

Zadanie nr 3.10 – Wytworzenie materiałów wyjściowych czereśni (*Prunus avium* L.) o wysokiej jakości oraz tolerancyjnych na pęknięcie owocach deserowych z wykorzystaniem techniki *embryo rescue*

Kierownik zadania: dr Marek Szymajda

Cele zadania:

Wytworzenie nowych materiałów wyjściowych czereśni wytwarzających wysokiej jakości oraz tolerancyjne na pęknięcie owoce deserowe (kontynuacja oceny materiałów hodowlanych czereśni otrzymanych w latach 2008-2013 i realizacja nowego programu hodowli) oraz optymalizacja warunków metody *embryo rescue* dla prawidłowego rozwoju niedojrzałych zarodków wytwarzanych przez formy mateczne o wczesnym terminie dojrzewania owoców.

Zakres rzeczowy zadania i przyjęte cele realizowano zgodnie z założeniami na 2024 r.

Wykonano 10 kombinacji krzyżowań, zapyłono 23 634 kwiaty, uzyskano 3 184 owoce, z których pozyskano 2 537 nasion. Wyprodukowano 1 033 siewki, które jesienią posadzono w kwaterze selekcyjnej Sadu Doświadczalnego w Dąbrowicach. W kwaterach selekcyjnych oceniano 954 siewki; wyselekcjonowano 1 pojedynkę. Rozmnożono 1 pojedynkę oraz 1 klon do ewentualnego wykorzystania ich w dalszej hodowli; prowadzono 3 doświadczenia odmianowo-porównawcze. Przeprowadzono weryfikację tożsamości genetycznej, przy zastosowaniu markerów mikrosatelitarnych (SSR), klonu czereśni hodowli IO: Cz-KD3-1-6 ('Ruksandra' × 'Summit'). Do badań nad uzyskaniem siewek techniką *embryo rescue* z nasion form matecznych o wczesnym terminie dojrzewania owoców zastosowano Murashige & Skoog i Boxus różniące się źródłem i stężeniem mikro- i makroelementów oraz rodzajem cukru (sacharoza 20g/l i glukoza 40g/l) oraz wprowadzono modyfikację składu obu ww. pożywek polegającą na zmniejszeniu o połowę mikro- i makroskładników (1/2 MS, 1/2 Boxus). Koncentracja żelaza oraz regulatorów wzrostu pozostała bez zmian. Na każdą pożywkę wykładano po 240 nasion z dwóch kombinacji krzyżowań: 'Rita' × 'Kasandra' oraz 'Jacinta' × 'Rita', pobrane w 7 tygodniu po zapyleniu w początkowej fazie czerwonego owocu. Najwięcej siewek uzyskano na pożywkach Murashige & Skoog oraz Boxus.

W ramach zadania 3.10 w 2024 r. wykonano następujące prace:

1) Wykonanie programu krzyżowań z wykorzystaniem różnych form rodzicielskich o komplementarnych cechach fenotypowych i użytkowych oraz zbiorów owoców, pozyskiwanie nasion.

Wykonano 10 kombinacji krzyżowań na drzewach posadzonych w tunelu foliowym (Sad Pomologiczny w Skierniewicach), zapyłono 23 634 kwiaty. Do programu krzyżowań wykorzystano 10 form rodzicielskich ('Rita', 'Jacinta', 'Kasandra', 'Carmen', 'Tamara', 'Justyna', 'Kordia', 'Regina' i 2 klony hodowlane C16-1, C16-2), pochodzących z różnych rejonów geograficznych – Węgry, Czechy, Niemcy i Polska oraz zróżnicowanych genetycznie. Jako formy rodzicielskie wybrano genotypy o wysokiej plenności i wytwarzające atrakcyjne owoce. Trzy odmiany oraz dwa klony hodowlane należą do genotypów o wczesnym terminie dojrzewania owoców. W celu uzyskania siewek z zarodków otrzymanych z krzyżowania genotypów o wczesnym terminie dojrzewania owoców zastosowano metodę *embryo rescue*. Otrzymano 3 184 owoce, z których pozyskano 2 537 nasion.

