

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 2016 badania prowadzono w ramach 4 tematów badawczych:

Temat 1: Określenie wpływu regulatora z grupy cytokinin meta-topoliny na procesy morfogenezy w kulturach *in vitro* agrestu.

Celem tematu było zbadanie wpływu różnych stężeń cytokininy meta-topoliny na mikrorozmnażanie agrestu. Materiałem badawczym były ustabilizowane kultury 15 genotypów agrestu: 8 odmian ustalonych i 7 klonów selekcyjnych hodowli IO. Badania nad wpływem meta-topoliny w trzech zastosowanych stężeniach wskazują, że we wszystkich badanych zakresach następowało namnażanie pędów agrestu. Odnotowano natomiast odmienną reakcję poszczególnych genotypów na zastosowane stężenia. Dla ośmiu z piętnastu genotypów agrestu zarówno współczynnik namnażania, jak też wysokość pędów były najwyższe przy stężeniu 0,5 mg/l meta-topoliny. Dla pięciu genotypów najbardziej korzystne było zastosowanie stężenia 1 mg/l, gdzie odnotowano największy współczynnik namnażania oraz udział pędów > 1 cm. Dla dwóch genotypów przy stężeniu 0,25 mg/l osiągnięto dobre namnażanie oraz największy udział pędów wyższych.

Temat 2: Rola hormonów roślinnych z grupy auksyn na morfogenezę i rizogenezę agrestu *in vitro*.

Celem badań było zbadanie wpływu auksyny NAA dla zapewnienia optymalnego namnażania i ukorzeniania pędów agrestu w kulturach *in vitro*. W procesie morfogenezy auksynę NAA zastosowano w stężeniach 0,1 i 0,2 mg/l oraz 0,1 mg/l IAA jako kombinację kontrolną. W procesie rizogenezy auksynę NAA zastosowano w stężeniach 0,5 mg/l i 1,0 mg/l oraz 1,0 mg/l IAA jako kontrolę. Dla większości badanych genotypów wpływ NAA na namnażanie pędów okazał się niekorzystny. Najlepszy współczynnik rozmnażania oraz liczbę pędów wyższych osiągnięto w kombinacji kontrolnej w obecności 0,1 mg/l auksyny IAA. U większości genotypów w obecności NAA zanotowano zwiększenie liczby eksplantatów nekrotycznych oraz występowanie mokrego kalusa u podstawy eksplantatów. Wpływ auksyny NAA na ukorzenianie *in vitro* dla wszystkich badanych odmian okazał się bardzo niekorzystny. Zastosowany regulator wpływał na całkowity brak lub istotnie mniejszy odsetek ukorzenionych pędów. U genotypów, których pędy ukorzeniały się w obecności NAA, nastąpiło pogorszenie jakości pędów i korzeni. U podstawy pędów wszystkich genotypów odnotowano występowanie mokrego, szarego kalusa.

Temat 3: Zbadanie potencjału regeneracyjnego agrestu z fragmentów liści, pędów, korzeni. Określenie warunków organogenezy przybyszowej agrestu w kulturach *in vitro*.

Celem tematu było sprawdzenie zdolności tego gatunku do wytwarzania pędów przybyszowych z poszczególnych organów roślinnych takich jak: liście, pędy i korzenie w warunkach kultur *in vitro* agrestu. Materiałem do badań były fragmenty pędów, korzeni oraz młode liście z ogonkami i nasadą, pochodzące z kultur *in vitro* 5 genotypów agrestu. Zbadany został wpływ dwóch pożywek w czasie indukcji regeneracji oraz dwóch pożywek na wyrastanie pędów przybyszowych. Zastosowane kombinacje pożywek powodowały bardzo duży wzrost kalusa. Obserwując fazę indukcji stwierdzono lepszą przydatność pożywki zawierającej 0,5 mg/l TDZ, eksplantaty były dłużej zielone a kalus nieco mniejszy. Tylko u klonu 2/2 na eksplantatach liściowych z nasadami, po 3 tygodniach od początku procedury regeneracji, na pożywce z BAP obserwowano zaczątki pędów przybyszowych. Szybki wzrost

szarego, mokrego kalusa spowodował jednak brak możliwości ich wyrastania. W wielu przypadkach eksplantaty liściowe z nasadami wytwarzały korzenie przybyszowe co może wskazywać na zbyt duże stężenie auksyny w pożywkach. Stwierdzono niską przydatność regeneracyjną fragmentów pędów i korzeni spowodowaną ciemnieniem i zamieraniem tych eksplantatów, szczególnie po przełożeniu na pożywki regeneracyjne. W przypadku trzech genotypów przełożenie wszystkich eksplantatów na pożywkę regeneracyjną z BAP powodowało ich masowe ciemnienie.

Temat 4: Poznanie reakcji kultur na stres niskich temperatur oraz wpływ tego czynnika na indukcję procesów rozwojowych.

