



# **KSIĄŻKA STRESZCZEŃ**

## **BOOK OF ABSTRACTS**

**23–25 WRZEŚNIA 2024, KRAKÓW**

**Patronat honorowy:**

Minister Nauki: Dariusz Wieczorek



**Minister  
Nauki**

---

Wojewoda Małopolski: Krzysztof Jan Klęczar  
Przewodnicząca Komitetu Biotechnologii PAN: prof. dr hab. Ewa Łojkowska  
Prezes Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych: prof. dr hab. inż. Piotr Siwek  
Rektor Uniwersytetu Jagiellońskiego: prof. dr hab. Piotr Jedynak  
Prorektor UJ ds. Collegium Medicum: prof. dr hab. Maciej Małecki  
Rektor Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie: dr hab. inż. Sylwester Tabor, prof. URK  
Prezes Polskiego Towarzystwa Botanicznego: prof. dr hab. Anna Mikuła



WOJEWODA  
MAŁOPOLSKI



POLSKA AKADEMIA NAUK



POLSKIE TOWARZYSTWO NAUK OGRODNICZYCH



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM



UNIWERSYTET ROLNICZY  
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



# KSIĄŻKA STRESZCZEŃ

## BOOK OF ABSTRACTS

XVI OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA KULTUR  
IN VITRO I BIOTECHNOLOGII ROŚLIN:  
**BIOTECHNOLOGIA I KULTURY IN VITRO ROŚLIN  
W BADANIACH PODSTAWOWYCH I APLIKACYJNYCH**

PLANT BIOTECHNOLOGY AND IN VITRO CULTURES  
IN BASIC AND APPLIED RESEARCH

23–25 WRZEŚNIA 2024, KRAKÓW

### Organizatorzy:

Uniwersytet Rolniczy  
im. H. Kołłątaja w Krakowie



Polskie Towarzystwo Botaniczne,  
Sekcja Kultur Tkankowych Roślin



## **Komitet Naukowy**

prof. dr hab. Adela Adamus (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
prof. dr hab. Anna Bach (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
prof. dr hab. Małgorzata Gaj (Uniwersytet Śląski w Katowicach)  
prof. dr hab. Halina Ekiert (Uniwersytet Jagielloński)  
prof. dr hab. Aleksandra Królicka (Uniwersytet Gdański)  
prof. dr hab. Anna Mikuła (PAN, Ogród Botaniczny CZRB w Powsinie)  
prof. dr hab. Teresa Orlikowska (Instytut Ogrodnictwa PIB w Skierniewicach)  
prof. dr hab. Bożena Pawłowska (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
prof. dr hab. Agnieszka Pietrosiuk (Warszawski Uniwersytet Medyczny)  
prof. dr hab. Anna Pindel (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
prof. dr hab. Małgorzata Podwyszyńska (Instytut Ogrodnictwa PIB w Skierniewicach)  
prof. dr hab. Jan J. Rybczyński (PAN, Ogród Botaniczny CZRB w Powsinie)  
prof. dr hab. Agnieszka Szopa (Uniwersytet Jagielloński)  
prof. dr hab. Elżbieta Zenkeler (Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu)  
prof. dr hab. Janusz Zimny (Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie)  
dr hab. Ewa Grzebelus, prof. URK (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
dr hab. Izabela Grzegorzczak-Karolak (Uniwersytet Medyczny w Łodzi)  
dr hab. Ewa Hanus-Fajerska, prof. URK (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
dr hab. Małgorzata Kikowska (Uniwersytet Medyczny w Poznaniu)  
dr hab. Dariusz Kulus, prof. PBŚ (Politechnika Bydgoska)  
dr hab. Rafał Mól, prof. UAM (Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu)  
dr hab. Agata Ptak, prof. URK (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)  
dr hab. Dariusz Sochacki (SGGW w Warszawie)  
dr hab. Alina Trejgell, prof. UMK (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)

## **Komitet Organizacyjny**

prof. dr hab. Bożena Pawłowska – przewodnicząca  
prof. dr hab. Agnieszka Szopa  
dr hab. Anna Kapczyńska, prof. URK  
dr hab. Agata Ptak, prof. URK  
dr hab. Dariusz Sochacki  
dr Monika Cioć  
dr Dawid Kocot  
dr Wojciech Makowski  
dr Bożena Szewczyk-Taranek  
dr Ewelina Tomiak  
mgr Barbara Prokopiuk



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego



Konferencja dofinansowana ze środków budżetu państwa,  
przyznanych przez Ministra Edukacji i Nauki  
w ramach Programu „Doskonała Nauka II –  
wsparcie konferencji naukowych”  
(KONF/SN/0443/2023/01)

# Spis treści

.....	13
<b>Preface</b> .....	15
.....	17
.....	19
<b>M. Beruto</b>	
Micropropagation of ornamental plants: a bridge between research and production.....	21
<b>S.J. Ochatt</b>	
Unusual plant growth regulators in tissue culture and their impact on in vitro biotechnology	22
<b>M. _____</b>	
Kultury in vitro w praktyce ogrodniczej i hodowli .....	24
<b>R. _____</b>	
Nowe mo liwo ci i ograniczenia ukierunkowanej mutagenezy z u yciem systemów CRISPR/Cas .....	27
.....	
Procesy ró nicowania in vitro i ich uwarunkowania.....	29
<b>T. _____, T. _____, K. _____</b>	
Wpływ uwolnienia kultur maliny od zanieczyszcze bakteryjnych na namna anie, ukorzenianie i aklimatyzacj .....	31
....., I. _____, I. _____, J. _____	
Nanocz stki zlota w doskonaleniu technologii kultur in vitro serduszki okazalej .....	33
....., U. _____, J. _____ - _____, _____, J. _____,	
<b>M. _____</b>	
Wpływ nanocz stek tlenku cynku i srebra na parametry biometryczne, aktywno metaboliczn i stabilno genetyczn mikrosadzonek chryzantemy wielokwiatowej .....	35
<b>M. _____, B. _____</b>	
Mikrorozmna anie rodzimych gatunków z rodziny Droseraceae obj tych ochron cisl .....	37
<b>B. _____ Kocot, E. _____</b>	
Kultury in vitro w ochronie gatunków rzadkich - badania własne .....	39
.....	
Asteraceae w kulturach in vitro .....	41
<b>K. _____, J. _____ - _____ Gaj</b>	
Czynniki VAL z udziałem kompleksu PRC2 i metylacji histonów reguluj somatyczn embriogenez u <i>Arabidopsis</i> .....	43
.....	
Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach in vitro .....	45
<b>S. _____, M. _____, M. _____, _____</b>	
<i>Drosera zigzagia</i> w kulturach in vitro oraz jej potencjał do zwalczania antybiotyko- opomych patogenów człowieka.....	47
....., M. _____, I. _____, P. _____, H. _____	
Wysoka produkcja antyoksydantów o strukturze polifenoli w kulturach bioreaktorowych wybranych gatunków ro lin leczniczych i kosmetycznych .....	49

I. _____ - _____, K.	
Tarczyca brodata – źródłem cennych metabolitów wtórnych w warunkach in vitro oraz in vivo	51
M. _____, M. _____, M. _____, N. _____ - _____, E.	
Ocena aktywności biologicznej ekstraktów otrzymanych z kultur pędów i kalusa wybranych odmian winorośli właściwej ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	53
_____, P.	
Wykorzystanie roślinnych kultur in vitro w produkcji kosmetyków na przykładzie roślin z rodzaju <i>Lavandula</i>	55
S. _____, W.	
Kultury in vitro roślin leczniczych z rodziny makurowatych (Papaveraceae) jako źródło alkaloidów izochinolinowych	57
_____, J.	
Pochodne kwasów hydroksycynamonowych w kulturach mikropędów roślin podplemienia Inuleae-Inulinae	59
I. _____ - _____, Y. _____, G. _____, K. _____, W. _____ - _____	
Wpływ wybranych metabolitów roślinnych na wzrost i rozwój <i>Fusarium oxysporum</i>	61
_____ Metody biotechnologiczne w tworzeniu nowych odmian roślin	63
L. _____, S. _____, M. _____, S. Sowa	
Wieloletnie badania transgenicznego pszenicyta	65
_____	
Haploidyżacja wybranych warzyw dwuletnich – badania podstawowe i praktyka hodowlana	67
M. _____, B. _____, I. _____, J. _____	
Efektywność regeneracji roślin w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy jarej i ozimej	69
_____, K. _____, S. _____, I. _____, I. _____	
Inhibitory metylacji związków efektywność embriogenezy mikrospor pszenicy zwyczajnej	71
_____, M. _____, P. _____, E. _____, M. _____, R.E. _____, J. _____, I. _____	
Dynamika transkryptomu mikrospor zmieniającego się podczas indukcji procesu embriogenezy	73
K. _____, M. _____, M. _____ - _____, E. _____	
Przyczyny słabej konwersji haploidalnych zarodków owsa ( <i>Avena sativa</i> L.)	75
_____, E. _____, E. _____ - _____, _____, R. Perez-Perez, E. _____, K. _____, _____, M. _____	
Gryka w kulturach in vitro: stan obecny i perspektywy	77
N. _____	
Fizyczne czynniki mutagenne jako narzędzie w hodowli twórczej roślin ozdobnych in vitro	79
_____ Praktyczne zastosowanie osiągnięć z dziedziny kultur in vitro i biotechnologii	81
E. _____, L. Róg	
Wykorzystanie kultur in vitro w programach hodowlanych warzyw, w spółce PlantiCo Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Zielonki Sp. z o.o.	83
T. _____, J. Radosz Noga-	
Praktyczne wykorzystanie mikrorozmnażania w produkcji szkółkarskiej	86

<b>P. Norwa, K. Norwa Majos, M.</b>	
Wielkoskalowa produkcja ro lin metod kultur tkankowych w praktyce.....	88
<b>I. _____, M. _____</b>	
Komercyjny wiat kultur tkankowych.....	90
_____	
Produkcja sadzonek in vitro w formie Inf ora.....	92
_____	
Kultury ro linne w warunkach stresu.....	95
<b>I. _____ - _____, J. _____, T. Wojda</b>	
Wpływ stresu suszy na wzrost wybranych klonów robinii ( <i>Robinia pseudoacacia</i> L.) w warunkach kultur in vitro .....	97
_____, <b>M. _____, U. _____, Y. _____</b>	
Glikozydy cyjanogenne w lnie ( <i>Linum usitatissimum</i> ) w rozwoju i odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne .....	99
<b>M. _____ - _____, I. _____</b>	
Zastosowanie chitozanu i nanosrebra w łagodzeniu stresu wywołanego metalami ciężkimi u <i>Solanum pimpinellifolium</i> in vitro.....	101
_____	
Wykorzystanie szczepów <i>Fusarium</i> znakowanych fluorescencyjnie w badaniu infekcji lnu.....	103
<b>M. _____, K. _____</b>	
Zmienne pole elektromagnetyczne jako czynnik regulujący ekspresję genów w ro linach na przykładzie lnu .....	105
<b>W. _____ - _____, M. _____ - Stawarz, M. _____, J. _____ - _____</b>	
Uczulanie lnu niepatogennym szczepem <i>Fusarium oxysporum</i> : wpływ na infekcje szczepem patogennym.....	107
<b>K. _____</b>	
Krioprezervacja w ochronie zasobów genowych ziemniaka.....	109
_____	
_____	
Zmiany proteomiczne podczas przeprogramowania komórek <i>Fagopyrum esculentum</i> i <i>F. tataricum</i> .....	111
<b>POSTERY</b> .....	113
_____	
Procesy różnicowania in vitro i ich uwarunkowania.....	115
<b>R. _____, J. _____, J. _____, P. _____, P.T. _____</b>	
Model regeneracji ro lin zielonych u pszenicy.....	117
_____	
Wpływ różni jako ci światła LED na wzrost i rozwój warkoczniczy jesiennej ( <i>Eucomis autumnalis</i> ) in vitro.....	119
_____, <b>M. _____ - Sowa, Z. _____</b>	
Uprawa ro lin serdecznika syberyjskiego ( <i>Leonurus sibiricus</i> L.) w kulturach in vitro .....	121
<b>M. _____</b>	
Zmiany zawartości kalozy w trakcie somatycznej embriogenezy paproci drzewiastej <i>Cyathea delgadii</i> .....	123

N. _____ - _____, K. Nawrot-	
Uzyskiwanie kalusa i siewek wi ąz szypulkowego ( <i>Ulmus laevis</i> ) in vitro – wykorzystanie tkanek w kulturach dualnych.....	125
E. _____ - _____, J.	
Gatunki z rodziny Thymelaeaceae jako obiekty eksperymentów in vitro.....	127
_____, M. _____, R.	
Analiza wpływu nanocz ęstek tlenku cynku na kultury in vitro <i>Nigella damascena</i> L.....	129
M. _____, J. Mazur, _____	
Formowanie in vitro cebul <i>Lachenalia viridiflora</i> .....	131
_____, M. _____, B.	
Wpływ wiatła LED o ró żnej długo ci fali na kiełkowanie nasion i dalszy wzrost storczyków z rodzaju <i>Bletilla</i> .....	133
W. _____, M. _____, M. _____, I. _____, S. _____,	
<i>Agrostemma githago</i> w kulturach in vitro.....	135
M. _____, K. Norwa, P. Norwa, J. _____ Majos, E.	
Porównanie wydajno ci produkcji p ędów bylin ( <i>Echinacea</i> , <i>Heuchera</i> , <i>Hosta</i> ) w bioreaktorach Rita® i Setis®.....	137
P. _____, M.	
Wykorzystanie <i>meta</i> -Topoliny i karriki w organogenezie bezpo redniej triploidalnych form <i>Hippeastrum</i> .....	139
M. _____	
Kultury merystemów <i>Tulipa tarda</i> .....	141
K. _____, B.	
Mikrorozmna nianie <i>Lilium martagon</i> z wykorzystaniem kultur płynnych .....	143
P. _____, B.	
Organogeneza przybyszowa <i>Lilium candidum</i> L. na po ywce cytokininowej pod wpływem wiatła LED.....	145
B. _____, B.	
Ukorzenianie p ędów <i>Pennisetum</i> 'Vertigo®' w kulturach in vitro w ró żnych warunkach wietlnych .....	147
_____, P. _____, K.	
Zastosowanie karriki w mikrorozmna niu narcyza ( <i>Narcissus</i> L.) .....	149
P. _____, O.	
Indukcja kalusa oraz regeneracja ro lin wierzby purpurowej ( <i>Salix purpurea</i> L.) w warunkach in vitro.....	151
B. _____, B. _____, J.	
Ocena zdolno ci regeneracyjnej in vitro aloesu sokotrza ńskiego ( <i>Aloe succotrina</i> Lam.) .....	153
J. _____, E.	
Wpływ cytokinin na namna nianie p ędów <i>Salvia candelabrum</i> Boiss. ....	155
K. _____, K. _____, E.	
Wpływ inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na wzrost potencjału regeneracyjnego w kulturach protoplastów czosnku i cebuli.....	157



B. _____, K.M. _____, W. _____, K. _____, S. _____ Ukorzenianie p dów in vitro l d wianu siewnego ( <i>Lathyrus sativus</i> L.) wró nych podło ach	159
M. _____, O. _____ Optymalizacja procesów mikro rozmna nia ro lin tarczycy brodatej ( <i>Scutellaria barbata</i> ) w kulturach in vitro .....	162
_____ Mikro rozmna nianie oraz aklimatyzacja tetraploidów agrestu ( <i>Ribes grossularia</i> L.) i czere ni ( <i>Prunus avium</i> L.) .....	164
_____, P. _____ Hormonalna regulacja ryzogenezy <i>Rheum raponticum</i> in vitro .....	166
_____ Biosynteza metabolitów wtórných w kulturach in vitro .....	169
<b>K. Buch</b> _____, M. _____ Wpływ długo ci fali wietlnej na zawarto substancji bioaktywných w ro linach pigwowca japo skiego ( <i>Chaenomeles japonica</i> ) rozmna nanych metod in vitro .....	171
P. _____, M. _____, H. _____ Kultury in vitro <i>Verbena officinalis</i> jako bogate ró dło glikozydów fenylopropanoidowych - werbaskozydu i izowerbaskozydu .....	174
M. _____ Genetyczna i biochemiczna charakterystyka regenerantów stewii ( <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) otrzymaných drog organogenezy po redniej .....	176
M. _____ Kultury in vitro mszaków jako narz dzie w badaniu wytwarzania zwi zków bioaktywných .....	178
I. _____, M. _____ Wpływ warunków o wietlenia na wzrost i akumulacj polifenoli w kulturach in vitro kilku gatunków szalwi .....	180
M. _____, I. _____ Strategia suplementacji egzogennymi prekursorami w produkcji kwasu rozmarynowego w korzeniach wło nikowatých <i>Salvia bulleyana</i> .....	182
M. _____, J. _____, R. _____ Wpływ regulatorów wzrostu na biosyntezy wybranych zwi zków chemicznych u <i>Coleus scutellarioides</i> (L.) Benth. ....	184
M. _____, J. _____, R. _____ Wpływ kwasu salicylowego na elicytacj metabolitów wtórných w kulturach <i>Nigella damascena</i> L. ....	186
_____ <i>Callitriche cophocarpa</i> uprawiana w kulturach in vitro jako ró dło metabolitów wtórných o działaniu bakteriobójczym .....	188
W. _____, J. _____, M. _____, P. _____, B. _____, K.M. _____ Synteza zwi zków fenolowych w kulturach płynnych i bioreaktorowych rdostowca japo skiego ( <i>Reynoutria japonica</i> Houtt.) i ich wła ciwo ci biologicznie czynne .....	190

W. _____, M. _____, M. _____, M. _____, S. _____, R. _____, W. _____, I. _____, F. _____, _____	
Kultury in vitro <i>Gypsophila elegans</i> i <i>Agrostemma githago</i> jako źródło triterpenoidów i fawono-C-glikozydów .....	192
S. _____, M. _____, M. _____	
Aktywność przeciwbakteryjna <i>Drosera cayenensis</i> , <i>Drosera derbyensis</i> i <i>Drosera ultramafica</i> hodowanych w kulturach in vitro .....	194
_____, M. _____, E. _____, F. _____, R. _____, M. _____	
Wpływ temperatury na biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae w kulturach in vitro <i>Leucojum</i> <i>aestivum</i> L. ....	196
E. _____	
Wpływ płynnego podłoża i światła LED na namnaianie pędów <i>Rhaponticum carthamoides</i> (Willd.) Iljin. i produkcję kwasów kawoilochinowych.....	198
_____, P. _____, M. _____, E. _____	
Badania metabolomiczne kalusa i zawiesiny komórkowej bazylii ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) .....	200
K. _____, K. _____, P. _____, M. _____,	
Wpływ primingu na zmiany w profilu chemicznym ekstraktów z korzeni transgenicznych <i>Taxus × media</i> .....	202
_____, M. _____, K. _____, P. _____, I. _____, M. _____	
Profil fitochemiczny oraz aktywność biologiczna ekstraktów z różnych typów kultur in vitro <i>Schisandra sphenanthera</i> .....	204
I. _____, L. _____	
Wpływ jonów metali na biosyntezy bioaktywnych polifenoli w kulturach pędów <i>Dracocephalum forrestii</i> .....	206
_____, K. _____, R. _____	
Zawartość związków biologicznie czynnych i zdolności regeneracyjne słonolubnego modraka morskiego ( <i>Crambe maritima</i> L.) w zależności od źródła jonów chlorkowych w pożywce.....	208
_____	
Metody biotechnologiczne w tworzeniu nowych odmian roślin.....	211
_____ Chuda, L. _____, M. _____	
Badania nad androgenezą u <i>Brassica oleracea</i> L. prowadzone w KBRiB dla potrzeb hodowli odmian heterozygicznych.....	213
_____, T. _____	
Uzyskiwanie mieszańców międzygatunkowych <i>Nicotiana tabacum</i> × <i>Nicotiana glauca</i> z wykorzystaniem kultur in vitro.....	215
E. _____, K. _____, K. _____	
Protoplasty w badaniach podstawowych i aplikacyjnych u wybranych warzyw.....	217
W. _____, M. _____, M. _____,	
Kultury izolowanych mikrospor papryki ( <i>Capsicum annuum</i> L.) .....	219
C. _____, M. _____	
Zastosowanie technologii Oligo w modulacji aktywności genów roślinnych na przykładzie <i>Solanum tuberosum</i> .....	221

<u>M.</u> _____, <u>I.</u> _____, <u>P.</u> _____, <u>K.</u> _____, <u>E.</u> _____ Udział proteaz cysteinowych w regulacji programowanej śmierci komórki (PCD) w procesie embriogenezy mikrospor u pszen yta ozimego ( <i>Triticosecale</i> Wittm.) .....	223
<u>V.</u> _____, <u>R.K.</u> _____, <u>G.</u> _____ Characterisation of transgenic tobacco plants expressing defence genes isolated from <i>Hypericum perforatum</i> L. by T-DNA transfer assay.....	225
_____ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mutant library for understanding the function of Vir genes in plant transformation .....	226
_____ Ekspresja genów zwi zanych z biosyntezy antocyjanów u autotetraploidów <i>Vaccinium</i> <i>myrtillus</i> L. ....	227
<u>E.</u> _____, <u>M.</u> _____, <u>P.</u> _____ Wykorzystanie podwojonych haploidów jako narzędzi biotechnologicznych w hodowli zbó ozimych w Hodowli Ro lin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR.....	229
<u>M.M.</u> _____, <u>S.</u> _____ Wykorzystanie metody CRISPR/Cas9 w aktywacji transkrypcyjnej wybranych genów zwi zanych z cechami plonotwórczymi.....	231
<u>W.M.</u> _____, <u>R.</u> _____, <u>P.T.</u> _____ Model działania jonów metali w po ywce indukującej ujemną czmieniacz wydajno regeneracji ro lin zielonych .....	233
<u>J.</u> _____, <u>M.</u> _____, <u>M.</u> _____ Wpływ genotypu oraz czasu traktowania chłodem na indukcję androgeny i regenerację czmieniacz ozimego.....	235
<u>M.</u> _____, <u>M. Marat</u> , <u>K.</u> _____ Wytwarzanie autopoliploidów gatunków sadowniczych w kulturach in vitro z przeznaczeniem do hodowli twórczej.....	237
<u>E.</u> _____ Charakterystyka linii addycyjnych owsa ( <i>Avena sativa</i> L.) z kukurydzy ( <i>Zea mays</i> L.) .....	240
<u>W.</u> _____ Próby indukcji gynogenezy u pomidora ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) z zastosowaniem kultur zależnych oraz izolowanych zależnych ków.....	242
<u>K.</u> _____, <u>I. Mezoued</u> , <u>M.H.</u> _____ Wpływ inhibitorów metylacji na kultury pylnikowe mieszańców F <sub>1</sub> pszenicy ozimej.....	244
_____, <u>G.</u> _____ Zastosowanie kultur in vitro w ocenie dziedziczenia introgresji od <i>Nicotiana glauca</i> w segregującej populacji F <sub>2</sub> mieszańców tytoniu .....	246
<u>M.</u> _____, <u>E.</u> _____ Wpływ temperatury i rodzaju po ywki indukcyjnych na androgenę owsa ( <i>Avena sativa</i> L.) Kultury ro linne w warunkach stresu.....	249
_____, <u>B.</u> _____, <u>W.</u> _____, <u>I.</u> _____, <u>O.</u> _____, <u>M.</u> _____, _____, <u>Y.</u> _____ Hormony ro linne u lnu traktowanego spermidyną i infekowanego patogennym grzybem	253

<b>S.</b> _____, <b>S.</b> _____, <b>L.</b> _____, <b>G.</b> _____	
Effects of plant growth regulator-based nanoformulations on bacterial and plant cell viability.....	255
<b>W.M.</b> _____ <b>Gaj</b>	
Związki z odpowiedzi na stres gen <i>ESK1</i> pozytywnie reguluje odpowiedź embriogeniczną komórek somatycznych w kulturze in vitro <i>Arabidopsis</i> .....	256
<b>M.</b> _____ , <b>J.</b> _____ , <b>B.</b> _____ , <b>Y.</b> _____ , <b>W.</b> _____	
Dynamika ciąony komórkowej wywołana przez uczulanie lnu niepatogennym szczepem <i>Fusarium oxysporum</i> .....	258
<b>M.</b> _____ , <b>W.</b> _____ , <b>M.</b> _____ , <b>M.</b> _____	
Krioprezewacja czosnku pospolitego ( <i>Allium sativum</i> L.) w ciekłym azocie.....	260
<b>Y.</b> _____ , <b>J.</b> _____ , <b>Z.</b> _____ , <b>I.</b> _____ , <b>B.</b> _____ , <b>M.</b> _____	
Wpływ apokarotenoidów na infekcję <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> lnu zwyczajnego.....	262
<b>P.</b> _____ , <b>G.</b> _____	
Development of floating seedling cultures of <i>Hypericum perforatum</i> L. for a detailed understanding of the effects of engineered nanoparticles on plants.....	264
<b>M.</b> _____ , <b>K.</b> _____	
Wykorzystanie kultur in vitro grzybów zgniliznowych dla określenia ich wpływu na rozkład sosnowego substratu drzewnego.....	265
_____, <b>T. Hura</b>	
Zastosowanie heterotroficznych i autotroficznych siewek pszenicy jarej w badaniach tolerancji stresu wodnego.....	268
<b>M.</b> _____ , <b>L.</b> _____ , <b>G.</b> _____	
Quantification of gold and silver nanoparticles/ions in shoots and roots of floating seedling cultures of <i>Hypericum perforatum</i> L. ....	270
<b>M.</b> _____ , <b>Z.</b> _____ , <b>K.</b> _____ , <b>S.</b> _____ , <b>M.</b> _____ , <b>W.</b> _____	
Wpływ krioprezewacji poprzez kapsułkowanie-dehydratację na kinetykę wzrostu, potencjał embriogeniczny i wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach zawiesinowych <i>Gentiana capitata</i> Buch.-Ham. ex D.Don i <i>Gentiana decumbens</i> L.f.....	271
_____, <b>K.</b> _____ , <b>M.</b> _____ , <b>B.</b> _____ , <b>R.M.</b> _____ , <b>M.</b> _____ , <b>J.M.</b> _____ , <b>K.</b> _____	
Wpływ czasu dehydratacji powietrznej w procesie krioprezewacji korzeni transformowanych <i>Polyscias filicifolia</i> na ich stabilność genetyczną i profil fitochemiczny.....	273
<b>E.</b> _____ , <b>K. Hura</b> , <b>B.</b> _____	
Wpływ białka AFP III na krioprezewację wierzchołków wzrostu <i>Rosa multiflora</i> .....	276
<b>K.</b> _____ , <b>M.</b> _____ , <b>T. Hura</b>	
Fizjologiczne i molekularne konsekwencje inhibicji amoniakolizacji <i>L</i> -fenyloalaniny u pszenicy jarej.....	278
<b>U.</b> _____ , <b>M.K.</b> _____ , <b>J.P.R.</b> _____ , <b>P.</b> _____ , <b>P.</b> _____	
Kriokonserwacja plumuldy bu bezszypułkowej ( <i>Quercus petraea</i> (Matt.) Liebl.) przy użyciu krioplatek aluminiowych: wpływ krioprotekcji i podsuszania.....	280

## Wstęp

Przed nami księżka streszczeń referatów i posterów, które będą prezentowane podczas XVI Ogólnopolskiej Konferencji Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin odbywającej się na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie. Po covidowej przerwie wznawiamy cykliczne naukowe zjazdy, a liczba zgłoszonych w tym roku uczestników (ponad 150) potwierdza potrzebę i słuszność ich kontynuowania. Gościmy nie tylko naukowców, wybitnych profesorów, młodych badaczy, doktorantów i studentów, ale też przedstawicieli różnych sektorów gospodarki, wykorzystujących osiągnięcia nauki w działalności swoich firm. Taka sytuacja dobrze koresponduje z tytułem tegorocznej konferencji: „BIOTECHNOLOGIA I KULTURY IN VITRO ROŚLIN W BADANIACH PODSTAWOWYCH I APLIKACYJNYCH”.

Spotykamy się po pięćdziesięciu latach od pierwszej Krajowej Konferencji Kultur Tkankowych w Polsce, która odbywała się w Radzikowie w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. Śdzisiaj wśród nas, obecni też na tamtej konferencji, prof. Jan Rybczyński i prof. Elżbieta Zenktelek, która zainicjowała w Polsce uwalnianie roślin od wirusów poprzez kultury merystemów, a potem propagowała mikrorozmnianie na szeroką skalę. Ogromne zasługi dla rozwoju kultur tkankowych wniósł prof. Maciej Zenktelek, uważany za pioniera polskich kultur in vitro, nauczyciel, *spiritus movens* wielu pokoleń polskich specjalistów posługujących się technikami in vitro. Dwadzieścia lat od pierwszej konferencji in vitro, w czerwcu 1994 roku, Profesor zorganizował w Białejce koło Poznania ważne spotkanie naukowe pt. „Kultury in vitro w Polsce – aktualny stan i perspektywy”, gromadząc prawie wszystkich polskich naukowców zajmujących się tą dziedziną. Wtedy podjęto decyzję o założeniu Sekcji Kultur Tkankowych Roślin działającej w ramach Polskiego Towarzystwa Botanicznego. Powołano ją w tym samym roku na jesiennym posiedzeniu Zarządu Głównego, legalizując wieloletnią działalność badaczy in vitro. Właśnie mija 30 lat od powstania Sekcji. Warto wspomnieć, że w grupie założycielskiej byli m.in. uznani dziś profesorowie: Elżbieta Zenktelek, Teresa Orlikowska, Małgorzata Podwyszyńska i Jan Rybczyński. Funkcję przewodniczącego powierzono wówczas prof. Rybczyńskiemu, który już wcześniej, bo od 1984 roku wprowadził regularnie w organizację ogólnopolskich konferencji in vitro. Troszczył się również o stworzenie warunków zapewniających wysoki poziom merytoryczny tych wydarzeń oraz brał udział w ich organizacji, współpracując z różnymi zespołami naukowców. Konferencje odbywały się w wielu ośrodkach akademickich, w tym roku zapraszamy Państwa w gościnne progi Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Głównym zadaniem Sekcji Kultur Tkankowych Roślin PTB jest organizacja konferencji naukowych, podczas których odbywa się prezentacja najnowszych osiągnięć badaczy zajmujących się różnymi kulturami in vitro i różnymi biotechnologiami, pracuj-

cyh w o rodkach naukowych w Polsce. Spotkania te daj mo liwo dzielenia si wiedz oraz prowadzenia dyskusji nad najwa niejszymi problemami w badaniach podstawowych i stosowanych. Odbywaj ca si konferencja realizuje i rozwija zało one strategie. Stwarza najlpsz okazj do rozwoju współpracy miedzy naukowcami, co wi cej daje mo liwo nawi zania kooperacji mi dzy instytucjami badawczymi i przedsi biorcami wykorzystu j cymi techniki in vitro w praktyce. W tegorocznej konferencji uczestniczy b dzie wielu przedstawicieli sektora gospodarczego reprezentuj cych znane w Polsce f rmy produkcyjne i hodowlane. W sekcji zatytułowanej: „Praktyczne zastosowanie osi gni z dziedziny kultur in vitro i biotechnologii”, prelegenci zaprezentuj aplikacyjne wykorzystanie wyników bada naukowych, jak równie podziel si do wiadzeniami. Mamy nadziej , e b dzie to przyczynkiem do powstania efektywnego pomostu mi dzy praktyk i nauk .

Do udziału w sesji plenarnej zaprosili my uznanych na wiecie zagranicznych naukowców. Dr Margerita Beruto jest przewodnicz c sekcji Ro lin Ozdobnych w International Society for Horticultural Science, byłym dyrektorem Regional Institute for Floriculture w Sanremo we Włoszech. Prowadzi ona badania w cisłej współpracy z producentami, a zdobyt wiedz wspiera hodowców i producentów kwiciarzy. Dr Sergio Ochatt jest znany polskim badaczom redaktorem naczelnym czasopisma Plant Cell Tissue and Organ Culture, redaktorem Nature Scientific oraz Frontiers in Plant Science. Jest naukowcem w French National Institute for Agriculture, Food, and Environment, z ponad 45-letnim do wiadzeniem zwi zany z szeroko rozumian biotechnologi ro lin. W sesji plenarnej prof. Małgorzata Podwyszy ska przedstawi kluczow rol kultur in vitro w praktyce i hodowli ro lin, a zaproszyny specjalnie przez organizatorów, prof. Rałal Bara ski zapozna uczestników z najnowszymi mo liwo ciami hodowli z u yciem systemów CRISPR/Cas.

W dziedzinie biotechnologii ro lin nast pił ogromny post p, a kultury in vitro stoj na czele tego rozwoju. Techniki in vitro stały si niezbdnymi narz dziami wró nych dziedzinach nauki o ro linach, pozwalaj pogł bia podstawow wiedz na temat biologii ro lin, ale tak e nap dzaj innowacje w hodowli ro lin, produkcji metabolitów wtórnych, rozmna aniu ro lin na du skal oraz ochronie ró norodno ci biologicznej. Potwierdza ten stan rzeczy tegoroczna konferencja. Tematy naukowo-badawcze podejmowane podczas konferencji prezentowane b d w sesjach tematycznych dotycz cych procesów ró nicowania in vitro i ich uwarunkowa , biosyntezy metabolitów wtórnych w kulturach in vitro, metod biotechnologicznych w tworzeniu nowych odmian ro lin, a tak e kultur ro linnych w warunkach stresu. Do ka dej sesji referatowej dopasowane s sesje posterowe. Ł cznie na konferencji wygłoszonych zostanie 40 referatów i zaprezentowanych 78 posterów.

W miar ci głego rozwoju i udoskonalania technik, potencjał przełomowych odkry i zwi zanych z nimi praktycznych zastosowa pozostaje nieograniczony. Mamy nadziej , e zaprezentowanie najnowszycy osi gni i dzielenie si wiedz podczas odbywaj cej si konferencji stanie si inspiracj przyszłych bada w dynamicznej dziedzinie ro linnych kultur in vitro i biotechnologii ro lin.

w imieniu organizatorów,  
prof. dr hab. Bo ena Pawłowska,  
przewodnicz ca Komitetu Organizacyjnego

## Preface

The following “Book of Abstracts” is a collection of abstracts from the papers and posters that will be presented during the 16<sup>th</sup> National Conference of In Vitro Cultures and Plant Biotechnology held at the University of Agriculture in Krakow. We have titled the conference “BIOTECHNOLOGY AND IN VITRO PLANT CULTURES IN BASIC AND APPLIED RESEARCH”. We are resuming our regular scientific meetings post Covid, and this year over 150 participants have registered confirming the interest in this area. We will host scientists, outstanding professors, young researchers, PhD students, and representatives of various sectors of the economy who use these scientific achievements in their companies’ activities.

This year marks fifty years since the first National Conference of Tissue Cultures in Poland, which took place in Radzików at the Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR). Our members include Prof. Jan Rybczyński and Prof. Elbieta Zenkteler, who initiated the release of plants from viruses in Poland through meristem cultures and then promoted micropropagation on a large scale. Additionally Prof. Maciej Zenkteler will join us, as he is considered a pioneer of Polish in vitro culture, teacher and a multi-generational driving force of Polish specialists using in vitro techniques and has made a huge contribution in the field of tissue culture.

In June 1994, twenty years after the first in vitro conference, Professor Zenkteler organized in Błażejówko near Poznań an important scientific meeting entitled “In vitro cultures in Poland - current status and perspectives”, which brought together almost all of the Polish scientists involved in this field. At that time “Plant Tissue Culture” was formed as a new section of the Polish Botanical Society. In the autumn of the same year the Main Board formalised and legally acknowledged the many years of activity of the in vitro researchers. 2024 marks 30 years since the establishment of this Section, of which the founding group included some of today’s renowned professors: Elbieta Zenkteler, Teresa Orlikowska, Małgorzata Podwyszyńska and Jan Rybczyński. Prof. Rybczyński was named chairman and had already introduced regular nationwide in vitro conferences since 1984. He also ensured high substantive levels at these events and participated in their organization, cooperating with various teams of scientists. Conferences were held in various academic centres, this year we proudly hosting the conference in the grounds of the University of Agriculture in Krakow.

The main task of the Plant Tissue Culture Section of the Polish Botanical Society is to organize scientific meetings illustrating the latest achievements of the Polish research centres that work with plants in in vitro cultures and plant biotechnology. These meetings provide an opportunity to share knowledge and hold discussions on the most



important problems in basic and applied research. Our 2024 conference continues the theme of implementing and developing this area of science. It creates optimal opportunities to develop cooperation between scientists. Additionally it provides an proverbial seedbed to establish cooperation between research institutions and companies which use in vitro techniques in practice. This year's conference will be attended by many representatives of the economic sector representing well-known production and breeding companies in Poland. In the title: "The practical application of achievements in the field of in vitro cultures and biotechnology", scientists and speakers will share their experiences, contributing to the creation of an effective bridge between practice and science.

We have invited internationally recognized scientists to participate in the plenary session. Dr. Margerita Beruto, Chair of the Ornamental Plants Section of the International Society for Horticultural Science, former Director of the Regional Institute for Floriculture Sanremo in Italy, conducts research in close cooperation with producers, and the knowledge gained has enabled her to support breeders and florist producers. Dr. Sergio Ochatt, well known to Polish researchers, editor-in-chief of the journal *Plant Cell Tissue and Organ Culture* and editor of *Nature Scientific* and *Frontiers in Plant Science*. He is the scientist at the French National Institute for Agriculture, Food, and Environment, with over 45 years of experience in broadly understood plant biotechnology. In this session, Prof. Małgorzata Podwyszyńska will present the key role of plant breeding and in vitro culture in practice. By the special invitation of the organizers, Prof. Rafał Barański will introduce participants to the latest breeding possibilities using CRISPR/Cas systems.

There has been enormous progress in the field of plant biotechnology and in vitro culture is at the forefront of these developments. In vitro techniques have become essential tools in various fields of plant science, allowing for the deepening of basic knowledge of plant biology, but also driving innovations in plant breeding, production of secondary metabolites, plant propagation on a large scale and protection of biological diversity. The scientific and research topics studied during the conference will be presented in thematic sessions concerning the in vitro differentiation processes and their determinants, biosynthesis of secondary metabolites in in vitro cultures, biotechnological methods in creating new plant varieties, as well as plant cultures under stress conditions. Poster sessions are matched to each paper session. A total of 40 papers will be presented at the conference and 78 posters will be presented.

As techniques are continually developed and improved the potential for breakthrough discoveries and practical applications remains unlimited. We hope that highlighting the latest achievements and sharing knowledge during the conference will inspire future research in the dynamic field of plant in vitro cultures and plant biotechnology.

on behalf of the organizers,  
prof. dr hab. Bożena Pawłowska,  
chairwoman of the Organizing Committee

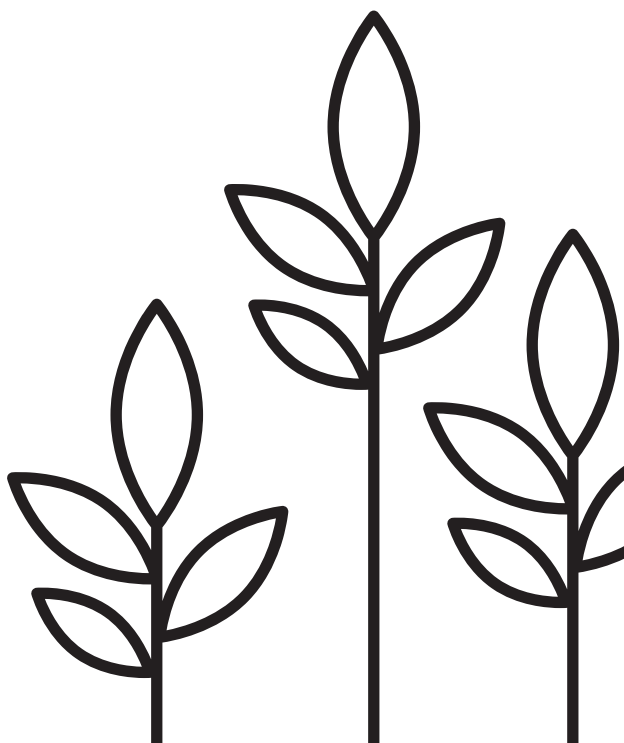


# WYKŁADY





## SESJA PLENARNA







## Micropropagation of ornamental plants: a bridge between research and production

M. BERUTO

International Society for Horticultural Science (ISHS), Sanremo, Italy;  
e-mail: margheberuto@gmail.com

Micropropagation is a widely recognized technique used to aseptically cultivate plant tissues inside vessels with nutrients and growth regulators and under controlled incubation conditions. This technique has reached a great impact in the horticulture industry since large quantities of high-quality plants identical to the stock plant can be produced in a relatively short time. Moreover, this technology supports the breeding programs, allows to conserve in vitro germplasm of elite genotypes, and can develop disease-free plants. The technologies related to plant biosynthesis through cell and root cultures are a part of micropropagation too and it is expected that these applications will enhance the impact of the global micropropagation market during the coming years. In 2019, the production of tissue culture plants was about 1.5 to 2 billion units, with an annual growth of 5%–10%. This growth is attributed to the enhanced technology in the horticulture industry requiring good quality of plant materials and extension of the cultivations. The ornamental sector is highly active and internationalized with breeders, growers, and retailers and shows traditionally a great impact on micropropagation industry; nowadays several plant species and cultivars are commercially in vitro propagated. Important connections between fundamental and applied research and commercial operations allowed this important development. This review, although not exhaustive, wants to highlight some important challenges of the micropropagation industry with particular attention to the costs of production which could represent a severe limitation on extending the tissue culture business and the ecophysiology of the in vitro cultures. In addition, some examples will be provided on how micropropagation could create new products for the market.



## Unusual plant growth regulators in tissue culture and their impact on in vitro biotechnology

S.J. OCHATT

Agroécologie, InstitutAgro Dijon, INRAE,  
Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France;  
email: sergio.ochatt@inrae.fr

Traditionally, plant growth regulators (hereafter PGR) have been classed into five major types or groups, i.e., auxins, gibberellins (GAs), cytokinins, abscisic acid (ABA) and ethylene. However, in addition to these there are several more, natural and/or synthetic, less frequently used derivative compounds which also act as PGRs in studies of in vitro biotechnology. During their life cycle, plants are exposed to several signals, some positive other negative, that will modulate their growth and development as also their reaction vis-a-vis different biotic and abiotic stress-inducing agents. Such signals are recognized by specific receptors located in the environment immediately surrounding the cell wall and their binding sites are located in the plasma membrane. Their recognition of those signals, among which are the PGRs, drives the cell to launch a range of physiologic and metabolic processes leading to the adequate responses to both stimuli and stresses, ensuring a sustainable growth, development, differentiation, and metabolic activity. This results in a satisfactory tolerance to constraints, an efficient growth and productivity of both tissues and the potential secondary metabolites of interest that this encompasses. For a successful implementation of new genetic technologies including gene transfer and genome editing, an efficient and reliable regeneration from tissues cultured in vitro is a prerequisite, and this requires the identification and utilisation of PGRs capable of fostering the regeneration competence from both undifferentiated tissues and cultured organs. Significant advances have been done in this domain but, unsurprisingly, they have mainly concerned the major groups of PGRs, while studies on other, less frequently used substances with hormonal action still require extensive

research input. Moreover, despite decades of research, poor in vitro regeneration is still a costly bottleneck for numerous plant genotypes, including elite cultivars, to the extent that it can sometimes prevent altogether micropropagation or transgenesis in certain species. Against this background, this talk will discuss the nature, chemical structure, and action of other less frequently used PGRs, be it those found recently in chemical libraries (i.e., rotenone and other specific inhibitors of the mitochondrial electron transport chain complex I) or others which are slowly but surely finding their way into the literature on plant regeneration competence and its modulation, including brassinosteroids, strigolactones, phytosulfokines, methyl jasmonate, salicylic acid, sodium nitroprusside, hydrogen sulfide, various plant growth retardants and inhibitors (e.g., Ancymidol, Uniconazole, Flurprimidol, Paclobutrazol), and polyamines.



## Kultury in vitro w praktyce ogrodniczej i hodowli

M. PODWYSZYŃSKA

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;  
e-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl

Historia kultur roślinnych in vitro rozpoczęła się ponad 120 lat temu. Kultury in vitro były początkowo wykorzystywane do badań podstawowych. Przełomowe dla rozwoju badań i wykorzystania kultur in vitro do masowej produkcji mikrosadzonek czy hodowli roślin było opracowanie przez Murashige i Skooga w 1962 r. podłoża do hodowli in vitro kalusa tytoniu (MS). Podstawowy skład tej pożywki okazał się na tyle doskonały, że obecnie jest powszechnie stosowany w kulturach in vitro wielu gatunków roślin. Przedstawione będą przykłady wykorzystania metody kultur in vitro w produkcji i hodowli gatunków ogrodniczych w Polsce. Krajowa produkcja roślin w kulturach in vitro jest jedną z największych w Europie. Obecnie metody in vitro są powszechnie wykorzystywane do produkcji wysokiej jakości materiału rozmnożeniowego roślin sadowniczych oraz wieloletnich roślin ozdobnych i warzywnych. Dla wielu gatunków o dużym znaczeniu gospodarczym opracowano systemy oceny jakości, zdrowotności i tożsamości genetycznej mikroorganizmów z wykorzystaniem metod serologicznych i molekularnych. Techniki in vitro są szeroko stosowane w hodowli, m.in. do wytwarzania podwojonych haploidów (DH), czyli szybkiego otrzymywania roślin homozygotycznych na drodze androgenyzy i gynogenyzy (marchew, cebula, warzywa kapustne i burak). Dzięki temu możliwe jest skrócenie czasu hodowli o kilka lat i obniżenie jej kosztów. Uzyskane linie DH są wykorzystywane do wytwarzania nowych odmian – mieszańców heterozygotycznych. W ostatnich latach przy użyciu technik in vitro wytworzono autopoliploidy kilku gatunków roślin sadowniczych i ozdobnych. Proces podwojenia liczby chromosomów jest ważnym źródłem zmienności. Autotetraploidy po pozytywnej ocenie kwitnienia, płodności, owocowania czy odporności na choroby przeznaczane są do dalszej hodowli: odmian triploidalnych (jabłko, tulipany), do pokonania bariery



krzy owalno ci (borówka czernica), czy uzyskania plennych mieszańców (czerechy); autotetraploidy same w sobie mogą stanowić nowe odmiany (liliowiec). Kultury *in vitro* są także stosowane do ratowania zarodków (embryo rescue) w krzyżowaniach oddalonych i interploidalnych, w celu pokonywania postzygotycznych barier krzyżowalności, kiedy dochodzi do zapłodnienia, ale rozwój bielma, a następnie nasion jest zaburzony (krzyżowania w obrębie *Prunus*, *Brassica* i *Ribes*). Celem takich badań jest wprowadzenie nowych cech z gatunków pokrewnych, często dzikich lub genotypów różnej ploidalności. Techniki *in vitro* są również stosowane w przypadku, gdy niemożliwe jest uzyskanie mieszańców oddalonych na drodze rozmnażania płciowego, gdy nie dochodzi do zapłodnienia. W takim przypadku zastosowanie znajduje hybrydyzacja somatyczna, w wyniku której w procesie fuzji protoplastów wytwarzane są mieszańce somatyczne. Dzięki tej technice możliwe jest wprowadzenie nowych cech niewystępujących u gatunków uprawnych.

## In vitro culture in horticultural practice and breeding

The history of *in vitro* plant cultures began over 120 years ago. *In vitro* cultures were initially used for basic research. A breakthrough for the development of research and the use of *in vitro* cultures for mass production of microcuttings or plant breeding was the development by Murashige and Skoog in 1962 of a medium for *in vitro* culture of tobacco callus (MS). The basic composition of this medium turned out to be so perfect that it is now widely used in *in vitro* cultures of many plant species. Examples of the use of the *in vitro* culture method in the production and breeding of horticultural species in Poland will be presented. The domestic production of plants in *in vitro* cultures is one of the largest in Europe. Currently, *in vitro* methods are widely used to produce high-quality propagation material for fruit plants and perennial ornamental and vegetable plants. For many species of great economic importance, systems for assessing the quality, health and genetic identity of micropropagated plants, using serological and molecular methods, have been developed. *In vitro* techniques are widely used in breeding, including the production of doubled haploids (DH), i.e. the rapid production of homozygous plants via androgenesis and/or gynogenesis (carrot, onion, *Brassica* vegetables and beet). Thanks to this, it is possible to shorten the breeding time by several years and reduce its costs. The obtained DH lines are used to produce new cultivars – heterosis hybrids (F1). In recent years, autopolyploids of several species of fruit and ornamental plants have been produced using *in vitro* techniques. The process of doubling the number of chromosomes is an important source of variation. Autotetraploids, after a positive assessment of flowering, fertility, fruiting and disease resistance, are intended for further breeding: triploid cultivars (apple tree, tulip), to overcome the crossability barrier (bilberry), or to obtain fertile hybrids (cherry); autotetraploids may constitute new cultivars in themselves (daylily). *In vitro* cultures are also used for embryo rescue in

distant and interploid crosses, in order to overcome postzygotic crossability barriers when fertilization occurs but the development of the endosperm and then seeds is disturbed (crosses within *Prunus*, *Brassica* and *Ribes*). The aim of such research is to introduce new characters from related species, often wild ones, or genotypes that differ in ploidy. In vitro techniques are also used when it is impossible to obtain distant hybrids through sexual reproduction when fertilization does not occur. In such a case, somatic hybridization is used, as a result of which somatic hybrids are produced in the process of protoplast fusion. Thanks to this technique, it is possible to introduce new features not found in cultivated species.



## Nowe możliwości i ograniczenia ukierunkowanej mutagenезy z użyciem systemów CRISPR/Cas

R. BARAŃSKI

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: r.baranski@urk.edu.pl

Metody indukowanej mutagenезy od dekad s stosowane zarówno w badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych, efektem których jest komercjalizacja wielu odmian uprawnych o zmodyfikowanych cechach agronomicznych i u ytkowych. Dzi ki zwi kszeniu cz sto ci wyst powania mutacji uzyskanie nowych, po danych cech stało si bardziej prawdopodobne, jednak wi e si z ocen i analiz populacji, w których ka dy osobnik mo e posiada wiele mutacji losowo umiejscowionych w genomie, a zatem rezultat indukowanej mutagenезy jest nieprzewidywalny. Metody ukierunkowanej mutagenезy s znacznie bardziej efektywne w generowaniu po danych cech, zwłaszcza przy wykorzystaniu systemu CRISPR/Cas. Wynika to z mo liwo ci wywołania mutacji w z góry zaplanowanym, jednym lub kilku miejscach genomu. Co wi cej, opracowane zostały systemy base editing i prime editing pozwalaj ce zaplanowa typ mutacji, jaki ma zosta wygenerowany. Dzi ki temu mo liwe jest badanie funkcji i aktywno ci wybranych wcze niej genów i czynników regulatorowych oraz uzyskiwanie ro lin o nowych, po danych cechach. Kluczowym warunkiem powodzenia ukierunkowanej mutagenезy jest dost p do sekwencji genomowej, na podstawie której mo na wytypowa miejsca przeznaczone do mutacji i zaprojektowa efektywne narz dzia ich indukowania. Niezale nie, czy narz dzia te b d zawierały obce DNA, czy te b d całkowicie wolne od DNA, musz by wprowadzone do modyfikowanych komórek docelowych, zwykle w warunkach kultur in vitro. Podatno mutowanych komórek na rozwój i regeneracj in vitro oraz efektywno stosowanych procedur determinuje mo liwo skutecznego przeprowadzenia ukierunkowanej mutagenезy. Post p w rozwoju metod ukierunkowanej

mutagenezy znajduje odzwierciedlenie w praktyce. W różnych krajach na świecie, na razie poza UE, kolejne odmiany roślin ze zmodyfikowanymi cechami, głównie jako ciowymi, są dopuszczane do uprawy. Nie są one traktowane jako genetycznie zmodyfikowane, gdyż są nieodróżnialne od naturalnie pojawiających się spontanicznych mutantów oraz nie zawierają obcego DNA.

## New opportunities and limitations of targeted mutagenesis using CRISPR/Cas systems

Methods of induced mutagenesis have been used for decades in both basic and applied research, resulting in the commercialisation of many crop varieties with modified agronomic and functional traits. By increasing the frequency of mutations, obtaining new desirable traits has become more likely however, it involves the evaluation and analysis of populations where each individual may have multiple mutations randomly located in the genome and therefore the outcome of induced mutagenesis is unpredictable. In contrast, methods of targeted mutagenesis are much more efficient in generating desired traits, especially using the CRISPR/Cas system. This is due to the ability to induce mutations in the genome at one or more planned locations. Furthermore, methods of base editing and prime editing have been developed to design and generate mutations of desired types. These advantages enable the study of function and activity of pre-selected genes and regulatory elements, and obtaining plants with new, desirable traits. A key prerequisite for the success of targeted mutagenesis is access to the genomic sequence, from which target sites for mutation can be selected and effective tools for their induction can be designed. Whether these tools will contain foreign DNA or be completely DNA-free, they must be introduced into modified target cells, usually in the conditions of in vitro culture. The susceptibility of the mutant cells to growth and regeneration in vitro, and the efficiency of the procedures used determine the success of targeted mutagenesis. Progress in the development of targeted mutagenesis is reflected in practice. In several countries around the world, for the time being outside the EU, new plant varieties with modified traits, mainly quality traits, have been approved for cultivation. They are also not considered as genetically modified as they are indistinguishable from spontaneous mutants occurring in nature and because they do not contain any foreign DNA.



## SESJA 1

# Procesy różnicowania in vitro i ich uwarunkowania







## Wpływ uwolnienia kultur maliny od zanieczyszczeń bakteryjnych na namnażanie, ukorzenianie i aklimatyzację

T. ORLIKOWSKA, A. TRZEWIK, T. MALINOWSKI, K. MYNETT,  
A. NIEWIADOMSKA-WNUK

Instytut Ogródnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;  
e-mail: Teresa.Orlikowska@inhort.pl

Zanieczyszczenia bakteryjne kultur in vitro są stałym problemem w laboratoriach produkcyjnych. Znane są ogólne zasady, jednak najczęściej trzeba dobrać sposób uwalniania kultur od bakterii, w zależności od gatunku rośliny i bakterii i możliwości laboratoryjnych. Najczęstszym problemem jest, że po pewnym czasie na powierzchni zaczynają być widoczne bakterie endogenne, które chociaż nie niszczy kultur, to mogą zmieniać wyniki doświadczeń i szkodzić wizerunkowi laboratorium. Wycinanie do powierzchni preparatów odciekających nie jest dobrym rozwiązaniem, ponieważ bakterie mogą się na nie uodpornić, a tkanki roślinne reagują zmianami metabolizmu. W prezentowanej tu pracy informujemy o wynikach odciekania endogennego zastosowanego w warunkach podciśnienia, trwałości tego zabiegu i wynikach namnażania i ukorzeniania uwolnionych od bakterii kultur podwojnych. Trzy odmiany maliny, każda z innym zanieczyszczeniem bakteryjnym, były pozabawiane bakterii metodą infiltracji biocydów w podciśnieniu. Zastosowano następujące biocydy:  $HgCl_2$  (0,05 i 0,1%), PPM™ (0,2–4%), ryfampicyn (50–200 mg dm<sup>-3</sup>) i NaOCl (0,1–60%). Tylko  $HgCl_2$  eliminował bakterie z powierzchni, które pozostały uwolnione przez kilka lat, co potwierdzano przez indeksowanie na powierzchni bakteryjnej w każdej subkulturze. Podczas gdy większość powierzchni poddanych zabiegowi w podciśnieniu ulegała nekrozie i obumarła, te, które przetrwały, były żywotne i wykazywały wysoką zdolność do tworzenia powierzchniowych i dostarczania wolnego od bakterii materiału do rozmnażania. Stwierdzono doświadczenie, że namnażanie, ukorze-

nianie i aklimatyzacja kultur uwolnionych od bakterii nie różniło się spektakularnie od zanieczyszczonych.

## The influence of raspberry cultures decontamination on multiplication, rooting and acclimatization

Bacterial contamination of in vitro cultures is a constant problem in production laboratories. General principles are known, but most often, the method of freeing cultures from bacteria needs to be experimentally adapted, depending on the plant and bacteria species and laboratory capabilities. The most common problem is that after some time, endogenous bacteria begin to be visible on the medium, and, although they often do not destroy the cultures, they can change the experimental results and harm the image of the laboratory. Including disinfectants in the medium is not a good solution because bacteria may become resistant, and plant tissues may react by changing their metabolism. In the work presented here, we report on the results of endogenous disinfection used under vacuum pressure, the durability of this treatment, and the multiplication and rooting results free from bacteria. Three raspberry cultivars, each with different bacterial contamination, were freed from bacteria using the biocide infiltration method at a vacuum pressure. The following biocides were used:  $\text{HgCl}_2$  (0.05 and 0.1%), PPM<sup>TM</sup> (0.2–4%), rifampicin (50–200  $\text{mg dm}^{-3}$ ) and NaOCl (0.1–60%). Only  $\text{HgCl}_2$  eliminated bacteria from shoots that remained released for several years, as confirmed by indexing each subculture on a bacterial medium. While most of the shoots subjected to the vacuum treatment became necrotic and died, those that survived were viable and showed a high ability to form axillary shoots and provide bacteria-free propagation material. It was experimentally found that bacteria-free cultures' multiplication, rooting, and acclimatization did not differ dramatically from those of contaminated ones.





## Nanocząstki złota w doskonaleniu technologii kultur in vitro serduszki okazałej

D. KULUS<sup>1</sup>, A. TYMOSZUK<sup>1</sup>, A. KULPIŃSKA<sup>1</sup>, I. VIEHMANNOVA<sup>2</sup>, I. JĘDRZEJCZYK<sup>3</sup>,  
J. WINIECKI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Ogródnictwa, Katedra Biotechnologii, Politechnika Bydgoska;

<sup>2</sup>Katedra Roślin Uprawnych i Agroleśnictwa, Czeski Uniwersytet Nauk Przyrodniczych, Praga;

<sup>3</sup>Katedra Biotechnologii, Politechnika Bydgoska;

<sup>4</sup>Zakład Fizyki Medycznej, Centrum Onkologii, Bydgoszcz;

e-mail: [dariusz.kulus@psb.edu.pl](mailto:dariusz.kulus@psb.edu.pl)

Nanocząstki s obiecuj cym narz dzim w badaniach z zakresu biotechnologii ro-  
lin, jednak ich potencjał w zakresie mikrorozmna ania, krioprezerwacji i mutage-  
nezy jest wci niedostatecznie zbadany. Celem bada było zweryfikowanie wpływu  
nanocząstek złota (AuNPs) na efektywno mikrorozmna ania, krioprezerwacji i in-  
dukowanej mutagenyzy u serduszki okazałej (*Lamprocapnos spectabilis* L. Fukuhara)  
'Valentine', gatunku popularnego na rynku ogrodniczym oraz o znacznym potenc-  
jale farmakologicznym. Dodatek AuNPs do po ywki Murashige i Skoog stymulował  
proliferaç p dów oraz wzrost mikrosadzonek serduszki okazałej in vitro skutecz-  
niej ni tradycyjne regulatory wzrostu ro lin. Jednak e wy sze st enia nanocząstek  
(75- 100 ppm) powodowały wyst powanie mutacji w ro linach, co sugeruje wi kszy  
potencjał AuNPs jako czynnika mutagennego w porównaniu z promieniowaniem  
niejonizuj cym (mikrofale), cho ni szy ni w przypadku promieni rentgenow-  
skich (promieniowanie jonizuj ce). W badaniach z zakresu krioprezerwacji, p ki  
wierzchołkowe uzyskane in vitro poddano procedurze kapsułkowania- witryfikacji,  
stosuj c AuNPs w ró nych rozmiarach, st eniach i na ró nych etapach procedury  
(prekultury, kapsułkowania i odtwarzania). Dodatek 10ppm AuNPs do ochronnej al-  
ginianowej otoczki znacz co poprawił prze ywalno eksplantatów, przy jednocze-  
snym zachowaniu stabilno ci genetycznej ro lin. Efekt ten jednak uzale niony był  
od wielko ci nanocząstek; wi ksze nanocząstki (13 nm) były bardziej skuteczne od

mniejszych (6 nm), które dodatkowo indukowały zmienność somaklonalną. Obecność AuNPs w procesie regeneracyjnej niekorzystnie wpływała na przeżywalność eksplantatów i parametry fizjologiczne uzyskanych z nich roślin, takie jak integralność błon komórkowych oraz zawartość metabolitów. Niniejsze badania wskazują na wieloaspektowe role nanocząstek złota w biotechnologii roślin. Mogłyby one być wykorzystane zarówno do poprawy efektywności mikrorozmniania i krioprezewacji, ale także jako czynniki mutagenne, co może mieć praktyczne przełożenie w reprodukcji i hodowli roślin ozdobnych.

Podziękowania: Badania zostały częściowo finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (numer grantu: 2020/39/D/NZ9/01592).

## Gold nanoparticles in improving the technology of in vitro culture in bleeding heart

Nanoparticles (NPs) have emerged as promising tools in various fields of plant biotechnology, yet their potential in plant micropropagation, cryopreservation and mutagenesis remains underexplored. Here, we summarize findings from several studies conducted on bleeding heart (*Lamprocapnos spectabilis* L. Fukuhara) 'Valentine', aimed at elucidating the effects of gold nanoparticles (AuNPs) on micropropagation, cryopreservation and induced mutagenesis efficiency. When added to the Murashige and Skoog culture medium, AuNPs enhanced the in vitro development and multiplication of plants more effectively than traditional plant growth regulators. Notably, when added at higher concentrations (75–100 ppm) mutations were detected in some plants, suggesting a greater potential of AuNPs as mutagenic agents compared to non-ionizing radiation (microwaves), although lower than in the case of X-rays. In the cryopreservation studies, in vitro-derived shoot tips were subjected to an encapsulation-vitrification protocol, with varying concentrations and application points of AuNPs (preculture, encapsulation and recovery steps). Results revealed that the addition of 10 ppm of AuNPs into the protective bead matrix significantly improved the recovery rate of cryopreserved shoot tips, without altering the genetic stability of plants, however, this effect depended on the nanoparticle size; bigger NPs (13 nm) were more effective than smaller ones (6 nm), which additionally caused some genetic aberrations. On the other hand, the presence of AuNPs in the recovery medium adversely affected explant survival and physiological parameters such as membrane stability index and pigment concentration. Overall, our findings demonstrate the multifaceted roles of AuNPs in plant biotechnology, serving as both enhancers of micropropagation and cryopreservation efficiency and inducers of mutagenesis, with implications for conservation and genetic improvement strategies in ornamental plant species.

Acknowledgement: This research was funded in part by National Science Centre, Poland (Grant number: 2020/39/D/NZ9/01592).