2) Stratyfikacja, wysiew nasion oraz produkcja siewek w szklarni i wysokim nieogrzewanym tunelu foliowym.

Uzyskane z programu krzyżowań nasiona poddano stratyfikacji. Przed stratyfikacją z nasion usunięto endokarpy za pomocą imadła stołowego. Pozyskane nasiona odkażano poprzez namoczenie w 0,5% roztworze fungicydu Kaptan zawieszinowy 50 WP przez 1-2 godz. Następnie wymieszano je z wilgotnym podłożem do stratyfikacji (perlit), zapakowano do oddzielnych, perforowanych foliowych torebek i umieszczono w inkubatorze do stratyfikacji nasion w temperaturze ok. 5°C. Pierwsze cztery przeglądy nasion wykonano po 20, 40, 60 i 80 dniach od rozpoczęcia stratyfikacji, a następnie co 10 dni. W trakcie tych przeglądów wybierano i liczone kiełkujące nasiona, które

sukcesywnie wysiewano (sadzono) pojedynczo do plastikowych doniczek o wymiarach 7 × 7 cm, wypełnionych mieszaniną substratu torfowego i piasku w stosunku objętościowym 3:1. Doniczki z wysianymi nasionami ustawiano na parapecie w szklarni ze zmienną temperaturą 20/18°C (dzień/noc), pod sztucznym doświetlaniem 16/8 h (dzień/noc). W szklarni z nasion uzyskanych w latach 2022-2023 wyprodukowano 1 033 nowe siewki. W maju siewki posadzono w wysokim tunelu foliowym. W trakcie uprawy prowadzono zabiegi ochrony roślin według zaleceń Programu Ochrony Roślin Sadowniczych na 2024 r. oraz zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie, cięcie.

3) **Optymalizacja metody *embryo rescue*.**

W 2024 r. do badań nad uzyskaniem siewek techniką *embryo rescue* z nasion form matecznych o wczesnym terminie dojrzewania owoców wybrano pożywki: Murashige & Skoog (1962) i Boxus (1974) różniące się źródłem i stężeniem mikro- i makroelementów oraz rodzajem cukru (sacharoza 20g/l i glukoza 40g/l). Pożywka Murashige & Skoog (1962) jest podstawowym podłożem wykorzystywanym w hodowli *in vitro* roślin. Charakteryzuje się bogatym składem związków mineralnych i organicznych natomiast Boxus zawiera dodatkowe źródło żelaza. Dodatkowo wprowadzono modyfikację składu obu ww. pożywek polegającą na zmniejszeniu o połowę mikro- i makroskładników (1/2 MS, 1/2 Boxus). Koncentracja żelaza oraz regulatorów wzrostu pozostała bez zmian. Na każdą pożywkę wykładano po 240 nasion z dwóch kombinacji krzyżowań: 'Rita' × 'Kasandra' oraz 'Jacinta' × 'Rita', pobrane w 7 tygodniu po zapyleniu w początkowej fazie czerwonego owocu. Pozyskane z owoców pestki poddano sterylizacji w roztworze 0,1% chlorku rtęci, a następnie izolowano z nich nasiona. Nasiona wykładano na pożywki bez regulatorów wzrostu i poddano stratyfikacji ciepło – chłodnej (25°C/ 3 tygodnie – 4°C /12 tygodni). Po tym czasie poczyniono obserwacje związane ze stanem zarodków na przygotowanych pożywkach. Zarodki białe i twarde (żywotne) pochodzące z kombinacji krzyżowań 'Rita' × 'Kasandra' stanowiły 67% wszystkich wyłożonych na pożywkę 1/2 MS, 80% na MS, 64% na 1/2 Boxus i 75% na Boxus. Analogiczne obserwacje przeprowadzono dla zarodków pochodzących z kombinacji krzyżowań 'Jacinta' × 'Rita'. Zarodki żywotne stanowiły 82% wszystkich wyłożonych na pożywkę 1/2 MS, 84% na MS, 80% na 1/2 Boxus i 77% na Boxus. Zarodki te przekładano na pożywkę WPM (sacharoza 30 g/l) bez regulatorów wzrostu i umieszczono w fitotronie. Po kolejnych 4 tygodniach hodowli oceniano, ile zarodków podjęło wzrost i rozwój oraz wykształciło organy roślinne (korzeń i pęd). Zarodki z kombinacji 'Rita' × 'Kasandra' miały największą zdolność do rozwoju na pożywce MS (20%), natomiast zarodki z kombinacji 'Jacinta' × 'Rita' najlepiej rozwijały się na pożywkach Boxus (25%). Część nadliścieniowa większości roślin osiągała długość ok 24 mm i wykształcała 3-4 liście, a długość korzenia średnio wynosiła ok. 75 mm. Najwięcej zarodków tworzących tylko część nadziemną obserwowano na pożywce Boxus - 18% dla kombinacji 'Rita' × 'Kasandra' oraz 15% dla kombinacji 'Jacinda' × 'Rita'. Rośliny, które rozwinęły system korzeniowy oraz część nadliścieniową zostały wysadzone w szklarni i poddane aklimatyzacji.

