

DANUTA KUCHARSKA

DANUTA WÓJCIK

STANISŁAW PLUTA

ŁUKASZ SELIGA

LUCYNA OGÓREK

BARBARA WIOSNA

STANISŁAW BODEK

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Kierownik Tematu: dr inż. Danuta Kucharska Instytut Ogrodnictwa, Zakład Biologii Stosowanej

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3 96-100 Skierniewice; tel. 46 8345506 lub 46 8345532

e-mail: danuta.kucharska@inhort.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.20.2018, Zadanie nr 79.

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

The analysis of factors determining *in vitro* and *in vivo* organogenesis of gooseberry (*Ribes grossularia* L.), genetic and phenotypic assessment of obtained material

Słowa kluczowe: agrest, DNA, kultury *in vitro*, organogeneza, polimorfizm

TEMAT BADAWCZY 1

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

Cel

Ocena fenotypowa roślin agrestu rozmnożonych w kulturach *in vitro* i tradycyjnie rosnących w warunkach polowych.

Opis wyników

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 'Hinonnmaki Rot' oraz klonów 86 i 117.

Wnioski

- Odmiana 'Captivator' oraz klony hodowlane w obu metodach rozmnażania wykazywały największą siłę wzrostu.
- Rośliny rozmnożone *in vitro* w porównaniu do roślin rozmnożonych z sadzonek zielnych charakteryzowały się bardziej rozłożystym pokrojem oraz większą szerokością.
- Odmiana 'Biały Triumf', niezależnie od metody rozmnażania, wykazywała największą wrażliwość na amerykańskiego mączniaka agrestu, a genotypy 'Biały Triumf', 'Hinonnmaki Rot' oraz klony 86 i 117 wykazywały najwięcej symptomów porażenia przez antraknozę liści niezależnie od metody rozmnażania.

TEMAT BADAWCZY 2

Określenie wpływu mikrorozmnażania agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej i powstawanie zmienności somaklonalnej w obrębie gatunku

Cel

Optymalizacja techniki izolacji genomowego DNA agrestu z liści roślin matecznych oraz pochodzących z kultur *in vitro*.

Opis wyników

Badania prowadzono na 5 odmianach agrestu: 'Captivator', 'Hinonnmaki Rot', 'Hinsel', 'Invicta' i 'Resika'. Porównano skuteczność izolacji DNA zestawami: DNeasy Plant Mini Kit® oraz NucleoSpin Plant II. Preparaty DNA analizowano elektroforetycznie w żelu oraz spektrofotometrycznie do obliczenia stężenia genomowego DNA w poszczególnych preparatach oraz oceny czystości. Zestawem DNeasy Plant Mini Kit® przeprowadzono izolację DNA z 71 roślin z *in vitro*. Stężenie genomowego DNA wahało się od 8,70 do 49,2 ng/μl, natomiast współczynnik 260/280 nm wynosił od 1,74 do 1,99. Zaobserwowano różnicę w wydajności izolacji genomowego DNA pomiędzy poszczególnymi genotypami. Najwyższe stężenia genomowego DNA uzyskano w preparatach wyizolowanych z odmian 'Invicta' i 'Captivator' odpowiednio 31,9 i 30,7 ng/μl, niższe stężenia uzyskano z odmiany 'Resika' i 'Hinsel' 26,4

i 24,5 ng/μl, najniższą zawartość DNA miały preparaty odmiany 'Hinnonmaki Rot' 16,1 ng/μl. Najwyższe stężenie DNA uzyskano stosując zestaw NucleoSpin Plant II z użyciem buforu PL1 (średnio 44,5 ng/μl), natomiast izolacja przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit[®] dała najniższe zawartości DNA średnio 28,6 ng/μl. Współczynnik 260/280 nm dla preparatów izolowanych zestawem DNeasy Plant Mini Kit[®] wynosił od 1,76 do 1,84, wyższe wartości współczynnika uzyskano zestawem NucleoSpin Plant II: od 1,83 do 1,90 w izolacji z buforem PL1 oraz od 1,85 do 1,92 w preparatach izolowanych buforem PL2.

Wnioski

- Sprawdzone metody izolacji DNA pozwoliły na uzyskanie preparatów DNA przydatnych do dalszej analizy techniką AFLP.
- Do izolacji genomowego DNA agrestu najbardziej efektywny jest zestaw NucleoSpin Plant II, metoda z buforem PL1.
- Wydajność izolacji genomowego DNA była uzależniona od odmiany.

TEMAT BADAWCZY 3

Analiza polimorfizmu DNA genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP

Cel

Analiza polimorfizmu DNA 15 genotypów agrestu techniką AFLP z zastosowaniem 6 kombinacji starterów w różnicujących reakcjach amplifikacji.

Opis wyników

Badania prowadzono na 15 genotypach agrestu. Izolację genomowego DNA wykonano z użyciem DNeasy Plant Mini Kit[®] oraz z zestawem NucleoSpin Plant II z buforem ekstrakcyjnym PL1. Spektrofotometrycznie obliczono stężenie genomowego DNA oraz oceniono czystość preparatów. Analizę AFLP polimorfizmu DNA prowadzono według Zabeau i Vos (1993). Preparaty DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi MseI oraz PstI. Do fragmentów restrykcyjnych przyłączano adaptery o znanej sekwencji. 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 rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym i wybarwiano azotanem srebra. Oceniano liczbę produktów AFLP-PCR ich zróżnicowanie pomiędzy genotypami oraz polimorfizm produktów PCR. W analizie AFLP z sześcioma parami starterów uzyskano 283 produkty amplifikacji, z czego 87 (30,7%) było polimorficznych. Testowane pary starterów AFLP generowały polimorficzne produkty amplifikacji w reakcji różnicowej PCR. Testowane pary starterów różniły się w ilości generowanych produktów PCR, których liczba wahała się od 22 dla pary starterów Pst-TC/Mse-AG do 91 ze starterami Pst-AG/Mse-CT.

Wnioski

- Preparaty DNA uzyskane zestawami do izolacji 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.

LITERATURA

Zabeau M., Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7, Publication number 0 534 858 A1.