## Wpływ nanocząstek tlenku cynku i srebra na parametry biometryczne, aktywność metaboliczną i stabilność genetyczną mikrosadzonek chryzantemy wielkokwiatowej

A. TYMOSZUK<sup>1</sup>, U. SZALAŃ<sup>2</sup>, J. WOJNAROWICZ<sup>2</sup>, A. WENDA-PIESIK<sup>3</sup>, D. KULUS<sup>1</sup>,  
J. KOWALSKA<sup>4</sup>, M. ANTKOWIAK<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pracownia Ogrodnictwa, Politechnika Bydgoska;

<sup>2</sup>Laboratorium Nanostruktur, Instytut Wysokich Ciśnień PAN, Warszawa;

<sup>3</sup>Katedra Agronomii, Politechnika Bydgoska;

<sup>4</sup>Zakład Rolnictwa Ekologicznego i Ochrony Środowiska,  
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań;  
e-mail: alicja.tymoszuk@psb.edu.pl

Nanotechnologia stwarza szanse na doskonalenie mikrorozmna nia ro lin ogrodnicznych. Celem bada było poznanie wpływu submikronowych cz stek tlenku cynku (ZnO SMPs), nanocz stek tlenku cynku (ZnO NPs) oraz nanocz stek tlenku cynku w po czeniu z nanocz stkami srebra (ZnO+Ag NPs), w st eniu 0, 100, 200 lub 400 mg·L<sup>-1</sup>, na ró ne cechy mikrosadzonek *Chrysanthemum ×morifolium* (Ramat.) Hemsl. odmian UTP Burgundy Gold oraz UTP Pinky Gold namno onych na po ywce Murashige i Skoog w kulturze wierzchołków p dów lub w kulturze jednow z owych fragmentów p dów. W przypadku kultury wierzchołków p dów, mikrosadzonki traktowane SMPs i NPs wytworzyły li cie o wi kszej powierzchni, obwodzie i szeroko ci ni ro liny kontrolne. wie a i sucha masa p dów mikrosadzonek po zastosowaniu SMPs i NPs była równie wi ksza ni u ro lin kontrolnych. Aplikacja ZnO SMPs w porównaniu z ZnO+Ag NPs w wi kszym stopniu stymulowała wzrost wie ej i suchej masy p dów. Zastosowanie ZnO SMPs i ZnO NPs skutkowało wzrostem wie ej i suchej masy oraz innych analizowanych parametrów systemu korzeniowego w porównaniu z ZnO+Ag NPs. Wkulturze jednow z owych fragmentów p dów, aplikacja SMPs i NPs równie stymulowała wzrost i rozwój mikrosadzonek. U odmiany UTP Burgundy Gold najbardziej efektywne traktowania obejmowały 400 mg·L<sup>-1</sup> ZnO

SMPs i  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO NPs, a u odmiany UTP Pinky Gold  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO+0,1% Ag NPs i  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO+1%Ag NPs. W przypadku ostatniej wymienionej kombinacji do wiadczalnej odnotowano tak e intensywny rozwój systemów korzeniowych u badanych odmian. Mikrosadzonki traktowane SMPs i NPs charakteryzowały si przybli on lub najcz ciej ni sz zawarto ci chlorof lu i karotenoidów w porównaniu z ro linami kontrolnymi. Analizy w wykorzystaniem systemów markerów RAPD i SCoT potwierdziły zgodn genetyczn mikrosadzonek traktowanych SMPs i NPs z ro linami kontrolnymi. Uzyskane wyniki, ł cz c osi gni cia nanotechnologii i biotechnologii, maj znaczenie naukowe i praktyczne w modulowaniu jako ci mikrosadzonek i mog by wykorzystane w komercyjnej produkcji chryzantem.

### The impact of zinc oxide and silver nanoparticles on biometric parameters, metabolic activity and genetic stability of chrysanthemum plantlets

Nanotechnology creates opportunities to improve the micropropagation of horticultural plants. The aim of the study was to test the effects of zinc oxide submicron particles (ZnO SMPs), zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), and zinc oxide nanoparticles combined with silver nanoparticles (ZnO+Ag NPs), at the concentration of 0, 100, 200, or  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , on various traits of *Chrysanthemum ×morifolium* (Ramat.) Hemsl. 'UTP Burgundy Gold' and 'UTP Pinky Gold' plantlets propagated on the Murashige and Skoog medium by shoot-tip culture or single-node culture method. In shoot-tip culture, the SMPs- and NPs-treated plantlets produced leaves with a higher area, perimeter and horizontal width compared to the non-treated control plantlets. Overall, shoot fresh and dry weight of SMPs and NPs-treated plantlets was also higher compared to the control plantlets. ZnO SMPs outperformed ZnO+Ag NPs regarding shoot fresh and dry weight. As for the root system, the application of ZnO SMPs and ZnO NPs resulted in higher fresh and dry weight, and increased most biometrical parameters of roots compared to ZnO+Ag NPs. As for single-node culture, generally, SMPs and NPs stimulated the growth and development of plantlets. In 'UTP Burgundy Gold', the most prominent treatments were  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO SMPs and  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO NPs, whereas in 'UTP Pinky Gold'  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO+0,1% Ag NPs and  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnO+1% Ag NPs. The latter treatment stimulated also the intensive development of root systems in the two studied cultivars. As compared to the control plantlets, the SMPs and NPs-treated plantlets had similar or, most often, lower content of chlorophylls and carotenoids. The RAPD and SCoT marker systems confirmed the genetic fidelity of SMPs and NPs-treated plantlets with the control plantlets. The obtained results are of scientific and practical importance for modulating plantlet quality, combining the achievements of nanotechnology and biotechnology, and can be implemented in the commercial large-scale production of chrysanthemum.



## Mikrorozmnażanie rodzimych gatunków z rodziny Droseraceae objętych ochroną ścisłą

M. PARZYMIES<sup>1</sup>, B. BANACH-ALBIŃSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Produkcji Ogrodniczej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;

<sup>2</sup>Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;

e-mail: marzena.parzymies@up.lublin.pl

W Polsce występuje 5 gatunków roślin z rodziny rosiczkowatych (Droseraceae) i wszystkie objęte są ochroną ścisłą. Są to rosiczki: długolistna (*Drosera anglica*), okrągłolistna (*D. rotundifolia*), owalna (*D. obovata*) i pośrednia (*D. intermedia*) oraz aldrowanda porzeczka (*Aldrovanda vesiculosa*). Są to rośliny mięsożerne, które chwytają ofiarę przy pomocy liści przekształconych w ruchome pułapki. Rośliny te są bogatym źródłem metabolitów wtórnych, które mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle medycznym i farmaceutycznym. W ostatnich latach widoczny jest spadek zarówno liczby, jak i liczebności rodzimych populacji. Z tego względu podjęto badania, których celem było opracowanie procedur mikrorozmnażania roślin, a w dalszej perspektywie podjęcie działań ochronnych. Materiał roślinny do badań pochodził ze stanowisk naturalnych zlokalizowanych we wschodniej Polsce, na terenie Pojezierza Łęczyńskiego-Włodawskiego. W przypadku rosiczki pobierano pojedyncze liście oraz nasiona, jeżeli były dostępne, a w przypadku aldrowandy porzeczki – liście oraz turiony. Materiał roślinny został poddany odkażeniu. Biorąc pod uwagę skuteczność odkażania oraz współczynnik regeneracji eksplantatów pierwotnych, stwierdzono, że standardowe metody dezynfekcji, przy pomocy podchlorynu sodu, są najbardziej skuteczne. Odkażone eksplantaty zostały umieszczone na pożywkach wzrostowych. Zastosowano sole mineralne wg Murashige i Skooga w stężeniach od 1/10 do 1. Dodatkowo określono regenerację roślin przy obniżonej zawartości azotu. Stwierdzono, że pożywka 1/4 MS pozwala na uzyskanie największej liczby rozet potomnych rosiczki o średnicy przynajmniej 1 cm. Stwierdzono także, że obecność 1 g AC korzystnie wpływała na liczbę rozet potomnych. W przypad-

ku aldrowandy p cherzykowatej, najwyższy współczynnik rozmnażania uzyskano na płynnej pożywce 1/5 MS przy jednoczesnym obniżeniu zawartości N o połowę. Rosiczki tworzyły korzenie samoistnie w trakcie rozmnażania in vitro. Uzyskane rozety sadzono w podłożu złożonym z torfu i piasku i umieszczano w szczelnie zamkniętych akwariach. Pędy aldrowandy p cherzykowatej przenoszono do kuwet wypełnionych filtrowaną wodą jeziorną oraz wodą destylowaną. Stwierdzono, że wszystkie rośliny przeżyły aklimatyzację i podjęły dalszy wzrost.

## Micropropagation of native species of the Droseraceae family under strict protection

There are 5 species of the Droseraceae family in Poland and all of them are under strict protection. They are: *Drosera anglica*, *D. rotundifolia*, *D. xobovata*, *D. intermedia*, and *Aldrovanda vesiculosa*. They are carnivorous plants, catching prey with leaves transformed into moving traps. The plants are a rich source of secondary metabolites, which can be used for medical or pharmaceutical purposes. A decrease in the number and numerosity of native populations has been observed. Therefore, research aiming at developing micropropagation procedures was done with further perspective for active protection. The plant material was obtained from the natural stands located in eastern Poland, in the Łęczna-Włodawa lake district. In the case of *Drosera*, single leaves and seeds were excised, and in the case of *Aldrovanda*, they were shoots and turions. The plant material was surface disinfected. Taking into consideration disinfection effectiveness and regeneration rate, the standard disinfection method with sodium hypochlorite was the most optimal. Disinfected explants were placed in the media. Mineral Murashige and Skoog salts diluted from 1/10 to 1 were used. Additionally, a regeneration rate of shoots with a lowered content of nitrogen was estimated. It was stated that the 1/4 MS medium allows to obtain the highest number of *Drosera* daughter rosettes of at least 1 cm in diameter. The presence of 1 g AC increased the number of daughter rosettes. In the case of *Aldrovanda*, the highest propagation rate was obtained in the liquid 1/5 MS medium with a lowered amount of N by half. The obtained *Drosera* rosettes were planted in a mixture of peat and sand, while shoots of *Aldrovanda* were placed in containers with a mixture of filtered lake water and distilled water. All plants survived acclimatization and proceeded to continue their growth.



## Kultury in vitro w ochronie gatunków rzadkich – badania własne

B. NOWAK<sup>1</sup>, D. KOCOT<sup>2</sup>, E. SITEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

e-mail: barbara.nowak@urk.edu.pl

Wykorzystanie klonowania roślin w kulturach in vitro dla gatunków zagrożonych pozwala na wykorzystanie zalet tej techniki, ale jednocześnie naraża na pewne zagrożenia. Zaletą jest uzyskanie wielu osobników z niewielkiej ilości materiału wyjściowego. Niestety, w czasie rozmnażania na pożywkach może dojść do pojawienia się spontanicznych mutacji, które mogą, choć nie muszą, modyfikować cechy biologiczne roślin istotne dla przetrwania gatunku w naturalnym siedlisku. W związku z tym, oprócz opracowania efektywnych protokołów rozmnażania, istotną jest ocena wierności uzyskanych roślin w stosunku do rośliny matecznej dokonywana na różnych poziomach. Z rzadkich i zagrożonych gatunków nasion wysianych na pożywkę rozmnożone zostały *Dianthus knappa*, *Pontechium maculatum*, *Primula farinosa*, z fragmentów kłosa *Ranunculus illyricus* i z eksplantatów liściowych *Aconitum bucovinense*. Ploidalność rozmnożonych roślin została porównana z roślinami matecznymi. Biologia rozmnażania oceniana w warunkach ex vitro pozwoliła na zaobserwowanie zmian, które miały charakter przejściowy, jak u *P. farinosa* lub utrzymujących się przez trzy lata obserwacji, jak u *P. maculatum* i *D. knappa*.

## Tissue culture technique for conservation of rare species – own research

The application of plant in vitro cloning for endangered species allows for the advantages of this technique, but also puts in danger of certain threats. The advantage is obtaining many individuals from a small amount of initial material. Unfortunately, during regeneration on media, spontaneous mutations may occur, which may, but do not have to, modify the biological features of plants that are important for the survival of the species in the natural habitat. Therefore, in addition to developing effective propagation protocols, it is important to assess the fidelity of the obtained plants to the mother plant at various levels. Among rare and endangered species *Pontechium maculatum*, *Primula farinosa*, *Dianthus knappa* were propagated from seeds sown on the medium, while *Ranunculus illyricus* from rhizome fragments and *Aconitum bucovinense* from leaf explants. The ploidy of the propagated plants was compared with that of the mother plants. The biology of reproduction assessed in ex vitro conditions allowed for the observation of changes that were transient, as in *P. farinosa*, or lasting for three years of observation, as in *P. maculatum* and *D. knappa*.





## Asteraceae w kulturach in vitro

A. TREJGELL

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń;  
e-mail: trejgell@umk.pl

Rodzina Asteraceae to największa i najbardziej zróżnicowana rodzina roślin okrytozalaskowych. Przedstawiciele astrowatych można spotkać niemal na wszystkich kontynentach (za wyjątkiem Antarktydy). Św. w rodzinie zarówno gatunki określone jako jadalne czy ozdobne, jak również produkujące metabolity wtórne, cenne z punktu widzenia gospodarki człowieka. Wysiłki podejmowane od połowy XX wieku doprowadziły do rozkwitu badań i rozwoju kultur in vitro, co pozwoliło na opracowanie systemów regeneracyjnych dla wielu gatunków, w tym z rodziny Asteraceae. Z jednej strony umożliwiło to produkcję roślin na masową skalę czego przykładem jest rodzaj *Gerbera*, jak i tworzenie nowych odmian chociażby u *Dendranthema grandiflora*. Z drugiej strony mikropropagacja w kulturach in vitro może być narzędziem ochrony gatunkowej szczególnie dla gatunków rzadkich, o ograniczonym zasięgu występowania np. *Carlina onopordiifolia*, *Inula germanica*, *Leontopodium alpinum*, czy *Taraxacum alpinum*. Ponadto techniki in vitro umożliwiają wykorzystanie potencjału terapeutycznego przedstawicieli astrowatych bez zubożenia ich naturalnych populacji, czego dowodem są badania nad *Echinacea purpurea*. Co nie mniej ważne, transformacja takich gatunków jak *Lactuca sativa* czy *Carthamus tinctorius* umożliwia wykorzystanie gatunków należących do rodziny astrowatych w produkcji biofarmaceutyków.

### Asteraceae in in vitro culture

The Asteraceae family is the largest and the most diverse family of the Angiosperms. Representatives of Asteraceae can be found all over the world (except Antarctica). They include species considered edible or ornamental, as well as species producing

secondary metabolites that are valuable from the point of view of the human economy. Efforts undertaken since the mid-20th century have led to a flourishing of research and development of in vitro cultures, which has allowed the defining regeneration systems for many species, including those from the Asteraceae family. On the one hand, it enabled plant production on a mass scale, an example of which the *Gerbera* genus is, as well as the creation of new varieties, as in case of *Dendranthema grandiflora*. On the other hand, micropropagation in in vitro cultures may be a tool for species protection, especially for rare ones with a limited range of occurrence, e.g. *Carlina onopordifolia*, *Inula germanica*, *Leontopodium alpinum*, or *Taraxacum alpinum*. Moreover, developed in vitro techniques enable the use of the therapeutic potential of Asteraceae without depleting their natural populations, as evidenced by research on *Echinacea purpurea*. Last but not least, transformation of species such as *Lactuca sativa* or *Carthamus tinctorius* enables the use of species belonging to the Asteraceae family in the production of biopharmaceuticals.



## Czynniki VAL z udziałem kompleksu PRC2 i metylacji histonów regulują somatyczną embriogenezę u *Arabidopsis*

K. NOWAK, J. MOROŃCZYK, A. KIWIOR-WESOŁOWSKA, M.D. GAJ

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski w Katowicach;  
e-mail: katarzyna.nowak@us.edu.pl

Somatyczna embriogeneza (SE) jest procesem rozwoju zarodka z komórek somatycznych roślin bez udziału gamet i procesu zapłodnienia. Indukcja SE wymaga epigenetycznego przeprogramowania transkryptomu komórki somatycznej w embriogeniczną. Szczególną rolę w tranzycji embriogenicznej komórek somatycznych pełni czynnik transkrypcyjny (TF), które z udziałem mechanizmów epigenetycznych regulują ekspresję genów. Do transkrypcyjnych regulatorów genów należą czynniki VAL1 i VAL2 (VIVAPAROUS/ABI3-LIKE). VAL1/VAL2 poprzez interakcję z kompleksem PRC2 regulują ekspresję genów docelowych na drodze metylacji histonów prowadzonej przez metylotransferazy histonowe CURLY LEAF i SWINGER. Dowodem na zaangażowanie czynników VAL1 i 2 oraz CLF i SWN w regulację SE jest spontaniczne tworzenie zarodków somatycznych z siewek mutantów *val1val2* oraz *clfswn*. W badaniach skupiono się na identyfikacji mechanizmu działania czynników VAL i metylotransferaz CLF i SWN w SE indukowanej w eksplantatach *Arabidopsis*. Wykazano, że podczas indukcji SE auksyn, pojedyncze mutacje w genach VAL oraz CLF skutkują zmniejszeniem odpowiedzi embriogenicznej oraz wzrostem ekspresji kluczowych dla indukcji SE genów *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*, *AGL15*, *BBM* oraz *WUS*. Wynik ten sugeruje, że czynniki VALs wraz z kompleksem PRC2 (CLF) kontrolują indukcję embriogeniczną, negatywnie regulując ekspresję kluczowych dla SE genów TF, które są zaangażowane między innymi w kontrolę biosyntezy IAA. Powiązany z auksyn mechanizm działania VAL w SE sugerują także analizy podwójnego mutantu *val1val2*. Stwierdziliśmy zależności między zdolnością do indukcji SE tego mutantu a zawartością auksy-

ny (2,4-D) w po ywce indukcyjnej. W przeciwie stwie do indukcji SE na po ywce bezauksynowej i z nisk koncentracj auksyny, standardowe dla kultury WT (Col-0) st enie auksyny w po ywce hamuje odpowied embriogeniczn mutantu *val1val2*. Nadwra liwo mutantu *val1val2* na zawarto auksyny w po ywce indukuj cej SE sugeruje podwy szony poziom endogennej auksyny w eksplantatach tego mutantu, który mo e by wynikiem nadekspresji zwi zanych z kontrol auksyny genów TF, wskazanych jako prawdopodobnie regulowane przez VAL w SE.

## VAL factors with the PRC2 complex and histone methylation regulate the somatic embryogenesis in *Arabidopsis*

Somatic embryogenesis (SE) is the process of embryo development from somatic plant cells without gametes and fertilization. SE induction requires epigenetic reprogramming of somatic cell transcriptome to embryogenic one. A special role in the embryogenic transition of somatic cells played transcription factors (TFs), which regulate gene expression using epigenetic mechanisms. Transcriptional gene regulators include the VAL1 and VAL2 factors (VIVAPAROUS/ABI3-LIKE1/2) which, through interaction with the PRC2 complex, regulate the expression of target genes through histone methylation carried out by histone methyltransferases CURLY LEAF and SWINGER. Evidence for the involvement of VAL1 and 2 factors and CLF and SWN in the regulation of SE is the spontaneous formation of somatic embryos from seedlings of *val1val2* and *clf swn* double mutants. The research was focused on identifying the mechanism of action of VAL factors and CLF and SWN methyltransferases in SE which was induced in *Arabidopsis* explants. We have shown that during SE induction with auxin, single mutations in the VAL and CLF genes increase both the embryogenic response and the expression of the key genes in embryogenic transition, including *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*, *AGL15*, *BBM*, and *WUS*. This result suggests that VALs factors and the PRC2 complex (CLF) control embryogenic induction by negatively regulating the expression of key TF genes in SE. In support of the auxin-related mechanism of VAL/PRC2 role in SE induction the targeted TFs control of IAA biosynthesis. Further evidence on an auxin-related VAL action mechanism in SE provided the results of the *val1val2* double mutant analysis. We found a relationship between the double mutant ability to induce SE and the auxin (2,4-D) content in the induction medium. In contrast to the capacity of SE induction in an auxin-free and low-auxin media, the auxin concentration efficient for embryogenic response in WT (Col-0) culture inhibits the embryogenic response of the *val1val2* mutant. The hypersensitivity of the *val1val2* mutant to the auxin content in the SE-inducing medium suggests an increased level of endogenous auxin in the explants of this mutant, which might result from the overexpression of auxin control-related TF genes indicated as likely regulated by VAL in SE.



## SESJA 2

# Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach in vitro







## *Drosera zigzagia* w kulturach in vitro oraz jej potencjał do zwalczania antybiotykoopornych patogenów człowieka

S. RUGIEŃ<sup>1</sup>, M. POTRYKUS<sup>1</sup>, A. MOZHEJKO<sup>1</sup>, M. THIEL<sup>2</sup>, A. KAWIAK<sup>3</sup>,  
A. KRÓLICKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

<sup>2</sup>Pracownia Struktury Biopolimerów, MWB UG i GUMed;

<sup>3</sup>Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, MWB UG i GUMed;

e-mail: [aleksandra.krolicka@ug.edu.pl](mailto:aleksandra.krolicka@ug.edu.pl)

*Drosera zigzagia* jest rośliną owadożerną z rodziny Droseraceae. Roślina ta rośnie w warunkach naturalnych w zachodniej Australii w klimacie półsuchym i półpustynnym. *D. zigzagia* jest rośliną wieloletnią i wytwarza białe bulwy o średnicy 5 mm. Dane literaturowe wskazują, że komórki roślin owadożernych z gatunku *Drosera* zawierają w swoich tkankach biologicznie czynne metabolity wtórne z grupy naftochinonów, związków fenolowych i flawonoidów. Celem przedstawionych badań była hodowla w kulturach in vitro roślin z gatunku *D. zigzagia* pod kątem pozyskiwania z ich tkanek metabolitów wtórnych o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Kultury in vitro roślin *D. zigzagia* prowadzono na pożywkach zestalonych agarem, pożywkach płynnych z wytrącaniem oraz w hodowli okresowo-zalewowej Plantform™. W celu podwyższenia poziomu metabolitów wtórnych w roślinach owadożernych zastosowano pożywkę ze zredukowaną ilością azotu, L-fenylalaninę, lizat bakterii *Raoultella ornithinolytica* oraz kokulturę z *Calitriche cophocarpa*. Zbadano również wpływ elicytacji oraz rodzaju kultury na aktywność ekstraktów z tkanek *D. zigzagia* uzyskiwanych metodą wysalania z użyciem tetrahydrofuranu oraz ekstrakcji wodnej na wybrane patogeny człowieka *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Stosując wysokosprawną chromatografię cieczą określono poziom głównego naftochinonu zawartego w tkankach roślinnych – plumbaginy, a wykorzystując chromatografię cienkowarstwową wyodrębniła się aktywność

frakcj przeciwdrobnoustrojow , któr zbadano pod k tem toksyczno ci wzgl dem unie niertelnionej linii nienowotworowych, adherentnych komórek keratynocytów skóry człowieka – HaCaT. W ramach przeprowadzonych bada wykazano, e hodowla ro lin *D. zigzagia* w hodowli okresowo-zalewowej Plantform™ charakteryzuje si najwy szym przyrostem mokrej masy ro linnej. Ekstrakty pozyskane z tkanek hodowanych w wy ej wymienionym systemie zawieraj biologicznie czynne metabolity wtórne. Poprzez zastosowanie frakcjonowania mo na uzyska ekstrakt o wysokiej aktywno ci przeciwdrobnoustrojowej i niskiej aktywno ci cytotoksycznej.

### *Drosera zigzagia* in in vitro cultures and its potential to combat antibiotic-resistant human pathogens

*Drosera zigzagia* is a carnivorous plant from the Droseraceae family. This plant grows in natural conditions in Western Australia in a semi-arid and Mediterranean climate. *D. zigzagia* is a perennial plant and produces white tubers with a diameter of 5 mm. Literature data indicate that the tissues of insectivorous plants of the *Drosera* species contain biologically active secondary metabolites from the group of naphthoquinones, phenolic compounds and flavonoids. The aim of the presented research was to cultivate *D. zigzagia* plants in in vitro cultures in order to obtain secondary metabolites with antimicrobial activity from their tissues. In vitro cultures of *D. zigzagia* plants were performed on agar-solidified media, liquid media with shaking and in a temporary immersion bioreactors Plantform™. In order to increase the level of secondary metabolites in carnivorous plants, media with reduced amounts of nitrogen, L-phenylalanine, *Raoultella ornithinolytica* bacteria lysate and co-culture with *Calitriche cophocarpa* were used. The influence of elicitation and culture type on the activity of *D. zigzagia* tissue extracts obtained by salting out using tetrahydrofuran and water extraction was verified on selected human pathogens *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Using high-performance liquid chromatography, the level of the main naphthoquinone present in plant tissues – plumbagin was determined, and using thin-layer chromatography, the active antimicrobial fraction was isolated, which was tested for toxicity towards the immortalized line of non-cancerous, adherent human skin keratinocytes – HaCaT. The conducted research showed that the cultivation of *D. zigzagia* plants in a temporary immersion bioreactors Plantform™ is characterized by the highest increase in wet plant mass. Extracts obtained from tissues cultured in the above-mentioned system contain biologically active secondary metabolites. By using fractionation, an extract with high antimicrobial activity and low cytotoxic activity can be obtained.





## Wysoka produkcja antyoksydantów o strukturze polifenoli w kulturach bioreaktorowych wybranych gatunków roślin leczniczych i kosmetycznych

A. SZOPA<sup>1</sup>, M. ŁUCZKIEWICZ<sup>2</sup>, A. KOKOTKIEWICZ<sup>2</sup>, I. KWIECIEŃ<sup>1</sup>, P. KUBICA<sup>1</sup>,  
H. EKIERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Farmakognozji, Gdański Uniwersytet Medyczny;  
e-mail: halina.ekiert@uj.edu.pl

Współcześnie coraz częściej w produkcji leków, kosmetyków i suplementów diety, wykorzystuje się roślinne kultury in vitro jako źródło bioaktywnych związków. W celach komercyjnych kultury roślin prowadzone są w instalacjach wielkoskalowych – bioreaktorach o różnej konstrukcji. W ramach badań prowadzonych przez nasze zespoły, optymalizowaliśmy różne typy bioreaktorów (prototypy skonstruowane przez dr A. Kokotkiewicza oraz dostępne komercyjnie bioreaktory okresowo-zalewowe dedykowane dla kultur mikropodowych – PlantForm (produkcji szwedzkiej) i RITA (produkcji francuskiej)) warunki produkcji różnych podgrup antyoksydantów o strukturze polifenoli. W efekcie optymalizacji uzyskaliśmy bardzo atrakcyjne wyniki: w kulturach zawieszinowych *Verbena officinalis* – 9,2 g% werbaskozydu (bioreaktor mieszajco-napowietrzający), w kulturach *Aronia arbutifolia* i *A. ×prunifolia* – 1,01 i 1,16 g% kwasów fenolowych, w tym depsydu (bioreaktory PlantForm), w kulturach *Schisandra chinensis* – 0,55 g% lignanów (bioreaktory PlantForm), w kulturach *Scutellaria baicalensis* – 1,13 g% flawonoidów i 1,98 g% werbaskozydu (bioreaktory RITA), w kulturach *Hypericum perforatum* cvs (Helos, Topas, Elixir) – 0,91, 0,84, 0,74 g% flawonoidów (bioreaktory PlantForm). Uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość zaproponowania kultur in vitro badanych gatunków roślin jako biotechnologiczne źródło surowców leczniczych, kosmetycznych i prozdrowotnych.

## High production of antioxidants with polyphenolic structure in bioreactor cultures of some medicinal and cosmetic plant species

Nowadays, in vitro plant cultures are increasingly used as a source of bioactive compounds in the production of medicines, cosmetics and dietary supplements. For commercial purposes, plant cultures are carried out in large-scale installations – bioreactors of various designs. As part of the research conducted by our teams, we optimized the production conditions of various subgroups of antioxidants with the structure of polyphenols in different types of bioreactors (prototypes constructed by Dr. A. Kokotkiewicz) and commercially available batch-mode bioreactors dedicated to microshoot cultures – PlantForm (Swedish production) and RITA (French production)). As a result of optimization, we obtained very attractive results: in *Verbena officinalis* suspension cultures – 9.2 g% of verbascoside (mix and air-flow bioreactor), in *Aronia arbutifolia* and *A. ×prunifolia* cultures – 1.01 and 1.16 g% of phenolic acids, including depsides (PlantForm bioreactors), in *Schisandra chinensis* cultures – 0.55 g% of lignans (PlantForm bioreactors), in *Scutellaria baicalensis* cultures – 1.13 g% of flavonoids and 1.98 g% of verbascoside (RITA bioreactors), in *Hypericum perforatum* cvs cultures (Helos, Topas, Elixir) – 0.91, 0.84, 0.74 g% of flavonoids (PlantForm bioreactors). The obtained research results indicate the possibility of proposing in vitro cultures of the tested plant species as a biotechnological source of medicinal, cosmetic and healthy – raw materials.



## Tarczycza brodata źródłem cennych metabolitów wtórnych w warunkach in vitro oraz in vivo

J. LEMA-RUMIŃSKA<sup>1</sup>, K. SADOWSKA<sup>2</sup>, A. TYMOSZUK<sup>3</sup>, A. ANDRZEJEWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Środowiska, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz;

<sup>2</sup>Katedra Agronomii, Politechnika Bydgoska;

<sup>3</sup>Pracownia Ogrodnictwa, Politechnika Bydgoska;

e-mail: lem-rum@ukw.edu.pl

Tarczycza brodata (*Scutellaria barbata* D. Don) należy do rodziny Lamiaceae. Jest rośliną wieloletnią pochodzącą ze wschodnich regionów Chin. Roślina dorasta do 50 cm wysokości. Liście ma słabo zakłose, nieco lancetowate lub trójklonowe 1,5–2,5 cm długości i 0,7–1,5 cm szerokości. Kwiaty są w kolorze fioletowo-niebieskim, o długości korony kwiatowej około 1,3 cm. W tradycyjnej medycynie chińskiej i koreańskiej tarczycza brodata stosowana jest do leczenia różnych stanów zapalnych, krwawień, ukłosa przez owady oraz wczesnych stadiów raka. W ziele tej rośliny zidentyfikowano ponad 200 związków chemicznych o wysokiej aktywności biologicznej, wśród których flawonoidy, zostały uznane jako główne związki o działaniu przeciwzapalnym, przeciwtłuszczającym i przeciwnowotworowym. W obrębie flawonoidów najwyżej zawartość wykazuje skutelaryna, która jest uznana za główny związek przeciwnowotworowy. Obecnie wiele badań związanych z tą rośliną koncentruje się wokół wykazania jej skuteczności w leczeniu raka, w tym raka piersi, krwi, w wątrobie, nerek. Skutelaryna poprzez działanie przeciwzapalne, przeciwtłuszczające, rozszerzające naczynia, przeciwplatekcyjne, przeciwzakrzepowe, może również mieć znaczenie w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych. Uprawa jej w warunkach in vitro oraz in vivo jest dotychczas słabo poznana, ponadto brak obecnie standaryzowanego materiału roślinnego o wysokiej zawartości skutelaryny dostępnego dla przemysłu. Uzyskaliśmy nowe linie (L1–L7), u których stwierdziliśmy istotne różnice zarówno pod względem zawartości skutelaryny, jak i innych metabolitów i to zarówno u roślin uprawianych w warunkach in vitro, jak i in vivo. Ultra High Performance Liquid

Chromatography (UPLC) była zastosowana do analizy zawartości skutelaryny w roślinach. Ponadto dystans genetyczny pomiędzy liniami został zbadany za pomocą markerów molekularnych przy użyciu Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) and Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) genetic markers. Marker ISSR wykazał różnice genetyczne u wszystkich badanych linii (82,4% polimorficznych loci), natomiast SCoT nie generował polimorfizmów.

## Barbed skullcap a source of valuable metabolites in vitro and in vivo

Barbed skullcap (*Scutellaria barbata* D. Don) belongs to the Lamiaceae family. It is a small plant growing up to 50 cm in height. Leaves are denticulate, slightly lanceolate or deltoid, 1.5–2.5 cm long and 0.7–1.5 cm wide. The flowers are violet-blue in color, with a corolla length of approximately 1.3 cm. In traditional Chinese and Korean medicine, barbed skullcap is used to treat various inflammations, bleeding, insect bites and early stages of cancer. Over 200 chemical compounds with high biological activity have been identified in the herb of this plant, among which flavonoids have been recognized as the main compounds with anti-inflammatory, antioxidant and anticancer effects. Among flavonoids, the highest content is found in scutellarin, which is recognized as the main anti-cancer compound. Currently, many studies related to this plant are focused on demonstrating its effectiveness in the treatment of cancer, including breast, liver, and kidney cancers and leukemia. Scutellarin through its anti-inflammatory, antioxidant, vasodilating, antiplatelet and antithrombotic effects may also be important in the treatment of cardiovascular diseases. Its cultivation in vitro and in vivo is still not understood, and there is currently no standardized plant material with a high content of scutellarin available for the industry. We obtained new lines (L1–L7) of *S. barbata* in which we found significant differences both in terms of the content of scutellarin and other metabolites, both in plants grown in vitro and in vivo. Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC) was used to analyze the content of scutellarin in plants. In addition, the genetic distance between lines was investigated with molecular markers using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) and Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) genetic markers. The ISSR marker showed genetic differences in all tested lines (82.4% of polymorphic loci), while SCoT did not generate polymorphisms.



## Ocena aktywności biologicznej ekstraktów otrzymanych z kultur pędów i kalusa wybranych odmian winorośli właściwej (*Vitis vinifera* L.)

M. SHARAFAN<sup>1</sup>, M. MALINOWSKA<sup>1</sup>, A. LANOUE<sup>2</sup>, M. FERRIER<sup>2</sup>,  
N. GIGLIOLI-GUIVARC'H<sup>2</sup>, A. SZOPA<sup>3</sup>, E. SIKORA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chemii i Technologii Organicznej, Politechnika Krakowska;

<sup>2</sup>EA 2106 «Biomolécules et Biotechnologie Végétales», UFR des Sciences Pharmaceutiques, Uniwersytet w Tours;

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;  
e-mail: marta.sharafan@doktorant.pk.edu.pl

*Vitis vinifera* L. (winoro l wla ciwa) to jedna z najpopularniejszych ro lin upraw nych na wiecie. Obecnie, wla ciwo ci biologiczne winoro li zostały potwierdzone badaniami naukowymi. Innowacyjnym aspektem bada nad *V. vinifera* jest zasto sowanie ekstraktów z kultur pozyskanych w warunkach in vitro. Celem bada była ocena aktywno ci biologicznej ekstraktów z kultur p dów (P) i kalusa (K) ró nych odmian winoro li (6 odmian białych: Chardonnay, Hibernat, Riesling, Johanner, Solaris, Seyval Blanc i 4 odmiany czerwone: Cabernet Cortis, Regent, Marenchal Foch, Rondo). Kultury prowadzono w 30-dniowych cyklach hodowlanych na wariantach podło y Murashige i Skoog (MS) oraz Schenk i Hildebrandt (SH) ró - ni cych si doborem jako ciowym i ilo ciowym regulatorów wzrostu i rozwoju ro lin. Testowanymi wariantami podło a były: „W1” (MS, 0,9 ml/l BA i 0,1 ml/l IBA), „W2” (MS, 1,5 ml/l BA i 0,2 ml/l NAA), „W3” (SH, 0,9 ml/l BA i 0,1 ml/l IBA) i „W4” (SH, 1,5 ml/l BA i 0,2 ml/l NAA). Aktywno przeciwutleniaj c badano metoda mi DPPH, ABTS i FRAP. Ponadto, oznaczono całkowit zawarto polifenoli (TPC) testem Folina-Ciocalteu. Dodatkowo, testy enzymatyczne zdolno ci hamowania aktywno ci tyrozynazy i kolagenazy miały na celu ocen potencjału przeciwsta

rzeniowego działania badanych ekstraktów. Uzyskane wyniki aktywności antyutleniającej dla testów DPPH, ABTS i FRAP wynosiły odpowiednio: 51,79%, 51,38% i 11,02% dla ekstraktów „K” oraz 33,57%, 50,75% i 13,55% dla ekstraktów „P”. TPC wynosiła 9,43 mg/ml GAE dla „K” i 2,58 mg/ml GAE dla „P”. Wyniki badań enzymatycznych wykazały, że badane ekstrakty są potencjalnymi inhibitorami tyrozynazy i kolagenazy. Przeprowadzone badania potwierdziły silną aktywność antyoksydacyjną i przeciwstarzeniową ekstraktów z kultur *in vitro* *V. vinifera* i wskazują, że mogą one znaleźć potencjalne zastosowanie w preparatach kosmetycznych.

## The evaluation of biological activities of extracts obtained from the shoot and callus cultures of selected *Vitis vinifera* (Grapevine) cultivars

*Vitis vinifera* L. (grapevine) is one of the most popular crop plants cultivated worldwide. Nowadays, the biological properties of grapevine extracts have been proved by scientific research. An innovative aspect of research on *V. vinifera* is the proposed use of extracts from *in vitro* cultures obtained through plant biotechnology methods. The aim of the study was to evaluate the biological activity of *in vitro* shoot (S) and callus (C) extracts obtained from different grapevine varieties (6 white cultivars: Chardonnay, Hibernial, Riesling, Johanniter, Solaris, Seyval Blanc and 4 red cultivars: Cabernet Cortis, Regent, Marenchal Foch, Rondo). The cultures were maintained over 30-day growth cycles on two media: Murashige and Skoog (MS) and Schenk and Hildebrandt (SH) with various concentrations of plant growth regulators. The tested media were: 'W1' (MS, 0.9 ml/l BA and 0.1 ml/l IBA), 'W2' (MS, 1.5 ml/l BA and 0.2 ml/l NAA), 'W3' (SH, 0.9 ml/l BA and 0.1 ml/l IBA) and 'W4' (SH, 1.5 ml/l BA and 0.2 ml/l NAA). The antioxidant activity of extracts was tested using DPPH, ABTS and FRAP methods. In addition, the total polyphenolic content (TPC) was determined using Folin-Ciocalteu reagent. The enzymatic tests including tyrosinase and collagenase inhibition were used to evaluate the anti-aging activity of extracts. The obtained results indicated that tested extracts possessed antioxidant activity in DPPH, ABTS and FRAP reached up to 51.79%, 51.38%, 11.02% for 'C', respectively, and 33.57%, 50.75%, 13.55% for 'S', respectively. The total phenolic content (TPC) of extracts reached up to 9.43 mg/ml GAE in 'C' extracts and 2.58 mg/ml GAE in 'S' extracts. The results of enzymatic tests showed that both extracts are the potential tyrosinase and collagenase inhibitors. The obtained results indicated that *V. vinifera* *in vitro* cultures extracts possessed strong biological activity and could be potentially applied in cosmetic formulations.



## Wykorzystanie roślinnych kultur in vitro w produkcji kosmetyków na przykładzie roślin z rodzaju *Lavandula*

D. KULPA, P. JADCZAK, D. ANDRYS

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie;  
e-mail: danuta.kulpa@zut.edu.pl

Kultury in vitro s technik od dziesi cioleci wykorzystywan przede wszystkim do masowej produkcji sadzonek ro lin ogrodnicych. W ostatnim dziesi cioleciu znac co wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem ro linnych kultur in vitro w produkcji preparatów kosmetycznych. Zamiast tradycyjnego zbierania ro lin czy ekstrakcji składników, mo liwe jest uzyskanie potrzebnych substancji czynnych poprzez hodowl komórek ro linnych. Podej cie to minimalizuje niszczenie siedlisk naturalnych i przyczynia si do ochrony ró norodno ci biologicznej. Dodatkow zalet jest mo liwo uzyskania czystych i standaryzowanych składników o wysokiej jako ci. Dzi ki precyzyjnej kontroli warunków hodowli, mo na zapewni stał zawarto aktywnych substancji, co przekłada si na skuteczno i bezpiecze stwo kosmetyków. W badaniach własnych okre lono mo liwo wykorzystania kultur in vitro lawendy w skolistnej w produkcji kosmetyków. Okre lono wpływ elicytorów biotycznych (kwas jasmonowy) oraz abiotycznych (nanocz stki złota i srebra) na produkcj metabolitów wtórnych.

The use of in vitro plant cultures in the production of cosmetics  
on the example of plants from the *Lavandula* genus

In vitro cultures are a technique that has been used for decades primarily for mass production of horticultural plant seedlings. Over the last decade, interest in the use of in vitro plant cultures in the production of cosmetics has increased significantly.

Instead of traditional collection of plants or extraction of ingredients, it is possible to obtain the necessary active substances by cultivating plant cells. This approach minimizes the destruction of natural habitats and contributes to the protection of biodiversity. An additional advantage is the ability to obtain clean and standardized high-quality ingredients. Thanks to precise control of environmental conditions, it is possible to ensure a constant content of active substances, which increases the effectiveness and safety of cosmetics. Our own research determined the possibility of using *in vitro* cultures of lavender in the production of cosmetics. The influence of biotic (jasmonic acid) and abiotic (gold and silver nanoparticles) elicitors on the production of secondary metabolites was determined.





## Kultury in vitro roślin leczniczych z rodziny makowatych (Papaveraceae) jako źródło alkaloidów izochinolinowych

S. ZIELIŃSKA<sup>1</sup>, W. KOZŁOWSKA<sup>1</sup>, A. JUNKA<sup>2</sup>, A. MATKOWSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

<sup>2</sup>Pracownia Unikalnych Modeli Aplikacyjnych, Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

<sup>3</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;  
e-mail: sylwia.zielinska@umw.edu.pl

Alkaloidy izochinolinowe reprezentują zróżnicowaną grupę wyspecjalizowanych związków chemicznych występujących w roślinach z rodziny makowatych (Papaveraceae). Ich obecność w lateksie wpływa na zabarwienie tej wydzieliny, które przyjmuje odcienie od olivowego przez pomarańczowe do jaskrawej czerwieni. Związki te są powszechnie znane ze swoich silnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Warto podkreślić, że niektóre alkaloidy izochinolinowe, takie jak berberyna i kopteryna, są produkowane na skalę przemysłową z wykorzystaniem kultur tkanek roślinnych. Mimo to nasza wiedza pozostaje ograniczona w odniesieniu do wielu innych substancji o tym charakterze, które są produkowane w obfitości w roślinach znanych z medycyny ludowej z rodziny makowatych, w tym w podrodzynie Fumarioideae. W naszych badaniach wykorzystaliśmy kultury tkanek i organów roślinnych do ledzenia biosyntezy oraz ekstrakcji alkaloidów izochinolinowych. Związki te badamy pod kątem ich skuteczności w zwalczaniu drożdży z rodzaju *Candida* oraz patogennych szczepów bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem tych, które tworzą biofilmy. Ponadto, opracowaliśmy nowatorskie metody obejmujące system hodowli komórek *Chelidonium majus* L. wykonane z bionanocelulozy bakteryjnej. System ten ma na celu wywołanie reakcji w cytotwórczo unieruchomionych komórkach roślinnych, zwiastując w ten sposób ich właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Nasze badania dotyczą przede wszystkim *C. majus*, zioła tradycyjnie stosowanego w leczeniu

infekcji skórnych, ale eksperymenty obejmują także inne gatunki roślin m.in. z rodzajów *Corydalis*, *Galucium*, *Fumaria* i *Pseudofumaria*. Wyniki naszych dotychczasowych badań wskazują na znaczny potencjał wykorzystania organów i tkanki kalusowej hodowanych *in vitro* do wytwarzania znacznych ilości farmakologicznie ważnych alkaloidów izochinolinowych. Jednocześnie nie należy ignorować obecności pozostałych metabolitów wyspecjalizowanych w hodowanym materiale roślinnym, takich jak związki polifenolowe, które mogą odgrywać kluczowe role w modulowaniu działania przeciwdrobnoustrojowego obserwowanego w tych roślinach.

Badania zostały sfinansowane z projektu badawczego Sonata 15, ufundowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN). Nr projektu: 2019/35/D/NZ7/00266, tytuł: „Elicytory stresu biotycznego i abiotycznego jako modulatory profilu alkaloidów izochinolinowych w kierunku specyficznych właściwości przeciwdrobnoustrojowych roślin leczniczych z rodziny makuwatych”.

### In vitro cultures of medicinal plants of the poppy family (Papaveraceae) as a source of isoquinoline alkaloids

Isoquinoline alkaloids (IQA) represent a diverse group of specialized metabolites found in plants of the poppy family (Papaveraceae). Their presence in the latex affects the color of this excretion, which ranges from yellow through orange to vivid red. These compounds are well known for their strong antimicrobial properties. It is worth emphasizing that some IQA, such as berberine and coptisine, are produced commercially using plant tissue cultures. Nevertheless, our knowledge remains limited regarding many other substances of this nature, that are produced abundantly in various medicinal plants of the poppy family, including the subfamily Fumarioideae. In our research, we used plant tissue and organ cultures to monitor the biosynthesis and extraction of IQA. Their effectiveness in combating *Candida* yeast and pathogenic bacterial strains, with particular emphasis on those that form biofilms was also tested. Moreover, we have developed an innovative *Chelidonium majus* L. cell-support system based on the bacterial bionanocellulose. This system aims to elicit a response of partially immobilized plant cells, thereby increasing their antimicrobial properties. Our research focuses primarily on *C. majus*, a herb traditionally used to treat skin infections, but several other species of such genera as *Corydalis*, *Galucium*, *Fumaria* and *Pseudofumaria*, have also been examined. The results of our studies indicate the potentially great role of tissue and organ cultures *in vitro* for the production of significant amounts of pharmacologically important isoquinoline alkaloids. Nevertheless, the presence of other specialized metabolites, such as polyphenolic compounds, should not be ignored, as they may play a key role in modulating the antimicrobial activity observed in these plants.

This study was supported by the National Science Centre (NCN) grant: 2019/35/D/NZ7/00266 SONATA15, title: “Biotic and abiotic stress elicitors as modulators of isoquinoline alkaloid profile towards specific antimicrobial properties of medicinal plants from the Papaveraceae”.



## Pochodne kwasów hydroksycynamonowych w kulturach mikropędów roślin podplemienia Inuleae-Inulinae

A. STOJAKOWSKA, J. MALARZ

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN, Kraków;  
e-mail: [stoja@if-pan.krakow.pl](mailto:stoja@if-pan.krakow.pl)

Podplemi Inuleae-Inulinae rodziny astrowatych obejmuje 28 rodzajów i około 400 gatunków roślin, pochodzenia europejskiego, azjatyckiego i północnoafrykańskiego, w tym wiele gatunków o walorach użytkowych, także leczniczych (*Blumea* spp., *Carpesium* spp., *Inula* spp., *Pulicaria* spp.). Głównymi farmakologicznie aktywnymi metabolitami roślin podplemienia Inuleae-Inulinae są seskwiterpenoidy i polifenole o właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych, gastro- i hepatoprotekcyjnych, przyspieszających gojenie ran, hipoglikemicznych, hipolipidemicznych i wazorelaksacyjnych. Ostatnio zwrócono uwagę na ich aktywność przeciwdziałającą zmianom behawioralnym przypominającym depresję, obserwowanym u zwierząt laboratoryjnych. Związkami polifenolowymi najczęściej wymienianymi w kontekście aktywności farmakologicznej są flawonoidy i pochodne kwasów hydroksycynamonowych. Hodowle in vitro roślin *Buphthalmum speciosissimum* L., *Carpesium divaricatum* Siebold & Zucc., *Carpesium cernuum* L. i *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. prowadzono z użyciem płynnych lub zestalonych agarów po wyekstrahowaniu dodatkiem regulatorów wzrostu (BA, NAA, TDZ) dobranych odpowiednio dla każdego z gatunków. Stosowano oświetlenie ciągłe lub fotoperiod (16/8). Po ośmiu tygodniach hodowli, produkty zbierano, suszono w temperaturze pokojowej i poddawano ekstrakcji 70% (v/v) metanolem. Ekstrakty analizowano za pomocą technik HPLC-PAD i UHPLC-PAD-MS<sup>n</sup>, w celu zidentyfikowania i oszacowania zawartości polifenoli wytwarzanych przez mikropędy. Wszystkie badane hodowle produkowały charakterystyczne dla roślin macierzystych kwasy kawoilochinowe i kawoiloheksarowe oraz ich acylowane pochodne. Analiza technik UHPLC-PAD-MS<sup>n</sup> nie wykazała obecności flawonoidów w badanym materiale, pomimo że wyniki analiz HPLC-PAD wskazywały na obecność flawonoidów w hodowli roślin *B. speciosissimum*. Najwięcej polifenoli (31 związków) zidentyfiko-

wano w wyci gach z p dów *C. divaricatum*. Zawarto kwasu chlorogenowego (5-CQA), który dominował we frakcjach polifenolowych wieszko ci badanych kultur; wynosiła od 0,06%, w przeliczeniu na such mas , w hodowli p dów *T. speciosa* prowadzonej na agarowej po ywce MS zawieraj cej 4,44  $\mu$ M BA i 0,54  $\mu$ M NAA do 0,63%, w mikrop - dach *C. cernuum* hodowanych na zestalonej agarem po ywce MS z dodatkiem 2,0  $\mu$ M BA i 0,1  $\mu$ M NAA.

## Hydroxycinnamic acid derivatives in multiple shoot cultures of the Inuleae-Inulinae

The Inuleae-Inulinae subtribe of the Asteraceae comprises 28 genera and about 400 species of European, Asian and North African origin. Numerous plants of the subtribe have found use as ingredients of foods, beverages, spices, and medicines (*Blumea* spp., *Carpesium* spp., *Inula* spp., *Pulicaria* spp.). The primary pharmacologically active metabolites of the Inuleae-Inulinae are sesquiterpenoids with antiproliferative and anti-inflammatory activities and polyphenols that have antioxidative, anti-inflammatory, gastro- and hepatoprotective, wound-healing, anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic, and vasorelaxant properties. Recently, their activity against depression-like behavior in mice has been observed in several experimental models. Flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives are regarded as major pharmacologically active polyphenolic constituents of the plants. In vitro multiple shoot cultures of *Buphthalmum speciosissimum* L., *Carpesium divaricatum* Siebold & Zucc., *Carpesium cernuum* L. and *Telekia speciosa* (Schreb.) Baumg. were grown using liquid and agar-solidified MS media supplied with plant growth regulators (BA, NAA, TDZ). The medium composition was dependent on the requirements of the cultivated species. The shoots were maintained under a continuous illumination or under a photoperiod 16/8 (light/dark). After eight week in culture, the shoots were harvested, dried in a room temperature, pulverized, and extracted with 70% (v/v) methanol. The extracts were analyzed using HPLC-PAD and UHPLC-PAD-MS<sup>n</sup> techniques, to identify polyphenolic constituents and to assess quantities of polyphenols produced by the multiple shoots. All examined cultures accumulated caffeoylquinic and caffeoylhexaric acids, typical of the parent plants, together with their acylated derivatives. The UHPLC-PAD-MS<sup>n</sup> analysis did not show the presence of flavonoids in the investigated plant material, although the HPLC-PAD examination results revealed flavonoid accumulation in the multiple shoots of *B. speciosissimum*. The highest number of polyphenols (31 compounds) was found in the extracts from multiple shoots of *C. divaricatum*. The estimated chlorogenic acid (5-CQA) contents ranged from 0.06% (calculated on a dry weight basis) in the multiple shoots of *T. speciosa* cultivated on the agar-solidified MS medium containing 4.44  $\mu$ M BA and 0.54  $\mu$ M NAA to 0.63% in the multiple shoots of *C. cernuum* maintained on the solidified MS medium supplemented with 2.0  $\mu$ M BA and 0.1  $\mu$ M NAA. Chlorogenic acid dominated the polyphenolic fractions in most of the examined cultures.



## Wpływ wybranych metabolitów roślinnych na wzrost i rozwój *Fusarium oxysporum*

J. MIERZIAK-DERECKA<sup>1</sup>, Y. KOCHNEVA<sup>1</sup>, G. BILIŃSKA<sup>1</sup>, K. KOSTYN<sup>2</sup>,  
W. WOJTASIK-GÓRNA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;

<sup>2</sup>Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

e-mail: justyna.mierziak@uwr.edu.pl

*Fusarium* to rodzaj grzybów strzępkowych, który zawiera wiele istotnych agronomicznie patogenów roślin, producentów mykotoksyn oraz oportunistycznych patogenów ludzkich. Grzyby z rodzaju *Fusarium* są odpowiedzialne za znaczne straty w uprawie lnu, który jest ważną rośliną uprawną, dostarczającą cennych nasion i włókien. Obecnie nie istnieje odmiana lnu całkowicie odporna na zakażenie grzybami *Fusarium*. Wiskozna zakażenie lnu jest spowodowana przez *F. oxysporum* f. sp. *lini*. Ponadto *F. oxysporum* f. sp. *lini* produkuje niebezpieczne mykotoksyny, których obecność w roślinach uprawnych stanowi poważne zagrożenie dla wiatowego bezpieczeństwa żywności i pasz. Z tych powodów ten rodzaj grzybów stał się przedmiotem naszych zainteresowań badawczych. Opracowano różne metody kontroli i zapobiegania zakażeniom grzybiczym roślin. Metody chemiczne są najbardziej popularnym podejściem. Jednak te metody mają swoje ograniczenia, ze względu na możliwość powstawania toksycznych produktów, zanieczyszczenie środowiska oraz wpływ na substancje odżywcze i właściwości organoleptyczne żywności i pasz. Dlatego istnieje potrzeba odkrycia lepszych metod, które mogą zapobiegać kolonizacji roślin przez grzyby i produkcji przez nie niebezpiecznych mykotoksyn. Metabolity roślinne są rozwiane jako alternatywa dla tradycyjnych fungicydów, ponieważ są one uważane za bardziej przyjazne dla środowiska i bezpieczniejsze związki pozwalające na kontrolę rozwoju grzybów i zawartości mykotoksyn w roślinach uprawnych, a co za tym idzie w żywności i paszach. W wielu doniesieniach literaturowych

stwierdzono, że metabolity roślinne mogą hamować wzrost mikroorganizmów. W naszych badaniach również zauważyliśmy taki efekt. Skupiliśmy się na wpływie metabolitów roślinnych, należących do grupy związków fenylpropanoidowych i karotenoidowych, na wzrost i rozwój *F. oxysporum* f. sp. *lini*, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji przez tego grzyba mykotoksyn. Uzyskaliśmy obiecujące rezultaty, zwłaszcza dla witeksyny, kwasu ferulowego i ionenów.

## The influence of selected plant metabolites on the growth and development of *Fusarium oxysporum*

*Fusarium* is a genus of filamentous fungi that contains many agronomically important plant pathogens, mycotoxin producers, and opportunistic human pathogens. Fungi from the genus *Fusarium* are responsible for considerable crop losses in fax cultivation, an important crop providing valuable seeds and fibers. Currently, there are no varieties of fax fully resistant to *Fusarium* infection. Most infections in fax are caused by *F. oxysporum* f. sp. *lini*. Furthermore *F. oxysporum* f. sp. *lini* produces hazardous mycotoxins, and their presence in cultivated plants is a serious threat to global food and feed safety. For those reasons this particular type of fungi has become the focus of our research interests. Various approaches to control and prevent fungal infections in plants have been developed. Chemical methods are the most popular approaches. However, these methods are limited due to residual toxic products, environmental pollution, and interference with nutrients and organoleptic properties of food and feed. Therefore, there is a need to discover better methods that can prevent fungal colonization of plants and their production of dangerous mycotoxins. Plant metabolites are considered as alternatives for traditional fungicides, as they are generally regarded as environmentally friendly and safer options for controlling the growth of fungi and mycotoxins content in cultivated plants, and consequently in food and feed. Many plant metabolites have been found to inhibit microbial growth. In our research we also noted such an effect. In our investigation, we focused on the influence of plant metabolites, belonging to the group of phenylpropanoid and carotenoid compounds, on the growth and development of *F. oxysporum* f. sp. *lini*, with particular emphasis on mycotoxin production by this fungus. We obtained promising results, especially for vitexin, ferulic acid, and ionenes.



## SESJA 3

# Metody biotechnologiczne w tworzeniu nowych odmian roślin









## Wieloletnie badania transgenicznego pszenżyta

J. ZIMNY<sup>1</sup>, S. OLESZCZUK<sup>1</sup>, M. JĘDRYCZKA<sup>3</sup>, S. SOWA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii i Biotechnologii, IHAR-PIB, Radzików;

<sup>2</sup>Laboratorium Kontroli GMO, IHAR-PIB, Radzików;

<sup>3</sup>Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin, IGR-PAN, Poznań;

e-mail: j.zimny@ihar.edu.pl

W wystąpieniu przedstawimy wyniki 40-letnich badań nad systemami regeneracji pszenżyta w kulturach in vitro oraz nad uzyskiwaniem transgenicznego pszenżyta wyposażonego w gen *bar* niesący odporność na herbicyd oraz gen markerowy *uidA* dla glukuronidazy. Badania nad transgenami były prowadzone w obszarach dotyczących stabilności genotypowej i fenotypowej, toksyczności, zdolności do zapylenia krzyżowego oraz lokalizacji wprowadzonych genów na chromosomach. Uzyskiwanie roślin transgenicznych wymaga wypracowania metod umożliwiających wprowadzenie do komórki informacji genetycznej, a następnie zregenerowania płodnych roślin z transgenicznych komórek. Opracowany w IHAR system regeneracji zbóż drogą somatycznej embriogenezy okazał się niezwykle wydajny i jest stosowany w innych laboratoriach. Dzięki temu systemowi w latach 90. uzyskano pierwsze w świecie transgeniczne pszenżyto. Poza metodę regeneracji niezbędnym elementem systemu był efektywnie działający konstrukt genowy, uzyskany dzięki współpracy z Uniwersyteciem w Hamburgu (Prof. H. Lörz, dr Dirk Becker). Trzecim, niezbędnym elementem kompleksu badawczego było zoptymalizowanie metodyki wprowadzenia wybranych genów przy użyciu strzelby genowej. Główne wnioski z wielopokoleniowych badań prowadzonych przez 30 lat można podsumować następująco: Rozmnażanie transgenicznego pszenżyta doprowadziło do stopniowego wyciszenia genu *bar* – odporności na fosfotricynę bez zmiany poziomu ekspresji genu markerowego *uidA* glukuronidazy. Poszczególne zdarzenia transformacyjne wiążą się z włączaniem transgenów do różnych chromosomów. W badaniach przelotu pyłku pszenżyta, niezależnie od roku i wariantu eksperymentu, w odległości większej niż 85 m nie obserwowano transgenicznych ziaren pyłku. W żadnym z wariantów eksperymentu nad obcoza-

pyleniem pszen yta próg znakowania ywno ci GMO przyj ty w Europie (0,9%), nie został przekroczony w odległo ci wi kszej ni 11 m od pola z ro linami transgenicznymi. Badania obejmuj ce karmienie myszy pasz z transgenicznego pszen yta nie wykazały objawów patologicznych oraz zmian na poziomie chromosomów i DNA u badanych zwierz t. Badania porównawcze metabolomu ziarna ro lin transgenicznych i nietransgenicznych nie wykazały ró nic dla zwi zków tłuszczowych i białek.

## Long-term study of transgenic triticale

We will present the results of 40 years of research on the induction of triticale regeneration systems in in vitro culture and the production of transgenic triticale. Research on transgenes has been carried out in four main areas: genotypic and phenotypic stability, toxicity, ability to cross-pollinate and localisation of introduced genes on chromosomes. The system developed at IHAR for regenerating cereals by inducing somatic embryogenesis has proved extremely efficient and is being used in other laboratories. Its development made it possible to obtain the world's first transgenic triticale plants in the 1990s. In addition to the regeneration method, an essential component of the system was a well-functioning gene construct developed at the University of Hamburg (Prof. H. Lörz, Dr. Dirk Becker). The third essential element of the research complex was the optimised and efficient use of the particle gun. We have responded to the need for multi-generational and multi-directional research on transgenic plants. The main conclusions of this research can be summarised as follows: Propagation of transgenic triticale over a period of 30 years resulted in the gradual silencing of the bar gene (phosphinothricin resistance). The uidA glucuronidase marker gene was not silenced over the same period. Individual transformation events were associated with the incorporation of transgenes into different chromosomes. Only a few pollen grains were observed at a distance of 85 m, irrespective of the year and the experimental design. In none of the experimental designs did the GMO food labelling threshold, adopted in Europe (0.9%), get exceeded at a distance of more than 11 m from a field with transgenic plants. Studies in which mice were fed diets containing transgenic triticale showed no pathological signs in the animals. Grain metabolome test of transgenic and non-transgenic plants showed no differences in fatty compounds and proteins.



## Haploidyzacja wybranych warzyw dwuletnich – badania podstawowe i praktyka hodowlana

A. KIELKOWSKA

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: a.kielkowska@urk.edu.pl

Otrzymywanie odmian mieszańcowych F1 jest wiadomą metodą we współczesnej hodowli roślin. Odmiany mieszańcowe oparte na heterozji charakteryzują się obfitym i wyrównanym plonem o wysokiej jakości, co jest niezbędne do sprośnienia wymaganiom współczesnego rynku. Sukces odmian mieszańcowych u roślin obco- i dwuletnich opiera się na wytworzeniu linii homozygotycznych o dużej zdolności kombinacyjnej. Tradycyjnie takie linie uzyskuje się poprzez chów wsobny, który jest procesem długotrwałym (średnio około 6–8 lat), zwłaszcza u roślin dwuletnich. Skrócenie czasu potrzebnego na uzyskanie linii homozygotycznych ma kluczowe znaczenie dla przyspieszenia procesu hodowli nowych, ulepszonych odmian o wysokich walorach rolniczych i zdrowotnych. Embriogeneza gametyczna jest cennym narzędziem biotechnologicznym wspierającym hodowlę roślin poprzez szybkie wytwarzanie roślin homozygotycznych. W tym wystąpieniu zostanie zaprezentowany przegląd różnych metod haploidyzacji na podstawie badań prowadzonych od około 30 lat w Katedrze Biologii i Biotechnologii Roślin. Opracowane metody, takie jak gynogeneza u cebuli (*Allium cepa* L.) i androgeneseza u kapusty (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) zaowocowały wyhodowaniem nowych wartościowych odmian u tych gatunków roślin warzywnych.

Badania były finansowane przez MRiRW i prowadzone we współpracy z firmami hodowlano-nasiennymi (KHINO Polan, PlantiCo Zielonki).

## Haploidization of selected biennial vegetable species – basic research and breeding practice

F1 hybrid technology is the leading method in modern plant breeding. Hybrid varieties based on heterosis are characterized by abundant high-quality yield and uniformity, which are necessary to meet the requirements of the modern market. The success of hybrid varieties in open-pollinated crops relies on production of homozygous lines with high combining ability. Traditionally, such lines are obtained through inbreeding, which is a long-term process (about 6–8 years on average), especially in biennial plants. Reduction of the time required for obtaining homozygous lines is crucial for accelerating the process of breeding new, improved varieties with high agricultural and health-promoting values. Gametic embryogenesis are valuable biotechnological tools to support plant breeding by fast generation of true homozygous plants. Here a revision of different methods of haploidization conducted for about 30 years at the Department of Plant Biology and Biotechnology will be presented. Elaborated methods such as gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) and androgenesis in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) resulted in release on new valuable cultivars of these vegetables.