Celem tematu była możliwość okresowego przechowywania kultur w warunkach niskich temperatur i zbadanie wpływu tego czynnika na zdolność przeżywania, podejmowania wzrostu i rozkrzewiania kultur po przeniesieniu do fitotronu. Miesięczne kultury in vitro agrestu wstawiono do chłodni na okres 2 i 4 miesięcy. Chłodzenie kultur in vitro agrestu w każdej z badanych temperatur oraz okresów chłodzenia powodowało zamieranie pędów. Chłodzenie przez okres 2 miesięcy wykazało podobne, zależne od genotypu tendencje, choć straty w liczbie pędów były mniejsze niż po 4 miesiącach. W pierwszym pasażu po chłodni pędy wszystkich badanych genotypów podjęły wzrost i namnażanie. Dla badanych okresów chłodzenia i zakresów temperatur u czterech odmian nastąpił wzrost współczynnika namnażania oraz zwiększyła się liczba pędów wyższych w porównaniu do kontroli. U czterech genotypów, które najgorzej zniosły okres chłodzenia, namnażanie w pierwszym pasażu było słabsze niż w warunkach kontrolnych, a także odnotowano zwiększony udział pędów zamartych. Dla dwóch genotypów agrestu chłodzenie nie miało wpływu na współczynnik namnażania pędów oraz wysokość pędów. W drugim pasażu dla sześciu z badanych genotypów nastąpiło zwiększenie współczynnika namnażania oraz udział pędów wyższych w kombinacjach po chłodzeniu, a dla dwóch namnażanie było słabsze niż w kontroli.

Prezentacja wyników na konferencjach:

III International Symposium on Horticulture in Europe – SHE 2016, Greece, 17-21 October 2016. Poster – “Factors influencing the micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia* L.” wyniki z 2015 r.

Factors influencing micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia* L).

Danuta Kucharska, Teresa Orlikowska

Research Institute of Horticulture, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland
e-mail danuta.kucharska@inhort.pl

The growing interest in the cultivation of gooseberry prompted that in the Research Institute of Horticulture, work was undertaken on development of micropropagation protocols of 15 genotypes of this species. Literature reports on micropropagation of gooseberry are few and they relate to individual genotypes, and indicate a number of difficulties what accounts this species to a group recalcitrant plants in vitro. The main problems are: lack of growth and necrosis of explants during the stabilization of cultures, no shoot proliferation or formation of dense rosettes with short shoots not available for further multiplication and rooting. In the first place an impact of type and concentration of cytokinins – kinetin, 6- benzylaminopurine (BAP) and meta-topolin was evaluated. In the result, a negative effect of kinetin and BAP was found. In all studied genotypes, meta-topolin caused an increase in the coefficient of shoots multiplication and for most genotypes a reduction or elimination of dieback that accompanied the presence of BA was observed. Under the influence of meta-topolin a significant increase in number of longer shoots that were able to proliferate as compared with BAP, was obtained. Such improvement of the quality and quantity of the gooseberry cultures using meta-topolin remained constant in the subsequent subcultures. The results indicate on the possible accumulation of BAP or its metabolites in the gooseberry tissues. This detrimental effect of BAP persisted also on the medium without any cytokinin. The other problems to overcome were yellowing of leaves or hyperhydration of shoots. Consequently, another factor studied was the kind of agar. It was stated that Gerlite used for medium solidification caused the occurrence of massive hyperhydration of explants.

Key words: gooseberry, BA, kinetin, meta-topolin

Factors influencing micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia* L).

Danuta Kucharska, Teresa Orlikowska
Research Institute of Horticulture, Skierniewice, Poland

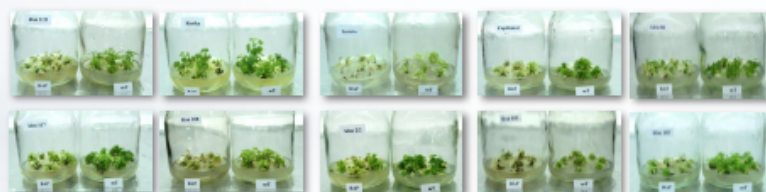
The growing interest in the cultivation of gooseberry prompted that in the Research Institute of Horticulture experiments were undertaken to develop micropropagation protocols of 15 genotypes of this species. Literature reports on micropropagation of gooseberry are few; they relate to individual genotypes and indicate on a number of difficulties, what accounts this species to a group of recalcitrant plants in vitro.



