



Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych
Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin
Sadowniczych

Wykorzystanie techniki *embryo rescue* w produkcji siewek czereśni (*Prunus avium* L.) z nasion form matecznych o wczesnym terminie dojrzewania owoców

Autorzy:

Dr Marek Szymajda
Mgr Bogusława Idczak
Dr Anita Kuras
Dr hab. Agnieszka Masny
Tech. Grażyna Lewandowska
Tech. Krystyna Strączyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 3.10.**

„Wytworzenie materiałów wyjściowych czereśni (*Prunus avium* L.) o wysokiej jakości oraz tolerancyjnych na pęknięcie owocach deserowych z wykorzystaniem techniki *embryo rescue*”

Zadanie realizowane w ramach **dotacji celowej MRiRW**

Obszar 3. Hodowla i nasiennictwo roślin uprawnych



MINISTERSTWO
ROLNICTWA
I ROZWOJU WSI

Skierniewice 2021

1. Wstęp:

Dużym problemem w hodowli czereśni ukierunkowanej na uzyskanie odmian o wczesnej porze dojrzewania owoców jest ograniczona możliwość wykorzystania odmian o wczesnym terminie dojrzewania owoców jako form matecznych. Owoce takich odmian dojrzewają już niekiedy w 7-8 tygodniu po kwitnieniu drzew i dlatego zawarte w nich zarodki nie mają dość czasu na osiągnięcie pełnej dojrzałości fizjologicznej. Po wyizolowaniu z owoców zarodki takie nie są zdolne do kiełkowania w warunkach tradycyjnej stratyfikacji. Dla osiągnięcia zdolności kiełkowania zarodki te muszą być hodowane na odpowiednio skomponowanych pożywkach w warunkach *in vitro* (technika *embryo rescue*). Niewiele jest doniesień o tego typu badaniach prowadzonych na zarodkach czereśni (*Prunus avium* L.), dlatego w ramach zadania podjęto badania nad optymalizacją metody ratowania zarodków tego gatunku.

Efektywność metody *embryo rescue* zależy m.in. od genotypu i stadium dojrzałości zarodka oraz składu pożywki. Opracowanie skutecznej metody *embryo rescue* dla niedojrzałych zarodków czereśni umożliwi otrzymywanie siewek z kombinacji krzyżowań, w których jako formy mateczne wykorzystano odmiany o wczesnym terminie dojrzewania owoców. Zwiększy to efektywność hodowli czereśni ukierunkowanej na uzyskanie odmian o wczesnym terminie dojrzewania owoców.

2. Cel zadania:

Ocena wpływu czterech pożywek na efektywność uzyskiwania siewek czereśni z niedojrzałych zarodków, wytwarzanych przez formy mateczne o wczesnym terminie dojrzewania owoców.

3. Materiał i metody:

Optymalizacja metody *embryo rescue* obejmowała badanie wpływu czterech pożywek różniących się źródłem i stężeniem mikro- i makroelementów oraz rodzajem cukru (sacharoza 20g/l i glukoza 40g/l) na rozwój niedojrzałych zarodków czereśni. Pożywka Murashige & Skoog (1962) jest podstawowym podłożem wykorzystywanym w hodowli *in vitro* roślin. Charakteryzuje się bogatym składem związków mineralnych i organicznych. Opracowana została dla kultur miękiszki z łądy tytoniu, obecnie stosowana jest powszechnie w kulturach *in vitro* wielu gatunków roślin ogrodniczych i ozdobnych. Pożywka wg Fossard (1977) w odniesieniu do MS charakteryzuje się obniżonym o połowę stężeniem mikroelementów oraz podwyższoną zawartością jonów sodu. Ponadto wzbogacona została o takie związki organiczne jak biotyna, cholina, kwas pantotenowy. Pożywka wg Stewart i Hsu (1977) nie zawiera w składzie jonów amoniakalnych, natomiast w stosunku do MS zwiększono ilość jonów potasu i wapnia. Pożywka wg Boxus (1974) zawiera w składzie dodatkowe źródło jonów żelaza i potasu.