The research was financed by MRiRW and conducted in collaboration with breeding companies (KHiNO Polan, PlantiCo Zielonki).



## Efektywność regeneracji roślin w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy jarej i ozimej

M. GAJECKA, B. CHMIELEWSKA, I. SZAREJKO, J. ZBIESZCZYK

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski w Katowicach;  
e-mail: monika.gajECKa@us.edu.pl

Androgeneza jest najefektywniejszą metodą produkcji podwojonych haploidów zbóż, które szeroko wykorzystywane są w celu skrócenia czasu wprowadzania nowych odmian w programach hodowlanych. Kultura izolowanych mikrospor poprzez uzyskanie homogennej zawiesiny mikrospor umożliwia liwią synchronizowany rozwój struktur pochodzenia generatywnego bez zanieczyszczenia tkanek somatycznych. W procesie androgenezy, mikrospory, które w warunkach naturalnych rozwijają się w ziarnie pyłku, poprzez zastosowanie stresu wchodzi w rozwój sporofitycznego. Rodzaj i czas traktowania stresem są kluczowymi czynnikami warunkującymi efektywność indukcji i regeneracji roślin ogółem, jak również skuteczność regeneracji roślin zielonych, czy skuteczność regeneracji podwojonych haploidów. W niniejszych badaniach określiliśmy wpływ traktowania wstępnych na regenerację roślin ogółem, czy skuteczność regeneracji roślin zielonych oraz skuteczność diploidyzacji w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy jarej i ozimej. Analizowano wpływ traktowania wstępnie dębem w 4°C w wodzie przez 21–28 dni, dębem w 4°C w roztworze kwasu hydroksynikotynowego przez 7 dni i mikrospor w roztworze A przez 48 godzin. Wykazano, że traktowanie wstępnie dębem w 4°C w wodzie jest najaktywniejszym traktowaniem wstępnym w regeneracji roślin zielonych. Analizowano również efektywność regeneracji roślin w kulturze izolowanych mikrospor genotypów pochodzących z programów hodowlanych. Dla genotypów jarych uzyskano pomiędzy 21 a 52 regeneranty w przeliczeniu na 100 tysięcy wyłoniętych mikrospor; jednak rośliny zielone stanowiły ok. 10–20% ogółu roślin ogółem. W przypadku genotypów pszenicy ozimej poziom regeneracji roślin ogółem był na

poziomie ok. 10 ro lin w przeliczeniu na 100 tys. wyłonych mikrospor, jednak ponad 50% uzyskanych regenerantów stanowiły ro liny zielone. Dodatkowo, ponad 90% uzyskanych regenerantów stanowiły podwojone haploidy. Opracowany system indukcji androgenozy w kulturze izolowanych mikrospor umożliwia produkcję podwojonych haploidów pszenicy jarej i ozimej i może być wykorzystywany w programach hodowlanych w celu produkcji stabilnych fenotypowo linii.

## Effectiveness of plant regeneration in isolated microspore culture of spring and winter wheat

Androgenesis is the most efficient method of doubled haploids production in cereals, which are widely used to speed up the introduction of new varieties. Obtaining a homogeneous microspore suspension enables synchronized development of structures of generative origin without contamination from somatic tissues. In the process of androgenesis, microspores, which normally develop into pollen grains undergo sporophytic development under the influence of stress. The type and duration of stress treatment are key factors determining the efficiency of induction and regeneration of plants overall, as well as the frequency of regeneration of green plants or spontaneous diploidization. In this study, we determined the impact of pre-treatments on plant regeneration, frequency of green plant regeneration, and frequency of diploidization in the culture of isolated microspores of spring and winter wheat. The effect of pre-treatment was analyzed, including tillers treated at 4°C in water for 21–28 days, tillers at 4°C in a solution of hydroxynicotinic acid, and microspores in solution A for 48 hours. It was shown that the cold pre-treatment of tillers is the most effective stress for green plant regeneration. The efficiency of plant regeneration in the culture of isolated microspores of genotypes from breeding programs was also analyzed. For spring genotypes, between 21 and 52 regenerants per 100,000 plated microspores were obtained, but green plants accounted for about 10–20% of the total plants. In the case of winter wheat genotypes, the overall plant regeneration was around 10 plants per 100,000 plated microspores, but over 50% of the obtained regenerants were green. Additionally, over 90% of the obtained regenerants were doubled haploids. The developed system of androgenesis induction in the culture of isolated microspores enables the production of doubled haploids of spring and winter wheat and can be used in breeding programs to produce phenotypically stable lines.



## Inhibitory metylacji zwiększają efektywność embriogenezy mikrospor pszenicy zwyczajnej

D. WEIGT<sup>1</sup>, K. SZEWCZYK<sup>1</sup>, S. MIKOŁAJCZYK<sup>1</sup>, I. ŻUR<sup>3</sup>, I. SIATKOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;

<sup>2</sup>Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;

<sup>3</sup>Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;  
e-mail: dorota.weigt@up.poznan.pl

Inhibitory metylacji (IM) regulują procesy epigenetyczne i odpowiadają za aktywność genów. Do najczęściej stosowanych IM należą: 5-azacytydyna (AZC) – niemetylowany analog cytydyny oraz trichostatyna A (TSA) – inhibitor deacetylazy histonowej klasy I i II. Związki te reaktywują transkrypcję, powodują hipometylację DNA lub otwarcie chromatyny. Analiza transkryptomu pszenicy potwierdziła, że IM wpływają na wydajność embriogenezy mikrospor (EM) u różnych gatunków roślin, aktywując geny odpowiedzialne za zmianę kierunku rozwoju z generatywnego w sporofityczny oraz stymulując tworzenie embriogenego kalusa poprzez aktywację proliferacji komórek. Celem badań była analiza wpływu 5-azacytydyny oraz trichostatyny A na wydajność EM i regenerację roślin pszenicy zwyczajnej. Materiał roślinny stanowiły genotypy pszenicy charakteryzujące się zróżnicowaną zdolnością do EM. Pylniki znajdujące się w fazie jednej drowej traktowano AZC lub TSA w różnych kombinacjach stężeń, a następnie płukano je i wykładano na płynny podkład indukujący C17. Każdy wariant traktowania powtarzano trzykrotnie. We wszystkich wariantach do wiadczalnych zastosowano kontrolę bez traktowania IM. Tworzące się struktury embriogenne pasowano na podkład regeneracyjny MS. W wiadczalnych analizowanych genotypach IM wpłynęły korzystnie na wydajność EM. AZC stymulowała EM wydajniej niż TSA. Struktury embriogenne i rośliny zielone uzyskano ze wszystkich genotypów, lecz nie we wszystkich kombinacjach do wiadczalnych. IM nie wpłynęły istotnie na frekwencję albinosów.

ródło finansowania: MRiRW, badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, tytuł projektu: „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.

## Methylation inhibitors increase the efficiency of microspore embryogenesis in common wheat

Methylation inhibitors (IM) regulate epigenetic processes and are responsible for gene activity. Among the most commonly used IM are: 5-azacytidine (AZC) – an unmethylated analog of cytidine, and trichostatin A (TSA) – an inhibitor of histone deacetylase classes I and II. These compounds reactivate transcription, causing DNA hypomethylation or chromatin opening. Transcriptome analysis of wheat confirmed that IM affect the efficiency of microspore embryogenesis (ME) in various plant species by activating genes responsible for changing the direction of development from generative to sporophytic and stimulate the formation of embryogenic structures by activating cell proliferation. The aim of the research was to analyze the effect of 5-azacytidine and trichostatin A on the efficiency of ME and plant regeneration in common wheat. Plant material were wheat genotypes characterized by varying ME ability. Pollen grains in the uninucleate stage were treated with AZC or TSA at different concentrations, then rinsed and plated on liquid C17 induction medium. Each treatment combination was repeated three times. Control groups without IM treatment were used in all experimental variants. The developing embryogenic structures were transferred to regenerative MS medium. The studied IM positively influenced the efficiency of ME in most analyzed genotypes. AZC stimulated ME more efficiently than TSA. Embryogenic structures and green plants were obtained from all genotypes, but not in all treatment combinations. IM did not significantly affect the frequency of albinos.

Source of funding: Ministry of Agriculture and Rural Development, basic research for biological progress in plant production, project title “Identification of factors determining the induction of microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.)”.





## Dynamika transkryptomu mikrospor jęczmienia podczas indukcji procesu embriogenezy

A. NOWICKA<sup>1,2</sup>, M. KOVACIK<sup>2</sup>, A. MAKSYLEWICZ<sup>1,3</sup>, P. KOPEĆ<sup>1</sup>, E. DUBAS<sup>1</sup>,  
M. KRZEWSKA<sup>1</sup>, A. SPRINGER<sup>1</sup>, R.E. HOFFIE<sup>4</sup>, D.S. DAGHAMA<sup>4</sup>,  
A. PECINKA<sup>2</sup>, J. KUMLEHN<sup>4</sup>, I. ŽUR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

<sup>2</sup>Institute of Experimental Botany CAS, Olomouc;

<sup>3</sup>Małopolskie Centrum Biotechnologii UJ, Kraków;

<sup>4</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Stadt Seeland;

e-mail: p.kopec@ifr-pan.edu.pl

Rozwój niedojrzałych ziaren pyłku (mikrospor) rośliny siewnej może na przekierować na alternatywną ścieżkę rozwoju, inicjując proces embriogenezy, prowadzący do powstania roślin haploidalnych lub podwojonych haploidów. W naszych badaniach skupiliśmy się na identyfikacji mechanizmu regulacji indukcji embriogenezy mikrospor poprzez analizę dynamiki zmian transkryptomu mikrospor z użyciem techniki RNA-seq. Do badań wykorzystaliśmy dwie odmiany jęczmienia (Igr i Golden Promise) różniące się pod względem efektywności indukcji tego procesu. Wytypowaliśmy 628 genów kandydujących na markery molekularne zaangażowanych w przeprogramowanie mikrospor oraz 160 genów różnicujących badane genotypy. Wyniki analizy transkryptomowej tworzą wysokorozdzielczy atlas ekspresji genów podczas początkowych etapów embriogenezy mikrospor jęczmienia, oferując wgląd w molekularne podłoże podatności i przyczyny oporności na indukcję tego procesu.

## Transcriptome dynamics of barley microspores during the induction of embryogenesis

The development of immature pollen grains (microspores) of higher plants can be redirected to an alternative developmental path, initiating the process of embryogenesis, which leads to the formation of haploid plants or doubled haploids. In our research, we focused on identifying the mechanism of regulation for the induction of microspore embryogenesis by analyzing the dynamics of changes in the microspore transcriptome using the RNA-seq technique. We utilized two barley cultivars (Igri and Golden Promise) that differ in terms of the efficiency of induction of this process. We identified 628 candidate genes for molecular markers involved in microspore reprogramming and 160 genes that distinguish the examined genotypes. The results of the transcriptomic analysis provide a high-resolution atlas of gene expression during the initial stages of barley microspore embryogenesis, offering insight into the molecular basis of responsiveness and causes of recalcitrance to the induction of this process.



## Przyczyny słabej konwersji haploidalnych zarodków owsa (*Avena sativa* L.)

K. DZIURKA<sup>1</sup>, M. DZIURKA<sup>1</sup>, M. SUJKOWSKA- RYBKOWSKA<sup>2</sup>,  
E. MUSZYŃSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

<sup>2</sup>Katedra Botaniki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;  
e-mail: k.dziurka@ifr-pan.edu.pl

W wyniku krzyżowania oddalonego owsa (*Avena sativa* L.) z kukurydzą (*Zea mays* L.) otrzymujemy haploidalne zarodki owsa pozbawione bielma, co stanowi o konieczności ich wyizolowania z ziarna i wyłożenia na podłożu w warunkach in vitro do dalszego wzrostu i rozwoju. Współczynnik konwersji haploidalnych zarodków owsa w rośliny jest niezadawalająco niski. Równocześnie nie jest to kluczowy etap w produkcji podwojonych haploidów owsa, które są cennym materiałem dla hodowców. Celem tych badań było określenie przyczyn słabego kiełkowania zarodków haploidalnych. Przeprowadzono obserwacje morfologiczne, anatomiczne, analizy profilu hormonalnego, immunolokalizację IAA oraz określono zawartość nieenzymatycznych antyoksydantów w 21 dniowych zarodkach haploidalnych w odniesieniu do zarodków zygotycznych. Stwierdzono, że przyczyną słabej konwersji zarodków haploidalnych w rośliny jest ich opóźniony w porównaniu do zarodków zygotycznych rozwój i nieregularna budowa anatomiczna. Ponadto w haploidalnych zarodkach obserwowano niską zawartość aktywnego IAA, wysoką zawartość prekursora IAA oraz nieaktywnych form auksyn. Biorąc pod uwagę, że auksyny odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu siapikalno-bazalnej osi zarodka i koordynują powstanie wzorca embrionalnego, nieregularna budowa strukturalna haploidalnych zarodków może tłumaczyć efekt zaburzeń w syntezie auksyn lub ich dystrybucji podczas morfogenezy. Immunolokalizacja IAA wykazała, że w zarodkach zygotycznych, IAA gromadzi się głównie w jądrach komórkowych, zaś w zarodkach haploidalnych dodatkowo w cytoplazmie. Z kolei w słabsze zawartości cytokinin w haploidalnych za-

rodkach w porównaniu z zygocycznymi sugeruj ich wcze niejsz faz rozwoju, co jest spójne z obserwacjami anatomicznymi. Akumulacja ftohormonów zwi zanych ze stresem (JA, SA), jak i dwukrotnie wy sze (w stosunku do zarodków zygocycznych) st enie nieenzymatycznych, niskocz steczkowych antyoksydantów przemawia za obecno ci stresu oksydacyjnego w zarodkach haploidalnych owsa. Prezentowane badania przyczyniaj si do lepszego rozumienia procesu rozwoju haploidalnych zarodków owsa.

## Reasons for poor conversion of haploid oat embryos (*Avena sativa* L.)

As a result of crossbreeding oat (*Avena sativa* L.) with maize (*Zea mays* L.), we obtain haploid oat embryos without endosperm, which makes it necessary to isolate them from the ovaries and place on a medium in in vitro conditions for further growth and development. The conversion rate of haploid oat embryos into plants is unsatisfactory. At the same time, it is a key stage in the production of doubled oat haploids, which are a valuable material for breeders.

The research aimed to determine the causes of poor germination of haploid embryos. Morphological and anatomical observations, phytohormones and non-enzymatic antioxidants analysis, and IAA immunolocalization were carried out in 21-day-old haploid embryos concerning to zygotic embryos. The poor conversion of haploid embryos into plants was due to their delayed, compared to zygotic embryo, development and irregular anatomical structure. Moreover, a low content of active IAA, a high content of the IBA precursor and inactive forms of auxins were observed in haploid embryos. Since auxins play a crucial role in forming the apical-basal axis of the embryo and coordinating the formation of the embryonic pattern, the irregular structure of haploid embryos can be explained by the effect of disturbances in the synthesis of auxins or their distribution during morphogenesis. Immunolocalization of IAA showed that in zygotic embryos IAA accumulates mainly in the cell nuclei, in the haploid embryo additionally in the cytoplasm. In turn, higher cytokinin contents in haploid embryos than in zygotic embryos suggest their earlier phase of development, which is consistent with anatomical observations. The accumulation of stress-related phytohormones (JA, SA) as well as a twice as high (compared to zygotic embryos) amount of non-enzymatic, low-molecular antioxidants support the presence of oxidative stress in haploid oat embryos. The presented research contributes to a better understanding of the development process of haploid oat embryos.



## Gryka w kulturach in vitro: stan obecny i perspektywy

A. BETEKHTIN<sup>1</sup>, E. GRZEBELUS<sup>2</sup>, E. KURCZYŃSKA<sup>1</sup>, A. MILEWSKA-HENDEL<sup>1</sup>,  
A. PIŃSKI<sup>1</sup>, R. PEREZ-PEREZ<sup>1</sup>, E. ŚLIWIŃSKA<sup>3</sup>, K. SALA<sup>1</sup>, A. TOMASIAK<sup>1</sup>,  
M. ZARANEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski w Katowicach;

<sup>2</sup>Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>3</sup>Katedra Biotechnologii, Politechnika Bydgoska;  
e-mail: alexander.betekhtin@us.edu.pl

Nasze badania skupiają się na obu gatunkach gryki (*Fagopyrum esculentum* i *F. tataricum*) i obejmują one m.in. opracowanie skutecznych technik hodowli protoplastów i otrzymywanie hybryd somatycznych poprzez elektrofuzję protoplastów. Co więcej, analiza kalusa morfogenicznego oraz niemorfogenicznego wykazała dynamiczne zmiany (zarówno u *F. tataricum*, jak i *F. esculentum*) w poziomie modyfikacji epigenetycznych w trakcie pasażu. Po raz pierwszy uzyskali my stabilne transformanty *F. tataricum*, dokonując ekspresji białka zielonej fluorescencji GFP (green fluorescent protein) i ekspresji GUS (beta-glucuronidase). Ponadto rozwój techniki transformacji pozwolił nam na inaktywację genu desaturazy fitoenu przy użyciu systemu CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9), umożliwiając uzyskanie roślin albino-tycznych. Prowadzone badania otwierają nowe możliwości w badaniach podstawowych, jak też aplikacyjnych, pozwalając na wykorzystanie pełnego potencjału gryki.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt OPUS (2020/37/B/NZ9/01499) oraz Sonata Bis (2020/38/E/NZ9/00033).

## Buckwheat in tissue culture: current status and future perspectives

Our research focuses on both buckwheat species (*Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*) and includes, among others, developing effective protoplast breeding techniques and obtaining somatic hybrids by protoplast electrofusion. Moreover, the morphogenic and non-morphogenic calli analysis showed dynamic changes (in both *F. tataricum* and *F. esculentum*) in the level of epigenetic modifications during passage. For the first time, we obtained stable *F. tataricum* transformants by expressing the green fluorescent protein GFP and GUS. Moreover, the development of the transformation technique allowed us to inactivate the phytoene desaturase gene using the CRISPR/Cas9 system, allowing us to obtain albino plants. The conducted research opens new possibilities in basic and applied research, allowing the full potential of buckwheat to be used.

Research funded by the National Science Centre Poland-Projects OPUS (2020/37/B/NZ9/01499) and Sonata Bis (2020/38/E/NZ9/00033).



## Fizyczne czynniki mutagenne jako narzędzie w hodowli twórczej roślin ozdobnych in vitro

N. MILER

Pracownia Ogrodnictwa, Katedra Biotechnologii, Politechnika Bydgoska;  
e-mail: nmiler@pbs.edu.pl

Rośliny ozdobne są najliczniej reprezentowaną grupą pod względem liczby corocznie tworzonych nowych odmian. Potrzeby rynku zmieniają się dynamicznie, stawiając przed hodowcami coraz to nowe wyzwania: klienci oczekują odmian o atrakcyjnym wyglądzie, a producenci wymagają odmian odpornych na choroby, łatwych w uprawie, transporcie i przechowaniu. Od hodowców oczekuje się szybkich efektów, ponieważ trwałość odmian na rynku jest stosunkowo krótka. Podstawową metodą hodowli wykorzystywaną w tworzeniu nowych odmian roślin ozdobnych jest krzyżowanie, a jako dodatkowe źródło zmienności, szczególnie dla cennych wyselekcjonowanych genotypów, stosuje się indukowaną mutagenezę. Mutagenеза, inaczej niż krzyżowanie, prowadzi do zmian pojedynczych cech rośliny bez szerokiej reorganizacji całego genomu. W dodatku zmianom podlegają cechy łatwe w detekcji i jednocześnie istotne dla roślin ozdobnych – zmiany w wyglądzie. Za pomocą indukowanej mutagenезы możliwe jest na przykład tworzenie odmian o nowych kolorystycznych wybranych odmianach wyjątkowej. W hodowli twórczej wykorzystuje się fizyczne i chemiczne czynniki mutagenne, przy czym przewagą czynników fizycznych jest wysze bezpieczeństwo aplikacji i brak szkodliwych odpadów, natomiast wady – ograniczony dostęp. Do najczęściej wykorzystywanych w praktyce hodowlanej fizycznych mutagenów należą różne rodzaje promieniowania jonizującego: strumień cząstek jonów, strumień elektronów, strumień wysokoenergetycznych fotonów (promieniowanie X) czy promieniowanie gamma. Alternatywnie można wykorzystywać fale elektromagnetyczne z zakresu UV czy mikrofal, ale ich skuteczność w indukowaniu mutacji jest niższa. Ważnym zagadnieniem związanym z indukowaną mutagenезą jest wybór rośliny macierzystej i sposobu aplikacji czynnika

mutagennego. Napromienianie nasion lub sadzonek prowadzi do tworzenia chimer – form częściowo zmutowanych, co wydüła proces oceny i wprowadzenia odmiany na rynek. Wykorzystanie kultur *in vitro* jako systemu do napromieniania i regeneracji roślin z eksplantatów niezawierających merystemów, umożliwia uzyskanie fenotypów jednorodnie zmienionych pod wpływem czynnika mutagennego. Dzięki temu mutageneza indukowana *in vitro* jest skutecznym narzędziem do tworzenia nowych odmian w krótkim czasie.

## Physical mutagenic factors as a tool for *in vitro* breeding of ornamental plants

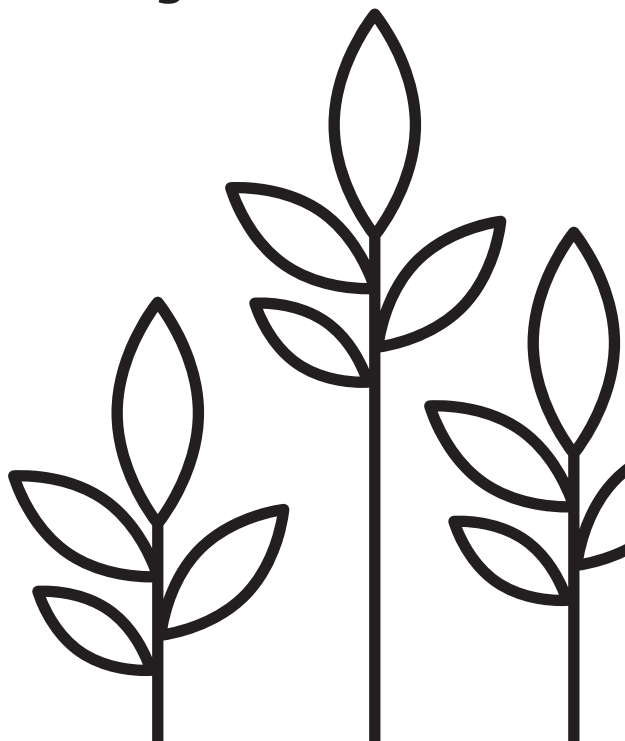
Ornamental plants are the most represented group in terms of the number of new cultivars released each year. Market needs are changing dynamically, posing constant challenges for breeders: customers expect cultivars with an attractive appearance, and growers require cultivars that are resistant to diseases, easy to grow, transport and store. The basic method used to create new cultivars of ornamental plants is crossbreeding. Induced mutagenesis is used as an additional source of variability, especially for valuable selected genotypes. Mutagenesis, unlike crossbreeding, leads to changes in individual plant traits without a broad rearrangement of the entire genome. Moreover, the mutations frequently relate to features that are easy to detect and important for ornamental plants – they are changes in the appearance. With mutagenesis it is possible, for example, to create cultivars that are color variants of the selected initial cultivar. Physical and chemical mutagenic factors are used in breeding, with the advantage of physical factors being higher application safety and the lack of harmful waste, while the disadvantage is limited access. The most commonly used physical mutagens in breeding include various types of ionizing radiation: a stream of heavy ions, a stream of high-energy electrons, a stream of high-energy photons (X-rays) and gamma radiation. Alternatively, electromagnetic waves in the UV or microwave range can be used, but their effectiveness in inducing mutations is lower. An important issue related to induced mutagenesis is the choice of the mother plant and the method of application of the mutagenic treatment. Irradiation of seeds or cuttings leads to the formation of chimeras – partially mutated forms. The use of *in vitro* cultures as a system for irradiation and regeneration of plants from explants containing no meristems makes it possible to obtain phenotypes uniformly changed. This makes *in vitro* induced mutagenesis an effective tool for creating new cultivars in a short time.





## SESJA 4

# Praktyczne zastosowanie osiągnięć z dziedziny kultur in vitro i biotechnologii







## Wykorzystanie kultur in vitro w programach hodowlanych warzyw, w spółce PlantiCo Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Zielonki Sp. z o.o.

E. KAPSA, L. RÓG

PlantiCo Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Zielonki Sp. z o.o.,  
Zakład Hodowlano-Nasienny Polan, Kraków;  
e-mail: [lrog@plantico.pl](mailto:lrog@plantico.pl)

Kultury in vitro znajdują szerokie zastosowanie w hodowli twórczej i zachowawczej roślin. Dzięki posiadaniu własnego laboratorium, w spółce PlantiCo Zielonki Sp. z o.o., kultury in vitro są wykorzystywane do zwiększenia efektywności realizowanych programów hodowlanych. Stosowane są metody mikrorozmnażania, odwirusowania oraz haploidyzacji roślin. Mikrorozmnażanie stosowane jest w hodowli kilku gatunków warzyw. W przypadku ogórka, cebuli i kapusty służy do uzyskania klonów roślin haploidalnych przed ich diploidyzacją oraz klonów roślin dihaploidalnych przed ich aklimatyzacją i rozmnożeniem generatywnym. Odwirusowanie w kulturach in vitro wykorzystywane jest w spółce w hodowli zachowawczej czosnku. Dla zwiększenia efektywności procesu stosowane są dwie metody odwirusowania: termoterapia na zbrodkach, przed wprowadzeniem do kultur i chemioterapie, z dodatkiem substancji chemicznych do pożywki. W celu przyspieszenia hodowli twórczej wykorzystywane są metody haploidyzacji roślin. Dla kapusty roślin haploidalne uzyskiwane są na drodze androgenyzy. Początkowo stosowano metodę pylników, natomiast obecnie stosuje się wydajniejszy metodę izolowanych mikrospor. U ogórka i cebuli haploidy uzyskiwane są na drodze gynogenyzy, przy czym dla cebuli dzięki kulturom zaleźni, natomiast u ogórka dzięki partenogenezie indukowanej poprzez zapylenie napromieniowanym pyłkiem. W wyniku zapylenia powstają haploidalne zarodki, które są namnażane w kulturach in vitro. Efektem prac nad haploidyzacją w PlantiCo są liczne, dihaploidalne linie rodzicielskie oraz odmiany w Krajowym Rejestrze (kapusty Korund, Jasper, Opalo,

Onyks) lub b d ce w trakcie bada rejestrowych (ogórki POL 9 22 Joran, POL 13 23 Peramito).

Odmian kapusty Onyks F1 uzyskano w projekcie RPMP.01.02.01-IP.01-12-028/17-01 „Przeprowadzenie prac B+R nad opracowaniem nowych odmian wybranych warzyw o podwyższonej wartości prozdrowotnej przeznaczonych do produkcji wielkotowarowej” sfinansowanym w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Małopolskiego na lata 2014-2020.

Odmian ogórka POL 13 23 Peramito F1 uzyskano w projekcie POIR.01.01.01-00-0831/18 „Opracowanie nowej odmiany ogórka gruntowego dedykowanego do kiszenia oraz ulepszonej technologii jego uprawy w celu uzyskania wysokiej jakości, powtarzalnej i wydajnej produkcji w polskich warunkach klimatycznych” sfinansowanym w ramach Program Operacyjny Inteligentny Rozwój.

## The use of in vitro cultures in vegetable breeding programs at PlantiCo Zielonki Ltd.

In vitro cultures are widely used in creative and maintenance plants breeding. Thanks to having our own laboratory, in PlantiCo Zielonki Ltd., in vitro cultures are used to increase the effectiveness of breeding programs. Micropropagation, deviralization in in vitro cultures and plant haploidization methods are used. Micropropagation is used in breeding several vegetable species. For cucumber, onion and cabbage, micropropagation is used to obtain clones of haploid plants before their diploidization and clones of dihaploid plants before their acclimatization and generative propagation. Deviralization in in vitro cultures is used by the Company for maintenance breeding of garlic. To increase the effectiveness of the process, two methods of deviralization are used: thermotherapy on garlic cloves, before introducing them into the cultures, and chemotherapy, with the addition of chemicals to the medium. In order to accelerate creative breeding, haploidization methods are used. For cabbage, haploid plants are obtained by androgenesis. Initially, the anther method was used, but now the more efficient isolated microspore method is used. In cucumber and onion, haploids are obtained by gynogenesis, in onion by ovary cultures, and in cucumber by parthenogenesis induced by pollination with irradiated pollen. As a result of pollination, haploid embryos develop, which are multiplied in in vitro cultures. The result of the work on haploidization in the PlantiCo are numerous dihaploid parental lines and varieties in the National Register (cabbages Korund, Jasper, Opalo, Onyks) or under registration tests (cucumbers POL 9 22 Joran, POL 13 23 Peramito).

The cabbage variety Onyks F1 was obtained in the project RPMP.01.02.01-IP.01-12-028/17-01. „Carrying out R&D work on the development of new varieties of selected vegetables with increased health-promoting value intended for large-

scale production” financed under the Regional Operational Program of the Voivodeship Małopolska for the years 2014-2020.

The cucumber variety POL 13 23 Peramito F1 was obtained in the project POIR.01.01.01-00-0831/18, „Development of a new variety of field cucumber dedicated to pickling and improved technology of its cultivation in order to obtain high-quality, repeatable and efficient production in Polish climatic conditions”, financed in under the Smart Growth Operational Programme.



## Praktyczne wykorzystanie mikrorozmnażania w produkcji szkółkarskiej

T. KUSIBAB, J. RADOSZ, A. NOGA-SZYRSZEŃ

Gospodarstwo Ogrodnicze Tadeusz Kusibab, Kraków;  
e-mail: kusibab@in-vitro.pl

Gospodarstwo Ogrodnicze Tadeusz Kusibab od 1981 roku zajmuje się mikrorozmnażaniem roślin. W 2018 roku została otwarta nowa pracownia mikrorozmnażania (kultur in vitro) zatrudniająca obecnie 25 osób. W asortymencie firmy znajduje się obecnie około 450 odmian roślin, wprowadzonych do kultur in vitro przez własnych pracowników. Corocznie wprowadzane jest do produkcji kilkadziesiąt nowych odmian. W pracowni kultur in vitro rozmnażane są rośliny owocowe, takie jak borówki, maliny, jagody kamczackie, jeżyny, widoliby, leszczyny oraz rośliny ozdobne, takie jak np. róże, anemki, azalie, kalmie, lilaki, klony i wiele innych z obu grup. Z laboratorium kultur in vitro do odbiorców dostarczane są rośliny na sterylnych podłożach. Aklimatyzacja do warunków niesterylnych przeprowadzana jest u klientów Gospodarstwa. Najważniejszym klientem Gospodarstwa Ogrodniczego Tadeusz Kusibab jest firma Plantin. Firma Plantin oferuje młode rośliny wyłącznie dla odbiorców profesjonalnych, do dalszej produkcji szkółkarskiej. W laboratorium rozmnażane są również rośliny dla klientów zewnętrznych. Rozmnożone w laboratorium rośliny eksportowane są do kilkadziesiąt krajów na całym świecie. W ramach współpracy z naukowymi instytucjami, w laboratorium firmy wykonano częściowo do wiadomości kilku prac doktorskich i magisterskich. Laboratorium współpracuje z kilkoma jednostkami naukowymi w kraju i zagranicą.

## Practical use of micropropagation methods in the nursery production

Tadeusz Kusibab Horticultural Farm has been involved in plant micro-propagation since 1981. In 2018, a new micropropagation (in vitro culture) laboratory was opened, currently employing 25 people. The company's product range currently includes approximately 450 varieties of plants introduced into in vitro cultures by its own employees. Several dozen new varieties are introduced into production every year. In the in vitro culture laboratory, fruit plants – such as blueberries, raspberries, haskap berries, blackberries, serviceberries and hazels are being propagated, but also ornamental plants – such as rhododendrons, azaleas, kalmias, lilacs, maples – and many others from both groups. From the in vitro culture laboratory, plants are delivered to recipients on sterile media. Acclimatization to non-sterile conditions is carried out at the company's clients. The most important client of the Tadeusz Kusibab Horticultural Farm is Plantin. The Plantin company offers young plants exclusively to professional customers, for further nursery production. Plants are also propagated in the laboratory for many other external customers. Plants propagated in the laboratory are exported to dozens of countries around the world. As part of cooperation with scientific institutions, experimental parts of several doctoral and master's thesis were carried out in the company's laboratory. The laboratory cooperates with several research units in Poland and abroad.



## Wielkoskalowa produkcja roślin metodą kultur tkankowych w praktyce

P. NORWA, K. NORWA, D. MAJOS, M. VUIKO

Norwa Plants sp. z o. o., Piaseczno;  
e-mail: [norwa@norwa.eu](mailto:norwa@norwa.eu)

Firma Norwa Plants jest kontynuacją wielopokoleniowej rodzinnej działalności związanej z produkcją roślin ozdobnych, w tym od 1984 roku różnorodnymi sadyżonkami metod kultur tkankowych in vitro. Obecnie zatrudniamy ponad 150 osób i pracujemy w laboratorium o powierzchni ponad 3 tys. m<sup>2</sup>. Znakomicie wyposażone laboratorium zatrudnionych stanowi nasi wieloletni pracownicy – dysponujemy rozległym doświadczeniem i emocjonalnie związani z naszą firmą. Jesteśmy w pełni niezależnym laboratorium, które oferuje szerokie spektrum usług: począwszy od wprowadzenia roślin do hodowli tkankowej, przez namnażanie mikrosadyżonek i ich ukorzenie na życzenie klienta (w tym do stadium 4. rozwoju rośliny). Wspieramy hodowców, pobierając merytymy nowych odmian, które w możliwie najkrótszym czasie włączamy do masowej produkcji. Obecnie namnażamy ponad 1000 odmian bylin ogrodowych, roślin doniczkowych, warzywnych i owocowych. Rokrocznie produkujemy ponad 10 mln sadyżonek z rodzajów m.in. *Echinacea*, *Heuchera*, *Hakonechloa*, *Geranium*, *Rudbeckia*, *Pelargonium* i wiele innych. Wiąkszość sadyżonek eksportujemy do klientów hurtowych z całego świata, w tym m.in. do firm z Holandii, Belgii, Niemiec oraz USA. Rośliny wiąkszością sprzedawane są na sterylnych podkładkach w tak zwanym trzecim stadium rozwoju sadyżonek (stage 3). Wiąkszość produkcji kontraktowana jest na długoterminowe umowy tak o charakterze pracy na wyłączność. Posiadamy licencje wiodących hodowców roślin zezwalające na rozmnażanie roślin chronionych prawami własności intelektualnej. Staramy się być innowacyjni, wprowadzając nowe metody produkcji, automatyzację i informatyzację procesów oraz nowoczesne systemy do wietlania. Wspólnie z jednostkami badawczymi prowadzimy projekty badawczo-rozwojowe, w tym: badania metod bioreaktorowych w kul-



turach tkankowych z Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie oraz prace badawcze nad protokołami wraz ze Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW) w Warszawie. Współpracujemy z uniwersytetami przyrodniczymi w Polsce tak e w celu wspomagania kształcenia studentów.

## Large-scale production of plants using tissue culture methods in practice

Norwa Plants is a continuation of a multi-generational family business dedicated to production of ornamental plants, including propagation of plants using in vitro tissue culture methods since 1984. Currently, we employ over 150 people and operate in a laboratory spanning over 3.000 square meters. The vast majority of our employees are long-term staff who possess extensive experience and have an emotional connection to our company. We are a fully independent laboratory that offers a wide range of services: from introducing plants into tissue culture, through micropropagation and rooting at the client's request (including up to stage 4 of plant development). We support breeders by collecting meristems of new varieties, which we incorporate into mass production in the shortest possible time. Currently, we propagate over 1.000 varieties of garden perennials, potted plants, vegetables, and fruit plants. Annually, we produce over 10 million cuttings from genera such as *Echinacea*, *Heuchera*, *Hakonechloa*, *Geranium*, *Rudbeckia*, *Pelargonium*, and many others. Most of the plants are exported to wholesale professional customers worldwide, including companies from the Netherlands, Belgium, Germany, and the USA. The plants are mostly sold on sterile media at the so-called third stage of seedling development (stage 3). Most of the production is contracted through long-term agreements, also on exclusive terms. We hold licenses from leading plant breeders allowing us to propagate plants protected by intellectual property rights. We strive to be innovative by introducing new production methods, automation, digitalization of processes, and modern lighting systems. Together with research institutions, we conduct R&D projects, including studies of bioreactor methods in tissue cultures with the Agricultural University in Krakow and research on protocols with the Warsaw University of Life Sciences (SGGW). We also collaborate with life sciences universities in Poland to support student education.



## Komercyjny świat kultur tkankowych

I. BUJEWSKA, M. ZIMMERMAN

Vitroflora Laboratorium Kultur Tkankowych Karol A. Pawlak, Łochowo;  
email: m.zimmerman@vitroflora.com.pl

W 1977 roku Anna i Karol Pawlakowie rozpoczęli budowę swojej pierwszej szklarni, początkowo skupiając się na uprawie warzyw. Do 1995 roku w Łochowie powstało ponad 10 000 m<sup>2</sup> szklarni. W 2006 roku firma oddała do użytku nowy obiekt w Trzyszaczu koło Bydgoszczy o powierzchni ponad 70 000 m<sup>2</sup>. W obiekcie tym zastosowano najnowocześniejsze technologie i urządzenia z ruchomymi stołami, zamkniętym obiegiem wody i skomputeryzowaną klimatyzacją. W kolejnych latach kilka firm zagranicznych produkowało rośliny na potrzeby Vitroflory. W 1984 roku w Vitroflora powstała Pracownia Kultur Tkankowych, która szybko przekształciła się w komercyjne laboratorium, dostarczające na cały świat sadzonki ozdobnych roślin jednorocznych, bylin, roślin tropikalnych, leczniczych i owocowych. Obecnie w Laboratorium na powierzchni 2500 m<sup>2</sup> pracuje 150 osób, a roczna produkcja wynosi około 15 milionów roślin. Od 2009 roku Vitroflora jest laboratorium certyfikowanym przez Naktuinbouw (Holenderską Inspekcję Ogrodniczą, promując i monitorując jako produktów, procesów i jakościach produkcyjnych w sektorze ogrodniczym). Uzyskanie takiego certyfikatu świadczy o zdrowotności i najwyższej jakości produkowanych roślin. Vitroflora dostarcza materiał roślinny 'SEE Elite', pochodzący od znanych hodowców z całego świata, aktualnie jest jednym z największych producentów elitarnego materiału nasadzeniowego. Nasza firma, w celu wprowadzenia na rynek swoich produktów i zapewnienia globalnego łańcucha dostaw, współpracuje ze znanymi hodowcami. Ponadto posiada również własny program hodowlany i współpracuje z hodowcami stowarzyszonymi. Vitroflora uczestniczy także w realizacji dużych projektów, oferując zainteresowanym stronom swoją wiedzę i potencjał. Firma od wielu lat współpracuje z uczelniami wyższymi w Polsce (projekty UE, staże, prace dyplomowe, nowe techniki produkcji in vitro). Aktualnie Vitroflora realizuje projekt 'Leucojum' (Program Rozwoju Obszarów Wiejskich 2014–2020, Działanie 16

„Współpraca”) z Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie. Pomimo międzynarodowego zasięgu firmy i produkcji w zagranicznych laboratoriach w Tajlandii, Portugalii i Holandii, Vitrofora zachowuje swój rodzinny charakter z aktywnym udziałem dzieci Anny i Karola Pawlaków w codziennej pracy firmy.

## The commercial world of tissue culture

In 1977, Anna and Karol Pawlak began building their first greenhouse, initially focusing on growing vegetables. By 1995, over 10 000 m<sup>2</sup> greenhouses was realised in Łochowo. In 2006, the company commissioned a new facility over 70 000 m<sup>2</sup> in Trzysacz near Bydgoszcz, using the latest technology and equipment with movable tables, closed water circulation and computerized climate control. In the following years, several companies were acquired abroad that contribute to plant production for Vitrofora needs. In 1984 Vitrofora Tissue Culture Laboratory started its activities. Soon it grew into a commercial laboratory for worldwide supply of TC material of almost all plant varieties such as annuals, perennials, tropical plants, plants for medical purposes and plants used for fruit production. There are currently 150 people working in the Laboratory in an area of 2,500 square metres. The annual production is at this time approximately 15 million plants. Since 2009 Vitrofora is an Naktuinbouw certified laboratory. Naktuinbouw (the Netherlands Inspection Service for Horticulture) promotes and monitors the quality of products, processes and production chains in the horticultural sector. The certificate is a guarantee of healthy horticultural crops grown from highest quality propagating material. Vitrofora supplies SEE Elite plant material from well-known breeders all over the world and currently is one of the largest producers of elite planting material. Furthermore, we also accommodate the new or lesser known breeders to give their products the expansion it deserves. Furthermore, Vitrofora also has its own breeder program what fits with cooperation with associate breeders. Vitrofora offers its help to interested parties with regard to the realization of large-scale projects where our knowledge and capacity are needed to bring a project to success. For many years we have been cooperating with universities in Poland in areas such as EU projects, internship training, graduation projects and new techniques for tissue culture production. For example 'Leucojum' project (Rural Development Programme 2014–2020, Measure 16 "Cooperation") with the University of Agriculture in Krakow. Despite its international reach, and production in foreign locations such as Thailand, Portugal and the Netherlands, Vitrofora retains its family character, with the active participation of Anna and Karol Pawlak's children in the company's daily operations.



## Produkcja sadzonek in vitro w firmie Inflora

A. GALANT-JAKUBOWSKA

Inflora-Kraków sp. z o.o., Węgrzce;  
e-mail: ania.galant@inflora.eu

Laboratorium kultur tkankowych Inflora-Kraków sp. z o.o. zostało założone w Krakowie w roku 1993 przez pani Iris Kientzler. Początkowo Inflora zlokalizowana była przy ulicy Gabrieli Zapolskiej w Krakowie. Od 2005 roku siedziba firmy znajduje się w podkrakowskich Węgrzcach. Powierzchnia budynku zajmuje około 1000 m<sup>2</sup> i podzielona jest na cztery biurowe i produkcyjne, z trzema fototermami. Obecnie zatrudniamy 40 osób. Z naszym personelem staramy się nadal - żywa wieloletni współpracownicy, dzięki czemu opieramy się na wyspecjalizowanej i do wiadczonej kadrze. Dzięki stałym inwestycjom w najnowsze technologie oraz wysoce wykwalifikowanych pracowników możemy produkować szeroki asortyment roślin in vitro. Obecnie zajmujemy się przede wszystkim produkcją bylin. Rośliny z naszej firmy są dostarczane do szkółkarzy w Polsce, Europie i Stanach Zjednoczonych. W swojej ofercie posiadamy szeroki asortyment gatunków, takich jak: *Heuchera*, *Heucherella*, *Primula*, *Pulmonaria*, *Oxalis* i wiele innych. Większość z produkowanych przez nas gatunków i odmian rozmnażanych jest na licencji. Rocznie dostarczamy do naszych klientów około 3 000 000 roślin w postaci ukorzenionych mikrosadzonek w pożywce agarowej. Inflora skupia się na produkcji wysokiej jakości sadzonek in vitro, natomiast jako laboratorium nie prowadzimy izolacji materiału wyjściowego. Nasza produkcja opiera się na materiale elitarnym dostarczonym z Niemiec i Holandii. Firma Inflora prowadzi również współpracę z laboratorium Innova Plant w Niemczech i Kostaryce. Chętnie wspieramy Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, pokazując nasz prac studentom oraz przyjmując zainteresowanych na praktyki i staż.

## In vitro seedling production at Inflora Company

The Tissue Culture Laboratory Inflora-Krakow sp. z o.o. was set up in Cracow, Poland in the year 1993 by Ms. Iris Kientzler. Initially, Inflora was located at Gabrieli Zapolska Street in Krakow. Since 2005, the company's headquarters has been located in W grzce near Krakow. The building covers approximately 1000 m<sup>2</sup> and is divided into an office and production part, with three phytotrons. We currently employ 40 people. We try to establish long-term cooperation with our staff, thanks to which we rely on specialized and experienced employees. Thanks to continuous investments in new technologies and highly qualified staff we are able to produce a wide range of in vitro plants. Currently, we mainly produce perennials. Plants from Inflora are delivered to the growers in Poland, Europe and the USA. In our offer we have a wide range of species such as: *Heuchera*, *Heucherella*, *Primula*, *Pulmonaria*, *Oxalis* and many others. Most of these varieties are protected under plant-breeders rights. We deliver approximately 3000 000 plants to our customers annually, in the form of rooted micro-cuttings in agar medium. Inflora focuses on the production of high-quality in vitro seedlings, but as a laboratory we do not isolate the starting material. Our production is based on elite material delivered from Germany and the Netherlands. Inflora cooperates closely with the Innova Plant laboratory in Germany and Costa Rica. We are happy to support Krakow Agricultural University by showing our work to students and accepting interested people for student practice and internships.





**SESJA 5**

## Kultury roślinne w warunkach stresu









## Wpływ stresu suszy na wzrost wybranych klonów robinii (*Robinia pseudoacacia* L.) w warunkach kultur in vitro

I. SZYP-BOROWSKA<sup>1</sup>, J. UKALSKA<sup>2</sup>, T. WOJDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Hodowli Lasu i Genetyki Drzew Leśnych; Instytut Badawczy Leśnictwa, Raszyn;

<sup>2</sup>Katedra Urządzania Lasu, Dendrometrii i Ekonomiki Leśnictwa;

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

e-mail: i.szyp@ibles.waw.pl

W obliczu zmian klimatycznych, konieczne jest uzupełnienie programów hodowlanych drzew o szybkie metody przesiewowe, pod kątem odporności na suszę. Niedawne badania w Europie środkowej wskazują, że wiskoszowe rodzimych gatunków drzew stanie w obliczu znacznego zmniejszenia się odpowiedniego obszaru siedliskowego, podczas gdy przyszłe warunki klimatyczne będą prawdopodobnie sprzyjać występowaniu wprowadzonych gatunków obcych, takich jak robinia akacja (*Robinia pseudoacacia* L.). Do przeprowadzonych doświadczeń wybraliśmy trzy wysoce produktywne genotypy *R. pseudoacacia* (4SO, 6SO, 10PT), które różniły się w warunkach in vitro. Porównywaliśmy wpływ stresu osmotycznego, wywołanego mannitolem i sacharozą, które wykorzystaliśmy do naładowania warunków suszy. Aby ocenić fenotypową reakcję roślin na stres, w ośmiotygodniowym eksperymencie, stopniowaliśmy stres w zakresie potencjałów wody od 0 MPa do -1,5 MPa. Podczas eksperymentu oceniano: całkowitą długość pędów i masę, a także miertelność roślin. Wszystkie trzy klony *R. pseudoacacia*, wykazywały, zależnie od genotypu, reakcje na warunki stresowe, dla wszystkich badanych cech. Klon 4SO był najbardziej wrażliwy na suszę spośród badanych klonów. Charakteryzował się najniższym przyrostem długości pędu i najwyższą miertelnością w warunkach umiarkowanego stresu. Klon 10PT wykazywał stabilny wzrost przy potencjale wody wynoszącym -0,6 MPa; jednakże miertelność osiągnęła 57% po ośmiu tygodniach w warunkach umiarkowanego stresu. Najwyższą odporność na suszę spośród badanych klonów wykazał klon 6SO, który nie tylko osiągnął najwyższe przyrosty pędu w ciągu ośmiu tygodni suszy, ale także miał najniższą miertelność (3%

przy potencjale wody  $-0.6$  MPa). Chociaż badania przesiewowe *in vitro* zapewniają precyzyjną kontrolę warunków stresowych, nie odzwierciedlają pełnej złożoności warunków rodowiskowych wpływających na wzrost i przeżywanie drzew. Dlatego potencjalna przydatność tej metody w programach hodowlanych powinna zostać dodatkowo potwierdzona poprzez badania w warunkach terenowych, najlepiej na wielu stanowiskach, w celu oceny interakcji genotyp-rodowisko.

### Effects of water deficit stress on growth parameters of *Robinia pseudoacacia* L. selected clones under *in vitro* conditions

Rapid screening methods for drought-resistant genotypes are urgently needed in tree improvement programs in the face of current climate change. Recent evidence suggests that rising global temperatures are already exacerbating drought-induced forest changes and affecting terrestrial net primary productivity. The other consequences of prolonged droughts and higher temperatures include potential shifts in species distribution ranges and a reduction in the sustainability of forests and their benefits for ecological and social needs. We used a plant tissue culture technique to assess the phenotypic response of three highly productive genotypes of *Robinia pseudoacacia* (4SO, 6SO, 10PT) to water deficit induced by mannitol and sucrose in a range of water potentials from 0 MPa to  $-1.5$  MPa in an eight-week experiment. We compared the effect of osmotic stress induced by mannitol and sucrose, which we used to mimic drought conditions, on two growth parameters, total shoot length and fresh weight, as well as mortality of *R. pseudoacacia* vegetative cuttings in the *in vitro* cultures. Our study showed genotype-specific responses to induced drought stress, indicating the potential for tree improvement in productivity and stress tolerance. The 4SO clone was the most drought sensitive among the clones studied. It was characterized by the lowest shoot length increment and the highest mortality rate under moderate stress conditions. The 10PT clone was characterized by an intermediate response to stress-induced conditions. Clone 10PT showed stable growth at a water potential of  $-0.6$  MPa; however, mortality reached 57% after eight weeks under moderate stress conditions. The highest drought resistance among the clones studied was shown by clone 6SO, which not only achieved the greatest TSL during eight weeks of drought, but also had the lowest mortality (3% at a water potential of  $-0.6$  MPa). Yet, it is important to note that while *in vitro* screening provides precise control of stress conditions, it does not reflect the full complexity of environmental conditions affecting tree growth and survival. Therefore, we think that the potential applicability of the *in vitro* rapid screening method in tree improvement programs should be further confirmed by testing under field conditions, preferably at multiple test sites, to evaluate genotype-by-environment interactions and assess the long-term impact of utilizing this early selection strategy.



## Glikozydy cyjanogenne w lnie (*Linum usitatissimum*) w rozwoju i odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne

A. SAWUŁA, M. ŻUK, U. KAŻMIERCZAK, Y. KOCHNEVA

Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;  
e-mail: agnieszka.sawula2@uwr.edu.pl

Glikozydy cyjanogenne, monoglikozydy: linamaryna i lotaustralina, a także diglikozydy: linustatyna i neolinustatyna, zostały zidentyfikowane w lnie (*Linum usitatissimum*). W literaturze sugeruje się, że związki te pełni funkcje obronne ze względu na produkcję cyjananku (silnie toksycznego dla organizmów) w wyniku ich degradacji. Cyjanek może uczestniczyć w odpowiedzi rośliny na stres, indukując m.in. produkcję reaktywnych form tlenu. Glikozydy cyjanogenne potencjalnie mają udział w odpowiedzi rośliny na niekorzystne warunki środowiskowe. Glikozydy cyjanogenne mogą stanowić źródło azotu do syntezy aminokwasów, białek i amin. W związku z tym ich funkcja nie ogranicza się do roli odpornościowej, ale także zaangażowane w metabolizm pierwotny (synteza aminokwasów), zwłaszcza zmiany w ich poziomie wykazują silną korelację z kluczowymi etapami rozwoju rośliny. Len odmiany Linola i len transgeniczny charakteryzujący się zwiększoną zawartością aminokwasów siarkowych zostały poddane stresom związanym ze zmienioną zawartością azotu lub siarki w podłożu, a także w warunkach suszy lub zakażenia patogenem. W przypadku zwiększenia liczby jonów  $\text{SO}_4^{2-}$  w podłożu obserwuje się zmniejszenie zawartości glikozydów cyjanogennych, co nie ma miejsca w linii transgenicznej. Pomimo zmian w poziomach transkryptów genów szlaku metabolicznego glikozydów cyjanogennych, nie występują istotne zmiany w zawartości metabolitów w przypadku suszy, infekcji patogennej i zmienionej dostawności azotu w podłożu. Prawdopodobnym jest, że ze względu na fluktuacyjny, przejściowy charakter glikozydów cyjanogennych, istotne zmiany w ich zawartości mogą nie być obserwowalne. Konieczne jest dalsze badanie aktywności enzymatycznej kluczowych enzymów, takich jak CAS (syntaza  $\beta$ -cyanoalaninowa) lub

monooksygenaza walinowa, a także zawartość końcowego produktu metabolizmu glikozydów cyjanogennych – aminokwasów.

## Cyanogenic glycosides in flax (*Linum usitatissimum*) in development and response to biotic and abiotic stresses

Cyanogenic glycosides, the monoglucosides linamarin and lotaustralin, as well as the diglucosides linustatin and neolinustatin, have been identified in flax (*Linum usitatissimum*). These compounds in the literature are proposed as defensive substances due to the cyanide (which is highly toxic to organisms) production as an effect of their degradation. Cyanide may participate in plant response to stress by inducing the production of reactive oxygen species. There are indications of the importance of cyanogenic glycosides in response to unfavourable environmental conditions. Cyanogenic glycosides can be used as nitrogen-containing precursors for the synthesis of amino acids, proteins and amines. Therefore, they not only can perform protective functions against herbivores but also are involved in the primary metabolism (amino acids synthesis), especially since changes in their level have been shown to be strongly correlated with significant stages of plant development. Linola cultivar and transgenic plants characterized by increased levels of sulphur amino acids were analysed under stresses of changed nitrogen or sulphur content in the medium as well as in conditions of drought or pathogenic infection. In the case of an increased number of the  $\text{SO}_4^{2-}$  ion in the medium, a reduction in the content of cyanogenic glycosides is observed, which is not the case in the transgenic line. Despite alteration in transcript levels of genes cyanogenic glycosides metabolic pathway no significant changes in metabolite content occur in case of drought, fungi infection and changed nitrogen availability in medium. We postulate that due to the fluctuating transitional character of cyanogenic glycosides, the relevant effects in their content may not be observed. Further research in terms of enzymatic activity on key enzymes like CAS ( $\beta$ -cyanoalanine synthase) or vanillin monooxygenase as well as the content of the final product of cyanogenic glycoside metabolism – amino acids is necessary.



## Zastosowanie chitozanu i nanosrebra w łagodzeniu stresu wywołanego metalami ciężkimi u *Solanum pimpinellifolium* in vitro

M. KRUPA-MAŁKIEWICZ<sup>1</sup>, I. OCHMIAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie;

<sup>2</sup>Katedra Ogrodnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie;  
e-mail: mkrupa@zut.edu.pl

Rozwój produkcji przemysłowej doprowadził do alarmująco wysokiego wzrostu zanieczyszczenia środowiska ciekami zawierającymi metale ciężkie. Ze względu na swój nieulegający biodegradacji charakter, metale ciężkie mają tendencję do gromadzenia się w organizmach żywych, gdzie stwarzają znaczne ryzyko toksycologiczne. Miedź (Cu) nieznacznie przekracza optymalny poziom w tkankach roślin, jest toksyczna dla roślin. Dlatego też, aby przeciwdziałać szkodliwemu wpływowi stresu środowiskowego na rośliny, badane są nowe rozwiązania, w tym zastosowanie substancji biologicznie czynnych (chitozan) lub nanotechnologii (nanocząsteczki srebra nAg). Chitozan (CH) jest nietoksycznym, naturalnym elicytorem i biodegradowalnym związkem pochodzenia naturalnego, otrzymywanym przez enzymatyczną deacetylację chityny. W doświadczeniu zbadano możliwość zastosowania substancji aktywnych w łagodzeniu stresu miedziowego u roślin pomidora (*S. pimpinellifolium*) poprzez dodatek chitozanu (CH) lub nanosrebra (nAg) do pożywki MS w warunkach in vitro. Oceniono różne parametry wzrostu, stężenie proliny, MDA, całkowitą zawartość polifenoli, zawartość makro- i mikroelementów oraz barwę CIE L\*a\*b\*. Namnożone eksplantaty pasowano na pożywce MS (kontrola), MS+20 ppm CH 3.33 kDa, MS+6 mg l<sup>-1</sup> nAg, MS+100 μM l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> oraz kombinacji MS+20 ppm CH 3.33 kDa+100 μM l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>, MS+6 mg l<sup>-1</sup> nAg +100 μM l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>. Wyniki wykazały, że podczas gdy roztwory miedzi lub nanosrebra hamowały wzrost roślin, chitozan działał stymulująco, szczególnie na liczbę nowych pędów (144% kontroli), system

korzeniowy i wie mas (116% kontroli). Dodatkowo, chitozan łagodził negatywny wpływ  $\text{CuSO}_4$ , obniżył znacząco stężenie proliny, MDA oraz stężenie polifenoli wro linach pomidora. Eksplantaty pomidora wykazywały bardziej intensywne, zielone zabarwienie liści w porównaniu z tymi traktowanymi nanosrebrem i miedzi. Zastosowanie chitozanu lub nAg miało również pozytywny wpływ na zawartość mineralów w liściach pomidora w warunkach stresu wywołanego metalami ciężkimi. Wyniki z badania podkreślają potencjał chitozanu w łagodzeniu stresu wywołanego metalami ciężkimi u roślin pomidora.

## In vitro assessment of chitosan and nanosilver for alleviating heavy metal stress in *Solanum pimpinellifolium*

The expansion of industrial production activities has led to an alarming increase in environmental pollution from wastewater containing heavy metals. These metals, particularly prevalent in developing countries, are disposed of directly or indirectly into the environment in significant quantities. Due to their non-biodegradable nature, heavy metals tend to accumulate in living organisms, where they create a significant risk of toxicity. Copper (Cu) slightly above optimal tissue levels can become toxic to the plant. Therefore, to counteract the detrimental impacts of environmental stresses on plants, new solutions are being investigated, including the application of biologically active substances (chitosan) or nanotechnology (silver nanoparticles nAg). Chitosan (CH) is a non-toxic, natural elicitor, and biodegradable compound of natural origin, obtained by enzymatic deacetylation of chitin. The study aimed to investigate the potential mitigation of copper stress in tomato plants (*S. pimpinellifolium*) by introducing chitosan (CH) or nanosilver (nAg) solutions to the MS medium under in vitro conditions. The various growth parameters, proline, MDA, total polyphenols, mineral contents, and CIE  $L^*a^*b^*$ , were evaluated. After the multiplication stage, explants were transferred on MS medium (control), MS +20 ppm  $\text{CH}_{5.33}$ , MS+6  $\text{mg l}^{-1}$  nAg, MS+100  $\mu\text{M l}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ , and combination of MS+20 ppm  $\text{CH}_{5.33}$ +100  $\mu\text{M l}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ , MS+6  $\text{mg l}^{-1}$  nAg +100  $\mu\text{M l}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ . The results showed that while copper or nanosilver solutions inhibited plant growth, chitosan had a stimulating effect, especially on the number of new shoots (144% of control), root system and fresh weight (116% of control). In addition, chitosan mitigated the negative effect of  $\text{CuSO}_4$  by significantly reducing proline, MDA and polyphenol concentrations in tomato plants. Tomato explants showed more intense green leaf colouration compared to those treated with nanosilver and copper. The application of chitosan or nAg also had a positive effect on the mineral content of tomato leaves under heavy metal stress conditions. The conclusions of the study highlight the potential of chitosan in alleviating heavy metal stress in tomato plants.



## Wykorzystanie szczepów *Fusarium* znakowanych fluorescencyjnie w badaniu infekcji lnu

A. DOMAŃSKA, A. KULMA, A. BOBA

Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;  
e-mail: anna.domanska2@uwr.edu.pl

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (Foln) to grzybowy patogen *Linum ussitatissimum* L. (len) odpowiedzialny za liczne straty w plonach. Badania przebiegu patogenezы *Fusarium oxysporum* pozwalaj na poznanie i potencjalne ulepszenie odpowiedzi obronnej ro liny na infekcj grzybem. W tym celu tworzone s szczepy patogene z oznacznikami fluorescencyjnymi, które pomagaj w wizualizacji interakcji grzyb-rolina. W badaniu udało si wytworzy transgeniczne szczepy Foln z oznacznikami fluorescencyjnymi GFP lub dsRed oraz markerem selekcyjnym opornoci na hygromycyn B za pomoci transformacji z użyciem *Agrobacterium tumefaciens*. Zoptymalizowano dobór szczepu *Agrobacterium* do transformacji Foln – najwi kszy wydajno wykazały szczepy AGL1 i EH105. Ze względu na losow integracji T-DNA do genomu przeprowadzono selekcje transformantów pod względem fenotypu: morfologia grzybni, tempo wzrostu, ilo wytworzonych spor. Patogenno transformantów badano poprzez qRT-PCR, mierząc poziom ekspresji genów odpowiedzi na infekcj z tkanki ro linnej poroonej transformowanym grzybem i porównano do ro lin poroonych szczepem dzikim Foln. Pod uwagę wzięto poziom ekspresji genów białek PR oraz genów metabolizmu reaktywnych form tlenu (ROS). Metabolizm ROS zbadano tak e poprzez wykrycie w poroonej tkance ro linnej obecnooci  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ . Ekspresj oznacznika fluorescencyjnego dsRed i GFP badano z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej. Analizy wskazały, e 2 (1 z dsRed i 1 z GFP) spośród 30 transformantów stworzonych w badaniu, wykazuj cechy patogennego szczepu dzikiego Foln. Mog one posłużyć jako cenne narzędzie w badaniach patogenezы Foln u lnu.



## Application of *Fusarium* strains labelled with fluorescent markers in the study of flax infection

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (Foln) is a fungal pathogen of *Linum ussitatissimum* L. (flax) responsible for significant crop losses. Studies on the pathogenesis of *Fusarium oxysporum* provide insights into the plant's defense response to fungal infection and show potential improvements in this area. To this end, pathogenic strains with fluorescent markers are created to facilitate the visualization of the fungus-plant interactions. In this study, transgenic Foln strains with GFP or dsRed fluorescent markers and a hygromycin B resistance selection marker were successfully generated through *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. The selection of the *Agrobacterium* strain for Foln transformation was optimized, with the AGL1 and EH105 strains demonstrating the highest efficiency. Due to the random integration of T-DNA into the genome, transformants were selected based on phenotype, including mycelial morphology, growth rate and sporulation. The pathogenicity of the transformants was assessed through qRT-PCR by measuring the expression level of pathogenesis-related genes in plant tissue infected with transformed fungus and compared to plants infected with the wild-type Foln strain. The expression levels of pathogenesis-related (PR) genes and reactive oxygen species (ROS) metabolism-related genes were considered. ROS metabolism was also examined by detecting the presence of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  in the infected plant tissue. The expression of the dsRed and GFP fluorescent markers was evaluated using fluorescence microscopy. Analyses revealed that 2 (1 with dsRed and 1 with GFP) out of the 30 transformants generated in this study exhibited characteristics of the pathogenic wild-type Foln strain. These transformants can serve as valuable tools for further studies of Foln pathogenesis in flax.





