

Zadanie 79

Analiza czynników warunkujących organogenezę agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro* i *in vivo* oraz ocena genetyczna i fenotypowa otrzymanego materiału.

W roku 2019 badania prowadzono w ramach 4 tematów badawczych:

Temat 1: Obserwacja roślin w doświadczeniu odmianowo-porównawczym i wykonanie oceny fenotypowej w warunkach *in vivo*.

Celem tematu były obserwacje i ocena fenotypowa roślin rozmnożonych w kulturach *in vitro* i tradycyjnie, rosnących w doświadczeniu odmianowo – porównawczym, w warunkach polowych.

Materiał do badań stanowiły młode rośliny 8 odmian i 7 klonów hodowlanych agrestu, rozmnożone w kulturach *in vitro* oraz metodą tradycyjną przez sadzonki zielne, rosnące w doświadczeniu odmianowo-porównawczym. Zdecydowana większość roślin zarówno z rozmnożenia tradycyjnego, jak również z *in vitro* była w dobrej kondycji po zimie. Pomiarów parametrów wzrostu wskazują, że silniej rosły krzewy rozmnożone *in vitro*. Większa była ich wysokość i szerokość, a przyrost wysokości i szerokości krzewów z *in vitro* był od 2,5 do 3 razy większy w porównaniu do rozmnażanych przez sadzonki zielne. Również liczba pędów mierzona jesienią w roślinach rozmnożonych *in vitro* była dwukrotnie większa w porównaniu do rozmnożonych tradycyjnie. Natomiast procent krzewów, na których pojawiły się pierwsze owoce był znacznie wyższy u roślin mnożonych tradycyjnie. Największe porażenie roślin przez mączniaka stwierdzono u odmiany ‘Biały Triumf’, niezależnie od metody rozmnażania. Wszystkie testowane genotypy wykazywały różny stopień porażenia roślin przez opadzinę liści. Niezależnie od sposobu rozmnażania, najwięcej symptomów porażenia przez *D. ribis* obserwowano na liściach odmian ‘Biały Triumf’ i ‘Hinnonmaki Rot’ oraz klonów 86 i 117.

Temat 2: Określenie wpływu mikrorozmnażania agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej i powstawanie zmienności somaklonalnej w obrębie gatunku.

Celem tematu była analiza zmienności somaklonalnej 5 genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP i przygotowanie preparatów DNA do analizy zmienności somaklonalnej kolejnych 5 genotypów agrestu.

Przeprowadzono analizę zmienności genetycznej klonów pochodzących z kultur *in vitro* pięciu odmian agrestu: ‘Captivator’, ‘Hinnonmaki Rot’, ‘Hinsel’, ‘Invicta’ i ‘Resika’. Dla każdej z odmian analizie poddano 13-15 roślin rozmnożonych *in vitro* oraz rośliny mateczne. Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wahała się od 33 do 108, średnio wynosiła 52,2. Najwyższą całkowitą liczbę produktów amplifikacji uzyskano w wyniku reakcji AFLP z DNA roślin ‘Hinnonmaki Rot’ (300), a najmniejszą w analizie roślin odmian ‘Hinsel’ i ‘Resika’ (262). Zmienność genetyczna analizowana metodą AFLP w roślinach agrestu pochodzących z kultur *in vitro* różniła się dla poszczególnych odmian i wahała się od 1,03% dla odmiany ‘Captivator’ do 10,3% w przypadku odmiany ‘Hinsel’. ‘Hinsel’ charakteryzował się szczególnie wysokim poziomem polimorfizmu w porównaniu z pozostałymi badanymi odmianami, w przypadku tej odmiany reakcje AFLP-PCR ze wszystkimi parami starterów generowały produkty polimorficzne. Dla pozostałych odmian produkty polimorficzne uzyskano w reakcji z 2-3 parami starterów.

Temat 3: Analiza polimorfizmu DNA genotypów agrestu przy użyciu techniki RAPD i ISSR.

Celem badań była analiza jednorodności genetycznej sadzonek *in vitro* i wegetatywnych 5 genotypów agrestu z zastosowaniem markerów ISSR.

Izolacja genomowego DNA z liści 5 genotypów agrestu (klony *in vitro*, sadzonki wegetatywne, rośliny mateczne) przy użyciu trzech zestawów komercyjnych DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), NucleoSpin® 96 Plant kit (Macherey-Nagel) i DNA Plant/Fungi DNA

Isolation Kit (Norgen Biotek Corp.) pozwoliła na uzyskanie DNA o stężeniu od 7,8 do 55,1 ng/ μ l (średnia wartość 20,1) i wartości współczynnika 260/280 nm od 1,61 do 2,00 (średnia wartość 1,82). W wyniku analizy ISSR-PCR z pięcioma starterami dla 5 badanych genotypów uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji, z czego 64 (2,8%) produktów było polimorficznych. Wielkości otrzymanych produktów amplifikacji wahały się w granicach 250 – 2900 pz, w zależności od użytego startera i odmiany. Zastosowane startery różniły się w ilości generowanych produktów PCR, liczba otrzymanych produktów amplifikacji w odmianie 'Invicta' wahała się od 42 dla startera 834 do 168 dla startera 849. Analiza ISSR-PCR wskazała na różny stopień polimorfizmu wśród badanych genotypów, od jego braku, w przypadku odmian 'Hinnonmaki Rot' i 'Resika', do 11,6% dla odmiany 'Hinsel'.

Temat 4: Wpływ zastosowanych warunków kultury na wydajność procesu fotosyntezy u mikrosadzonek agrestu w kulturach *in vitro* oraz warunkach szklarniowych.

Cel tematu ocena parametrów fizjologicznych oraz aktywności fotosyntetycznej pędów agrestu *in vitro* oraz *ex vitro* po zastosowaniu różnych cytokinin.

Materiałem badawczym były pędy *in vitro* oraz ukorzenione mikrosadzonki agrestu w szklarni, dwóch odmian agrestu 'Invicta' i 'Pax' oraz dwóch klonów hodowlanych: 2/33 oraz 102 po zastosowaniu cytokininy BAP oraz meta-topoliny w pożywce do namnażania kultur. Wzrost pędów *in vitro* na pożywce z BAP był mniej intensywny dla wszystkich badanych genotypów agrestu. Widoczne było żółknięcie liści i nekrozy pędów. W pędach mnożonych na pożywce z BAP poziom etylenu był wyższy dla wszystkich genotypów w porównaniu do meta-topoliny. Zaznaczył się wpływ rodzaju cytokininy na zawartość cukrów rozpuszczalnych, których poziom był wyższy w pędach mnożonych na pożywce z meta-topoliną dla wszystkich badanych genotypów agrestu. Również zaznaczył się następczy wpływ rodzaju cytokininy na zawartość chlorofilu, który był wyższy u wszystkich genotypów po pożywce z meta-topoliną. Uzyskane w badaniach wartości parametrów Fv/Fm na poziomie 0,82 dla klonu 102 i 0,81 dla odmiany 'Pax' niezależnie od rodzaju pożywki wskazują na dość wysoki potencjał fotosyntetyczny mikrosadzonek agrestu. Jedynie w odmianie 'Invicta' parametr ten wykazywał wartości niższe. Zaznaczyła się tendencja korzystnego wpływu meta-topoliny na ten wybrany parametr fizjologiczny u wszystkich genotypów.