Materiał do badań stanowiły zarodki czereśni odmian wytwarzające owoce o wczesnym terminie dojrzewania. Zarodki te uzyskano z dwóch kombinacji krzyżowań 'Rita' x 'Kassandra' (180 sztuk) oraz 'Jacinta' x 'Rita' (250 sztuk). Owoce zbierano 5 ('Rita' x 'Kassandra') i 6 ('Jacinta' x 'Rita') tygodni po kontrolowanym zapyleniu kwiatów, a wydobyte z nich pestki poddawano wstępnej sterylizacji poprzez płukanie pod bieżącą wodą przez ok 2 godziny. W tym czasie usunięto pozostałości miąższu. Następnie pestki płukano w roztworze detergentu (płyn do naczyń) z wodą przez 30 min, który usuwano przez kolejne godzinne płukanie pod bieżącą wodą. Po sterylizacji wstępnej pestki przenoszone były do sterylnych słoików i odkażane w roztworze 15% Cloroxu przez 30 min. Roztwór usuwano przez trzykrotne płukanie w sterylnej wodzie, po 20 minut każde.

Po wysterylizowaniu, z pestek usuwano endokarp przy pomocy imadła, a nasiona umieszczano na przygotowanych pożywkach. Na każdą pożywkę wyłożono po 45 nasion kombinacji 'Rita' x 'Kasandra' oraz po 62-64 nasiona kombinacji 'Jacinda' x 'Rita'.

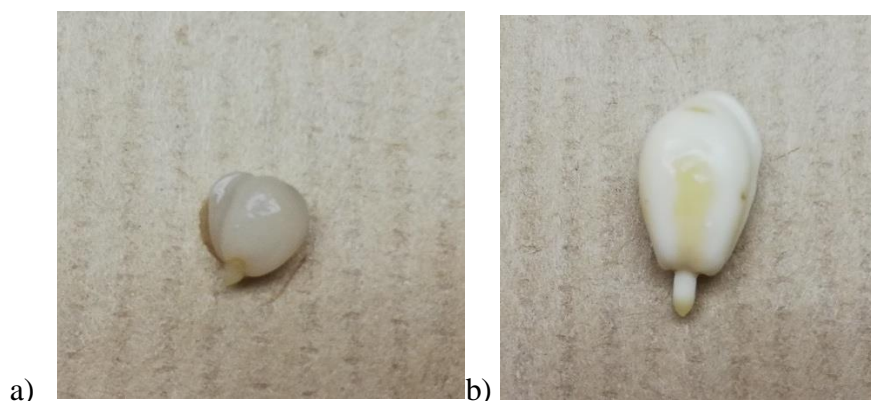
Etapy hodowli niedojrzałych zarodków czereśni obejmowały:

- stratyfikację ciepłą nasion przeprowadzoną w 25°C
- stratyfikację chłodną zarodków przeprowadzoną w 4°C
- okres rozwoju organów roślinnych w fitotronie przy fotoperiodzie 16/8 dzień/noc w 24°C
- wysadzenie uzyskanych siewek do podłoża i aklimatyzacja do warunków szklarniowych

Stratyfikacja ciepła prowadzona była na wszystkich czterech pożywkach bez regulatorów wzrostu przez okres 3 tygodni. Po tym etapie z nasion usuwano okrywą nasienną, zarodki przekładano na analogiczne pożywki z dodatkiem hormonów roślinnych: 1mg/l BAP, 0,5mg/l NAA i przetrzymywano w 4°C przez 10 tygodni. Po zakończeniu stratyfikacji chłodnej poczyniono obserwacje związane ze stanem zarodków na przygotowanych pożywkach. Pod uwagę brano wygląd zarodka tj. kolor i stan uwodnienia (z tym związana jest 'twardość' zarodka) oraz ilość zakażeń. Zarodki nieżywotne (szare, miękkie) oraz zakażone usuwano, a wszystkie pozostałe (białe i twarde, żywotne) przekładano na pożywkę WPM (sacharoza 30 g/l) bez regulatorów wzrostu i umieszczono w fitotronie. Wszystkie rośliny, które wykształciły korzeń i ped główny po 6 tygodniach zostały wysadzone do podłoża i poddane aklimatyzacji do warunków szklarniowych.

