suma Total	585	39	6,7	25	64,1	25	100,0
D 17-73 × Early Orange	570	158	27,7	110	69,6	108	98,2
D 17-73 × Harkot	830	82	9,9	63	76,8	60	95,2
D 17-73 × Sirena	750	23	3,1	21	91,3	21	100,0
D 17-73 × Somo	860	109	12,7	104	95,4	104	100,0
Suma Total	3010	372	12,4	298	80,1	293	98,3
Suma Total (śliwa japońska × morela)	6035	941	15,6	654	69,5	612	93,6
śliwa japońska × ałycza							
Czarnuszka × Amelia	150	10	6,7	10	100,0	6	60,0
Trumlar × Amelia	133	35	26,3	34	97,1	34	100,0
D 17-73 × Amelia	590	61	10,3	54	88,5	52	96,3
Suma Total (śliwa japońska × ałycza)	873	106	12,1	98	92,5	92	93,9
Suma (dla wszystkich kombinacji krzyżowań) Total (for all crosses)	6908	1047	15,2	752	71,8	704	93,6

^a procent z liczby zapylonych kwiatów^b percentage of the number of pollinated flowers^c procent z liczby z całkowitej liczby uzyskanych nasion^d percentage of the total number of seeds obtained^e procent z liczby z liczby nasion zastratyfikowanych^f percentage of the total number of seeds subjected to stratification

W dojrzałych owocach znajdowały się zarówno nasiona wykształcone prawidłowo – żywotne, jak i takie, które miały pomarszczoną okrywę nasienną i niewykształcone zarodki – czyli uznane za nieżywotne. Z 15 kombinacji krzyżowań łącznie uzyskano 752 prawidłowo wykształcone nasiona mieszańcowe śliwy japońskiej i moreli lub ałyczy, co stanowi 71,8% całkowitej liczby otrzymanych

nasion oraz tylko 10,9% liczby zapylonych kwiatów. Udział owoców z niewykształconymi nasionami był różny i zależał od krzyżowanych gatunków oraz od genotypu formy matecznej (Tabela 1). W krzyżowaniu śliwa japońska × ałycza uzyskano więcej wykształconych nasion niż w krzyżowaniu śliwa japońska × morela w stosunku do całkowitej liczby uzyskanych nasion (pestek). Natomiast

spośród form matecznych genotyp śliwy japońskiej D 17-73, bez względu na użytą formę ojcowską, lepiej wykształcał nasiona niż genotypy 'Czarnuszka' i 'Trumlar'. Obumieranie zarodków i nieprawidłowe wykształcenie nasion wskazuje na istnienie postzygotycznych barier krzyżowalności, co wcześniej obserwowali w swoich badaniach także inni autorzy (Rubio-Cabates, Socias i Company, 1996; Liu i in., 2007). Pokonanie barier postzygotycznych i uratowanie przynajmniej części zarodków mieszańcowych jest możliwe poprzez zastosowanie techniki *embryo-rescue* (Golis i in., 2002; Kukhar'chyk i Kastrickaya, 2006; Liu i in., 2007). Umożliwia ona rozwój niedojrzałych zarodków i ich wzrost w warunkach *in vitro*, przez co staje się bardzo użytecznym narzędziem w hybrydyzacji oddalonej roślin z rodzaju *Prunus* (Arbeola i in., 2003).

Zdolność kiełkowania uzyskanych nasion mieszańcowych

Nasiona gatunków z rodzaju *Prunus* w chwili wydobycia z owoców nie są zdolne do kiełkowania, ponieważ znajdują się w fazie głębokiego spoczynku fizjologicznego (Suszka 1962, 1967). Nasiona te nie kiełkują, nawet jeżeli warunki środowiskowe, tj. temperatura, wilgotność podłoża i dostęp tlenu są odpowiednie do ich skielkowania (Baskin i Baskin, 2004). Spoczynek ten jest przelamywany w trakcie stratyfikacji (Szymajda i Żurawicz, 2014; Szymajda i in. 2019b) pod wpływem chłodu, który powoduje rozkład związków chemicznych zwanych inhibitorami kiełkowania. Z poddanych stratyfikacji 752 nasion skielkowało 704 czyli 93,9%. Choć nie wszystkie nasiona wykiełkowały, to ich zdolność kiełkowania była dość dobra. Zdolność ta zależała bardziej od genotypu formy matecznej niż ojcowskiej. Niezależnie od formy ojcowskiej moreli lub ałyczy nasiona śliwy japońskiej 'Trumlar' posiadały większą zdolność kiełkowania niż nasiona śliwy japońskiej 'Czarnuszka'. Wpływ genotypu formy matecznej na zdolność kiełkowania nasion gatunków z rodzaju *Prunus* stwierdzono także w badaniach własnych (Szymajda i in., 2019a; 2019b) oraz innych autorów (Jensen i Kristiansen, 2009; Seliga i Żurawicz, 2011; Souza i in., 2017).

