

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

W ramach zadania w 2017 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 pyłku genotypów rodzicielskich pod kątem jego przydatności do programu krzyżowań oddalonych w roku 2017. Sprawdzono żywotność wyizolowanego pyłku (met. 1 – barwienie 2% acetoorceiną) oraz zdolność jego kiełkowania w warunkach *in vitro* (met. 2) i *in vivo* (met. 3 – wzrost łagiewki pyłkowej). Pierwszą i drugą metodę zastosowano podczas oceny jakości pyłku 13 wybranych genotypów ojcowskich, a do obserwacji wzrostu łagiewki pyłkowej (met. 3) użyto materiału biologicznego z 11 kombinacji krzyżowań (śliwa japońska x morela). Wyniki barwienia acetoorceiną wskazywały na wysoką żywotność pyłku, ale nie przekładały się na jego zdolność do kiełkowania. Zdolność kiełkowania pyłku genotypu 'Angeleno' (śliwa japońska) wynosiła 10%, podczas gdy dla wszystkich genotypów moreli (z wyjątkiem MII-19, MII-42) wynosiła ona ponad 70%. Wyniki te wskazują, że zastosowanie śliwy japońskiej jako formy ojcowskiej może wpływać limitująco na liczbę uzyskiwanych zawiązków owoców. Obserwacje prowadzone w warunkach *in vivo* wykazały, że łagiewka pyłkowa moreli dociera do komórki jajowej śliwy japońskiej po upływie 72 godzin od zapylenia. Wynik ten uzyskano dla dziewięciu z jedenastu kombinacji. Najwyższy stopień zgodności w układzie pyłek-zalążnia wykazały formy rodzicielskie D17-73 i 'Early Orange'.

Temat badawczy 2. Ocena możliwości krzyżowania różnych genotypów z rodzaju *Prunus* (ałyca, 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, zapylając 13.313 kwiatów. Uzyskano 1.351 owoców, co stanowi 10,1% zapylonych kwiatów. Najlepsze zawiązywanie owoców w stosunku do liczby zapylonych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach ałyca x morela (24,4%) i śliwa japońska x ałyca (18,0%). Z powodu przymrozków wiosennych i niesprzyjających warunków pogodowych po wykonaniu zapyleń, owoców nie uzyskano w krzyżowaniu śliwa domowa x morela oraz w krzyżowaniu wstecznym mieszańca (śliwa japońska x morela) x morela. Wstępne wyniki 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. 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 oddalonych różnych genotypów ałyczy, moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej dzielono na dwie grupy; prawidłowo wykształcone - żywotne oraz zdeformowane – niezdolne do kiełkowania. Z ocenianych 720 nasion 554 szt. (76,9%) było dobrze wykształconych, natomiast 166 nasion (23,1%) miało 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. Ze stratyfikowanych 554 nasion skiełkowało 531, co stanowi 95,8%. Kiełkowanie nasion było zróżnicowane i zależało od krzyżowanych form rodzicielskich. Najlepiej kiełkowały nasiona genotypów 'OSL 57', 'Blue Gigant' i 'Trumlar' (100% skiełkowania nasion), natomiast najsłabiej - genotypu śliwy japońskiej 'OSL 65'. Wstępne wyniki potwierdzają, 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 niezbędnych do prawidłowego rozwoju 10-tygodniowych zarodków, uzyskanych w procesie krzyżowego zapylenia w obrębie rodzaju *Prunus*. Badania prowadzono na 273 nasionach z 14 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych. Kontrolę stanowiło 240 nasion uzyskanych z wolnego zapylenia. Po usunięciu owocni pestki poddawano sterylizacji i wydobywano z nich nasiona, które wykładano na pożywki MS, WPM i C2d. W celu przełamania spoczynku nasiona poddano 10-tygodniowej stratyfikacji w temperaturze 2°C, prowadząc równocześnie obserwacje zmian morfologicznych. W materiale kontrolnym, w którym formy mateczne stanowiły morela i ałyca, w 4.

