

RAPORT Z BADAŃ

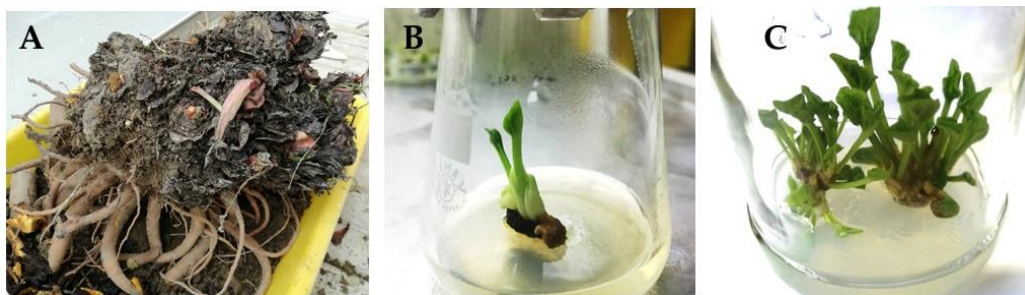
Celem Grupy Operacyjnej EPI Bio-Food Roztocze było opracowanie i wdrożenie technologii produkcji *in vitro* wysokiej jakości materiału nasadzeniowego rabarbaru o czerwonych ogonkach pozwalające na wzrost rentowności plantacji, poszerzenie rynków zbytu i rozwoju eksportu.

W Instytucie Ogrodnictwa – Państwowym Instytucie Badawczych prowadzone były badania, których celem było opracowanie technologii produkcji *in vitro* umożliwiającej całoroczną, sterowaną produkcję sadzonek rabarbaru o wysokiej zdrowotności, kondycji fizjologicznej i poziomie substancji fenolowych. Materiałem badawczym były wyselekcjonowane rośliny rabarbaru ‘Malinowy’ (wyróżniające się wielkością ogonków liściowych i wysokim poziomem antocyjanów zarówno w skórce jak i mięszu), pochodzące z plantacji na Podkarpaciu. Badania prowadzono w laboratorium *in vitro* i fitotronach Zakładu Biologii Stosowanej oraz w obiekcie szklarniowych z kontrolowanym klimatem.

OMÓWIENIE OTRZYMANYCH WYNIKÓW

1. Określenie czynników wpływających na aktywność pąków wegetatywnych na etapie inicjacji kultur i namnażania pędów rabarbaru ‘Malinowy’

W celu zapewnienia wysokiej jakości sadzonek, rośliny mateczne rabarbaru ‘Malinowy’ zostały poddane testom na obecność 8 wirusów: mozaiki tytoniu (TMV), mozaiki gęsiówki (ArMV), mozaiki ogórka (CMV), liściozwoju czereśni (CLRV), pierścieniowej plamistości tytoniu (TRSV), pierścieniowej plamistości pomidora (ToRSV), czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (TBRV) i utajonego wirusa pierścieniowej plamistości truskawki (SLRV). Wyniki analiz DAS-ELISA przy użyciu specyficznych przeciwciał poliklonalnych nie wykazały obecności wirusów. Kultury pędowe rabarbaru zostały zainicjowane z pąków wierzchołkowych i kątowych, znajdujących się u nasady liści a także na zgrubiałych korzeniach 8-letnich karp w fazie spoczynku. Na etapie indukcji i stabilizacji kultur pędów oceniano wpływ różnego poziomu soli azotowych (75%, 100%) wg pożywki Murashige i Skooga (1962) oraz benzyloaminopuryny (BAP; 0,0 i 4,4 μM) podanej łącznie z kwasem giberelinowym (GA_3 ; 0,3 μM) lub kwasem naftylo-1-octowym (NAA; 0,1 μM). Rozwój pojedynczych pędów z pąków wegetatywnych rabarbaru uzyskano na wszystkich pożywkach zawierających regulatory wzrostu. Jednak w kolejnych dwóch pasażach prowadzonych w cyklu 3-tygodniowym zdolność do tworzenia nowych pędów wykazywały tylko kultury rosnące na pożywce zawierającej BAP i GA_3 (Fot. 1). Obecność auksyny wpływała na starzenie pędów, natomiast wysoki poziom azotu w pożywce MS indukował szklistość.



Fot. 1. Inicjacja i stabilizacja kultur *in vitro* rabarbaru ‘Malinowy’; **A** – 8-letnie rośliny mateczne w fazie spoczynku; **B** – pęd inicjalny po 3 tygodniach wzrostu *in vitro*; **C** – ustabilizowane kultury pędów (fot. A. Wojtania)

Na etapie namnażania pędów *in vitro* oceniano wpływ dwóch cytokinin - BAP i meta-topoliny (4,4; 6,6 i 12,4 μ M) oraz ich współdziałanie z sacharozą (59; 73; 88; 117 i 175 mM). Wykazano przydatność obydwu cytokinin w procesie tworzenie pędów rabarbaru 'Malinowy', jednak efekt ich działania znacząco zależał od poziomu sacharozy w pożywce. Najwyższy współczynnik namnażania pędów rabarbaru (4,8-4,9 pędów/eksplantat) obserwowano na pożywce o najniższym poziomie sacharozy (59 mM) (Tab. 1, Fot. 2). Wzrastające stężenie sacharozy (59-175 mM) w pożywce z cytokininą hamowało tworzenie pędów i liści, wpływało na zmianę morfologii w kierunku formowanie pędów dojrzałych, stymulowało tworzenie antocyjanów w ogonkach liściowych i tworzenie tkanki kalusowej u podstawy pędów. Pędy rosnące na pożywce zawierającej BAP i sacharozę w stężeniu 175 mM cechowały się tendencją do żółknięcia liści i tworzenia zgrubiałych podstaw pędów, co mogło wskazywać na indukcję spoczynku. W obecności mT nie obserwowano objawów starzenia. Z drugiej strony, pędy cyklicznie mnożone na pożywce zawierającej najniższe stężenie sacharozy cechowały się drobnieniem, jasną zielenią liści i tendencją do szklistości, szczególnie pod wpływem mT. Obserwacje te pozwoliły na wnioskowanie, iż cykliczne mnożenie pędów rabarbaru o wysokiej jakości może odbywać się z zastosowaniem obydwu cytokinin, ale wymagane jest zróżnicowane stężenie sacharozy, wynoszące kolejno dla BAP i mT - 73 i 88 mM.

Tabela 1. Wpływ rodzaju cytokinin (BAP, *meta*-topolina) i stężenia sacharozy na tworzenie pędów, świeżą masę pędów, liczbę i długość liści rabarbaru 'Malinowy' posażowanych w cyklu 4-tygodniowym.

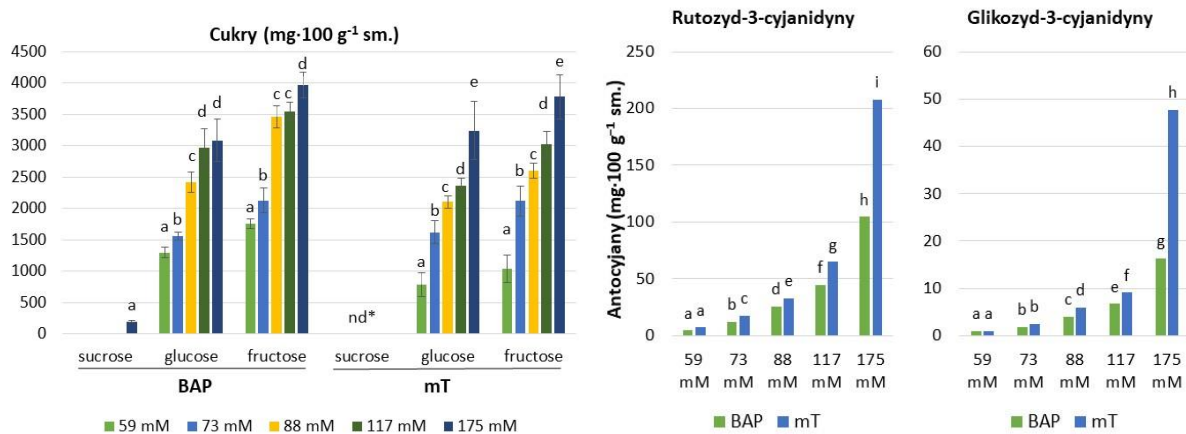
Rodzaj cytokinin	Stężenie sacharozy (mM)	Świeża masa (g)			Liczba pędów	Długość pędów (mm)	Liczba liści/wieloroślinkę
		Wieloroślinka	Kalus	Pojedyncze pędy			
BAP	59	1.90 bc	0.170 a	0.395 a	4.8 e	31.6 a	25.1 d
	73	2.37 cd	0.162 a	0.566 b-c	4.3 de	37.5 bc	21.5 d
	88	1.68 ab	0.261 a-c	0.586 bc	3.1 bc	38.5 bc	16.9 c
	117	1.28 a	0.362 b-d	0.653 c-d	2.2 ab	42.4 cd	11.5 b
	175	1.41 a	0.532 e	0.907 e	1.5 a	49.0 e	8.9 ab
mT	59	2.51 d	0.256 a-c	0.446 ab	4.9 e	30.9 a	32.1 e
	73	2.31 d	0.237 ab	0.522 a-c	4.7 e	36.6 b	24.6 d
	88	1.61 ab	0.423 de	0.494 a-c	3.7 cd	40.1 b-d	12.7 b
	117	1.31 a	0.402 c-e	0.576 b-c	2.3 ab	38.9 bc	11.7 b
	175	1.28 a	0.430 de	0.768 de	1.7 a	44.8 de	6.9 a



Fot. 2. Namnażone pędy rabarbaru *in vitro* (fot. A. Wojtania)

W celu oceny kondycji fizjologicznej pędów zostały wykonane pomiary ilościowej i jakościowej zawartości cukrów rozpuszczalnych i antocyjanów w ogonkach liściowych rabarbaru. Analizy te wykazały, iż obserwowane różnice w organogenezie pędów w obecności mT i BAP wynikały ze zróżnicowanego oddziaływania cytokinin na metabolizm pierwotny i wtórny. Pędy rabarbaru będące

w fazie aktywnego wzrostu gromadziły mniej cukrów rozpuszczalnych (glukozy i fruktozy) i antocyjanów (główne rutozydu-3-cyjanidyny) w porównaniu z pędami wykazującymi objawy spoczynku (Wykres 1). zahamowanie tworzenia pędów i liści oraz ich stopniowe zasychanie). Na akumulację cukrów rozpuszczalnych istotny wpływ miał wzrastający poziom sacharozy w pożywce i rodzaj cytokininy. Pędy rabarbaru rosnące na pożywce z mT zawierały mniej cukrów niż w obecności BAP, szczególnie przy niższych stężeniach sacharozy, co było zbieżne z wyższym współczynnikiem rozmnażania, ale też skłonnością do nadmiernego uwodnienia pędów. W obecności wysokiego stężenia sacharozy, pędy rabarbaru zawierały podobną ilość cukrów rozpuszczalnych, ale w zależności od zastosowanej cytokininy znacząco różniły się morfologią i poziomem antocyjanów. Dwukrotnie wyższy poziom antocyjanów i brak objawów starzenia pędów w obecności mT pozwoliły na wnioskowanie o zaindukowanych reakcjach obronnych w odpowiedzi na wzrastające stężenie sacharozy w pożywce. Potwierdziły to analizy endogennych fitohormonów, które wykazały wysoką zawartość kwasu salicylowego (SA) w pędach rosnących w obecności meta-topoliny. Indukcja antocyjanów *in vitro* w obecności mT i wysokiego stężenia sacharozy może być wykorzystana w dalszych badaniach do wczesnego fenotypowania roślin rabarbaru pod kątem produkcji substancji bioaktywnych.



