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*

POSTĘP BIOLOGICZNY

Okres realizacji: 2014-2020

KIEROWNIK ZADANIA 77

dr inż. Marek Szymajda

e-mail: Marek.Szymajda@inhort.pl

Wykonawcy:

dr Anita Kuras, prof. dr hab. Edward Żurawicz, prof. dr hab. Małgorzata Korbin, Bogusława Idczak, Krystyna Strączyńska, Grażyna Lewandowska, Dorota Dziubińska, Jolanta Kubik, Agnes Zmarlickine Laszlovszky , Tadeusz Filipczak, Piotr Skręta

CEL PROJEKTU

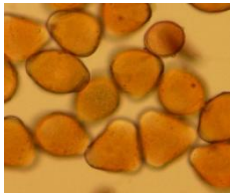
Ocena możliwości zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus* poprzez zastosowanie hybrydyzacji oddalonej gatunków *P. cerasifera*, *P. salicina, P. armeniaca* oraz *P. domestica* metodą hodowli klasycznej przy wykorzystaniu techniki *embryo-rescue*

(założony cel został osiągnięty)

MATERIAŁY I METODY

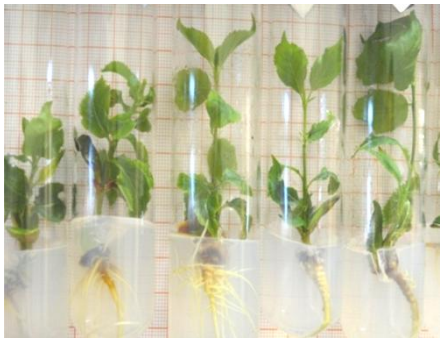
Corocznie realizowano 6 tematów badawczych:

1. **Analiza żywotności pyłku form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej i ałyczy.** 3 metody - wybarwianie cytoplazmy pyłku 2% acetoorceiną, ocena zdolności kiełkowania pyłku na sztucznych pożywkach oraz ocena zdolność kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych w warunkach *in vivo.*



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

3. **Ocena zdolności kiełkowania nasion uzyskanych w wyniku hybrydyzacji oddalonej różnych genotypów śliwy japońskiej, moreli, ałyczy lub ich mieszańców.**



4. **Optymalizacja i prowadzenie hodowli zarodków *in vitro.*** Zarodki mieszańcowe wykładano na 5 pożywek: wg Murashige i Skoog (MS i ½ MS) , wg Lloyd i McCown (C2d), wg Boxus oraz wg Chee i Pool (WPM)

5. **Analizy molekularne siewek mieszańcowych oraz ich form rodzicielskich.**

6. **Ocena wybranych cech biologicznych uzyskanych siewek mieszańcowych**

WYNIKI

Temat badawczy 1

- ✓ Żywotność pyłku oceniona na pożywkach była niższa od zaobserwowanej po barwieniu acetoorceiną. Najniższą zdolność kiełkowania miał pyłek śliwy japońskiej (0-33% kiełkujących ziaren pyłku), a najwyższą moreli (30-75%).

Temat badawczy 2

- ✓ Efektywność krzyżowania oddalonego różnych genotypów śliwy japońskiej, moreli i ałyczy na ogół była niska. Uzyskano tylko 8,8% owoców w odniesieniu do liczby zapylonych kwiatów.
- ✓ Tworzenie owoców w większym stopniu zależało od genotypu śliwy japońskiej, jako formy matecznej niż genotypu moreli lub ałyczy jako formy ojcowskiej. Przy wykorzystaniu zgodnych genotypów śliwy japońskiej i moreli zawiązanie owoców przekraczało 20% liczby zapylonych kwiatów.
- ✓ Śliwy japońskie ‘Trumlar’, D 17-73 i ‘Czarnuszka’ oraz ałycza ‘Amelia’ są dobrymi formami matecznymi do tradycyjnej hybrydyzacji oddalonej śliwy japońskiej, moreli i ałyczy.

Temat badawczy 3

- ✓ W otrzymanych owocach znajdowały się zarówno nasiona dobrze wykształcone – żywotne, jak i pomarszczone zawierając niewykształcone martwe zarodki - nieżywotne. W zależności od kombinacji krzyżowań liczba nieżywotnych nasion przekraczała nawet 50% całkowitej liczby uzyskanych nasion.
- ✓ Prawidłowo wykształcone nasiona form matecznych śliwy japońskiej ‘Trumlar’, D 17-73 i ‘Czarnuszka’ oraz ałyczy ‘Amelia’ posiadały na ogół dobrą zdolność kiełkowania.

