



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

Dr Anita Kuras

Dr hab. Agnieszka Masny, prof. IO

Piotr Skręta

Krystyna Strączyńska

Mgr Renata Czarnecka

Mgr Bogusława Idczak

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*”

Obszar 3 „Hodowla i nasiennictwo roślin uprawnych”

**Dotacja celowa** Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi



Ministerstwo Rolnictwa  
i Rozwoju Wsi

---

**Skierniewice, 2022**

## **1. Wstęp**

Dużym problemem w hodowli czereśni ukierunkowanej na uzyskanie odmian wczesnych jest ograniczona możliwość wykorzystania odmian o wczesnym terminie dojrzewania owoców jako form mącznych. 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 zapewniającej prawidłowy rozwój zarodków tego gatunku.

Efektywność metody *embryo rescue* zależy m.in. od genotypu i stadium dojrzałości zarodka oraz składu pożywki. 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 miększu z łądgi 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 posiada większą ilość jonów potasu i wapnia. Pożywka wg Boxus (1974) zawiera w składzie dodatkowe źródło jonów żelaza i potasu. Opracowanie skutecznej metody *embryo rescue* dla niedojrzałych zarodków czereśni umożliwi otrzymywanie siewek z kombinacji krzyżowań, w których jako formy mączne 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 mączne o wczesnym terminie dojrzewania owoców.

## **3. Materiał i metoda**

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 (tab. 1).

Tabela 1. Skład pożywek zastosowanych w badaniu.

ZWIĄZEK CHEMICZNY	POŻYWKA (mg/l)			
	MS	SH	Fossard	Boxus
MAKROELEMENTY				
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	370	490	370	510
CaCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	332,2	1300	491,76	-
KNO <sub>3</sub>	1900	5055	1011	250
Ca(NO <sub>3</sub> ) × 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	1440
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	800	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	272	-	250
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	138	-
KCl	-	-	-	120
MIKROELEMENTY				
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	10,7	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	18,61	37,3
FeCl <sub>3</sub>	-	-	-	5
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	16,9	15	8,45	12,76
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	8,6	4,8	5,75	8,6
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,016	0,024	0,025
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,02	0,118	0,025
KI	0,83	0,8	0,415	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6	3,09	6,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,2	0,024	0,25
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	144,99	-
WITAMINY				
Kwas nikotynowy (B <sub>3</sub> )	0,5	0,5	2,462	0,5

Materiał do badań stanowiły zarodki czereśni odmian wytwarzających owoce o wczesnym terminie dojrzewania. Zarodki te uzyskano z dwóch kombinacji krzyżowań ‘Rita’ × ‘Kassandra’ (240 sztuk) oraz ‘Jacinta’ × ‘Rita’ (220 sztuk). Owoce zbierano w szóstym (‘Rita’ × ‘Kassandra’) i siódmym (‘Jacinta’ × ‘Rita’) tygodniu 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 0,1% chlorku rtęci przez 5 min. Roztwór usuwano przez trzykrotne płukanie w sterylnej wodzie, po 20 minut każde. Po wysterylizowaniu, z pestek usuwano endokarpy przy pomocy imadła, a nasiona umieszczano na przygotowanych pożywkach. Na każdą pożywkę wyłożono po 60 nasion kombinacji ‘Rita’ × ‘Kassandra’ oraz po 55 nasion kombinacji ‘Jacinta’ × ‘Rita’.

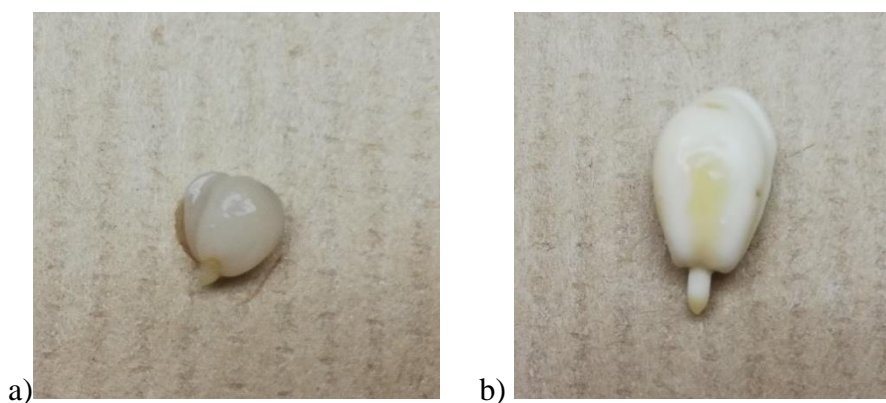
Etapy hodowli niedojrzałych zarodków czereśni obejmowały:

- 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 12 tygodni. Po zakończeniu stratyfikacji chłodnej poczyniono obserwacje związane ze stanem zarodków na ocenianych 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 eliminowano, 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 pęd 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 po 12 tyg. stratyfikacji w temp. 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 białe i twarde pochodzące z kombinacji krzyżowań 'Rita' × 'Kassandra' stanowiły 48% wszystkich wyłożonych na pożywkę MS, 30% na SH, 46% na Boxus i 65% na Fossard. Zarodki szare i miękkie stanowiły 37% wszystkich wyłożonych na pożywkę MS, 29% na SH, 24% na Boxus i 20% na Fossard. Zaobserwowano również, że zakażenia bakteryjne występowały w 15% na pożywce MS, 41% na SH, 30% Boxus oraz 15% na Fossard. Analogiczne obserwacje przeprowadzono dla zarodków pochodzących z kombinacji 'Jacinta' × 'Rita'. Zarodki białe i twarde stanowiły 80% wszystkich wyłożonych na pożywkę MS, 50% na SH, 62% na Boxus i 44% na Fossard. Zarodki nieżywotne obejmowały 5% wszystkich wyłożonych na pożywkę MS, 35% na SH, 29% na Boxus i 15% na Fossard, natomiast zakażenia bakteryjne występowały w 15% na pożywce MS, 15% na SH, 9% na Boxus oraz 11% na Fossard (tab. 2).



Fot.1. Zarodek po okresie chłodzenia w 4°C a) nieżywoty b) żywoty

Tabela. 2. Stan zarodków na badanych pożywkach po 12 tygodniach chłodzenia w temp. 4°C.

Krzyżowane formy rodzicielskie	Kondycja zarodków	MS	SH	Boxus	Fossard
		Udział zarodków (%) w odniesieniu do liczby wyłożonych			
Rita × Kasandra	twarde (żywotne)	48	30	46	65
	zakażone	15	41	30	15
	miękkie	37	29	24	20
Jacinta × Rita	twarde (żywotne)	80	50	62	44
	zakażone	15	15	9	11
	miękkie	5	35	29	15

W następnym etapie hodowli wszystkie żywotne zarodki czereśni przełożono na pożywkę WPM (sacharoza 30 g/l, bez regulatorów wzrostu) i umieszczono w fitotronie. Po 4 tygodniach hodowli oceniono, ile zarodków podjęło wzrost i rozwój oraz wykształciło organy roślinne (korzeń i pęd) (tab. 3).

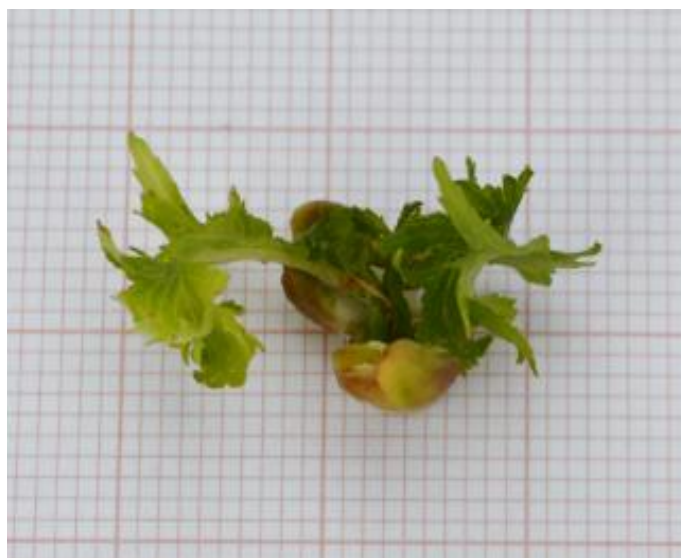
Tabela. 3. Wpływ pożywki w początkowym etapie hodowli zarodków na ilość uzyskanych roślin i organów roślinnych po 4 tygodniach wzrostu w fitotronie w odniesieniu do uzyskanych zarodków żywotnych wyrażony w %.