Wykres 1. Zawartość cukrów rozpuszczalnych i antocyjanów w pędach rabarbaru 'Malinowy' po 4 tygodniach wzrostu na pożywce zawierającej różne cytokininy: BAP (6.6 µM) i mT (12.4 µM) i stężenie sacharozy (59; 73; 88; 117 and 175 mM); * – nie stwierdzono (not detectable).

2. Ocena zdolności pędów rabarbaru 'Malinowy' do tworzenia korzeni *in vitro* i *ex vitro* oraz następczy wpływ metody ukorzenia na aklimatyzację pędów w warunkach *ex vitro*

W kolejnym doświadczeniu oceniano zdolność pędów rabarbaru 'Malinowy' do tworzenia korzeni *in vitro* i *ex vitro*. Kultury pędów przeznaczone do ukorzenia były przenoszone na pożywkę zawierającą 4,1 µM mT. Do ukorzenia wybierano pędy dobrze wykształcone, o długości ok. 4 cm. W warunkach *in vitro*, oceniano wpływ różnych stężeń kwasu indolo-3-masłowego (0,49-4,9 µM). Indukcja korzeni następowała po 1-2 tygodniach i była stymulowana przez auksynę. Na pożywce kontrolnej (bez auksyny), tworzenie pojedynczych korzeni obserwowano u 40% pędów. Zastosowanie IBA w najwyższym stężeniu wpłynęło na ponad dwukrotny wzrost liczby ukorzenionych pędów i pięciokrotny wzrost liczby korzeni na pędzie (Tab. 2).

Tabela 2. Wpływ stężenia IBA na ukorzenie pędów rabarbaru in vitro.

Traktowania	Stężenie (μM)	% ukorzenionych pędów	Liczba korzeni/pęd	Długość korzeni (mm)	Długość pędów (mm)
Control	0.0	40.0 a	2.1 a	29.2 b	75.2 a
IBA	0.49	55.9 b	2.5 a	28.8 b	72.0 a
	2.5	82.0 c	2.6 a	30.3 b	77.8 a
	4.9	94.9 d	10.7 b	13.84 a	78.5 a



Fot. 3. Ukorzenione pędy rabarbaru in vitro (fot. A. Wojtania)

Następnie oceniano możliwość ukorzenia pędów ex vitro, przy zastosowaniu handlowego preparatu stymulującego ukorzenie Rhizopon AA (0,5% IBA), z równoczesną aklimatyzacją prowadzoną w kontrolowanych warunkach (wysoka wilgotność, $25\pm 2^\circ\text{C}$; PPFD— $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) w fitotronie. Po 4 tygodniach, porównywano efektywność aklimatyzacji oraz wzrost i rozwój części nadziemnej i korzeniowej sadzonek ukorzenianych in vitro i ex vitro przy zastosowaniu 3 stopniowej skali (1 - brak korzeni lub pojedyncze krótkie korzenie, 2 – słabe przekorzenie, 3 - dobrze rozwinięty system korzeniowy) (Fot. 3).



Fot. 3. Ocena rozwoju systemu korzeniowego mikrosadzonek rabarbaru wg 3-stopniowej skali (fot. A. Wojtania)

Zdecydowanie wyższą efektywność aklimatyzacji i jakość mikrosadzonek rabarbaru uzyskano w przypadku zastosowania pędów ukorzenionych in vitro (Tab. 3). Pomimo możliwości obniżenia kosztów i skrócenia cyklu produkcji sadzonek poprzez równoczesne ukorzenie ex vitro i aklimatyzację, metoda ta okazała się nieskuteczna podczas mikrorozmnażania rabarbaru 'Malinowy'. Pędy traktowane preparatem Rhizopon AA w warunkach ex vitro potrzebowały znacznie dłuższego czasu do zainicjowania i rozwoju korzeni (7-8 tygodni). Skutkowało to niższą efektywnością aklimatyzacji (83%), a także niższą jakością mikrosadzonek.

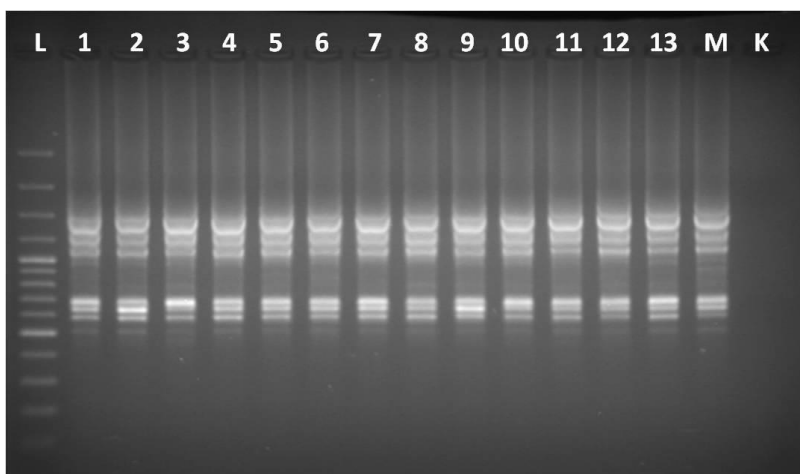
Tabela 3. Wpływ rodzaju pędu (ukorzeniony i nie ukorzeniony in vitro) na przeżywalność, wzrost pędu i rozwój korzeni po 4 tygodniach wzrostu ex vitro w fitotronie.

Rodzaj mikropędu	Przeżywalność pędów (%)*	Długość sadzonki (mm)	Współczynnik ukorzenia**	Aklimatyzacja po 4 tygodniach	Czas aklimatyzacji (tygodnie)
Nieukorzeniony	83	72.8 a	1.9 a	no	7-8
Ukorzeniony	100	107.8 b	2.9 b	yes	4

*po 8 tygodniach wzrostu ex vitro; ** wg 3-stopniowej skali

3. Analiza molekularna sadzonek rabarbaru rozmnożonych *in vitro*

W celu zapewnienia wysokiej jakości sadzonek rabarbaru została przeprowadzona ocena stabilności genetycznej roślin rozmnożonych *in vitro*. Materiał do analiz pobrano z losowo wytypowanych roślin rozmnożonych *in vitro* oraz z roślin matecznych. Genomowy DNA izolowano w dwóch powtórzeniach przy użyciu komercyjnego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta. Przygotowane preparaty genomowego DNA stanowiły matrycę do przeprowadzenia reakcji PCR ze starterami ISSR. We wstępnych reakcjach PCR przetestowano 15 starterów ISSR, 12 spośród nich (810, 823, 825, 827, 830, 834, 840, 848, 849, 853, 855 i 858) generowało produkty PCR, zostały one użyte do przeprowadzenia oceny stabilności genetycznej sadzonek rabarbaru. Produkty amplifikacji PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym. Podczas analizy elektroforegramów oceniano liczbę prążków (produktów ISSR) oraz ich wielkość (Fot. 4). Wyniki wykazały wysoką stabilność genetyczną materiału roślinnego rabarbaru rozmnożonego *in vitro*.

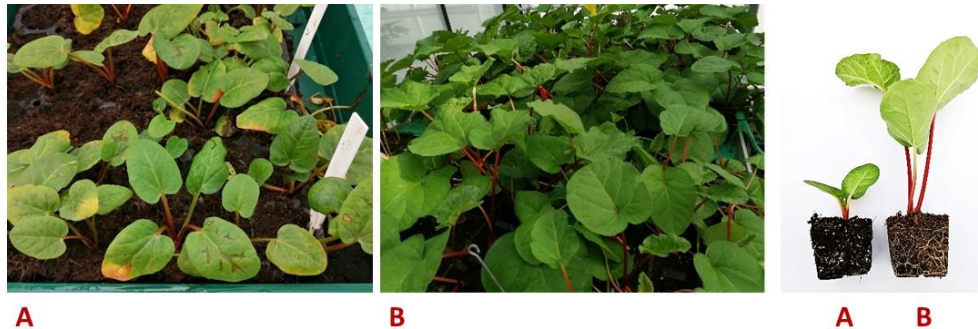


Fot. 4. Elektroforetyczny rozdział produktów ISSR-PCR z użyciem startera 855; L – wzorzec masowy GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific), 1-13 – reakcja na matrycy DNA wyizolowanego z sadzonek rabarbaru pochodzących z kultur *in vitro*, M - reakcja na matrycy DNA wyizolowanego z rośliny matecznej, K – kontrola negatywna reakcji (fot. D. Wójcik)

