

## **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 roku 2014 prowadzono 6 tematów badawczych:

### ***Temat badawczy 1***

#### Analiza żywotności pyłku z form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej i ałyczy

Celem badań była ocena żywotności pyłku oraz jego zdolności do kiełkowania warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Analizę przeprowadzono z użyciem 3 metod pozwalających na ogólną ocenę żywotności pyłku (barwienie 2% acetoorceiną) oraz na ocenę zdolności kiełkowania łagiewki pyłkowej w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* (na znamionach słupków). Pierwszą i drugą metodę zastosowano do oceny żywotności pyłku 20 wybranych genotypów ojcowskich. Do analiz metodą *in vivo* użyto materiału biologicznego z 14 kombinacji krzyżowań (śliwa japońska x morela, ałycza x morela i śliwa domowa x morela). Wyniki analiz po barwieniu acetoorceiną wskazywały na wysoką żywotność ziaren pyłku, ale nie przekładały się na zdolność łagiewki do kiełkowania. Wśród genotypów śliwy japońskiej jedynie w roślinach odmiany 'Blue Gigant' 16% ziaren pyłku kiełkowało. Wśród odmian ałyczy oraz moreli obserwowano kiełkowanie łagiewek pyłkowych we wszystkich ziarnach pyłku, jednak średnia zdolność kiełkowania zawierała się w szerokich przedziałach - 17,9% do 65,3% dla ałyczy i 2,8% do 86% dla moreli. Największą żywotnością pyłku charakteryzowały się genotypy 'Anna', 'Taja', 'Early Orange', 'Somo', M I-16 i M II-42.

### ***Temat badawczy 2***

#### Ocena możliwości krzyżowania różnych genotypów z rodzaju *Prunus* (ałycza, morela, śliwa japońska, śliwa domowa)

Celem badań było uzyskanie wiedzy w zakresie możliwości krzyżowania wybranych genotypów ałyczy, moreli, śliwy japońskiej, i śliwy domowej metodami hodowli klasycznej. Program zapyleń międzygatunkowych wykonany został w warunkach polowych w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach oraz w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach (warunki częściowo kontrolowane). Łącznie wykonano 77 kombinacji zapyleń i zapyłono 20.686 kwiatów, uzyskano 575 owoców (2,8% zapyłonych kwiatów). Najwięcej owoców w stosunku do zapyłonych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach śliwa japońska x ałycza (7,1%), morela x śliwa japońska (5,9%), ałycza x morela (3,6%), śliwa japońska x morela (2,4%) oraz w krzyżowaniu wstecznym mieszańca (śliwa japońska x ałycza) x śliwa japońska (6,5%). Najmniej owoców w stosunku do zapyłonych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach ałycza x śliwa japońska (0,0%), morela x ałycza (1,0%) oraz śliwa domowa x ałycza (1,8%). Uzyskane wyniki wskazują, że hybrydyzacja oddalona krzyżowanych gatunków odznacza się małą efektywnością, ale możliwe jest uzyskanie nasion i siewek mieszańcowych.

### ***Temat badawczy 3***

#### Ocena zdolności kiełkowania uzyskanych nasion mieszańcowych

Celem badań była ocena zdolności kiełkowania nasion, uzyskanych z krzyżowań oddalonych ałyczy, moreli, śliwy japońskiej i śliwy domowej. Wydobyte z owoców nasiona uzyskane z programu hybrydyzacji oddalonej różnych genotypów ałyczy, moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej dzielono na dwie grupy; prawidłowo wykształcone oraz zdeformowane. Z uzyskanych 496 pestek pozyskano 447 nasion dobrze wykształconych oraz 49 nasion ze zdeformowanymi liścieniami. Nasiona prawidłowo wykształcone odkażono w 1,0% roztworze preparatu Huwa San TR 50, wymieszano z wilgotnym podłożem (perlit) i poddano procesowi stratyfikacji. Pierwsze nasiona skiełkowały po 80 dniach stratyfikacji, ale najczęściej nasion skiełkowało po 100 i 110 dniu stratyfikacji. Z 447 nasion skiełkowało 360 (80,6 %). W 100% kiełkowały nasiona z kombinacji krzyżowań, gdzie formą mateczną była morela, ałycza lub śliwa domowa. Nasiona z kombinacji śliwa japońska x ałycza kiełkowały w 91,9%, a w kombinacjach śliwa japońska x morela w 77,7%. Uzyskane wyniki pokazują, że zdolność kiełkowania nasion uzależniona jest od genotypu krzyżowanych form rodzicielskich.