Krzyżowane formy rodzicielskie	Wykształcone organy rośliny	MS	SH	Boxus	Fossard
Rita × Kasandra	roślina	28	15	7	5
	tylko pęd	3	50	36	28
	tylko korzeń	10	7	0	0
Jacinta × Rita	roślina	12	4	29	29
	tylko pęd	14	33	12	34
	tylko korzeń	8	0	0	0

Zarodki z kombinacji ‘Rita’ × ‘Kassandra’ wyłożone w pierwszym etapie hodowli na pożywki SH, Boxus i Fossard miały niższą zdolność do tworzenia siewek, odpowiednio 15, 7 i 5% (uzyskanych roślin w odniesieniu do liczby wyłożonych zarodków żywotnych), niż zarodki wyłożone na pożywkę Murashige & Skoog (28%). Natomiast zarodki wyłożone na pożywki SH, Boxus i Fossard dość dobrze wytwarzały pędy, ale bez korzeni, odpowiednio 50, 36 i 28% (fot. 3).



Fot. 2. Rośliny uzyskane z zarodków pochodzących z kombinacji ‘Rita’ × ‘Kassandra’ na pożywce wg Boxusa (1974); roślina z w pełni wykształconym pędem i korzeniem.



Fot. 3. Pęd z 2 liśćmi bez wykształconego korzenia uzyskany z zarodka (kombinacja ‘Rita’ × ‘Kassandra’) wyłożonego na pożywkę wg Fossard (1977).



Zarodki uzyskane z kombinacji krzyżowań ‘Jacinta’ × ‘Rita’ wykazały się większą zdolnością do tworzenia siewek niż zarodki z kombinacji ‘Rita’ × ‘Kasandra’. Zarodki te wyłożone w pierwszym etapie hodowli na pożywki Boxus i Fossard lepiej tworzyły siewki (29% uzyskanych roślin w odniesieniu do liczby wyłożonych zarodków żywotnych) niż na pożywkach SH (4%) i MS (12%). Natomiast najwięcej zarodków tworzących tylko pędy obserwowano na pożywkach SH i Fossard, odpowiednio 33 i 34%. Bez względu na rodzaj zastosowanej pożywki z zarodków z kombinacji ‘Rita’ × ‘Kasandra’ uzyskano 15 siewek (od 5% na pożywce Fossard do 29% na pożywce Murashige & Skoog). Dla kombinacji ‘Jacinda’ × ‘Rita’ uzyskano 28 roślin (od 4% roślin na pożywce SH do 29% na pożywce Boxus i Fossard). Część nadliścieniowa większości roślin osiągała długość od 20 do 40 mm i wykształcała 4 liście, do tego długość korzenia średnio wynosiła ok 60 mm (fot. 4). Nie zanotowano wpływu pożywek na długość korzenia. Rośliny, które rozwinęły system korzeniowy oraz część nadliścieniową (w sumie 43 siewki), zostały wysadzone w szklarni i poddane aklimatyzacji.



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

## **5. Podsumowanie**

Na podstawie przeprowadzonych w 2022 r. badań można stwierdzić, że:

- technika *embryo rescue* umożliwia uzyskanie siewek z nasion odmian czereśni o wczesnym terminie dojrzewania owoców,
- dla hodowli zarodków uzyskanych z krzyżowań ‘Rita’ × ‘Kasandra’ korzystny był wpływ pożywek MS i SH, natomiast dla hodowli zarodków uzyskanych z krzyżowań ‘Jacinta’ × ‘Rita’ pozytywny wpływ miały pożywki Boxus oraz Fossard,
- ilość otrzymanych siewek czereśni przy użyciu techniki *embryo rescue* zależna jest od zastosowanej pożywki oraz od genotypu wykładanych zarodków,
- zarodki pochodzące z kombinacji krzyżowań ‘Jacinta’ × ‘Rita’ lepiej tworzą organy roślinne niż zarodki z kombinacji ‘Rita’ × ‘Kasandra’.