4. Wyniki

Obserwacje zarodków wykonane po wyjęciu ich z chłodni wykazały, że żaden nie rozpoczął kiełkowania podczas stratyfikacji w 4 °C. Oceniano więc tylko ich wygląd zewnętrzny, czyli kolor (szary/ biały) i stan uwodnienia (miękkie/ twarde) oraz ilości występujących na pożywkach zakażeń. Zarodki które były szare i miękkie uznano za nieżywotne (fot. 1a), natomiast białe i twarde za żywotne (fot. 1b). Zarodki szare i miękkie pochodzące z kombinacji krzyżowań 'Rita' x 'Kasandra' stanowiły 48% wszystkich wyłożonych na pożywkę MS, 41% na SH, 24% na Boxus i 26% na Fossard. Zaobserwowano również, że zakażenia bakteryjne występowały w 2% na pożywce MS, 28% na SH i Boxus oraz 4% na Fossard. Analogiczne obserwacje przeprowadzono dla zarodków pochodzących z kombinacji 'Jacinda' x 'Rita'. Zarodki nieżywotne stanowiły 15% wszystkich wyłożonych na pożywkę MS, 10% na SH, 22% na Boxus i 6% na Fossard. Zakażenia bakteryjne występowały w 6% na pożywce MS, 35% na SH, 17% na Boxus oraz 21% na Fossard (tab. 1).



Fot.1. Zarodek po okresie chłodzenia w 4°C a) nieżywotny b) żywotny

Tabela 1. Stan zarodków na badanych pożywkach po 10 tygodniach chłodzenia w temp. 4°C.

Krzyżowane formy rodzicielskie	Kondycja zarodków	MS	SH	Boxus	Fossard
		Udział zarodków (%) w odniesieniu do liczby wyłożonych			
Rita x Kasandra	twarde (żywotne)	50	30	48	70
	zakażone	2	28	28	4
	miękkie	48	41	24	26
Jacinda x Rita	twarde (żywotne)	79	55	61	73
	zakażone	6	35	17	21
	miękkie	15	10	22	6

W następnym etapie hodowli wszystkie zarodki czereśni, które uznano za żywotne przełożono na pożywkę WPM (sacharoza 30 g/l, bez regulatorów wzrostu) i umieszczono w fitotronie. Po 4 tygodniach hodowli oceniano ile zarodków podjęło wzrost i rozwój oraz wykształciło organy roślinne (korzeń i pęd) (tab.2).

Tabela 2. Wpływ pożywki w początkowym etapie hodowli zarodków na ilość uzyskanych roślin lub organów roślinnych po 4 tygodniach wzrostu w fitotronie w odniesieniu do wszystkich wyłożonych na pożywki zarodków wyrażoną w %

Krzyżowane formy rodzicielskie	Wykształcone organy rośliny	MS	SH	Boxus	Fossard
Rita x Kasandra	roślina	6	2	0	4
	tylko pęd	4	4	0	8
	tylko korzeń	0	0	0	0
Jacinda x Rita	roślina	30	13	8	32
	tylko pęd	6	16	9	16
	tylko korzeń	5	0	0	3

Zarodki wyłożone w pierwszym etapie hodowli na pożywkę wg Boxusa miały najniższą zdolność do rozwoju. Z kombinacji 'Rita' x 'Kasandra' nie uzyskano roślin, natomiast z kombinacji 'Jacinda' x 'Rita' tylko 8% zarodków wytworzyło korzeń i pęd. Ponadto średnia długość pędu u roślin wynosiła 3,5mm, natomiast korzeń u 50% roślin miał długość zaledwie 2mm (fot. 2). Bez względu na rodzaj zastosowanej pożywki z zarodków z kombinacji 'Rita' x 'Kasandra' uzyskano od 2% roślin na pożywce Stewart i Hsu do 6% na pożywce Murashige & Skoog w odniesieniu do liczby wyłożonych zarodków. Ponadto z niektórych zarodków rozwinęły się tylko pędy, bez korzeni (fot. 3).