## Zmienne pole elektromagnetyczne jako czynnik regulujący ekspresję genów w roślinach na przykładzie lnu

M. PREISNER<sup>1</sup>, A. BOBA<sup>2</sup>, D. SZTAFROWSKI<sup>3</sup>, K. KOSTYN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

<sup>2</sup>Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski;

<sup>3</sup>Wydział Elektryczny, Politechnika Wrocławska;  
e-mail: marta.preisner@upwr.edu.pl

Wszystkie żywe organizmy na Ziemi ewoluowały w obecności pola elektromagnetycznego (EMF), przystosowały się do niego, a nawet nauczyły się wykorzystywać je do swoich celów. Jednak w ciągu ostatniego stulecia na Ziemi utraciło swój ekskluzywny charakter, gdy wraz z rozwojem elektryczności i elektroniki pojawiło się wiele rodzajów pola elektromagnetycznego. Nie wiadomo, w jaki sposób motywy CTCT w promotorach genów lub różne mechanizmy odpowiedzi na stres są zaangażowane w reakcje roślin na zewnętrzne pole elektromagnetyczne. Co więcej, ponieważ wiele genów aktywowanych pod wpływem działania EMF nie ma powtórzeń CTCT w swoich promotorach, postanowiliśmy określić profil transkrypcji rośliny w odpowiedzi na działanie EMF i wskazać geny, które bezpośrednio reagują na traktowanie EMF. Siewki lnu (*L. usitatissimum* L. var. Nike) poddano działaniu ELF-EMF o częstotliwości 50 Hz i sile 500  $\mu$ T przez 30 minut. Do analizy RNAseq tkanek zebrano 12 godzin po ekspozycji i porównano z nietraktowanymi kontrolami. Spośród 1882 genów ulegających zmianom w ekspresji, prawie 1000 z nich miało zwiększoną ekspresję, a ponad 800 obniżoną. Geny zaangażowane w procesy redoks, reakcje na stres oksydacyjny i wiązanie hemu/żelaza zidentyfikowano jako te z największą liczbą transkryptów. Wyniki wykazały represję pierwszego genu szlaku fenylopropanoidowego, liazy fenyloamoniowej (PAL). Natomiast inne geny szlaku fenylopropanoidowego: 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego (C4H) i syntaza chalconu (CHS) cechowały

si zwi kszon transkrypcj . Na podstawie analizy transkryptomu po działaniu EMF wybrano najbardziej aktywowany gen i przeprowadzono analiz *in silico* jego promotora. Stwierdzono obecno powtórze CTCT. Promotor podzielono na 100-nukleotydowe fragmenty i umieszczono w wektorze binarnym z genem reporterowym GUS. Tak przygotowane konstrukty wprowadzono do li ci tytoniu metod Agroinf ltracji, a nast pnie poddano działaniu pola elektromagnetycznego. Aktywno GUS badano 12 i 48 godzin po zabiegu traktowania EMF. Wzrost aktywno ci GUS zaobserwowano po 48 godzinach dla fragmentów 500 i 600.

## Variable electromagnetic field as a factor regulating gene expression in plants studied in flax

All living organisms on earth evolved in the presence of electromagnetic field (EMF), adapted to it, and even learned to use it for their purposes. However, during the last century the earth's core lost its exclusivity and a number of sources of the EMF appeared due to the development of electricity and electronics. It remains unknown how CTCT motifs or different mechanisms are involved in the plants' reaction to external EMF. Moreover, as many genes that are activated under EMF treatment do not have the CTCT repeats in their promoters we decided to determine the transcription profile of a plant exposed to EMF and pinpoint the genes that directly respond to the treatment to find the common denominator of the observed changes in plant's transcriptome. Flax seedlings (*L. usitatissimum* L. var. Nike) were exposed to the 50 Hz, 500  $\mu$ T ELF-EMF for 30 min. For RNAseq analysis the tissue was collected 12 hours after exposition and compared with the non-treated control. Among 1882 differently expressed genes almost 1000 was up-regulated and over 800 was down-regulated. Genes involved in redox processes, response to oxidative stress, and heme binding/iron binding were identified as the ones with the highest number of transcripts. The results revealed the repression on the first gene from phenylpropanoid pathway: phenyl-amonia lyase (PAL). In contrast, other genes from phenylpropanoid pathway: cinnamate-4-hydroxylase (C4H) and chalcone synthase (CHS) were up-regulated. Based on the transcriptome analysis after EMF treatment, the most activated gene was selected and an *in silico* analysis of its promoter was performed. It revealed the presence of CTCT tracts. The promoter was divided into 100-nucleotide fragments and placed in a binary vector with the GUS reporter gene. The fragments were introduced into tobacco leaves using Agroinf ltration and then treated with EMF. GUS activity was examined 12 and 48 h after treatment. An increase in GUS activity was observed at 48 hours for fragments 500 and 600.



## Uczulanie lnu niepatogennym szczepem *Fusarium oxysporum*: wpływ na infekcje szczepem patogennym

W. WOJTASIK-GÓRNA, M. BURGBERGER-STAWARZ, M. STARZYK,  
J. MIERZIAK-DERECKA

Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;  
e-mail: wioleta.wojtasik@uwr.edu.pl

W swoim naturalnym rodowisku ro liny musz stale broni si przed abiotycznymi i biotycznymi czynnikami stresowymi. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* jest jednym z najgro niejszych patogenów atakuj cych uprawy lnu, powoduj c fuzaryjne wi d ni cie lnu, co prowadzi do znacznego spadku plonu i jako ci produktów. W obr bie rodzaju *Fusarium* wyst puj równie szczepy niepatogenne, które poprzez kolonizacje korzeni ro lin mog zmniejsza objawy choroby wywołanej przez szczepy patogene. Dokładne mechanizmy ich działania nie s jednak znane. W warunkach stresowych w ro linach, podczas kolonizacji lnu zarówno przez szczepy patogene, jak i niepatogenne *F. oxysporum*, dochodzi do zaburzenia homeostazy redoks, spowodowanej zmienionym poziomem RFT i wydajno ci systemów antyoksydacyjnych. Zmieniaj si równie poziomy metabolitów drugorz dowych, w tym zwi zków fenolowych i poliamin. Równie wa na podczas kolonizacji lnu przez oba szczepy *F. oxysporum* jest ciana komórkowa ro lin, która jest f zyczn barrier blokuj ca wnikanie strz pek grzybów do komórek ro linnych. Naszym celem było ustalenie, jakie mechanizmy odgrywaj kluczowe role w oporno ci lnu na fuzarioz uzyskanej za po rednictwem niepatogennego szczepu *F. oxysporum*. W tym celu ro liny zostały traktowane niepatogennym szczepem *F. oxysporum* (Fo47), a nast pnie po 4 dniach szczepem patogennym *F. oxysporum* (Fol). Analiza fenotypowa wykazała, e ro liny lnu uczulone Fo47 wykazywały zmniejszone objawy fuzariozy w porównaniu z ro linami traktowanymi Fol. Dodatkowo obserwacje mikroskopowe oraz analizy PCR na geny grzybowe potwierdziły wnikanie obu szczepów *F. oxysporum* do tkanek lnu, wskazuj c na mniejsz liczb kopii genu SIX7, charakterystycznego dla Fol, w ro

linach uczulonych szczepem niepatogennym. Ponadto w tych roślinach wykazano zmiany w metabolizmie RFT (zawartość  $H_2O_2$  oraz aktywność enzymów metabolizmu RFT) i metabolizmie poliamin (zawartość poliamin i poziomy transkryptów genów metabolizmu poliamin) oraz potwierdzono rearranżację ściany komórkowej (poprzez analizę składników ściany komórkowej oraz poziomu transkryptów kluczowych genów zaangażowanych w jej metabolizm). Zrozumienie tych procesów może pomóc w opracowaniu strategii zwiększających odporność na fuzariozę oraz poprawę jego ogólnego plonu i jakości.

### Sensitization of flax with a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*: impact on infections with a pathogenic strain

In their natural environment, plants must constantly defend themselves against abiotic and biotic stress factors. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* is one of the most dangerous pathogens attacking flax crops, causing Fusarium wilt, which leads to a significant decrease in yield and product quality. Within the *Fusarium* genus, there are also non-pathogenic strains that, by colonizing plant roots, can reduce the symptoms of the disease caused by pathogenic strains. However, the exact mechanisms of their action are not yet known. Under stressful conditions in plants, during the colonization of flax by both pathogenic and non-pathogenic strains of *F. oxysporum*, disruption of redox homeostasis occurs due to altered levels of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant system efficiency. Secondary metabolite levels also change, including phenolic compounds and polyamines. Equally important during colonization of flax by both strains of *F. oxysporum* is the plant cell wall, which is a physical barrier blocking fungal hyphae from penetrating plant cells. Our goal was to determine which mechanisms play key roles in flax resistance to Fusarium wilt obtained through the non-pathogenic strain of *F. oxysporum*. For this purpose, plants were treated with the non-pathogenic strain Fo47, and then after 4 days with the pathogenic strain Fol. Phenotypic analysis showed that Fo47-sensitized flax plants exhibited reduced Fusarium wilt symptoms compared to plants treated with Fol. Additionally, microscopic observations and PCR analysis of fungal genes confirmed the penetration of both strains of *F. oxysporum* into flax tissues, indicating a lower copy number of the SIX7 gene, characteristic of Fol, in plants sensitized by the non-pathogenic strain. Furthermore, changes in ROS metabolism ( $H_2O_2$  content and ROS metabolism enzyme activities) and polyamine metabolism (polyamine content and transcript levels of polyamine metabolism genes) were demonstrated in these plants, and rearrangement of the cell wall was confirmed (through analysis of cell wall components and transcript levels of key genes involved in its metabolism). Understanding these processes may help in developing strategies to increase flax resistance to Fusarium wilt and improve its overall yield and quality.



## Krioprezerwacja w ochronie zasobów genowych ziemniaka

K. TOMICZAK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików;  
e-mail: k.tomiczak@ihar.edu.pl

Krioprezerwacja jest uważana za najbezpieczniejszą metodę długoterminowego zabezpieczania roślinnych zasobów genowych *ex situ*, pozwalając zarówno zaoszczędzić koszty, jak i zmniejszyć powierzchnię przechowywania. Jest szczególnie ważna w przypadku gatunków wytwarzających nasiona typu „recalcitrant”, niewytwarzających nasion w ogóle oraz rozmnażanych wegetatywnie z innych powodów. Ziemniak (*Solanum tuberosum* L.) należy do najmniej licznych roślin uprawnych na świecie. Z powodu wysokiej heterozygotyczności nie może być rozmnażany przez nasiona, dlatego jego zasoby genowe są zabezpieczane w formie bulw lub kultur *in vitro* oraz poprzez krioprezerwację wierzchołków wzrostu. Przechowywanie ziemniaka w ciekłym azocie zainicjowano w 1977 r. wykorzystując techniki mrozenia bezpoziomego i dwustopniowego. Jednak pierwsze opracowane protokoły były czasochłonne i wymagały użycia zamrażarki do kontrolowanego mrozenia, ponadto przeżywalność materiału roślinnego była niska. Nowsze metody, takie jak witrifikacja, kapsułkowanie-dehydratacja i kapsułkowanie-witrifikacja, bazowały na odwadnianiu komórek przed schłodzeniem i witrifikacji cytoplazmy w trakcie zanurzenia w ciekłym azocie. Ich modyfikacje, wykorzystujące wysokie przewodnictwo cieplne folii aluminiowej i metalowych kriopłyt, pozwoliły przyspieszyć tempo schładzania i ocieplania próbek, redukując ryzyko powstawania kryształów lodu wewnątrz komórek i poprawiając ich przeżywalność. Obecnie, te zoptymalizowane protokoły są rutynowo wykorzystywane do zabezpieczania wierzchołków wzrostu ziemniaka w najlepszych kriobankach w Peru, Niemczech, USA, Korei Południowej oraz Japonii. W Polsce kolekcja kultur *in vitro* liczy ponad 1800 tetraploidalnych odmian ziemniaka, jest utrzymywana w Oddziale Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji

Roślin w Boninie. Niestety, krioprezervacji wykorzystano do tej pory tylko dla 56 diploidalnych mieszańców *Solanum*. Dlatego w Radzikowie trwają prace nad utworzeniem centralnej kolekcji kriogenicznej ziemniaka oraz innych roślin uprawnych, finansowanej ze środków Krajowego Planu Odbudowy. Przeprowadzono również pierwsze eksperymenty nad krioprezervacją sześciu odmian ziemniaka z wykorzystaniem metody kropli-witryfikacji i roztworu PVS3.

## Cryopreservation for conservation of potato genetic resources

Cryopreservation is considered to be the safest as well as the most cost- and space-efficient tool for the long-term storage of plant genetic resources *ex situ*. It is especially important for those species which produce „recalcitrant” seeds, do not produce seeds at all or are vegetatively propagated because of other reasons. Potato (*Solanum tuberosum* L.), one of the most important crops worldwide, is highly heterozygous, therefore the sexually produced seeds are not true to type. Thus, cultivated potato accessions are conserved through the storage of tubers or *in vitro* plants, and by cryopreservation of shoot tips. Potato storage in liquid nitrogen was initiated in 1977 through the implementation of two-step cooling and ultra-rapid freezing techniques. However, these initial protocols were time-consuming and necessitated the utilization of programmable freezers, additionally, the survival rate was poor. More recent methods, such as vitrification, encapsulation-dehydration, and encapsulation-vitrification, involved the removal of freezable water from cells before cooling and the vitrification of the cytoplasm while immersed in liquid nitrogen. Further modifications such as the use of aluminum foil and cryo-plates accelerated cooling and rewarming rates, thus reducing the risk of lethal ice-crystal formation and improving plant survival. Currently, the improved protocols are being applied routinely for potato shoot tips in the largest cryobanks in Peru, Germany, USA, South Korea, and Japan. In Poland, an *in vitro* collection of over 1800 tetraploid potato cultivars is preserved in the Bonin Division of the Plant Breeding and Acclimatization Institute. However, cryopreservation has been used only for the shoot tips of 56 diploid *Solanum* hybrids. Therefore, the establishment of a central cryogenic collection for potato and other crop species, funded by the Recovery and Resilience Facility, is currently in progress in Radzików. Initial experiments utilizing the PVS3 droplet vitrification method for the cryopreservation of six potato cultivars have also been conducted.



## Zmiany proteomiczne podczas przeprogramowania komórek *Fagopyrum esculentum* i *F. tataricum*

M. ZARANEK<sup>1</sup>, A. PIŃSKI<sup>1</sup>, K. GODEL-JĘDRYCHOWSKA<sup>1</sup>, B. SKUPIEN-RABIAN<sup>2</sup>,  
U. JANKOWSKA<sup>2</sup>, E. KURCZYŃSKA<sup>1</sup>, E. GRZEBELUS<sup>3</sup>, A. BETEKHTIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski w Katowicach;

<sup>2</sup>Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie;

<sup>3</sup>Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: magdalena.zaraneck@us.edu.pl

Gryka jest cennym źródłem substancji odżywczych oraz wielu związków biologicznie aktywnych. Najczęściej uprawianymi gatunkami jest gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum*) oraz gryka tatarska (*F. tataricum*), które różnią się sposobem formowania i budową morfogennej kalusa, formowaniem kwiatów oraz sposobem zapylania. Niniejsze badania miały na celu poznanie zmian przestrzenno-czasowego rozmieszczenia wybranych komponentów ściany komórkowej, jak również analiz całkowitego proteomu podczas przeprogramowania (odróżnicowania oraz różnicowania) komórek gryki. Zastosowanie immunocytochemii pozwoliło na detekcję występowania oraz rozmieszczenia istotnych komponentów ściany komórkowej. Z kolei proteomika typu „shotgun” posłużyła do identyfikacji białek występujących podczas istotnych punktów czasowych kultury protoplastów.

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt OPUS 19 (2020/37/B/NZ9/01499).

## Proteomic changes during the cell reprogramming of *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*

Buckwheat is a valuable source of nutrients and many biologically active compounds. The most commonly cultivated species are common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and Tartary buckwheat (*F. tataricum*), which differ in the formation and structure of the morphogenic callus, flower formation and pollination method. The present study aimed to find changes in the spatial-temporal distribution of selected cell wall components and analyze the total proteome during buckwheat cells' reprogramming processes (dedifferentiation and differentiation). Immunocytochemistry made it possible to detect the occurrence and distribution of important cell wall components. In turn, "shotgun" proteomics was used to identify proteins present during significant time points of protoplast cultures.

Research funded by the National Science Centre Poland, project OPUS 19 (2020/37/B/NZ9/01499).



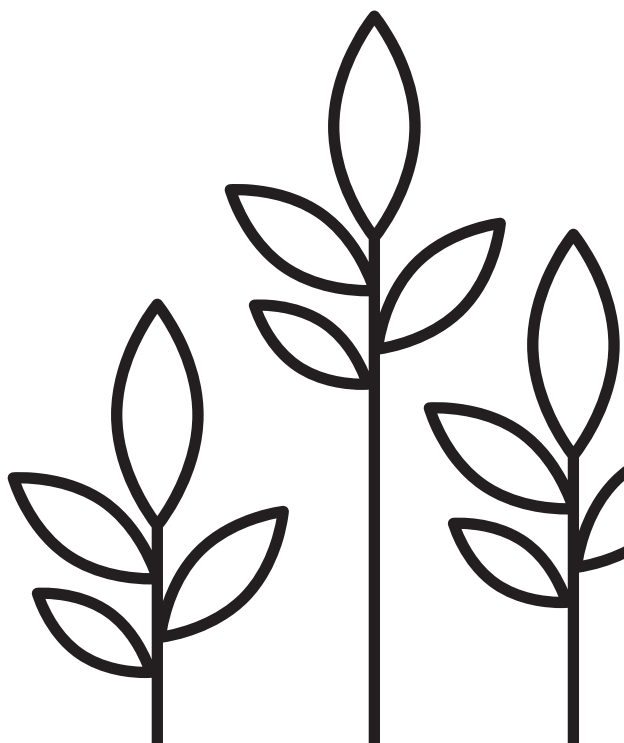
**POSTERY**





## SESJA 1

# Procesy różnicowania in vitro i ich uwarunkowania







## Model regeneracji roślin zielonych u pszenżyta

R. ORŁOWSKA<sup>1</sup>, J. ZIMNY<sup>1</sup>, J. ŻEBROWSKI<sup>2</sup>, P. ANDROSIUK<sup>3</sup>, P.T. BEDNAREK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Radzików;

<sup>2</sup>Uniwersytet Rzeszowski;

<sup>3</sup>Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin,

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

e-mail: p.bednarek@ihar.edu.pl

Uzyskiwanie roślin poprzez kultury tkankowe stwarza możliwość otrzymania unikalnych materiałów roślinnych stosowanych w badaniach podstawowych lub włączanych w praktyce do programów hodowlanych. Jednak cz. zregenerowanych roślin jest obciążona zmiennością somaklonalną lub zmiennością indukowaną kultur tkankowych (TCIV), dodatkowo, wydajność uzyskiwania zielonych regenerantów, szczególnie dla roślin zbożowych, bywa wysoce niezadowolająca. Badania prowadzone dla pszenicy i pszenżyta wykazały, że S-adenozyl-L-metionina (SAM), glutation (GSH), β-glukany, pektyny i jony Cu(II) mogą być zaangażowane w wydajność regeneracji zielonych roślin (GPRES) i TCIV. Wymienione zmienne zostały powiązane za pomocą modeli równań strukturalnych (SEM) ze szlakami biochemicznymi (cykle Krebsa i Yanga, glikoliza, transsulfuracja), jednak analiz takich nie zaprezentowano dla pszenżyta. Celem prezentowanego eksperymentu było opracowanie statystycznego modelu wydajności regeneracji pszenżyta z wykorzystaniem danych metabolomicznych i (epi)genetycznych. W eksperymencie zastosowano różnice stężeń jonów Cu(II) i Ag(I) w pożywkach indukujących wykorzystanych do inkubacji pylników pszenżyta. W zaprojektowanych wariantach do wiadczenia zmieniano także czas inkubacji eksplantatów na pożywkach indukujących. Badanie poziomu TCIV dla genomowego DNA regenerantów i roślin donorowych wykonano przy pomocy metody metAFLP, uwzględniając poziom metylacji w sekwencjach symetrycznych (CG, CHG) i asymetrycznych (CHH). Dane metabolomiczne dotyczące β-glukanów/pektyn, SAM i GSH uzyskano za pomocą spektroskopii ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared). Do opracowania danych

wykorzystano model równa strukturalnych. Analiza metAFLP wykazała, że średnia wartość zmienności sekwencyjnej w kontekście CHH wynosiła 8,65%, zaś poziom metylacji *de novo* dla kontekstu CHH wynosił 0,58%. Analiza FTIR wygenerowała widma dla pektyn, SAM i GSH. Średnia wartość GPRE wynosiła 2,55 zielonych regenerantów uzyskanych na 100 wyłożonych pylników. Zbudowanie teoretycznego modelu i jego weryfikacja pozwoliły na potwierdzenie wpływu takich czynników, jak poziom demetylacji pektyn, SAM, metylacji *de novo* i GSH na GPRE. Wydajność regeneracji zielonych roślin pszenicy na podnie poprzez zmianę stężenia jonów Cu(II) w pożywce, co wpływa także na ilość zidentyfikowanych pektyn.

## Triticale green plant regeneration model

Obtaining plants through tissue cultures offers unique plant materials for basic research or practical incorporation into breeding programmes. However, some regenerated plants are burdened by somaclonal variation or tissue culture-induced variation (TCIV); acquiring green regenerants, particularly cereal plants, can be inefficient sometimes. Studies conducted for barley and partly triticale have shown that S-adenosyl-L-methionine (SAM), glutathione (GSH),  $\beta$ -glucans, pectins and Cu(II) ions may be involved in green plant regeneration efficiency (GPRE) and TCIV. These variables have been linked by structural equation models (SEM) to biochemical pathways (Krebs and Yang cycles, glycolysis, transsulfuration), but such analyses were not presented for triticale. The experiment presented here aimed to develop a statistical model of triticale regeneration efficiency using metabolomic and (epi)genetic data. The experiment used different Cu(II) and Ag(I) ion concentrations in the induction media to incubate triticale anthers. The incubation time of the explants on the induction media was also varied according to the designed variants of the experiment. Testing of TCIV levels for genomic DNA of regenerants and donor plants was performed using the metAFLP method, considering methylation levels in symmetric (CG, CHG) and asymmetric (CHH) sequences. Metabolomic data for  $\beta$ -glucans/pectins, SAM and GSH were obtained by ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared) spectroscopy. A structural equation model was used to process the data. MetAFLP analysis showed that the mean value of sequence variation in the CHH context was 8.65%, while the *de novo* methylation level for the CHH context was 0.58%. FTIR analysis generated spectra for pectin, SAM and GSH. The average GPRE value was 2.55 green regenerants obtained per 100 plated anthers. By building a theoretical model and verifying it, we were able to confirm the influence of factors such as the demethylation level of pectins, SAM, *de novo* methylation and GSH on GPRE. The regeneration efficiency of green triticale plants can be increased by changing the concentration of Cu(II) ions in the media, affecting the amount of pectins identified.



## Wpływ różnej jakości światła LED na wzrost i rozwój warkocznicy jesiennej (*Eucomis autumnalis*) in vitro

M. CIOĆ<sup>1</sup>, J. KACZMARCZYK<sup>1</sup>, P. SALACHNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Katedra Ogrodnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie;  
e-mail: monika.cioc@urk.edu.pl

*Eucomis autumnalis* jest ozdobną rośliną cebulową, która w rejonach naturalnego występowania znajduje się pod ochroną. Ze względu na produkcję związków bioaktywnych i potencjał prozdrowotny kultury in vitro mogą stanowić kontrolowane środowisko badań nad ich syntezą, składem i właściwościami. W badaniach oceniono wpływ różnych jakości światła LED na organogenezę przybyszów na liściach *E. autumnalis*. Kultury prowadzono przez 8 tygodni w warunkach 16/8 godz. fotoperiodu, temperaturze 23/21 ± 1°C (dzień/noc), wilgotności względnej 80%, na agarowej pożywie MS z dodatkiem 30 g dm<sup>-3</sup> sacharozy oraz regulatorów wzrostu 5 μM BA i 0,5 μM NAA. Testowano światła LED: niebieskie 100% (430 nm) (B), czerwone 100% (670 nm) (R), mieszane czerwone i niebieskie w proporcji 7:3 (RB), mieszane RB (50%) z dodatkiem fal zielonych (50% 730 nm) (RBG) lub fioletowych (50% 600 nm) (RBY), białe o temperaturze barwowej w proporcji 1:1:1 (2700:4500:5700 K) (WLed) oraz światło lampy fluorescencyjnej jako kontrolę (Philips TL-D36W/54) (Fl). Światło RBY LED wpłynęło stymulująco na parametry biometryczne otrzymanych roślin, które miały największą masę (średnio 0,77 g) i wysokość, a także uformowały największą liczbę pędów i liści (odpowiednio 15,48 i 1,72). Jednak rośliny spod RBY (a także R) miały najmniejszą zawartość suchej masy (średnio 6,15%), najwyższą charakteryzowały się te uformowane pod RBG oraz B (8,16%). RBG i B stymulowało również syntezę barwników fotosyntetycznych (sumarycznie 17,74 mg g<sup>-1</sup>). Rośliny traktowane RBG wytworzyły także największą liczbę i długość korzeni (2,84 szt. o długości 0,66 mm). Uzyskany mate-

riał roślinny będzie w kolejnym etapie badań analizowany pod kątem zawartości składników bioaktywnych (polifenoli, flawonoidów, aminokwasów, cukrów redukujących) oraz aktywności przeciwutleniającej.

## LED light quality influence on the in vitro growth and development of *Eucomis autumnalis*

*Eucomis autumnalis* is an ornamental bulbous perennial plant that is protected in natural areas. Due to the production of bioactive compounds and their health-promoting potential, in vitro cultures can be a controlled environment for research on their synthesis, composition and properties. The influence of different LED light qualities on adventitious organogenesis on *E. autumnalis* leaves was evaluated. Cultures were carried out for 8 weeks under 16/8-hour photoperiod, temperature  $23/21 \pm 1^\circ\text{C}$  (day/night), relative humidity 80%, on MS agar medium with the addition of  $30\text{ g dm}^{-3}$  of sucrose and growth regulators  $5\ \mu\text{M}$  BA and  $0.5\ \mu\text{M}$  NAA. LED lights tested: blue 100% (430 nm) (B), red 100% (670 nm) (R), mixed red and blue in a 7:3 ratio (RB), mixed RB (50%) with the addition of green (50% 730 nm) (RBG) or yellow wavelengths (50% 600 nm) (RBY), white with a color temperature in the ratio of 1:1:1 (2700:4500:5700 K) (WLED) and fluorescent lamp light as a control (Philips TL-D36W/54) (FL). RBY LED light had a stimulating effect on the biometric parameters of the obtained plants, which had the highest fresh weight (average 0.77 g) and height, and also formed the largest number of shoots and leaves (15.48 and 1.72, respectively). However, plants under RBY (and also R) had the lowest dry matter content (average 6.15%), the highest were those formed under RBG and B (8.16%). RBG and B also stimulated the synthesis of photosynthetic pigments (total  $17.74\text{ mg g}^{-1}$ ). Plants treated with RBG also produced the most and longest roots (2.84 roots, 0.66 mm long). In the next stage of research, the obtained plant material will be analyzed in terms of the content of bioactive compounds (polyphenols, flavonoids, amino acids, reducing sugars) and antioxidant activity.





## Uprawa roślin serdecznika syberyjskiego (*Leonurus sibiricus* L.) w kulturach in vitro

A. FIGAS, M. TOMASZEWSKA-SOWA, Z. GRUSZKA

Katedra Biotechnologii, Politechnika Bydgoska;  
e-mail: figasanna@pbs.edu.pl

Serdecznik syberyjski (*Leonurus sibiricus* L.) jest rośliną zielną należącą do rodziny Lamiaceae. W tradycyjnej medycynie chińskiej wykorzystywany jest w wielu schorzeniach i dolegliwościach, w szczególności ci w problemach ginekologicznych, z potencją, w nadciśnieniu, a także dla poprawienia krążenia krwi. Wszechstronne zastosowanie tego gatunku sprawia, że jest on cennym surowcem zielarskim. W niniejszej pracy dokonano próby mikrorozmnażania serdecznika syberyjskiego w kulturach in vitro. Celem pracy było porównanie sposobów sterylizacji nasion, które były różdkiem eksplantatów wyjciowych do zaindukowania kultury in vitro oraz namnażanie pędów. Jako eksplantaty wtórne w do wiadczeniu wykorzystano jednowzłowe fragmenty siewek, które wykładano na pożywkę MS (wg Murashige i Skooga, 1962), z dodatkiem regulatorów wzrostu (RW) z grupy auksyn i cytokinin. Nasiona wykładano na pożywkę  $\frac{1}{2}$  MS bez RW oraz wzbogaconą w  $GA_3$  w stężeniu  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Do sterylizacji właściwiej wykorzystano  $NaClO$  w stężeniach: 0,0% (1), 1,5% (2), 2% (3), 2,5% (4) przez 11 minut. Najwięcej sterylnych i żywych siewek uzyskano w wariancie, w którym do sterylizacji właściwiej nasion zastosowano 2,5%  $NaClO$ . Dodatek do pożywki  $GA_3$  stymulował ich kiełkowanie. W celu optymalizacji procesu mikrorozmnażania in vitro, pędy boczne *L. sibiricus* przenoszono podczas trzeciego pasażu na 9 wariantów pożywki MS: bez regulatorów wzrostu roślin (ORW), z różnymi stężeniami BAP (6-benzylaminopuryna) – 2,0, 3,0, 4,0, 5,0  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  i BAP – 2,0, 3,0, 4,0, 5,0  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  z NAA (kwas 1-naftalenoctowy) – 1,0  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Najwięcej pędów bocznych formułowaliśmy na pożywkę z dodatkiem 4  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i 1  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  NAA (9,62). Indukcję ryzogenezę w kulturach in vitro uzyskano na pożywkę MS z dodatkiem 0,5  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  IAA (kwas indolilo-3-octowy). Na etapie adaptacji do wa-

runków *ex vitro* wysoki przeżywalność roślin wynosząca 90% uzyskano stosując do podlewania roztwory z solami MS.

## Cultivation of Siberian motherwort plants (*Leonurus sibiricus* L.) in *in vitro* cultures

Siberian motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) is a herbaceous plant belonging to the Lamiaceae family. In traditional Chinese medicine, it is used for many diseases and ailments, in particular gynecological problems, potency, hypertension and to improve blood circulation. The versatile use of this species makes it a valuable herbal raw material. In this study, an attempt was made to micropropagate Siberian motherwort in *in vitro* cultures. The aim of the study was to compare methods of sterilization of seeds, which served as a source of initial explants to induce *in vitro* culture, and to multiply shoots from explants isolated from them. The explants used in the experiment were single-node fragments of seedlings, which were placed on MS medium (according to Murashige and Skoog, 1962), with the addition of PGR (plant growth regulators) from the group of auxins and cytokinins. NaClO was used for proper sterilization in concentrations: 0.0% (1), 1.5% (2), 2% (3), 2.5% (4) for 11 minutes. The largest number of sterile and live seedlings was obtained in the variant in which 2.5% NaClO was used for proper sterilization of the seeds. The addition of GA<sub>3</sub> to the medium stimulated their germination. To optimize the *in vitro* micropropagation process, *L. sibiricus* axillary shoots were transferred during the third passage to 9 different combinations of MS medium: PGRs free, BAP (6-benzylaminopurine) – 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg·dm<sup>-3</sup> and BAP – 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg·dm<sup>-3</sup> with NAA (1-naphthaleneacetic acid) – 1.0 mg·dm<sup>-3</sup>. The greatest number of axillary shoots developed on the medium with the addition of 4 mg·dm<sup>-3</sup> BAP and 1 mg·dm<sup>-3</sup> NAA (9.62). Induction of rhizogenesis in *in vitro* cultures was achieved on MS medium with the addition of 0.5 mg·dm<sup>-3</sup> IAA (indolyl-3-acetic acid). At the stage of adaptation to *ex vitro* conditions, high plant survival of 90% was achieved by using a solution with MS salts for watering.



## Zmiany zawartości kalozy w trakcie somatycznej embriogenezy paproci drzewiastej *Cyathea delgadii*

M. GRZYB<sup>1</sup>, A. KAŻMIERCZAK<sup>2</sup>, A. MIKUŁA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie, Warszawa;

<sup>2</sup>Katedra Cytofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej, Uniwersytet Łódzki;  
e-mail: malgorzata.grzyb@ob.pan.pl

Kaloza (1,3- $\beta$ -glukan) jest polisacharydem uczestniczącym w reakcjach obronnych komórek roślinnych w odpowiedzi na różne sygnały rozwojowe i stresowe. W porównaniu z innymi składnikami ściany komórkowej jest produkowana w małych ilościach i rozmieszczona w określonych jej typach, takich jak te nowo tworzące się czy zewnętrzne ściany pyłku, oraz w plasmodesmach. Doniesienia ostatnich lat wykazały zaangażowanie kalozy w procesy morfogenetyczne roślin zachodzące w warunkach in vitro, w tym w transycji komórek somatycznych w embriogeniczne. Dlatego celem badania było oznaczenie zawartości 1,3- $\beta$ -glukanu w eksplantatach paproci drzewiastej *Cyathea delgadii* poddanych indukcji somatycznej embriogenezy. Do inicjacji kultur wykorzystano fragmenty ogonków liściowych i młodych liści, które dają początek zarodkom, odpowiednio, jedno- i wielokomórkowego pochodzenia. Eksplantaty te umieszczono na pożywce Murashige & Skooga o zredukowanej do połowy zawartości soli i uzupełnionej 1% sacharozą. Kultury utrzymywano w ciemności. Zawartość kalozy w tkankach określono fluorymetrycznie w próbkach utrzalonych w 96% etanolu, pobranych w 0, 4, 8 i 16 dniu kultury. Dodatkowo przeprowadzono obserwacje przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego w tych samych punktach czasowych. W tym celu wykorzystano eksplantaty utrzalone w 2,5% glutaraldehydzie i barwione błkitem aniliny. W obu typach eksplantatów zaobserwowano wzrost zawartości kalozy w trakcie kultury in vitro związanej z intensyfikacją podziałów. Wykazano również, że młody liść charakteryzuje wysza zawartość 1,3- $\beta$ -glukanu w porównaniu do ogonków liściowych zarówno w eksplantatach inicjalnych, jak

i w trakcie 16 dniowej kultury, co może być związane z odmienną drogą różnicowania somatycznych zarodków. Badania z wykorzystaniem *C. delgadii* wskazują na kluczową rolę kalozy w regulacji somatycznej embriogenezy u paproci i poszerzają wiedzę o transycji embriogenicznej roślin.

## Changes in callose content during somatic embryogenesis of the tree fern *Cyathea delgadii*

Callose (1,3- $\beta$ -glucan) is involved in plant cell reactions in response to various developmental and stress signals. Compared to other cell wall components, this polysaccharide is produced in small amounts and distributed in specific cell wall types, such as newly forming or outer walls of pollen, and in plasmodesmata. Recent reports have shown the involvement of callose in plant morphogenetic processes occurring in vitro, including the transition of somatic cells into embryogenic ones. Therefore, this study aimed to determine the content of 1,3- $\beta$ -glucan in explants of the tree fern *Cyathea delgadii* during the induction of somatic embryogenesis. The following were used for culture initiation: stipe and internode fragments, which give rise to embryos of unicellular and multicellular origin, respectively. Explants were placed on Murashige & Skoog medium with half salt concentration supplemented with 1% sucrose and kept in the dark. The callose content was determined fluorometrically in samples fixed in 96% ethanol, collected on days 0, 4, 8, and 16 of culture. In addition, observations were made using a fluorescence microscope at the same time points. Explants fixed in 2.5% glutaraldehyde and stained with aniline blue were used. In both types of explants, an increase in callose content related to the intensification of cell divisions was observed during the progression of in vitro culture. It was also shown that internodes were characterized by a higher 1,3- $\beta$ -glucan content than stipes in both initial explants and during 16-day culture, which may be related to a different pathway of somatic embryo differentiation. Studies using *C. delgadii* may indicate a key role of callose in the regulation of fern somatic embryogenesis and expand knowledge of plant embryogenic transition.



## Uzyskiwanie kalusa i siewek wiązu szypułkowego (*Ulmus laevis*) in vitro – wykorzystanie tkanek w kulturach dualnych

N. GUMULAK-WOŁOSZYN, K. NAWROT-CHORABIK

Katedra Ochrony Ekosystemów Leśnych,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: natalia.gumulak@student.urk.edu.pl

Holenderska choroba wiązów jest jedną z najbardziej niebezpiecznych chorób drzew z rodzaju *Ulmaceae*. Najbardziej na nią odporny spośród trzech polskich gatunków wiązów jest wiąz szypułkowy (*Ulmus laevis*). Celem badań było uzyskanie kalusów, a w dalszych etapach siewek wiązów szypułkowych oraz informacji na temat podatności wiązów na *Ophiostoma ulmi* oraz *Graphium* sp. Opracowano metodę odkażania dojrzałych nasion w 8%  $H_2O_2$  (15 min.), z których izolowano zarodki. Wyizolowane zarodki wykładano na cztery różne podłoża. W celu uzyskania kalusa lub/i siewek zróżnicowano badania pod względem doboru hormonów wzrostu: BA, TDZ,  $GA_3$  i KIN, które dodawano do podłoża w różnych kombinacjach. Kalus proliferował na podłożu WPM (Wody Plant Medium) z dodatkiem 4,440  $\mu M$  BA i 4,646  $\mu M$  KIN. Tkanki zróżnicowane, na których obserwowano wydłużenie pędów, rozwój liści i dno korzeni, rozwijały się na WPM uzupełnionym w 4,440  $\mu M$  BA i 1,444  $\mu M$   $GA_3$ . Ukorzenianie mikrosadzonek prowadzono na podłożu WPM z dodatkiem 10,740  $\mu M$  NAA, a aklimatyzowano zmniejszając stopniowo podłoża o połowę co 2 tygodnie. Eksperyment nad jakością kalusa w zależności od warunków świetlnych wykazał, że tkanki hodowane w świetle (wielkość tygodnie indukcji w ciemności) posiadają większą średnią masę (163 mg) niż tkanki hodowane w całości w ciemności (129 mg). Uzyskany kalus wykorzystano do kultur dualnych z grzybami *O. ulmi* oraz *Graphium* sp. Wykazano różnice we wzroście grzybnii w kulturze dualnej w zależności od dostępu do światła i temperatury. Kultura dualna prowadzona w świetle ukazała zmiany barwy (beżowa, jasnozielona) oraz zróżnicowany rozmiar grzybnii. Kalus hodowany

w ciemno ci był ciemno br zowy. W niskiej temperaturze rozmiar grzybni w kulturze dualnej został zredukowany o ok. 65%. Badania potwierdziły istotno doboru odpowiednich regulatorów wzrostu oraz wiatła w rozwoju kalusa. Wykazano równie , e ró nice we wzro cie w kulturach dualnych zale od temperatury oraz warunków wietlnych hodowli. W przyszło ci badania mog by podstaw do poszerzenia wie dz z zakresu wirulencji badanych gatunków grzybów.

### Obtaining callus and seedlings of European white elm (*Ulmus laevis*) in vitro – the use of tissues in dual cultures

Dutch elm disease is one of the most dangerous diseases affecting three Polish elm species, of which European white elm (*Ulmus laevis*) is the most resistant. The aim of this study was to obtain callus and seedlings of the *U. laevis*, then the information about susceptibility to *Ophiostoma ulmi* and *Graphium* sp. A method was developed to decontaminate mature seeds, from which embryos were isolated, in 8% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min). The isolated embryos were plated on four different culture media. To obtain callus and/or seedlings, tests were differentiated by the choice of growth hormones, which were added to the medium in different combinations. Callus proliferated on WPM medium with the addition of 4.440 µM of BA and 4.646 µM of KIN. Tissues, on which shoot elongation, leaf or root development was observed, developed on WPM supplemented with 4.440 µM of BA and 1.444 µM of GA<sub>3</sub>. Rooting of microcuttings was carried out on WPM supplemented with 10.740 µM of NAA and acclimatised by halving the substrate concentration every 2 weeks. An experiment on callus quality in relation to light conditions showed that tissues grown in the light (including one week of induction in the dark) had a higher average weight (163 mg) than tissues grown entirely in the dark (129 mg). The dual culture grown in the light showed a difference in the colour of the mycelium and callus (beige). Callus grown in the dark was brown. At low temperature, the size of the mycelium in dual cultures decreased by about 65%. The study confirmed the importance of selecting appropriate growth regulators and light in callus development. The differences in growth in the dual cultures were also shown to depend on temperature and light. In the future, the study may serve as a basis for expanding our knowledge of the virulence of fungal species.



## Gatunki z rodziny Thymeleaceae jako obiekty eksperymentów in vitro

E. HANUS-FAJERSKA<sup>1</sup>, A. WISZNIEWSKA<sup>1</sup>, A. KOŹMIŃSKA<sup>1</sup>, J. WINCENCIAK<sup>2</sup>,  
A. RISEMAN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>SM Technologia Roślin Leczniczych i Prozdrowotnych,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>3</sup>Faculty of Land and Food Systems, The University of British Columbia, Canada;  
e-mail: ewa.hanus-fajerska@urk.edu.pl

*Daphne caucasica*, *D. cneorum*, *D. genkwa*, *D. jasminea*, *D. tangutica* stanowi wa ny zasób biologiczny ze wzgl du na cenne wła ciwo ci lecznicze, pachn ce kwiaty i atrakcyjny wygl d. Zoptymalizowano rozmna anie gatunków reprezentuj cych rodzin Thymeleaceae i opracowano wydajne protokoły mikrozmna nia tego materiału. Z wierzchołków p dów i mi dzyw li dobry efekt uzyskano stosuj c po ywk na bazie soli WPM z witaminami MS uzupełnion BAP ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) i IBA ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) tj. współczynnik rozmna nia odpowiednio 8,59 and 9,54. Współczynnik rozmna nia uległ znacznej poprawie, gdy eksplantaty wierzchołkowe umieszczono w półstałej po ywce zestalanej  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  Gelrite z dodatkiem 3% (w/v) sacharozy, 0,2% (w/v) w gła aktywowanego, 8% (w/v) homogenatu bananowego,  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, and  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  thidiazuronu. Na po ywkach proliferacyjnych uzyskano długoterminowe kultury, lecz poszczególne gatunki wykazywały odmienne reakcje na poziomy ró nych PGR i wietln-temperaturowy re im kultywacji. Po fazie namna nia, 100 mm p dy, po etapie wydłu nia na po ywce pozbawionej regulatorów wzrostu, zostały ukorzenione in vitro. Ryzogeneza była najbardziej obf ta na po ywce zawieraj cej  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  IBA. Uzyskane mikro ro liny były z po wodem aklimatyzowane w warunkach słabego o wietlenia na mieszance ziemi ogrodowej, torfu i perlitu. W warunkach szklarniowych najlepszy efekt hartowania,

z przeżywalnością 82,52%, uzyskano przy zastosowaniu podłoża składającego się z równych proporcji ziemi ogrodowej, włókien orzecha kokosowego i wermikulitu. Ponadto, selekcja *in vitro* w kulturach podziemnych pod kątem tolerancji na ołów, kadm i zasolenie podłoża oraz w kulturach korzeni pod kątem tolerancji na *Thielaviopsis basicola* dała dobre wyniki.

## Species of the Thymeleaceae Family as *in vitro* experiment objects

*Daphne caucasica*, *D. cneorum*, *D. genkwa*, *D. jasminea*, *D. tangutica* are considered an important biological resource due to their valuable medicinal properties, in addition to the fragrant flowers and attractive appearance. The propagation of species representing the Thymeleaceae family was optimised, and efficient protocols for true-to-type propagation for this material were developed. In the case of shoot apical and internodes the good effect was obtained using a WPM salt-based medium with MS vitamins supplemented with BAP ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) and IBA ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) i.e. a multiplication coefficient 8.59 and 9.54 respectively. The propagation ratio was significantly improved when shoot tips were placed in semi-solidified medium with  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  Gelrite, supplemented with 3% (w/v) sucrose, 0.2% (w/v) activated charcoal, 8% (w/v) banana homogenate,  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP, and  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  thidiazuron. Long-term cultures were obtained on the proliferation media, but individual species showed different responses to the levels of PGRs and the light/temperature regime of cultivation. After the multiplication phase, about 100 mm-long shoots were rooted *in vitro*, following an elongation stage on growth-regulator-free medium. Rhizogenesis was most abundant on medium containing  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  IBA. The resulting micro-plants were successfully acclimatised under low-light conditions on a mixture of garden soil, peat and perlite. Under greenhouse conditions, the best hardening-off effect, with a survival rate of 82.52%, was obtained using a substrate consisting of equal proportions of garden soil, sand, coconut fibres and vermiculite. In addition, *in vitro* selection in shoot cultures for both tolerance to lead, cadmium and salt, and substrate salinity, and in root cultures for tolerance to *Thielaviopsis basicola* yielded good results.





## Analiza wpływu nanocząstek tlenku cynku na kultury in vitro *Nigella damascena* L.

D. HUBER, M. KLIMEK-CHODACKA, R. BARAŃSKI

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: huber.dominik.03@gmail.com

Nanotechnologia jako narzędzie w kulturach in vitro roślin znajduje zastosowanie między innymi w indukcji kalusa, zapobieganiu zakażeniom oraz elicytacji. Wśród najczęściej wykorzystywanych można wymienić nanocząstki srebra, kobaltu, tlenku tytanu oraz tlenku miedzi. Elicytacja pozwala wielokrotnie zwiększyć zawartość związków bioaktywnych wytwarzanych przez tkanki roślinne w kulturach in vitro. Czarnuszka damasceńska to gatunek jednorocznej rośliny należącej do rodziny jaskrowatych (Ranunculaceae). Dotychczasowe badania naukowe dowodzą, że posiada ona znaczny potencjał w zastosowaniach leczniczych. Olejki eteryczne lub ekstrakty pozyskane z nasion wykazują właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwgorączkowe, estrogenne, przeciwbólowe i przeciwdrobnoustrojowe. Głównymi składnikami oleju eterycznego pozyskiwanego z nasion czarnuszki damasceńskiej są β-elemien, wykazujący działanie antybakteryjne, przeciwnowotworowe i przeciwzapalne oraz damascenina wykazująca działanie przeciwzapalne, przeciwgorączkowe, przeciwbólowe i moczopędne. Terapeutyczny efekt tych związków został potwierdzony w wielu badaniach. Celem badania było określenie wpływu dodatku do pożywek nanocząstek tlenku cynku, na zawartość metabolitów wtórnych oraz przyrost biomasy w kulturach in vitro czarnuszki damasceńskiej. Określono reakcję kultur na dodatek nanocząstek tlenku cynku w zakresie 10 do 400 mg/l. W wyniku badania odnotowano wpływ nanocząstek na zawartość suchej masy oraz zawartość substancji oznaczanych przy użyciu wysokości nienowej chromatografii cieczowej (HPLC). Największy przyrost suchej masy (117,6% względem kontroli) odnotowano po zastosowaniu nanocząstek w stężeniu 10 mg/l, z kolei dodatek 160 mg/l spowodował drastyczny spadek suchej masy.

Stwierdzono zależność od stężenia, hamujący wpływ dodatku nanocząstek na syntezę kwasu neochlorogenowego.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS, UMO-2022/45/B/NZ7/01478).

## Influence of zinc oxide nanoparticles on *Nigella damascena* L. in vitro cultures

Nanotechnology is used in plant tissue cultures for various purposes including callus induction, infections prevention, and elicitation. The most commonly used nanoparticles include silver, cobalt, titanium oxide, and copper oxide nanoparticles. Elicitation can significantly increase the levels of bioactive compounds content produced in tissue cultures. *Nigella damascena*, an annual plant species belonging to the buttercup family (Ranunculaceae), holds significant potential for medicinal applications, as evidenced by scientific research. Essential oils or extracts obtained from the seeds have anti-cancer, anti-inflammatory, antipyretic, estrogenic, diuretic, analgesic, and antimicrobial properties. The main constituents of the essential oil extracted from *Nigella damascena* seeds are  $\beta$ -elemene, which exhibits antibacterial, anticancer, and anti-inflammatory properties, and damascenine, which has anti-inflammatory, antipyretic, analgesic, and diuretic properties. The therapeutic effect of these compounds has been confirmed in numerous studies. The aim of the research was to determine the effect of zinc oxide nanoparticles supplemented growth media on the content of secondary metabolites and biomass growth of *Nigella damascena* in vitro cultures. The response of cultures to the zinc oxide nanoparticles supplementation in the range of 10 to 400 mg/l was determined. The research showed the effect of nanoparticles on the dry mass content and the content of substances determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). The highest increase in dry mass (117.6% compared to the control) was observed after the application of nanoparticles at a concentration of 10 mg/l, while the addition of 160 mg/l resulted in a drastic decrease in dry mass. Nanoparticles supplementation showed inhibitory effect on the synthesis of neochlorogenic acid in concentration-dependent manner.

This work was funded by the National Science Centre, Poland (OPUS, UMO-2022/45/B/NZ7/01478).



## Formowanie in vitro cebul *Lachenalia viridiflora*

M. MAŚLANKA, J. MAZUR, A. KAPCZYŃSKA

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: [anna.kapczynska@urk.edu.pl](mailto:anna.kapczynska@urk.edu.pl)

*Lachenalia viridiflora* jest krytycznie zagrożonym, endemicznym gatunkiem, pochodzącym z Afryki Południowej, wymagającym intensywnej ochrony ex situ. W celu podjęcia działań konserwacyjnych, w niniejszej pracy skupiono się na jego mikro-rozmnażaniu. W doświadczeniu wykorzystano materiał roślinny z kolekcji in vitro *L. viridiflora* (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie). Jako eksplantat zastosowano fragment liścia (10 mm długości, 2 mm szerokości) przecięty wzdłuż. Eksplantaty wyłożono na pożywkę MS, zawierającą 5 μM BAP i 0,5 μM NAA oraz 3 lub 6% sacharozy. Kultury utrzymywano w ciemności, w temperaturze 20°C. Po 12 tygodniach oceniono zdolność i wydajność formowania cebul przybyszowych oraz ich jakość. Bez względu na poziom sacharozy, pierwsze cebule zaczęły się formować już po 2 tygodniach od założenia doświadczenia. Po 4 tygodniach, na pożywkę z 3% sacharozy było ich dwukrotnie więcej (4 cebule/eksplantat), niż na pożywkę z 6% cukrem (2 cebule/eksplantat). Ta tendencja utrzymywała się do końca trwania doświadczenia, kiedy ostatecznie uzyskano ok. 9 i 3 cebule (z jednego eksplantatu), odpowiednio dla 3 i 6% sacharozy, co wskazuje, iż *L. viridiflora* cechuje się wysokim współczynnikiem rozmnażania w kulturach in vitro, biorąc pod uwagę niewielki rozmiar eksplantatu. Oceniając jakość formowanych cebul stwierdzono, iż wyższa zawartość sacharozy wpłynęła korzystnie na ich średnicę (3,4 mm) w porównaniu do podstawowej zawartości cukru (2,6 mm). Stężenie sacharozy w pożywkę nie wpłynęło na zdolność cebul do formowania liścia (w obu przypadkach wyniosła ona ok. 30%), ale miało istotny wpływ na ich długość. Na pożywkę z niższym stężeniem sacharozy uzyskano cebule formujące dłuższe pędzły (9 mm), niż na pożywkę z 6% sacharozy (6 mm). Zaprezentowane wyniki wpisują się w problematykę ochrony ex situ rzadkich i zagrożonych gatunków roślin.

## In vitro bulb formation of *Lachenalia viridiflora*

*Lachenalia viridiflora* is a critically endangered, endemic species from South Africa, requiring intensive ex situ protection. In order to undertake conservation activities, this work focuses on its micropropagation. The experiment used plant material from the in vitro collection of *L. viridiflora* (University of Agriculture in Kraków). A leaf explants (10 mm long, 2 mm wide) were cut lengthwise and placed on MS media containing 5 µM BAP, 0.5 µM NAA, 3 or 6% saccharose. The cultures were maintained in the dark at 20°C. After 12 weeks, the ability and efficiency of forming adventitious bulbs and their quality were assessed. Regardless of the level of sucrose, the first bulbs started forming 2 weeks after setting up the experiment. After 4 weeks, there were twice more of them on the medium with 3% sucrose (4 bulbs/explant) than on the medium with 6% sucrose (2 bulbs/explant). This tendency continued until the end of the experiment, while approximately 9 and 3 bulbs were obtained (per explant), for 3 and 6% sucrose, respectively. That indicates that *L. viridiflora* is characterized by a high rate of in vitro propagation, considering the small size of the explant. Assessing the quality of the formed bulbs, it was found that the higher saccharose content had a more positive effect on their diameter (3.4 mm) compared to the basic content of sucrose (2.6 mm). The concentration of saccharose in the medium did not affect the ability of the bulbs to form leaves (in both cases it was approximately 30%), but it had a significant effect on their length. On the medium with a lower concentration of sucrose, bulbs formed longer shoots (9 mm) than on the medium with 6% sucrose (6 mm). The presented results are part of the issue of ex situ protection of rare and endangered plant species.



## Wpływ światła LED o różnej długości fali na kiełkowanie nasion i dalszy wzrost storczyków z rodzaju *Bletilla*

D. KOCOT<sup>1</sup>, M. CIOĆ<sup>1</sup>, B. PROKOPIUK<sup>1</sup>, A. VOLANTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>CREA – Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo di Sanremo, Italy;

e-mail: dawid.kocot@urk.edu.pl

Zbadano wpływ różnych kombinacji spektralnych światła LED na kiełkowanie nasion i dalszy wzrost roślin z gatunków *Bletilla striata* i *B. formosana*. Nasiona po odkażeniu powierzchniowo wyłożono na szalki Petriego z pożywką Orchimax i umieszczono w komorach wzrostowych oświetlanych różnie jako ci światłem LED – 5 kombinacji: 100% światła niebieskiego (Blue), 100% światła czerwonego (Red), 70% Red + 30% Blue (RB), 50% światła żółtego (Yellow) + RB 7:3 oraz 50% światła zielonego (Green) + RB 7:3. Warunki kontrolne stanowiły rośliny doświetlane lampami fluorescencyjnymi oraz trzymane w ciemności. Po miesiącu policzono procent skielkowanych nasion. Nasiona kiełkowały na wszystkich zastosowanych światłach, jak również w ciemności, a najwyższe siewki uzyskano w warunkach kontrolnych doświetlanych lampami fluorescencyjnymi (87%). Otrzymane siewki przepasaowano po 3 miesiącach od wysiewu na nowe pożywki i obserwowano ich dalszy wzrost na tych samych kombinacjach światła. Po 7 tygodniach sporządzono pomiary wysokości roślin, liczby liści, ich maksymalnej szerokości oraz obliczono procent ukorzenionych roślin. Zaobserwowano całkowite zahamowanie wzrostu dla obu gatunków na świetle czerwonym (100% Red). Najwyższe rośliny dla obu gatunków uzyskano na świetle 50% Yellow + RB 7:3 – średnia liczba liści wahała się od 2 do 4, średnica liści dla *B. formosana* była mniejsza i wynosiła ok. 0,2 cm, natomiast liście *B. striata* osiągały nawet 0,5 cm szerokości. Zaobserwowane różnice stanowią interesujący podstaw do dalszych badań wpływu różnych rodzajów światła na kiełkowanie i wzrost storczyków z rodzaju *Bletilla*.

## The influence of different wavelengths of LED lights on seed germination and further growth of the *Bletilla* genus orchids

The effect of different LED light spectrum combinations on seed germination and further growth of *Bletilla striata* and *B. formosana* plants was investigated. After surface disinfection, the seeds were placed on Petri dishes with Orchimax medium and placed in growth chambers illuminated with different LED light quality – 5 combinations: 100% Blue, 100% Red, 70% Red + 30% Blue (RB), 50% Yellow + RB 7:3 and 50% Green + RB 7:3. The control conditions were plants illuminated with fluorescent lamps and kept in the dark. After a month, the percentage of germinated seeds was counted. The seeds germinated under all lights used, as well as in the dark, and the largest number of seedlings were obtained in control conditions illuminated with fluorescent lamps (87%). The obtained seedlings were transplanted 3 months after sowing onto new media and their further growth was observed under the same light combinations. After 7 weeks, measurements of plant height, number of leaves, their maximum width were made and the percentage of rooted plants was calculated. Complete growth inhibition was observed for both species under red LED light (100% Red). The tallest plants for both species were obtained in 50% Yellow + RB 7:3 light. The average number of leaves ranged from 2 to 4. The diameter of the leaves for *B. formosana* was smaller and was approximately 0.2 cm, while the leaves of *B. striata* were up to 0.5 cm wide. The observed differences constitute an interesting basis for further research into the influence of different types of light on the germination and growth of orchids of the *Bletilla* genus.



## *Agrostemma githago* w kulturach in vitro

W. KOZŁOWSKA<sup>1</sup>, D. ZBLEWSKA<sup>1\*</sup>, M. BIELECKA<sup>2</sup>, M. DZIWAŁ<sup>2</sup>,  
I. NAWROT-HADZIK<sup>2</sup>, S. ZIELIŃSKA<sup>1</sup>, A. MATKOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

<sup>1\*</sup>Studenckie Koło Naukowe, K76 przy Katedrze Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej;

<sup>2</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

e-mail: weronika.kozłowska@umw.edu.pl

K kol polny (*Agrostemma githago* L.) z rodziny goździkowatych był szeroko rozpowszechnionym chwastem upraw zbożowych. Obecnie gatunek ten jest klasyfikowany jako znikający, a miejscami wymarły z uwagi na zmiany w agrotechnice upraw. K kol jest gatunkiem jednorocznym, silnie trującym ze względu na wysoką zawartość saponin triterpenowych, obecnych w całej roślinie, a szczególnie w nasionach. Wysoka toksyczność rośliny wynika ponadto z obecności białek inaktywujących rybosom typu I (RIP-I), których synergistyczne działanie z saponinami triterpenowymi może być wykorzystane w lecznictwie do produkcji leków nowej generacji. Ponadto k kol jest źródłem C-glikozydów fawanowych, posiadających cenne właściwości lecznicze i profilaktyczne m.in. w schorzeniach kardiologicznych i chorobach cywilizacyjnych. Celem badawczym było wprowadzenie gatunku *A. githago* do kultur in vitro i zweryfikowanie hipotezy o możliwości uzyskania biosyntezy saponin triterpenowych, białek RIP i C-glikozydów fawanowych w warunkach kontrolowanych. Badania prowadzono na niezeronikowanych układach tkankowych oraz w kulturach organów na różnych podłożach hodowlanych z dodatkiem kombinacji roślinnych regulatorów wzrostu (PGR) – auksyny: kwasu indoliloctowego (IAA) i cytokinin – kinetyny (KIN), 6-benzylaminopuryny (BAP) czy 6- $\gamma,\gamma$ -dimetyloallylaminopuryny (ZiP), w szeregach steroidalnych. Kultury były prowadzone za pomocą monitoringu cech morfologicznych, takich jak długość pędu głównego, współczynnik rozkrzewiania,

masa – w przypadku pędów, oraz współczynnik przyrostu biomasy w przypadku kultur zawieszinowych, a także korzeni i kalusa. Dodatkowo podjęto próbę zwiększenia skali hodowli poprzez wykorzystanie bioreaktorów typu czasowego zanurzenia (RITA, Plantform). Otrzymane wyniki świadczą o wysokim potencjale produkcyjnym *A. githago* w kulturach *in vitro* oraz o znaczącym wpływie PGR na biosyntezy metabolitów wyspecjalizowanych. W kolejnych etapach badań zostaną podjęte próby selekcji wysokoproduktywnych linii o zmaksymalizowanym wzroście biomasy.

Badania zostały sfinansowane z projektu badawczego OPUS 20 (LAP), ufundowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN). Nr projektu: 2020/39/I/NZ7/01515.

### *Agrostemma githago* in *in vitro* cultures

The corn cockle (*Agrostemma githago* L.) of the carnation family was a widespread weed of cereal crops. Once very common it is now regarded as an endangered species due to changes in crop agrotechnics. *A. githago* is an annual, highly toxic species due to a high content of triterpene saponins, present in all plant organs, especially in the seeds. The toxicity of a corn cockle is also caused by ribosome-inactivating proteins, type I (RIP-I), whose synergistic action with the triterpene saponins can be used in medicine to produce new generation drugs. Moreover, the plant is a source of flavan C-glycosides, known for its beneficial effect on human health, like cardiovascular disorders or civilization diseases. The research objective was to introduce *A. githago* into *in vitro* cultures and verify the hypothesis that the biosynthesis of triterpene saponins, RIP proteins, and flavan C-glycosides could be achieved under controlled conditions. Studies were conducted on undifferentiated tissue systems and in organ cultures on different culture media with a combination of the plant growth regulators (PGRs): auxin - indoleacetic acid (IAA), and the cytokinins - kinetin (KIN), 6-benzyl amino purine (BAP) or 6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino)purine (ZiP), in a range of concentrations. Cultures were conducted by monitoring morphological features such as main shoot length, branching weight - in the case of shoots, and biomass growth rate in the case of suspension cultures, as well as roots and callus. In addition, an attempt was made to scale up the culture in temporary immersion-type bioreactors (RITA, Plantform). The results obtained demonstrate the high production potential of *A. githago* in *in vitro* cultures and the significant effect of PGR on the biosynthesis of specialized metabolites. In the next stages of the study, attempts will be made to select highly productive lines with maximized biomass growth.

This research was funded by National Science Center of Poland (NCN) #2020/39/I/NZ7/01515; OPUS 20 (LAP).





## Porównanie wydajności produkcji pędów bylin (*Echinacea*, *Heuchera*, *Hosta*) w bioreaktorach Rita® i Setis®

M. MALIK<sup>1</sup>, K. NORWA<sup>2</sup>, P. NORWA<sup>2</sup>, J. AKIK<sup>2</sup>, D. MAJOS<sup>2</sup>, E. GABRYSZEWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Norwa Plants Tissue Culture Laboratory, Piaseczno;

e-mail: Malgorzata.Malik@urk.edu.pl

Wśród zalet bioreaktorów do produkcji roślinnej wymienia się m.in. możliwość uzyskania dużej liczby roślin, uzyskanie wyszych współczynników rozmnażania, łatwe powiększenie skali produkcji, łatwy obsługa, a co za tym idzie zmniejszenie kosztów produkcji. Celem przedmiotowego badania było porównanie wydajności namnażania pędów *Heuchera*, *Echinacea* i *Hosta* w bioreaktorach z systemem okresowego zalewania. Kontrolę stanowiły kultury na podłożach stałych. Do badania użyto dwóch bioreaktorów, bioreaktora Rita o pojemności 1 L z opcją sterowania czasem i częstotliwością zalewania kultury podług bioreaktora Setis o 10-krotnie większej pojemności, z opcjami zmiany czasu i częstotliwości zalewania, objętości powietrza i intensywności napowietrzania. Na podstawie wyników stwierdzono, że zastosowanie systemów okresowego zalewania daje możliwość zwiększenia współczynnika rozmnażania pędów *Echinacea* (w systemie Rita) oraz *Heuchera* i *Hosta* (w obu systemach) w porównaniu do kontroli. W przypadku *Heuchera* i *Hosta* obserwowano około dwukrotnie większą liczbę pędów w bioreaktorze Setis (odpowiednio 12,0-16,4 i 4,4-5,8) niż w Rita (odpowiednio 6,1-7,7 i 2,4-2,5). Ponadto *Echinacea* namnażała się lepiej w systemie Rita (6,7-6,9) niż w Setis (2,40-4,25). Przy czym masa pędów była prawie czterokrotnie większa w bioreaktorze Setis.