The main problems in in vitro propagation of gooseberry are:

- lack of growth and necrosis of explants during the stabilization of cultures,
- no shoot proliferation or formation of dense rosettes with short shoots not available for further multiplication and rooting,
- hyperhydration in shoot cultures of all fifteen studied genotypes

In the first place an impact of type and concentration of cytokinins - kinetin, 6-benzylaminopurine (BAP) and meta-topolin was evaluated. In the result, a negative effect of kinetin and BAP was found. In all studied genotypes, meta-topolin caused an increase in the coefficient of shoots multiplication and for most genotypes a reduction or elimination of dieback that accompanied the presence of BA was observed. Under the influence of meta-topolin a significant increase in number of longer shoots that were able to proliferate, as compared with BAP, was obtained (Figs. 1 a-j).



Figs. 1 a-j. The effect of the BAP and meta-topolin in the first subculture on shoots multiplication of some genotypes of gooseberry. In pairs: 0.1 mg/l BA on the left, 0.5 mg/l meta-topolin on the right.

Such improvement of the quality and quantity of the gooseberry cultures using meta-topolin remained constant in the subsequent subcultures. The results indicate on the possible accumulation of BAP or its metabolites in the gooseberry tissues. This detrimental effect of BAP persisted also after transfer of such explants on the medium with meta-topolin (Figs. 2 a-g, Tab. 1).



Figs. 2 a-g. Shoot cultures of gooseberry on MS medium containing 0.5 gm/l meta-topolin. In pairs: on the left 0.1 mg/l BA in the former subculture, on the right two subsequent subcultures on 0.5 mg/l meta-topolin.

In order to eliminate the hyperhydricity (Fig. 3), influence of nitrogen concentration and agar type was studied. Much better results were obtained by reducing nitrogen to 1/2 because in most genotypes the vitrification has been inhibited (Fig. 4). Replacement of Bacto agar with Gelrite resulted in the best quality of gooseberry shoots in the first subculture (Figs. 5 a-d), but in the subsequent subcultures hyperhydricity increased instantly.



Fig. 3. Vitrified shoots on the medium with full concentration of MS salts.



Fig. 4. Proliferation of cv. 'Rezika' shoots: at the top - signs of vitrification (full concentration of MS salts) at the bottom - without vitrification (MS with 1/2 nitrogen).



Figs. 5 a-d. The effect of the agar type, in presence of BAP, on the multiplication of four gooseberry genotypes.

Tab. 1. The effect of the BAP and meta-topolin in the first and second subculture on shoots multiplication of gooseberry (media: in the first subcultures 0.1 mg/l BA and 0.5 mg/l meta-topolin in the second subculture 0.5 mg/l meta-topolin).

Genotypes	Cytokinin	No. shoots/explant		% shoots > 1 cm		% necrosis of explants	
		I	II	I	II	I	II
		sub culture	sub culture	sub culture	sub culture	sub culture	sub culture
,Blaly ,Triumf'	BAP	1.5	1.8	11.8	18.2	11.1	6.2
	mT	2.1	2.8	21.5	28.6	5.6	2.0
,Captivator'	BAP	2.3	2.8	2.6	0	6.3	15.0
	mT	3.1	5.0	1.0	4.6	0	0
,Hissel'	BAP	2.8	3.1	11.3	17.8	19.9	7.4
	mT	3.7	4.1	8.5	19.0	6.0	0
,Hinnonmaki ,Rot'	BAP	1.5	1.9	10.5	13.2	13.2	9.0
	mT	2.7	3.1	5.4	16.0	2.6	0
,Invicta'	BAP	1.2	1.8	4.1	11.3	9.7	9.7
	mT	2.3	2.9	13.5	25.9	1.9	0
,Kamieniar'	BAP	0.9	1.2	6.7	8.0	8.9	7.6
	mT	1.7	2.2	0	7.4	2.2	0.6
,Pax'	BAP	1.1	1.5	0	10.3	6.0	2.8
	mT	1.7	2.7	0	15.3	0	0
,Rezika'	BAP	2.1	2.8	24.5	8.5	12.0	1.5
	mT	2.9	2.7	6.2	44.9	3.3	0
Clone 86	BAP	2.2	2.5	19.9	30.6	3.2	0
	mT	3.5	3.6	37.9	38.9	0	0
Clone 102	BAP	0.3	1.0	0	3.0	86.2	40.6
	mT	4.6	5.0	0	11.0	0	0
Clone 101	BAP	1.3	3.6	0	0	26.5	56.3
	mT	3.6	7.7	0	1.8	3.4	7.2
Clone 108	BAP	1.2	1.9	23.1	0	3.8	20.7
	mT	2.4	4.0	0.8	15.5	0	0
Clone 117	BAP	2.2	2.7	0	0	6.4	1.3
	mT	2.7	4.9	0	20.3	0	0
Clone 2/2	BAP	2.5	4.1	4.3	14.4	6.5	0
	mT	3.0	4.1	1.4	23.7	3.8	0
Clone 2/33	BAP	0.9	2.5	0	5.1	37.8	13.4
	mT	1.6	3.8	0	18.0	33.0	6.5