

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 2020 badania prowadzono w ramach 3 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. Rok 2020 to trzeci sezon wegetacyjny dla ocenianych krzewów agrestu. Wszystkie parametry wzrostu i owocowania były większe dla krzewów rozmnażanych *in vitro*. Średnia wysokość krzewów z *in vitro* wynosiła 54,1 cm a rozmnożonych tradycyjnie 45,1 cm, szerokość odpowiednio: 67,0 cm do 53,5 cm, a liczba pędów 32,4 do 20,6. Dynamika przyrostu poszczególnych parametrów w roku 2020 była różna w porównaniu do sezonu 2019. Wtedy przyrost wysokości i szerokości dla krzewów z *in vitro* wynosił 12,9 cm i 14,0 cm, a dla rozmnożonych tradycyjnie odpowiednio 5,2 cm i 4,8 cm. W sezonie 2020 przyrosty wysokości i szerokości dla dwóch sposobów rozmnażania były na podobnym poziomie, natomiast największa dynamika wzrostu dotyczyła liczby pędów. W roku 2019 przyrost liczby pędów dla krzewów z *in vitro* wynosił 1,4 a dla roślin rozmnażanych tradycyjnie 1,8, w sezonie 2020 odpowiednio 18,7 i 13,8. W roku 2020 po raz pierwszy z każdego poletka zbierano owoce. Suma plonów z 3 poletek każdego genotypu wskazuje, że w przypadku 13 genotypów wyższe plony uzyskano z roślin rozmnażanych *in vitro*, u pozostałych 2 genotypów wyższy był plon z roślin rozmnażanych tradycyjnie. Najlepiej plonującą odmianą, niezależnie od sposobu rozmnażania był ‘Hinomaki Rot’

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, najczęściej symptomów porażenia przez *D. ribis* obserwowano na liściach odmian ‘Biały Triumf’ i ‘Hinomaki 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. Przeprowadzono analizę zmienności genetycznej klonów pochodzących z kultur *in vitro* odmian ‘Kamieniar’ i ‘Pax’ i klonów hodowlanych AGR 101, AGR 108, AGR 117 agrestu. Dla każdego z odmian analizie poddano 14-15 klonów rozmnożonych *in vitro* oraz rośliny mateczne.

Liczba produktów generowanych przez zastosowane w analizie pary starterów AFLP wahała się od 25 do 79, średnio wynosiła 47,96. Całkowita liczba produktów amplifikacji dla poszczególnych genotypów wynosiła: ‘Kamieniar’-268, ‘Pax’-204, AGR 101-236, AGR 108-265 i AGR 117-226. Zmienność genetyczna analizowana metodą AFLP w roślinach agrestu pochodzących z kultur *in vitro* różniła się dla poszczególnych odmian i wahała się od 0,74% dla odmiany ‘Kamieniar’ do 18,49% w przypadku klonu AGR 108. AGR 101 i AGR 108 charakteryzowały się znacznie wyższym poziomem polimorfizmu w porównaniu z pozostałymi genotypami.

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

Celem badań była analiza polimorfizmu 15 genotypów agrestu techniką AFLP z zastosowaniem 6 kombinacji starterów, opracowanie macierzy podobieństwa genetycznego i drzewa filogenetycznego badanych genotypów.

Stężenie genomowego DNA w preparatach uzyskanych z liści roślin matecznych 15 genotypów agrestu wahało się od 19,9 do 93,0 ng/μl, natomiast współczynnik 260/280 nm wynosił od 1,78 do 1,84. Łącznie w wyniku analizy AFLP 15 genotypów agrestu z pięcioma kombinacjami starterów uzyskano 333 markery AFLP, z czego 126 było polimorficznych. Największy procent polimorficznych produktów uzyskano w wyniku reakcji z zastosowaniem starterów Pst-GA/Mse-TC, a najmniej produktów w reakcji ze starterami Pst-AC/Mse-GT.