tygodniu stratyfikacji pękniętą okrywą nasienną miało 50-65% nasion (niezależnie od pożywki). W 10. tygodniu stratyfikacji okrywa nasenna była pęknięta we wszystkich obserwowanych nasionach moreli. W przypadku kontrolnych nasion śliwy japońskiej pęknięcie okrywy nasiennej było początkowo słabsze (20% obiektów w 4. tygodniu), ale w 10. tygodniu stratyfikacji pęknięte okrywy miało 95% obiektów. Udział nasion z pękniętymi okrywami nasionnymi, pochodzących z krzyżowania oddalonego, był po 4 tygodniach stratyfikacji zbliżony dla kombinacji D17-73 x morela oraz 'Trumlar' x morela, niezależnie od zastosowanej pożywki. Mniejszy udział nasion z pękniętą okrywą zaobserwowano w kombinacji 'Czernuszka' x morela (20% na WPM, 40% na MS). W 10. tygodniu stratyfikacji liczba nasion z pękniętą okrywą była porównywalna dla wszystkich kombinacji (75%-89%), z wyjątkiem kombinacji 'Czernuszka' x morela na WPM (40%). Wzrost korzenia zarodkowego obserwowano dla 75% obiektów pochodzących z kombinacji 'Trumlar' x morela (wszystkie pożywki) oraz kombinacji 'Czernuszka' x morela (pożywki MS i C2d). Udział nasion z korzeniem zarodkowym dla kombinacji D17-73 x morela oraz 'Czernuszka' x morela na pożywce WPM był niższy (45%). Po upływie 4 tygodni w fitotronie uzyskano 86 roślin mieszańcowych i 140 roślin kontrolnych.

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 oddalonego prowadzonego w poprzednich latach oraz jeden genotyp nowej formy matecznej (klon nr MMG K4 13 2012 75/3). Materiał genetyczny izolowano z młodych liści metodą opartą na CTAB, opisaną przez Doyle i Doyle. Na uzyskanej matrycy przeprowadzono reakcje amplifikacji z 20 parami starterów SSR umożliwiającymi analizę fragmentów mikrosatelitarnych w genomach roślinnych, uzyskując 35 amplikonów DNA charakteryzujących genotyp. Dla form mieszańcowych reakcje amplifikacji przeprowadzono z 7 parami starterów SSR. Polimorficzne amplikony (228 fragmentów DNA) posłużyły do utworzenia baz danych, na podstawie których przeprowadzano ocenę statusu mieszańca. Każdy analizowany genotyp scharakteryzowano na podstawie 29-46 polimorficznych fragmentów. W oparciu o te dane zweryfikowano pozytywnie status wszystkich mieszańców, przy czym dla czterech roślin pochodzących z krzyżowania 'Czernuszka' x 'Anna/Amelia/Agata' uzyskano najniższy stopień pokrewieństwa z formą mateczną (10%).

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 prac prowadzonych w latach 2011-2013). W 2017 r. zakwitły siewki mieszańcowe posadzone w latach 2012-2015. Z poddanych obserwacjom 180 genotypów (siewek mieszańcowych) zakwitło 121. Pozostałe 59 siewek nie ukończyło jeszcze fazy juvenilnej. Większość siewek odznaczała się małą intensywnością kwitnienia, a niektóre z nich tak jak w roku poprzednim wykazywały zaburzenia w rozwoju kwiatów. Przejawiało się to ich deformacjami lub niedorozwojem - w kwiatach znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. Z powodu wystąpienia przymrozków wiosennych i niekorzystnych warunków pogodowych w czasie kwitnienia drzew, pojedyncze owoce zawiązała tylko jedna siewka mieszańcowa. Wykonane obserwacje wskazują, że większość siewek mieszańcowych moreli, śliwy japońskiej i ałyczy kończy okres juvenilny w 4-5 roku wzrostu (3-4 lata po ich posadzeniu w polu). W roku 2017 rozmnożono kolejnych 40 genotypów siewek mieszańcowych, które jesienią w liczbie 164 drzew posadzono w kwaterze selekcyjnej w Dąbrowicach. Każdy genotyp siewki został posadzony w liczbie od 1 do 5 drzewek.

Abstrakt zamieszczony w materiałach konferencyjnych:

Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek', Kraków, 20-21 września 2017, Materiały konferencyjne: 126.

Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców w krzyżowaniu oddalonym *Prunus salicina* Lindl. (śliwa japońska) i *Prunus armeniaca* L. (morela)

Marek Szymajda, Bogusława Napiórkowska, Edward Żurawicz
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Marek.Szymajda@inhort.pl

Krzyżowanie genotypów należących do odległych genetycznie gatunków roślin (hybrydyzacja oddalona) pozwala na uzyskanie mieszańców międzygatunkowych, charakteryzujących się innowacyjnymi cechami, jak np. zwiększona odporność/ tolerancja na czynniki biotyczne i abiotyczne, mniejsza siła wzrostu roślin lub lepsza jakość owoców. Taka metoda hodowli znajduje zastosowanie zwłaszcza wówczas, gdy w obrębie określonego gatunku roślin brak jest źródeł genów warunkujących pożądane cechy użytkowe. Jednak krzyżowanie roślin należących do różnych gatunków nie zawsze jest możliwe lub z krzyżowań takich otrzymuje się niewiele owoców i nasion w stosunku do liczby zapylonych kwiatów. Powodem niskiej efektywności hybrydyzacji oddalonej jest istnienie licznych barier krzyżowalności o charakterze morfologicznym, anatomicznym i fizjologiczno-biochemicznym. Bariery te uniemożliwiają zapłodnienie i powstanie zarodka (bariery prezygotyczne) lub zaburzają jego rozwój (bariery postzygotyczne). Dlatego w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach prowadzone są badania, których celem jest ocena możliwości i efektywności krzyżowania oddalonego wybranych genotypów w obrębie rodzaju *Prunus*, należących do gatunków *P. salicina* i *P. armeniaca*.

Badania prowadzono w latach 2014 - 2016 w Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach na drzewach rosnących w kolekcji odmian w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach (Polska Centralna). Krzyżowano 4 genotypy mateczne śliwy japońskiej oraz 12 genotypów ojcowskich moreli. Średnio dla trzech lat badań, najlepszym zawiązywaniem owoców, w stosunku do zapylonych kwiatów, odznaczyły się genotypy 'D 17-73', 'Trumlar' oraz 'Czernuszka', natomiast najslabszym 'Santa Rosa' (średnio dla użytych form ojcowskich moreli). Najwięcej owoców uzyskano w krzyżowaniu genotypów 'D 17-73' × M I-7 (25,5%), 'D 17-73' × M II-19 (23,5%) oraz 'Trumlar' × 'Somo' (21,6%). Genotypy 'Czernuszka', 'D 17-73' i 'Trumlar' wytwarzały też więcej wykształconych nasion niż genotyp 'Santa Rosa'. Badania wykazały, że efektywność krzyżowań oddalonych śliwy japońskiej z morelą w dużym stopniu uzależniona jest od genotypu śliwy japońskiej, użytej jako forma mateczna.

*Badania finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 77 „Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałyca), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*”.*

Poster prezentowany podczas Ogólnopolskiej Ogrodniczej Konferencji Naukowej „Ziemia – Roślina – Człowiek”, Kraków, 20-21 września 2017 r., uwzględnia wyniki badań z tematu badawczego nr 1 „Analiza żywotności pyłku z form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej i ałyczy” (sprawozdanie za rok 2016, str. 6-8).

Napiórkowska B., Strączyńska K., Szymajda M., Korbin M. „Kompatybilność w krzyżowaniach międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Prunus* określona poprzez wzrost łagiewki pyłkowej”.

KOMPATYBILNOŚĆ W KRZYŻOWANIACH MIĘDZYGATUNKOWYCH W OBRĘBIE RODZAJU *PRUNUS* OKREŚLONA POPRZEZ WZROST ŁAGIEWKI PYŁKOWEJ

Bogusława Napiórkowska, Krystyna Strączyńska, Marek Szymajda, Małgorzata Korbin

Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Głównym celem prac hodowlanych jest pozyskiwanie genotypów, które charakteryzują się cechami użytkowymi, pożądanymi przez producentów i konsumentów. Donorem tych cech często są rośliny należące do odległych genetycznie taksónów botanicznych. Krzyżowanie oddalone niesie jednak ryzyko wystąpienia barier krzyżowalności już na etapie kiełkowania pyłku. Przejawem tego może być brak łagiewki pyłkowej, zatrzymanie wzrostu łagiewki w szyjce słupka, występowanie kalozy blokującej transport materiału genetycznego.