Badania finansowane były przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR) w ramach „Konkursu 3/1.1.1/2020 – Szybka ścieżka dla Mazowsza” (POIR.01.01.01-00-0178/20).

## Comparison of the production efficiency of perennials (*Echinacea*, *Heuchera*, *Hosta*) in Rita® and Setis® bioreactors

The advantages of bioreactors for plant production include: the ability to produce a large number of plants, obtain higher multiplication rates, easily expand the scale of production, easy operation, and thus reduce production costs. The aim of the experiments was to compare the multiplication efficiency of *Heuchera*, *Echinacea* and *Hosta* shoots in bioreactors with a temporary immersion system. Cultures on solid media were the control. Two bioreactors were used for the experiments: a Rita bioreactor with a capacity of 1 L with the option to control the time and frequency of immersion the culture with medium and a Setis bioreactor with a 10-fold larger capacity, with options to change the time and frequency of immersion, medium volume and aeration intensity. Based on the results, it was found that the use of temporary immersion systems makes it possible to increase the multiplication of *Echinacea* shoots (in the Rita system) and *Heuchera* and *Hosta* (in both systems) compared to the control. In the case of *Heuchera* and *Hosta*, approximately twice as many shoots were observed in the Setis bioreactor (12.0- 16.4 and 4.4- 5.8, respectively) than in Rita (6.1- 7.7 and 2.4- 2.5 respectively). *Echinacea* shoots multiplied better in the Rita (6.7- 6.9) than in Setis system (2.40- 4.25). The mass of shoots was almost four times higher in the Setis bioreactor.

The research was financed by the National Centre for Research and Development (NCBR) under the „Konkurs 3/1.1.1/2020 – Szybka cięka dla Mazowsza” (POIR.01.01.01-00-0178/20).



## Wykorzystanie *meta*-Topoliny i karrikiny w organogenezie bezpośredniej triploidalnych form *Hippeastrum*

P. MARCINIAK, M. ZAJĄCZKOWSKA, D. SOCHACKI

Samodzielny Zakład Roślin Ozdobnych,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie;  
e-mail: przemyslaw\_marciniak1@sggw.edu.pl

Obecny rodzaj *Hippeastrum* należy do rodziny Amaryllidaceae, liczy około 110 gatunków, był włączony do rodzaju *Amaryllis* a do XIV Międzynarodowego Kongresu Botanicznego, który odbył się w 1987 roku. Dziś to już dwa odrębne rodzaje botaniczne, których przedstawicielami są kolejno gatunki i odmiany *Hippeastrum* oraz *Amaryllis beladonna*. Roślina ta jest geofitem uprawianym na kwiatostany oraz jako kwitnąca roślina doniczkowa, a cebule w produkcji ogrodniczej pozyskuje się z plantacji reprodukcyjnych. Rozmnażane są także przez sadzonki dwułuskowe lub metodami in vitro. W 2018 roku w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie przekrzyżowano dwa klony *H. ×chmielii* z trzema odmianami *H. hybridum* i otrzymano populację mieszańców, z których w wstępnych badaniach cytogenetycznych wyselekcjonowano obiecujące formy triploidalne ( $2n = 3x = 33$ ) i rozmnażano je metodami kultur tkankowych. Celem badań było określenie wpływu *meta*-Topoliny oraz Karrikiny 1 ( $KAR_1$ ) na wzrost i rozwój mikrosadzonek czterech triploidalnych klonów hodowlanych *Hippeastrum*: 0021-10, 0023-11, 0050-16 oraz 0062-10, po 10 tygodniowym etapie namnażania in vitro. Ocenie poddano liczbę i długość liści, liczbę i długość korzeni oraz masę całych roślin, ale również masę samych cebul. Zastosowane regulatory wzrostu wpływały na badane parametry mikrosadzonek *hippeastrum*. Zaobserwowano pozytywne oddziaływanie  $KAR_1$  na bryły korzeniowe (zwiększenie liczby korzeni) trzech badanych genotypów [0023-11, 0050-16, 0062-10] oraz na zwiększenie liczby liści dla jednego z badanych genotypów [0023-11]. *Meta*-Topolina hamowała rozwój bryły korzeniowej (zmniejszenie liczby i długości korzeni w porównaniu do roślin nie

traktowanych regulatorami wzrostu) oraz wzrost liści u wszystkich badanych genotypów. Powyższe wyniki mogą sugerować pozytywny wpływ  $KAR_1$  na architekturę systemu korzeniowego również w przypadku innych geofitów, co przyczyni się do zwiększenia efektywności produkcji materiału nasadzeniowego dobrej jakości, ale wymaga dalszych badań.

## The use of *meta*-Topolin and karrikin in the direct organogenesis of triploid forms of *Hippeastrum*

The current genus *Hippeastrum*, which belongs to the Amaryllidaceae family and has about 110 species, was included in the genus *Amaryllis* until the 14th International Botanical Congress held in 1987. Nowadays they are two separate botanical genera, whose representatives are species and cultivars of *Hippeastrum* and *Amaryllis beladonna*. The plant is a geophyte grown for cut flowers and as a flowering potted plant, and bulbs in horticultural production are obtained from reproductive plantations. They are also propagated by twin-scaling or by the in vitro method. In 2018, two clones of *H. ×chmielii* were crossed with three cultivars of *H. hybridum* at the Warsaw University of Life Sciences and a population of hybrids was obtained, from which, after preliminary cytogenetic studies, promising triploid forms ( $2n = 3x = 33$ ) were selected and propagated by tissue culture. The aim of the study was to determine the effect of *meta*-Topolin and Karrikin 1 ( $KAR_1$ ) on the growth and development of plantlets of four triploid *Hippeastrum* breeding clones: 0021-10, 0023-11, 0050-16 and 0062-10, after a 10-week in vitro multiplication stage. The number and length of leaves, the number and length of roots, and the weight of whole plants were evaluated, but also the weight of the bulbs themselves. The applied plant growth regulators influenced the studied parameters of *Hippeastrum* plantlets. A positive effect of  $KAR_1$  was observed on the root system (increase in the number of roots) of the three tested genotypes [0023-11, 0050-16, 0062-10] and on the increase in the number of leaves for one of the tested genotypes [0023-11]. *Meta*-Topolin inhibited root system development (reduction in the number and length of roots compared to plants not treated with plant growth regulators) and leaf growth in all tested genotypes. The above results may suggest a positive effect of  $KAR_1$  on the root system architecture in other geophytes as well, which will contribute to increasing the efficiency of producing good quality planting material, but requires further research.



## Kultury merystemów *Tulipa tarda*

M. MAŚLANKA

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: malgorzata.maslanka@urk.edu.pl

*Tulipa tarda*, należą do grupy tulipanów botanicznych, cieszy się rosnącym zainteresowaniem na rynku roślin cebulowych. Ze względu na niską wydajność tradycyjnego rozmnażania tulipanów, poszukuje się bardziej efektywnych metod, opartych na technikach in vitro. W doświadczeniu założono kultury merystemów w celu opracowania skutecznego protokołu mikropropagacji *T. tarda*. Jako wyjściowy materiał roślinny wykorzystano cebule przybyszowe, pozyskane z kolekcji in vitro *T. tarda* (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie). Z cebul tych wyizolowano merystemy wierzchołkowe, które posłużyły jako eksplantaty. Wyizolowane wierzchołki wzrostu przeniesiono na pożywkę stałą MS zawierającą 3% sacharozy, pikloram (25 lub 50  $\mu\text{M}$ ) i BAP (0,5; 5 lub 10  $\mu\text{M}$ ). Łącznie zastosowano 6 kombinacji pożywek. Kultury utrzymywano w ciemności, w temperaturze 20°C przez 16 tygodni. W pierwszych tygodniach kultury eksplantaty nabrzmiały i blisko pięciokrotnie powiększyły swój średnicę. Dziesięć tygodni po rozpoczęciu doświadczenia, cztery merystemy zaczęły tworzyć łuski cebulowe (bezpośrednio lub poprzez tkankę kalusową), a cztery zaczęły formować kalus bez żadnych oznak regeneracji. W niniejszych badaniach uzyskano 100% bezpośredniej regeneracji (formowania cebul) pod wpływem pożywek zawierających 25  $\mu\text{M}$  pikloramu i 5  $\mu\text{M}$  BAP. Obniżenie poziomu BAP do 0,25  $\mu\text{M}$ , przy tej samej zawartości pikloramu, skutkowało znacznie niższą regeneracją bezpośrednią, wynoszącą 69% oraz 15% regeneracją przez tkankę kalusową. Znacząco niższą bezpośrednią regenerację (73,8%) zaobserwowano także pod wpływem 50  $\mu\text{M}$  pikloramu stosowanego łącznie z 0,5  $\mu\text{M}$  BAP. Pozostałe kombinacje pożywek wykazały bezpośrednio formowanie cebul na poziomie 93–96%.

## Meristem culture of *Tulipa tarda*

*Tulipa tarda*, belonging to the group of botanical tulips, is enjoying growing interest on the bulb plant market. Due to the low efficiency of traditional tulip reproduction, more effective methods based on in vitro techniques are being sought. In the experiment, meristem culture was established for developing an efficient protocol of *T. tarda* micropropagation. As initial plant material there were used adventitious bulbs, obtained from in vitro *T. tarda* collection (University of Agriculture, Kraków). Apical meristems excised from the adventitious bulbs were used as explants. The isolated apices were transferred onto the MS solid media containing 3% sucrose, picloram (25 or 50  $\mu\text{M}$ ) and BAP (0.5, 5 or 10  $\mu\text{M}$ ). A total of 6 combinations of media were used. The cultures were maintained in the dark at 20°C for 16 weeks. During the first weeks of cultivation the explants had a swollen appearance and enlarged their diameter nearly five times. Ten weeks after initiation of the experiment, some of the apices started forming of bulb scales (directly or via callus tissue) and some started callusing without any signs of recovery. In the present investigation 100% direct regeneration (bulb forming) was obtained under the influence of media containing 25  $\mu\text{M}$  picloram and 5  $\mu\text{M}$  BAP. Decreasing BAP to 0.25  $\mu\text{M}$ , with the same content of picloram, resulted significantly lower direct regeneration, amounting 69% and 15% regeneration via callus tissue. Significantly lower direct recovery (73.8%) was observed also under influence of 50  $\mu\text{M}$  picloram applying together with 0.5  $\mu\text{M}$  BAP. The remaining media combinations achieved 93–96% of direct forming of bulbs.



## Mikrorozmnażanie *Lilium martagon* z wykorzystaniem kultur płynnych

K. NOWAK, A. KAPCZYŃSKA, B. PAWŁOWSKA

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: krzysztof.nowak@urk.edu.pl

Lilia złotogłów (*Lilium martagon* L.), obj ta w Polsce całkowit ochron gatunkow , jest znana i wykorzystywana od bardzo dawna do celów dekoracyjnych, w medycynie ludowej i weterynarii. Pomimo niew tliwych walorów dekoracyjnych oraz przystosowania do warunków klimatycznych naszego kraju nie jest ro lin oferowan w handlu. Tradycyjne sposoby rozmna ania, tj. wysiew nasion czy uzyskiwanie cebul przybyszowych z sadzonek łuskowych wymagaj kilku lat uprawy. Techniki in vitro oferuj szybki i wydajni metod rozmna ania zapewniaj c jednocześnie nie wysoki i powtarzalni cech uzyskanego materiału ro linowego. W przeprowadzonych do wiadzeniach badano wpływ po ywki płynnej na formowanie cebul przybyszowych. Organogenez przybyszow prowadzono na fragmentach łusek cebulowych pobieranych z in vitro, w 16 po ywkach płynnych ró ni cych si zawarto ci sacharozy (3 lub 6%), składników mineralnych (50 lub 100% MS) oraz regulatorów wzrostu (0-0,54  $\mu$ M NAA, 0-5  $\mu$ M BA). Namna anie prowadzono w ciemno ci, na wytrzsarce, w temperaturze 20°C, przez 16 tygodni, przy czym co 2 tygodnie wymieniano po ywk . Najwi ksz liczb cebul przybyszowych (48 sztuk z eksplantatu) uzyskano w po ywce zawieraj cej 50% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu oraz w po ywce 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54  $\mu$ M NAA (41 sztuk). Po ywka zawieraj ca 6% sacharozy ograniczała formowanie cebul przybyszowych. Najwi cej korzeni zanotowano w po ywce 100% MS, 3% sacharozy bez regulatorów wzrostu, a dodatek do po ywki cytokiny BA hamował ich formowanie.

## Micropropagation of *Lilium martagon* using liquid cultures

Turk's-cap lily (*Lilium martagon* L.) protected species in Poland, has been known and used as ornamental plant for a very long time, in folk and veterinary medicine. Despite its undoubted decorative values and adaptation to the climatic conditions of our country, it is not offered commercially. Conventional methods of propagation, i.e. sowing seeds or obtaining adventitious bulbs from scale cuttings, require several years of cultivation. In vitro techniques offer a quick and efficient method of reproduction high quality and homogenous plant material. In this study adventitious bulbs formation on bulb scales was tested in liquid medium. Bulb scales, derived from in vitro, were cultured in 16 liquid mediums supplemented with different concentration MS salts (50 or 100% MS), 3 or 6% sucrose and growth regulators (0-0.54  $\mu$ M NAA, 0-5  $\mu$ M BA), in 16 weekly cycles, with replacement of the media every 2 weeks, the cultures were incubated at 20°C in darkness. The greatest number of bulbs (48 per the explant) was obtained in 50% MS liquid medium, with 3% sucrose, without growth regulators and 100% MS, 3% sucrose supplemented with 0.54  $\mu$ M NAA (41 per the explant). The medium containing 6% sucrose limited regeneration of adventitious bulbs. The best root formations were obtained in medium containing 100% MS salts, 3% sucrose without plant growth regulators. Addition of BA inhibited root formation.





## Organogeneza przybyszowa *Lilium candidum* L. na pożywce cytokininowej pod wpływem światła LED

P. PAŁKA, B. PAWŁOWSKA

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: piotr.palka@urk.edu.pl

Lilia biała (*Lilium candidum* L.) to geofit cebulowy występujący naturalnie na obszarze śródziemnomorskim. Ma duże znaczenie ozdobne ze względu na czyste białe kwiaty o silnym i przyjemnym zapachu oraz wczesne kwitnienie. Znalazł zastosowanie w medycynie ze względu na obecność związków biologicznie czynnych. Do założenia do wiadczenia wykorzystano łuski cebulowe. Kulturę prowadzono na pożywce według Murashige i Skoog zestawionej agarem, z dodatkiem roślinnych regulatorów wzrostu:  $5 \mu\text{M}$  BAP i  $0,5 \mu\text{M}$  NAA. Zbadano wpływ różnych składów spektralnych LED: 100% niebieskie (B); 100% czerwone (R); mieszanin 70% czerwonego i 30% niebieskiego (RB); mieszanin 50% RB i 50% dalekiej czerwieni (RBfR), fioletowego (RBY), ultrafioletowego (RBUV) i zielonego (RBG); 100% białe (WLED). światło lampy fluorescencyjnej (FL) i ciemno (D) wykorzystano jako kontrole. Po 8 tygodniach kultury we wszystkich badanych kombinacjach zaobserwowano formowanie cebul przybyszowych, i korzeni. Cebule były otwarte i zbudowane z pogrubiałych łusek. Współczynnik regeneracji cebul w wiadczeniach badanych kombinacji wynosił 100%. Niektóre cebule rozwijały liście (4–19% eksplantatów), nie zaobserwowano tego w kombinacjach D, FL i R. Liczba uzyskanych cebul promowana była przez światło lampy fluorescencyjnej (35,2 z pojedynczej cebuli wyjściowej) i niebieskie światło LED (35). Największe cebule uzyskały one w kombinacjach R, RB, RBY i RBG (2,8–2,87 mm). Najwięcej korzeni regenerowało pod wpływem dodatku światła UV do spektrum RB (5), i były one najkrótsze (3,42 mm). Najdłuższe korzenie uzyskano pod niebieskim światłem LED (7 mm).

## Adventitious organogenesis of *Lilium candidum* L. on cytokinin medium under the influence of LED light

Madonna lily (*Lilium candidum* L.) is a bulbous geophyte that occurs naturally in the Mediterranean area. It is of great ornamental importance due to its pure white flowers with a strong and pleasant scent and early flowering. It is used in medicine due to the presence of biologically active compounds. Bulb scales were used to set up the experiment. The culture was performed on the medium according to Murashige and Skoog, solidified with agar, with the addition of plant growth regulators: 5  $\mu$ M BAP and 0.5  $\mu$ M NAA. The influence of 8 different LED spectral compositions was tested: 100% blue (B); 100% red (R); a mixture of 70% red and 30% blue (RB); a mixture of 50% RB and 50% far red (RBfR), yellow (RBY), ultraviolet (RBUV) and green (RBG); 100% white (WLED). Fluorescent lamp light (FL) and darkness (D) were used as controls. After 8 weeks of culture, the formation of adventitious bulbs and roots was observed in all tested combinations. The bulblets were open and made of thickened scales. Bulblet regeneration coefficient in most of the tested combinations was 100%. Some bulblets developed leaves (4–19% of explants), this was not observed in combinations D, FL and R. The number of bulblets obtained was promoted by the light of a fluorescent lamp (35.2 from a single starting bulb) and blue LED light (35). They had the largest diameter in the R, RB, RBY and RBG combinations (2.8–2.87 mm). The greatest number of roots regenerated under the influence of the addition of UV light to the RB spectrum (5), and they were the shortest (3.42 mm). The longest roots were obtained under blue LED light (7 mm).



## Ukorzeniecie pędów *Pennisetum* ‘Vertigo®’ w kulturach in vitro w różnych warunkach świetlnych

B. PROKOPIUK, A. KAPCZYŃSKA, B. PAWŁOWSKA

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: barbara.prokopiuk@urk.edu.pl

Badano wpływ różnej jako ci światła na ukorzeniecie ozdobnej trawy *Pennisetum* ‘Vertigo®’ w warunkach in vitro. Ukorzeniecie 3-4 pędowe eksplantaty na pożywkę MS z  $1 \mu\text{M}$  IAA,  $30 \text{ g dm}^{-3}$  sacharozy oraz  $5 \text{ g dm}^{-3}$  BioAgar (pH 5,7). Kontrolę stanowiła pożywka MS bez regulatorów. Zastosowano siedem różnych jako ci światła LED: 100% niebieskie (B), 100% czerwone (R), kombinację czerwonego i niebieskiego (RB) (70%/30%) oraz czerwonego, niebieskiego z żółtym (RBY) (35%/15%/50%), czerwonego, niebieskiego z zielonym (RBG) (35%/15%/50%) oraz światło białe (WLED). Lampa fluorescencyjna (FL) została użyta jako kontrola. Jako światła wpłynęła na współczynnik ukorzeniecia, liczbę uformowanych korzeni przybyszowych oraz ich masę. Najslabiej ukorzeniały się przede wszystkim na świetle niebieskim (B) (43% ukorzeniecnych), na pozostałych światłach współczynnik ukorzeniecia wynosił 80-98%. Na świetle niebieskim (B) uzyskano również korzenie o najmniejszej masie. Najwięcej korzeni formowało się w warunkach WLED, na pożywkę bez regulatorów wzrostu uzyskano 9,3 szt./eksplantat, na pożywkę z IAA 9,7 szt./eksplantat. Na światłach RB oraz FL obserwowano od 5, 1-6, 7 korzenia/eksplantat. Najslabiej formowały się korzenie na świetle niebieskim (B) oraz czerwonym (R) (1,3-2,5 szt./eksplantat). Nie wykazano wpływu IAA na badane cechy, z wyjątkiem długości korzeni, gdzie auksyna hamowała ich wydłużenie. Najwięcej korzeni formowało się pod światłem WLED na pożywkę kontrolnej oraz zawierającej auksynę. Na takim samym poziomie formowały się korzenie pod światłem fluorescencyjnym na pożywkę z auksyną. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wyeliminowania auksyny z pożywki ukorzeniacej, pod warunkiem prowadzenia tego procesu przy zastosowaniu światła WLED.

## Rooting of in vitro-cultured *Pennisetum* 'Vertigo®' shoots under various light conditions

The effect of various light conditions on in vitro rooting of the ornamental grass *Pennisetum* 'Vertigo®' was investigated. 3-4 shoot explants were rooted on MS medium with 1  $\mu$ M IAA, 30 g dm<sup>-3</sup> sucrose and 5 g dm<sup>-3</sup> BioAgar (pH 5.7). The control was MS medium without regulators. Seven different LED light conditions were used: 100% blue (B), 100% red (R), a combination of red and blue (RB) (70%/30%) and red, blue and yellow (RBY) (35%/15%/50%), red, blue with green (RBG) (35%/15%/50%) and white light (WLED). A fluorescent lamp (FL) was used as a control. The quality of light influenced the rooting rate, the number of adventitious roots formed and their weight. The shoots rooted the least under blue light (B) (43% rooted), while under other lights the rooting rate ranged from 80-98%. Roots with the lowest weight were also obtained under blue (B) light. The greatest number of roots were formed under WLED conditions; on the medium without growth regulators, 9.3 roots and on the medium with IAA, 9.7 roots per explant were obtained. Under the RB and FL lights, 5.1-6.7 roots/explant were observed. Roots were formed the weakest under blue (B) and red (R) light (1.3-2.5 pcs./explant). There was no effect of IAA on the examined features, except for the length of roots, where auxin inhibited their elongation. The greatest number of roots were formed under WLED light on the control medium and the medium containing auxin. Roots were formed at the same level under fluorescent light on medium with auxin. The obtained results indicate the possibility of eliminating auxin from the rooting medium, provided that this process is carried out using WLED light.



## Zastosowanie karrikininy w mikrorozmnażaniu narcyza (*Narcissus* L.)

D. SOCHACKI, P. MARCINIAK, K. KORYTKOWSKI

Samodzielny Zakład Roślin Ozdobnych,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie;  
e-mail: [dariusz\\_sochacki@sggw.edu.pl](mailto:dariusz_sochacki@sggw.edu.pl)

Narcyz (*Narcissus* L.) to jeden z najpopularniejszych wiosennych gatunków cebulowych. Znajduje powszechne zastosowanie w ogrodach, terenach zieleni miejskiej, ale także w uprawie w domu jako roślina doniczkowa. Jego naturalnie niski i łagodny współczynnik namnaiania skutkuje ograniczoną podażą cebul na rynku oraz ich relatywnie wysokimi cenami. Intensyfikacja procesu rozmnażania może nastąpić u narcyza sposobami ogrodniczymi (poprzez segmentację cebul oraz sadzonki dwułuskowe), ale także poprzez rozmnażanie metodami *in vitro*. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu stosunkowo nowych i mało jeszcze poznanych regulatorów wzrostu jakim są: *meta*-Topolina (mT) i karrikinina 1 (KAR<sub>1</sub>) na namnażanie pędów narcyza metodami *in vitro*. Materiał do wiadczenia stanowiły ustabilizowane kultury *in vitro* narcyza (klon hodowlany 10/97) na etapie namnażania pędów na pożywkach wg Murashige i Skoog (MS), zestalonych agarowo. W do wiadczenia zastosowano pożywki MS: bez regulatorów wzrostu oraz z dodatkiem BA i NAA standardowo stosowanych do namnażania pędów jako pożywki kontrolne, do których odnoszono obserwacje kultur na pożywkach z mT w porównaniu z NAA oraz KAR<sub>1</sub> w dwóch stężeniach. Po każdym z czterech pasów dokonywano oceny wpływu regulatorów wzrostu na namnożenie pędów i cebul narcyza oraz wpływu regulatorów wzrostu na zawartość barwników fotosyntetycznych na koniec eksperymentu. Uzyskane wyniki wskazują, że mT może być stosowana jako zamiennik BA na etapie namnażania pędów narcyza *in vitro*, bo daje takie same lub lepsze wyniki przyrostu masy liści i cebul oraz nie niszczy lub wywołuje niekorzystne współczynniki namnażania pędów. KAR<sub>1</sub> nie wpłynęła na zwiększenie przyrostu masy liści i cebul narcyza *in vitro*, ani

na zwiększenie wydajności namnażania pędów narcyza *in vitro* oraz nie wpłynęła pozytywnie na tworzenie korzeni przybyszowych. KAR<sub>1</sub> w stężeniu 10<sup>-7</sup> M wpłynęła na zwiększenie zawartości chlorofilu a, b oraz a+b, a KAR<sub>1</sub> w stężeniu 10<sup>-9</sup> M na zwiększenie zawartości obu chlorofilów łącznie. KAR<sub>1</sub> w stężeniu 10<sup>-7</sup> M wpływała na zwiększenie zawartości karotenoidów w porównaniu do KAR<sub>1</sub> w stężeniu 10<sup>-9</sup> M. Podsumowując należy stwierdzić, że możliwość stosowania KAR<sub>1</sub> w mikrorozmnażaniu narcyza wymaga dalszych badań.

## The use of karrikin in the micropropagation of narcissus (*Narcissus* L.)

*Narcissus* (*Narcissus* L.) is one of the most popular spring bulbous species. It finds widespread use in gardens, urban green spaces, but also in forcing for cut flowers and as a pot plant. Its naturally low multiplication rate results in a limited supply of bulbs on the market and their relatively high price. Intensification of the propagation process can be achieved in narcissus by horticultural means (through bulb segmentation and twin-scaling), but also by *in vitro* propagation. The aim of this study was to investigate the effect of the relatively new and not yet well-known growth regulators *meta*-Topolin (mT) and Karrikin 1 (KAR<sub>1</sub>) on *in vitro* propagation of narcissus shoots. The experimental material consisted of stabilised *in vitro* cultures of narcissus (breeding clone 10/97) at the shoot multiplication stage on media according to Murashige and Skoog (MS), solidified with agar. MS media were used in the experiment: without growth regulators and with the addition of BA and NAA standardly used for shoot multiplication as control media, to which observations of cultures on media with mT in combination with NAA and KAR<sub>1</sub> at two concentrations were related. After each of the four passages, the effect of growth regulators on the multiplication of narcissus shoots and bulbs and the effect of growth regulators on photosynthetic pigment content at the end of the experiment were evaluated. The results indicate that mT can be used as a substitute for BA at the *in vitro* shoot multiplication stage of narcissus, because it gives the same or better results in leaf and bulb weight gain and no lower or higher shoot multiplication rates. KAR<sub>1</sub> did not increase *in vitro* narcissus leaf and bulb weight gain or *in vitro* narcissus shoot multiplication rates and did not positively affect adventitious root formation. KAR<sub>1</sub> at 10<sup>-7</sup> M increased chlorophyll a, b and a+b, and KAR<sub>1</sub> at 10<sup>-9</sup> M increased both chlorophylls combined. KAR<sub>1</sub> at a concentration of 10<sup>-7</sup> M had an effect on increasing carotenoid content compared to KAR<sub>1</sub> at a concentration of 10<sup>-9</sup> M. In conclusion, the potential of KAR<sub>1</sub> for use in narcissus micropropagation requires further research.



## Indukcja kalusa oraz regeneracja roślin wierzby purpurowej (*Salix purpurea* L.) w warunkach in vitro

P. SULIMA, O. SULOT, J.A. PRZYBOROWSKI

Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;  
e-mail: pawel.sulima@uwm.edu.pl

Aktualnie obserwuje się coraz większe zainteresowanie roślinami wierzby purpurowej (*Salix purpurea* L.), co głównie związane jest z różnorodnym ich wykorzystaniem m.in. w przemyśle farmaceutycznym, energetycznym, plecionkarskim i szeroko pojętej ochronie środowiska. Dodatkowo niektórzy naukowcy traktują *S. purpurea* jako gatunek modelowy w badaniach molekularnych roślin drzewiastych z uwagi na dostępną sekwencjonowanego i w miarę małego genomu oraz rozprzestrzenienie się roślin, podobnie jak to jest w przypadku drzew liściastych, na duże odległości. Pomimo licznych badań charakteryzujących ten cenny gatunek w dalszym ciągu w literaturze naukowej brakuje komplementarnych prac z zakresu wykorzystania kultur in vitro wierzby purpurowej. Roślinne kultury in vitro odgrywają ważną rolę w badaniach podstawowych, znajdują liczne zastosowania praktyczne i produkcyjne, a także są wysoce użyteczne w procesie hodowli nowych odmian, w tym również jako integralna część transgenezy roślin w modyfikacjach genetycznych roślin. Celem niniejszej pracy było opracowanie warunków kultury in vitro do indukcji kalusa oraz ocena możliwości namnażania kalusa, a także regeneracji roślin wierzby purpurowej z różnych rodzajów eksplantatów. Materiał roślinny stanowiły różne eksplantaty pozyskane z liści, pędów, korzeni, kwiatostanów młodych i dojrzałych, pylników oraz zalążni roślin *S. purpurea*. Kultury in vitro poszczególnych eksplantatów prowadzono na dwóch rodzajach podłoży (MS oraz WPM), oceniając wpływ pH, światła oraz dodatku do podłoża różnych kombinacji regulatorów wzrostu na tworzenie się tkanki kalusowej oraz możliwości regeneracji roślin. Bardzo dobre warunki do inicjacji i namnażania tkanki kalusowej uzyskano w przypadku kultury pylników oraz kultury

mi dzyw li, które prowadzone były na po ywce WPM z dodatkiem 2,5 mg l<sup>-1</sup> NAA i 0,2 mg l<sup>-1</sup> BAP. Zaobserwowano również regenerację korzeniów oraz pojedyncze przypadki regeneracji p dowej. Regeneracja ro lin *S. purpurea* była najskuteczniejsza w przypadku zastosowania kultury fragmentów kwiatostanów m skich na po ywce WPM z dodatkiem 2,5 mg l<sup>-1</sup> NAA i 1 mg l<sup>-1</sup> BAP oraz fotoperiodu 16 8

## Callus induction and plant regeneration in purple willow (*Salix purpurea* L.) in vitro cultures

Currently, we observe increasing interest in purple willow plants (*Salix purpurea* L.), which is mainly related to their various uses e.g. in the pharmaceutical and energy industry, basketry and environmental protection. Additionally, some scientists treat *S. purpurea* as a model species in molecular studies of woody plants due to the availability of a sequenced and relatively small genome, and the long distance spread of plants similarly to forest trees. Despite numerous studies characterizing this valuable species, there is still no complementary works in the scientific literature on the *S. purpurea* in vitro cultures. Plant in vitro cultures play an important role in basic research, practical applications, plant breeding including as an integral part of transgenesis in plant genetic modifications. The aim of this study was to develop in vitro culture conditions for callus induction and to assess the possibility of callus multiplication and regeneration of purple willow plants from various types of explants. The plant material consisted of various explants obtained from leaves, shoots, roots, inflorescences, anthers and ovaries. In vitro cultures were performed on two types of media (MS and WPM), assessing the impact of light, pH and various combinations of growth regulators on the formation of callus tissue and the possibility of plant regeneration. Very good conditions for initiation and callus tissue multiplication were obtained in the case of anther culture and internode culture, which were carried out on WPM medium with the addition of 2.5 mg l<sup>-1</sup> NAA and 0.2 mg l<sup>-1</sup> BAP. Root regeneration and single cases of shoot regeneration were also observed. The regeneration of *S. purpurea* plants was most effective when the culture of male inflorescence fragments was used on WPM medium with the addition of 2.5 mg l<sup>-1</sup> NAA and 1 mg l<sup>-1</sup> BAP and 16 8 photoperiod.





## Ocena zdolności regeneracyjnej in vitro aloesu sokotrzańskiego (*Aloe succotrina* Lam.)

B. PROKOPIUK, B. SZEWCZYK-TARANEK, J. POLISZUK

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: bozena.szewczyk-taranek@urk.edu.pl

Aloes sokotrzański (*Aloe succotrina* Lam.) jest zagrożonym gatunkiem i jednocześnie leczniczo rośliną o potencjalnych właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. Gatunek ten nie był dotychczas rozmnażany w kulturach in vitro, dlatego celem naszych badań było dopracowanie optymalnych warunków namnażania drogą inicjacji poków przybyszowych. Kultury in vitro *Aloe succotrina* zapoczątkowano z wierzchołkowych poków roślin matecznych uprawianych w szklarni i kulturowano na pożywce stałej MS z dodatkiem 1  $\mu\text{M}$  BA i 0,1  $\mu\text{M}$  NAA, z 30 g  $\cdot$  dm<sup>-3</sup> sacharozy, pH 5,7. Liście aloesu uzyskane in vitro posłużyły jako eksplantaty w doświadczeniu nad inicjacją poków przybyszowych. Liście przecięto wzdłuż i na długość 2 cm, a następnie umieszczono na pożywce MS wzbogaconej w kombinacje regulatorów wzrostu (PGR): 1–5  $\mu\text{M}$  BA i 0,1–0,5  $\mu\text{M}$  NAA lub 1–2,5  $\mu\text{M}$  Thidiazuronu. Kultury prowadzono w świetle furoscencyjnym, z PFD 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotoperiod 16-godz. oraz w ciemności. Po 6-tygodniowym cyklu 52% eksplantatów uprawianych z dostaniem światła utworzyło pokody przybyszowe, natomiast w ciemności 18%, niezależnie od pożywki. Najwyższy współczynnik regeneracji eksplantatów zaobserwowano na pożywce z 2,5  $\mu\text{M}$  BA i 0,25  $\mu\text{M}$  NAA na świetle (0,65), a także w tej kombinacji uzyskano najwyższe pokody przybyszowych (10,4). Pożywka MS z 2,5  $\mu\text{M}$  BA i 0,25  $\mu\text{M}$  NAA może polecić jako odpowiednią do namnażania *Aloe succotrina* w kulturach in vitro.

## Assessment of the in vitro regenerative potential of *Aloe succotrina* Lam.

*Aloe succotrina* Lam. is an endangered species and medicinal herb with potential antibacterial and antifungal properties. This species has not been propagated in in vitro cultures so far. Therefore, our goal was to evaluate the optimal conditions for multiplication through adventitious buds. In vitro cultures of *A. succotrina* were initiated from apical buds of greenhouse aloes and cultivated on MS solid medium with 1  $\mu$ MBA and 0.1  $\mu$ MNAA, with 30 g  $\cdot$  dm<sup>-3</sup> sucrose at pH 5.7. Aloe leaves obtained in vitro served as explants for an experiment on adventitious shoot formation. Leaves were cut lengthwise and trimmed to 2 cm, then placed on MS medium supplemented with combinations of plant growth regulators (PGR): 1–5  $\mu$ MBA and 0.1–0.5  $\mu$ M NAA, or 1–2.5  $\mu$ M Thidiazuron. The cultures were kept under fluorescent light, PPFD of 35  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> on a 16-hour photoperiod, and in the dark. After a 6-week cycle, 52% of explants formed adventitious shoots in light conditions, and 18% in the dark regardless of the PGR in the medium. The regeneration rate of explants on the medium with 2.5  $\mu$ MBA and 0.25  $\mu$ MNAA in light was the highest (0.65), as well as the number of adventitious shoots (10.4), and this media can be recommended for wider propagation of *A. succotrina* in vitro.



## Wpływ cytokinin na namnażanie pędów *Salvia candelabrum* Boiss.

J. SZYMAŃSKA<sup>1</sup>, E. SKAŁA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Studenckie Koło Naukowe Botaniki Farmaceutycznej przy Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

<sup>2</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;  
e-mail: ewa.skala@umed.lodz.pl

*Salvia candelabrum* (*candelabra spanish sage*) (Lamiaceae) jest gatunkiem występującym w stanie naturalnym w południowej Hiszpanii. W medycynie tradycyjnej gatunek ten stosowany jest jako rodek przeciwgorączkowy. Ponadto wykazuje właściwości m.in. antyseptyczne i przeciwutleniające. W nadziemnych częściach *S. candelabrum* zidentyfikowano diterpeny – pochodne abietanu (kandelabron, kandesalwochinon), kwasy fenolowe (kwas rozmarynowy, kwas kawowy), flawonoidy (apigenina, luteolina, genkwanina) i wyizolowano z nich olejek eteryczny z dominującymi 1,8-cyneolem, kamfor,  $\alpha$ -pinenem i  $\beta$ -pinenem. Celem pracy było opracowanie procedury namnażania tego gatunku szalwii w kulturze in vitro. Zbadano wpływ różnych cytokinin, pochodnych puryn (6-benzylaminopuryna, BAP; rybozyd BAP; meta-topolina, m-Top; N-benzyl-9-(2-tetrahydropiranylo)-adenina, BPA) i 4-CPPU. Jako eksplantaty zastosowano wierzchołkowe części pędu oraz fragment pędu obejmujący pojedynczy węzeł, które hodowano na agarowym (0,7%) podłożu Murashige i Skoog'a uzupełnionym kwasem indolilo-3-octowym (0,1 mg/L) oraz jedną z cytokinin w stężeniu 0,5, 1 lub 2 mg/L. Kultury prowadzono w fototronie (16h/8h światło/ciemno) przy oświetleniu lampami fluorescencyjnymi. Po 35 dniach hodowli określono m.in. współczynnik namnażania (tj. średni liczbę pędów na eksplantat), średni długość pędów (cm), proporcje pędów do pędów oraz procent szklistych struktur. Zaobserwowano, że rodzaj cytokiny, jej stężenie, jak i rodzaj eksplantatu wpływały na proliferację i morfologię pędów szalwii. Z jednego eksplantatu po 35 dniach hodowli można było uzyskać 1,4–4,3

nowych struktur. Zaobserwowano, że współczynnik namnaiania pędów wzrastał wraz ze wzrostem stężenia cytokininy, niezależnie od zastosowanego eksplantatu. Najwyższą jego wartość osiągnięto po zastosowaniu BAP (2 mg/L) i szczytowych części pędu. Z drugiej strony, wyższe stężenia cytokinin wpływały negatywnie na morfologię namnoonych struktur, tj. hamowały wydłużanie pędów oraz nasilały zjawisko szklistości. Najdłuższe pędy (długości 3 cm) zaobserwowano po zastosowaniu BPA (0,5 mg/L). Pędy otrzymane z eksplantatów w złowych były krótsze o 1 cm. Po zastosowaniu cytokinin w stężeniu 2 mg/L, 13,6-34,6% namnoonych struktur wykazywało szklistość.

## The effect of cytokinin on *Salvia candelabrum* Boiss. shoot propagation

*Salvia candelabrum* (candelabra Spanish sage) (Lamiaceae) is a plant species found in southern Spain. In traditional medicine, this species is used as an antipyretic. *S. candelabrum* also shows antiseptic and antioxidant activities. In the aerial parts were identified diterpenes – abietane derivatives (candelabrone, candelalvoquinone), phenolic acids (rosmarinic acid, caffeic acid), flavonoids (apigenin, luteolin, genkwanin), and an essential oil was isolated with dominated 1,8-cineole, camphor,  $\alpha$ -pinene, and  $\beta$ -pinene. The work aimed to develop a procedure for sage shoot multiplication. The effects of various cytokinins, purine derivatives (6-benzylaminopurine, BAP; BAP riboside; meta-topolin, m-Top; N-benzyl-9-(2-tetrahydropyryl)-adenine, BPA) and 4-CPMU were investigated. As the explants were used the shoot tips and a single node. The explants were cultured on an agar (0.7%) Murashige and Skoog medium supplemented with indole-3-acetic acid (0.1 mg/L) and one of the cytokinin at a concentration of 0.5, 1, and 2 mg/L under fluorescent lamps, and 16/8-hour light/dark photoperiod. The multiplication rate (average number of buds and shoots per explant), shoot length (cm), bud-to-shoot ratio, and percentage of hyperhydricity structures were determined after 35 days. It was observed that the type of cytokinin, its concentration, and the type of explant influenced the proliferation and morphology of shoots. After 35 days, 1.4-4.3 new structures could be obtained from one explant. The shoot multiplication rate increased with higher cytokinin concentration regardless of the explant type. The highest value was achieved on medium supplemented with BAP (2 mg/L). On the other hand, higher concentrations of cytokinin harmed the morphology of the multiplied structures; inhibited the shoot elongation and intensified the hyperhydricity. The longest shoots (3 cm long) were observed on BPA (0.5 mg/L). Shoots obtained from nodal explants were 1 cm shorter. 13.6-34.6% of the multiplied structures showed hyperhydricity at a cytokinin concentration of 2 mg/L.



## Wpływ inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na wzrost potencjału regeneracyjnego w kulturach protoplastów czosnku i cebuli

K. SZYMONIK, K. STELMACH-WITYK, E. GRZEBELUS

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: kamil1713sz@gmail.com

Niekorzystnie ukierunkowane modyfikacje epigenetyczne i niewłaściwa aktywacja ekspresji genów może negatywnie wpłynąć na rozwój kultur protoplastów. Jednakże procesy odpowiedzialne za modyfikacje epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i acetylacja histonów, są odwracalne i okazują się obiecującym obszarem badań w zakresie przełamывania latencji podziałowej komórek. Opracowanie skutecznej metody regeneracji protoplastów gatunków z rodzaju *Allium* może stanowić ważne narzędzie w hodowli tych roślin, zwłaszcza czosnku, którego dostępne na rynku odmiany uprawne rozmnażają się wyłącznie wegetatywnie. Celem badania była ocena wpływu inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na zdolność regeneracyjną protoplastów czosnku i cebuli, do czego wykorzystano dwa związki chemiczne: vorinostat (SAHA) oraz azacytydyn (AZA). Materiał wyjściowy do izolacji protoplastów stanowił embriogenny kalus czosnku i cebuli. Uwolnione po 14–16 godzinach inkubacji w mieszaninie maceracyjnej, pozbawione ściany komórki charakteryzowały się wysoką (70–92%) żywotnością. Wzrost i oddechy od obiektu i testowanej mieszaniny maceracyjnej wydają się izolacji miały miejsce w zakresie  $0,5\text{--}2,3 \times 10^6$  komórek na gram suchej masy. Użyte wymienione inhibitory wpływały na żywotność kultury, a obserwowane efekty były zależne od badanego obiektu *Allium* i zastosowanego związku. Dziesięć dni od izolacji zaobserwowano pierwsze, pozytywne symptomy, charakterystyczne dla rozwijających się kultur protoplastów, tj. reorganizację cytoplazmy, zwiększenie objętości oraz zmian kształtu komórek. Po około trzydziestu dniach od rozpoczęcia kultury obserwowano formowanie się agregatów komórkowych, które po około dziesięciu dniach rozwinęły się

w niewielkie grudki kalusa, przerastające krople agarozowe. W kulturach, gdzie zastosowane zostały SAHA i AZA zdecydowanie częściej obserwowano rozwój kalusa, który po przeniesieniu na pożywkę stał formował masę proembryogenną, z której rozwijały się zarodki somatyczne konwertujące wrośliny.

## Effect of inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation on the regenerative ability in garlic and onion protoplast cultures

Epigenetic silencing and inappropriate activation of gene expression can negatively affect the development of plant protoplast cultures. However, the processes responsible for epigenetic silencing, such as DNA/histone methylation and histone acetylation, are reversible and have emerged as promising targets for studies related to breaking cell division latency. The development of an efficient method for the plant regeneration from protoplasts of the *Allium* genus is crucial in plant breeding, especially for crops like garlic, whose commercially available cultivated varieties reproduce only vegetatively. The aim of this study was to evaluate the effect of DNA methylation and histone deacetylation inhibitors on the regenerative ability of garlic and onion protoplasts. For this purpose, callus-derived protoplasts were treated with either vorinostat (SAHA) or azacitidine (AZA). Spherical protoplasts were released from garlic and onion embryogenic calli after 14–16 h of incubation in the maceration mixture. The yield of protoplasts ranged from 0.5 to  $2.3 \times 10^6$  per gram of fresh tissue, depending on the accession and tested maceration mixture. The quality of the released protoplasts was determined using FDA staining, and 70–92% of protoplasts emitted green fluorescence and were considered as viable. SAHA and AZA treatments affected protoplast viability. The survival rate was genotype- and compound-dependent. Ten days after isolation, the protoplasts began to change. Observed changes included positive symptoms characteristic of properly developing protoplast cultures. Among them, cell wall reconstruction, reorganization of cytoplasm, increase in cell volume, and changes in cell shape were the most prominent. Approximately 30 days after isolation, the protoplast-derived cell colonies formed, and after about 90 days, they developed into microcalli, overgrowing agarose droplets. AZA and SAHA had a positive effect on callus formation frequency. Transferred to solid medium callus proliferate and formed a proembryogenic mass which then formed somatic embryos converting into plants after approximately ten weeks.



## Ukorzenie pędów in vitro lędźwianu siewnego (*Lathyrus sativus* L.) w różnych podłożach

B. TOKARZ, K.M. TOKARZ, W. MAKOWSKI, K. MRZYGLÓD, S. GAŁĘZOWSKA

Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: barbara.tokarz@urk.edu.pl

Lędźwian siewny (*Lathyrus sativus* L.) jest mało znaną rośliną uprawną, zaliczaną do grubonasiennych roślin strączkowych, które od dawna są uważane za oporne w kulturach tkankowych. Jednym z trudniejszych etapów regeneracji kompletnych roślin jest uzyskanie na zregenerowanych podłożach prawidłowo uformowanych i funkcjonujących korzeni przybyszowych. Rozwój nowych korzeni odgrywa istotną rolę, zarówno przed, jak i po redni, w późniejszym rozwoju roślin. Opracowanie niezawodnych i efektywnych protokołów ukorzenia jest niezbędnym warunkiem, aby hodowcy i genetycy skutecznie mogli wykorzystywać mikrorozmnażanie roślin. Tradycyjne badania nad ukorzeniem in vitro skupiają się na zastosowaniu regulatorów wzrostu i rozwoju, zwłaszcza auksyn, w celu indukcji i rozwoju korzeni. Jednakże, badania wykazały, że niedotlenienie po wywki jest krytycznym czynnikiem ograniczającym ukorzenie in vitro, dlatego te stopnie zestalenia po wywki lub rodzaj podłoża i jego związków mogą decydować o powodzeniu ukorzenia. Celem prowadzonych badań było sprawdzenie efektywności ukorzenia pędów lędźwianu siewnego regenerowanych w warunkach in vitro, przy zastosowaniu podłoży o różnych właściwościach fizykochemicznych. Prezentowane do wiadomości miało także zweryfikować hipotezę, czy aktywność enzymu peroksydazy może być predykatorem wydajności ukorzenia w przypadku badanego gatunku. Regenerowane pędy lędźwianu siewnego odm. Derek, układano na po wywki zestalone agarosem, Phytigel'em lub do podłoża (perlitu, mieszanki perlitu z torfem) zalanych płynem po wywki. Po wywki zawierały dodatek IBA w stężeniu 0, 0,25 lub 0,5 mg/l. Oceniano efektywność ukorzenia obliczając: procent ukorzonych pędów, średnią liczbę korzeni na pęd oraz średnią długość korzeni. Na podstawie uzyskanych wyników



wytypowano najlepszy i najslabszy wariant warunków ukorzenia (podłoże plus pożywka). Wpędach, ukorzeniach na wybranych wariantach, oceniano aktywność peroksydazy w kolejnych dniach kultury. Najwięcej pędów ukorzeniło się w podłożu perlitu z torfem zalany płynną pożywką z dodatkiem 0,5 mg/l IBA, a najmniej w pożywce zestalonej Phytigel'em zawierającej 0,25 mg/l IBA. Pędów ukorzenie w mieszance perlitu z torfem charakteryzowały się wyszą aktywnością peroksydazy niż pędów z pożywki zestalonej Phytigel'em. Badania wykazały, że lepsze lub gorsze napowietrzenie podłoża (wynikające z jego właściwości fizycznych) warunkuje ukorzenie pędów *in vitro* i dławianu siewnego w większym stopniu niż skład pożywki ukorzeniającej. Przebieg aktywności peroksydazy w podstawie wyłożonych do ukorzenia pędów i dławianu siewnego może być wykorzystywany jako wskaźnik przyszłego ukorzenia.

### Rooting of *in vitro* grass pea (*Lathyrus sativus* L.) shoots in different substrates

Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is a poorly known crop, classified as a large-seeded legume that is considered recalcitrant in tissue culture. One of the more challenging aspects of the complete plant regeneration is obtaining properly formed and functioning adventitious roots on the regenerated shoots. The formation of new roots has a major role in subsequent plant development. The establishment of reliable and efficient rooting protocols is a prerequisite to effective use of plant micropropagation by breeders and geneticists. Traditional *in vitro* rooting research has focused on the use of growth regulators, especially auxins, for root induction and growth. However, studies have shown that medium hypoxia is a critical limiting factor for *in vitro* rooting, so the degree of medium solidification or the type of substrate and its compactness can determine rooting success. The aim of the present study was to verify the rooting efficiency of grass pea shoots regenerated *in vitro*, using media with different physico-chemical properties. The experiment presented was also intended to verify the hypothesis whether peroxidase enzyme activity could be a predictor of rooting efficiency in the case of the species studied. Regenerated shoots of grass pea 'Derek' were placed on media solidified with agar, Phytigel or into substrates (perlite, perlite-peat mixture) flooded with liquid medium. The media were supplemented with IBA (0, 0.25 or 0.5 mg/l). Rooting efficiency was assessed by calculating: the percentage of rooted shoots, the average number of roots per shoot and the average root length. On the basis of the results obtained, the best and weakest variant of rooting conditions (substrate plus medium) were selected. In shoots, rooted on the selected variants, peroxidase activity was assessed on successive days of culture. The greatest number of shoots rooted in perlite-peat medium flooded with liquid medium containing 0.5 mg/l IBA, and the least in medium solidified with Phytigel containing 0.25 mg/l IBA. Shoots



rooted in a perlite-peat mixture had higher peroxidase activity than shoots from medium solidified with Phytigel. The study showed that aeration of the medium (resulting from its physical properties) determines the in vitro rooting of grass pea shoots more than the composition of the rooting medium. The pattern of peroxidase activity in the basal part of rooted shoots can be used as an indicator of future rooting.



## Optymalizacja procesów mikrorozmnażania roślin tarczycy brodatej (*Scutellaria barbata*) w kulturach in vitro

M. TOMASZEWSKA-SOWA, A. FIGAS, O. MIKOŁAJCZAK

Katedra Biotechnologii, Politechnika Bydgoska;  
e-mail: magda@pbs.edu.pl

Tarczycza brodata, zwana też brodawkowat (*Scutellaria barbata* D. Don), jest zaliczana do roślin ciwo ciach adaptogennych. Roślina należy do tej grupy wykazującej normalizujący wpływ na organizm i zwiększającą odporność na stres, ponadto mogą być charakterystyczne aktywności biologiczne o znaczeniu terapeutycznym. Wiele *S. barbata* zidentyfikowano związki o działaniu przeciwzapalnym, przeciwutleniającym i przeciwnowotworowym. Wykazano możliwość zastosowania tego gatunku w leczeniu wczesnych faz nowotworów m.in. piersi, trzustki, nerek, skóry a także chorób układu krążenia, obrzęków, stanów zapalnych jamy ustnej, gardła, jelit, układu moczowego. W niniejszej pracy dokonano próby regulacji procesów morfogenezy i zwiększenia efektywności namnażania pędów tarczycy brodatej w kulturach in vitro. Przeprowadzono optymalizację procesu sterylizacji nasion, namnażanie i ukorzenianie pędów oraz aklimatyzację w warunkach szklarniowych. Na etapie sterylizacji nasiona traktowano przez 12 minut roztworem NaClO w stężeniu: 0,0%, 1,0%, 1,5%, 2,0%. Sterylne nasiona inokulowano na pożywkę ½ MS bez RW lub ½ MS wzbogaconą w 1,0 mg · dm<sup>-3</sup> GA<sub>3</sub> i umieszczano w temperaturze 4°C na okres 21 dni. Po tym czasie próbki z nasionami przenoszono do fototronu, gdzie panował 16-godzinny fotoperiod, natężenie światła 40 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> i temperatura 24°C. Z uzyskanych siewek izolowano jednowzrostowe fragmenty pędów. Eksplantaty, w celu namnażania, wykładano na pożywkę MS z dodatkiem regulatorów wzrostu i rozwoju (RW), w różnych koncentracjach: NAA (kwas 1-naftalenoctowy), BAP (6-benzylaminopuryna), TDZ (tidiazuron), KIN (kinetyna). Jako kontrolę stosowano pożywkę MS bez RW. Ukorzenianie prowadzono na pożywce z IAA (kwas indolilo-3-octowy) lub IBA (kwas indolilo-3-masłowy). Najwięcej sterylnych siewek uzyskano w warunkach, w których do sterylizacji zastosowano 2,0% NaClO. Dodatek do pożywki

GA<sub>3</sub> w istotny sposób zwi kszał odsetek skielkowanych nasion. Najwy sz efektyw-  
no namna ania p dów obserwowano na po ywce MS uzupełnionej 2,0 mg·dm<sup>-3</sup>  
BAP i 1,0 mg·dm<sup>-3</sup> NAA a proces ryzogenezy zachodził intensywniej w obecno ci  
1,0 mg·dm<sup>-3</sup> IBA. W celu optymalizacji procesów adaptacji do warunków ex vitro,  
nawadnianie przeprowadzano z zastosowaniem roztworów soli MS i uzyskano 85%  
zaaklimatyzowanych ro lin.

## The optimization of in vitro micropropagation of *Scutellaria barbata* plants

*Scutellaria barbata* D. Don is a plant with adaptogenic properties. Plants belonging to this group are said to have a normalizing effect on the body and increase resistance to stress. Moreover, they may be characterized by biological activity of therapeutic importance. Compounds with anti-inflammatory, antioxidant and anticancer properties have been identified in the herb *S. barbata*. The possibility of using this species in the treatment of early stages of cancer has been demonstrated, including: breasts, liver, kidneys, skin, as well as cardiovascular diseases, swelling, inflammation of the mouth, throat, intestines and urinary system. In this study, an attempt was made to regulate the morphogenesis processes and increase the efficiency of shoot multiplication of the *S. barbata* in in vitro cultures. The seed sterilization process, shoot multiplication and rooting, and acclimatization in greenhouse conditions were optimized. At the sterilization stage, the seeds were treated for 12 minutes with NaClO at the following concentrations: 0.0%, 1.0%, 1.5%, 2.0%. Sterile seeds were inoculated into ½ MS medium without growth regulators or ½ MS medium enriched with 1.0 mg·dm<sup>-3</sup> GA<sub>3</sub> and placed at 4°C for 21 days. After this time, the tubes with seeds were transferred to the growth room, where was a 16-hour photoperiod, a light intensity of 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> and a temperature of 24°C. Single-node shoot fragments were isolated from the obtained seedlings and placed on MS medium with the addition of growth regulators in various concentrations: NAA (1-naphthaleneacetic acid), BAP (6-benzylaminopurine), TDZ (thidiazuron), KIN (kinetin) for the purpose of multiplication. MS medium without growth regulators was used as a control. Rooting took place on a medium with IAA (indolyl-3-acetic acid) or IBA (indolyl-3-butyric acid). The largest number of sterile seedlings was obtained in the variant in which 2.0% NaClO was used for sterilization. The addition of GA<sub>3</sub> to the medium significantly increased the percentage of germinated seeds. The highest multiplication efficiency was observed on MS medium supplemented with 2.0 mg·dm<sup>-3</sup> BAP and 1.0 mg·dm<sup>-3</sup> NAA, and the rhizogenesis process occurred more intensively in the presence of 1.0 mg·dm<sup>-3</sup> IBA. In order to optimize the adaptation processes to ex vitro conditions, MS salt solutions were used to irrigate the plants and 85% of acclimated plants were obtained.



## Mikrorozmnażanie oraz aklimatyzacja tetraploidów agrestu (*Ribes grossularia* L.) i czereśni (*Prunus avium* L.)

A. TRZEVIK, A. NIEWIADOMSKA-WNUK

Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
Skierniewice;

e-mail: [aleksandra.trzewik@inhort.pl](mailto:aleksandra.trzewik@inhort.pl)

Poliploidyzacja to narz dzie szeroko wykorzystywane w programach hodowlanych wielu ro lin u tkowych. Po podwojeniu liczby chromosomów, korzystne cechy bardzo cz sto ulegaj wzmocnieniu na skutek zwi kszenia genów warunkuj cych po dane cechy. Poprzez krzyz owanie ró nych warto ciowych tetraploidów mo - na kumulowa korzystne cechy u miesza ców. Dla agrestu po dane cechy to m.in. bezkolcowo oraz odporno ro lin i owoców na ameryka skiego m czniaka agrestu (*Podosphaera mors-uvae*), dla czere ni – odporno drzew na raka bakteryjnego (*Pseudomonas syringae*) i zró nicowana pora dojrzewania owoców. Poprzez kultury p dów bocznych poddane działaniu antymitotyków otrzymali my tetraploidy trzech odmian czere ni Merton Premier, Tamara, Rita oraz dwóch genotypów agrestu 'Biały Triumf' i klonu hodowlanego AGR9. Celem pracy było rozmno enie, ukorzenie in vitro i aklimatyzacja w szklarni otrzymanych tetraploidów agrestu i czere ni. Tetraploidalne i diploidalne p dy agrestu rozmna ano in vitro na po ywce WPM w obecno ci 0,2 mg/l mT; 0,1 mg/l GA<sub>3</sub> i 0,1 mg/l IAA. P dy o długo ci powy ej 0,5 cm ukorzeniano na po ywce 1/2 MS bez regulatorów wzrostu z dodatkiem 4 g/l w gla aktywnego. W przypadku czere ni tetraploidalne i diploidalne p dy rozmna ano in vitro na po ywce MS zawieraj cej 0,8 mg/l BAP; 1,0 mg/l GA<sub>3</sub> i 0,01 mg/l IBA. P dy ukorzeniano in vitro na po ywce MS z dodatkiem 1 mg/l IBA przez pi dni w ciemno ci, a nast pnie na po ywce 1/2 MS bez regulatorów wzrostu z dodatkiem 4 g/l w gla aktywnego. Efektywno namna ania i ukorzenia p dów tetraploidów oceniano w odniesieniu do diploidów. U agrestu p dy tetraploidów namna ały si bardzo słabo i były krótkie, o długo ci około 3 mm. Tak e efektywno ukorzenia p dów tetraploidów była niska: 14,3% dla odmiany Biały Triumf i 52,4% dla klonu AGR9. P dy diploidów ukorzeniły si w wy szym procencie: 47,8% dla odmiany Bia-

ły Triumf oraz 63,8% dla klonu AGR9. Parametry namna nia i ukorzenia in vitro tetraploidalnych p dów odmian czere ni były zbli one do diploidalnych odpowiedników, jedynie wysoko p dów tetraploidów była wyra nie ni sza ni u diploidów. Odnotowano wysoki odsetek ukorzenia p dów tetraploidalnych czere ni, który wynosił od 70,3% dla odmiany Merton Premier do 98,6% dla odmiany Tamara.

Badania f nansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach Post pu Biologicznego w Produkcji Ro linnej Zadanie 46

## Micropropagation and acclimation of tetraploids of gooseberry (*Ribes grossularia* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.)

Polyplodization is a tool widely used in the breeding programs of many crop plants. After doubling the number of chromosomes, favorable traits are often enhanced as a result of increasing the genes that determine the desired traits. By crossing various valuable tetraploids, beneficial traits can be accumulated in hybrids. For gooseberry, desirable traits include thornlessness and plant and fruit resistance to American gooseberry powdery mildew (*Podosphaera mors-uvae*), for cherry – resistance of trees to bacterial canker (*Pseudomonas syringae*) and differentiated fruit ripening time. Treating axillary shoots in in vitro cultures with antimetotics, we obtained tetraploids for three sweet cherry cultivars Merton Premier, Tamara, Rita and two gooseberry genotypes 'White Triumph' and the breeding clone AGR9. The aim of the work was to multiply, root in vitro and acclimatize the obtained gooseberry and cherry tetraploids in the greenhouse. Gooseberry shoots of tetraploids and diploid counterparts were propagated in vitro on WPM medium in the presence of 0.2 mg/L mT, 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> and 0.1 mg/L IAA. Shoots longer than 0.5 cm were rooted on ½ MS medium without growth regulators with the addition of 4 g/L of activated carbon. In the case of sweet cherries, tetraploid and diploid shoots were propagated in vitro on MS medium containing 0.8 mg/L BAP, 1.0 mg/L GA<sub>3</sub> and 0.01 mg/L IBA. The shoots were rooted in vitro on MS medium containing 1 mg/L IBA for five days in the dark and then on ½ MS medium without growth regulators supplemented with 4 g/L activated carbon. The efficiency of multiplication and rooting of tetraploid shoots was assessed in relation to diploids. In gooseberry tetraploids, multiplication rate was very low and the shoots were short, about 3 mm long. The rooting efficiency of tetraploid shoots was also low: 14.3% for 'White Triumph' and 52.4% for the breeding line AGR9. Diploid shoots rooted at a much higher percentage, 47.8% for 'White Triumph' and 53.8% for the breeding line AGR9. In sweet cherry cultivars, the in vitro multiplication and rooting parameters of tetraploid shoots were similar to those of their diploid counterparts, only the shoot length of tetraploids was significantly lower than that of diploids. A high percentage of rooting of tetraploid cherry shoots was recorded, ranging from 70.3% for 'Merton Premier' to 98.6% for 'Tamara'.