4) **Sadzenie, uprawa i pielęgnacja siewek w polowej kwaterze selekcyjnej.**

W kwaterach selekcyjnych (ok. 0,5 ha) kontynuowano uprawę 250 siewek, wyprodukowanych w ostatnich latach edycji poprzedniego programu wieloletniego (lata 2008-2013) oraz 704 siewek wyprodukowanych w ramach dotacji celowej – zadanie 3.10. W kwaterze selekcyjnej prowadzono zabiegi pielęgnacyjne: nawożenie, nawadnianie, odchwaszczanie, cięcie i formowanie drzew oraz ochronę chemiczną przeciwko chorobom i szkodnikom według zaleceń Programu Ochrony Roślin Sadowniczych na 2024 r. Jesienią w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach posadzono 1 033 siewki wyprodukowane w wysokim tunelu foliowym.

5) **Ocena i selekcja pozytywna w obrębie populacji siewek (oznaczanie pojedynków będących nośnikami pożądanych cech, molekularna weryfikacja tożsamości genetycznej wartościowych pojedynków).**

W kwaterach selekcyjnych (ok. 0,5 ha) kontynuowano ocenę 250 siewek, wyprodukowanych w ostatnich latach edycji poprzedniego programu wieloletniego (lata 2008-2013) oraz 704 siewek wyprodukowanych w ramach dotacji celowej – zadanie 3.10. Ocenianymi cechami fenotypowymi były: siła wzrostu i pokrój drzew, termin i intensywność kwitnienia oraz owocowania drzew, wielkość owoców oraz barwa owoców i soku. Na wybranych genotypach wykonano pomiar zawartość ekstraktu i witaminy C w owocach. W trakcie prowadzonej oceny wyselekcjonowano 1 nowy pojedynok: Cz-KD3-1-12 ('Van' × 'Summit').

Rozpoczęto weryfikację tożsamości genetycznej (na poziomie DNA) perspektywicznego klonu czereśni hodowli IO: Cz-KD3-1-6 ('Ruksandra' × 'Summit'). Pobrano materiał roślinny w postaci młodych liści z analizowanego klonu i jego genotypów rodzicielskich. Z pobranej tkanki (2g/ 3 powtórzenia) wyizolowano DNA metodą opartą na CTAB, zgodną z Doyle i Doyle (1990). Czystość i jakość przygotowanych preparatów określano spektrofotometrycznie przy długości 230, 260, 280, 320 nm (Gene Quant Pro Amersham Pharmacia Biotech). Wyizolowany materiał zamrożono w -20 °C do czasu rozpoczęcia analiz molekularnych. Do analiz molekularnych zastosowano technikę SSR (Simple Sequence Repeat), umożliwiającą analizę regionów mikrosatelitarnych. Reakcje amplifikacji przeprowadzono na uzyskanych matrycach DNA (2 powt. biol./ 2-3 powt. tech.) w obecności 18 par oligonukleotydów, specyficznych dla genomu czereśni. Łącznie przeprowadzono 216 testów PCR, w których wygenerowano 81 amplikonów o długości od 80 do 380 pz. Potwierdzono tożsamość genetyczną testowanego klonu, po wizualizacji produktów amplifikacji obserwowano allele zarówno od formy matecznej jak i ojcowskiej.

