

**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 2018 badania prowadzono w ramach 3 tematów badawczych:

Temat 1: Założenie doświadczenia odmianowo-porównawczego i wykonanie oceny fenotypowej roślin agrestu z rozmnożenia tradycyjnego oraz z *in vitro*.

Celem tematu była ocena fenotypowa roślin agrestu rozmnożonych w kulturach *in vitro* i tradycyjnie rosnących 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 z rozmnożenia tradycyjnego jak również z *in vitro* była w bardzo dobrej kondycji po zimie. Tylko pojedyncze rośliny doznały lekkich uszkodzeń mrozowych. U dwóch sadzonek *in vitro*, z klonów 86 i 108 zaobserwowano silne uszkodzenia mrozowe. Obserwacje siły wzrostu, pokroju oraz tworzenia nowych pędów wskazują, że najsilniej rosnącą odmianą był 'Captivator' oraz klony hodowlane. Rośliny rozmnożone *in vitro* wykazywały bardziej rozłożysty pokrój oraz większą szerokość w porównaniu do roślin rozmnożonych z sadzonek zielnych. Wstępne wyniki pokazują, że największe porażenie roślin przez mączniaka stwierdzono u odmiany 'Biały Triumf', niezależnie od metody rozmnażania. Na młodych roślinach pozostałych genotypów nie stwierdzono objawów tej choroby. Wszystkie testowane genotypy agrestu wykazywały różny stopień porażenia roślin przez opadzinę liści. Niezależnie od metody rozmnażania, najwięcej symptomów porażenia obserwowano na liściach odmian 'Biały Triumf' i 'Hinonmaki 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 badawczego była optymalizacja techniki izolacji genomowego DNA agrestu z liści roślin matecznych oraz pochodzących z kultur *in vitro*.

Badania prowadzono na 5 odmianach agrestu: 'Captivator', 'Hinonmaki Rot', 'Hinsel', 'Invicta' i 'Resika'. Liście do badań molekularnych pobierano zarówno z roślin matecznych jak i z roślin rozmnożonych *in vitro*. Porównano skuteczność izolacji DNA z liści agrestu z wykorzystaniem dwóch komercyjnych zestawów do izolacji DNA z tkanek roślinnych: DNeasy Plant Mini Kit® (Promega) oraz NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel). Do optymalizacji techniki izolacji DNA użyto liści pobranych z roślin macierzystych agrestu. Uzyskane preparaty DNA analizowano przez elektroforezę w żelu agarozowym oraz przy użyciu spektrofotometru Epoch (BioTek). Wyniki pomiarów spektrofotometrycznych posłużyły do obliczenia stężenia genomowego DNA w poszczególnych preparatach oraz do oceny czystości preparatów. Przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit® przeprowadzono izolację genomowego DNA z 71 roślin agrestu rozmnożonych metodą *in vitro*. Stężenie DNA w preparatach oraz ich czystość analizowano spektrofotometrycznie. Uzyskane preparaty zostaną wykorzystane do oceny wpływu mikrorozmnażania na zachowanie jednorodności genetycznej agrestu z wykorzystaniem techniki AFLP. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że wszystkie sprawdzone metody izolacji DNA z liści agrestu pozwoliły na uzyskanie preparatów DNA przydatnych do dalszej analizy techniką AFLP. Spośród przetestowanych zestawów do izolacji genomowego DNA najbardziej efektywny jest zestaw NucleoSpin Plant II, metoda izolacji z buforem PL1. Wydajność izolacji genomowego DNA z liści agrestu była uzależniona od odmiany.

### Temat 3: Analiza polimorfizmu DNA genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP.

Celem badań była analiza polimorfizmu DNA 15 genotypów agrestu techniką AFLP z zastosowaniem 6 kombinacji starterów w różnicujących reakcjach amplifikacji.

Izolację genomowego DNA wykonano w dwóch powtórzeniach, jedną z użyciem DNeasy Plant Mini Kit®, drugą z zestawem NucleoSpin Plant II, metodą z buforem ekstrakcyjnym PL1. Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych obliczono stężenie genomowego DNA oraz oceniono czystość preparatów. Analizę AFLP polimorfizmu DNA prowadzono według w dwóch powtórzeniach. Preparaty DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi MseI oraz PstI, do uzyskanych fragmentów restrykcyjnych przyłączano adaptory o znanej sekwencji. Uzyskane fragmenty DNA poddano wstępnej amplifikacji z użyciem starterów komplementarnych do sekwencji adapterowych. Do reakcji różnicowego PCR wytypowano 6 par starterów: Pst-AT/Mse-CG, Pst-CA/Mse-TG, Pst-GT/Mse-AC, Pst-TA/Mse-GA, Pst-AG/Mse-CT i Pst-TC/Mse-AG. Produkty amplifikacji rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym i wybarwiano z użyciem azotanu srebra. Żele dokumentowano w celu analizy prążków AFLP. Oceniano liczbę uzyskanych produktów AFLP-PCR i ich zróżnicowanie pomiędzy genotypami agrestu oraz obliczono procent polimorficznych produktów PCR. Preparaty DNA uzyskane obydwoma zestawami do izolacji genomowego DNA: DNeasy Plant Mini Kit® i NucleoSpin Plant II są odpowiednie do analizy techniką AFLP. Polimorfizm DNA pomiędzy piętnastoma genotypami agrestu oceniony na podstawie analizy AFLP z sześcioma parami starterów wyniósł 30,7%. Wszystkie testowane pary starterów AFLP generowały polimorficzne produkty w reakcji różnicowej amplifikacji, co potwierdza skuteczność techniki AFLP w uzyskaniu markerów pozwalających na identyfikację genotypów.