This research was funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development as part of basic research for Biological Progress in Plant Production, Tasks 46



## Hormonalna regulacja ryzogenezy *Rheum raponticum* in vitro

A. WOJTANIA<sup>1</sup>, P. WALIGÓRSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;

<sup>2</sup>Zakład Biologii Rozwoju, Instytut Fizjologii Roślin PAN, Kraków;  
e-mail: agnieszka.wojtania@inhort.pl

Wcześniejsze badania dotyczące mikrorozmna ania rabarbaru ogrodowego wykazały brak powtarzalności w uzyskiwaniu wysokiej efektywności ukorzeniania pędów. W przeciwieństwie do form dzikich, wszystkie odmiany rabarbaru ogrodowego uprawianego dla długich i masywnych ogonków bogatych w substancje bioaktywne, są tetraploidami ( $2n=44$ ). U wielu roślin ogrodniczych wykazano, iż poliploidy cechują się zwykle niższą zdolnością do tworzenia korzeni w porównaniu do ich diploidalnych odpowiedników. Celem badań było poznanie czynników regulujących tworzenie korzeni na pędach rabarbaru ogrodowego 'Malinowy' in vitro. Oceniano wpływ i współdziałanie egzogennej auksyny (IBA) i prekursora biosyntezy etylenu (ACC) oraz inhibitorów syntezy i przekazywania sygnału etylenu (AVG, AgNO<sub>3</sub>) na liczbę ukorzenionych pędów (%), liczbę korzeni na pędzie, jako pędów i poziom endogennych fitohormonów (IAA, IBA, ABA, JA). Zarówno IBA jak i ACC podane pojedynczo powodowały wzrost liczby ukorzenionych pędów rabarbaru, kolejno o 36,7% i 32,8% w stosunku do roślin rosnących na powietrze bez regulatorów wzrostu. Najlepsze wyniki (91,4% ukorzenionych pędów; 9,7 korzeni/pęd) uzyskano przy łącznym zastosowaniu IBA i ACC. Wskazuje to na współdziałanie auksyny i etylenu w procesie ukorzeniania rabarbaru in vitro. Zablokowanie syntezy i przekazywanie sygnału etylenu znacząco hamowało ryzogenezę i było związane z wysoką produkcją kwasu jasmonowego i kwasu abscysynowego. Wyniki te mogą sugerować o redukcji udziału JA i ABA w procesie ukorzeniania rabarbaru in vitro w odpowiedzi na egzogenne auksyny i etylen.

Badania były finansowane przez Agencję Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa w ramach działania M16 „Współpraca”, Program Rozwoju Obszarów Wiejskich 2014-2020, nr projektu: 00009.DDD.6509.00181.2022.09.

## Hormonal regulation of rhizogenesis in *Rheum raphanistrum* in vitro

Earlier studies on micropropagation of garden rhubarb have shown a lack of reproducibility in obtaining high rooting efficiency. In contrast to wild forms, all cultivars of garden rhubarb grown for their long fleshy petioles, rich in different bioactive substances, are tetraploids ( $2n=44$ ). In many horticultural plants, it has been shown that polyploids tend to have a lower root-forming capacity compared to their diploid counterparts. The aim of this study was to find out the factors regulating the rooting of garden rhubarb ‘Raspberry’ shoots in vitro. The effect and interaction of exogenous auxin (IBA) and ethylene biosynthesis precursor (ACC) and inhibitors of ethylene synthesis and signal transduction (AVG, AgNO<sub>3</sub>) on the number of rooted shoots (%), number of roots per shoot, shoot quality and endogenous phytohormone levels (IAA, IBA, ABA, JA) were assessed. Both IBA and ACC given individually increased the number of rooted shoots by 36.7% and 32.8%, respectively, compared to rhubarb plants grown on medium without growth regulators. The best results (91.4% of rooted shoots; 9.7 roots/shoot) were obtained with the combined application of IBA and ACC. This indicates a synergistic effect of auxin and ethylene in the rooting process of rhubarb in vitro. Inhibition of ethylene synthesis and signal transduction significantly decreased rhizogenesis and was coincident with high jasmonic acid and abscisic acid production. These results suggest that IBA and ethylene regulation of the root formation of garden rhubarb in vitro is mediated by ABA and JA.

This research was funded by the European Union under the “European Agricultural Fund for Rural Development: Europe investing in rural areas”, grant number 00009.DDD.6509.00181.2022.09.

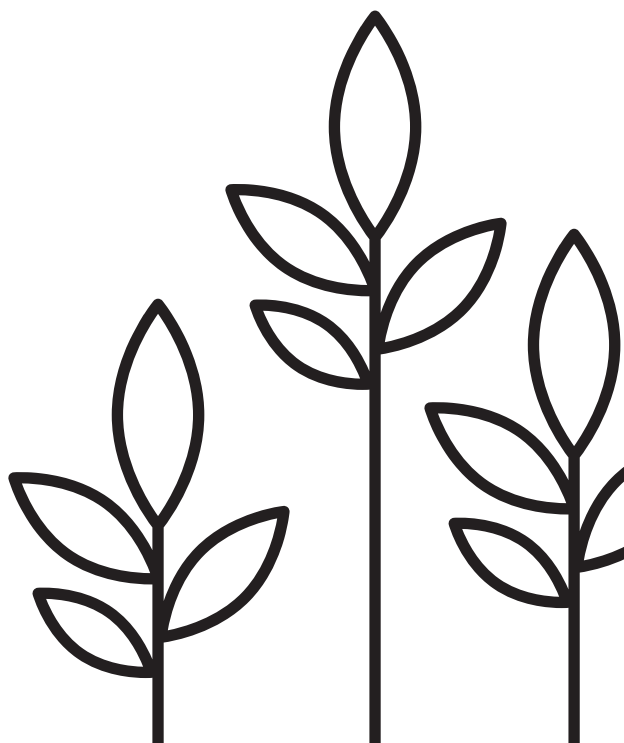






## SESJA 2

# Biosynteza metabolitów wtórnych w kulturach in vitro







## Wpływ długości fali świetlnej na zawartość substancji bioaktywnych w roślinach pigwowca japońskiego (*Chaenomeles japonica*) rozmnażanych metodą in vitro

K. BUCH<sup>1</sup>, A. SZOPA<sup>2</sup>, M. BIENIASZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;  
e-mail: Klaudia.buch@urk.edu.pl

Pigwowiec japoński (*Chaenomeles japonica*) to krzew ozdobny znajdujący zastosowanie jako roślina o wysokim potencjale dietetycznym i prozdrowotnym. Jest wykorzystywana w przemyśle przetwórczym. Charakteryzuje się licznymi właściwościami przeciwutleniającymi – z uwagi na koncentrację licznych cennych składników ekstraktów z *C. japonica* mogą m.in. wykazywać korzystne działanie na skórę. Wspomniane związki działające w sposób synergiczny wpływają na zwiększenie szybkości proliferacji komórek, podwyższając tym samym potencjał antyoksydacyjny. Celem niniejszego doświadczenia było zbadanie zawartości substancji bioaktywnych w liściach pigwowca japońskiego utrzymanego w warunkach in vitro w zależności od genotypu i jakości światła diod elektroluminescencyjnych (LED). Materiał stanowiły trzy genotypy pigwowca japońskiego: A2, A4 i A9. Z roślin matecznych pobrano merystemy wierzchołkowe, z których zainicjowano kultury. Wykorzystano podłoże bazalne MS (Murashige i Skoog 1962) zestalone 0,6% (w/v) agaru uzupełnione 30 g L<sup>-1</sup> (w/v) sacharozy i regulatorami wzrostu roślin w różnych stężeniach. Rośliny umieszczono w komorach wzrostowych zapewniając 16/8 h fotoperiodu (dzień / noc), temperaturę 25/23 ± 1°C (dzień / noc) i 80% wilgotności względnej. Rośliny pasowano przez 10 tygodni. Rośliny traktowano światłem LED o następujących kombinacjach: B 100% (430 nm), R 100% (670 nm); RB 7:3 (430 nm i 670 nm), FR (daleka czerwona) 50% + RB 50% (w proporcji 7:3 RB:FR), G (zielone) 50% + RB 50% (w proporcji 7:3 RBG) oraz białe LEDy (2700K 4500K 5700K w stosunku 1:1:1;

WLed). W ro linnych ekstraktach alkoholowych metod chromatograf czn HPLC wykonano analiz ilo ciow i jako ciow obecnych składników. Zawarto badanych zwi zków ró niła si wzale no ci od składu spektralnego widma oraz genotypu. We wszystkich analizowanych typach dominuj cym zwi zkiem był kwas benzoesowy. Stwierdzono, i skład spektralny wiatła nie wpływa na ró nice w zawarto ci kwasu kawowego we wszystkich badanych genotypach. Wykazano, e wiatło niebieskie oraz kombinacja RBfR wpływaj stymuluj co na synteze kwasu neochlorogenowego. Ilo fawonoidów w badanym materiale była zbli ona we wszystkich kombinacjach do wietlania i mie ciła si w przedziale: 122- 155 mg/100 g s.m. dla apigetryny, 135- 198 mg/100 g s.m. dla apigeniny, 278- 308 mg/100 g s.m dla kemferolu. Wykazano, i we wszystkich przypadkach wiatło czerwone wpływało hamuj co na synteze trifoliny w li ciach pigwowca.

## Effect of light wavelength on the content of bioactive substances in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) plants propagated in vitro

Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) is an ornamental bush known as a plant with high dietary and health-promoting potential, eagerly used in the processing industry. It can be characterized by numerous antioxidant properties – due to the concentration of many valuable ingredients, *C. japonica* extracts can, among others, have a beneficial effect on the skin. These compounds, acting in a synergistic way, increase the rate of cell proliferation and as a consequence improve the antioxidant potential. The purpose of the experiment was to investigate the content of bioactive substances in Japanese quince leaves maintained in vitro depending on the genotype and quality of light-emitting diodes (LEDs). The plant material consisted of three genotypes of Japanese quince: A2, A4 and A9. Apical meristems were collected from mother plants from which cultures were initiated. As medium used MS (Murashige and Skoog 1962) basal substrate solidified with 0.6% (w/v) of agar supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> (w/v) sucrose and plant growth regulators at different concentrations. The plants were placed in growth chambers providing 16/8 h photoperiod (day/night), a temperature of 25/23 ± 1 °C (day/night) and 80% relative humidity. The plants were passaged for 10 weeks. The plants were treated with LED light of the following combinations: B 100% (430 nm), R100% (670 nm); RB 7:3 (430 nm & 670 nm), FR (Far Red) 50% + RB 50% (7:3; RBfR), G (green) 50% + RB 50% (in a 7:3 ratio; RBG) and white LEDs (2700K, 4500K, 5700K in a 1:1:1 ratio; WLed). In plant alcohol extracts, quantitative and qualitative analysis of the present components was performed by HPLC chromatographic method. The content of the tested compounds differed depending on the spectral composition of the spectrum and genotype. In every of the analyzed types, benzoic acid was the dominant

compound. It was found that the spectral composition of light does not affect the differences in the content of caffeic acid in all the genotypes studied. Blue light and the combination of RBfR have been shown to stimulate the synthesis of neochlorogenic acid. The amount of flavonoids in the tested material was similar in all combinations of lighting and ranged from: 122- 155 mg/100 g d.m. for apigenin, 135- 198 mg/100 g d.m. for apigenin, 278- 308 mg/100 g d.m. for kaempferol. It was shown that in all cases red light had an inhibitory effect on the synthesis of trifolin in quince leaves.



## Kultury in vitro *Verbena officinalis* jako bogate źródło glikozydów fenylopropanoidowych – werbaskozydu i izowerbaskozydu

P. KUBICA<sup>1</sup>, A. SZOPA<sup>1</sup>, A. KOKOTKIEWICZ<sup>2</sup>, M. ŁUCZKIEWICZ<sup>2</sup>, H. EKIERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Farmakognozji, Gdański Uniwersytet Medyczny;  
e-mail: halina.ekiert@uj.edu.pl

Werbena lekarska (*Verbena officinalis*) to roślina o cennych właściwościach leczniczych. Badania naukowe potwierdzają liczne właściwości biologiczne ekstraktów zieleń *V. officinalis*, m.in. antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe, gastroprotektoryjne, antyproliferacyjne, uspokajające, poprawiające sen, przeciwdrgawkowe i neuroprotektoryjne. Surowiec charakteryzuje się bogatym składem chemicznym, dominującymi składnikami są: glikozydy irydoidowe (m.in. werbenalina, hastatozyd), glikozydy fenylopropanoidowe (m.in. werbaskozyd, izowerbaskozyd), kwasy fenolowe (m.in. kwasy: ferulowy, protokatechowy, rozmarynowy). Szereg badań przeprowadzonych przez nasz zespół udokumentował wysoką produkcję tych związków w biomacie kultur in vitro *V. officinalis*. Badania te obejmowały optymalizację warunków prowadzenia zainicjowanych kultur in vitro o różnym stopniu organogenezy (kalusowych oraz mikropodów), optymalizację składu podłoża hodowlanego (jako ciowy oraz ilości ciowy dobór regulatorów wzrostu i rozwoju roślin), warunków świetlnych oraz czasu trwania cykli hodowlanych. Ponadto w ramach badań testowano różne typy prowadzonych kultur (agarowe, zawieszinowe, płynne stacjonarne, wytrzaślane, oraz kultury bioreaktorowe). W ramach przeprowadzonych badań stwierdzono, iż potencjał biosyntetyczny komórek z kultur in vitro *V. officinalis* jest wyraźnie ukierunkowany na produkcję glikozydów fenylopropanoidowych – werbaskozydu i izowerbaskozydu. Stwierdzono bardzo wysoką zawartość werbaskozydu w ekstraktach z kultur kalusowych, w tym szczególnie w eks-

traktach z kultur hodowanych w bioreaktorze mieszaj ąco napowietrzaj ącym (STB) – 9176,87 mg/100 g s.m. (specyficzna produktywno ść 120,49 mg/l/dzie ń) – ponad 5,3-krotnie wi ęcej ni ę w ekstraktach z ziela. Zawarto ść izoverbaskozydu równie były wysokie w ekstraktach z kultur kalusowych – maks. 609,26 mg/100 g s.m. (specyficzna produktywno ść 10,13 mg/l/dzie ń) – ponad 7,7-krotnie wi ęcej ni ę w ekstraktach z ziela). Dobrze rosn ąca biomasa kultur *in vitro* *V. officinalis* (szczególnie kultur prowadzonych w bioreaktorach STB) o du żej zawarto ści wybranych glikozydów fenylpropanoidowych mo że zosta ć w przyszło ści wykorzystywana zarówno w celach farmaceutycznych, jak i w f tokosmetologii.

### In vitro cultures of *Verbena officinalis* as a rich source of phenylpropanoid glycosides – verbascoside and isoverbascoside

*Verbena officinalis* is a plant species with valuable medicinal activities. Scientific research confirms the numerous biological properties of *V. officinalis* herb: antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, gastroprotective, antiproliferative, sedative, sleep-promoting, anticonvulsant and neuroprotective. The main constituents of the herb are: iridoid glycosides (e.g. verbenalin, hastatoside), phenylpropanoid glycosides (e.g. verbascoside, isoverbascoside), phenolic acids (e.g. ferulic acid, protocatechuic acid, rosmarinic acids). A number of studies conducted by our team documented high production of these compounds in the biomass of *V. officinalis* *in vitro* cultures. These studies included optimization of the conditions for conducting initiated *in vitro* cultures with various degrees of organogenesis (callus and microshoot), optimization of the composition of the culture medium (qualitative and quantitative selection of plant growth regulators), light conditions and the duration of breeding cycles. In addition, the research tested various types of cultures (agar, suspension, stationary liquid, agitated and bioreactor cultures).

The results showed high biosynthetic potential of *V. officinalis* *in vitro* cultures cells clearly directed towards the production of phenylpropanoid glycosides – verbascoside and isoverbascoside. The verbascoside content was very high in extracts from callus cultures, especially in cultures maintained in stirred-tank bioreactor (STB) – 9176.87 mg/100 g dw. (specific productivity 120.49 mg/l/day) – more than 5.3-fold higher than in herb extracts. Isoverbascoside content was also high – max. 609.26 mg/100 g dw. (specific productivity 10.13 mg/l/day) in agar callus cultures – more than 7.7 times higher than in herb extracts. The well-growing biomass of *V. officinalis* *in vitro* cultures (especially cultures grown in STB bioreactors) with a high content of selected phenylpropanoid glycosides may be used in the future both for pharmaceutical purposes and in phytocosmetology.



## Genetyczna i biochemiczna charakterystyka regenerantów stewii (*Stevia rebaudiana* Bertoni) otrzymanych drogą organogenezy pośredniej

M. DYDUCH-SIEMIŃSKA

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;  
e-mail: magdalena.dyduch@up.lublin.pl

Rośnie tendencja do spożywania rośliny o niskiej zawartości cukru i kalorii. *Stevia rebaudiana* Bertoni (rodzina Asteraceae) to naturalne zioło słodzik. Liście stewii są źródłem podstawowych składników chemicznych i cennych substancji biologicznie aktywnych, a przede wszystkim glikozydów stewiolowych, nadających słodki smak roślinie. Obecnie w Polsce nie ma oryginalnych odmian stewii zarejestrowanych w rejestrze odmian. Uprawiane stewie to najczęściej rośliny o niezdefiniowanej odmianie, rozmnażane głównie konwencjonalnymi metodami wegetatywnymi. Stanowi to błąd narodowo-genetyczny, co nie gwarantuje produkcji stałego wysokiego poziomu glikozydów stewiolowych i innych związków fitochemicznych. Wytwarzane na bazie takich roślin dodatki do żywności i preparaty lecznicze nie charakteryzują się wyrównanym i jednolitym standardem. W związku z powyższym, produkcja fitoproduktów z tego typu roślin nie jest możliwa na skalę towarową. Dlatego bardzo istotna jest wnikliwa charakterystyka roślin stewii stanowiących materiał wyjściowy do wytwarzania bioproduktów zarówno na poziomie biochemicznym, jak i molekularnym. Celem niniejszej pracy była ocena zróżnicowania genetycznego oraz charakterystyka biochemiczna regenerantów stewii (*Stevia rebaudiana* Bertoni) otrzymywanych w warunkach in vitro. Wykorzystane w niniejszych badaniach genotypy otrzymano w laboratorium kultur tkankowych drogą organogenezy pośredniej. Do oceny zróżnicowania genetycznego w/w roślin wykorzystano dwa systemy markerowe oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy – SCoT (Start Codon Targeted) oraz ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Populacja regenerantów po mikropropagacji posłużyła jako materiał do badań fitochemicznych. Analizy te obejmowały oznaczenie ilości



glikozydów stewiolowych, identyfikacji i rozdziału cukrów za pomocą systemu HPLC (high performance liquid chromatography) oraz właściwości przeciwutleniających. Ocena różnorodności genetycznej i biochemicznej jest podstawą do rozpoczęcia programów hodowlanych i jest niezbędna do selekcji roślin o nowych genotypach. Przeprowadzone doświadczenia umożliwiły zdobycie nowej wiedzy dotyczącej zjawiska zmienności somaklonalnej i możliwości wykorzystania u analizowanego gatunku. Wyprowadzone w ramach wyżej opisanego projektu genotypy mogą być wykorzystane w programach hodowlanych, które prowadzą do stworzenia nowej odmiany stevia o podwyższonej zawartości związków fitochemicznych.

## Genetic and biochemical characterization of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) regenerants obtained through indirect organogenesis

There is a growing tendency to eat foods low in sugar and calories. *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae family) is a natural sweetener herb. Stevia leaves are a source of basic chemical components and valuable biologically active substances, and above all steviol glycosides, which give the plant a sweet taste. Currently, there are no original stevia varieties registered in the variety register in Poland. Cultivated stevia are most often plants of an undefined variety, propagated mainly by conventional vegetative methods. They represent a large genetic diversity, which does not guarantee the production of a constant high level of steviol glycosides and other phytochemical compounds. Food additives and medicinal preparations produced on the basis of such plants are not characterized by a consistent and uniform standard. Due to the above, the production of phytoproducts from this type of plants is not possible on a commercial scale. Therefore, a thorough characterization of stevia plants, which are the starting material for the production of bioproducts, at both the biochemical and molecular levels, is very important. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and biochemical characteristics of stevia regenerants (*Stevia rebaudiana* Bertoni) obtained in vitro. The genotypes used in this study were obtained in a tissue culture laboratory by indirect organogenesis. Two marker systems based on the polymerase chain reaction – ScoT (Start Codon Targeted) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) were used to assess the genetic diversity of the above-mentioned plants. The population of regenerants after micropropagation was used as material for phytochemical tests. These analyzes included determination of the amount of steviol glycosides, identification and separation of sugars using the HPLC (high performance liquid chromatography) system and antioxidant properties. Assessment of genetic and biochemical diversity is the basis for starting breeding programs and is necessary for the selection of plants with new genotypes. The experiments carried out enabled the acquisition of new knowledge regarding the phenomenon of somaclonal variability and the possibility of its use in the analyzed species. The genotypes developed as part of the project described above can be used in breeding programs that lead to the creation of a new variety of stevia with an increased content of phytochemical compounds.



## Kultury in vitro mszaków jako narzędzie w badaniu wytwarzania związków bioaktywnych

M. DZIWAK

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;  
e-mail: [michal.dziwak@umw.edu.pl](mailto:michal.dziwak@umw.edu.pl)

Mszaki to heterogeniczna grupa roślin składająca się z około 14000 mszaków, 6000 w trzawców i 300 gwałków. Dawniej wykorzystywane były one przez wiele kultur do leczenia ran oraz łagodzenia chorób. Tradycyjna medycyna chińska i indyjska znalazły zastosowanie dla ponad 40 gatunków mszaków. Badania nad tą grupą roślin wykazały, iż jest ona źródłem unikalnych związków biologicznie czynnych o potencjalnym zastosowaniu w medycynie czy przemyśle. Wśród nich znajdują się między innymi metabolity wtórne o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybowym, insektobójczym, mikotoksynogennym, przeciwnowotworowym oraz przeciwzapalnym. Ponadto związki lotne pozyskane z mszaków wykazały charakterystyczne aromaty, na przykład mleczny, cedrowy, balsamiczny, mszysty czy korzenny. Jednym z problemów badań nad mszakami jest ich dostępność. Spora ich część występuje w nielicznych skupiskach, a przez to zagrożona jest wyginaniem. W ochronie zasobów genowych, jak również aby zapewnić odpowiednią ilość materiału roślinnego do badań, pomocne są metody in vitro, gdyż są one stosunkowo tanie, wymagają niewielkiej ilości materiału wyjściowego, co pozwala zminimalizować wpływ na siedliska mszaków, oraz pozwalają na rozmnożenie materiału w stosunkowo krótkim czasie. Jednakże indukcja kultur in vitro mszaków jest problematyczna, gdyż gametofity mszaków są bardzo delikatne, przez co ich przeżywalność podczas dezynfekcji jest niska, a skuteczność jest wysoka przy niskich stężeniach rodków dezynfekujących. Zatem skuteczna indukcja kultur z użyciem gametofitu wymaga odpowiedniego doboru rodków dezynfekujących, jego stężenia oraz czasu dezynfekcji. W przypadku sporofitów mchów sytuacja różni się znacznie.

Do indukcji używany jest materiał w postaci zarodników pozyskanych ze zdezynfekowanych zarodni. W tym przypadku ważna jest znajomość typu zarodni danego gatunku, czas zbioru materiału oraz warunki jego przechowywania. Zarodniki w nieotwartych zarodniach wykazują sterylność, toteż zarodnie nie powinny ulec otwarciu podczas transportu materiału. W przypadku optymalizacji produkcji metabolitów wtórnych istotnym jest wybór warunków fizycznych oraz podłoża. Dobór odpowiednich regulatorów wzrostu również wykazuje istotny wpływ na produkcję związków biologicznie czynnych.

## In vitro culture of bryophytes as a tool for studying production of bioactive compounds

Bryophytes are a heterogeneous group of plants consisting of approximately 14,000 mosses, 6,000 liverworts and 300 hornworts. In the past, they were used by many cultures to heal wounds and alleviate diseases. Traditional Chinese and Indian medicine uses over 40 species of bryophytes. Research on this group of plants has shown that it is a source of unique biologically active compounds with potential use in medicine and industry. They include secondary metabolites with antibacterial, antifungal, insecticidal, molluscicidal, anticancer and anti-inflammatory properties. Moreover, volatile compounds obtained from bryophytes showed characteristic aromas, e.g. milky, cedar, balsamic, mossy or rooty. One of the problems of research on bryophytes is their availability. Many of them occur in small clusters and are therefore at risk of extinction. In the protection of genetic resources, as well as to ensure an appropriate amount of plant material for research, in vitro methods are helpful because they are relatively cheap, require a small amount of input material, which allows to minimize the impact on bryophyte habitats, and allow the material to be multiplied in a relatively short time. However, the induction of bryophyte cultures in vitro is problematic because bryophyte gametophytes are very delicate, which means that their survival rate during sterilization is low, or the number of infections is high at low concentrations of sterilizing agent. Therefore, effective culture induction using gametophyte requires appropriate selection of the sterilizing agent, its concentration and sterilization time. In the case of moss sporophytes, the situation is significantly different. Material used for induction is spores obtained from sterilized sporangia. In this case, it is important to know the type of sporangia of a given species, the time of harvesting the material and the conditions of its storage. Spores in unopened sporangia are sterile, so sporangia should not open during transport. In case of optimizing the production of secondary metabolites, the choice of physical conditions and substrate is important. The selection of appropriate growth regulators also has a significant impact on the production of biologically active compounds.



## Wpływ warunków oświetlenia na wzrost i akumulację polifenoli w kulturach in vitro kilku gatunków szalwii

I. GRZEGORCZYK-KAROLAK, M. KRZEMIŃSKA

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;  
e-mail: izabela.grzegorzczuk@umed.lodz.pl

W badaniu oceniano wpływ warunków oświetlenia (niebieskie, czerwone, mieszane, białe LED i białe lampy fluorescencyjne) na wzrost i akumulację polifenoli w kulturach trzech gatunków szalwii hodowanych in vitro. Zawartość związków analizowano, stosując metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Stwierdzono, że reakcja na światło różniła się w zależności od gatunku rośliny. Najwyższy współczynnik namnożenia zaobserwowano dla *S. atropatana* i *S. bulleyana* po ekspozycji na światło białe, z wartościami odpowiednio około 6,5 i 4,3. W przypadku *S. viridis* ekspozycja na niebieskie i mieszane LEDy skutkowałą zbliżonym współczynnikiem namnożenia wynoszącym około 4,5. Niebieskie LEDy i oświetlenie fluorescencyjne było optymalne dla wzrostu biomasy u tego ostatniego gatunku z wartościami 16 dla indeksu wzrostu suchej masy i 14 dla suchej. Tymczasem w przypadku *S. atropatana* i *S. bulleyana* odnotowano podobny poziom biomasy dla wszystkich zabiegów (około 25) z wyjątkiem czerwonych diod elektroluminescencyjnych. Wyniki badań wskazują na istotne różnice w akumulacji kwasu rozmarynowego (RA) pomiędzy różnymi gatunkami rodzaju *Salvia* eksponowanymi na różne długości fal świetlnych. Pody *S. viridis* produkowały najwięcej RA pod wpływem niebieskich diod elektroluminescencyjnych (9,1 mg/g s.m.). Tymczasem pody *S. atropatana* charakteryzowały się najwyższą akumulacją tego związku podczas ekspozycji na czerwone LEDy (21 mg/g s.m.), a *S. bulleyana* na białe lampy fluorescencyjne (25 mg/g s.m.). Poziom RA w kulturze *S. viridis* był o połowę niższy niż w przypadku pozostałych dwóch gatunków, ale jej pody akumulowały również fenyletanoidy z dominującym werbaskozydem. Ostatecznie zoptymalizowanie warunków oświetlenia umożliwiło wzrost poziomu RA w kulturach podów szalwii, który istotnie przewyższał ten raportowany w p -

dach kilkuletnich roślin mącznych rosnących w glebie. Dlatego odkrycia te sugerują, że światło może odgrywać ważną rolę w optymalizacji produkcji metabolitów wtórnych w kulturach roślin.

## Effect of light condition on growth and polyphenol accumulation in *in vitro* cultures of several *Salvia* species

The study evaluated the impact of lighting conditions (blue, red, mixed, white LEDs, and white fluorescent lamps) on the growth and accumulation of polyphenols in shoots of three species of sage cultivated *in vitro*. The compound content was analyzed using the high performance liquid chromatography method. It was found that the response to light varied depending on the plant species. The highest multiplication coefficient was observed for *S. atropatana* and *S. bulleyana* after exposure to white light, with values of *cir.* 6.5 and 4.3, respectively. In the case of *S. viridis*, exposure to blue and mixed LEDs resulted in a similar multiplication coefficient of around 4.5. Blue LEDs and fluorescent lamps were optimal for biomass growth in the latter species; 16 for the fresh biomass index and 14 for the dry biomass. Meanwhile, a similar biomass level for *S. atropatana* and *S. bulleyana* was recorded for all treatments (*cir.* 25) except for red LEDs. The results indicate significant differences in the accumulation of rosmarinic acid (RA) between different species of the *Salvia* genus exposed to different light conditions. *S. viridis* showed the highest accumulation of RA under blue LEDs (9.1 mg/g dw). Meanwhile, *S. atropatana* showed the highest accumulation of this compound during exposure to red LEDs (21 mg/g dw), and *S. bulleyana* to fluorescent lamps (25 mg/g dw). The level of RA in the shoots of *S. viridis* was half lower than in the other two species, but they also accumulated phenylethanoids with dominant verbascoside. Ultimately, optimized light conditions increased the level of RA in the shoot culture of all tested species, which significantly exceeded that reported in the shoots of several-year-old mother plants growing in the soil. Therefore, these findings suggest that light may play an important role in optimizing the production of secondary metabolites in plant cultures.



## Strategia suplementacji egzogennymi prekursorami w produkcji kwasu rozmarynowego w korzeniach włośnikowatych *Salvia bulleyana*

M. KRZEMIŃSKA<sup>1</sup>, A. OWCZAREK-JANUSZKIEWICZ<sup>2</sup>, I. GRZEGORCZYK-KAROLAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

<sup>2</sup>Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

e-mail: izabela.grzegorzczak@umed.lodz.pl

Kwas rozmarynowy (RA) jest jednym z najbardziej rozpoznawalnych i cenionych polifenoli w królestwie roślin. Ze względu na szerokie spektrum działania: potencjał przeciwutleniający, przeciwdrobnoustrojowy, przeciwwzapalny oraz przeciwnowotworowy, RA znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetyce i medycynie. W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na ten związek, coraz większe znaczenie zyskują biotechnologiczne metody otrzymywania wysokiej jakości surowca bogatego w RA. Skuteczną metodą zwiększenia akumulacji związków bioaktywnych w roślinnych kulturach in vitro jest suplementacja egzogennymi prekursorami. Strategia ta zakłada dodatek do podłoża wzrostowego związków biorących udział w szlakach biosyntezy metabolitów wtórnych w celu stymulacji ich produkcji. Jak wykazały wcześniejsze badania, uzyskana przez nas kultura korzeni włośnikowatych *Salvia bulleyana* hodowana w zoptymalizowanych warunkach może być cennym źródłem kwasu rozmarynowego. Celem niniejszej pracy była dalsza stymulacja produkcji RA w tej kulturze poprzez dodatek do podłoża L-tyrozyny (LT), L-feniloalaniny (LP), kwasu kawowego (CA), kwasu *p*-kumarowego (PK) oraz kwasu 4-hydroksyfenylopirogronowego (4HPPA) będących metabolitami szlaku jego biosyntezy. Podłoże wzrostowe suplementowano egzogennymi prekursorami w stężeniu 0,1 oraz 1 mM w 20 dniu hodowli. Zawartość RA po 20 dniach traktowania oceniano z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Poziom kwasu rozmarynowego w materiale roślinnym różnił się w zależności od zastosowanego prekursora i jego stężenia. Najwyższą zawartość RA w korzeniach włośnikowatych *S. bulleyana*

stwierdzono dla traktowania 1 mM HPPR – 80,0 mg/g sm (suchej masy). Była ona o 17% wyższa niż w traktowaniu kontrolnym (68,5 mg/g sm) oraz o ponad 50% wyższa od uzyskanej dla najmniej korzystnego wariantu do wiadczenia – 0,1 mM CA (51,4 mg/g sm). Ostatecznie, osiągnięty w optymalnych warunkach w korzeniach włosowatych poziom RA był 10-krotnie wyższy niż raportowany w korzeniach 2-letniej rośliny macicznej.

## Precursor-feeding strategy for rosmarinic acid production in *Salvia bulleyana* hairy root culture

Rosmarinic acid (RA) is one of the most recognizable and valuable polyphenols in the plant kingdom. Due to its wide spectrum of activities: antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer potential, RA finds applications in the food industry, cosmetology, and medicine. With the increasing demand for RA, biotechnological methods for obtaining high-quality raw material rich in this compound are gaining importance. An effective method for increasing the accumulation of bioactive compounds in plant in vitro cultures is precursor-feeding. This strategy involves supplementing to the growth medium compounds participating in the biosynthesis pathways of secondary metabolites to stimulate their production. As our previous studies have shown, the hairy roots of *Salvia bulleyana* cultivated under optimized conditions can be a valuable source of RA. The aim of this study was to further stimulate RA production in this culture by supplementing the growth medium with L-tyrosine (LT), L-phenylalanine (LP), caffeic acid (CA), *p*-coumaric acid (PK), and 4-hydroxyphenylpyruvic acid (4HPPA), which are metabolites of its biosynthetic pathway. The medium was supplemented with exogenous precursors at concentrations of 0.1 and 1 mM on the 20<sup>th</sup> day of cultivation. The content of RA was evaluated after 20 days of treatment using high performance liquid chromatography. The level of RA in plant material varied depending on the applied precursor and its concentration. The highest RA content in the *S. bulleyana* hairy roots was achieved for treatment with 1 mM HPPR – 80.0 mg/g DW (dry weight). It was 17% higher than in the control treatment (68.5 mg/g DW) and over 50% higher than that obtained for the least favorable experimental variant – 0.1 mM CA (51.4 mg/g DW). Ultimately, the RA level in hairy roots achieved under optimal conditions was ten times higher than reported in the roots of a 2-year-old mother plant.





## Wpływ regulatorów wzrostu na biosyntezę wybranych związków chemicznych u *Coleus scutellarioides* (L.) Benth.

M. JAKOBINA<sup>1</sup>, J. ŁYCZKO<sup>2</sup>, A. SZUMNY<sup>2</sup>, R. GALEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;  
<sup>2</sup>Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy,  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;  
e-mail: maciej.jakobina@upwr.edu.pl

*Coleus scutellarioides* (L.) Benth. to gatunek popularny na świecie, znany ze swoich charakterystycznych, wspaniałych kolorowych liści. Poprzez względną zmienność genetyczną i łatwość tworzenia nowych mieszańców, niezbrudne jest zastosowanie kultur in vitro w przypadku zidentyfikowania interesujących cech. *Coleus scutellarioides* (L.) Benth. odmiany Electric lime hodowano na pożywce MS, prowadzono z dodatkiem regulatorów wzrostu: 6-benzyladeninopuryny (BA), kwas indolilo-3-octowego (IAA), kwas naftylo-1-octowego (NAA), folidon oraz na pożywce kontrolnej bez dodatku fitohormonów. Najlepszym sposobem na mikrorozmnianie okazała się pożywka podstawowa MS wzbogacona kwasem naftylo-1-octowym w stężeniu 0,5 mg dm<sup>-3</sup>. Przeprowadzono analizy chemiczne z zastosowaniem LC-MS/MS oraz SPME-GC/MS roślin pochodzących z kultur in vitro oraz matecznika uprawianego w warunkach in vivo. Wyniki wskazują, że największą zawartość kwasu kawowego i kwasu rozmarynowego występuje w roślinie uprawianej w warunkach in vivo. Zśród zidentyfikowanych związków lotnych stwierdzono najwyższą zawartość 1-octen-3-olu w roślinie uprawianej na pożywce suplementowanej NAA. Najniższą ilość tego związku zaobserwowano w roślinach uprawianych w warunkach in vivo. Również 3-octanol oraz  $\alpha$ -selinen w najwyższej ilości występował w roślinach uprawianych na pożywce z dodatkiem NAA. Najmniej tego związku odnotowano w roślinach uprawianych w warunkach in vivo. Suplementacja folidonem najkorzystniej wpływała na zawartość  $\alpha$ -pinenu i sabinenu. Natomiast najmniejszą ilość tych związków



zidentyfikowano na poziomie z dodatkiem IAA. Najwyższą zawartość kopenu charakteryzowały się rośliny uprawiane na poziomie z dodatkiem NAA, a najmniejszą zidentyfikowano w roślinach pochodzących z poziomu suplementowanej BA. Wyniki wskazują, że dodatek regulatorów wzrostu do podłoża podstawowego w warunkach *in vitro* wpływał na zawartość poszczególnych związków w tkankach. Wyniki wskazują, że dodatek regulatorów wzrostu do podłoża podstawowego w warunkach *in vitro* wpływał na zawartość poszczególnych związków w tkankach, o czym wiadczą istotnie statystycznie różnice w przypadku ilości związków występujących w roślinach uprawianych *in vitro* na poziomie kontrolnej, a z dodatkiem fitohormonów.

## The influence of growth regulators on the biosynthesis of selected chemical compounds in *Coleus scutellarioides* (L.) Benth.

*Coleus scutellarioides* (L.) Benth. is a popular species worldwide, known for its distinctive, magnificently colored leaves. Through its high genetic variability and ease of creating new hybrids, it is necessary to use *in vitro* cultures when traits of interest are identified. *Coleus scutellarioides* (L.) Benth. cultivar Electric lime was grown on MS medium run with the addition of growth regulators: 6-benzyladeninopurine (BA), indolyl-3-acetic acid (IAA), naphthyl-1-acetic acid (NAA), fluridone, and on control medium without the addition of phytohormones. MS basal medium enriched with naphthyl-1-acetic acid at a concentration of 0.5 mg dm<sup>-3</sup> proved to be the best for micropropagation. Chemical analysis using LC-MS/MS and SPME-GC/MS of plants derived from *in vitro* cultures and the mother plant grown under *in vivo* conditions was carried out. The results indicate that the highest content of caffeic acid and rosmarinic acid is found in the plant grown under *in vivo* conditions. Among the identified volatile compounds, 1-octen-3-ol was found to have the highest content in plants bound on NAA-supplemented medium. The lowest amount of this compound was observed in plants grown under *in vivo* conditions. Also 3-octanol and  $\alpha$ -selinene were present in the highest amount in plants grown on NAA-supplemented medium. The least amount of this compound was recorded in plants grown under *in vivo* conditions. Fluridone supplementation had the most favorable effect on the content of  $\alpha$ -pinene and sabinene. In contrast, the lowest amount of these compounds was identified on the medium supplemented with IAA. The highest copene content was found in plants grown on NAA-supplemented medium, while the lowest content was identified in plants derived from BA-supplemented medium. The results indicate that the addition of growth regulators to the basal medium *in vitro* affected the content of individual compounds in the tissues. The results indicate that the addition of growth regulators to the basal medium *in vitro* affected the content of individual compounds in the tissues, as evidenced by statistically significant differences for the amount of compounds present in plants grown *in vitro* on control medium versus with the addition of phytohormones.



## Wpływ kwasu salicylowego na elicytację metabolitów wtórnych w kulturach *Nigella damascena* L.

M. KLIMEK-CHODACKA<sup>1</sup>, J. WYROSTEK<sup>1</sup>, A. SZEWCZYK<sup>2</sup>, R. BARAŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;  
e-mail: m.chodacka@urk.edu.pl

Czarnuszka damasce ska (*Nigella damascena* L.) to jednoroczna ro lin z rodziny jaskrowatych (Ranunculaceae). Pochodzi z rejonu Morza ródziemnego, ale jest uprawiana w wielu regionach wiata, w tym w Polsce. Ceniona jest ze wzgl du na swoje wła ciwo ci lecznicze i ozdobne. Nasiona czarnuszki zawieraj wiele cennych metabolitów wtórnych, m.in. alkaloidy, saponiny, olejki eteryczne i zwi zki fenolowe. Jednak e pozyskiwanie metabolitów wtórnych bezpo rednio ze rodowiska nie zawsze jest łatwe i oplacalne, dlatego coraz popularniejsze jest wykorzystanie kultur ro linnych wraz z traktowaniem komórek za pomoc ró nego rodzaju elicytorów pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego. Stosowanie elicytacji mo e prowadzi do zwi kszenia produkcji warto ciowych zwi zków, co ma du e znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego. Kwas salicylowy (SA) jest naturalnym elicytorem, który odgrywa wa n rol w odpowiedzi ro lin na stres biotyczny i abiotyczny. Wykazano te , e SA stymuluje produkcj ró nych metabolitów wtórnych w wielu gatunkach ro lin. Celem bada było okre lenie wpływu zastosowania SA jako elicytora w st eniach 25, 50 i 75  $\mu\text{M}$  na kultury zawiesinowe *N. damascena*, ich wzrost na po ywce, zawarto suchej masy, profil chemiczny oraz ogóln zawarto zwi zków fenolowych. W wyniku przeprowadzonych bada wykazano, e kwas salicylowy w st eniu 50  $\mu\text{M}$  stymuluje wzrost zarówno wie ej, jak i suchej masy kalusa *N. damascena*. Przy czym procentowa zawarto suchej masy w wie ej masie kalusa nie była zale na od obecno ci elicytora i wynosiła rednio ok. 5%. Aplikacja SA w kulturach in vitro wywarła wpływ na syntez zwi zków fenolowych. St e-

nie 25  $\mu\text{M}$  SA stymulowało ogólną zawartość tych związków w suchej masie kalusa. Zastosowany elicytor powodował również podwyższenie zawartości wybranych kwasów fenolowych. Uzyskano dwukrotny wzrost zawartości kwasu neochlorogenowego, a także odnotowano biosyntezę kwasu wanilinowego, którego nie wykryto w próbie kontrolnej.

Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS, UMO-2022/45/B/NZ7/01478).

## Effect of salicylic acid on the elicitation of secondary metabolites in cultures of *Nigella damascena* L.

*Nigella damascena* L. is an annual plant of the Ranunculaceae family. It is native to the Mediterranean region, but is cultivated in many parts of the world, including Poland. It is valued for its medicinal and ornamental properties. *Nigella* seeds contain many valuable secondary metabolites, including alkaloids, saponins, essential oils and phenolic compounds. However, direct extraction of secondary metabolites from the environment is not always easy or cost effective, so the use of plant cultures together with the treatment of cells with various types of elicitors of both natural and synthetic origin is becoming increasingly popular. The use of elicitation can lead to increased production of valuable compounds, which is of great importance to the pharmaceutical and cosmetic industries. Salicylic acid (SA) is a natural elicitor that plays an important role in the response of plants to biotic and abiotic stresses. SA has also been shown to stimulate the production of various secondary metabolites in many plant species. The aim of this study was to determine the effect of using SA as an elicitor at concentrations of 25, 50 and 75  $\mu\text{M}$  on *N. damascena* callus cultures, their growth on medium, dry weight content, chemical profile and total phenolic compound (PCs) content. The results showed that salicylic acid at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  stimulated the growth of both fresh and dry weight of *N. damascena* callus. At the same time, the percentage of dry weight in the fresh callus was not dependent on the presence of the elicitor. On average, it was about 5%. The application of SA in *in vitro* cultures had an effect on the synthesis of PCs. The total content of these compounds in the dry weight of the callus was stimulated by a concentration of 25  $\mu\text{M}$  SA. The elicitor also increased the content of selected phenolic acids. A twofold increase in the content of neochlorogenic acid was obtained and the biosynthesis of vanillic acid, which was not detected in the control sample, was also recorded.

The research was funded by the National Science Centre (OPUS, UMO-2022/45/B/NZ7/01478).



## *Callitriche cophocarpa* uprawiana w kulturach in vitro jako źródło metabolitów wtórnych o działaniu bakteriobójczym

W. MAKOWSKI<sup>1</sup>, A. KRÓLICKA<sup>2</sup>, J. AUGUSTYNOWICZ<sup>1</sup>, A. SZOPA<sup>3</sup>, P. KUBICA<sup>3</sup>,  
A. KOŁTON<sup>1</sup>, B. TOKARZ<sup>1</sup>, K.M. TOKARZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;  
e-mail: wojciech.makowski@urk.edu.pl

*Callitriche cophocarpa* (rz. 1 długoszyjkowa) jest zimozielon, wysz rolin wodn, powszechnie wystpuje w wodach klimatu umiarkowanego kuli ziemskiej, naleci do rodziny Callitrichaceae (rz. lowatych). Gatunek ten wykorzystywany byl w medycynie ludowej ze wzgl du na swoje wla ciwo ci przeciwzapalne czy antyseptyczne. Dotychczas wykazano, e rz. 1 jest zasobna w zwi zki fenolowe o wla ciwo ciach biologicznie czynnych. Poniewa wystpuje ona powszechnie w wodach zanieczyszczonych i ma zdolno do akumulacji metali ci kich, jej biomasa nie mo e by pozyskiwana ze rodowiska w celu pozyskania zwi zków leczniczych. Z tego wzgl du, celem pracy bylo zbadanie mo liwo ci uprawy ro lin rz. li w ró - nych typach kultur in vitro w celu pozyskania biomasy zasobnej w metabolity wtórne. W kolejnym etapie bada ro liny poddano elicytacji, analizie ftochemicznej oraz zbadano aktywno przeciwbakteryjn uzyskanych ekstraktów. Ro liny uprawiano w po ywkach płynnych stacjonarnych (PPS), po ywkach wytrzsanych (PW) i bioreaktorach zalewowych typu Plantform™ (BZ). Z wykorzystaniem DAD-HPLC oznaczono zawarto kwasów fenolowych i irydoidów w tkankach rz. li. Ro liny poddano równie elicytacji z zastosowaniem zwi kszego st enia sacharozy i obni on

zawartości jonów azotu w pokładkach hodowlanych. Ekstrakty z roślin po elicytacji były badane pod kątem ich działania na bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus* – szczep wzorcowy, wrażliwy i oporny na szereg antybiotyków. Badania wykazały, że uprawa roślin w warunkach PPS i PW prowadzi do efektywnego przyrostu biomasy. *C. cophocarpa* akumuluje znaczne ilości kwasów fenolowych i irydoidów: verbascosydu i loganiny, a elicytacja w warunkach obniżonej zawartości azotu zwiększa poziom syntezy niektórych z nich. Ekstrakty z roślin działają bakteriobójczo na wszystkie trzy testowane szczepy bakterii, a zastosowana elicytacja podnosi efektywność ich działania. Wykazano, że kultury *in vitro* roślin długoszypkowej stanowią bogate źródło biologicznie czynnych metabolitów wtórnych.

### *Callitriche cophocarpa* grown in *in vitro* cultures as a source of secondary metabolites with bactericidal activity

*Callitriche cophocarpa* (water-starwort) is an evergreen, higher aquatic plant, commonly found in temperate waters of the globe, belonging to the Callitrichaceae family. This species was used in folk medicine due to its anti-inflammatory and anti-septic properties. So far, it has been shown that water-starwort is rich in phenolic compounds with biologically active properties. Because it commonly occurs in polluted waters and can accumulate heavy metals, its biomass cannot be obtained from the environment as a source of biologically active compounds. Therefore, the aim of the study was to investigate the possibility of growing *Callitriche* plants in various types of *in vitro* cultures to obtain biomass rich in secondary metabolites. In the next stage of the research, the plants were subjected to elicitation. Phytochemical analysis and the antibacterial activity measurements were performed. Plants were grown in liquid stationary media (SLM), liquid media with rotary shaking (LRS) and temporary immersion bioreactors Plantform™ (TIB). The content of phenolic acids and iridoids in water-starwort tissues was determined using DAD-HPLC. The plants were also subjected to elicitation using an increased concentration of sucrose in the culture media and a reduced content of nitrogen ions. After elicitation, extracts from plants were tested for their bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*: a reference strain, sensitive and resistant to several antibiotics. Research has shown that SLM and LRS induce effective biomass growth. *C. cophocarpa* accumulates significant amounts of phenolic acids and iridoids: verbascoside and loganin. Abiotic elicitation with reduced nitrogen content increases the level of synthesis of some of the examined secondary metabolites. Water-starwort extracts have a bactericidal effect on all three tested bacteria strains, while the elicitation increases their bactericidal properties. It has been shown that *in vitro* cultures of *C. cophocarpa* are a rich source of biologically active secondary metabolites.



## Synteza związków fenolowych w kulturach płynnych i bioreaktorowych rdestowca japońskiego (*Reynoutria japonica* Houtt.) i ich właściwości biologicznie czynne

W. MAKOWSKI<sup>1</sup>, A. KRÓLICKA<sup>2</sup>, J. SROKA<sup>1</sup>, A. MATYJEWICZ<sup>1</sup>, M. POTRYKUS<sup>2</sup>,  
A. SZOPA<sup>3</sup>, P. KUBICA<sup>3</sup>, B. TOKARZ<sup>1</sup>, K.M. TOKARZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;  
e-mail: wojciech.makowski@urk.edu.pl

Rdestowiec japoński (*Reynoutria japonica* Houtt.) należy do rodziny rdestowatych (Polygonaceae) jest rośliną inwazyjną. Jednak w jego tkankach akumulują się duże ilości rozmaitych metabolitów wtórnych z grupy polifenoli, a chińska Farmakopea wskazuje jego liczne właściwości lecznicze. Ponieważ roślina ta często występuje na terenach zdegradowanych i ma zdolność do akumulacji toksycznych substancji z gleby (np. metali ciężkich), jej biomasa nie może być pozyskiwana standardowo do celów leczniczych. Z tego względu głównym celem pracy było zbadanie możliwości uprawy rdestowca w kulturach in vitro oraz syntezy polifenoli w jego partach i korzeniach. Kultury in vitro rośliny wyprowadzono z uyciem pobocznych z kłosa rdestowca japońskiego jako eksplantatów wyjściowych. Po namnożeniu roślin uprawiano w postaci stałej (PS), płynnej z wytrącaniem (PP) i bioreaktorach zalewowych typu Plattform (BZ). Członość roślin została testowo zaaklimatyzowana do warunków ex vitro i była uprawiana w doniczkach z podłożem. Wykonano analizy przyrostu biomasy i zawartości suchej masy roślin uzyskanych w trakcie eksperymentów. Następnie z uyciem metody DAD-HPLC przeprowadzono jako ilościowe i jakościowe analizy zawartości polifenoli w tkankach partów i korzeni. Zbadano także, jak zmienia się potencjał redukujący ekstraktów z roślin rdestowca w zależności od warunków

uprawy. Badania wykazały, że tkanki rdestowca japońskiego zasobne są w kwasy fenolowe i flawonoidy, z których dużą grupę stanowi katechiny. Uprawa w PP i BZ stymulowała wzrost roślin w stosunku do tych uprawianych na PS. Ponadto wykazano, że hodowle PP i BZ indukują zwiększoną syntezę flawonoidów (w tym katechin w pędach i korzeniach badanych roślin), w stosunku do rdestowców z hodowli PS i warunków *ex vitro*. Badania wskazują, że kultury tkankowe roślin *R. japonica* uprawiane w hodowlach PP lub BZ mogą stanowić wydajne źródło biologicznie czynnych metabolitów wtórnych.

## Synthesis of phenolic compounds in liquid and bioreactor cultures of Japanese knotweed (*Reynoutria japonica* Houtt.) and their biologically active properties

Japanese knotweed (*Reynoutria japonica* Houtt.) is an invasive plant belonging to the family Polygonaceae. However, its tissues accumulate large amounts of various secondary metabolites from the polyphenol group, and the Chinese Pharmacopoeia indicates its numerous medicinal properties. This plant often occurs in degraded areas and can accumulate toxic substances from the soil (e.g. heavy metals), its biomass cannot be obtained from natural environment for medicinal purposes. Therefore, the main aim of the study was to investigate the possibility of Japanese knotweed cultivation in *in vitro* conditions. Moreover, accumulation of polyphenols in *R. japonica* shoots and roots was evaluated. *In vitro* plant cultures were derived using lateral buds from the rhizome of Japanese knotweed as starting explants. After multiplication, the plants were grown in solid medium (SM), as the agitated culture (AC) and in temporary immersion bioreactor Plantform™ (TIB). Some of the plants were also acclimatized to *ex vitro* conditions and grown in pots with substrate. Analyses of the biomass growth and dry matter content of plants obtained during the experiments were performed. Then, using the DAD-HPLC method, a qualitative and quantitative analysis of the polyphenol content in shoot and root tissues was performed. It was also examined how the reducing potential of extracts from Japanese knotweed plants changes depending on the cultivation conditions. Results have shown that *R. japonica* tissues are rich in phenolic acids and flavonoids, a mostly catechins. Cultivation in AC and TIB stimulated the growth of plants compared to those grown in SM. Moreover, it was shown that AC and TIB cultures increased synthesis of flavonoids (including catechins in the shoots and roots of the tested plants), compared to knotweed from SM cultures and *ex vitro* conditions. Research indicates that tissue cultures of *R. japonica* plants grown in AC or TIB cultures may constitute an efficient source of biologically active secondary metabolites.





## Kultury in vitro *Gypsophila elegans* i *Agrostemma githago* jako źródło triterpenoidów i flawono-C-glikozydów

W. KOZŁOWSKA<sup>1</sup>, M. DZIWAŁ<sup>2</sup>, D. ZBLEWSKA<sup>2</sup>, M. BIELECKA<sup>2</sup>, M. STAFINIĄK<sup>2</sup>,  
Ł. PECIO<sup>3</sup>, S. PECIO<sup>3</sup>, R. GEVRENOVA<sup>4</sup>, W. KORZENIOWSKA<sup>2</sup>,  
I. NAWROT-HADZIK<sup>2</sup>, A. WENG<sup>5</sup>, F. BÜLOW<sup>5</sup>, A. MATKOWSKI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

<sup>2</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;

<sup>3</sup>Zakład Biochemii i Jakości Plonów, IUNG-PIB, Puławy;

<sup>4</sup>Zakład Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej, Sofijski Uniwersytet Medyczny, Sofia;

<sup>5</sup>Zakład Biologii Farmaceutycznej, Wolny Uniwersytet w Berlinie, Dahlem;

<sup>6</sup>Pracownia Eksperymentalnych Techniki Uprawy Ziół, Ogród Botaniczny Roślin Leczniczych,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;  
e-mail: pharmaceutical.biology@wp.eu

Rośliny z rodziny Caryophyllaceae są znane z bogatego składu saponin triterpenowych i C-glikozydów flawonowych. Saponiny, które mają cząsteczki tworzone przez gipsogenin lub kwasy gipsogenowy, oleanolowy oraz kwilajowy, występują w różnych organach roślinnych i uważane są za główne związki biologicznie czynne roślin leczniczych z tej rodziny. Z kolei flawonoidy, takie jak orientyna, witeksyna i ich pochodne, występują głównie w częściach nadziemnych i mimo to były opisywane w literaturze farmaceutycznej od dawna z ich znanej bioaktywności, są słabiej zbadane pod względem mechanizmów regulacji ich biosyntezy. W niniejszych badaniach, wykorzystywane są kultury in vitro dwóch gatunków: *Agrostemma githago* L. (kukieł polny) i *Gypsophila elegans* M.Bieb. (gipsówka błyszcząca), które zostały wybrane z powodu obecności acetylowanych saponin o wysokim potencjale permeabilizacji błon komórkowych. Kultury kallusowe, zawieszinowe, powłokowe i korzeniowe były hodowane w pojemnikach szklanych na podłożach stałych, za



na po ywkach plynnych byly skalowane od kolb hodowlanych 300 mL do bioreaktorów okresowego zanurzenia (systemy RITA i Plantform). Analiza f tochemiczna byla prowadzona technikami HPLC i LC-MS i potwierdzila w badanym materiale obecno orientyny, izorientyny oraz co najmniej kilku saponin triterpenowych w ilo ciach zró nicowanych w ró nych systemach hodowli. Wplyw podlo a oraz sposobu hodowli byl istotny, jednak e potrzebne s dalsze badania w celu zidentyfikowania czynnikó wplywaj cych na ilo ciowe i jako ciowe ró nice w zawarto ci poszczególnych metabolitów. Ponadto uzyskane wysokie przyrosty biomasy w bioreaktorach wskazuj na mo liwo biotechnologicznej produkcji C-glikozydów f awonowych (orientyny) i acetylowanych bidesmozydów kwasu kwillaowego.

Badania s finansowane z mi dzynarodowego projektu badawczego NCN-DFG 2020/39/I/NZ7/01515 (RIPSAPO) „Regulation of a plant-based synergistic toxicity between triterpene saponins and ribosome-inactivating proteins”.

### Triterpenoids and C-glycosylated flavones in in vitro cultures of *Gypsophila elegans* and *Agrostemma githago*

Plants belonging to the Caryophyllaceae are know to contain diverse triterpenoid saponins and f avone- C-glycosides. The former are based on pentacyclic hydroxylated aglycons such as gypsogenin and gypsogenic, oleanolic and quillaic acids and are typically present in all plant organs. These constituents are considered major bioactive principle in numerous medicinal plants of this family. On the other hand, f avonoids, such as orientin, vitexin and their analogs are concentrated in aerial parts but the regulation of their biosynthesis is less studied, despite their high pharmacological potential. For studying the phytochemical profiles under in vitro conditions we used two species, *Agrostemma githago* L. and *Gypsophila elegans* M.Bieb. known to contain acetylated saponins able to permeabilize cell membranes. The callus, cell suspensions, shoots and roots were cultured in glass containers for solid media and scaled up from 300 mL culture flasks to temporary immersion systems (RITA and Plantform). The phytochemical profile was obtained using HPLC and LC-MS and confirmed a presence of orientin and isoorientin as well as several saponins in various in vitro culture types. The influence of media composition and culture system was significant and indicates a need of further studies to understand the key factors influencing the quantity and diversity of both classes of specialized metabolites. Moreover, the high biomass growth in the temporary immersion systems provides a potential biotechnological source of bioactive f avone- C-glycosides and specifically acting acetylated quillaic acid bidesmosides.

Acknowledgements: This study is funded by the international project of the NCN and the DFG # 2020/39/I/NZ7/01515 (RIPSAPO) “Regulation of a plant-based synergistic toxicity between triterpene saponins and ribosome-inactivating proteins”.



## Aktywność przeciwbakteryjna *Drosera cayenensis*, *Drosera derbyensis* i *Drosera ultramafica* hodowanych w kulturach in vitro

S. RUGIEŃ<sup>1</sup>, A. KRÓLICKA<sup>1</sup>, M. THIEL<sup>2</sup>, M. POTRYKUS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

<sup>2</sup>Pracownia Struktury Biopolimerów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;  
e-mail: marta.potrykus@ug.edu.pl

*Drosera cayenensis*, *Drosera derbyensis* oraz *Drosera ultramafica* s ro linami owado-  
emnymi nale cymi do rodziny Droseraceae. Ro liny owado emne mog by cennym  
ródlem metabolitów wtórnych, które wykazuj aktywno przeciwnowotworow ,  
przeciwzapaln , przeciwbakteryjn , a nawet przeciwwirusow . *D. cayenensis* pocho-  
dzi z Ameryki Południowej i rodkowej i ro nie na tropikalnych sawannach, nato-  
miast *D. derbyensis* naturalnie wyst puje w zachodniej Australii na terenach okreso-  
wo zalewanej sawanny. Z kolei naturalne wyst powanie *D. ultramafica* jest zwi zane  
z glebami zasadowymi, skałami magmowymi i z terenami górskimi. Przedstawione  
badania miały na celu okre lenie, który gatunek *Drosera* wykazuje najwy sz aktyw-  
no przeciwbakteryjn w stosunku do wybranych bakterii G(-) oraz zbadanie, czy  
na t aktywno ma wpływ ró ny sposób hodowli ro lin owado emnych.

Hodowl ro lin prowadzono w po ywce płynnej oraz w hodowli okresowo-za-  
lewowej Plantform™. Nast pnie sprawdzano aktywno przeciwdrobnoustrojow  
ekstraktów z tkanek ro lin uzyskanych z wy ej wymienionych hodowli metod  
wysalania z wykorzystaniem tetrahydrofuranu oraz metod ekstrakcji wodnej.  
Aktywno przeciwbakteryjn ekstraktów sprawdzono przeciwko bakteryjnym  
patogenom człowieka z gatunku *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*.  
W ekstrakcie z hodowli okresowo-zalewowej Plantform™ okre lono zawarto  
głównego naftochinonu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatograf i cie-

czowej oraz porównano profile metabolitów wtórnych zawartych w ekstraktach z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej. Ekstrakty uzyskane z tkanek roślin hodowanych w różnego typu hodowlach *in vitro* zawierały metabolity wtórne, a ich głównym składnikiem były naftochinony: plumbagina lub ramentaceon. Najwyśz aktywno przeciwbakteryjn wykazywały ekstrakty pozyskane z tkanek *D. derbyensis*. Wszystkie badane gatunki roślin owado ernych zaadoptowały si do wzrostu w hodowli typu Plantform™, a przyrost biomasy był około 3-krotnie szybszy w porównaniu z hodowl plyn .

### Antibacterial activity of *Drosera cayenensis*, *Drosera derbyensis* and *Drosera ultramafica* grown in *in vitro* cultures

*Drosera cayenensis*, *Drosera derbyensis* and *Drosera ultramafica* are insectivorous plants belonging to the Droseraceae family. Insectivorous plants can be a valuable source of secondary metabolites that have anticancer, anti-inflammatory, antibacterial and even antiviral activity. *D. cayenensis* comes from South and Central America and grows in tropical savannah, while *D. derbyensis* naturally occurs in Western Australia in areas of periodically flooded savannah. In turn, the natural occurrence of *D. ultramafica* is associated with alkaline soils, igneous rocks and mountainous areas.

The presented research aimed to determine which *Drosera* species exhibits the highest antibacterial activity against selected G(-) bacteria and to investigate whether this activity is influenced by different methods of plants cultivation.

Plants were cultivated in liquid medium and in temporary immersion bioreactors Plantform™. Then, the antimicrobial activity of plant tissue extracts obtained from the above-mentioned cultures were prepared using the salting-out method with tetrahydrofuran and the water extraction method. The antibacterial activity of the extracts was tested against human bacterial pathogens from *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* species. In the extract from the temporary immersion bioreactors Plantform™, the content of the main naphthoquinone was determined using high-performance liquid chromatography and the profiles of secondary metabolites contained in the extracts were compared using thin-layer chromatography. Extracts obtained from plant tissues grown in various types of *in vitro* cultures contained secondary metabolites, and their main components were naphthoquinones: plumbagin or ramentaceone. The highest antibacterial activity was demonstrated by extracts obtained from *D. derbyensis* tissues. All tested species of insectivorous plants adapted to growth in Plantform™ bioreactors, and the biomass growth was about three times faster compared to liquid culture.