W projekcie realizowanym w Instytucie Ogrodnictwa oceniono kompatybilność pyłku i znamienia dla różnych genotypów z rodzaju *Prunus*, w 12 kombinacjach krzyżowań oddalonych.

MATERIAL I METODY

Materiał: pyłek zebrany z czterech genotypów moreli (MII-42, 'Taja', 'Early Orange', 'Sirena') oraz słupki kwiatowe trzech odmian śliwy japońskiej (D17-73, 'Czernuszka', 'Trumlar')

Opis metod:

1. obserwacja wzrostu łagiewek pyłkowych w warunkach *in vitro*
 - wysianie ziaren pyłku na szalki z pożywką Brewbacker i Kwack (1963)
 - 24-godzinna inkubacja szalek z pyłkiem, ciemność, temp. 24°C
 - zliczanie skielkowanych łagiewek pod mikroskopem świetlnym
2. obserwacja kiełkowania łagiewek pyłkowych *in vivo*, na znamieniu i przez szyjkę słupka
 - okastrowanie i zapylanie kwiatów przeprowadzone w kontrolowanych warunkach - szklarnia, temp. 19-21°C
 - zbieranie materiału (zapylone słupki) w czterech terminach od nałożenia pyłku na znamień słupka (48, 72, 96 i 120 godzin)
 - maceracja zebranych słupków w 4N roztworze NaOH, temp. 60°C, 15 minut
 - barwienie materiału w roztworze K₂HPO₄ i błękitie aniliny, 15 minut
 - obserwacja przerostu łagiewek przez szyjkę słupka pod mikroskopem w świetle UV

Kombinacja	Wzrost łagiewek <i>in vivo</i> po 72 h od zapylenia (%)	Liczba słupków, dla których łagiewka dociera do komórki jajowej (%) - 72 h od zapylenia
'Czernuszka' x 'Taja'	90	10
'Czernuszka' x 'Sirena'	50	0
'Czernuszka' x MII42	100	10
'Czernuszka' x 'Early Orange'	80	10
D17-73 x 'Taja'	90	10
D17-73 x 'Sirena'	20	0
D17-73 x MII-42	80	10
D17-73 x 'Early Orange'	80	30
'Trumlar' x 'Taja'	90	10
'Trumlar' x 'Sirena'	70	0
'Trumlar' x MII-42	60	10
'Trumlar' x 'Early Orange'	70	0

Tab.2. Kiełkowanie ziaren pyłku na znamionach słupków w poszczególnych kombinacjach krzyżowań po upływie 72 godzin od zapylenia (%) i kompatybilność analizowanych genotypów obserwowana na podstawie intensywności dorastania łagiewki w okolicy położenia komórki jajowej.

WYNIKI OBSERWACJI

1. Pyłek analizowanych genotypów moreli wykazał wysoką zdolność do wyrastania łagiewki pyłkowej (60% - 89%) (Tab. 1).
2. W kombinacjach kontrolnych (zapylenie wewnątrzgatunkowe 'Taja' x 'Early Orange' oraz 'Early Orange' x 'Taja') łagiewki pyłkowe rosły bardzo intensywnie i docierały w okolicy komórki jajowej w okresie do 48 h od momentu zapylenia. Dla kombinacji międzygatunkowych zaobserwowano intensywny wzrost łagiewek na znamieniu słupka, jednak PO 48 H docierały one do 1/3 - 2/3 długości szyjki słupka.
4. Dla 8 z 12 kombinacji międzygatunkowych zaobserwowano dotarcie łagiewki pyłkowej do załączka po 72 h.
5. W 30% obserwowanych słupków dla kombinacji D17-73 x 'Early Orange' łagiewki pyłkowe docierały w okolicy załączka (Tab. 2).

Badania finansowane przez MRiRW w ramach Postępu Biologicznego, Zadanie 77.

