

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 2016 r. 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 w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Ocenę przeprowadzono z użyciem 3 metod pozwalających na ogólną ocenę żywotności pyłku (barwienie 2% acetoorceiną) oraz na ocenę zdolności wzrostu łagiewek pyłkowych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* (przez szyjkę słupka). Pierwszą i drugą metodę zastosowano do oceny żywotności pyłku 16 wybranych genotypów ojcowskich. Do analiz metodą *in vivo* użyto materiału biologicznego z 15 kombinacji krzyżowań (śliwa japońska x morela, ałycza x morela). Wyniki analiz po barwieniu acetoorceiną wskazywały na wysoką żywotność ziaren pyłku, ale nie przekładały się na jego zdolność do kiełkowania. Zdolność kiełkowania ziaren pyłku dla analizowanych 3 genotypów śliwy japońskiej nie przekroczyła 20%, podczas gdy zdolność do kiełkowania pyłku dla wszystkich genotypów (z wyjątkiem 'Poleskiej Krupnoplodnyj') należących do gatunku morela wynosiła ponad 60%. Dwa z analizowanych genotypów tj. 'Sirena', i 'Harkot' wykazały największy potencjał w kiełkowaniu pyłku (blisko 90%). Wyniki te wskazują, że zastosowanie śliwy japońskiej jako formy ojcowskiej może wpływać ograniczająco na liczbę uzyskiwanych zawiązków owoców, natomiast morelę można uznać za dobrego kandydata do zapyleń. Obserwacje wzrostu łagiewek w warunkach *in vivo* wskazują że po upływie 72 godzin od zapylenia łagiewka jest w stanie osiągnąć poziom komórki jajowej. Wynik ten uzyskano dla ośmiu z piętnastu kombinacji gdzie najwyższą kompatybilnością (30%) wykazały się genotypy D17-73 i 'Early Orange'.

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 polu, w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach oraz w wysokim tunelu foliowym w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach (warunki częściowo kontrolowane). Łącznie wykonano 60 kombinacji krzyżowań i zapyłono 17.471 kwiatów. Uzyskano 1.369 owoców, co stanowi 7,8% zapyłonych kwiatów. Najlepsze zawiązywanie owoców w stosunku do liczby zapyłonych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach śliwa japońska x ałycza (26,8%) i śliwa japońska x morela (8,0%). Natomiast najmniej owoców w stosunku do zapyłonych kwiatów uzyskano w krzyżowaniu wstecznym mieszańca (śliwa japońska x ałycza) x śliwa japońska (2,5%) oraz śliwa domowa x morela (4,3%) i ałycza x morela (4,7%). Wstępne 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 – nie zdolne do kiełkowania. Z ocenianych 659 nasion 506 nasion (76,8%) było dobrze wykształconych natomiast 153 nasiona (23,2%) miało zdeformowane liścienie. Nasiona prawidłowo wykształcone zostały odkażone w 1,0% roztworze preparatu Huwa San TR 50, wymieszane z wilgotnym podłożem do stratyfikacji (perlit) i poddane procesowi stratyfikacji. Pierwsze nasiona skiełkowały po 80 dniach stratyfikacji, a najwięcej nasion skiełkowało pomiędzy 90 i 120 dniem stratyfikacji. Łącznie skiełkowało 88,4% nasion. Kiełkowanie nasion było zróżnicowane i zależało od krzyżowanych form rodzicielskich. Najlepiej kiełkowały nasiona pozyskane z genotypu śliwy japońskiej 'Trumlar', natomiast najslabiej z genotypu śliwy japońskiej 'Santa Rosa'. Ze wstępnych badań wynika, że zdolność kiełkowania nasion uzależniona jest od genotypu krzyżowanych form rodzicielskich.