## Wpływ temperatury na biosyntezę alkaloidów Amaryllidaceae w kulturach in vitro *Leucojum aestivum* L.

A. PTAK<sup>1</sup>, M. WARCHOŁ<sup>2</sup>, E. MORAŃSKA<sup>3</sup>, A. BŁAŻEJCZAK<sup>1</sup>, D. LAURAIN-MATTAR<sup>4</sup>,  
F. DUPIRE<sup>5</sup>, R. SPINA<sup>4</sup>, M. SIMLAT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

<sup>3</sup>Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>4</sup>Université de Lorraine, INRAE, Nancy;

<sup>5</sup>Université de Lorraine, CNRS, Nancy;

e-mail: agata.ptak@urk.edu.pl

nie ycaletnia (*Leucojum aestivum* L.) jest wa n ro lin lecznicz . Stanowi ona cenne ródło alkaloidów Amaryllidaceae: galantaminy i likoryny. Galantamina wykorzystywana jest w leczeniu choroby Alzheimera. Natomiast likoryna obj ta jest badaniami klinicznymi pod k tem zwalczania nowotworów. Celem pracy było okre lenie optymalnej temperatury do wzrostu ro lin nie ycy letniej oraz biosyntezy alkaloidów w warunkach in vitro. Kultury ro linne prowadzono na po ywce stałej według Murshige i Skoog'a, wzbogaconej w 5  $\mu$ M zeatyny. Ro liny wzrastały w komorze klimatycznej w temperaturach: 15°C, 20°C, 25°C i 30°C przez 4 tygodnie. Przeprowadzone badania wykazały, i temperatura 25°C działała korzystnie na wzrost i rozwój ro lin nie ycy letniej. Biosynteza galantaminy stymulowały natomiast temperatury 20°C i 30°C (zawarto ci: 107,4  $\mu$ g/g suchej masy (s.m.), 104,1  $\mu$ g/g s.m.), za dla biosyntezy likoryny najkorzystniejsze były temperatury 15°C i 30°C (zawarto ci: 269,5  $\mu$ g/g s.m., 268,8  $\mu$ g/g s.m.). Ponadto najoptymalniejsza dla biosyntezy obu badanych alkaloidów temperatura 30°C istotnie zwi kszała ekspresj genów *N4OMT* oraz *CYP96T1*. Gen *N4OMT* zaanga owany jest w przemiany prekursora alkaloidów Amaryllidaceae: norbelladyny do 4-O-metylnorbelladyny, a gen *CYP96T1* koduje mi dzy innymi enzymy odpowiedzialne za konwersj 4-O-metylnorbelladyny do galantaminy lub likoryny.

Badania były finansowane z Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich na lata 2014- 2020, Działanie 16 „Współpraca”.

## The effect of temperature on the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in in vitro cultures of *Leucojum aestivum* L.

Summer snowflake (*Leucojum aestivum* L.) is an important medicinal plant, as it is a valuable source of the Amaryllidaceae alkaloids: galanthamine and lycorine. Galanthamine is used to treat Alzheimer's disease, while lycorine is the subject of clinical trials aimed at fighting cancer. The aim of the study was to determine the optimal temperature for the growth of summer snowflake plants and the biosynthesis of galanthamine and lycorine in vitro. Plant cultures were cultivated on a solid Murashige and Skoog medium enriched with 5  $\mu$ M zeatin. The plants were grown in a climatic chamber at temperatures of 15°C, 20°C, 25°C and 30°C for 4 weeks. Our research showed that a temperature of 25°C had a beneficial effect on the growth and development of the summer snowflake plants. The biosynthesis of galanthamine was stimulated by temperatures of 20°C and 30°C (content: 107.4  $\mu$ g/g dry weight (DW), 104.1  $\mu$ g/g DW), while the most favourable temperatures for lycorine biosynthesis were 15°C and 30°C (content: 269.5  $\mu$ g/g DW, 268.8  $\mu$ g/g DW). Moreover, the optimal temperature for the biosynthesis of both tested alkaloids, 30°C, significantly increased the expression of the *N4OMT* and *CYP96T1* genes. The *N4OMT* gene is involved in the transformation of norbelladine, which is the precursor of Amaryllidaceae alkaloids, to 4-O-methylnorbelladine, whereas the *CYP96T1* gene encodes, among others, the enzymes responsible for the conversion of 4-O-methylnorbelladine to galanthamine or lycorine.

Presented studies were sponsored by Rural Development Programme 2014- 2020, Measure 16 “Cooperation”.



## Wpływ płynnego podłoża i światła LED na namnażanie pędów *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. i produkcję kwasów kawoilochinowych

E. SKAŁA<sup>1</sup>, M.A. OLSZEWSKA<sup>2</sup>, A. KICEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

<sup>2</sup>Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;

e-mail: ewa.skala@umed.lodz.pl

*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. (szczodrak krokoszowaty) (Asteraceae) jest endemitem występującym w Azji (Syberia, Mongolia). W medycynie tradycyjnej stosowany jest podczas rekonwalescencji po przebytych chorobach. Surowiec stanowi kłose wraz z korzeniami (*Rhapontici carthamoidis rhizomata cum radicibus*). Celem pracy było opracowanie wydajnej metody namnażania szczodraka w kulturze in vitro oraz pozyskiwania cennych kwasów kawoilochinowych. Podymnażano z wierzchołkowych części pędu w płynnym podłożu Murashige i Skoog'a uzupełnionym kwasem idolilo-3-octowym (0,1 mg/L) i 6-benzylaminopuryn (0,5 mg/L) i hodowano przy oświetleniu lampami LED (*light emitting diodes*) (wiatło białe, niebieskie, czerwone i mieszane (wiatło czerwone i niebieskie w proporcji 7:3) z zastosowaniem fotoperiodu, 16 h wiatło/8 h ciemno). Zawartość metabolitów wtórnych w wodno-metanolowych (80% v/v) ekstraktach z pędów określono metodą HPLC-PDA. Długość fali świetlnej wpływała zarówno na proliferację pędów szczodraka, jak i akumulację kwasów fenolowych. Najwyższy współczynnik namnażania (7,6 pędów i pędów z jednego eksplantatu) osiągnięto podczas ekspozycji pędów na wiatło niebieskie. Podczas hodowli w tych warunkach pody były najdłuższe (3,4 cm) oraz były dobrej jakości. Jedynie 9% z nich wykazywało zjawisko szklistości. Zawartość kwasów fenolowych w pędach hodowanych na wiatle LED wahała się w granicach 2–6 mg/g suchej masy (s.m) i osiągała najwyższą wartość na wiatle niebieskim. W pędach zidentyfikowano 10 kwasów kawoilochinowych (kwas chlorogenowy, kwas 3-O-kawoilochinowy, kwas 4-O-kawoilochinowy, kwas

3,5-*O*-dikawoilochinowy, kwas 4,5-*O*-dikawoilochinowy, 3,4-*O*-dikawoilochinowy, kwas 1,5-*O*-dikawoilochinowy oraz wst. pnie zidentyfikowane 3 pochodne kwasów kawoilochinowych). Niezależnie od długości fali świetlnej, pochodne kwasów monokawoilochinowych stanowiły główną klasę związków z dominującym kwasem chlorogenowym, którego najwyższe stężenie odnotowano na świetle mieszanym, czerwonym i niebieskim (3 mg/g s.m.). Dominującymi metabolitami wtórnymi były także kwas 3,5-*O*-dikawoilochinowy i kwas 4,5-*O*-dikawoilochinowy, których najwyższe poziomy osiągnięto na świetle niebieskim.

## The effect of liquid medium and LED lights on *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. shoot propagation and caffeoylquinic acid production

*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. (Asteraceae) is an endemic plant found in Asia (Siberia, Mongolia). In traditional medicine, it has been used for treating physical fatigue and weakness after illness. The raw material is the rhizome and roots (*Rhaponticum carthamoides rhizomata cum radicibus*). The work aimed to develop an efficient procedure of *R. carthamoides* shoot micropropagation in in vitro culture and obtain valuable caffeoylquinic acids. Shoots were propagated from the shoot tips in liquid Murashige and Skoog medium supplemented with indole-3-acetic acid (0.1 mg/L) and 6-benzylaminopurine (0.5 mg/L) under LED lights (*light emitting diodes*) (white, blue, red and combination of red and blue light (in a 7:3 ratio), 16/8-hour light/dark photoperiod). The content of the secondary metabolites in 80% (v/v) aqueous methanol extracts of shoots was determined using HPLC-PDA method. LED lights influenced both the proliferation rate of shoots and the accumulation of phenolic acids. The highest multiplication rate (7.6 buds and shoots from one explant) was achieved when the shoots were exposed to blue light. In this condition, the shoots were longest (3.4 cm) and were of good quality. Only 9% of them showed hyperhydricity symptoms. The content of phenolic acids in shoots grown under LED lights ranged from 2–6 mg/g of dry weight (DW) and reached the highest value under blue light. Ten caffeoylquinic acids were identified in the shoots (chlorogenic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and three tentatively identified caffeoylquinic acid derivatives). The mono-caffeoylquinic acid derivatives were the main class of compounds (regardless of LED lights) with the dominant chlorogenic acid. The highest content of chlorogenic acid was recorded under mixed red and blue light (3 mg/g DW). The dominant secondary metabolites were also 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid which the highest levels were achieved under blue light.





## Badania metabolomiczne kalusa i zawiesiny komórkowej bazylii (*Ocimum basilicum* L.)

D. JAKOVLJEVIĆ<sup>1</sup>, D. KRUSZKA<sup>2</sup>, P. WALIGÓRSKI<sup>3</sup>, M. WARCHOŁ<sup>3</sup>, E. SKRZYPEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii i Ekologii, Uniwersytet w Kragujevacu, Serbia;

<sup>2</sup>Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań;

<sup>3</sup>Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

e-mail: dragana.jakovljevic@pmf.kg.ac.rs

Organizmy ywe charakteryzuj si niezwykle zło onym składem (nie mniej ni kilkadziesi t tysi cy zwi zków chemicznych). Wiele z nich zaangażowanych jest w przemiany, którym organizmy te podlegaj podczas ycia, a badania nad dynamik tych przemian mog udzieli niezwykle cennych informacji. Dotychczas u ywane metody analityczne zaliczane s do tzw. analiz ukierunkowanych, gdzie widoczne s głównie zwi zki chemiczne b d ce celem analizy, za pomijane (a cz sto niewidoczne) s wszystkie inne zwi zki chemiczne. Efektem tego jest pomijanie w wynikach eksperymentów szeregu nieprzewidzianych wcze niej i cz sto bardzo interesuj cych efektów. Jedn z metod rozwi zania tych problemów jest metabolomika, gdzie badany materiał jest rozdzielany za pomoc metod chromatograficznych (np. HPLC), a nast pnie otrzymane zwi zki chemiczne wykrywane i identyfikowane s za pomoc wysokorozdzielczej spektrometrii masowej. Tak otrzymane wyniki konfrontuje si z dost pnymi bazami danych, co pozwala w wielu przypadkach na identyfikacj nawet kilkuset zwi zków chemicznych w jednej próbce. W naszych badaniach skupili my si na identyfikacji metabolitów wtórnych w kulturach in vitro kalusa i zawiesin komórkowych bazylii (*Ocimum basilicum* L.). W oparciu o technik UPLC-HESI-HRMS/MS odnotowano prawie dwa tysi ce zwi zków chemicznych w badanym materiale. Unikalne widma izotopowe i fragmentacyjne MS/MS pozwoliły na identyfikacj to samo ci wykrytych zwi zków, przy uyciu programu MS-DIAL. Spo ród wszystkich 1949 zidentyfikowanych metabolitów 60 zalicza si do zwi zków fenolowych. Wi kszo spo ród nich zalicza si do fawonoidów (33%),



glikozydów (29%) i triterpenoidów (21%). Lista potwierdzonych metabolitów wtórnych z grupy związków fenolowych umieszczona jest w internetowej bazie danych, która może służyć do wykonywania ukierunkowanych analiz w dalszych badaniach metabolitów wtórnych bazylii z wykorzystaniem kultur tkankowych. Ciekawym kierunkiem dalszych badań byłoby również porównanie otrzymanych wyników metabolomicznych z danymi z transkryptomiki i proteomiki.

## Untargeted metabolomics of basil (*Ocimum basilicum* L.) callus and cell suspension cultures

Living organisms are characterized by an extremely complex composition (no less than several dozen thousand chemical compounds). Many of them are involved in the changes that these organisms undergo during life, and research on the dynamics of these changes can provide extremely valuable information. The analytical methods used so far are classified as so-called targeted analyses, where mainly the chemical compounds that are the target of the analysis are visible, while all other chemical compounds are omitted (and often invisible). The result is that a number of previously unforeseen and often very interesting effects are omitted from the experimental results. One of the methods to solve these problems is metabolomics, where the tested material is separated using chromatographic methods (e.g. HPLC), and then the obtained chemical compounds are detected and identified using high-resolution mass spectrometry. The results obtained in this way are compared to available databases, which in many cases allows for the identification of up to several hundred chemical compounds in one sample. In our research, we focused on the identification of secondary metabolites in *in vitro* cultures of callus and cell suspensions of basil (*Ocimum basilicum* L.). Based on the UPLC-HESI-HRMS/MS technique, almost two thousand chemical compounds were recorded in the tested material. Unique isotope and fragmentation MS/MS spectra allowed for the identification of the identity of the detected compounds using the MS-DIAL program. Of all 1949 identified metabolites, 60 are phenolic compounds. Most of them are flavonoids (33%), glycosides (29%) and triterpenoids (21%). A list of confirmed secondary metabolites from the group of phenolic compounds is also included in an online database, which can be used to perform targeted analyses in further studies of basil secondary metabolites using tissue cultures. An interesting direction for further research would be to combine the obtained metabolomics results with data from transcriptomics and proteomics.



## Wpływ primingu na zmiany w profilu chemicznym ekstraktów z korzeni transgenicznych *Taxus × media*

K. SYKŁOWSKA-BARANEK<sup>1</sup>, A. SZAKIEL<sup>2</sup>, K. PAŁCZYŃSKA<sup>1</sup>, P. ZAKRZEWSKI<sup>1</sup>,  
M. JEZIOREK<sup>1</sup>, A. PIETROSIUK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny;

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Roślin, Uniwersytet Warszawski;  
e-mail: katarzyna.syklowska-baranek@wum.edu.pl

Priming jest swoistym rodzajem odpowiedzi humoralnej wykształconym przez rośliny. Zjawisko to polega na indukcji fizjologicznego stanu organizmu, w którym roślina zostaje przysposobiona do superaktywacji reakcji obronnych w momencie ekspozycji na stresor. Priming umożliwia szybszą i silniejszą reakcję na czynnik stresowy. Badania molekularnych mechanizmów primingu u roślin wykazały zmiany w strukturze chromatyny oraz ekspresji genów kodujących czynniki sygnałowe – receptory rozpoznające wzór. Ponadto, zaobserwowano akumulację metabolitów i innych czynnika zaangażowanych w utrzymanie odpowiedzi na bodźce wywołujące, którymi są substancje chemiczne (np. kwas  $\beta$ -aminomasłowy (BABA), kwas salicylowy, kwas pipedolowy, kwas jasmonowy, lotne związki organiczne), patogeny, owady roślinne oraz inne sygnały środowiskowe. Wykształca się również pewnego rodzaju pamięć, która przechowuje informacje o zainicjowaniu primingu. Rośliny poddane procesowi primingu, uzyskują zdolność do szybszej i silniejszej aktywacji pod wpływem bodźca stresowego. Aktywacja ta trwa także dłużej. W hodowlach dwóch linii korzeni transgenicznych *Taxus × media* przeprowadzono badania nad wpływem primingu i następnie elicytacji na zmiany w profilu chemicznym oraz ilościowym taksanów oraz związków sterolowych. Zastosowanym związkiem primującym był BABA w stężeniu 1 mM, działający przez 7 dni, po którym hodowle elicytowano 100  $\mu$ M jasmonianu metylu. Zastosowana strategia wywołała zmiany ilościowe badanych związków w hodowli korzeni transgenicznych *Taxus × media*.

## The effect of priming strategy on chemical profile of *Taxus × media* hairy root extracts

Being constantly exposed to various biotic and abiotic stressors, plants evolved innate immunity systems which are composed of structural barriers and inducible defence responses, including defence gene expression and phytoalexin production, as well as constitutive secondary metabolite accumulation, to cope with pathogen attacks. The recognition of certain signals from their environment (microbes, pathogens, abiotic stress, chemical compounds) results in cells triggering to the primed state of long-lasting and enhanced defence, both in affected and untreated (naïve) parts of the plant. Once primed, plants are capable of exerting faster and more pronounced responses to different stressors. Two lines of *Taxus × media* hairy roots were subjected to priming with 1 mM of  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA), a non-protein amino acid, followed by elicitation with 100  $\mu$ M of methyl jasmonate. The applied strategy resulted in significant changes in the total concentration of investigated compounds biosynthesised in *Taxus × media* transgenic roots.



## Profil fitochemiczny oraz aktywność biologiczna ekstraktów z różnych typów kultur in vitro *Schisandra sphenanthera*

A. SZOPA<sup>1</sup>, M. GAŁĄZKA<sup>1</sup>, K. JAFERNIK<sup>1</sup>, P. KUBICA<sup>1</sup>, I. SADOK<sup>2</sup>, M. DZIURKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Jagielloński – Collegium Medicum, Kraków;

<sup>2</sup>Katedra Chemii, Instytut Nauk Biologicznych,

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin;

<sup>3</sup>Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

e-mail: a.szopa@uj.edu.pl

Obiektem badań był endemiczny dla prowincji Syczuan (Chiny), znany z tradycyjnej medycyny chińskiej gatunek rodzaju *Schisandra* – *Schisandra sphenanthera* Rehder & E.H. Wilson. Jest on pokrewny farmakologicznie gatunkowi – *S. chinensis* (cytryniec chiński). W ramach pracy po raz pierwszy zainicjowano kultury podłojowe, kalusowe i zawieszinowe *S. sphenanthera*. Testowano dwa warianty podłoża hodowlanego MS zawierające 1 mg/l BA i 1 mg/l IBA (wariant A) oraz 2 mg/l BA i 1 mg/l IBA (wariant B), oraz czas trwania hodowli równy 30 i 60 dni. W celach porównawczych analizowano ekstrakty z liści roślin macierzystych. Na podstawie przeprowadzonej analizy UHPLC-ESI-MS/MS oznaczono jako ciowo i ilość ciowo związków z grupy: lignanów dibenzocyklooktadienowych (schisanteryne A i B, schisandryny, schisandryny C, gomisyne A, D, G, J, N, O, 6-O-benzoylgomisyne O, schisandryny A, rubrischisandryny A, epigomisyne O, schisanhenolu), lignanów aryltetralinowych (wulignan A<sub>1</sub>) i neolignanów (licaryny A). Uzyskane najwyższe, całkowite zawartości lignanów wynosiły dla kultur mikropodłojowych – 485,04 mg/100 g s.m. (wariant A, 30 dni), dla kultur kalusowych – 43,3 mg/100 g s.m. (suchej masy) (wariant A, 30 dni) oraz dla kultur zawieszinowych – 31,97 mg/100 g s.m. (wariant B, 60 dni). Dominującymi ilościami związków były: schisanteryne A (maks. 118,87 mg/100 g s.m.) i schisanteryne B (maks. 122,84 mg/100 g s.m.). Ponadto oznaczono potencjał antyoksydacyjny (testami CUPRAC, FRAP i DPPH), oraz aktywność przeciwpalną

(testami inhibicji 15-LOX, COX-1, COX-2 i sPLA2) ekstraktów z kultur eksperymentalnych oraz liści rośliny macierzystej. Uzyskane wyniki mają charakter innowacyjny w skali ogólnie światowej i wskazują na dużą konkurencyjność ekstraktów z kultur *in vitro* w stosunku do materiału *in vivo*.

## Phytochemical profile and biological activity of extracts of *Schisandra sphenanthera* different types in vitro culture

The object of the research was a species of the *Schisandra* genus endemic to the Sichuan province (China), known from traditional Chinese medicine – *Schisandra sphenanthera* Rehder & E.H. Wilson. It's related to the pharmacopoeial species – *S. chinensis* (Chinese schisandra). As part of the work, microshoot, callus and suspension cultures of *S. sphenanthera* were initiated for the first time. Two variants of MS culture medium containing 1 mg/l BA and 1 mg/l IBA (variant A) and 2 mg/l BA and 1 mg/l IBA (variant B) were tested, and the culture duration was 30 and 60 days. For comparative purposes, the extracts from the leaves of parent plants were analyzed. Based on the UHPLC-ESI-MS/MS analysis, compounds from the group of dibenzocyclooctadiene lignans (schisantherin A and B, schisandrin, schisandrin C, gomisin A, D, G, J, N, O, 6-O-benzoylgomisin O, schisandrin A, rubrischisandrin A, epigomisin O, schisanhenol), aryltetralin lignans (wulignan A,) and neolignans (licarin A), were qualitatively and quantitatively determined. The highest total lignan content was indicated for microshoot cultures – 485.04 mg/100 g DW (dry weight) (variant A, 30 days), for callus cultures – 43.3 mg/100 g DW (variant A, 30 days) and for suspension cultures – 31.97 mg/100 g DW (variant B, 60 days). The quantitatively dominant compounds were: schisantherin A (max. 118.87 mg/100 g DW) and schisantherin B (max. 122.84 mg/100 g DW). Additionally, the antioxidant potential (CUPRAC, FRAP and DPPH tests) and anti-inflammatory activity (15-LOX, COX-1, COX-2 and sPLA2 inhibition tests) of extracts from experimental cultures and leaves of the parent plant were performed. The obtained results are innovative on a global scale and indicate high competitiveness of extracts from *in vitro* cultures compared to *in vivo* material.



## Wpływ jonów metali na biosyntezę bioaktywnych polifenoli w kulturach pędów *Dracocephalum forrestii*

I. WEREMCZUK-JEŻYNA, L. CZAJKOWSKA

Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;  
e-mail: izabela.weremczuk-jezyna@umed.lodz.pl

*Dracocephalum forrestii* (Lamiaceae) jest chi sk ro lin lecznicz o zastosowaniu przeciwzapalnym, ci gaj cym i moczop dnym. Aktywno biologiczna gatunku wynika głównie z obecno ci zwi zków polifenolowych. Bogatym ich ródłem, szczególnie kwasu rozmarynowego (RA) i salwianolowego B (SAB), s kultury in vitro p - dów *D. forrestii*. Niniejsza praca jest prób zwi kszczenia skali hodowli oraz produkcji kwasów fenolowych w p dach in vitro tego gatunku, hodowanych w bioreaktorze czasowo zanurzeniowym typu Rita, w warunkach stresu wywołanego obecno ci metali ci kich ( $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ). P dły rosły w płynnym podło u Murashige i Skoog'a z 0,5 mg/L BAP i 0,2 mg/L IAA. Metale w postaci soli ( $AgNO_3$ ,  $CdCl_2$ ,  $CoCl_2$ ) były dodawane do podło a w st eniu 25 lub 50  $\mu M$  w 11 dniu cyklu wzrostu. Zawarto fenolokwasów oznaczano w metanolowo-wodnych ekstraktach (8:2 v/v) metod HPLC. Najkorzystniejszy wpływ na wzrost kultury miało srebro w st eniu 50  $\mu M$ . Biomasa p dów rosn cych w tych warunkach była ponad dwukrotnie wy sza ni p - dów kontrolnych i wynosiła 11,5 g/bioreaktor ( wie a masa) i 1,2 g/bioreaktor (sucha masa). Równie to traktowanie było najbardziej efektywne dla biosyntezy kwasu rozmarynowego (9,6 mg/g suchej masy). Produktywno RA w przeliczeniu na bioreaktor i liter kultury wynosiła odpowiednio 12,3 mg i 49,2 mg. Natomiast akumulacja kwasu salwianolowego B pobudzał przede wszystkim kobalt w st eniu 25  $\mu M$ . Zawarto SAB w tych warunkach osi gni ła poziom 1,5 mg/g suchej masy, 1,8 mg/bioreaktor i 7 mg/L kultury. W porównaniu z kontrol , produktywno obu zwi zków była prawie dwukrotnie wy sza. Chocia zawarto innych kwasów fenolowych nie przekraczała 1 mg/g suchej masy, ich produkcja była równie istotnie stymulowana obecno ci metali w podło u; w tym zakresie najsilniej działały srebro oraz kadm.

## Effect of metal ions on biosynthesis of bioactive polyphenols in shoot cultures of *Dracocephalum forrestii*

*Dracocephalum forrestii* (Lamiaceae) is a Chinese medicinal plant with anti-inflammatory, astringent and diuretic properties. The biological activity of the species results mainly from the presence of polyphenolic compounds. In vitro shoot culture of *D. forrestii* turned out to be a rich source of these compounds, particularly rosmarinic acid (RA) and salvianolic acid B (SAB). The aim of this study was to increase the scale of cultivation and in vitro production of phenolic acids in shoots of this species grown in a temporary immersion bioreactor Rita under stress caused by the presence of heavy metals ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ). The shoots were grown in Murashige and Skoog's liquid medium with 0.5 mg/L BAP and 0.2 mg/L IAA. Metals in the form of salts ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ) were added to the medium at a concentration of 25 or 50  $\mu\text{M}$  on day 11 of the growth cycle. The content of phenolic acids was determined in methanol-water extracts (8:2 v/v) by HPLC. Silver at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  had the most beneficial effect on culture growth. The biomass of shoots growing in these conditions was more than twice as high as that of control shoots and amounted to 11.5 g/bioreactor (FW) and 1.2 g/bioreactor (DW). This treatment was also the most effective for the biosynthesis of RA (9.6 mg/g DW). RA productivity was 12.3 mg/bioreactor and 49.2 mg/L of culture. However, the accumulation of SAB was stimulated primarily by 25  $\mu\text{M}$  cobalt. SAB content under these conditions reached 1.5 mg/g DW, 1.8 mg/bioreactor and 7 mg/L of culture. The productivity of both compounds was almost two times higher than in control. Although the content of other phenolic acids did not exceed 1 mg/g DW, their production was also significantly stimulated by the presence of metals in the medium;  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Cd}^{2+}$  had the strongest effect.



## Zawartość związków biologicznie czynnych i zdolności regeneracyjne słonolubnego modraka morskiego (*Crambe maritima* L.) w zależności od źródła jonów chlorkowych w pożywce

A. WISZNIEWSKA<sup>1</sup>, K. GIĘREK<sup>2</sup>, R. DULIŃSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>3</sup>Katedra Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: a.wiszniowska@urk.edu.pl

Modrak morski (kapusta morska) (*Crambe maritima* L., kapustowate) to słonolubna bylina porastająca nadbrzeżną morską klimatu umiarkowanego. Gatunek ten występuje na silnie zasolonych przedpolach wydm, wykazuje tolerancję na zasolenie, a także suszę i niskie temperatury. Ze względu na wysoką wartość odżywczą i tolerancję na stresy jest to perspektywiczna roślina warzywna, szczególnie przydatna do uprawy na terenach o podwyższonym zasoleniu. W niniejszej pracy podjęto próby optymalizacji warunków namnaiania modraka morskiego w warunkach in vitro, a także oceniono wpływ składników pożywki na akumulację wybranych związków czynnych w pędach. Pożywki zawierały różne rodzaje i stężenia fitohormonów, trzy rodzaje jonów chlorkowych, a niektóre również dodatkowe źródło wapnia. Zbadano zdolności regeneracyjne eksplantatów uzyskanych z fragmentów hypokotyli oraz wierzchołkowych fragmentów siewek. W namnionych pędach oznaczono zawartość cukrów, aminokwasów, barwników, a także związków fenolowych i tiolowych. Na wybranych liniach wykonano również wstępne oznaczenia zawartości glukozyolanów. Podczas mikrorozmnaiania *Crambe maritima* najlepsze efekty dało zastosowanie cytokiny ZrP, w porównaniu z metopolinem, kinetyną i BAP, oraz auksyną NAA w porównaniu



z IAA. Stwierdzono pozytywny wpływ niskiego zasolenia pożywki (20 mM NaCl, KCl lub  $MgCl_2$ ) i suplementacji glukonianem wapnia na regenerację pędów. Ten ostatni składnik spowodował znaczny spadek zawartości związków fenolowych w pędach, natomiast rodzaj soli chlorkowych wpłynął na akumulację cukrów rozpuszczalnych i wolnych aminokwasów. Z kolei stopień akumulacji związków tiolowych zależał głównie od rodzaju zastosowanej cytokininy. Opracowany w niniejszych badaniach protokół pozwala na efektywne namnażanie modraka morskiego w warunkach in vitro. Wykazano, że obecność nieorganicznych soli chlorkowych jest czynnikiem wpływającym na rozwój tego gatunku, oraz że różne fitohormony modulują akumulację związków biologicznie czynnych w regenerowanych mikrorolinach.

## Accumulation of bioactive compounds and regeneration potential in halophyte sea kale (*Crambe maritima* L.) on media containing various sources of chloride ions

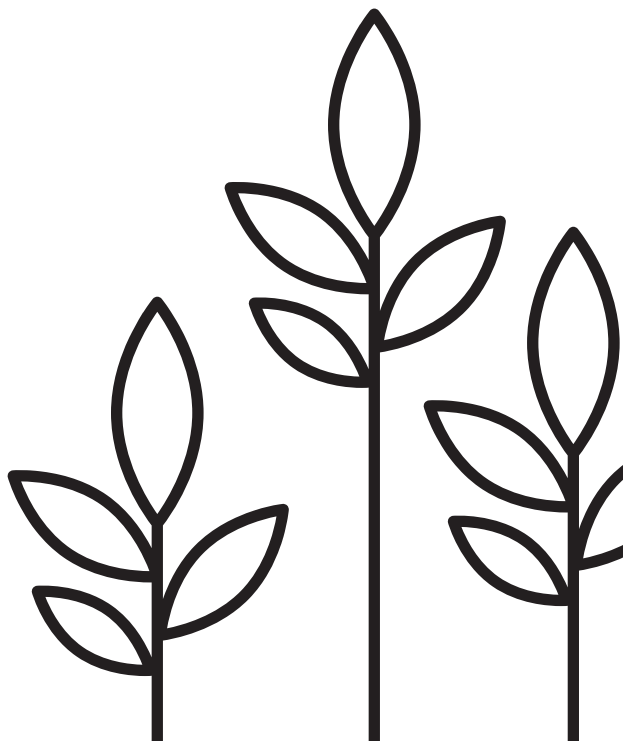
Sea kale (*Crambe maritima* L., Brassicaceae) is a long-lived perennial herb inhabiting coastal areas of temperate oceanic climates. As the species grows mostly on sea shores, it is tolerant to salinity, but also to drought and low temperatures. Due to its high nutritional value and stress resistance, it is prospective vegetable crop, particularly for cultivation on saline soils. In this study we attempted to optimize conditions for efficient in vitro propagation of *Crambe maritima* and evaluated the effect of medium components on the accumulation of selected bioactive compounds in the shoots. Culture media were supplemented with various combinations of phytohormones, as well as with several sources of chloride anions. Some medium variants were also enriched with calcium gluconate. Regeneration ability and culture behavior of hypocotyl and apical shoot fragments were evaluated. Obtained microshoots were analyzed for their contents of carbohydrates, amino acids, pigments, phenolics and thiol compounds, in relation to medium composition. Additionally, preliminary trials were performed to assess glucosinolates in selected lines. In micropropagation of *C. maritima* application of 2iP was superior to other tested cytokinins (m-topolin, kinetin and BAP), while NAA was superior to IAA. The development of explants was facilitated on the media with low salinity (20 mM NaCl, KCl or  $MgCl_2$ ), and enriched with calcium gluconate. The latter medium ingredient caused significant decrease in accumulation of phenolic compounds, while the source of chloride had pronounced effect on the content of soluble carbohydrates and free amino acids. The level of thiol accumulation was mostly depended on cytokinin type. We developed efficient protocol for in vitro propagation of sea kale. Our study revealed that addition of inorganic chloride salts is crucial for development of *C. maritima*, whereas applied phytohormones modulate nutritional composition of regenerated microplantlets.





## SESJA 3

# Metody biotechnologiczne w tworzeniu nowych odmian roślin







## Badania nad androgenezą u *Brassica oleracea* L. prowadzone w KBRiB dla potrzeb hodowli odmian heterozyjnych

A. ADAMUS, A. KIELKOWSKA, A. CHUDA, L. SAMEK, D. CHACHLOWSKA,  
M. SZKLARCZYK

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: a.kielkowska@urk.edu.pl

Celem badań prowadzonych w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii (KBRiB) w latach 2008–2020 było opracowanie metod haploidyzacji, koniecznych dla intensyfikacji prac w programach hodowli kapusty głowiastej białej i pekińskiej. Dla badanych warzyw opracowano metodyk prowadzenia kultur izolowanych mikrospor w celu otrzymania haploidów, a następnie podwojonych haploidów. Ustalono wielkość pól z odpowiednim do androgenezy stadium mikrospor, skład pożywki indukcyjnej, czas działania szoku termicznego zmieniającego drogę rozwoju mikrospor, opracowano skład pożywki regeneracyjnej dla androgenicznych zarodków oraz sposób podwajania genomu otrzymanych roślin haploidalnych. Sprawdzono zdolność do gametycznej embriogenezy u 80 zróżnicowanych genetycznie obiektów kapusty głowiastej oraz 21 genotypów kapusty pekińskiej. Efektywność androgenezy była zróżnicowana i zależała od czynnika genetycznego. Otrzymano ponad 6 tys. zarodków kapusty głowiastej oraz 300 pekińskiej, z których rozwój w rośliny podjęło ok. 50–60%. Podwojenie genomu roślin haploidalnych było procesem mało efektywnym i wiązało się z utratą dużej liczby roślin poddanych diploidyzacji. Otrzymano ponad 1 tys. roślin podwojonych haploidów (DH) kapusty głowiastej białej i rośliny te przekazano do firm hodowlanych. Analiza ploidalności androgenicznej populacji roślin kapusty pekińskiej (ponad 600 szt.) wykazała, że większość regenerantów była diploidami. Rośliny DH kapusty pekińskiej, które charakteryzowały się prawidłową morfologią i wysoką żywotnością pyłku poddano samozapyleniu. Do dalszych badań (rozmnożenie, ocena cech morfologicznych i wyrównania genetycznego oraz

dalsza selekcja) wytypowano 31 pokole DHR1, z których po rozmnożeniu zebrano ponad 6 tys. nasion DHR2. Ocena morfologiczna roślin pokole DHR1 i DHR2 wykazała bardzo duże wyrównanie cech wewnątrz linii i zróżnicowanie pomiędzy liniami, co potwierdza skuteczność metody i jest niezwykle cenne z punktu widzenia hodowli nowych odmian tego gatunku.

Badania były finansowane przez MRiRW i prowadzone we współpracy z firmami hodowlano-nasiennymi (KHiNO Polan, PlantiCo Zielonki).

## Androgenesis in *Brassica oleracea* L. conducted in DPBB for the breeding of heterosis varieties

The aim of the research conducted in Department of Plant Biology and Biotechnology (DPBB) in 2008-2020 was the development of haploidization methods, necessary to speeding up the breeding programs of cabbage and napa cabbage. For both vegetables, isolated microspore protocol, in order to obtain haploids and then doubled haploids, was developed. The size of buds containing microspores, the composition of the induction medium, the duration of thermal shock for switching of the path of microspore development, the composition of the regeneration medium for androgenic embryos and the method of genome doubling of the obtained haploid plants were determined. The ability to gametic embryogenesis was verified in 80 genetically diversified cabbages and 21 napa cabbage accessions. The effectiveness of androgenesis depended on the genetic factor. In cabbage over 6.000, and in napa cabbage near 300 embryos was obtained, of which approximately 50-60% developed into plants. The chemical doubling of the genome of haploid plants was ineffective and was associated with the loss of a large number plants. In total, over 1.000 of double haploids (DH) plants of cabbage was received and these were transferred to breeding companies. Analysis of the ploidy of obtained napa cabbage plants (over 600) showed that majority of the regenerants were diploids. DH plants of napa cabbage that were characterized by typical morphology and high pollen viability were self-pollinated. 31 generations of DHR1 were selected for further research (reproduction, morphology assessment, genetic uniformity and further selection) of which, after reproduction, over 6.000 DHR2 seeds were collected. Morphological assessment of the DHR1 and DHR2 generations showed a very high intraline uniformity and interline variability of evaluated traits, which confirms the effectiveness of the method and is extremely valuable for breeding.

The research was financed by MRiRW and conducted in collaboration with breeding companies (KHiNO Polan, PlantiCo Zielonki).



## Uzyskiwanie mieszańców międzygatunkowych *Nicotiana tabacum* × *Nicotiana glauca* z wykorzystaniem kultur in vitro

A. DEPTA, T. DOROSZEWSKA

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –  
Państwowy Instytut Badawczy, Puławy;  
e-mail: adepta@iung.pulawy.pl

W ostatnich latach coraz większe zagrożenie dla uprawy tytoniu w Polsce i na świecie stanowi wirus mozaiki tytoniu (tobacco mosaic virus, TMV). Wywołuje on przede wszystkim mozaikowe przebarwienia na liściach, jak również uszkodzenia liści, kwiatów oraz karłowatość roślin. Wirus mozaiki tytoniu jest przenoszony w sposób mechaniczny, co całkowicie uniemożliwia ochronę chemiczną. Najlepszą formą ochrony jest hodowla odpornościowa. Różnym rodzajem odporności na TMV jest *Nicotiana glutinosa* posiadająca pojedynczy, dominujący gen *N*. Jednak ta odporność jest zależna od temperatury. Alternatywnym rodzajem odporności na TMV jest *Nicotiana glauca*. Odporność tego gatunku jest warunkowana innym genem niż gen *N* i jest niezależna od temperatury. W celu przeniesienia tej odporności wykonano krzyżowanie międzygatunkowe *N. tabacum* cv. Wileńska × *N. glauca*. Ze względu na duży dystans genetyczny pomiędzy gatunkami rodzicielskimi formy mieszańcowe  $F_1$  charakteryzowały się niewytornością siewek spowodowaną zamieraniem korzeni. Uzyskanie wytrotnych form mieszańcowych wymagało wykorzystania kultur in vitro. Odkryto, że nasiona mieszańców  $F_1$  *N. tabacum* cv. Wileńska × *N. glauca* wysiano na pożywkę według Linmaiera i Skooga (1965) z 2% sacharozą, a następnie obserwowano wzrost siewek. Przy pierwszych oznakach brzożenia korzeni pobierano liście, których fragmenty układano na pożywkę wg Lloyd (1975) z dodatkiem 2 mg/l kinetyny, 2 mg/l kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz 0,5 mg/l kwasu foliowego. Początkowo obserwowano tworzenie się kalusa, a następnie regenerację pędów, które odcinano i przekładano na pożywkę ukorzeniającą zawierającą 0,2 mg/l kwasu indolilo-

-3-octowego (IAA) i 0,2 mg/l kwasu naftylooctowego (NAA). Zregenerowane ro liny przesadzono do szklarni, gdzie obserwowano ich wzrost i rozwój. Mieszane mieszańce międzygatunkowe *N. tabacum* cv. Wiliśca × *N. gossei* uzyskane z wykorzystaniem kultur *in vitro* były zróżnicowane morfologicznie pod względem pokroju, typu kwiatostanu oraz wyglądu kwiatów i liści.

### Obtaining of interspecific hybrids *Nicotiana tabacum* × *Nicotiana gossei* using *in vitro* cultures

Tobacco mosaic virus (TMV) has become an increasing threat to tobacco cultivation in Poland and worldwide in recent years. It mainly causes mosaic discoloration of leaves, as well as leaf and flower damage and plant dwarfing. TMV is transmitted mechanically, making chemical protection impossible. The best form of protection is resistance breeding. So far *Nicotiana glutinosa* has been used as a source of resistance conditioned by a single dominant *N* gene. However, it is temperature dependent. In contrast, *N. gossei* confers resistance through a different gene that is independent of temperature. Interspecific crosses between *N. tabacum* cv. Wiliśca and *N. gossei* were used to transfer this resistance. The F<sub>1</sub> hybrids obtained were characterised by seedling failure due to root dieback, likely due to the large genetic distance between the parental species. Viable hybrid forms were obtained through *in vitro* cultures. Decontaminated seeds of F<sub>1</sub> hybrid forms of *N. tabacum* cv. Wiliśca × *N. gossei* were sown on medium according to Linmaier and Skoog's (1965) protocol with 2% sucrose. The growth of the seedlings was observed until the first signs of root browning appeared. Cotyledons were then taken and their fragments were spread on a medium according to Lloyd's (1975) protocol with 2 mg/l kinetin, 2 mg/l indolyl-3-acetic acid (IAA), and 0.5 mg/l folic acid. Initially, callus formation was observed, followed by the regeneration of shoots. The shoots were then cut off and transferred to a rooting medium containing 0.2 mg/l of indolyl-3-acetic acid (IAA) and 0.2 mg/l of naphthylacetic acid (NAA). The resulting plants were transplanted to the greenhouse, where their growth and development were monitored. The *in vitro* cultures produced a variety of morphologically diverse hybrid forms of *N. tabacum* cv. Wiliśca × *N. gossei*, as evidenced by their habit, inflorescence type, and flower and leaf appearance.





## Protoplasty w badaniach podstawowych i aplikacyjnych u wybranych warzyw

E. GRZEBELUS, A. KIEŁKOWSKA, K. STELMACH-WITYK, K. SZYMONIK

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

Protoplasty są jednym z wielu materiałów wyjściowych wykorzystywanych do inicjacji roślinnych kultur in vitro. Jako komórki pozbawione ściany komórkowej stanowią unikatowy materiał startowy, który może być wykorzystywany zarówno w badaniach podstawowych (nadbudowa ściany komórkowej, podziałem komórkowym, odróżnicowaniem czy różnicowaniem komórek), jak i aplikacyjnych (mikrorozmnażanie, selekcja in vitro, somatyczna hybrydyzacja, transformacja czy edycja genomu). Mimo że znane są procedury otrzymywania roślin z protoplastów dla ponad 400 gatunków roślin, wciąż wiele, szczególnie gatunki uprawne, charakteryzuje się tzw. opornością na kultury protoplastów. Dodatkowym trudnym w implementacji technologii protoplastów do programów hodowlanych jest konieczność opracowania najczęściej wysoce wydajnej, uniwersalnej lub dedykowanej konkretnej tkance, procedury regeneracji roślin dla danego gatunku. Celem niniejszej prezentacji jest przedstawienie najnowszych badań nad systemem regeneracji roślin w kulturach protoplastów wybranych gatunków Apiaceae, Brassicaceae i Amaryllidaceae z uwzględnieniem różnych materiałów donorowych, technik kultury protoplastów oraz suplementacji po wywek do kultury protoplastów. Omówiona zostanie zdolność do regeneracji roślin w kulturach protoplastów pasternaku, kapusty czerwonej, brukselki, jarmużu, czosnku i cebuli w kontekście hybrydyzacji somatycznej oraz ze szczególnym naciskiem na przełamanie latencji podziałowej w kulturze protoplastów.

## Protoplasts in basic and applied research on selected vegetable crops

Protoplasts are one of many source materials used to initiate plant *in vitro* cultures. As cells with removed cell wall, they represent a unique starting material that can be used in both basic research (on cell wall reconstruction, cell division, dedifferentiation or cell differentiation) and applied research (micropropagation, *in vitro* selection, somatic hybridization, transformation or genome editing). Although there are some known protocols to obtain plants from protoplasts for hundreds of species, including cultivated species, there are some crops recognized as recalcitrant in protoplast cultures. An additional difficulty is that the implementation of protoplast technology to breeding programs must be preceded by developing, most often highly efficient, universal, or dedicated to specific tissue, plant regeneration procedure for a given species. In the present report latest research on protoplast-to-plant system in selected species of Apiaceae, Brassicaceae and Amaryllidaceae will be presented with reference to different source tissue, culture techniques and chemical nursing. Ability to plant regeneration in protoplast cultures of parsnip, red cabbage, Brussels sprouts, kale, garlic and onion will be discussed in the context of somatic hybridization and with a special emphasis on breaking the division latency in protoplast culture.



## Kultury izolowanych mikrospor papryki (*Capsicum annuum* L.)

W. KISZCZAK<sup>1</sup>, M. PODWYSZYŃSKA<sup>1</sup>, A. MARASEK-CIOŁAKOWSKA<sup>1</sup>,  
M. BURIAN<sup>2</sup>, A. KIELKOWSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
Skierniewice;

<sup>2</sup>Zakład Odmianoznawstwa, Szkółkarstwa i Zasobów Genowych, Instytut Ogrodnictwa –  
Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;

<sup>3</sup>Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: waldemar.kiszczak@inhort.pl

W Zakładzie Biologii Stosowanej Instytutu Ogrodnictwa – PIB przeprowadzono do wiadczenia nad indukcyjną androgenezę w kulturach izolowanych mikrospor papryki u odmiany Roberta oraz heterozygotycznego materiału hodowlanego – linii nr 9. Przed założeniem kultur określano korelację długości poka kwiatowego do faz rozwojowych mikrospor z wykorzystaniem barwienia DAPI. Za optymalną fazę do indukcji androgenazy przyjęto stadium późno jednej drowej mikrospory. Przeprowadzono do wiadczenia nad wpływem bazy pokarmowej na wydajność procesu androgenazy. W tym celu mikrospory po izolacji zawieszano w pokarmach płynnych na bazie MS i B5 wzbogaconych o: fitohormony, aminokwasy, AgNO<sub>3</sub>, węgla aktywny, kwas askorbinowy, biotyn, kolchicyn oraz sacharozę. U odmiany Roberta w zawiesinie mikrospor uzyskano zarodki na pokarmie B5, ze średnio efektywnością 1,7 zarodka na szalkę. Na pokarmie MS u tej odmiany nie stwierdzono obecności struktur zarodkowych. U drugiego z badanych genotypów uzyskano średnio 14 zarodków na szalkę na pokarmie MS, podczas gdy na pokarmie B5 nie zaobserwowano powstawania zarodków.

Finansowanie badania – usługa badawcza UB 11.1 realizowana w Instytucie Ogrodnictwa – PIB na zlecenie Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (finansowanie projektu MRiRW).

## Isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.)

At the Department of Applied Biology of Institute of Horticulture – National Research Institute, experiments were conducted on the induction of androgenesis in pepper using isolated microspores of Roberta variety and heterozygous breeding material – line no. 9. Before establishing the cultures, the correlation between the length of the flower bud and the developmental stages of microspores was determined using DAPI staining. The optimal stage for the induction of androgenesis was the late uninucleate microspore stage. An experiment was conducted on the effect of the medium base on the efficiency of the androgenesis. For this purpose, after isolation, microspores were suspended in liquid media based on MS and B5 supplemented with: phytohormones, amino acids, AgNO<sub>3</sub>, activated carbon, ascorbic acid, biotin, colchicine and sucrose. In the Roberta variety, on average 1.7 embryos per dish were obtained in a microspore suspension on B5 medium. In this variety no embryonic structures were observed on MS medium. In the second tested genotype, an average of 14 embryos per dish on MS medium were obtained, while no embryo formation was observed on B5 medium.

Research Financing – research service UB 11.1 conducted at the Institute of Horticulture – National Research Institute commissioned by the University of Agriculture in Krakow (project financed by MRiRW).



## Zastosowanie technologii Oligo w modulacji aktywności genów roślinnych na przykładzie *Solanum tuberosum*

C. KRASNODEBSKI, M. ŻUK

Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;  
e-mail: 289801@uwr.edu.pl

Wci poszukiwane s nowe narz dzia in ynierii genetycznej słu ce mi dzy innymi kontroli ekspresji genów wro linach. Odpowiedzi na to s badania nad nowatorsk technik modulacji aktywno ci genów ro linnych poprzez zastosowanie krótkich sekwencji oligonukleotydowych. Poznanie endogennych (równie epigenetycznych) mechanizmów kontroli ekspresji genów za pomoc krótkich sekwencji nukleotydowych, a tak e mo liwo taniej, szybkiej i dokładnej syntezy tych cz steczek umo liwia zastosowanie zdobytej wiedzy w praktyce. Technologia Oligo w swoim podstawowym wariacie polega na podawaniu do komórki antysensowych oligonukleotydów (ASO) o sekwencji komplementarnej do swojego celu w mRNA. Typowe ASO liczy mi dzy 15 a 25 nukleotydów. Do wywoływania zmian w ekspresji genów antysensowe oligonukleotydy wykorzystuj endogenne aparat komórki (np. cie ka RNA zależnej metylacji DNA, cie ka RNAi i RNAa). Wykorzystanie ASO pozwala na istotne przyspieszenie bada funkcji genów – s one mo liwe z pomini cciem (lub du ym ograniczeniem) procesu tworzenia konstruktów genetycznych. Poza tym, zastosowanie oligonukleotydów umo liwia badania genów letalnych, dla których tradycyjny „knock-out” jest niemo liwy. Istotn zalet metody jest zmniejszenie efektów plejotropowych, które stanowi powszechny problem spotykany przy tworzeniu organizmów genetycznie modyfikowanych. Wzale no ci od sekwencji i celu danej cz steczki, oligonukleotydy mog prowadzi do zmniejszenia lub zwi kszenia ekspresji, a nawet do indukowania dziedzicznych zmian epigenetycznych. Daje to mo liwo tworzenia nowych odmian ro lin bez etykiety GMO (np. odmiana lnu oleistego – Silesia). Celem przedstawionych eksperymentów było: zbadanie wpływu oligonukleotydów skierowanych na sekwencje koduj ce genu i sekwencje regulatrowe genu na aktywno transgenu GUS w *Solanum tuberosum*, porównanie dzia-

łania oligonukleotydów ze względu na ich zorientowanie (antysensowe i sensowe), określenie profilu czasowego zmian indukowanych działaniem oligonukleotydów na poziomie transkrypcji i translacji, określenie zmian w metylacji specyficznych miejsc badanego genu w odpowiedzi na traktowanie oligonukleotydami (dPCR), określenie potencjalnych mechanizmów działania oligonukleotydów i ich współdziałania na poziomie transkrypcji, translacji i mechanizmów epigenetycznych (metylacja DNA zależna od RNA).

## Application of Oligo technology in modulation of plant gene activity on the example of *Solanum tuberosum*

New genetic engineering tools are still being searched for, among others, to control gene expression in plants. The answer to this is research on an innovative technique of modulating the activity of plant genes through the use of short oligonucleotide sequences. Understanding the endogenous (including epigenetic) mechanisms of gene expression control using short nucleotide sequences as well as the possibility of cheap, fast and accurate synthesis of these molecules enable the use of the acquired knowledge in practice. In its basic variant, Oligo technology involves administering antisense oligonucleotides (ASOs) with a sequence complementary to their mRNA target into the cell. Typical ASOs are between 15 and 25 nucleotides in length. To induce changes in gene expression, antisense oligonucleotides use the endogenous cell apparatus (e.g., RNA-dependent DNA methylation pathway, RNAi and RNAa pathways). The use of ASOs allows for significant acceleration of gene function research – it is possible to bypass (or significantly reduce) the process of creating genetic constructs. Moreover, the use of oligonucleotides enables the study of lethal genes for which traditional “knock-out” is impossible. An important advantage of the method is the reduction of pleiotropic effects, which are a common problem encountered when creating genetically modified organisms. Depending on the sequence and target of a given molecule, oligonucleotides can lead to decreased or increased expression and even induce heritable epigenetic changes. This makes it possible to create new plant varieties without the GMO label (e.g. the Silesia variety of oilseed flax). Presented experiments were carried out with the aim of: investigating the effect of oligonucleotides directed at gene coding sequences and gene regulatory sequences on the activity of the GUS transgene in *Solanum tuberosum*, comparison of the action of oligonucleotides according to their orientation (antisense and sense), determination of the time profile of changes induced by the action of oligonucleotides at the level of transcription and translation, determination of changes in methylation of specific sites of the tested gene in response to treatment with oligonucleotides (dPCR), determination of potential mechanisms of action of oligonucleotides and their cooperation at the level of transcription, translation and epigenetic mechanisms (RNA-dependent DNA methylation).



## Udział proteaz cysteinowych w regulacji programowanej śmierci komórki (PCD) w procesie embriogenezy mikrospor u pszenżyta ozimego (*×Triticosecale* Wittm.)

M. KRZEWSKA<sup>1</sup>, I. ŻUR<sup>1</sup>, A. SPRINGER<sup>1</sup>, A. NOWICKA<sup>1</sup>, P. KOPEĆ<sup>1</sup>, K. YAMADA<sup>2</sup>,  
E. DUBAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Fiziologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

<sup>2</sup>Małopolskie Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków;  
e-mail: m.krzevska@ifr-pan.edu.pl

Embriogeneza mikrospor (EM) to alternatywna ścieżka rozwoju niedojrzałych ziaren pyłku, prowadząca do formowania struktur zarodkopodobnych zdolnych do regeneracji w rośliny. Do indukcji EM niezbędne jest zastosowanie odpowiedniego, eksperymentalnie dobranego czynnika stresowego, który m.in. generuje reaktywne formy tlenu (RFT). Ostatnie badania wykazały, że genotypowo specyficzny poziom RFT jest niezbędny do transdukcji sygnału inicjującego przeprogramowanie rozwoju mikrospor. Jednak nadmierna akumulacja RFT skutkuje stresem oksydacyjnym, który zagraża strukturom komórkowym i ich właściwemu funkcjonowaniu, co może indukować programowaną śmierć komórek (Programmed Cell Death, PCD). W proces PCD zaangażowane są, występujące w wakuoli proteazy cysteinowe (Vacuolar Processing Enzymes, VPE), które regulują degradację białek poprzez hydrolizy związków peptydowych. Celem niniejszych badań było wykazanie, jakie proteazy Cys, w tym VPE, biorą udział w regulacji degradacji białek w procesie indukcji EM. Obiektami badań były dwie modelowe linie podwojonych haploidów pszenżyta ozimego (*×Triticosecale* Wittm.) różniące się efektywnością EM. Pyłniki izolowano z kłosów poddanych traktowaniu niskimi temperaturami (3 tyg. w 4°C; LT), która jest standardowo stosowana jako czynnik indukujący EM u pszenżyta. Analizowano wpływ LT na efektywność EM w kulturach izolowanych mikrospor oraz identyfikowano wybrane proteazy cysteinowe za pomocą techniki Western blot z wykorzy-

staniem detekcji chemiluminescencyjnej. Po raz pierwszy wykazano, że działanie niskiej temperatury prowadzi do uszkodzenia oksydacyjnych mikrospor, a w następnym do uruchomienia PCD. W regulacji PCD uczestniczą proteazy Cys o aktywności kaspaz, papainy i legumainy. Aktywność zarówno papainy, jak i legumainy jest powiązana z opornością na indukcję EM.

### Involvement of cysteine proteases in the regulation of programmed cell death (PCD) during microspore embryogenesis in winter triticale (*×Triticosecale* Wittm.)

Microspore embryogenesis (ME) is an alternative developmental pathway for immature pollen grains that leads to the formation of embryo-like structures capable of regenerating into plants. Induction of ME requires the application of an appropriate, experimentally selected stress factor that generates, among other things, reactive oxygen species (ROS). Recent studies have shown that a genotypically specific level of ROS is required for the signalling that initiates the reprogramming of microspore development. However, excessive accumulation of ROS leads to oxidative stress that compromises cellular structures and their proper functioning, often inducing programmed cell death (PCD). Vacuolar processing enzymes (VPEs), which regulate protein degradation by proteolytic cleavage of peptide bonds, are involved in the PCD process. The aim of the present study was to investigate which cysteine proteases, including VPEs, are involved in the regulation of protein degradation during ME induction. The objects of this study were two model doubled haploid lines of winter triticale (*×Triticosecale* Wittm.) differing in ME efficiency. Anthers were isolated from tillers treated with low temperature (3 weeks at 4°C; LT), which is the standard ME inducer used in triticale. The effect of LT on ME efficiency in isolated microspore cultures was analysed and selected cysteine proteases were identified by chemiluminescent Western blot detection. It was shown for the first time that exposure to low temperature leads to oxidative damage to microspores and consequently to the activation of PCD. Cysteine proteases with caspase activity, papain and legumain, are involved in the regulation of PCD. The activities of both papain and legumain are associated with resistance to ME induction.





## Characterisation of transgenic tobacco plants expressing defence genes isolated from *Hypericum perforatum* L. by T-DNA transfer assay

V. LOKESH, R.K SELVAKESAVAN, G. FRANKLIN

Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences (IPG PAS), Poznań;  
e-mail: vlok@igr.poznan.pl

*Hypericum perforatum* is a highly valued medicinal plant that has been used since ancient times to treat various ailments, including depression. Despite its unique secondary metabolic profile, the increase in production of important bioactive compounds through metabolic engineering is hampered by its defence response against *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. To understand the role of *H. perforatum* defence genes in resistance to T-DNA transfer, some of the defence genes that are strongly upregulated in *H. perforatum* upon interaction with *A. tumefaciens*, such as salicylic acid-binding protein 2 (*SABP2*), 4-coumarate co-enzyme A ligase (*4CL*) and pathogenesis-related 10 (*PR10*) were cloned and transformed into *Nicotiana tabacum*, a plant species that is highly susceptible to *A. tumefaciens*-mediated transformation. The results of the T-DNA transfer assay carried out on the leaf discs of the transgenic plants showed that the presence of these genes alters the susceptibility of tobacco to T-DNA transfer in different ways.



## *Agrobacterium tumefaciens* mutant library for understanding the function of Vir genes in plant transformation

G. MAJCHRZAK, V. LOKESH, R.K. SELVAKESAVAN, G. FRANKLIN

Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences (IPG PAS), Poznań;  
e-mail: gmaj@igr.poznan.pl

The unique ability of *Agrobacterium tumefaciens* to insert foreign genes from its tumour-inducing (Ti) plasmid into the plant genome has been exploited for plant functional genomics and crop improvement. To understand the functions of *A. tumefaciens* genes in plant transformation, a mutant library with transposon tagging was generated in *A. tumefaciens* strain EHA105. A total of 228 unique mutations were identified in the linear chromosomal DNA, circular DNA, Ti plasmid and At plasmid. T-DNA transfer assays performed with selected Vir gene mutants suggest significant but unknown functions of these genes.



## Ekspresja genów związanych z biosyntezą antocyjanów u autotetraploidów *Vaccinium myrtillus* L.

M. MARKIEWICZ, M. PODWYSZYŃSKA

Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
Skierniewice;  
e-mail: monika.markiewicz@inhort.pl

Borówka czernica (*V. myrtillus* L.) jest dzikim gatunkiem leśnym, którego owoce są bogatym źródłem biologicznie aktywnych związków, głównie antocyjanów, zawartych w skórce oraz miąższu. Prace prowadzone w Instytucie Ogrodnictwa – PIB mają na celu uzyskanie autotetraploidów borówki czernicy zdolnych do krzyżowania z uprawnymi gatunkami borówki wysokiej (*V. corymbosum* L.), tak by uzyskać odmiany mieszane o owocach, których miąższ zawierałby antocyjany. Zwiększałoby to wartość biologiczną owoców. Uzyskanie mieszańców borówki wysokiej i borówki czernicy nie jest możliwe z powodu postzygotycznej bariery krzyżowania, tzw. bloku triploidalnego, która wynika z różnicy poziomu ploidalności u obu gatunków – borówka wysoka jest tetraploidem a borówka czernica diploidem. Aby pokonać tę barierę, konieczne jest podwojenie liczby chromosomów u *V. myrtillus*. Do tej pory w IO-PIB opracowano metodę poliploidyzacji borówki czernicy, w wyniku której uzyskano liczne autotetraploidy. Obecnie wykonywana jest ocena ich przydatności do krzyżowania z borówką wysoką oraz prowadzone są badania nad uzyskaniem wartościowych mieszańców pomiędzy tymi gatunkami. Celem pracy jest analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem biosyntezy flawonoidów, w tym wyjaśnienia, czy podwojenie liczby chromosomów u borówki czernicy zmienia biosyntezę związków fenolowych. Materiał roślinny do badań stanowiły liście wybranych klonów tetraploidalnych borówki czernicy (J4 4x – klony 3, 4, 7, 9, 10, 11 i 12) oraz ich diploidalnego odpowiednika (J4 2x). Wykonano analizę względnej ekspresji genów biorących udział w biosyntezie antocyjanów (*PAL*, *CHS*, *F3H*, *DFR*, *UFGT*, *ANS*) oraz genów regulatorowych (*TDR4*, *MYB1*, *MYB2*, *MYBA*, *MYB110a*) normalizowa-

n wzgl dem genu referencyjnego (*GAPDH*). Uzyskane wyniki wskazuj , e poziom ekspresji poszczególnych genów zale ny jest głównie od genotypu. Nadekspresja badanych genów była wyra nie widoczna u dwóch klonów tetraploidalnych – J4 4x-4 oraz – 10. U pozostałych klonów obserwowano głównie spadek ekspresji wszystkich badanych genów lub nadekspresj pojedynczych genów. Podwojenie liczby chromosomów u borówki czernicy mo e zmienia poziom biosyntezy zwi zków fenolowych, jednak nie zawsze przekłada si na zwi kszenie ekspresji genów zwi zanych z synteza f awonoidów.

Badania finansowane przez MRiRW: Badania podstawowe na rzecz post pu biologicznego w produkcji ro linnej (2021–2027), zadanie nr 45.

## Expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in *Vaccinium myrtillus* L. autotetraploids

The bilberry (*V. myrtillus* L.) is a wild species whose fruits are rich in biologically active compounds, mainly anthocyanins, contained in both the peel and flesh. The aim of our research was to obtain bilberry autotetraploids capable of crossing with cultivated species of highbush blueberry (*V. corymbosum* L.), to get hybrid cultivars with fruits containing anthocyanins in flesh. Cross-breeding between these species is not feasible due to a postzygotic crossing barrier, so-called triploid block, caused by the difference in ploidy between species: *V. corymbosum* is a tetraploid and *V. myrtillus* is a diploid. It is crucial to double the chromosome number in *V. myrtillus* to overcome this barrier. To date, in our Institute a procedure for the polyploidization of bilberries has been developed, resulting in numerous autotetraploids. Currently, an evaluation of their suitability for crossbreeding with blueberry is performed in order to obtain of valuable interspecific hybrids. The aim of this study is to analyse the expression of genes related to the flavonoid biosynthetic pathway, to explain whether chromosome doubling in bilberry modifies the biosynthesis of phenolic compounds. The plant material for the study consisted of several tetraploid clones of bilberry and their diploid counterpart. The expression level of genes involved in anthocyanin biosynthesis (*PAL*, *CHS*, *F3H*, *DFR*, *UFGT*, *ANS*) and regulatory genes (*TDR4*, *MYB1*, *MYB2*, *MYBA*, *MYB110a*) was performed which was normalised to the reference gene (*GAPDH*). The results showed that the expression level of the individual genes depends on the genotype. Overexpression of tested genes was clearly visible in two clones – J4 4x-4 and – 10. In other tetraploids, a decrease in the expression of all genes tested or overexpression of single genes was observed. Doubling the chromosome number in bilberry can change the biosynthesis level of phenolic compounds, but does not always translate into increased expression of genes related to flavonoid synthesis.

The work was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development within the programme 'Basic research for the biological progress in plant production – task 45'.