Genotyp	Kiełkowanie łagiewki pyłkowej <i>in vitro</i> (%)
MII-42	77
'Taja'	66
'Early Orange'	60
'Sirena'	89

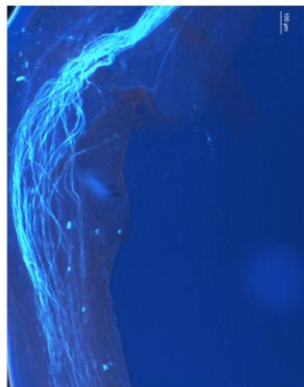
Tab. 1. Analiza zdolności kiełkowania ziaren pyłku dla roślin z rodzaju *Prunus* (%)



Fot.1. Słupki kwiatowe klonu D17-73 zebrane 72 h po zapyleniu.



Fot. 2. Wzrost łagiewek pyłkowych na znamieniu słupka



Fot. 3. Wzrost łagiewek pyłkowych przez szyjkę słupka

Załącznik 4.

Abstrakt zamieszczony w materiałach konferencyjnych:

Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek', Kraków, 20-21 września 2017, Materiały konferencyjne: 126.

**KOMPATYBILNOŚĆ W KRZYŻOWANIACH MIĘDZYGATUNKOWYCH W OBRĘBIE RODZAJU
PRUNUS OKREŚLONA PRZEZ WZROST ŁAGIEWKI PYŁKOWEJ PRZEZ SZYJKĘ SŁUPKA**

Bogusława Napiórkowska, Krystyna Strączyńska, Marek Szymajda, Małgorzata Korbin
Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Głównym celem prac hodowlanych jest pozyskiwanie genotypów, które charakteryzują się cechami użytkowymi, pożądanymi przez producentów i konsumentów. Tymczasem bardzo często jedynym źródłem genów warunkujących te cechy są rośliny należące do oddalonych genetycznie taksonów botanicznych. W warunkach naturalnych krzyżowanie roślin należących do różnych gatunków jest utrudnione, m. in. z uwagi na odmienność anatomiczno-fizjologiczną organów generatywnych form rodzicielskich lub ograniczoną żywotność i genetyczną niekompatybilność pyłku i znamienia.

W projekcie realizowanym w Instytucie Ogrodnictwa oceniono kompatybilność pyłku i znamienia różnych genotypów z rodzaju *Prunus*. Obserwacje zdolności kiełkowania pyłku oraz wzrostu łagiewki pyłkowej prowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym, przy użyciu błękitu aniliny emitującego niebieską barwę w świetle UV. Analizie poddano zapylone słupki pochodzące z 12 kombinacji krzyżowań oddalonych, gdzie formę matczyną stanowiła śliwa japońska (odm. 'Czernuszka' i 'Trumlar' oraz klon D17-73), natomiast formę ojcowską morela (odm. 'Taja', 'Sirena' i 'Early Orange' oraz klon MII-42). Kiełkowanie pyłku lub wzrost łagiewki pyłkowej przez szyjkę słupka oceniano w czterech terminach od nałożenia pyłku na znamię słupka (48, 72, 96 i 120 godzin). Materiał kontrolny stanowiły kombinacje krzyżowań wewnątrzgatunkowych moreli ('Taja' x 'Early Orange', 'Early Orange' x 'Taja').

Przeprowadzone obserwacje wykazały, że w kombinacjach kontrolnych pyłek kiełkował bardzo intensywnie, a łagiewka docierała w okolice komórki jajowej w okresie do 48 godzin od momentu zapylenia. W przypadku kombinacji międzygatunkowych zaobserwowano intensywne kiełkowanie pyłku na znamieniu słupka, jednak wzrost większości z nich zatrzymywał się na wysokości między 1/3 a 2/3 długości szyjki słupka. Tylko dla 8 z 12 kombinacji zaobserwowano szczyt łagiewki pyłkowej w okolicach zalążka (czas dotarcia – ok. 72 godzin). Dla tych kombinacji kompatybilny materiał w układzie pyłek-słupek stanowił jedynie 10%, z wyjątkiem kombinacji D17-73 x 'Early Orange' (30%).

*Badania finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach postępu biologicznego w produkcji roślinnej – Zadanie 77 „Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałyca), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*”.*