Uzyskane wyniki analizy AFLP umożliwiły opracowanie unikalnych profili prążkowych dla każdego z 15 genotypów agrestu, pozwalających na ich identyfikację oraz umożliwiły obliczenie wartości podobieństwa genetycznego między genotypami. Wartości podobieństwa genetycznego analizowanych odmian agrestu wahały się od 0,870 (pomiędzy odmianą 'Hinnonmaki Rot' i klonem AGR 117) do 0,978 (AGR 86 vs AGR 2/33) i średnio wynosiło 0,923. Drzewo filogenetyczne 15 genotypów agrestu zostało skonstruowane w oparciu o opracowaną macierz podobieństwa genetycznego z zastosowaniem analizy skupień metodą UPGMA. Na dendrogramie wyodrębniono 2 główne grupy skupień, jedną obejmującą 6 genotypów: AGR 2/33, AGR 86, 'Kamieniar', AGR 108, AGR 2/2 i 'Resika', a drugą składającą się z 5 genotypów: 'Pax', 'Biały Triumf', 'Invicta', AGR 101 i AGR 102 oraz 1 mniejszą, skupiającą odmiany 'Hinsel' i 'Hinnonmaki Rot'. Genotypy AGR 117 i 'Captivator' nie tworzą skupień z żadną z grup.

Podsumowanie badań prowadzonych w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w latach 2014-2020 – zadanie 79.

1. Cele prowadzonych badań

- Określenie czynników warunkujących inicjację i stabilizację kultur *in vitro* oraz czystość mikrobiologiczną 15 genotypów agrestu.
- Analiza wpływu poszczególnych składników pożywki na proces namnażania, ukorzeniania i aklimatyzacji *in vitro* 15 genotypów agrestu.
- Zbadanie potencjału regeneracji przybyszowej *in vitro* z fragmentów liści, pędów i korzeni 5 genotypów agrestu.
- Poznanie reakcji pędów w kulturach *in vitro* na okresowe przechowywanie w niskich temperaturach oraz wpływ tego czynnika na indukcję procesów rozwojowych 10 genotypów agrestu.
- Ocena fenotypowa i genetyczna roślin 15 genotypów agrestu, rozmnożonych *in vitro* oraz przez sadzonki zielne, w warunkach doświadczenia polowego.
- Określenie wpływu mikrorozmnażania agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej i powstawanie zmienności somaklonalnej 10 genotypów agrestu techniką AFLP.
- Analiza polimorfizmu DNA 15 genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP i ISSR-PCR.

2. Wnioski z prowadzonych badań

- W obecności *meta*-topoliny uzyskano najwyższy współczynnik namnażania oraz udział pędów wyższych; nastąpiło także całkowite ograniczenie nekrozy pędów, występujące w obecności BAP.
- Ukorzenianie *in vitro* i aklimatyzacja mikrosadzonek agrestu jest efektywna i wynosi ponad 90%.

- Kultury agrestu przechowywane 6 miesięcy w temperaturze 2°C były lepszej jakości niż przechowywane w 4°C.
- Parametry wzrostu i owocowania krzewów agrestu w doświadczeniu polowym, po trzech sezonach wegetacyjnych były większe dla krzewów rozmnażanych *in vitro*.
- Potwierdzono skuteczność techniki AFLP w detekcji zmienności somaklonalnej agrestu, generowanej w kulturach *in vitro* oraz w badaniach zróżnicowania genetycznego pomiędzy genotypami agrestu.
- Potwierdzono skuteczność techniki ISSR w uzyskaniu markerów identyfikacji genotypów oraz w detekcji polimorfizmu DNA agrestu.
- Współczynniki podobieństwa genetycznego uzyskane na podstawie analizy markerów AFLP wskazują na małe zróżnicowanie genetyczne analizowanych genotypów agrestu.

3. Osiągnięcia projektu

- Opracowano kompleksową procedurę mikrorozmnażania 15 genotypów agrestu.
- Wykazano, iż przełomowym czynnikiem w rozmnażaniu agrestu *in vitro* było zastosowanie meta-topoliny.
- Potwierdzono możliwość długotrwałego przechowywania kultur agrestu w temperaturze 2°C oraz pozytywny wpływ tego czynnika na namnażanie pędów.
- W doświadczeniu polowym prowadzono pionierskie obserwacje roślin *in vitro* oraz z sadzonek zielnych 15 genotypów agrestu.
- Potwierdzono skuteczność technik AFLP oraz ISSR w detekcji zmienności somaklonalnej i polimorfizmu DNA oraz w uzyskaniu markerów identyfikacji genotypów agrestu.
- Wyniki publikowano w postaci: 2 doniesień na konferencje zagraniczne, 7 doniesień na konferencje krajowe oraz w 6 oryginalnych publikacjach.