4. Określenie wpływu podłoża, fotoperiodu i temperatury na wczesny wzrost mikrosadzonek w warunkach *ex vitro*

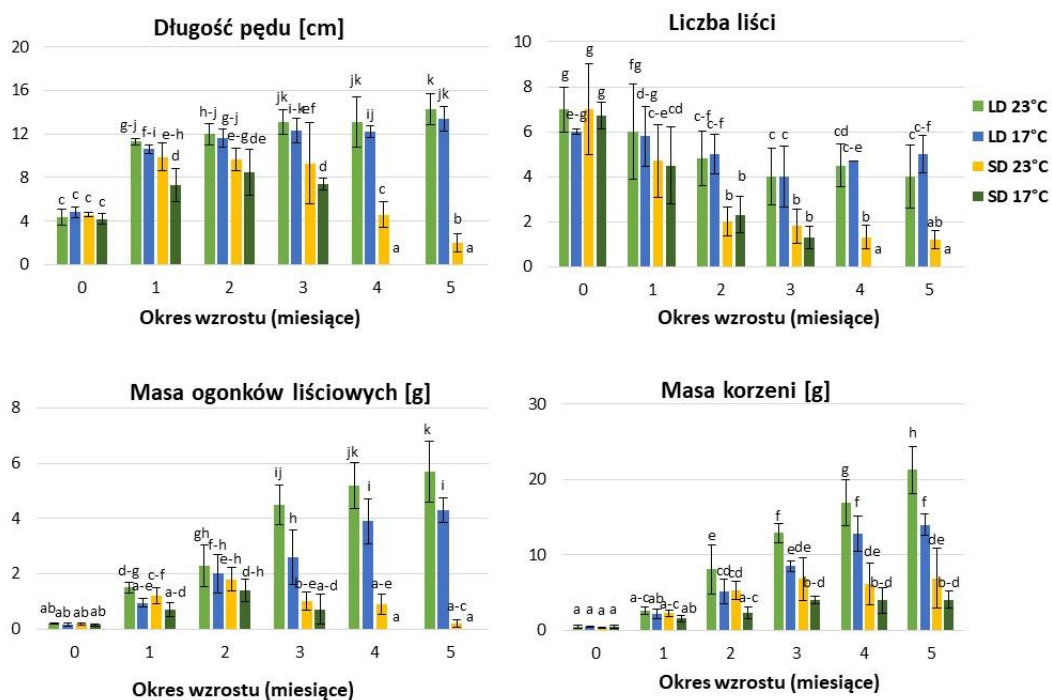
Specyficzne warunki podczas wzrostu *in vitro* (aseptyczność, wysoka wilgotność, niskie natężenia światła, wysoki poziom sacharozy i soli mineralnych) wpływają na tworzenie roślin o niskiej aktywności fotosyntetycznej, ze słabo wykształconą kutikulą i nieprawidłowo funkcjonującymi aparatami szparkowymi. Etap przeniesienia z warunków *in vitro* do *ex vitro* często uważany jest jako najtrudniejszy, gdyż delikatne rośliny uzyskane w sterylnych warunkach *in vitro* muszą przestawić się na autotroficzny metabolizm i funkcjonowanie w warunkach obniżonej wilgotności i wyższej intensywności światła. Są wtedy bardzo podatne na różne stresy abiotyczne i biotyczne. Przy braku właściwego traktowania nie rozwijają się prawidłowo i zamierają. Wstępne doświadczenia wykazały skłonność młodych roślin rabarbaru rozmnożonych *in vitro* do indukcji spoczynku na etapie wczesnego wzrostu *ex vitro*. Jest to zjawisko niekorzystne, gdyż nie pozwala na dostateczny wzrost pędów i wytworzenie części podziemnej (zgrubiałych, bulwiastych korzeni), a tym samym uzyskanie handlowej sadzonki, dobrze adoptującej się w warunkach polowych, a w dalszej kolejności wpływającej na dobre plonowanie. W przeprowadzonych doświadczeniach oceniano wpływ rodzaju podłoża, fotoperiodu i temperatury oraz ich wzajemne współdziałanie na wzrost mikrosadzonek rabarbaru w warunkach *ex vitro*.

Wykazano istotny wpływ substratu torfowego o wysokim przewodnictwie elektrycznym (EC) na wczesny wzrost *ex vitro* mikrosadzonek rabarbaru w szklarni. Sadzonki produkowane na podłożu z neutralizowanego torfu wysokiego, pomimo fertygacji 0,1% nawozem (18% N + 18% P + 18% K + 3% Mg + 5% S + mikroelementy) i doświetlania, nie wykazywały wzrostu części nadziemnej i tylko nieznaczny rozwój systemu korzeniowego (Fot. 5). Wyniki wykazały, iż poziom substancji pokarmowych dostarczanych młodym roślinom jest bardzo istotny w inicjacji wzrostu rabarbaru *ex vitro*.

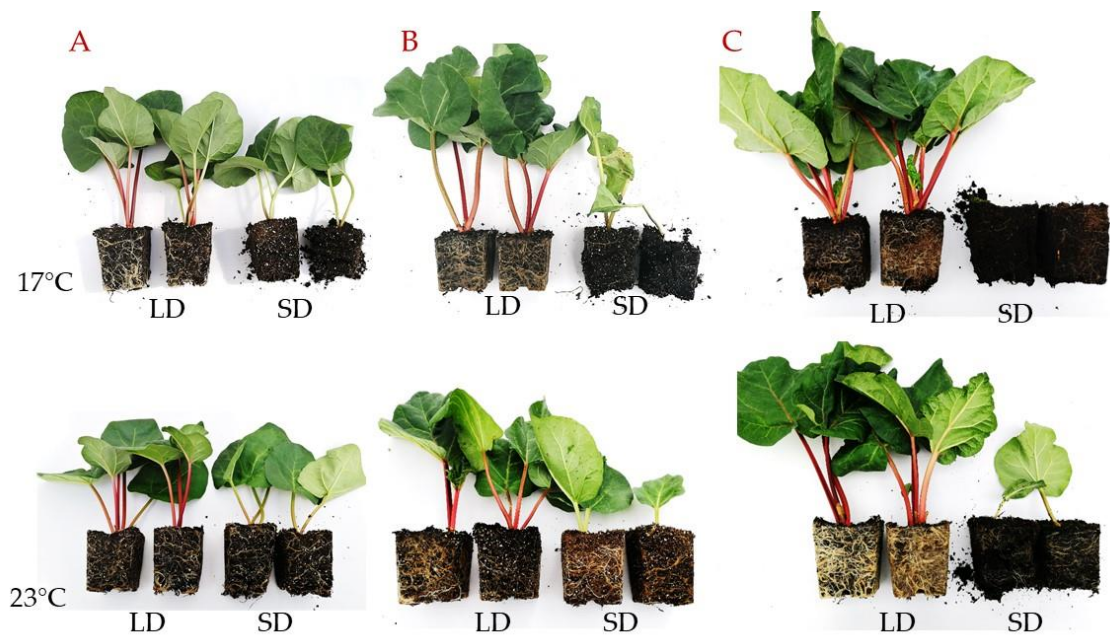


Fot. 5. Wpływ podłoża o: A – niskim EC i B – wysokim EC na wzrost mikrosadzonek rabarbaru *ex vitro* (fot. A. Wojtania)

W kolejnym doświadczeniu oceniano wpływ fotoperiodu (dzień/noc; 10/14-h i 16/8-h) i temperatury (17°C, 23°C) na wzrost i rozwój liści oraz części podziemnej (kłączy) w kontrolowanych warunkach w fitotronie. Wyniki badań wykazały, że mikrosadzonki rabarbaru są bardzo wrażliwe na krótki dzień. Po 4 tygodniach wzrostu w warunkach 10-h fotoperiodu sadzonki cechowały się zahamowanym wzrostem i tworzeniem liści, obniżoną masą ogonków liściowych i kłączy oraz szybkim żółknięciem liści. Powyższe procesy przebiegały szybciej w temperaturze 17°C niż 23°C (Wykres 2). Intensywny wzrost sadzonek (części nadziemnej i podziemnej) i brak indukcji spoczynku przez co najmniej 5 miesięcy uzyskano w przypadku wzrostu roślin w warunkach 16-h fotoperiodu i temperaturze w zakresie 17- 23°C (Fot. 5 i 6).



Wykres 2. Wpływ temperatury i fotoperiodu na wczesny wzrost mikrosadzonek rabarbaru w warunkach *ex vitro*. LD - długi dzień, SD – krótki dzień

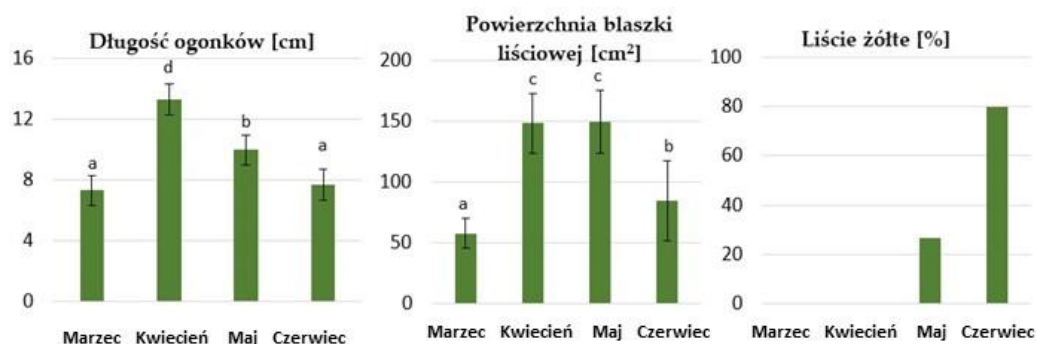


Fot 6. Wpływ temperatury i fotoperiodu na wczesny wzrost mikrosadzonek rabarbaru w warunkach ex vitro. LD - długi dzień, SD – krótki dzień (fot. A. Wojtania)



Fot 7. Wpływ temperatury i fotoperiodu na rozwój części podziemnej mikrosadzonek rabarbaru podczas wczesnego wzrostu w warunkach ex vitro. LD - długi dzień, SD – krótki dzień (fot. A. Wojtania)

Oceniano także wpływ wzrastającej temperatury w szklarni w miesiącach marzec-czerwiec w naturalnej temperaturze (średnia/max. w kolejnych miesiącach - 17,8/21,4°C; 20,1/23,1°C; 22,4/28,9°C i 28,0/34,3°C) przy 16-h fotoperiodzie (doświetlanie) na wczesny wzrost mikrosadzonek rabarbaru ex vitro. Wyniki wykazały intensywny wzrost sadzonek w marcu i kwietniu, a następnie postępujące żółknięcie liści w maju w warunkach wzrastającej temperatury (max. 28,9°C). W czerwcu następował intensywny przyrost masy zgrubiałych korzeni i zasychanie liści (Wykres 3). Morfologiczne odpowiedzi sadzonek na wzrastającą temperaturę sugerowały indukcję spoczynku (Fot. 8). W warunkach polowych, rabarbar najlepiej rośnie w temperaturze 20-25°C. Plon i jakość roślin obniża się, gdy średnie temperatury letnie wzrastają powyżej 27-32°C, ale spoczynek typu endodormancy jest indukowany jesienią wraz ze skracaniem długości dnia i obniżaniem temperatury.