Wnioski

1. Tradycyjna hybrydyzacja oddalona śliwy japońskiej i moreli lub ałyczy odznacza się małą efektywnością, w wyniku czego uzyskuje się małą liczbę owoców i nasion mieszańcowych w stosunku do zapylonych kwiatów.
2. Genotyp śliwy japońskiej użytej jako forma mateczna ma większy wpływ niż genotyp

ojcowski moreli na zawiązywanie owoców w hybrydyzacji oddalonej tych gatunków.

3. Duża część nasion uzyskanych w krzyżowaniach oddalonych śliwa japońska × morela oraz śliwa japońska × ałycza jest nieprawidłowo wykształcona (nieżywotna).
4. Nie wszystkie dobrze wykształcone nasiona mieszańcowe krzyżowanych genotypów śliwy japońskiej i moreli lub ałyczy, pomimo długotrwałej stratyfikacji, są zdolne do kiełkowania. Przy niedużej liczbie uzyskiwanych nasion jest to dużym utrudnieniem w uzyskaniu siwek mieszańcowych krzyżowanych gatunków.
5. Zdolność kiełkowania nasion uzyskanych w krzyżowaniu śliwa japońska × morela uzależniona jest od genotypu matecznego śliwy japońskiej.

Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR. hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r., Zadanie nr 77.

Literatura

- Arbeola, A., Daorden, M. E., García, E., Marín, J. A. (2003). Successful establishment of *in vitro* culture of *Prunus cerasifera* hybrids by embryo culture of immature fruits. *Acta Hort.* 616: 375-378.
- Arbeola, A., Daorden, M. E., García, E., Wünsch, A., Hormaza, J. I., Marín, J. A. (2006). Significant effect of accidental pollinations on progeny of setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica* 147: 389-394. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-005-9035-x>
- Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.
- Duval, H., Poëssel, J. L., Olivier, G. (1994). Evaluation and selection of progeny of an interspecific cross between *Prunus cerasifera* and *Prunus salicina*. *Acta Hort.* 359: 87-92.
- Golis, A., Korbin, M., Pluta, S. (2002). The development of *Ribes* embryos by interspecific hybridisation. *Acta Hort.* 585: 155-158.
- Hakoda, N., Toyoda, R., Tabuchi, T., Ogiwara, I., Ishikawa, S., Shimura, I. (1998). Morphological characteristics of the interspecific hybrids between Japanese apricot (*Prunus mume*) and Plum (*P. salicina*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 708-714. <http://dx.doi.org/10.2503/jjshs.67.708>
- Jensen, M., Kristiansen, K. (2009). Removal of distal part of cotyledons or soaking in BAB overcomes embryonic dormancy in sour cherry. *Propagation of Ornamental Plants Vol. 9* (3): 135-142.
- Jun, J. H., Chung, K. H. (2007). Interspecific cross compatibility among plum, apricot and plumcot. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 25 (3): 217-222.