Temat badawczy 4

Optymalizacja i prowadzenie hodowli zarodków *in vitro*

Celem badań było zoptymalizowanie warunków do prawidłowego rozwoju 10-cio tygodniowych zarodków, uzyskanych w procesie krzyżowego zapylenia w obrębie rodzaju *Prunus*. Badania prowadzono na 340 nasionach z 11 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych. Kontrolę stanowiło 240 nasion uzyskanych z wolnego zapylenia. Po usunięciu owocni nasiona poddawano sterylizacji i wykładano na pożywki: MS, WPM i C2d. W celu przełamania spoczynku nasiona poddano 10-cio tygodniowej stratyfikacji w temperaturze 2°C, prowadząc równocześnie obserwacje zmian morfologicznych (pęknięta okrywa nasienna, powiększenie objętości nasiona, zaczątki korzenia i pojawiające się liścienie). W materiale kontrolnym, w którym formą mateczną była morela, w 4. tygodniu stratyfikacji 80% nasion miało pękniętą okrywę nasienną na pożywce MS i WPM i 65% na pożywce C2d. Dla kontrolnych form matecznych śliwy japońskiej pęknięcie okrywy nasiennej było mniej intensywne. Odmiana D17-73 i 'Czernuszka' miały odpowiednio 40% i 20% nasion z pękniętą okrywą nasienną na pożywce MS, po 40% na WPM oraz po 45% na C2d i wzrastały one do ok. 80% w 10. tygodniu stratyfikacji. Pęknięcie okrywy u nasion międzygatunkowych (śliwa japońska x morela) po 4 tygodniach stratyfikacji przebiegało z podobną intensywnością na pożywkach MS i C2d (ok. 43% i 42%) i intensywniej na WPM (50%). W 10 tygodniu na pożywkach WPM i MS liczba nasion z pękniętą okrywą była porównywalna 83% i 82%, a na C2d wynosiła 67%. Zarówno wzrost korzenia oraz rozwój liścieni przebiegały z podobną intensywnością u wszystkich kombinacji krzyżowań. Po upływie 4 tygodni w fitotronie uzyskano 113 roślin mieszańcowych i 147 roślin kontrolnych. Zastosowanie moreli jako jednej z form rodzicielskich wpływało negatywnie na regenerację roślin wyłożonych na pożywkę MS i WPM. Nasiona wszystkich kombinacji międzygatunkowych, nieznacznie wydajniej regenerowały na MS. Oceniano również intensywność wzrostu pędu i korzenia u zregenerowanych roślin. Rośliny utrzymywane na pożywce WPM cechował brak jednolitości w długości pędu, rośliny uzyskiwały średnią wysokość od 2 cm w kombinacji 'Trumlar' x MII-42 do 6 cm w kombinacjach OSL65 x 'Early Orange' i D17-73 x 'Harkot'. Rośliny mające najkrótszy pęd (ok. 3 cm) pochodziły z pożywki C2d. Średnia długość korzenia na każdej pożywce była podobna i wynosiła ok 1-2cm.

Temat badawczy 5

Analizy molekularne form rodzicielskich i uzyskanych siewek mieszańcowych

Celem badań było opracowywanie profili genetycznych oraz potwierdzenie statusu mieszańca dla wybranych genotypów. Materiał do analiz stanowiły rośliny z rodzaju *Prunus*: 40 genotypów potomnych uzyskanych w wyniku planowanego krzyżowania w poprzednich latach prowadzenia hybrydyzacji oddalonej w tym rodzaju oraz jeden genotyp nowej formy matecznej ('Skoroplodnaja'). Materiał genetyczny izolowano z młodych liści metodą opartą na CTAB, opisaną przez Doyle i Doyle (1990). Na uzyskanej matrycy przeprowadzono reakcje amplifikacji z 20 parami starterów SSR umożliwiającymi analizę fragmentów mikrosatelitarnych w genomach roślinnych, uzyskując 43 amplikony DNA charakteryzujące genotyp. Dla form mieszańcowych reakcje amplifikacji przeprowadzono z 7 parami starterów SSR. Polimorficzne amplikony (221 fragmentów DNA) posłużyły do utworzenia baz danych, na podstawie których przeprowadzano ocenę statusu mieszańca. Każdy analizowany genotyp scharakteryzowano wstępnie na podstawie 29-46 polimorficznych fragmentów. W oparciu o te dane zweryfikowano pozytywnie status wszystkich mieszańców, przy czym dla czterech roślin pochodzących z krzyżowania 'Kalipso' x 'E. Orange' uzyskano najniższy stopień pokrewieństwa z formą ojcowską (6%-12%).

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 ałyczy, moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej i ich form rodzicielskich (badania są kontynuacją zadania prowadzonego w latach 2011-2013). W 2016 roku zakwitły siewki mieszańcowe posadzone w latach 2012-2015. Z poddanych obserwacjom 140 genotypów siewek mieszańcowych zakwitło 61, z których tylko 28 zawiązało owoce. Pozostałe 79 siewek nie ukończyło jeszcze fazy juvenilnej. Większość siewek odznaczyła się małą intensywnością kwitnienia, a nawet miała zaburzenia rozwojowe kwiatów. Przejawiało się to ich deformacjami lub niedorozwojem - w kwiatach znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. W efekcie mało siewek zawiązało owoce, a te które zawiązały owoce odznaczyły się na ogół małą intensywnością owocowania. Spośród siewek posadzonych w 2015 r. tylko jedna ukończyła fazę juvenilną. Wykonane obserwacje wskazują, że większość siewek mieszańcowych moreli, śliwy japońskiej i ałyczy kończy okres juvenilny w 4-5 roku (3-4 lata po ich posadzeniu w polu). W roku 2016 rozmnożono kolejnych 40 genotypów siewek mieszańcowych, które jesienią posadzono w kwaterze selekcyjnej w Dąbrowicach. Każdy genotyp siewki został posadzony w liczbie od 1 do 4 drzewek.