Wygenerowane amplikony poddano analizie bioinformatycznej pod kątem oceny stopnia ich powinowactwa genetycznego. Obecność lub brak polimorficznych fragmentów DNA była podstawą do określenia pokrewieństwa genetycznego badanych genotypów. Dystans genetyczny określono na podstawie analizy kodów binarnych 0/1, gdzie „0” oznaczał brak fragmentu DNA o określonej długości, a „1” - jego obecność (metoda Jaccarda). Dendrogram obrazujący pokrewieństwo badanych genotypów skonstruowano stosując metodę UPGMA. Na dendrogramie obserwowano klaster, w którym zgrupowano klon Cz-KD3-1-6 i odmianę 'Ruksandra' (65% podobieństwa genetycznego), oraz odmianę 'Summit' (30% podobieństwa). co potwierdza ich rodowód hodowlany.

- 6) **Rozmnażanie (klonowanie) wyselekcjonowanych pojedynków dla założenia kolekcji wyjściowych materiałów hodowlanych dla ich dalszej oceny pod kątem poziomu pożądanych cech i możliwości włączenia do hodowli.**

Rozmnożono poprzez zimowe szczepienie w rękę na podkładce 'Gisela 5' nowy pojedynek czereśni Cz-KD3-1-6 ('Ruksandra' × 'Summit'), w celu prowadzenia jego dalszej dokładnej oceny.

- 7) **Ocena wartości produkcyjnej klonów selekcyjnych w kolekcji klonów i rozmnożenie najcenniejszych klonów.**

Oceniono wzrost i owocowanie 15 klonów rosnących w kwaterach hodowlanych (ok. 0,3 ha) w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Ocenianymi cechami fenotypowymi były: siła wzrostu i pokrój drzew, termin i intensywność kwitnienia oraz owocowania drzew, wielkość owoców oraz barwa owoców i soku. Rozmnożono na podkładce 'Gisela 5' 1 klon o wczesnym terminie dojrzewania owoców: Cz-KD3-1-13 ('Van' × 'Summit'), w celu jego dalszej oceny.

- 8) **Prowadzenie wstępnych hodowlanych doświadczeń porównawczych z najwartościowszymi klonami, uzyskanymi w latach 2008-2013 w celu zgłoszenia ich, jako potencjalnych odmian, do badań rejestrowych COBORU (ocena fenotypowa, laboratoryjna, molekularna weryfikacja tożsamości genetycznej i statusu zdrowotności mieszańców pod kątem chorób wirusowych).**

Kontynuowano 3 doświadczenia odmianowo-porównawcze:

Czereśnia – 1/2016 - doświadczenie odmianowo-porównawcze z nowymi klonami hodowlanymi czereśni o wczesnym terminie dojrzewania owoców – 2 nowe klony: C16-1 i C16-2; odmiana standardowa – 'Burlat' na podkładce 'Gisela 5'. Doświadczenie prowadzone jest w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach na powierzchni ok. 0,1 ha. Wiosną roku 2024 wykonano obserwacje terminu i intensywności kwitnienia drzew. Latem oceniono termin dojrzewania owoców, masę plonu oraz średnią masę owoców. Jesienią oceniono siłę wzrostu drzew, wyrażoną polem poprzecznego przekroju pnia (PPPP).

W 2024 roku badane genotypy kwitły trzy dni wcześniej niż standardowa odmiana 'Burlat'. Owoce klonów C 16-1 oraz C 16-2 dojrzały w tym samym czasie, 6 dni wcześniej niż owoce odmiany 'Burlat'. Największy plon owoców zebrano z drzew klonu C 16-2. Drugi badany klon C 16-1 plonował słabiej, ale lepiej od odmiany kontrolnej. Drzewa obu badanych klonów wytwarzały większe owoce oraz słabiej rosły niż drzewa kontrolnej odmiany 'Burlat'.