#### **Temat badawczy 4**

##### Optymalizacja i prowadzenie hodowli zarodków *in vitro* badania

Celem badań było zoptymalizowanie warunków do prawidłowego rozwoju 10 tygodniowych zarodków, uzyskanych w procesie krzyżowego zapylenia w obrębie rodzaju *Prunus*. Badania prowadzono na 337 nasionach z 19 kombinacji międzygatunkowych. Kontrolę stanowiło 300 nasion uzyskanych z wolnego zapylenia oraz 80 nasion z hybrydyzacji wewnątrzgatunkowej. Po usunięciu owocni nasiona poddawano sterylizacji i wykładano na wybrane 3 pożywki (MS, WPM i C2d). W celu przełamania spoczynku nasion poddano je 10 tygodniowej stratyfikacji w temperaturze 2°C, prowadząc równocześnie obserwacje rozwoju każdego z nasion (pęknięta łupina nasienna, powiększenie objętości nasiona, zaczątki korzenia i pojawiające się liścienie). W kombinacjach, w których morela była formą maticzną zaobserwowano, że w 50% analizowanych nasion łupina pęka po 4 tygodniach stratyfikacji, a liczba ta rośnie do 99% w 10 tygodniu stratyfikacji. W nasionach, pochodzących z krzyżowań w których formą maticzną była śliwa japońska, pierwsze pęknięcia łupiny nasiennej zaobserwowano w 10 tygodniu stratyfikacji. W tym okresie 40 do 70% nasion z krzyżowań, w których formą maticzną była ałczy, miało pękniętą łupinę nasienną w takim stopniu, że można było zaobserwować pierwsze rozdzielające się liścienie oraz zaczątki korzeni. Po tym okresie nasiona przekładano na odpowiednie pożywki i obserwowano ich rozwój. Rośliny z rozwiniętym systemem korzeniowym oraz takie, których część nadziemna przekraczała 5 cm, wysadzone były do podłoża i aklimatyzowane w szklarni z przeznaczeniem do dalszych badań. Aklimatyzowane siewki uzyskano z 9 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych. Siewki z sześciu kolejnych kombinacji siewki są utrzymywane w fitotronie. Nie udało się zoptymalizować warunków dla rozwoju zarodków pochodzących z 4 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych.

#### **Temat badawczy 5**

##### Analizy molekularne form rodzicielskich i uzyskanych siewek mieszańcowych

Celem badań było opracowywanie profili genetycznych dla form rodzicielskich, użytych w programie krzyżowań oraz potwierdzenie statusu mieszańca z planowanego zapylenia dla uzyskanych roślin potomnych. Materiał do analiz stanowiły rośliny z rodzaju *Prunus*: 31 genotypów będących użyte w programie krzyżowań jako formy rodzicielskie oraz 21 genotypów potomnych uzyskanych w wyniku planowanego krzyżowania w poprzednich latach prowadzenia hybrydyzacji oddalonej w tym rodzaju. Materiał genetyczny izolowano z młodych liści metodą opartą na CTAB, opisaną przez Doyle i Doyle. Na uzyskanej matrycy przeprowadzono reakcje amplifikacji ze starterami SSR (20 par), umożliwiającymi analizę fragmentów mikrosatelitarnych w genomach roślinnych. Polimorficzne amplikony (185 fragmentów DNA) posłużyły do utworzenia baz danych dla analizowanych form rodzicielskich. Każdy analizowany genotyp scharakteryzowano wstępnie na podstawie 29-46 polimorficznych fragmentów. Wśród testowanych par starterów wybrano siedem, w reakcji z którymi utworzono profile genetyczne dla każdej z form rodzicielskich i na ich podstawie zweryfikowano pozytywnie status 10 z 21 mieszańców.

#### **Temat badawczy 6**

##### Ocena wybranych cech biologicznych mieszańców i ich form rodzicielskich

Celem badań była ocena wybranych cech biologicznych siewek mieszańcowych uzyskanych z krzyżowania różnych genotypów ałczy, moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej i ich form rodzicielskich. Badania są kontynuacją zadania prowadzonego w latach 2011-2013. Kiełkujące nasiona uzyskane z programu krzyżowań moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej i ałczy w 2013 r. w miesiącach listopad - luty sukcesywnie wysiewano w ogrzewanej szklarni do plastikowych doniczek. W maju, uzyskane siewki posadzono w wysokim tunelu foliowym. Jesienią w kwaterze selekcyjnej w Dąbrowicach posadzono 393 siewek. W 2014 roku zakwitły pierwsze siewki posadzone w 2011 roku. Z 29 genotypów zakwitło 9 siewek. Siewki te odznaczyły się małą intensywnością kwitnienia i żadna z nich nie zaowocowała. Kwitnienie pierwszych siewek mieszańcowych świadczy jednak, że zakończyły one fazę juwenilną. Siewki posadzone w latach 2012-2013 jeszcze nie zakwitły. Wykonane obserwacje wskazują, że okres juwenilny siewek mieszańcowych moreli, śliwy japońskiej i ałczy trwa co najmniej 3-4 lata po ich posadzeniu w polu.