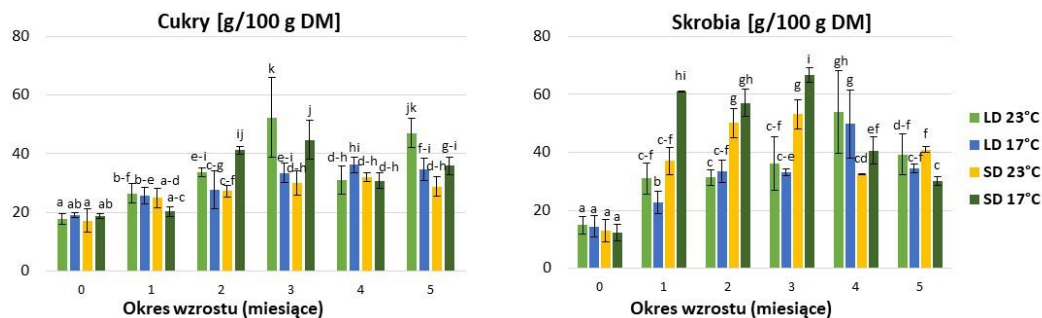
Wykres 3. Wpływ temperatury w szklarni na wczesny wzrost mikrosadzonek rabarbaru ex vitro



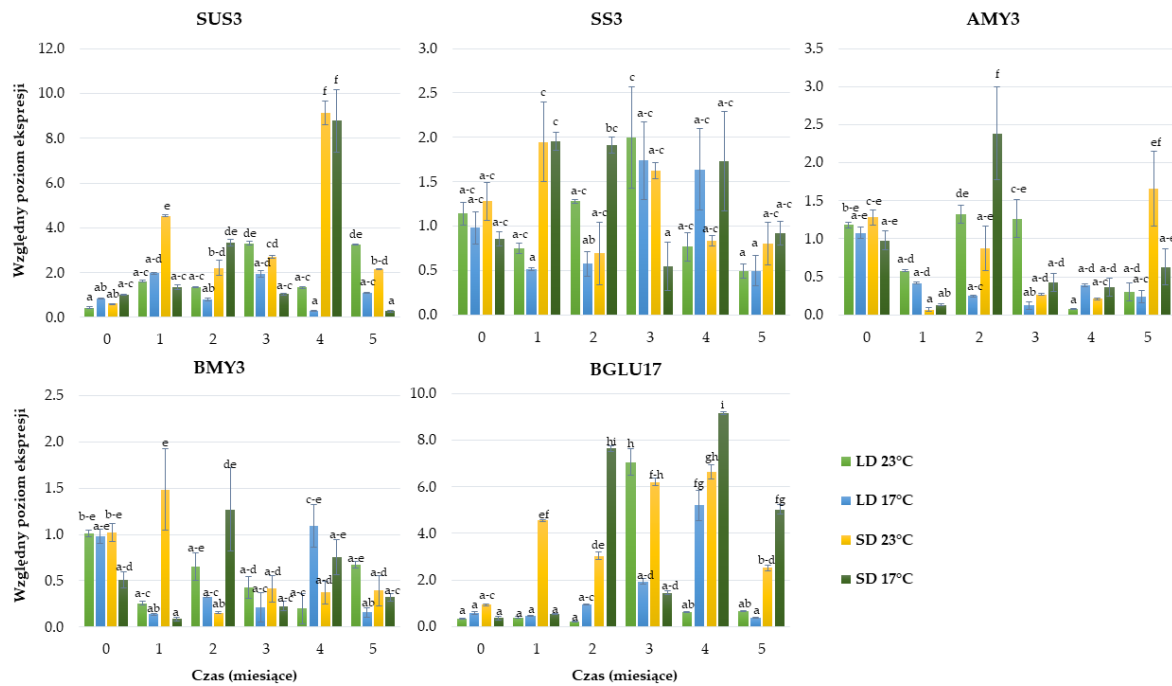
Fot. 8. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni miesiącach, kolejno od lewej: marzec-czerwiec na wczesny wzrost ex vitro sadzonek rabarbaru rozmnożonych przy zastosowaniu technik in vitro (fot. A. Wojtania)

5. Poznanie odpowiedzi metabolicznych, hormonalnych i aktywności genów na warunki wzrostu ex vitro wpływające na wczesną indukcję spoczynku mikrosadzonek

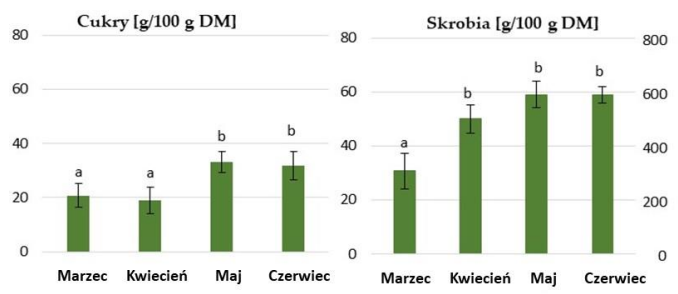
Zmiany zawartości węglowodanów są ważnym fizjologicznym markerem spoczynku roślin. W rocznym cyklu wzrostu bylin zmienia się rodzaj i ilość endogennych węglowodanów. Głównym cukrem zapasowym jest skrobia, której poziom spada podczas intensywnego wzrostu wiosną. Analiza biochemiczna i molekularna pąków podziemnych rabarbaru wykazała, że zahamowanie wzrostu mikrosadzonek było zbieżne z podwyższonym poziomem skrobi (Wykres 4 i 6), podwyższoną ekspresją genów syntazy skrobiowej (*SUS3*) i transportu cukrów (*BGLU17*) oraz ujemną regulacją genów uczestniczących w katabolizmie skrobi - α -amylazy (*AMY3*) i β -amylazy 3 (*BMY3*) (Wykres 5 i 7).



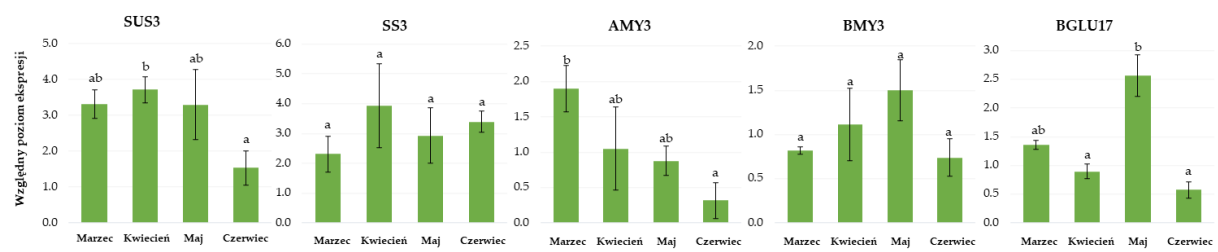
Wykres 4. Wpływ temperatury i fotoperiodu na zawartość węglowodanów w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro w kontrolowanych warunkach w fitotronie



Wykres 5. Wpływ temperatury i fotoperiodu na ekspresję genów uczestniczących w metabolizmie węglowodanów w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro w kontrolowanych warunkach w fitotronie

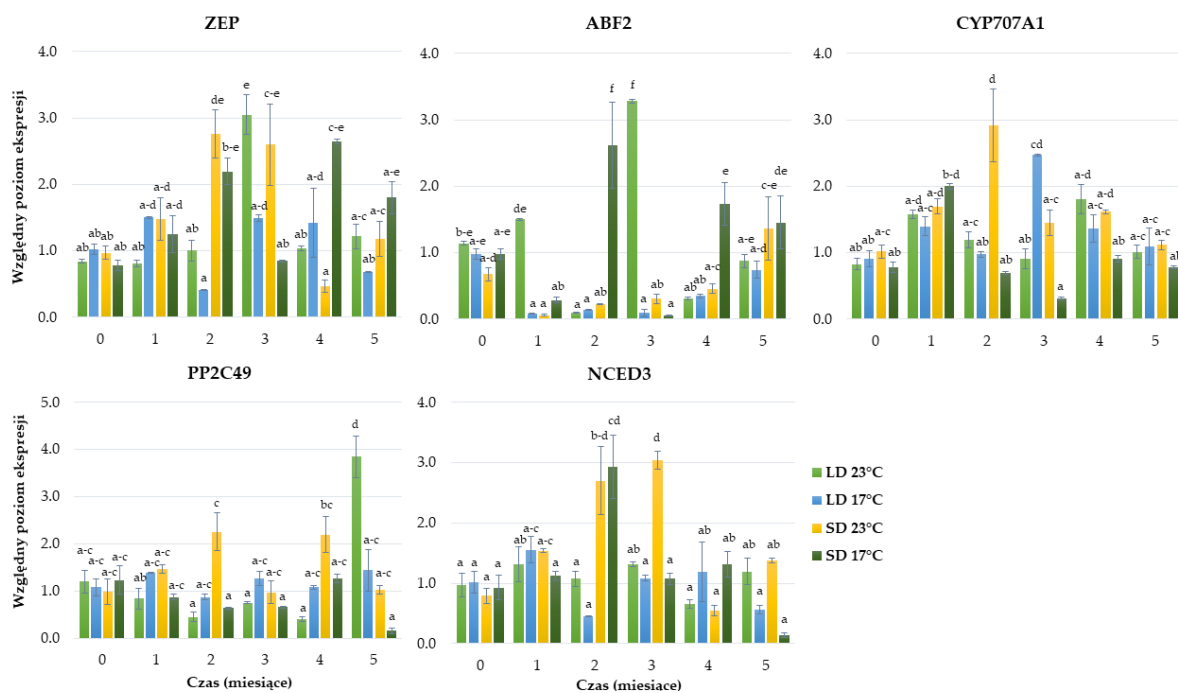


Wykres 6. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni miesiącach marzec-czerwiec na zawartość węglowodanów w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro

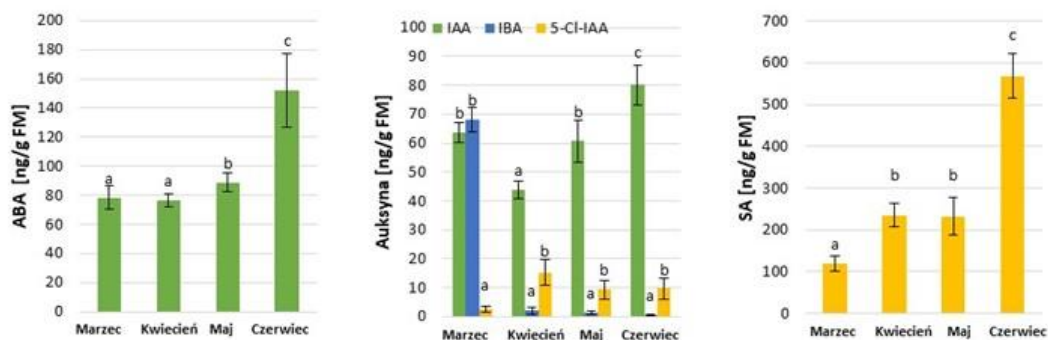


Wykres 7. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni miesiącach marzec-czerwiec na ekspresję genów związanych z metabolizmem węglowodanów w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro

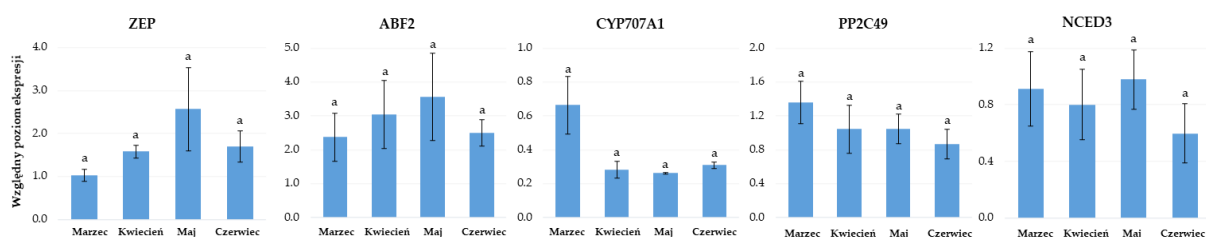
Istotną rolę w powstawaniu i utrzymywaniu spoczynku odgrywa zmieniająca się równowaga hormonalna. Obecność hormonów hamujących wzrost, głównie ABA, a także brak lub niskie stężenie stymulatorów (głównie giberelin i cytokinin) jest jednym z podstawowych czynników odpowiedzialnych za zahamowanie wzrostu. W pąkach wielu roślin zapadających w spoczynek pod wpływem skracającego się dnia i niskiej temperatury gromadzi się ABA. Przeprowadzone analizy pąków rabarbaru wykazały podwyższoną syntezę ABA (Wykres 9) i ekspresję genów odpowiedzialnych za biosyntezę ABA (*ZEP* i *NCED3*) oraz negatywną regulację genów odpowiedzialnych za katabolizm ABA (*CYP707A1*) zarówno w odpowiedzi na 10-h fotoperiod (Wykres 8) jak i wzrastającą temperaturę (Wykres 10). Natomiast, geny biorące udział w przekazywaniu sygnału ABA (*ABF3* i *PP2C49*) ulegały pozytywnej ekspresji w warunkach stresu (SD lub podwyższona temperatura), a także w warunkach optymalnych (LD, 23°). Na tej podstawie wnioskowałam o udziale ABA w procesie adaptacji mikrosadzonek rabarbaru do wzrostu w warunkach ex vitro. Dane literaturowe wskazują, że ABA pośredniczy w adaptacji roślin do różnych stresów poprzez zmianę ekspresji wielu genów, w tym zaangażowanych w transport i metabolizm sacharozy, a także czynników transkrypcyjnych szoku cieplnego (*HSFs*) i białek szoku cieplnego (*HSPs*). W pąkach rabarbaru, podwyższony poziom ABA był zbieżny z wysokim poziomem skrobi. Podczas indukcji spoczynku w szklarni obserwowano także korelację pomiędzy poziomem ABA a ekspresją genów *HSFs* i *HSPs*.



Wykres 8. Wpływ temperatury i fotoperiodu na ekspresję genów uczestniczących w syntezie i metabolizmie kwasu abscysynowego (ABA) w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro w kontrolowanych warunkach w fitotronie

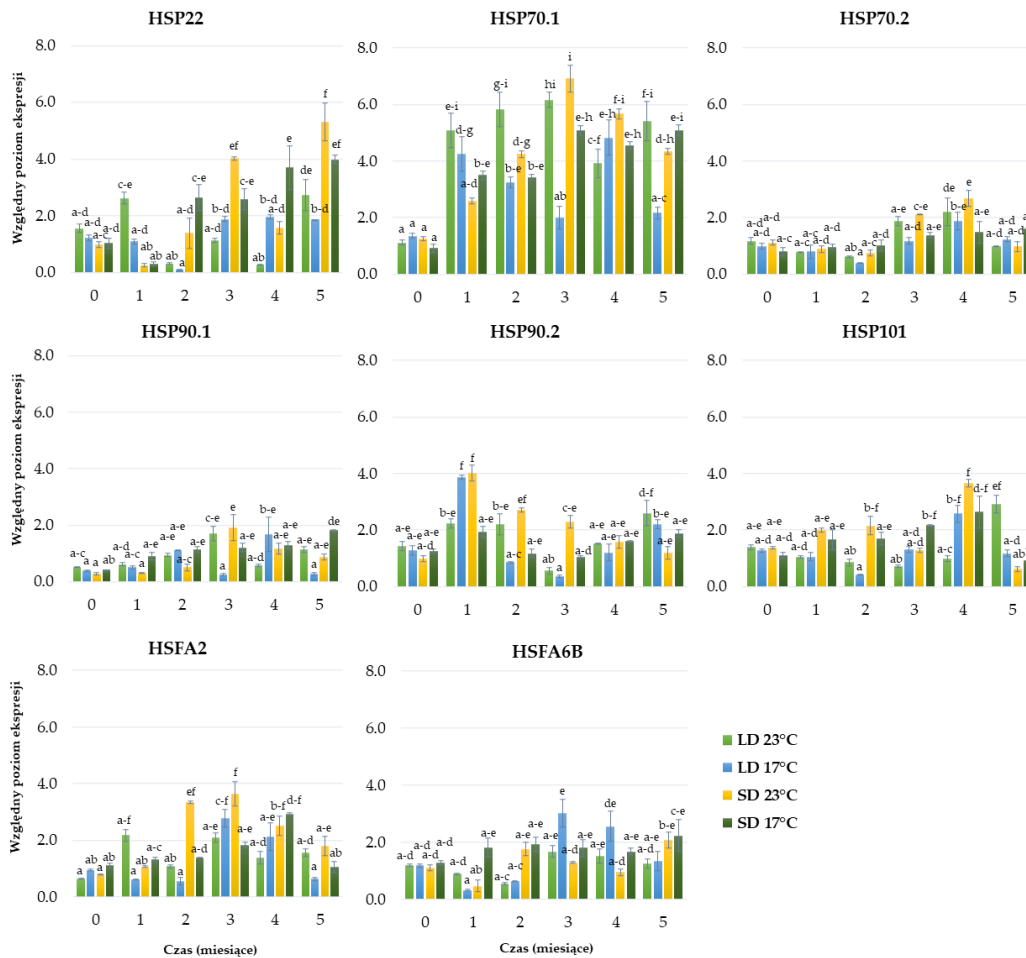


Wykres 9. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni miesiącach marzec-czerwiec na zawartość endogennych fitohormonów w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro

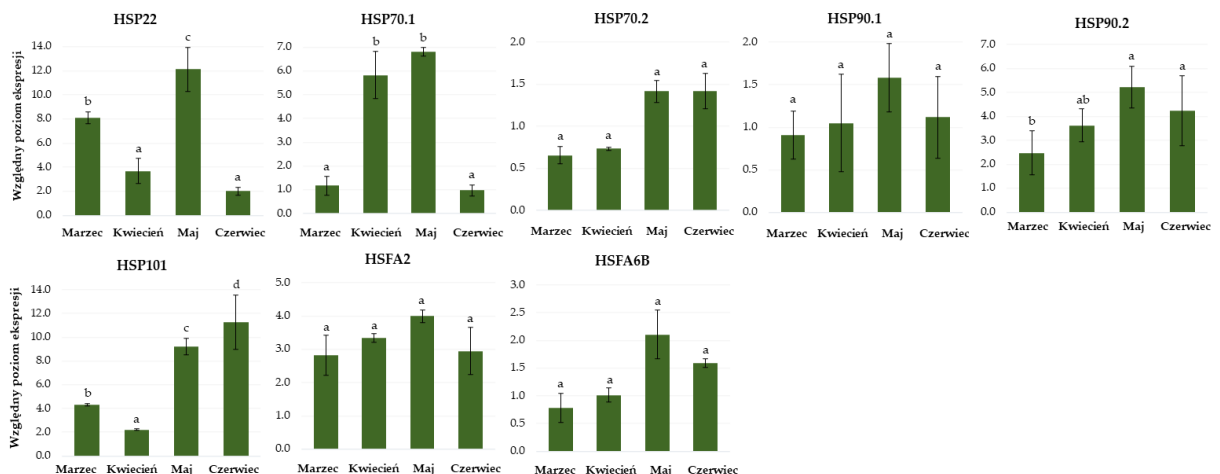


Wykres 10. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni miesiącach marzec-czerwiec na ekspresję genów uczestniczących w syntezie i metabolizmie kwasu abscysynowego (ABA) w pąkach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro

Czynniki transkrypcyjne i białka szoku cieplnego są kluczowymi elementami odpowiedzi na szok termiczny (HSR), mechanizmu, który chroni rośliny przed suboptymalną temperaturą i innymi stresami. Rośliny posiadają złożoną sieć regulacyjną składającą się z wielu genów *HSFs* i *HSPs*. Wyniki analiz pąków rabarbaru wykazały pozytywną regulację wielu genów czynników transkrypcyjnych *HSP22*, *HSP70.1*, *HSP90.2*, *HSP101*, jak również białek szoku cieplnego *HSFA2* i *HSFA6B* w odpowiedzi na wzrastającą temperaturę podczas wzrostu w szklarni. Natomiast geny *HSP22*, *HSP70.1* i *HSFA2* ulegały pozytywnej regulacji w warunkach krótkiego dnia, ale ich ekspresja była zróżnicowana w zależności od stadium rozwoju spoczynku (Wykres 11 i 12).