Czereśnia – 1/2017 - doświadczenie z nowymi klonami hodowlanymi czereśni o wczesnym terminie dojrzewania owoców – 3 nowe klony: Cz-KD1-3-8 ('Vanda' × 'Merton Premier'), Cz-KD1-3-48 ('Drogana Żółta' × 'Walerija'), Cz-KD1-3-80 ('Vospominanie' × 'Sweetheart'); odmiana standardowa – 'Burlat' na podkładce 'Gisela 5'. Doświadczenie o powierzchni ok. 0,1 ha prowadzone jest w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach. Wiosną roku 2024 wykonano obserwacje terminu i intensywności kwitnienia drzew. Latem oceniono termin dojrzewania owoców, masę plonu oraz średnią masę owoców. Jesienią oceniono siłę wzrostu drzew, wyrażoną polem poprzecznego przekroju pnia (PPPP).

W ósmym roku po posadzeniu najwcześniej kwitły drzewa klonów Cz-KD1-3-8 i Cz-KD1-3-80. Drzewa wszystkich badanych klonów kwitły z taką samą intensywnością jak drzewa kontrolnej odmiany 'Burlat'. Owoce klonów Cz-KD1-3-8 oraz Cz-KD1-3-80 dojrzewały w tym samym terminie co owoce odmiany 'Burlat', natomiast klonu Cz-KD1-3-48 3 dni później. Drzewa klonów Cz-KD1-3-8 i Cz-KD1-3-80 wytworzyły większy plon owoców od drzew odmiany kontrolnej. Drzewa odmiany 'Burlat' wytwarzały większe owoce oraz silniej rosły od drzew badanych klonów.

Czereśnia – 2/2017 - doświadczenie odmianowo-porównawcze z nowymi klonami hodowlanymi czereśni o późnym terminie dojrzewania owoców – 7 klonów: Cz-KD1-3-23 ('Drogana Żółta' × 'Sweetheart'), Cz-KD1-3-25 ('Drogana Żółta' × 'Sweetheart'), Cz-KD1-3-51 ('Drogana Żółta' × 'Regina'), Cz-KD1-3-53 ('Drogana Żółta' × 'Regina'), Cz-KD1-3-54 ('Drogana Żółta' × 'Regina'), Cz-KD1-3-59 ('Drogana Żółta' × 'Regina'), Cz-KD1-3-62 ('Drogana Żółta' × 'Regina'), na 2 podkładkach: wegetatywna - 'Gisela 5' i generatywna – siewki czereśni ptasiej 'Alkavo'; odmiany standardowe – 'Regina' i 'Kordia'. Doświadczenie prowadzone jest w Sadzie Doświadczalnym w Dąbrowicach na powierzchni ok. 0,2 ha. Wiosną roku 2024 wykonano obserwacje terminu i intensywności kwitnienia drzew. Latem oceniono termin dojrzewania owoców, masę plonu oraz średnią masę owoców. Jesienią oceniono siłę wzrostu drzew, wyrażoną polem poprzecznego przekroju pnia (PPPP).

W siódmym roku po posadzeniu najwcześniej kwitły drzewa klonów Cz-KD1/3/62 natomiast najpóźniej drzewa klonów Cz-KD1/3/59. Wszystkie badane klony kwitły tak samo intensywnie jak obie odmiany kontrolne. Najwcześniej dojrzewały owoce odmiany kontrolnej 'Kordia' zarówno na podkładce 'Gisela 5', jak i na siewkach czereśni ptasiej. Rozpatrując średnie wartości dla dwóch podkładek drzewa badanych klonów plonowały słabiej od kontrolnej odmiany 'Kordia'. Wśród badanych klonów najlepiej owocowały klony Cz-KD1/3/23 i Cz-KD1/3/62. Zdecydowanie najslabiej plonowały drzewa klonu Cz-KD1/3/59. Największą masę miały owoce klonu Cz-KD1/3/62 oraz obu odmian kontrolnych. Na podkładce 'Gisela 5' najslabszym wzrostem, wyrażonym polem przekroju poprzecznego pnia, wykazały się drzewa odmiany kontrolnej 'Regina', a na siewkach czereśni ptasiej drzewa klonu Cz-KD1/3/25. Średnio dla podkładek, zarówno drzewa badanych klonów, jak i odmian kontrolnych rosły słabiej i znacznie lepiej owocowały na podkładce 'Gisela 5' niż na siewkach czereśni ptasiej 'Alkavo'.