WYNIKI

Temat badawczy 4

- ✓ Ilość uzyskanych roślin techniką *embryo-rescue* zależała zarówno od rodzaju zastosowanej pożywki, jak i genotypu wyłożonych zarodków mieszańcowych.
- ✓ Po czterech tygodniach wzrostu najwięcej roślin mieszańcowych uzyskano z zarodków wyłożonych na pożywki MS oraz WPM (średnio 48% i 40% mieszańców w odniesieniu do wyłożonych zarodków), natomiast najmniej na pożywkę C2d (34%).
- ✓ Średnio dla badanych pożywek najwięcej roślin mieszańcowych uzyskano z zarodków śliwy japońskiej D 17-73 (ok. 50%).

Zarodki międzygatunkowe po 10 tyg. stratyfikacji: a) nieżywotne, b) żywotne

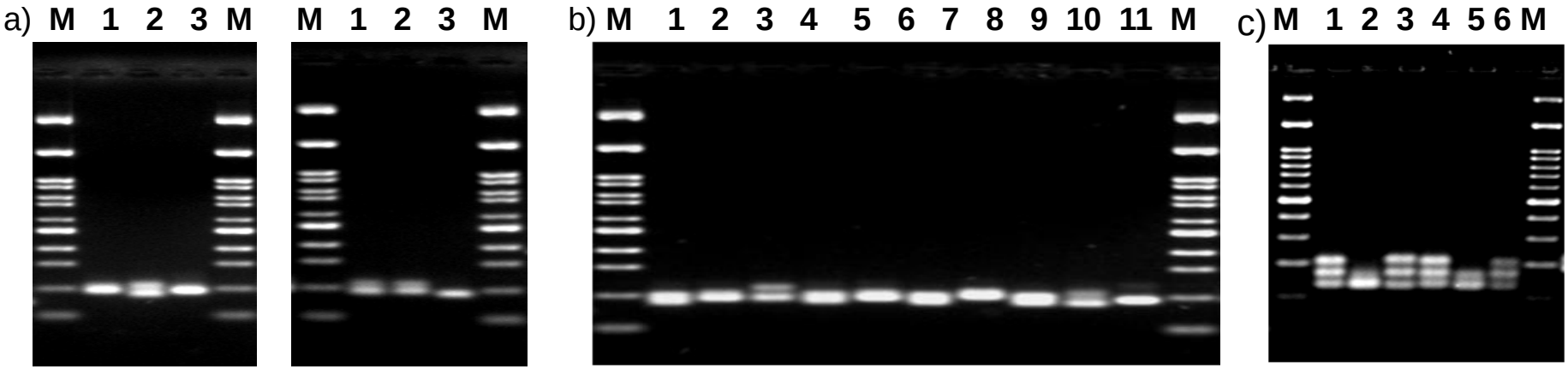
Rośliny na pożywkach odpowiednio: WPM, Boxus, C2d , MS, 1/2MS

Rośliny po 4 tygodniach w fitotronie

WYNIKI

Temat badawczy 5

- ✓ Do opracowania profili genetycznych dla form rodzicielskich zastosowano zestaw 20 par oligonukleotydów, w reakcji z którymi uzyskano ok. 35 amplikonów o długości od 90 do 230 pz dla każdego genotypu.
- ✓ Po analizie uzyskanych wyników wytypowano zestaw 7 starterów umożliwiający identyfikację mieszańców międzygatunkowych śliwy japońskiej i moreli, śliwy japońskiej i ałyczy oraz ałyczy i moreli.
- ✓ Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla 95% testowanych genotypów.