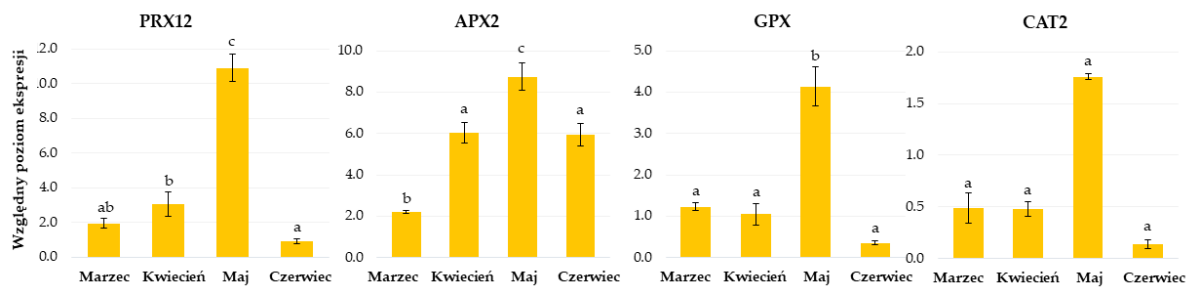
Wykres 11. Wpływ temperatury i fotoperiodu na ekspresję genów czynników transkrypcyjnych (*HSP*) i białek szoku ciepłego (*HSF*) w pakach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu *ex vitro* w kontrolowanych warunkach w fitotronie



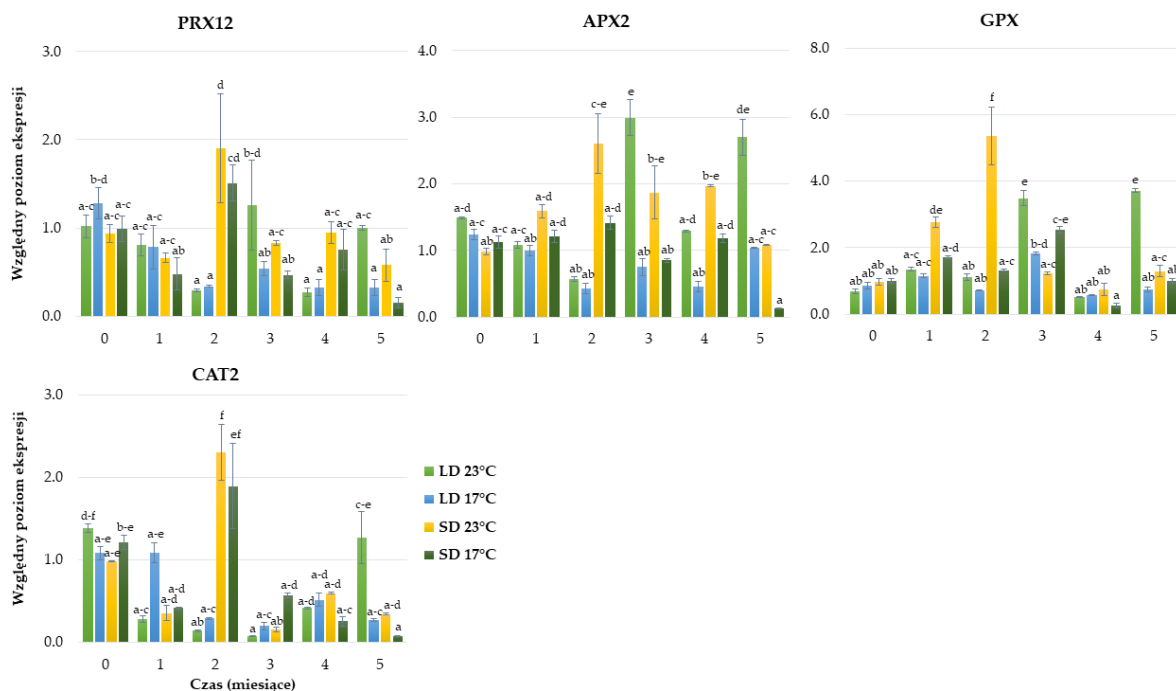
Wykres 12. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni (miesiące marzec-czerwiec) na ekspresję genów czynników transkrypcyjnych (*HSP*) i białek szoku ciepłego (*HSF*) w pakach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu *ex vitro*

W warunkach stresu abiotycznego rośliny zwykle wytwarzają reaktywne formy tlenu RFT (ROS, z ang. reactive oxygen species), które mogą powodować uszkodzenia oksydacyjne komórek. Reaktywne formy tlenu w kontrolowanych ilościach mogą funkcjonować jako cząsteczki sygnałne

indukujące szereg reakcji związanych z odpowiedzią rośliny na stres. Utrzymywanie RFT na konstytutywnym poziomie związane jest z funkcjonowaniem systemu antyoksydacyjnego, w tym enzymów, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPX). Uważa się, że podwyższona tolerancja na stres wiąże się z wyższą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. U roślin rabarbaru rosnących w szklarni, geny peroksydazy askorbinianowej (*APX2*) ulegały pozytywnej regulacji w kwietniu (temperatura max. 23,1°C), natomiast znaczący (11-krotny, 4-krotny i 2-krotny) wzrost aktywności genów peroksydazy 12 (*PRX12*), peroksydazy glutationowej (*GPX*) i katalazy (*CAT2*) następował w maju (temperatura max. 28,9°C) (Wykres 13). Ich aktywność była zbieżna z zahamowaniem wzrostu i żółknięciem liści. W kolejnym miesiącu, kiedy temperatura max. wzrosła do 34,3°C, ekspresja genów *PRX12*, *GPX* i *CAT2* gwałtownie obniżała się, co korelowało z zamieraniem części nadziemnej sadzonek rabarbaru. Podobnie, w odpowiedzi na krótki dzień, ekspresja genów wszystkich badanych enzymów wzrastała podczas indukcji spoczynku (po 2. miesiącu wzrostu w fitotronie), a następnie gwałtownie obniżała się u roślin spoczynkowych. W optymalnych warunkach (LD, 23°C), podwyższona aktywność peroksydazy glutationowej i askorbinianowej po 3.- i 5. miesiącu wzrostu w fitotronie nie korelowała z procesami starzenia roślin rabarbaru (Wykres 14).



Wykres 13. Wpływ wzrastającej temperatury w szklarni miesiącach marzec-czerwiec na ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych w pakach podziemnych mikrosadzonek na etapie wczesnego wzrostu ex vitro

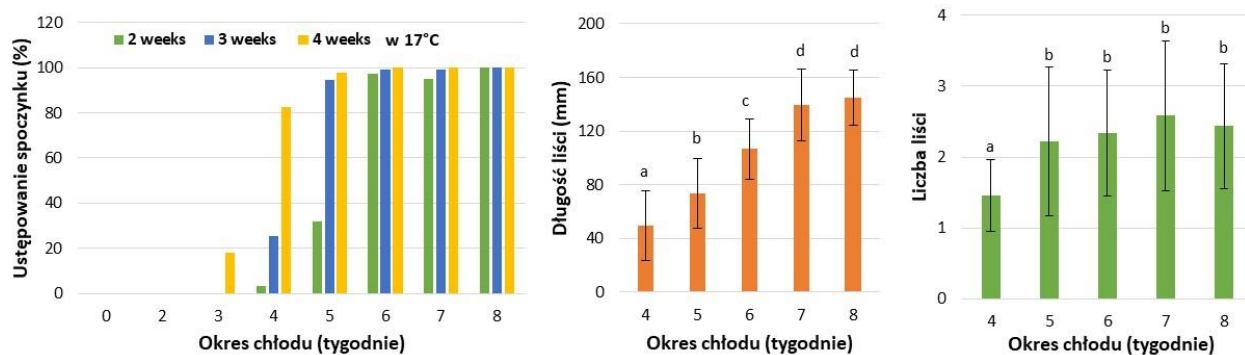


Wykres 14. Wpływ temperatury i fotoperiodu na ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych w pakach podziemnych mikrosadzonek rabarbaru na etapie wczesnego wzrostu ex vitro w kontrolowanych warunkach w fitotronie

6. Ocena wpływu chłodu na parametry morfologiczne, fizjologiczne i ekspresję genów w procesie ustępowania spoczynku

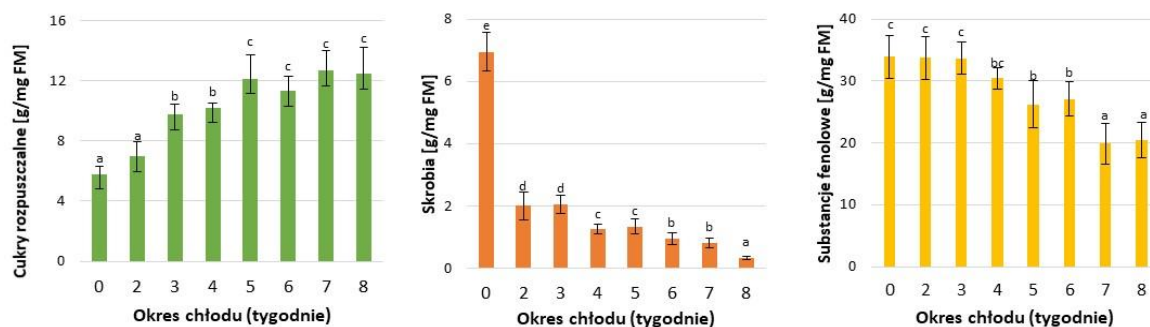
Spoczynkowe sadzonki rabarbaru pozostawione w zimnej szklarni na okres zimy nie podejmowały wzrostu w następnym okresie wegetacyjnym. Wskazywało to na niewystarczający bodziec chłodu. Interesującym było zbadanie jaki okres chłodu jest niezbędny do przerwania spoczynku podziemnych pąków rabarbaru 'Malinowy'. W przeprowadzonym doświadczeniu, spoczynkowe mini karpki poddawano działaniu niskiej temperatury (4°C) w ciemnej chłodni przez okres (0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 tygodni). Następnie przenoszono je do temperatury 17°C i po 2, 3 i 4 tygodniach oceniano zdolność do wzrostu i rozwoju pędów oraz zmiany metaboliczne, hormonalne i molekularne zachodzące w pąkach pod wpływem chłodzenia.