Wyjazdy zagraniczne:

Udział wykonawcy – dr Anity Kuras w V European Horticultural Congress - EHC2024, Bukareszt, Rumunia, 12-16 maja 2024 r. (<https://ehc.usamv.ro>)

Na Kongresie przedstawiono poster multimedialny pt. „Wykorzystanie techniki *embryo rescue* w programie hodowli czereśni (*Prunus avium* L.) w Polsce” („Use of biotechnological methods in sweet cherry (*Prunus avium* L.) breeding at the National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland”).

Wymierne/trwałe rezultaty realizacji zadania:

W roku 2024 do Krajowego Rejestru Odmian (KR) i Księgi Ochrony Wyłącznego Prawa (KO) zgłoszono odmianę czereśni 'CELESTA'.

Wyprodukowano 1 033 nowe siewki czereśni, które jesienią posadzono w kwaterze selekcyjnej Sadu Doświadczalnego w Dąbrowicach. Po ukończeniu fazy juwenilnej możliwe będzie wykonanie oceny fenotypowej owoców, co stworzy szanse wyselekcjonowania nowych cennych genotypów o pożądanych cechach użytkowych (wysoka jakość oraz tolerancja na pęknięcie owoców).

Oceniono wzrost i owocowanie drzew nowych klonów czereśni w 3 doświadczeniach odmianowo-porównawczych.

Wykonano wstępną ocenę przydatności dwóch pożywek MS i Boxus o zmodyfikowanym składzie do hodowli niedojrzałych zarodków czereśni. Udoskonalenie hodowli embryo rescue zwiększy szansę uzyskania większej ilości siewek od form maticznych wytwarzających owoce o wczesnym terminie dojrzewania.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

W siedzibie Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, a także telefonicznie oraz e-mailowo udzielano porad i konsultacji producentom czereśni na temat nowego programu hodowli, oceny wartości produkcyjnej wytworzonych klonów hodowlanych oraz ich przydatności do uprawy towarowej w Polsce.

Prowadzono spotkania informacyjne dla producentów owoców oraz szkółkarzy zainteresowanych programem hodowli w IO - PIB.

W dniach 12-16 maja 2024 r. na kongresie europejskim (V European Horticultural Congress – EHC 2024, Bucharest, Romania), przedstawiono poster multimedialny pt. „Use of biotechnological methods in sweet cherry (*Prunus avium* L.) breeding at the National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland”. Symposium 03 – Fruit Production Systems for Sustainable and Resilient Development.

Abstrakt:

Kuras A., Szymajda M., Idczak B., Strączyńska K., Czarnecka R. 2024. Use of biotechnological methods in sweet cherry (*Prunus avium* L.) breeding at the National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland. V European Horticultural Congress – EHC 2024, Bucharest, Romania, 12-16 May 2024. S03 – Fruit Production Systems for Sustainable and Resilient Development. Book of Abstracts: 104-105,

https://ehc.usamv.ro/wp-content/uploads/2024/07/S03_Book-of-abstracts.pdf

Wykonanie miernika:

1. liczba kombinacji w wykonanym programie krzyżowań – **plan: 10, wykonanie: 10**
2. liczba wyselekcjonowanych i rozmnożonych materiałów wyjściowych o pożądanych cechach dla wykorzystania ich w dalszej hodowli – **plan: 1 genotypy, wykonanie: 1**
3. liczba prowadzonych hodowlanych doświadczeń porównawczych – **plan: 3, wykonanie: 3**
4. liczba doniesień (ustnych lub posterów) na konferencjach międzynarodowych – **plan: 1, wykonanie: 1** (pt. Use of biotechnological methods in sweet cherry (*Prunus avium* L.) breeding at the National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland)