



## Badania nad kulturami zarodków mieszańcowych porzeczki czarnej uzyskanych w wyniku krzyżowania oddalonego

Agnieszka Golis, Stanisław Pluta, Edward Żurawicz  
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

### Study on an embryo culture of black currant hybrids obtained as a result of distant hybridisation

#### Summary

The subjects of this study were embryos obtained from 22 crossing combinations in the course of distant hybridisation. No embryos were obtained from the following three interspecific hybridisations: Siewka K1 x Josta, Siewka K1 x Czereszniwa and Captivator x Josta. Seeds obtained from these combinations did not hold endosperm, but yielded watered liquid. In the remaining hybridisations, a high percentages of visible embryos increased considerably, especially at the torpedo-shaped stage. An addition of kinetin (1 mg/l) to the media had a better impact on plant regeneration from embryos than the addition of BA (0,5 mg/l). Depending on the study, up to 83,7% of exposed embryos in the media started to grow and develop under the influence of kinetin.

#### Key words:

*Ribes*, embryo culture, interspecific hybridization.

#### Adres do korespondencji

Agnieszka Golis,  
Instytut Sadownictwa  
i Kwiaciarnictwa,  
ul. Pomologiczna 18,  
96-100 Skierniewice;  
e-mail:  
agolis@insad.isk.skierniewice.pl

### 1. Wstęp

Hybrydyzacja oddalona, polegająca na krzyżowaniu oddalonych taksonomicznie roślin należących do innych gatunków, jest często wykorzystywana w hodowli twórczej w celu poszerzenia zmienności genetycznej. Potomstwo uzyskane z takich krzyżowań ma szansę dziedziczyć pożądane cechy obojga rodziców. Nie zawsze jednak jest możliwe otrzymanie z takich krzyżowań

roślin potomnych ze względu na istnienie barier krzyżowalności (1). Jednym z efektów ich występowania jest zamieranie zarodka mieszańcowego podczas embriogenezy (2).

Część z barier można pokonać stosując techniki *in vitro*. Jedną z nich jest izolowanie niedojrzałych zarodków i hodowanie ich na sztucznych pożywkach (3).

Celem badań było określenie warunków, w jakich można otrzymać mieszańce oddalone z rodzaju *Ribes* w kulturach *in vitro* oraz poznanie biologii rozwoju zarodka w poszczególnych kombinacjach krzyżowań. Określono optymalny termin izolacji zarodków, przeprowadzono obserwacje stadiów rozwojowych oraz zbadano wpływ kinetyny i BA (6-benzyloaminopuryna) na prawidłowy wzrost i rozwój zarodków.

## 2. Materiały i metody

Przedmiotem badań były potencjalne zarodki z 22 kombinacji krzyżowań z rodzaju *Ribes* (tab. 1). Kontrolę stanowiły zarodki z wewnątrzgatunkowej kombinacji Titania x Bona.

Tabela 1

Wykaz kombinacji krzyżowań oddalonych wykonanych wiosną 1999 r. przeznaczonych do izolacji zarodków

Kombinacja krzyżowań	Układ krzyżowań
Titania x Bona (kontrola)	p. (porzeczka) czarna x p. czarna
Nr 10 SCRI x Niesłuchowski	p. czarna x agrest
Ben Sarek x Niesłuchowski	p. czarna x agrest
Czereszniwa x Nr 239	p. czarna x p. czerwona
Czereszniwa x Josta	p. czarna x porzeczkoagrest
Ben Tron x Niesłuchowski	p. czarna x agrest
Siewka K1 x Josta	agrest x porzeczkoagrest
Captivator x Titania	agrest x p. czarna
Captivator x Josta	agrest x porzeczkoagrest
Captivator x <i>R. oxycanthoides</i>	agrest x dziki gatunek
Captivator x Nr 10 SCRI	agrest x p. czarna
Titania x Niesłuchowski	p. czarna x agrest
Titania x Josta	p. czarna x porzeczkoagrest
Titania x Nr 239	p. czarna x p. czerwona
Titania x <i>R. sanguineum</i>	p. czarna x dziki gatunek
Titania x <i>R. aureum</i>	p. czarna x dziki gatunek
Titania x <i>R. glaciale</i>	p. czarna x dziki gatunek
Titania x <i>R. oxycanthoides</i>	p. czarna x dziki gatunek
Titania x Captivator	p. czarna x agrest
Titania x Rodneus	p. czarna x p. czerwona
<i>R. aureum</i> x Czereszniwa	dziki gatunek x p. czarna
Siewka K1 x Czereszniwa	agrest x p. czarna

Zarodki izolowano w sześciu terminach po zapyleniu (39,44,52,60,70 i 80 dzień). W czasie izolacji prowadzono obserwacje fazy rozwoju zarodka oraz liczone nasio-



na z zarodkami w stadium torpedy. Średnio izolowano około 30 zarodków w każdym terminie i dla każdej kombinacji pożywek.

Izolowane zarodki do momentu pojawienia się pierwszego liścia wzrastały na szalkach Petriego, na stałej pożywce White'a (4) z dodatkiem 20 g/l sacharozy i 6 g/l agaru oraz w zależności od kombinacji – kinetyny (1 mg/l) lub BA (0,5 mg/l). Następnie przenoszono je na mostki bibułowe na pożywkę płynną MS (5) bez dodatku regulatorów. Kulturę prowadzono w fitotronie w temperaturze 23°C, przy oświetleniu 3000 lux i 16-godzinnym fotoperiodzie.

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1 Rozwój zarodka w poszczególnych kombinacjach krzyżowań

Przeprowadzone obserwacje wykazały duże zróżnicowanie wśród genotypów pod względem stadium rozwoju, w którym występuje zarodek (tab. 2). W standardowej krzyżówce wewnątrzgatunkowej maksymalna liczba zarodków w stadium torpedy, w którym zarodek ma największą szansę rozwoju, zachodził przed 44 dniem po zapyleniu. W krzyżowaniach międzygatunkowych etap ten pojawia się później i jest to w większości przypadków 52 dzień. Na podstawie badań prowadzonych na roślinach z rodzaju *Ribes* przez innych autorów (3) i uzyskanych przez nich wyników wykazano, że w kombinacji wewnątrzgatunkowej *Ribes nigrum* rozwój zarodka zaczyna się od 36-38 dnia i w ciągu dwóch dni przechodzi on stadium sercowate, a następnie przybiera stadium torpedy. Zarodki innych gatunków z rodzaju *Ribes* zaczynają swoje różnicowanie od 32 dnia (*R. glossularia*) do 52 dnia (*R. americanum*).

Tabela 2

Procentowy udział nasion z zarodkami w stadium torpedy

Kombinacja krzyżowań	Dzień po zapyleniu				
	39	44	52	60	70
I	2	3	4	5	6
Titania x Bona (kontrola)	39	97,6	98	98,2	98,8
Nr 10 SCRI x Niesłuchowski	0	0	59,5	92,4	92
Ben Sarek x Niesłuchowski	0	0	59,5	88,6	93,3
Czereszniwa x Nr 239	0	83,4	96,4	93,7	100
Czereszniwa x Josta	0	0	34	38	27,6
Ben Tron x Niesłuchowski	0	0	72,4	89,3	94,9
Captivator x Titania	0	0	0	6,4	41
Captivator x <i>R. oxycantoides</i>	0	0	12,5	85,8	100
Captivator x Nr 10 SCRI	0	0	0	0	29
Titania x Niesłuchowski	0	31,2	66,7	77,8	50
Titania x Josta	0	66,7	54,2	70,2	50,5
Titania x Nr 239	0	73,7	94,4	92,3	100

1	2	3	4	5	6
<i>Titania</i> x <i>R. sanguineum</i>	0	42,3	68,8	95,4	100
<i>Titania</i> x <i>R. aureum</i>	0	0	93,7	brak owoców	brak owoców
<i>Titania</i> x <i>R. glaciale</i>	0	6,5	89,9	100	92,3
<i>Titania</i> x <i>R. oxycanthoides</i>	0	89,1	68	87,5	100
<i>Titania</i> x Captivator	0	14,7	87,5	90,6	96,2
<i>Titania</i> x Rodneus	0	63,2	95,7	92,7	95,7
<i>R. aureum</i> x Czereszniwa	0	0	–	–	–

W wyniku zapyleń roślin: Siewka K1 x Josta, Captivator x Josta i Siewka K1 x Czereszniwa nie stwierdzono występowania zarodków. Nasiona były bez bielma i wypełnione wodnistym płynem.

### 3.2. Stadium zarodka a jego dalszy rozwój

Zarodki w stadium globularnym umieszczone na pożywce nie podejmowały wzrostu i nie otrzymano z nich zregenerowanych roślin. Nieliczne zarodki w stadium sercowatym również słabo regenerowały, wykazywały one oznaki podjęcia wzrostu, ale ostatecznie obumierały. Inni autorzy (6,7) podają, że hodowanie zarodków wyizolowanych we wczesnym stadium rozwojowym jest skomplikowane i mało efektywne. Największą liczbę zarodków podejmujących wzrost uzyskano w grupie stadium torpedy. Wahała się ona w zależności od kombinacji krzyżowań od 35 (*Titania* x *R. oxycanthoides*) do 77,5% (nr 10SCRI x Niestuchowski).

### 3.3. Okres izolacji zarodków

Największy procent zarodków podejmujących wzrost obserwowano w grupie izolowanych w 52 dniu po zapyleniu. Rośliny wyprowadzone z zarodków pochodzących z tego terminu charakteryzowały się szybszym wzrostem niż z terminu wcześniejszego. Procent uratowanych zarodków w grupie izolowanych po 60, 70 i 80 dniach od zapylenia malał. Prawdopodobnie zmniejszanie szans na uratowanie zarodka w tym okresie jest związane ze zmianą jego stanu fizjologicznego. Zwiększoną syntezę inhibitorów i przechodzenie nasion w stan spoczynku obserwowały w tym okresie Batygina i Vasilyeva (1987).

### 3.4. Obecność regulatorów w pożywce

po dodaniu do pożywki kinetyny (1mg/l) stadium rośliny z pierwszymi liśćmi otrzymano, w zależności od badanej kombinacji krzyżowań w 33,3 do 83,7% wyizolowanych zarodków. Przy dodatku BA (0,5 mg/l) procent uzyskanych roślin był znacz-



nie mniejszy i kształtował się od 13 do 50%. Zaobserwowano, że rośliny poddane działaniu kinetyny były wyższe niż na pożywce z dodatkiem BA.

### 3.5. Zregenerowane rośliny

Całkowicie zregenerowane i przystosowane do warunków *in vivo* rośliny otrzymano z następujących krzyżowań: Titania x Bona (48 szt.), Titania x Josta (54), Titania x Rodneus (14), Titania x *R. glaciale* (23), Titania x *R. sanguineum* (8), Titania x *R. oxycanthoides* (11), Czereszniawa x Josta (13), Ben Tron x Niesłuchowski (12), Nr 10SCRI x Niesłuchowski (5).

Tabela 3

Wpływ hormonów roślinnych na wzrost i rozwój zarodków utrzymywanych w warunkach *in vitro*

Kombinacja krzyżowań	Kinetyna (1mg/l)		BA (0,5 mg/l)	
	a	b (%)	a	b (%)
Titania x Bona	40	32 (80)	60	23 (38,3)
Nr 10SCRI x Niesłuchowski	49	41 (83,7)	54	27 (50)
Czereszniawa x Nr 239	53	40 (75,5)	43	21 (48,8)
Titania x Nr 239	47	39 (83)	25	7 (28)
Bez Tron x Niesłuchowski	64	28 (43,7)	42	8 (19)
Titania x <i>R. sanguineum</i>	33	11 (33,3)	23	3 (13)
Titania x Rodneus	24	12 (50)	69	21 (30,4)
Captivator x Titania	37	19 (51,3)	18	6 (33,3)

a – liczba wyłożonych zarodków,

b – liczba zarodków podejmujących wzrost.

## 4. Podsumowanie

1. Istnieje możliwość uzyskania zarodków mieszańcowych w obrębie rodzaju *Ribes* przy zastosowaniu techniki *in vitro*.

2. Optymalnym stadium izolacji zarodka dla rozwoju i dalszej regeneracji jest stadium torpedy a dniem do jego izolacji 52 dzień po zapyleniu.

3. Liczba zregenerowanych zarodków zależy od stosowanych hormonów, w przypadku kinetyny – 83,7%, a w przypadku BA – 48,8%.

## Literatura

1. Michalik B., (1996), Praca zbiorowa: *Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin*, red. Michalik B., Drukpol, Kraków, 36-49.
2. Zenteler M., (1990), *Plant Sci.*, 9, 267-279.
3. Stanys V., Shikshnianas T., Staniene G., (1994), *Norwegian Journal of Agricultural Science*, 9, 95-104.
4. White P. R., (1943), *A handbook of plant tissue culture*, J. Cattell., Lancaster Pa.
5. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-479.
6. Reubenbauer T., Müller H. W., (1985), *Ogólna hodowla roślin*, PWN, Warszawa 1985.
7. Batygina T. B., Vasilyeva V. E., (1987), *Botanicheskij zhurnal*, 72(2), 155-161.