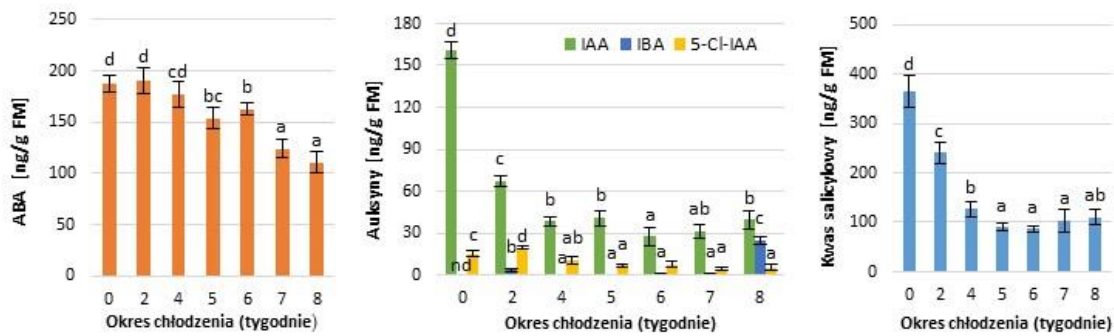
Wykazano, że 5-tygodniowy okres chłodu pozwala na uzyskanie aktywnego wzrostu 96,9% pędów po 4 tygodniach uprawy w temperaturze 17°C. Jednakże, dłuższe chłodzenie wpływało na szybszy, bardziej wydajny i wyrównany wzrost roślin (Wykres 15).



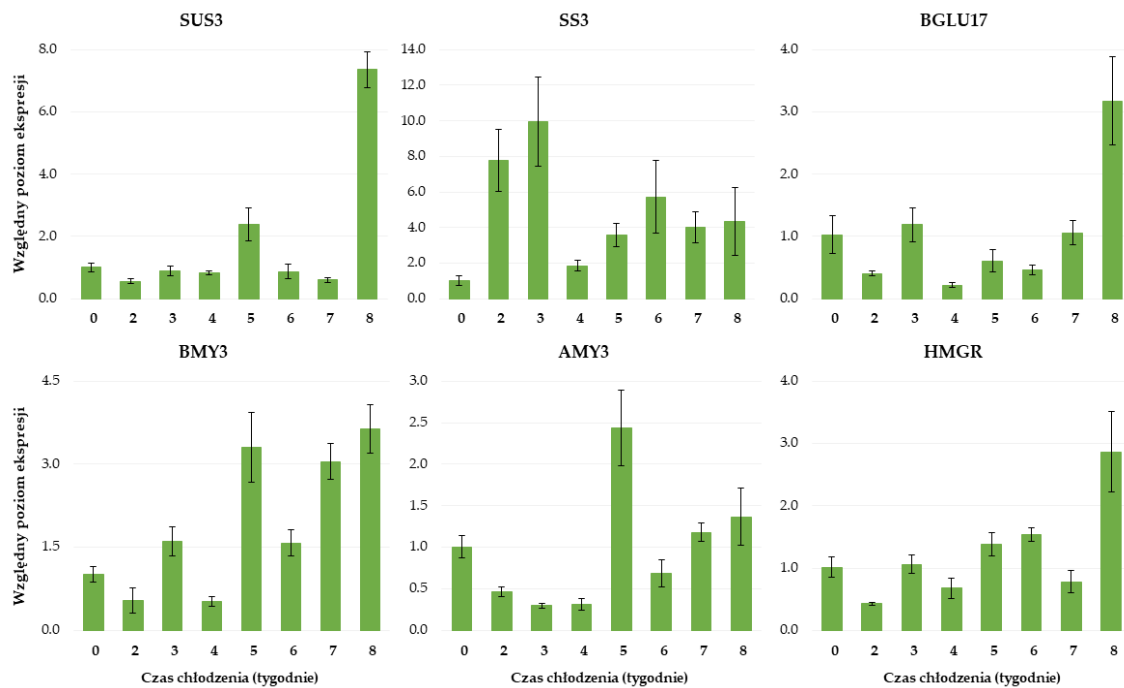
Wykres 15. Wpływ chłodzenia mini karp w temp. 4°C na ustępowanie głębokiego spoczynku wegetatywnych pąków podziemnych sadzonek rabarbaru. Obserwacje wykonano po 2, 3 i 4 tygodniach wzrostu w temp. 17°C po okresie chłodu.

Wykonane analizy pozwoliły na określenie, iż brak aktywności pąków niechłodzonych wynikał z wysokiej zawartości skrobi, substancji fenolowych, ABA i auksyn (Wykres 16). Na skutek działania niskiej temperatury ich poziom obniżał się, co prowadziło do inicjacji wzrostu roślin. Wykazano, że istotną rolę w ustępowaniu spoczynku pąków rabarbaru odgrywa metabolizm węglowodanów. Obniżony poziom skrobi i wzrastający poziom cukrów rozpuszczalnych w pąkach w wyniku działania niskiej temperatury był zbieżny z podwyższoną aktywnością genów katabolizmu skrobi (*AMY3* i *BMY3*). Wraz z ustępowaniem spoczynku pąków następował wzrost aktywności genów syntazy sacharozy (*SUS3*) i genów odpowiedzialnych za transport cukrów (*BGLU17*) (Wykres 17).



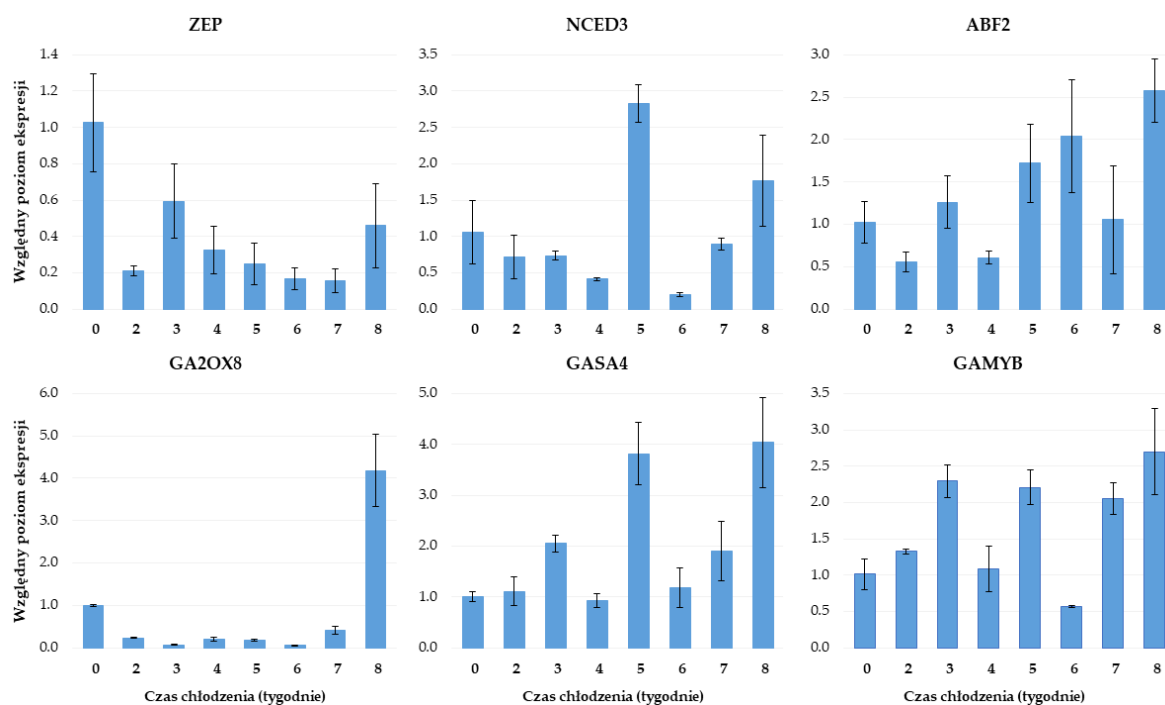


Wykres 16. Wpływ chłodzenia mini karp w temp. 4°C na zawartość cukrów rozpuszczalnych, skrobi, substancji fenolowych endogennych fitohormonów w wegetatywnych pąkach podziemnych sadzonek rabarbaru.



Wykres 17. Wpływ chłodzenia mini karp w temp. 4°C na ekspresję genów związanych z syntezą i metabolizmem węglowodanów w wegetatywnych pąkach podziemnych sadzonek rabarbaru.

Ponadto wykonane analizy pąków rabarbaru wykazały, iż istotną rolę w ustępowaniu spoczynku odgrywa zmiana równowagi pomiędzy zawartością ABA i GA. Wraz z wychodzeniem ze spoczynku obniżała się ekspresja genu syntezy ABA (*ZEP*) i wzrastała ekspresja genu odpowiedzialnego za metabolizm ABA (*ABF2*). Odwrotną tendencję obserwowano w przypadku ekspresji genów zaangażowanych w syntezę i metabolizm giberelin (*GASA4*, *GA2OX8*). Na uwagę zasługuje także wysoki poziom kwasu inolilo-3-octowego (IAA), który obserwowano w niechłodzonych pąkach rabarbaru. Wraz z ustępowaniem spoczynku jego synteza gwałtownie obniżała się, a następnie stopniowo wzrastała. Rola auksyny i substancji fenolowych w regulacji spoczynku jest mniej poznana, a uzyskiwane wyniki często nie są jednoznaczne. U rabarbaru, stężenie substancji fenolowych w pąkach było odwrotnie proporcjonalne do czasu chłodzenia karp, i było zbieżne z aktywnością genu odpowiedzialnego za ich metabolizm (*HMGR*).