- Khan, S. A., Perveen, A. (2008). Germination capacity of stored pollen of *Ficus carica* (Moraceae) and their maintenance. *Pak. J. Bot.* 40 (6): 2251–2254.
- Kukharchyk, N., Kastrickaya, M. (2006). Embryo rescue techniques in *Prunus*, L. breeding. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 14 (1): 129–135.
- Layne, R. E., Sherman, C. W. B. (1986). Interspecific hybridization of *Prunus*. *HortScience.* 21 (1): 48–51.
- Liu, W., Chen, X., Liu, G., Liang, Q., He, T., Feng, J. (2007). Interspecific hybridization of *Prunus persica* with *P. armeniaca* and *P. salicina* using embryo rescue. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 88: 289–299. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-007-9201-z>
- Neumüller, M. (2011). Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica* L.) breeding. W: Flachowsky, H., Hanke, V. M. (eds). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology.* Global Science Books, s. 139–154.
- Okie, W. R. (2005). 'Spring Satin' plumcot. *J. Amer. Pomol. Soc.* 59: 119–124.
- Perez, S., Moore, J. N. (1985). Prezygotyczne bariery do interspecific hybridizacji w *Prunus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110 (2): 267–273.
- Rubio-Cabates, M. J., Socias i Company, R. (1996). Fertilization assessment and postzygotyczne development w several intra- and interspecific *Prunus* hybrids. *Euphytica* 90: 325–330.
- Seliga, S., Żurawicz, E. (2011). Wpływ warunków stratyfikacji na kiełkowanie nasion wiśni (*Prunus cerasus* L.). *Zesz. Nauk. Inst. Sad. i Kw. im. Sz. Pieniążka* 19: 5–14.
- Sharafi, Y. (2011). Pollen viability and longevity w some selected genotypes of peach, plum, prune and sour cherry. *J. Med. Plants Res.* 5 (2): 275–279.
- Souza, A. G., Spinelli, V. M., Souza, R. O., Smiderle, O. J., Bianchi, V. B. (2017). Optimization of germination and initial quality of seedlings of *Prunus persica* tree rootstocks. *Journal of Seed Science* 39: 66–173. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n2171687>
- Suska, B. (1962). Wpływ czynnika termicznego na ustępowanie spoczynku nasion czereśni dzikiej. *Arboretum Kórnickie* 7: 189–275.
- Suska, B. (1967). Studia nad spoczynkiem i kiełkowaniem nasion różnych gatunków z rodzaju *Prunus*, L. *Arboretum Kórnickie* 12: 221–282.
- Szabó, Z., Nyéki, J. (1994). Frost injury to European and Japanese plum flower buds in Hungary. *Kerteszetudomány* 26 (1): 1–15.
- Szabó, Z. (2003). Frost injuries of the reproductive organs in fruit species. W: Kozma, P., Nyéki, J., Soltész, M., Szabó, Z. *Floral biology, pollination and fertilisation in temperate zone fruit species and grape.* Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 59–74.
- Szymajda, M., Pruski, K., Żurawicz, E., Sitarek, M. (2013). Freezing injuries to flower buds and their influence on yield of apricot (*Prunus armeniaca* L.) and peach (*Prunus persica* L.). *Can. J. Plant Sci.* 93: 191–198. <http://dx.doi.org/10.4141/cjps2012-238>
- Szymajda, M., Żurawicz, E. (2014). Seed genotypes for harvesting seeds in the production of generative rootstocks for peach cultivars. *Horticultural Science* 41 (4): 160–166.
- Szymajda, M., Sitarek, M., Pruski, K., Żurawicz, E. (2019a). A potential of new peach (*Prunus persica* L.) seed tree genotypes for the production of generative rootstocks. *Sci. Hortic.* 256. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108618>.
- Szymajda, M., Żurawicz, E., Maciorowski, R., Pruski, K. (2019b). Stratification period combined with mechanical treatments increase *Prunus persica* and *Prunus armeniaca* seed germination. *Dendrobiology* 81: 47–57.
- Szymajda, M., Napiórkowska, B., Korbin, M., Żurawicz, E. (2015). Studies on the interspecific crossing compatibility among three *Prunus* species and their hybrids. *Horticultural Science* 42 (2): 70–82. <https://doi.org/10.17221/273/2014-HORTSCI>
- Top, B.L., Russell, D.M., Neumüller, M., Dalbó, M.A., Liu, W. (2012). Plum. W: Badenes, M. L., Byrne, D. H. *Fruit Breeding: Handbook of Plant Breeding* 8. Springer Science+Business Media, LLC, p. 576–621. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9>
- Yoshida, M., Kyotani, H., Yasuno, M. (1975). Studies on interspecific crossing in *Prunus* spp. I. Cross compatibility. *Jpn. J. Breeding* 25 (1): 17–23.
- Yao, S. (2011). Winter 2011 low-temperature injury to stone fruit buds in New Mexico. *HortTechnology* 21 (6): 767–772
- Zenkeler, M. (1990). *In vitro* fertilization and wide hybridization in higher plants. *Plant Sci.* 9: 267–279. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689009382290>