Fot.1. Przykładowe elektroforegramy produktów amplifikacji metodą SSR na matrycach DNA z roślin mieszańcowych

a) mieszańce śliwy japońskiej i moreli nr 36(1) oraz formy rodzicielskie: ‘Trumlar’ (2), M II-42 (3) z parą starterów BPPCT002, BPPCT014

b) mieszańce śliwy japońskiej i moreli nr 4(1) 5 (2), 6 (3), 7 (4), 8 (5), 9 (6), 10 (7), 11 (8) oraz formy rodzicielskie: ‘Trumlar’ (9), M II-42 (10) z parą starterów BPPCT002;

c) mieszańce śliwy japońskiej i moreli nr 32 (1), 33 (2), 34 (3), 35 (4) oraz formy rodzicielskie: ‘Trumlar’ (5),‘Sirena’ (6) z parą starterów BPPCT020

WYNIKI

Temat badawczy 6

- ✓ Duża część siewek mieszańcowych śliwy japońskiej i moreli wykazała zaburzenia genetyczne w postaci rozwoju kwiatów. W kwiatach znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. W efekcie tego wiele z ocenianych siewek nie owocowało pomimo dobrego kwitnienia. Wyróżniającą populacją były siewki pochodzące z krzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska]. Siewki te dość szybko kończyły fazę juwenilną oraz dobrze owocowały i wytwarzały też na ogół atrakcyjne owoce.
- ✓ Dobrze owocowały też siewki uzyskane ze skrzyżowania ałyczy ‘Amelia’ jako formy matecznej i moreli ‘Early Orange’ lub ‘Sirena’ jako formy ojcowskiej. Siewki te wytwarzały na ogół owoce słabej lub średniej jakości z delikatnym omszeniem. Należy podkreślić, że siewki te kwitły przeważnie kilka dni przed przymrozkami, lecz mimo to niektóre z nich były zdolne do zawiązania owoców.
- ✓ Zaowocowały także niektóre siewki mieszańcowe śliwy japońskiej i moreli. Owoce tych siewek były znacznie atrakcyjniejsze niż owoce siewek mieszańcowych ałyczy i moreli, a ich miąższ częściowo oddzielał się od pestki.

Owoce mieszańca
[(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska]

Owoce mieszańca
(śliwa japońska × morela)

Owoce mieszańca
(ałycza × morela)

WNIOSKI

1. Metodę acetoorceinową można stosować tylko do badań wstępnych, gdyż może wybarwiać ziarna pyłku nieaktywne fizjologicznie.
2. Tradycyjna hybrydyzacja oddalona gatunków morela, śliwa japońska i ałycza jest mało efektywna. Uzyskuje się małą liczbę owoców, nasion i siewek mieszańcowych w stosunku do zapylonych kwiatów.
3. Duża część nasion uzyskanych z krzyżowania śliwy japońskiej i moreli jest nieprawidłowo wykształcona i nieżywotna.
4. Ilość uzyskanych roślin mieszańcowych śliwy japońskiej, moreli i ałyczy techniką *embryo-rescue* zależy od rodzaju zastosowanej pożywki i genotypu zarodków.
5. Niezgodność krzyżowanych form rodzicielskich ujawnia się na różnych etapach prac hodowlanych - od zawiązywania owoców do wzrostu uzyskanych siewek mieszańcowych.
6. Przy pomocy tradycyjnych metod hybrydyzacji oddalonej możliwe jest uzyskanie nowych genotypów drzew owocowych, poszerzających zmienność genetyczną w obrębie rodzaju *Prunus*.
7. Spośród ocenianych rodzin mieszańców najlepszymi cechami fenotypowymi odznaczają się siewki uzyskane ze skrzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska].

OSIĄGNIĘCIA PROJEKTU

- ✓ Wykazano, że przy zastosowaniu tradycyjnej hybrydyzacji oddalonej oraz zgodnych form rodzicielskich możliwe jest uzyskanie mieszańców śliwy japońskiej, moreli i ałyczy. Jednakże z krzyżowań takich na ogół otrzymuje się mało siewek w stosunku do liczby zapylonych kwiatów, a z niektórych kombinacji krzyżowań w ogóle nie uzyskuje się potomstwa.

- ✓ Wyniki pokazały, że niezgodność krzyżowanych genotypów ujawnia się na różnych etapach hybrydyzacji - od zapylenia kwiatów i zawiązywania owoców do wzrostu otrzymanych siewek mieszańcowych. Śliwy japońskie ‘Trumlar’ i D 17-73 są przydatnymi formami matecznymi do uzyskania siewek mieszańcowych śliwy japońskiej i moreli oraz śliwy japońskiej i ałyczy. Z kolei ałycza ‘Amelia’ użyta jako forma mateczna umożliwia uzyskanie siewek mieszańcowych ałyczy i moreli.