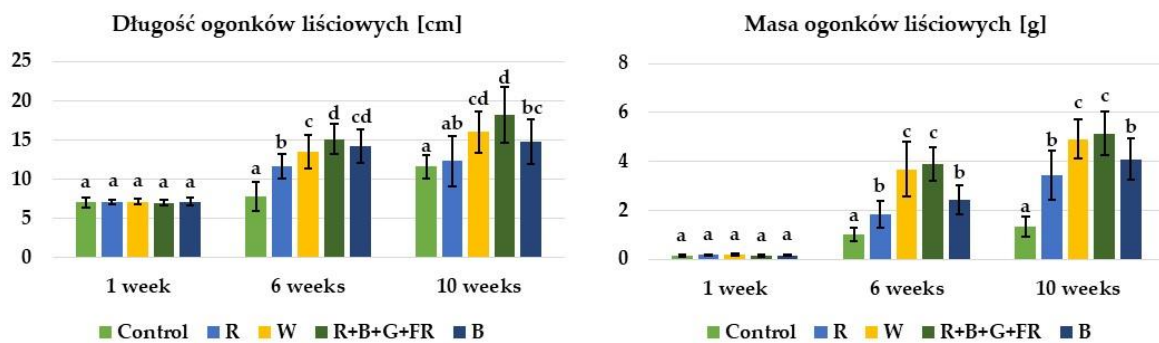
Wykres 18. Wpływ chłodzenia mini karp w temp. 4°C na ekspresję genów związanych z syntezą i metabolizmem ABA i gibereliny w wegetatywnych pąkach podziemnych sadzonek rabarbaru.

7. Określenie wpływu rodzaju światła na wzrost sadzonek *ex vitro* i produkcję substancji fenolowych

Podczas wzrostu w szklarni delikatnych roślin rozmnożonych *in vitro* bardzo ważne jest doświetlanie. Światło pełni w życiu roślin fundamentalną rolę stanowiąc źródło energii do fotosyntezy oraz bodziec w procesach fotomorfogenetycznych. Wiele danych wskazuje, że dzięki zastosowaniu promieniowania świetlnego o odpowiednim składzie spektralnym (barwie) i intensywności, można sterować przebiegiem morfogenezy i stymulować syntezę substancji fenolowych. Możliwość wytwarzania selektywnego spektrum światła dostosowanego do potrzeb roślin dają źródła światła oparte na diodach elektroluminescencyjnych (lampy LED). W związku z różnymi reakcjami roślin na poszczególne barwy i ich proporcje ważne jest dopasowanie widma do genotypu.

W przeprowadzonych badaniach oceniano wpływ doświetlania mikrosadzonek rabarbaru lampami LED o różnym składzie spektralnym: 100% czerwone, 100% niebieskie, białe (44.4% zielone, 24.4% niebieskie, 28.9% czerwone; 2.2% daleka czerwień) i R+B+G+FR (49.4% czerwone, 16.3% niebieskie, 10.3% zielone i 23.8% daleka czerwień) na wczesny wzrost *ex vitro* w szklarni w miesiącach zimowych i produkcję substancji bioaktywnych w ogonkach liściowych. Wyniki badań potwierdziły potrzebę doświetlania młodych roślin rozmnożonych *in vitro* w okresie niedoboru światła i istotny wpływ barwy światła na wszystkie parametry wzrostu sadzonek rabarbaru. Wykazano, iż światło o szerokim spectrum ma lepszy wpływ na wzrost i rozwój pędów (liści) i systemu korzeniowego sadzonek rabarbaru w porównaniu ze światłem monochromatycznym czerwonym i niebieskim (Wykres 19). Biorąc pod uwagę wszystkie parametry wzrostu najlepsze wyniki uzyskano w przypadku doświetlania mikrosadzonek lampami LED emitującego światło czerwone, niebieskie, zielone i dalekiej czerwieni, w proporcjach 49.4%, 16.3%, 10.3% i 23.8%, natomiast najgorsze w obecności światła czerwonego. Wykonane analizy endogennych cukrów

rozpuszczalnych pozwoliły na określenie, iż ich wysoki poziom był zbieżny z intensywnym wzrostem sadzonek rabarbaru doświetlanych światłem R+B+W+FR, co świadczyło o wysokiej efektywności fotosyntezy roślin w tym traktowaniu. Wykazano także, że doświetlanie lampami LED wpłynęło na znaczący wzrost (271%) zawartości substancji fenolowych w ogonkach liściowych w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Antocyjany (głównie rutozyd-3-cyjanidyny), stanowiły najbardziej liczną grupę substancji fenolowych, ale obecne były także katechiny, flawonole i kwasy fenolowe. Najwięcej antocyjanów tworzyło się w obecności światła białego i czerwonego. Rośliny rosące w świetle czerwonym wyróżniały się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, ale równocześnie cechowały się zahamowanym wzrostem, niską biomasą i poziomem cukrów rozpuszczalnych. Powyższe obserwacje wskazywały na udział antocyjanów w procesie adaptacji do niekorzystnych warunkach wzrostu. Nasuwa to przypuszczenie, iż rośliny rabarbaru o wysokim poziomie antocyjanów mogą być bardziej odporne na inne stresy abiotyczne i biotyczne w procesie produkcji sadzonek. U sadzonek rosnących w świetle białym o szerokim spectrum (44.4% zielone, 24.4% niebieskie, 28.9% czerwone; 2.2% daleka czerwień), wysoka produkcja antocyjanów korelowała z wysoką aktywnością wzrostową. Wskazuje to na istotny udział światła zielonego w procesie aklimatyzacji sadzonek rabarbaru do wzrostu w szklarni. Analizując działanie światła o różnym składzie spektralnym na wczesny wzrost *ex vitro* w szklarni i produkcję substancji fenolowych jako optymalne uznano światło białe.



Wykres 19. Reakcje mikrosadzonek rabarbaru na doświetlania lampami LED o różnym składzie spektralnym. Obserwacje wykonane po 1, 6 i 10 tygodniach wzrostu w szklarni.



Wykres 20. Wpływ doświetlania lampami LED o różnym składzie spektralnym na wzrost mikrosadzonek rabarbaru w szklarni. Obserwacje wykonane po 10 tygodniach wzrostu w szklarni (fot. A. Wojtania).

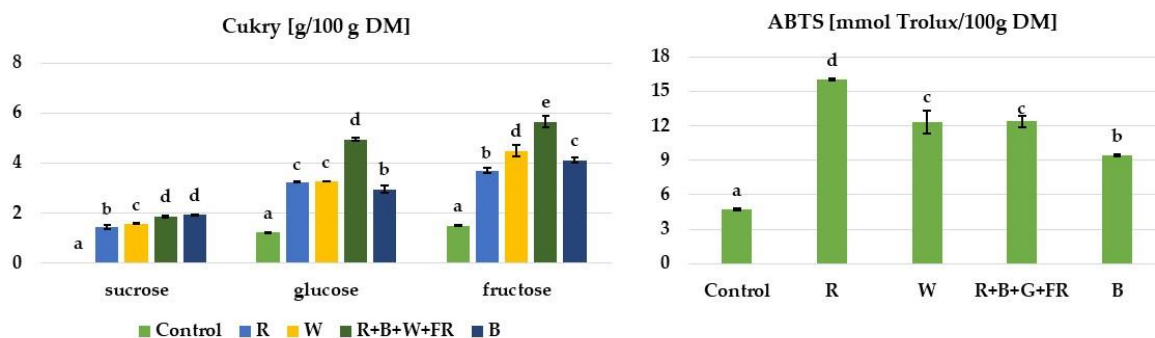


Tabela 4. Wpływ doświetlania lampami LED o różnym składzie spektralnym na zawartość substancji fenolowych w ogonkach liściowych sadzonek rabarbaru 'Malinowy' podczas wczesnego wzrostu ex vitro w szklarni.

Substancje fenolowe [mg/100g DM]	Rodzaj światła				
	Kontrola*	Czerwone	Białe	R+B+G+FR	Niebieskie
Antocyjany:	216.4 a	561.0 d	585.0 e	374.1 b	435.4 c
Rutozyt-3-cyjanidyny	200.8 a	488.4 d	503.2 e	332.2 b	387.7 c
Glikozyd- -3-cyjanidyny	10.8 a	59.9 d	68.8 e	33.0 b	38.4 c
Rutozyd-3-delfinidyny	4.8 a	12.7 c	13.0 c	8.9 b	9.2 b
Flawanole	3.1 a	4.4 d	4.1 c	3.6 b	3.4 b
Katechiny	12.7 a	32.3 c	30.8 c	36.5 d	23.4 b
Kwasy fenolowe	1.9 a	4.1 d	3.0 c	2.1 b	2.1 b
Łącznie	234.0 a	601.8 d	622.8 e	416.4 b	464.4 c

* bez doświetlania

Szczegółowy opis wyników badań został przedstawiony w publikacjach:

Wojtania A., Mieszczakowska-Frać M. 2021. *In vitro* propagation method for production of phenolic-rich planting material of culinary rhubarb 'Malinowy'. *Plants* 10: 1768.

Wojtania A., Markiewicz M., Waligórski P. 2022. Regulation of the bud dormancy development and release in micropropagated rhubarb 'Malinowy'. *International Journal of Molecular Science* 23: 1480.

Wojtania A., Markiewicz M., Waligórski, P. 2023. Growth cessation and dormancy induction in micropropagated plantlets of *Rheum rhaponticum* 'Raspberry' influenced by photoperiod and temperature. *International Journal of Molecular Science* 24: 607.

Wojtania A, Matysiak B., Mieszczakowska-Frać M., Nowak J.S., Szwejdą-Grzybowska J. 2023. Responses of micropropagated rhubarb (*Rheum rhaponticum*) plantlets to different growing media and light conditions in the greenhouse. *Agriculture* 13: 890.

Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie innowacyjnej technologii rozmnażania rabarbaru 'Malinowy' in vitro umożliwiającej całoroczną, sterowaną produkcję sadzonek rabarbaru o wysokiej zdrowotności, kondycji fizjologicznej i poziomie substancji fenolowych. Opracowana technologia umożliwiła wytwarzanie w krótkim czasie dużej ilości sadzonek genotypu o pożądanym cechach, które bardzo dobrze aklimatyzowały się na plantacji.