Fot.2. Rośliny uzyskane z zarodków pochodzących z kombinacji 'Jacinda' x 'Rita' na pożywce wg Boxusa (1974) a) roślina z w pełni wykształconym pędem i korzeniem b) roślina o skróconym pędzie i korzeniu.

Zarodki uzyskane z kombinacji krzyżowań 'Jacinta' x 'Rita' wykazały się większą zdolnością do rozwoju. Na pożywce SH uzyskano 13% w pełni wykształconych roślin z liczby wyłożonych nasion, a 16% zarodków wykształciło tylko pęd. Część nadliścieniowa większości roślin osiągała długość ok 20 mm i wykształcała 4 liście, do tego długość korzenia średnio wynosiła ok 70 mm (fot. 4). Pożywki MS oraz wg Fossard wykazały największy pozytywny wpływ na rozwój organów roślinnych. Z wyłożonych na te pożywki zarodków uzyskano 30% roślin na pożywce MS i 32% roślin na pożywce wg Fossard, ponadto na tej ostatniej wykształciło się 16% pędów bez korzenia. Zaobserwowano jednak, że uzyskane rośliny cechowało skrócenie długości pędu, zwłaszcza rosnących na pożywce wg Fossard – jedynie 26% wszystkich roślin miało długość części nadziemnej powyżej 10 mm. Z kolei u 50% wszystkich roślin uzyskanych na pożywce MS pęd był dłuższy niż 15 mm. Nie zanotowano wpływu pożywek na długość korzenia.



Fot.3. Skrócony pęd z 2 liśćmi bez wykształconego korzenia uzyskany z zarodka (kombinacja 'Rita' x 'Kasandra') wyłożonego na pożywkę wg Fossard (1977)

Rośliny, które rozwinęły system korzeniowy oraz część nadliścieniową (w sumie 58 siewek) zostały wysadzone w szklarni i poddane aklimatyzacji.



Fot.4. Rośliny uzyskane z zarodków pochodzących z kombinacji ‘Jacinda’ x ‘Rita’ na pożywce wg Stewart i Hsu (1977).

5. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych w 2021 r. badań można stwierdzić, że:

- możliwe jest uzyskanie siewek z nasion czereśni odmian o wczesnym terminie dojrzewania przy zastosowaniu techniki *embryo rescue*, prace te wymagają jednak dodatkowych badań,
- dwie z zastosowanych pożywek: MS (1962) i Fossard (1977) są przydatne w uzyskiwaniu siewek czereśni – w odniesieniu do liczby wyłożonych zarodków z kombinacji krzyżowań ‘Jacinda’ x ‘Rita’ uzyskano na tych pożywkach odpowiednio 30% i 32% roślin,
- Ilość uzyskanych siewek z niedojrzałych zarodków zależy od zastosowanej pożywki oraz form rodzicielskich użytych w programie krzyżowań (nasiona pochodzące z kombinacji krzyżowań ‘Jacinda’ x ‘Rita’ posiadały większą zdolność rozwoju organów roślinnych niż z kombinacji ‘Rita’ x ‘Kassandra’),
- rośliny hodowane na pożywkach MS oraz wg Fossard cechowało skrócenie pędu w porównaniu z roślinami rosnącymi na pożywce SH (Fossard – 26% roślin miało pęd dłuższy niż 10 mm, MS – 50% roślin miało pęd dłuższy niż 15 mm, SH – 75% roślin miało pęd dłuższy niż 20 mm).