- ✓ Uzyskano nowe cenne genotypy mieszańcowe. Wyróżniającą się populacją były siewki pochodzące z krzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska], ale wartościowe cechy mają także siewki śliwy japońskiej i moreli oraz ałyczy i moreli.

- ✓ Uzyskane genotypy pozwolą poszerzyć istniejącą bioróżnorodność w obrębie rodzaju *Prunus*, a w przyszłości mogą być wykorzystane także w hodowli ukierunkowanej na uzyskanie nowych odmian moreli i śliwy japońskiej lub śliwomoreli, a także podkładek dla tych gatunków.

Owoce mieszańca
[(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska]

WYKAZ PUBLIKACJI WYNIKÓW PROJEKTU

Publikacje naukowe:

- Szymajda M., Napiórkowska B., Korbin M., Żurawicz E. (2015). Studies on the interspecific crossing compatibility among three *Prunus* species and their hybrids, Horticultural Science, 42(2), 70-82. https://doi.org/10.17221/273/2014-HORTSCI (artykuł naukowy)
- Szymajda M., Idczak B., Kuras A., Korbin M., Żurawicz E. (2019). 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*, Biuletyn IHAR, 286, 429-432. https://doi.org/10.37317/biul-2019-0095 (komunikat)
- Szymajda M., Kuras A., Żurawicz E., Idczak B. (2019). 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*, Biuletyn IHAR, 286 (sup.), 221-224 (komunikat)
- Szymajda M., Kuras A., Żurawicz E. (2020). Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców i nasion w hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza), Biuletyn IHAR, 291, 85-90. https://doi.org/10.37317/biul-2020-PB88 (artykuł naukowy)
- Szymajda M., Studnicki M., Kuras A., Żurawicz E. (2021). Cross-compatibility in interspecific hybridization between three *Prunus* species, South African Journal of Botany – praca w recenzji (artykuł naukowy)

Doniesienia konferencyjne (abstrakty):

- Szymajda M., Żurawicz E. (2015). Ocena zdolności kiełkowania nasion uzyskanych z hybrydyzacji oddalonej gatunków z rodzaju *Prunus* - ałycza, morela, śliwa japońska, śliwa domowa. IV Zjazd PTNO, Konferencja Naukowa „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska", Wrocław, 14-16 września 2015, Streszczenia prac: 217.
- Napiórkowska B., Strączyńska K., Szymajda M., Korbin M. (2015). Wpływ składu pożywek na wzrost i rozwój wyizolowanych zarodków, pochodzących z krzyżowań w obrębie rodzaju *Prunus*. IV Zjazd PTNO, Konferencja Naukowa pt. „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska", Wrocław, 14-16 września 2015, Streszczenia prac: 208.
- Napiórkowska B., Strączyńska K., Szymajda M., Korbin M. (2017). Kompatybilność w krzyżowaniach międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Prunus* określona poprzez wzrost łagiewki pyłkowej. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek', Kraków 20-21 września 2017, Materiały konferencyjne s. 111.
- Szymajda M., Napiórkowska B., Żurawicz E. (2017). Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców w krzyżowaniu oddalonym pomiędzy *Prunus salicina* Lindl. (śliwa japońska) i *Prunus armeniaca* L. (morela). Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek', Kraków 20-21 września 2017, Materiały konferencyjne s. 126.
- Idczak B., Strączyńska K., Szymajda M., Keller-Przybyłkowicz S. (2019). Zdolność kiełkowania pyłku różnych gatunków z rodzaju *Prunus* (*P. armeniaca, P. salicina, P. cerasifera*) w warunkach *in vitro*. V Zjazd PTNO, Warszawa, 16-18 września 2019 r., Streszczenia, s. 116.
- Szymajda M., Idczak B., Żurawicz E. (2019). Influence of selected parental forms on fruit and seed set in distant hybridization of *Prunus salicina* Lindl. (Japanese plum) and *Prunus armeniaca* L. (apricot). XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium, June 3-7, 2019, Prague, Czech Republic. Book of abstracts, Poster presentations: 2.
- Szymajda M., Idczak B., Żurawicz E. (2019). Kiełkowanie nasion uzyskanych z hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza).V Zjazd PTNO, Warszawa, 16-18 września 2019 r., Streszczenia, s. 123.