## Wykorzystanie podwojonych haploidów jako narzędzi biotechnologicznych w hodowli zbóż ozimych w Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR

E. MATYSIK, M. OLEJNICZAK-IDCZAK, P. MATYSIK

Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR;  
e-mail: e\_matysik@hr-strzelce.pl

Wytwarzanie linii podwojonych haploidów (DH) staje się rutynowym narzędziem wykorzystywanym w procesie hodowlanym przez różne jednostki w celu uzyskania linii w pełni homozygotycznych oraz skrócenia czasu do wyprowadzenia odmiany. Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. wykorzystuje: metod krzyżowania oddalonego (pszenica), kultury pylników (pszen żyta, jęczmień, pszenica) i kultury izolowanych mikrospor (rzepak). Powszechnie dostępne metodyki są modyfikowane, by zwiększyć efektywność, m.in. poprzez: dostosowanie traktowania wstępnego, zmiany w składach pożywek, zastosowanie różnych regulatorów wzrostu. Korzystnym krokiem było wprowadzenie screeningu form rodzicielskich mieszańców pokolenia F1 pod kątem zdolności do indukcji i regeneracji roślin zielonych, co ułatwia dalszy wybór metody. Dla pszenicy ozimej wykorzystuje się: metod krzyżowania oddalonego (ze średnią efektywnością 4,7 roślin zielonych/kłos) lub kultury pylników (ze średnią efektywnością 0,8 roślin zielonych/kłos); wybór metody zależy głównie od genetycznej zależności do wytwarzania roślin zielonych i albinotycznych. Wiskusa efektywność w metodzie krzyżowania oddalonego wynika z małej zależności genotypowej, omińnięcia problemów z roślinami albinotycznymi, jednak wymaga większego nakładu pracy oraz uzależnienia jest silnie od warunków prowadzenia roślin donorowych i zapylacza. Dodatkową zaletą krzyżowania oddalonego jest mniejsza zmienność somaklonalna, co ma znaczenie przy dalszym prowadzeniu linii, ich selekcji i rozmnażaniu. Dla jęczmienia ozimego wykorzystywane są kultury pylników ze średnią efektywnością 8 roślin zielonych/kłos. W przypadku kultur pylników dla obu gatunków zbóż główne czynniki, które podlegają modyfikacji to: warunki wzro-

stu (temperatura), faza rozwojowa mikrospor, traktowanie wst pnie (wybór stresu chłodu, wysokiej temperatury, głodu oraz induktora chemicznego), skład pożywek (ródło węgla, regulatory wzrostu, czynniki zestalające) oraz temperatura i czas indukcji. Efektami wykonanych prac był wpis do krajowego rejestru COBORU odmian białych podwojonymi haploidami: pszenicy ozimej Elektra, Sova i Intuicja oraz jęczmienia ozimego Turbo oraz zarejestrowanie w Austrii odmiany pszenicy ozimej California.

## The use of doubled haploids as biotechnological tool in winter cereal breeding in Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR

The production of doubled haploid lines (DH) is becoming a routine tool used in the breeding process by various entities to obtain fully homozygous lines and shorten the time of variety development. Hodowla Roślin Strzelce is using wide hybridization method (wheat), anther cultures (triticale, barley, wheat) and isolated microspore cultures (rapeseed). Commonly available methods are modified to increase effectiveness, including: adjusting of pretreatment, changes in media compositions, diverse growth regulators. A beneficial step was the screening introduction of the parental lines of F1 hybrids in terms of their ability to induce and regenerate green plants, which facilitates the further selection of the method. For winter wheat, the following methods are used: the wide hybridization method (with an average efficiency of 4.7 green plants/ear) or anther culture (with an average efficiency of 0.8 green plants/ear); the choice of method depends mainly on the genetic control of the albino and green plantlets regeneration. Greater efficiency in the wide hybridization method is the result of low genotype dependency, avoiding albinism, but requires more work and is strongly dependent on the donor plants and the pollinator growing conditions. An additional advantage of wide hybridization is lower somaclonal variations, which is important for further line maintenance, selection and reproduction. For winter barley, anther cultures are used with an average efficiency of 8 green plants/ear. In anther cultures for both cereal species, the main factors that are modified: donor plants growing conditions (temperature), the stage of microspore development, pretreatment (cold stress, heat stress, starvation and chemical inducer), media composition (source of carbohydrates, growth regulators, gelling agents) and temperature and time of induction. The effects of the work performed were the entry into the COBORU national register of varieties that are double haploids: Elektra, Sova and Intuicja winter wheat and Turbo winter barley, and the registration of the California winter wheat variety in Austria.



## Wykorzystanie metody CRISPR/Cas9 w aktywacji transkrypcyjnej wybranych genów związanych z cechami plonotwórczymi

M.M. MIŁOSZEWSKI, S. GASPARIS, A. NADOLSKA-ORCZYK

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –  
Państwowy Instytut Badawczy, Radzików;  
e-mail: m.miloszewski@ihar.edu.pl

Systemy edytowania genomów oparte o technologii CRISPR/Cas9 mają szerokie zastosowanie w genomice funkcjonalnej oraz wytwarzaniu roślin zmodyfikowanych genetycznie. Metoda ta pozwala na precyzyjne wprowadzenie zmian w sekwencji DNA gospodarza, np. w postaci zmian pojedynczych nukleotydów lub delecji dłuższych fragmentów DNA dzięki wykorzystaniu endonukleazy Cas9 oraz czeczek kierujących sgrNA komplementarnej do fragmentu edytowanego genu. Inne warianty CRISPR/Cas9 mogą również służyć do wstawienia transgenów w określonym miejscu w genomie lub do zwiększenia ekspresji genu gospodarza poprzez wiązanie do promotora aktywatorów transkrypcji. W niniejszej pracy zaprojektowano konstrukty genetyczne wykorzystujące elementy systemu CRISPR-Act3.0 w celu aktywacji transkrypcyjnej wybranych genów związanych z metabolizmem cytokinin. Głównymi elementami tego systemu jest m.in. zmodyfikowana nukleaza dCas9 pozbawiona aktywności nukleolitycznej oraz posiadająca fuzyjne białko VP64 zwiększające wydajność transkrypcji. Wykorzystano również zmodyfikowany fragment sgrNA posiadający oprócz sekwencji komplementarnej do fragmentu promotora dwa aptamery MS2-RNA, pozwalające na przyłączenie dodatkowych aktywatorów transkrypcji. Kolejnym elementem zwiększającym wydajność transkrypcji jest łącuch SunTag posiadający 10 domen GCN4, do których za pośrednictwem białka scFV:sfGFP wiążą się aktywator transkrypcji zbudowany z domeny 2xTAD. Łącuch SunTag wiążący się do aptamerów MS2 w czeczkach sgrNA. Celem badania jest zwiększenie ekspresji dwóch genów z rodziny izopentenylotransferazy (IPT5 oraz IPT1)



wj czmieniu odmiany Golden Promise. Geny te s ̄ odpowiedzialne za biosyntezy cytokinin w ró nych tkankach na odpowiednich etapach rozwoju ro liny. Dotychczasowe badania wykazały, e zwi kszenie poziomu cytokinin u ró nych gatunków było zwi zane ze wzrostem produktywno ci ro lin, w tym ze zwi kszonym plonem ziarna. W pierwszym etapie bada ̄ uzyskano na drodze transformacji genetycznej za pomoc ̄ *Agrobacterium tumefaciens* 25 ro lin transgenicznych, które cechowały si ̄ zró nicowanym fenotypem, m.in. ró n ̄ długo ci i liczb ̄ p ̄ dów. Kolejnym etapem bada ̄ b dzie analiza molekularna ro lin w pokoleniu T<sub>1</sub>.

## Application of CRISPR/Cas9 in the transcriptional activation of selected genes related to yield traits

Genome editing systems based on CRISPR/Cas9 technology are widely used in functional genomics and the production of genetically modified plants. This method allows for precise changes in the host's DNA sequence, e.g. changes of single nucleotides or deletions of longer DNA fragments, owing to the use of Cas9 endonuclease and sgRNA guide molecule complementary to the fragment of the edited gene. Other CRISPR/Cas9 variants can also be used to insert a transgene at a specific location in the genome or to increase host gene expression by binding transcription activators to the promoter. In this work, a genetic construct was designed using elements of the CRISPR-Act3.0 system to transcriptionally activate selected genes related to cytokinin metabolism. The main element of this system is a modified dCas9 nuclease without nucleolytic activity and bound to the VP64 fusion protein that increases transcription efficiency. A modified sgRNA fragment was also used, having in addition to the sequence complementary to the promoter fragment, two MS2-RNA aptamers, allowing for attachment of additional transcription activators. Another element that increases transcription efficiency is the SunTag chain with 10 GCN4 domains that can bind transcription activator composed of the 2xTAD domain bound to the scFV: sfGFP mediate protein. The SunTag chain binds to MS2 aptamers in the sgRNA molecule. The purpose of the research is to increase the expression of two genes of the isopentenyltransferase family (IPT5 and IPT1) in the Golden Promise barley variety. These genes are responsible for the biosynthesis of cytokinins in different tissues at the appropriate stages of plant development. Previous research has shown that increasing the level of cytokinins in different species was associated with an increase in plant productivity, including increased grain yield. In the first stage of the research, 25 transgenic plants were obtained by genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens*, which were characterized by a diverse phenotype, including different length and number of shoots. The next stage of the research will be the molecular analysis of plants in the T<sub>1</sub> generation.





## Model działania jonów metali w pożywce indukującej u jęczmienia opisujący wydajność regeneracji roślin zielonych

W.M. DYNKOWSKA, R. ORŁOWSKA, D.R. MAŃKOWSKI, P.T. BEDNAREK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików;  
e-mail: r.orlowska@ihar.edu.pl

Proces embriogenezy mikrospor pozwala na uzyskiwanie podwojonych haploidów na drodze kultur tkankowych i jest powszechnie stosowany u roślin zbożowych. Mimo poznania tego procesu, nadal pozostają nierozwiązane problemy dotyczące poprawy wydajności uzyskiwania zielonych regenerantów lub teoretycznej liczby roślin albinotycznych. Prezentowane badania koncentrowały się na oszacowaniu metylacji DNA u uzyskanych regenerantów jęczmienia i powiązaniu jej z warunkami hodowli in vitro w celu określenia, które z badanych czynników mogą wpływać na wydajność regeneracji zielonych roślin. Weksperymentie wykorzystano regeneranty jęczmienia jarowego uzyskane w kulturach pylnikowych. Przetestowano dziewięć wariantów pożywek indukujących, które wzbogacono solami miedzi ( $\text{CuSO}_4$ ; 0,1; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) i srebra ( $\text{AgNO}_3$ ; 0; 10; 60  $\mu\text{M}$ ); sprawdzono także wpływ różnego czasu inkubacji pylników (21, 28 i 35 dni) na pożywkach indukujących. Zmiany w metylacji DNA oszacowano metodą markerów molekularnych DArTseqMet, która pozwala także na ilościowe oszacowanie metylacji cytozyny w genomowym DNA regenerantów. Modelowanie równań strukturalnych pozwoliło na określenie relacji między zmiennymi, a przetestowany teoretyczny model także wskazał, które zmienne znacząco wpływają na efektywność uzyskiwania zielonych regenerantów. Wydajność regeneracji zielonych roślin wynosiła od 0,1 do 2,91 roślin na 100 wyłoniętych pylników. Poziom demetylacji DNA mieścił się w granicach od 7,61 do 32,29%, podczas gdy metylacja de novo osiągnęła wartość od 6,83 do 32,27%. Najwyświekszą efektywność regeneracji roślin zielonych uzyskano przy zastosowaniu najwyższych stężeń jonów  $\text{Cu(II)}$  i po redukcji stężenia  $\text{Ag(I)}$ , stosując najdłuższy czas inkubacji

pylników na powyższych indukcjach. W badaniach wykazano, że związek między demetylacją DNA i metylacją *de novo* DNA ma kluczowe znaczenie dla wydajności regeneracji roślin zielonych, podczas gdy jony Cu(II) bezpośrednio wpływają na demetylację DNA i wydajność regeneracji zielonych roślin. Zatem optymalne stężenie jonów Cu(II) w powyższym indukcji jest najbardziej krytycznym czynnikiem dla wydajności regeneracji zielonych roślin.

## A model of metal ions applied to an induction medium describes barley's green plant regeneration efficiency

Microspore embryogenesis is a process that produces doubled haploids in tissue culture environments and is widely used in cereal plants. However, challenges persist with obtaining green regenerants or preventing albinism. The study focused on estimating DNA methylation and relating it to *in vitro* culture conditions to determine which of the factors studied may influence green plant regeneration efficiency (GPRE). The experiment involved using spring barley regenerants obtained through anther culture. Nine variants of induction media were created by adding copper ( $\text{CuSO}_4$ : 0.1; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) and silver salts ( $\text{AgNO}_3$ : 0; 10; 60  $\mu\text{M}$ ), with varying incubation times for the anthers (21, 28, and 35 days). Changes in DNA methylation were estimated using the DArTseqMet molecular marker method, which also detects cytosine methylation. Structural equation modelling establishes the relationships between the variables and tests a theoretical model to identify which variables significantly impact the productivity of green regenerants. The effectiveness of green plant regeneration ranged from 0.1 to 2.91 plants per 100 plated anthers. The DNA demethylation (DM) level ranged from 7.61 to 32.29%, while *de novo* methylation (DNM) reached values ranging from 6.83 to 32.27%. The highest green plant regeneration efficiency was obtained when the highest Cu(II) ions and intermediate Ag(I) concentrations were used for the longest time of anther culture. The results demonstrate that the relationship between DNA demethylation and DNA methylation is crucial for green plant regeneration efficiency, while Cu(II) directly impacts DM and GPRE. Thus, the optimal Cu(II) ion concentration in the induction media is the most critical factor for GPRE.



## Wpływ genotypu oraz czasu traktowania chłodem na indukcję androgenezy i regenerację jęczmienia ozimego

J. PATELSKA, M. ZDZIECHOWSKA-DUDEK, M. TACIAK, D. JASIŃSKA

Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Pion Hodowli Roślin – Oddział Wiatrowo, Wągrowiec;  
e-mail: justyna.patelska@phr.pl

Uzyskiwanie haploidów zbóż to proces bardzo złożony i uzależniony od wielu czynników. Technika kultur pylnikowych, oparta na zjawisku androgenezy jest wydajnym sposobem uzyskiwania roślin haploidalnych. Liczba uzyskiwanych podwojonych haploidów jest różna i silnie uzależniona od genotypu roślin donorowych oraz sposobu w jaki prowadzona jest roślinna kultura in vitro. Na efektywność otrzymywania podwojonych haploidów zbóż mają wpływ dwa niezależne procesy – zdolność do indukcji androgenezy oraz zdolność do regeneracji roślin. Efektywność indukcji androgenezy można skutecznie zwiększyć poprzez optymalizację takich czynników, jak: wstępne traktowanie kłosów czy skład zastosowanej pożywki. Celem powyższych prac było zbadanie wpływu genotypu oraz czasu traktowania chłodem kłosów (4°C) na efektywność otrzymywania roślin androgenicznych w kulturach pylnikowych jęczmienia ozimego. Łącznie przebadano 46 genotypów jęczmienia ozimego. Zastosowany czas trwania chłodu wynosił od 21 do 28 dni. Obserwowano wpływ genotypu na zdolność pylników do tworzenia kalusów embriogennych oraz roślin. Najbardziej efektywność indukcji androgenezy wykazywał genotyp 19, natomiast najmniej genotyp 363. Genotyp 478 charakteryzował się dużą zdolnością tworzenia kalusów i z tego genotypu uzyskano najwięcej roślin zielonych. Najbardziej efektywność regeneracji roślin wykazał się genotyp 365, natomiast najmniej genotyp 78. Badano również wpływ czasu inkubacji kłosów w niskiej temperaturze na zdolność pylników do tworzenia kalusów embriogennych oraz roślin. Najbardziej efektywność do tworzenia kalusów wykazały rośliny traktowane 23-dniowym chłodem, natomiast najmniej po 21 dniach chłodzenia. Najbardziej efektywność regeneracji roślin uzyskano po 24 dniach chłodu, natomiast najmniej po 27 dniach. Najbardziej efek-

tywno ci struktur embriogennych charakteryzował si genotypy 19 traktowany 21-dniowym chłodem. Natomiast najwi ksz efektywno ci regeneracji ro lin zielonych odznaczał si genotyp 21 po 25 dniach chłodzenia.

### Influence of genotype and duration of exposure to low temperatures on the induction of androgenesis and regeneration of winter barley

Cereals haploid production is a very complex process, influenced by various factors. The anther culture technique, based on androgenesis, is a very productive way of sourcing haploid plants. The number of doubled haploids obtained varies and strongly depends on the genotype of the donor plants and the way the in vitro plant tissue culture is conducted. Efficiency of obtaining doubled haploids is conditioned by two independent processes – capability of androgenesis induction and plant regeneration. Productivity of androgenesis induction can be effectively enhanced by optimizing factors such as pretreatment of ears or composition of the applied culture medium. The aim of the work undertaken was to examine the effect of genotype and duration of cold treatment (4°C) on the productivity of obtaining androgenic plants in anther cultures of winter barley. A total of 46 genotypes of winter barley were examined. The exposure to low temperatures period used was from 21 to 28 days. The influence of genotype on the ability of anthers to form embryogenic calli and plants was observed. The highest efficiency of the androgenesis induction was indicated by genotype 19, whereas the lowest was shown by genotype 363. Genotype 478 showed high ability of forming calli and the largest number of green plants was obtained from this genotype. The highest efficiency of regeneration was indicated by genotype 365, whereas genotype 78 represented the lowest productivity of regeneration. The influence of ears incubation period in low temperatures on the capability of anthers to form embryogenic calli and plants was also investigated. Plants exposed to low temperatures over the period of 23 days showed the highest capability of forming calli, whereas the least capable were those cold treated over the period of 21 days. The highest efficiency of plant regeneration was achieved after 24 days of exposure to low temperatures, whereas the lowest efficiency was observed after 27 days. The highest efficiency of embryogenic structures was observed for genotype 19 treated with 21 days of cold. Genotype 21 was characterized by the highest regeneration efficiency of green plants after 25 days of cooling.



## Wytwarzanie autoploidów gatunków sadowniczych w kulturach in vitro z przeznaczeniem do hodowli twórczej

M. PODWYSZYŃSKA, D. WÓJCIK, A. TRZEVIK, A. MARASEK, M. MARAT,  
K. MYNETT

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;  
e-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl

Poliploidy powszechnie występują w naturze i w ród roślin uprawnych. Poliploidyzacja indukuje istotne zmiany fenotypowe i genetyczne. Z tego względu w Instytucie Ogrodnictwa – PIB do celów hodowlanych wytwarzano autotetraploidy gatunków roślin sadowniczych: porzeczki czarnej, agrestu, borówki czernicy oraz jabłoni i czereśni. Wcześniej otrzymano autotetraploidy liliowca i tulipana. Indukowaniu autoploidów kładę z gatunków przy wiecał inny cel. U jabłoni, porzeczki i agrestu tetraploidy wytwarzano do krzyżowania z odmianami diploidalnymi by uzyskać triploidy. U porzeczki i agrestu nadrz dnym celem jest wyhodowanie triploidalnych odmian deserowych o dużych owocach o wysokiej wartości biologicznej. W przypadku jabłoni celem jest wytworzenie nowych triploidalnych odmian o zwiększonej odporności na stresy biotyczne i abiotyczne. Autotetraploidy borówki czernicy wytwarzano, aby przezwyciężyć barierę krzyżowania (blok triploidalny) z naturalnie tetraploidalną borówką wysoką i uzyskać nowe mieszane odmiany borówki wysokiej o owocach zawierających antocyjany zarówno w skórce jak i miąższu – owoce borówki wysokiej mają miąższ bezbarwny. U czereśni – gatunku diploidalnego, dążono do wytworzenia tetraploidów do krzyżowania z naturalnie tetraploidalnymi, by uzyskać pełne tetraploidalne mieszane, tzw. czerechy. Z krzyżowaniami tymi gatunkami, różniącymi się ploidalnością, stosunkowo łatwo otrzymuje się triploidy, jednak charakteryzują się one niską plodnością i słabo owocują. Dla wszystkich wymienionych gatunków autotetraploidy uzyskano w kulturach in vitro, gdzie działaniu antymitotyków dodawanych do pożywki (kolchicyny, amipro-

fosu metylu, trifluralinu i oryzaliny) poddawano pędzi, co jest metodą nowatorską. Na wycie do indukowania poliploidów mitotycznych wykorzystuje się głównie eksplantaty liściowe, fragmenty pędów czy szypulek kwiatowych, które poddaje się działaniu antymitotyków i jednocześnie nie stymuluje regeneracji pędów lub zarodków przybyszowych. Wymaga to jednak opracowania systemu regeneracji roślin i wydłużenia czasu potrzebnego do wytworzenia poliploidów. Efektywność uzyskiwania tetraploidów w kulturach pędów była stosunkowo wysoka. Regenerację pędów tetraploidalnych wykrywano metodą cytometrii przepływową. Opracowanie metod poliploidyzacji *in vitro* pozwoliło na otrzymanie w ciągu 12-18 miesięcy (począwszy od zapoczkowania kultur *in vitro*) od kilku do kilkudziesięciu tetraploidów dla każdego genotypu poliploidyzowanych gatunków. Nowo otrzymane tetraploidy różniły się wyraźnie od swoich diploidalnych odmian wyjściowych. U wszystkich gatunków charakteryzowały się one większymi organami, znacznie wyższą zawartością chlorofilu i natężeniem fotosyntezy. U jabłoni, tetraploidy są bardziej odporne na suszę oraz mniej podatne na zarodkownicę i parcha jabłoni. Najbardziej wartościowe tetraploidy po ocenie fenotypowej przekazywane są hodowcom.

Badania finansowane przez MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, Zadania nr 70 (2014-2020) oraz 45, 46, 49 (2021-2027).

## Production of autopolyploids of fruit species in *in vitro* cultures for creative breeding purposes

Polyploids are common in nature and among crops. Polyploidization induces significant phenotypic and genetic changes. For this reason, in The National Institute of Horticultural Research, autotetraploids of fruit plant species such as black currant, gooseberry, bilberry, apple and sweet cherry have been produced for breeding purposes. Previously, autotetraploids of daylilies and tulips were obtained. Inducing autopolyploids of each species had a different goal. In apple, black currant and gooseberry, tetraploids were produced for crossbreeding with diploid cultivars to obtain triploids. In the case of black currant and gooseberry, the primary goal is to breed triploid dessert cultivars with large fruits of high biological value. In the case of apple trees, the aim is to create new triploid genotypes with increased resistance to biotic and abiotic stresses. Bilberry autotetraploids were produced to overcome the crossability barrier (triploid block) with naturally tetraploid highbush blueberry and to obtain new hybrid cultivars of highbush blueberry with fruits containing anthocyanins in both the skin and flesh - highbush blueberry fruits have colorless flesh. In sweet cherry - a diploid species, attempts were made to obtain tetraploids for crossbreeding with naturally tetraploid cherry to obtain fertile tetraploid hybrids. Triploids are relatively easy to obtain from crosses between these species differing

in ploidy, but they are characterized by low fertility and poor fruit production. For all of the above mentioned species, autotetraploids were obtained in in vitro cultures where the shoots were treated with antimetabolites (colchicine, amiprophos-methyl, trifluralin and oryzalin, added to the medium), which is an innovative method. In the world, leaf explants, fragments of stems or flower stalks are most often used to induce mitotic polyploids, which are treated with antimetabolites and at the same time stimulated for regeneration of adventitious shoots or embryos. However, this requires the development of a plant regeneration system and extends the time needed to produce polyploids. The efficiency of obtaining tetraploids in shoot cultures was relatively high. The regenerated tetraploid shoots were detected by flow cytometry. The development of the in vitro polyploidization methods allowed obtaining from several to several dozen tetraploids for each genotype in all polyploidized species within 12- 18 months (starting from the initiation of in vitro cultures). The newly obtained tetraploids differ significantly from their diploid mother cultivars. In all species, they are characterized by larger organs, much higher chlorophyll content and photosynthesis activity. In apple trees, some tetraploids are more resistant to drought and less susceptible to fire blight and apple scab. The most valuable tetraploids are handed over to breeders after phenotypic assessment.

The studies were supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development within the programme Basic research for the biological progress in plant production – tasks 70 (2014- 2020) and 45, 46, 49 (2021- 2027)





## Charakterystyka linii addycyjnych owsa (*Avena sativa* L.) z kukurydzą (*Zea mays* L.)

E. SKRZYPEK

Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;  
e-mail: e.skrzypek@ifr-pan.edu.pl

Jedną z metod otrzymywania haploidalnych roślin, która może skrócić proces hodowli, jest krzyżowanie form oddalonych. Wytwarzanie nowych odmian jest niezbędne, aby rozwiązać problemy rosnącego zapotrzebowania na żywność, paszę i zrównoważenie energii w obliczu ciągłych zmian klimatycznych. Krzyżujemy owoce (*Avena sativa* L.) z kukurydzą (*Zea mays* L.) po zapłodnieniu, chromosomy kukurydzy usuwane z genomu owsa podczas wczesnego rozwoju zarodkowego, co prowadzi do powstania roślin haploidalnych. Czasami mogą również powstać zarodki owsa, u których nie doszło do eliminacji chromosomów kukurydzy, tworząc w ten sposób linie addycyjne owsa z kukurydzą (OMA, ang. oat ×maize addition). Linie addycyjne różnych gatunków roślin wytwarzają się najczęściej w celu wprowadzenia przydatnych genów do roślin uprawnych pochodzących od ich dzikich krewnych. Poza tym, linie addycyjne wykorzystywane są do generowania map fizycznych poszczególnych chromosomów, np. kukurydzy. Celem badania była identyfikacja i charakterystyka mieszańców owsa z kukurydzą metodami molekularno-cytogenetycznymi i fizjologicznymi. Obecnie chromosomy kukurydzy określano w ponad 2000 liniach owsa, które powstały w wyniku skrzyżowania z kukurydzą 80 różnych genotypów owsa. Fragmenty retrotranspozonu kukurydzy *Grande-1* (500 bp) amplifikowane metodą PCR, wskazywały na obecność chromosomów kukurydzy w wytworzonych liniach owsa. Chromosomy kukurydzy identyfikowano za pomocą hybrydyzacji genomowej in situ (GISH). Każda zregenerowana linia OMA posiadała wszystkie chromosomy owsa i 1–4 chromosomów kukurydzy. We wszystkich badanych liniach OMA obszary zajęte przez terytoria chromosomowe kukurydzy (CT) znajdowano na obrzeżach jądra. Obserwowane zmiany mor-



fologiczne ro lin, anatomii li ci, wydajno ci fotosyntezy i plonowania wynikały z introgresji chromosomów kukurydzy do genomu owsa.

### Characteristics of the oat (*Avena sativa* L.) × maize (*Zea mays* L.) addition lines

One of the haploid inducing method that may shorten the breeding process is wide hybridization. Generating new cultivars is essential in addressing the issues of the world's growing need for nourishment, fodder, and sustainable energy in the face of constant climate change. Through the method of oat (*Avena sativa* L.) pollination by maize (*Zea mays* L.) following fertilization, maize chromosomes are preferentially removed during early embryo development, leading to the generation of haploid plants. Additionally, hybrid zygotes between oat and maize can also arise forming oat × maize addition (OMA) lines. Different plant species' addition lines have been produced in order to introduce useful genes into cultivated plant species from their wild relatives. In addition to being an enriched supply of markers and generating physical maps of particular chromosomes e.g. maize, alien chromosomal additions have been utilized for gene mapping. The research objective was to identify and characterize oat × maize hybrids using molecular-cytogenetic and physiological methods. The presence of maize chromosomes was examined in oat lines that were produced by crossing more than 2,000 oat plants from 80 various genotypes with maize. The *Grande-1* maize retrotransposon fragment (500 bp) was amplified by PCR, indicating the presence of maize chromatin in oat lines. The maize chromosomes were found using in situ genomic hybridization (GISH). Each regenerated OMA line possessed all of the oat chromosomes and 1–4 maize chromosomes. The areas occupied by maize chromosome territories (CTs) were found at the nuclear periphery in all investigated OMA lines. Observed changes in plant morphology, leaf anatomy, photosynthetic efficiency, and yield resulted from the introgression of maize chromosomes into the oat genome.



## Próby indukcji gynogenezy u pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) z zastosowaniem kultur załączni oraz izolowanych załączków

W. SKRZYPKOWSKI, A. KIEŁKOWSKA

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: wiktorskrzypkowski@student.urk.edu.pl

Pomidor (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) jest gatunkiem roliny warzywno-owocowej o dużym znaczeniu handlowym oraz ekonomicznym, o czym świadczy wysoka światowa produkcja owoców tego gatunku, wynosząca w 2022 roku około 186 milionów ton. Tak wysokie znaczenie ekonomiczne determinuje wzmożone zapotrzebowanie na hodowlę tworczą, skierowaną na otrzymywanie nowych odmian uprawnych. W związku z tym, istnieje szczególna potrzeba otrzymywania cennych dla procesu hodowlanego linii homozygotycznych, dla których wysoko obiecujące metody pozwalające na znaczne skrócenie czasu ich produkcji (1–2 pokolenia) jest haploidyzacja. Pomimo jednak wysokiej wartości handlowej pomidora, technologia ta wciąż nie ma u tego gatunku praktycznego zastosowania co związane jest z jego opornością na próby haploidyzacji. Celem badań nad indukcją gynogenezy u pomidora było pobudzenie do rozwoju komórek gametofitu męskiego, a w rezultacie otrzymanie haploidalnych struktur. W tym celu posłużono się metodami kultur izolowanych załączni, fragmentów załączni oraz izolowanych załączków. Materiał roślinny wykorzystany w badaniach stanowiły obiekty hodowlane płodne i męskie skosterylne. Załączniki oraz ich fragmenty wyłożone na pożywki hodowlane w warunkach in vitro ulegały powiększeniu a na ich powierzchni obserwowano rozwój tkanki kalusowej, jednakże, rozwijała się ona wyłącznie z tkanki somatycznej ciał załączni, co wskazuje na nieskuteczność zastosowanych technik. W innym doświadczeniu, wypreparowane z niezapłodnionych załączni i oddzielone od tkanki łożyska załączki wykładano na pożywki indukcyjne. Na ich powierzchni obserwowano rozwój kalusa. Analiza ploidalności otrzymanej tkanki kalusowej pozwoliła określić, że większość grudek kalusa

posiadała diploidalną liczbę chromosomów, jednak tkanka haploidalna również została zidentyfikowana.

Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Projekt biologiczny w produkcji roślinnej 2021–2026).

## Haploidization in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via gynogenesis induced through ovary and isolated ovule culture

Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) is a crop species with one of the highest production values in the world, with a total global production of around 186 million tons. For this reason, extensive work is being conducted aimed at creative breeding in this species, with obtaining homozygous lines being of high importance in the breeding process. Haploidization is a promising technology allowing for rapid (1–2 generation) production of homozygous plants. However, despite the high commercial value of the tomato, this technology is still not in practical use due to recalcitrancy of tomato to haploidization. The study aimed at induction of the development of haploid of tomato female gametophyte cells through gynogenesis. Methods involving the culture of isolated ovaries, ovary fragments, and isolated ovules were employed. As plant materials male fertile and male-sterile breeding materials were used. The entire ovaries as well as their fragments, when placed on growth media, underwent enlargement and exhibited the growth of callus tissue. However, the calluses developed from somatic tissues of ovaries exclusively, indicating the inefficiency of the applied techniques. In another experiment, ovules were isolated from unfertilized ovaries and placed on induction media. In such cultures the development of callus tissue originating from the ovules was observed. The ploidy of callus samples developed from the ovules showed that most of them were identified as diploid, although haploid tissue was also present.

The research was financed by Polish Ministry of Agriculture and Rural Development (Biological advancement in plant production 2021–2026).



## Wpływ inhibitorów metylacji na kultury pylnikowe mieszańców $F_1$ pszenicy ozimej

K. SZEWCZYK, I. MEZOUED, M.H. NYAMBURA, D. WEIGT

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;  
e-mail: katarzyna.szewczyk1@up.poznan.pl

W kulturach pylnikowych, pod wpływem czynników stresu, niedojrzałe mikrospory tworzą zarodki, z których następnie można otrzymać linie o pojedynczym lub podwojonym zestawie chromosomów. Podwojone haploidy (DH) charakteryzują się pełną homozygotycznością i są wykorzystywane w badaniach naukowych oraz hodowli nowych odmian roślin uprawnych. Efektywność indukcji embriogenezy mikrospor (EM) i regeneracji roślin w pszenicy jest zależna między innymi od genotypu rośliny donorowej, rodzaju stosowanego czynnika stresu oraz składu stosowanych pożywk. Najnowsze badania epigenetyczne wskazują, że na proces EM wpływa także metylacja genów zaangażowanych w tworzenie androgenicznych zarodków. Celem badania było sprawdzenie zdolności do indukcji EM i regeneracji roślin w kulturach pylnikowych mieszańców  $F_1$  pszenicy ozimej traktowanych inhibitorami metylacji. Ziarniaki mieszańców  $F_1$  zostały otrzymane w polskich spółkach hodowlanych. Wysiano je na poletku do wiadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Kłosaćcinano, gdy mikrospory osiągały stadium jednej drożdzy i poddawano stresowi chłodu ( $4^{\circ}\text{C}$ ) przez 10 do 20 dni. Następnie izolowano pylniki i wykładano na pożywkę MS z dodatkiem inhibitorów metylacji: 5-azacytydyny (AZC) lub trichostatyny A (TSA). Pylniki inkubowano w ciemności przez 7 dni w  $4^{\circ}\text{C}$ , płukano i przenoszono na pożywkę C17 na okres 8 tygodni. Otrzymane struktury embriogenne pasowano na zestawioną pożywkę MS w celu regeneracji roślin. Obserwowano różnice w liczbie tworzących się struktur embriogennych oraz liczbie regenerujących się roślin zielonych i albinotycznych pomiędzy badanymi mieszcami  $F_1$  pszenicy ozimej. Inhibitory metylacji wpłynęły stymulująco zarówno na indukcję EM, jak i na regenerację roślin zielonych. Stwier-

dzono, i średnio dla wszystkich badanych genotypów I rzędu, inkubacja pylników w AZC wpływała najkorzystniej na badane parametry EM. Obserwowano także regenerację roślin albinotycznych, których liczba zależała przede wszystkim od ogólnej liczby otrzymywanych roślin, a nie od traktowania inhibitorami metylacji.

Źródło finansowania: MRiRW, badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, tytuł projektu „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.

## Effect of methylation inhibitors on anther cultures of F<sub>1</sub> winter wheat hybrids

In anther cultures (AC) immature microspores form embryos under stress factors. Plants obtained from them have single or double sets of chromosomes. Doubled haploids are fully homozygous and are used in scientific research and breeding of new varieties. The efficiency of microspore embryogenesis (ME) induction and plant regeneration (PR) of wheat mainly depends on the genotype of the donor plant, the type of stress factor and the composition of the media. Recent epigenetic studies indicate that the ME process is also influenced by methylation of genes involved in embryo formation. The purpose of this study was to investigate the induction ability of ME and PR in AC of F<sub>1</sub> winter wheat hybrids treated with methylation inhibitors. Grains of F<sub>1</sub> hybrids, obtained from Polish breeding companies, were sown in the experimental field. The spikes were cut when the microspores reached the uninucleate stage. Then they were exposed to cold stress (4°C) for 10 to 20 days. The anthers were isolated and plated on liquid MS medium with the addition of methylation inhibitors: 5-azacytidine and trichostatin A. Then they were incubated in the dark for 7 days at 4°C, washed and transferred to liquid C17 medium for 8 weeks. The obtained embryogenic structures were transferred onto solidified MS medium for PR. Differences were observed in the number of embryogenic structures and green and albino plants between the F<sub>1</sub> hybrids. Methylation inhibitors had a stimulating effect on ME induction and green PR. 5-azacytidine had the most favorable effect on the studied ME parameters on average for all the studied genotypes combined. The number of albino plants depended mainly on the total number of plants obtained, rather than on treatment.

Source of funding: MRiRW, basic research for biological progress in crop production, project title „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.



## Zastosowanie kultur in vitro w ocenie dziedziczenia introgresji od *Nicotiana alata* w segregującej populacji $F_2$ mieszkańców tytoniu

A. TROJAK-GOLUCH, G. KORBECKA-GLINKA, H. OLSZAK-PRZYBYŚ,  
M. KAWKA-LIPIŃSKA

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –  
Państwowy Instytut Badawczy, Puławy;  
e-mail: anngol@iung.pulawy.pl

Krzyżowanie oddalone i introgresja międzygatunkowa są ważnymi mechanizmami ewolucyjnymi oraz sposobami przenoszenia połączonych cech z dzikich gatunków do gatunków uprawnych. Niezgodność genetyczna występująca między krzyżowanymi gatunkami często uniemożliwia powstawanie połączonych mieszańców, a to powoduje szereg niekorzystnych efektów, m.in.: obniżenie zdolności kiełkowania nasion lub żywotności hybrydowego potomstwa. Zakłócony rozwój zarodków mieszańców lub obniżenie ich żywotności może prowadzić do zmniejszenia frekwencji osobników posiadających introgresję w kolejnych pokoleniach. Celem badania było określenie dziedziczenia introgresji przeniesionej do tytoniu od dzikiego gatunku *Nicotiana alata* i warunkującej odporność na wirusa brzozy plamistości pomidora (TSWV). Motywacją do podjęcia tych badań była niska liczebność osobników z introgresją obserwowana w populacjach segregujących rosnących w doświadczeniach polowych. Oceniono w warunkach in vitro kiełkowanie nasion segregującej populacji  $F_2$ , uzyskanej z krzyżowania linii hodowlanych tytoniu (posiadających wymienione introgresje) z odmian uprawnych *N. tabacum*. Odkłone powierzchniowo nasiona populacji  $F_2$  umieszczono na pożywce MS. Oceniono zdolność kiełkowania nasion i wieńmas uzyskanych roślin. Materiał roślinny poddano analizom DNA w celu wykrycia introgresji przy użyciu kombinacji staterów PCR amplifikujących sekwencje specyficzne dla *N. alata* i *N. tabacum*. W badanej populacji określono także frekwencje roślin należących do trzech klas introgresji: homozygot z dwie-

ma kopiami introgresji (Ala-Ala), heterozygot z jedn kopii introgresji (Ala-Tob) oraz homozygot bez introgresji (Tob-Tob). Zdolno kiełkowania nasion badanej populacji  $F_2$  wyniosła 94,7%. średnia masa roślin po siedmiu tygodniach wzrostu in vitro wahała się od 0,31 do 0,48 g. Nie stwierdzono istotnych różnic w masie roślin przypisanych do różnych klas introgresji, co wskazuje, że materiał genetyczny od *N. alata* nie powoduje zahamowania wzrostu mieszańców. Liczebność roślin w poszczególnych klasach odbiegała jednak od stosunku 1:2:1 oczekiwanego na podstawie segregacji mendelowskiej. Odnotowano mniejszą frekwencję roślin Ala-Ala, natomiast zwiększony udział osobników Tob-Tob i Ala-Tob. Przyczyny tego zjawiska należy upatrywać w nieznacznie obniżonej zdolności kiełkowania osobników Ala-Ala, jak również w upośledzonej transmisji do gamet regionu chromosomalnego z introgresją.

## The use of in vitro cultures in the assessment of the inheritance of introgression from *Nicotiana alata* in a segregating $F_2$ population of tobacco hybrids

Distant crossing and interspecific introgression are important evolutionary mechanisms and common methods of transferring desirable traits from wild species to cultivated species. Genetic incompatibility occurring between the crossed species often prevents the formation of the desirable hybrids or causes a number of adverse effects including reduced seed germination or viability of hybrid offspring. Disturbed development of hybrid embryos or their reduced viability can lead to a reduction in the frequency of individuals having introgression in subsequent generations. The aim of this study was to determine the inheritance of introgression transferred to tobacco from the wild species *Nicotiana alata* and determining resistance to tomato brown spot virus (TSWV). The motivation for this study was the low number of individuals with introgression observed in segregating populations grown in field experiments. Seed germination of the segregating  $F_2$  population, obtained from crossing tobacco breeding lines (having the aforementioned introgression) with the cultivated variety of *N. tabacum*, was evaluated in vitro. Surface-disinfected seeds from the  $F_2$  population were placed on MS medium. Seed germination and fresh weight of the obtained plants were evaluated. The plant material was subjected to DNA analysis to detect introgression. This involved using a combination of PCR primers targeting sequences specific to *N. alata* and *N. tabacum*. In the study population, the frequency of plants belonging to three classes of introgression was also determined: homozygotes with two copies of introgression (Ala-Ala), heterozygotes with one copy of introgression (Ala-Tob) and homozygotes without introgression (Tob-Tob). The seed germination percentage of the tested  $F_2$  population was 94.7%. The average weight of the plants after seven weeks of in vitro growth ranged from

0.31 to 0.48 grams. There were no significant differences in the weight of plants assigned to the different introgression classes, indicating that genetic material from *N. alata* does not inhibit the growth of the hybrids. However, the number of plants in each class deviated from the expected 1:2:1 ratio based on Mendelian segregation. The frequency of Ala-Ala plants was lower, while the proportion of Tob-Tob and Ala-Tob individuals increased. A slightly reduced germination in Ala-Ala individuals, as well as impaired transmission to gametes of the chromosomal region with introgression, may explain these observations.





## Wpływ temperatury i rodzaju pożywek indukcyjnych na androgenezę owsa (*Avena sativa* L.)

M. WARCHOŁ<sup>1</sup>, D. JAKOVLJEVIĆ<sup>2</sup>, E. SKRZYPEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;

<sup>2</sup>Katedra Biologii i Ekologii, Uniwersytet w Kragujevacu, Serbia;

e-mail: m.warchol@ifr-pan.edu.pl

W praktyce hodowlanej uzyskiwanie nowych odmian zbóż trwa od kilku do kilkunastu lat i bazuje głównie na wyprowadzaniu roślin o wysokim stopniu homozygotyczności dróg krzyżowania wsobnych, a następnie selekcji osobników o pożądanym cechach. Zastosowanie biotechnologicznych metod pozwala na skrócenie nawet o kilka lat powyższej procedury i polega na otrzymywaniu haploidalnych roślin, a następnie linii podwojonych haploidów (DH, Doubled Haploids) metodami wspomaganymi kulturami in vitro. U zbóż androgeniza jest częściej stosowaną metodą otrzymywania homozygotycznych roślin, a produkcja in vitro struktur zarodkowych (ELS, embryo-like structures) jest bardziej efektywna od metod opartych na gynogenezie. W przeprowadzonych badaniach porównano dwa genotypy owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) pod względem ich kompetencji do androgenyzy. Wiechy owsa czyscano i chłodzono w temperaturze 4°C przez 7–21 dni. Wyzolowane pylniki wykładano na pożywkę W14 (Ouyang et al. 1989): stałą, półpłynną lub płynną i inkubowano w temperaturze 32°C przez 5 dni a następnie w 22°C przez 4–5 tygodni. Traktowanie wiech owsa temperaturami 4°C, a następnie 32°C, miało istotny wpływ na indukcję ELS u badanych genotypów. Największą liczbę ELS obserwowano u genotypu STH 65488 × Chimene. Otrzymano siedem haploidalnych roślin z czterech genotypów: Flämingsprof × STH 238, STH 238 × Matilda, STH 65488 × Chimene i Sławko × Kasztan, ale tylko dwie linie DH. Indukcja ELS zależała od genotypu rośliny macierzystej, a w mniejszym stopniu od rodzaju pożywek indukcyjnych.

## The effect of temperature pre-treatment and kind of induction media on androgenic response of oat (*Avena sativa* L.)

Production of new cereal cultivars in breeding practice involves several years and is based on the generation of plants with a high level of homozygosity through inbreeding and then selection of individuals with specific features. The use of biotechnological methods allows to shorten this procedure by up to several years and required obtaining haploid plants, followed by the generation of doubled haploid (DH) lines through in vitro culture methods. In cereals, the androgenesis is one of the most commonly used method for obtaining homozygous plants, and in vitro production of embryo-like structures (ELS) is more efficient than methods based on gynogenesis. In this study, we compared competence of twelve oat (*Avena sativa* L.) genotypes for androgenesis in anthers culture. Oat panicles were cut, and cooled at 4°C for 7–21 days. Isolated anthers were placed on solid W14 (Ouyang et al. 1989) media, semi-liquid W14 media, or liquid W14 media, and induced at 32°C for 5 days and then at 22°C for 4–5 weeks. For the majority of tested genotypes, the duration of the oat panicles pretreatment at 4°C and heat shock at 32°C had significant effects on the androgenesis induction. The highest number of ELS were obtained from genotype STH 65488 × Chimene. The seven haploid plants were regenerated from four genotypes: Flämingsprof × STH 238, STH 238 × Matilda, STH 65488 × Chimene, and Slawko × Kasztan, and only two DH lines were obtained. The induction of ELS depends mainly on the donor plant genotype and to a smaller extent on the induction media.



## SESJA 5

# Kultury roślinne w warunkach stresu







## Hormony roślinne u lnu traktowanego spermidyną i infekowanego patogennym grzybem

B. AUGUSTYNIAK-TOMAN<sup>1</sup>, W. WOJTASIK-GÓRNA<sup>1</sup>, I. PETŘÍK<sup>2</sup>, O. NOVÁK<sup>2</sup>,  
M. BURGBERGER-STAWARZ<sup>1</sup>, A. SAWUŁA<sup>1</sup>, Y. KOCHNEVA<sup>1</sup>, A. KULMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Inżynierii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;

<sup>2</sup>Laboratorium Regulatorów Wzrostu, Uniwersytet Pałackiego & Instytut Botaniki  
Doświadczalnej Czeskiej Akademii Nauk, Ołomuniec;  
e-mail: beata.augustyniak@uwr.edu.pl

Len, cenna roślina przemysłowa, dostarcza włókna i olej, stanowi cenne produkty. Nasiona lnu są bogate w składniki odżywcze, takie jak witaminy, fitosterole i lignany. Olej lniany i włókna znajdują zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, a prace nad nowymi odmianami mogą dodatkowo zwiększyć ich wykorzystanie, zwłaszcza produkty uważane za odpady, takie jak paździerze i makuchy, które również zawierają cenne składniki. Choroby grzybowe, zwłaszcza fuzarioza, stanowi istotne zagrożenie dla upraw lnu w Polsce, prowadząc do znacznych strat. Aby przeciwdziałać temu problemowi, kluczowe jest zidentyfikowanie mechanizmów odporności na grzyb *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, głównego sprawcy tych chorób oraz opracowanie odmian lnu odpornych na infekcję. Poliaminy, zwłaszcza zawierające co najmniej dwie grupy aminowe, występują zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych, pełniąc różnorodne funkcje biologiczne. W roślinach są uznawane głównie za czynniki ochronne w przypadku stresów abiotycznych i biotycznych, takich jak zasolenie, susza, niska temperatura czy atak patogenów. Mimo to ich dokładny mechanizm działania i rola w interakcjach roślin z patogenami pozostają jeszcze do ostatecznego zdefiniowania. Udział hormonów roślinnych w reakcji roślin na stres biotyczny jest do pewnego stopnia dobrze poznany, jednak brakuje szczegółowych informacji w temacie interakcji lnu z grzybem *F. oxysporum*. Przeprowadzono oznaczenie poziomu hormonów roślinnych w tkance lnu traktowanej spermidyną oraz infekowanej patogennym grzybem *F. oxysporum*. W badaniu uwzględniono kilka punktów czasowych oraz po-

dział na tkankę zieloną oraz korze. To pierwsza tego typu analiza przeprowadzona na tej roślinie. Spośród 75 związków, obecność 27 została potwierdzona. Dodatkowo wcześniej stwierdzono obecność 6 związków z grupy giberelin. Zmiany związane z traktowaniem i infekcją wystąpiły głównie w grupie cytokin, zwłaszcza zeatyny i jej pochodnych, w obu tkankach. Ponadto, podczas infekcji zaobserwowano zmiany w poziomie kwasu salicylowego oraz kwasu jasmonowego i jego pochodnych.

## Plant hormones in flax treated with spermidine and infected with a pathogenic fungus

Flax, a valuable industrial plant, provides fiber and oil as essential products. Flax seeds are rich in nutrients such as vitamins, phytosterols, and lignans. Flaxseed oil and fibers find applications in various industries, and ongoing work on new varieties could further increase their utilization, including products considered waste, such as husks and cake, which also contain valuable components. Fungal diseases, especially fusariosis, pose a significant threat to flax cultivation in Poland, leading to substantial losses. To counter this problem, it is crucial to identify the resistance mechanisms to the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* fungus, the main culprit behind these diseases, and develop flax varieties resistant to infection. Polyamines, compounds containing at least two amino groups, present in both plant and animal cells, serve diverse biological functions. In plants, they are mainly considered protective molecules in response to abiotic and biotic stresses, such as salinity, drought, low temperature, or pathogen attacks. However, their precise mechanism of action and role in plant-pathogen interactions remain to be definitively defined. The involvement of plant hormones in plant responses to biotic stress is well understood, but detailed information on the interaction between flax and the *F. oxysporum* fungus is lacking. Levels of plant hormones in flax tissue treated with spermidine and infected with the pathogenic *F. oxysporum* fungus were examined. The study includes multiple time points and distinguishes between green tissue and roots. This marks the first such analysis conducted on this plant. Among 75 compounds, the presence of 27 was confirmed. Additionally, the preliminary presence of 6 compounds from the gibberellin group was observed. Changes associated with treatment and infection primarily occurred in the cytokinin group, especially zeatin and its derivatives, in both tissues. Furthermore, during infection, changes in the levels of salicylic acid and jasmonic acid and its derivatives were observed.



## Effects of plant growth regulator-based nanoformulations on bacterial and plant cell viability

S. BISWAS, S. RAKESH, L. KIIRIKA, G. FRANKLIN, D. MONDAL

Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences (IPG PAS), Poznań;  
e-mail: fgre@igr.poznan.pl

Integrating nanomaterials into agriculture offers inventive solutions for enhancing nutrient delivery, optimizing pesticide efficacy, facilitating precise seed treatments, and promoting sustainable soil and water management. Understanding the impacts of novel formulations derived from plant growth regulators (PGRs) on both plants and phytopathogens is essential for advancing agricultural biotechnology towards sustainable agricultural practices. In this study, we developed PGRs-based nanoformulations containing CeO<sub>2</sub> and choline ascorbate ionic liquids and assessed their effects on the viability of *Agrobacterium tumefaciens* and *Hypericum perforatum* cells. *H. perforatum* cells were exposed to varying concentrations of the nanoformulations and incubated under optimal conditions. Cell viability was evaluated using standardized methods. Additionally, morphological changes and cell integrity were examined under a microscope. This enabled the assessment of chemical effects on *H. perforatum* cell viability, providing valuable insights for pharmaceutical and agricultural applications. Furthermore, we tested the efficacy of the nanoformulations in inhibiting the growth of *A. tumefaciens* in vitro. *A. tumefaciens* cultures were treated with different nanoformulation concentrations, followed by incubation, growth measurement, and compared with the control cultures. Our findings demonstrate a significant influence on *H. perforatum* cell viability, evidenced by specific morphological alterations and maintained cell integrity. Additionally, the viability of *A. tumefaciens* was significantly reduced upon treatment with the nanoformulations as determined by counting the colony forming units/ml, indicating potential applications in plant disease management and biotechnological interventions. Results of this study systematically contribute to the development of sustainable strategies for crop protection and enhancement, with implications for agricultural productivity and environmental sustainability.



## Związany z odpowiedzią na stres gen *ESK1* pozytywnie reguluje odpowiedź embriogeniczną komórek somatycznych w kulturze in vitro *Arabidopsis*

W.M. BUCHCIK, A.M. WÓJCIK, M.D. GAJ

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Śląski w Katowicach;  
e-mail: weronika.buchcik@wp.pl

Proces somatycznej embriogenezy (SE) manifestuje wyjątkowo plastyczny rozwój komórek roślinnych, która jest szeroko wykorzystywana w biotechnologii roślin do regeneracji roślin w kulturze in vitro dla potrzeb mikropropagacji i transformacji genetycznej. Ponadto, badania procesu SE dostarczają wiedzy o czynnikach molekularnych determinujących pluripotencję komórek somatycznych. Szczególne znaczenie dla dalszego postępu w opracowywaniu efektywnych protokołów regeneracji roślin w kulturze in vitro, produkcji sztucznych nasion i roślin genetycznie modyfikowanych ma poznanie genetycznych regulatorów SE. W celu identyfikacji czynników genetycznych kontrolujących tranzycję embriogeniczną komórek somatycznych zastosowano nowatorski metod sortowania jader komórkowych, FANS (Fluorescent Activated Nuclear Sorting), która w połączeniu z analizą transkryptomu RNAseq pozwoliła na identyfikację transkryptomu specyficznego dla komórek zaangażowanych w proces SE. Badaniom poddano kultury embriogeniczne indukowane na podłożu auksynowej z eksplantatów modelowej dla genomiki rośliny, *Arabidopsis*. Analiza transkryptomu jader komórkowych w 3 dniu indukcji embriogenicznej pozwoliła na wskazanie genów o istotnych zmianach ekspresji podczas wczesnej fazy indukcji SE. Wśród genów o istotnie podwyższonej ekspresji w 3 d. SE zidentyfikowano geny *TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE33 (TBL33)*, *TBL34* i *ESKIMO1 (ESK1)*. Celem zweryfikowania roli w SE genów-kandydatów wykorzystano mutanty insercyjne: *tbl33*, *tbl34*, *esk1 Arabidopsis*. Mutanty te analizowano pod względem efektywności i produktywności SE. Wykazano, że spośród badanych form, mutant *esk1* charakteryzuje się istotnym obniżeniem zdolności do odpowiedzi embriogenicznej w porównaniu



do genotypu dzikiego, Col-0. Wynik sugeruje pozytywny rol genu *ESK1* w kontroli tranzycji embriogenicznej. Zidentyfikowany gen koduje białko regulujące geny odpowiedzi na stres abiotyczny (zimno) u *Arabidopsis*. Biorąc pod uwagę kluczowe role genów odpowiedzi na stres w indukcji SE, związek genu *ESK1* ze stresem wzmacnia hipotezę o regulatorowej roli tego genu w indukcji embriogenicznej. Dalsze badania zmierzają do wskazania genów regulowanych przez *ESK1* podczas indukcji SE.

Badania zostały finansowane z projektu SONATA Narodowego Centrum Nauki (SONATA17 2021/43/D/NZ1/00154).

## The stress response-related gene *ESK1* positively regulates the embryogenic response of somatic cells in *Arabidopsis* in vitro culture

The process of somatic embryogenesis (SE) manifests the unique developmental plasticity of plant cells, which is widely used in plant biotechnology to regenerate plants in in vitro culture for micropropagation and genetic transformation. Moreover, studies of the SE process provide information about the molecular factors determining the pluripotency of somatic cells. The understanding of the genetic regulators of SE is of particular importance for further progress in the development of effective protocols for plant regeneration in in vitro culture, the production of artificial seeds, and genetically modified plants. In order to identify the genetic factors responsible for the embryogenic transition of somatic cells, an innovative method of sorting cell nuclei, FANS (Fluorescent Activated Nuclear Sorting), was used, which, combined with RNAseq transcriptome analysis, allowed the identification of the transcriptome specific for cells involved in the SE process. The study involved embryogenic cultures induced on auxin medium from explants of a model plant for genomics, *Arabidopsis*. Transcriptome analysis of cell nuclei on day 3 of embryogenic induction allowed the identification of genes with significant expression changes during the early phase of SE induction. Among the genes with significantly increased expression at 3 d. of SE, the *TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE33* (*TBL33*), *TBL34*, and *ESKIMO1* (*ESK1*) genes were identified. The insertion lines, including *tbl33*, *tbl34*, and *esk1*, were used to verify the role of candidate genes in SE. The mutants were analyzed in terms of SE efficiency and productivity. It was shown that among the tested lines, the *esk1* mutant was characterized by a significant reduction in the capability for embryogenic response compared to the wild genotype, Col-0. The result suggests a positive role of the *ESK1* gene in the control of embryogenic transition. The identified gene encodes a protein that regulates abiotic stress (cold) response genes in *Arabidopsis*. Considering the key role of stress response genes in SE induction, the stress-related functions of the *ESK1* gene support the hypothesis of the regulatory role of this gene in embryogenic induction. Further research aims to identify the genes regulated by *ESK1* during SE induction.

This work was supported by a research grant from the National Science Centre in Poland (SONATA17 2021/43/D/NZ1/00154).



## Dynamika ściany komórkowej wywołana przez uczulanie lnu niepatogennym szczepem *Fusarium oxysporum*

M. BURGBERGER-STAWARZ, A. WYPYCHOWSKA, J. MIERZIAK-DERECKA,  
B. AUGUSTYNIAK-TOMAN, Y. KOCHNEVA, A. SAWUŁA, A. KULMA,  
W. WOJTASIK-GÓRNA

Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;  
e-mail: marta.burgberger@uwr.edu.pl

Len (*Linum usitatissimum*) to roślina ceniona za włókna i nasiona, używana w medycynie, przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Patogenny grzyb *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* stanowi poważne zagrożenie, powodując fuzariozę lnu, która skutkuje zmniejszeniem jego plonów. Rodzki do kontroli biologicznej, takie jak niepatogenny szczep *Fusarium oxysporum* (Fo47) mogą zwiększać odporność roślin, choć mechanizm ten jest niejasny. Sugeruje się, że niepatogenny szczep *F. oxysporum* może rywalizować z patogennymi szczepami w glebie. Dodatkowo, kolonizując korzenie, niepatogenny szczep może zapobiegać penetracji patogennych szczepów oraz zapewniać prewencyjną ochronę poprzez aktywację indukowanej odporności systemicznej u roślin. Ściana komórkowa roślin pełni funkcję głównej bariery obronnej przed patogenami, przechodząc dynamiczne zmiany w celu zapobiegania infekcjom. Wykazuje zdolność do wykrywania zewnętrznych stresów i wyzwalania odpowiedzi obronnej. Utrzymanie integralności ściany komórkowej jest kluczowe dla aktywacji i monitorowania mechanizmów obronnych. Zmiany w składzie lub strukturze ściany komórkowej wpływają na odporność roślin na stresy biotyczne. Celuloza, hemiceluloza, pektyny i ligniny są kluczowymi składnikami niezbędnymi dla odporności roślin. Dodatkowo, cząsteczki pochodzące ze ściany komórkowej działają jako elicytory, zwiększając odporność roślin na choroby. Celem przeprowadzonego eksperymentu było określenie wpływu uczulania lnu niepatogennym szczepem *F. oxysporum* (Fo47) na zawartość polimerów ściany komórkowej oraz na ekspresję genów zaangażowanych w jej metabolizm, podczas infekcji patogennym szczepem *Fusa-*

*rium oxysporum f. sp. lini*. Po stopniowej infekcji monitorowano poprzez określenie zawartości DNA grzybowego oraz obserwacje mikroskopowe. Odpowiedź obronna roślin została potwierdzona przez wzrost poziomu transkrypcji genu kodującego chitynazę. Zbadano zawartość pektyn i hemicelulozy poprzez analizę kwasów uronowych i cukrów prostych. W pektynach z łodygi i hemicelulozie z korzenia zaobserwowano zmiany w ilościach i udziale frakcji cukrów prostych. W przypadku pektyn z korzenia i hemicelulozy z łodygi zaobserwowano tylko zmiany w udziale frakcji.

## Cell wall dynamics induced by priming flax with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain

Flax (*Linum usitatissimum*) is primarily cultivated for fibers and seeds. The pathogenic fungus *Fusarium oxysporum f. sp. lini* poses a significant threat, causing Fusarium wilt and reducing yields. Biocontrol agents such as the non-pathogenic strain *Fusarium oxysporum (Fo47)* can enhance plant resistance, although the mechanism remains unclear. It is suggested that the non-pathogenic strain of *F. oxysporum* may compete with pathogenic strains in the soil. By colonizing roots, the non-pathogenic strain may prevent penetration by pathogenic strains and provide preemptive protection by activating induced systemic resistance in plants. The plant cell wall acts as the primary defence barrier against pathogens, undergoing dynamic changes to prevent infection. It senses external stresses and triggers defence responses. Maintaining the integrity of the cell wall is crucial for activating and monitoring defence mechanisms. Alterations in cell wall composition or structure affect plant resistance to biotic stresses. Cellulose, hemicellulose, pectin, and lignin are key components essential for plant immunity. Molecules derived from the cell wall act as elicitors, enhancing plant disease resistance. The aim of the conducted experiment was to determine the influence of priming flax with the non-pathogenic strain *Fo47* on the content of cell wall polymers and the expression of genes involved in its metabolism during infection with the pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. The progress of infection was monitored by determining fungal DNA content and microscopic observations. The plant's defence response was confirmed by an increase in the transcript level of gene encoding chitinase. Pectin and hemicellulose content were examined through the analysis of uronic acids and simple sugars. Changes in the quantities and proportions of simple sugars were observed in pectins from the stems and hemicelluloses from the roots. In the case of pectins from the roots and hemicelluloses from the stems, only changes in the proportions of fractions were observed.



## Krioprezerwacja czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) w ciekłym azocie

M. BURIAN<sup>1</sup>, W. KISZCZAK<sup>2</sup>, M. CHOJNOWSKI<sup>1</sup>, M. SITAREK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Odmianoznawstwa, Szkółkarstwa i Zasobów Genowych, Instytut Ogrodnictwa –  
Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;

<sup>2</sup>Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
Skierniewice;

e-mail: maria.burian@inhort.pl

Krioprezerwacja jest bezpieczną i opłacalną metodą długoterminowego zabezpieczania materiału roślinnego w ciekłym azocie, m.in. czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.), który należy do roślin stanowiących bardzo bogate źródło różnorodnych substancji biologicznie czynnych i z tego względu znajduje on szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz medycznym. Zaletą długoterminowego przechowywania czosnku pospolitego w ciekłym azocie jest niewielka powierzchnia przechowywania, ochrona przed zmiennymi warunkami zewnętrznymi oraz stosunkowo niewielkie koszty utrzymania próbek. Obecnie najczęściej wykorzystywaną oraz najbardziej skuteczną techniką krioprezerwacji w przypadku czosnku pospolitego jest metoda witrifikacji. Celem niniejszych badań było zastosowanie metody witrifikacji do długoterminowego przechowywania obiektów czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.) w ciekłym azocie. Przewodność i regeneracja oceniano po 2 i 10 tygodniach. Po 2 tygodniach przewodność wynosiła 60-93%. Natomiast regeneracja obiektów czosnku wprowadzonych do długoterminowego przechowywania wynosiła 50-68%.

## Cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.) in liquid nitrogen

Cryopreservation is a safe and cost-effective method of long-term preservation of plant material in liquid nitrogen, including common garlic (*Allium sativum* L.), which is a plant that is a very rich source of various biologically active substances and is therefore widely used in the food, pharmaceutical and medical industries. The advantage of long-term storage of garlic in liquid nitrogen is a small storage space, protection against changing external conditions and relatively low sample maintenance costs. Currently, the most frequently used and most effective cryopreservation technique for common garlic is the vitrification method. The aim of this research was to use the vitrification method for long-term storage of garlic (*Allium sativum* L.) objects in liquid nitrogen. Survival and recovery were assessed after 2 and 10 weeks. After 2 weeks, survival was 60-93%. However, the regeneration of garlic objects placed in long-term storage was 50-68%.



## Wpływ apokarotenoidów na infekcję *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* lnu zwyczajnego

Y. KOCHNEVA<sup>1</sup>, J. MIERZIAK-DERECKA<sup>1</sup>, Z. GUZIK<sup>1</sup>, I. ZALEWSKI<sup>2</sup>,  
B. AUGUSTYNIAK-TOMAN<sup>1</sup>, M. BURGBERGER-STAWARZ<sup>1</sup>, A. SAWUŁA<sup>1</sup>, A. KULMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Genetycznej, Uniwersytet Wrocławski;

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Dietetyki i Bromatologii,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu;  
e-mail: yelyzaveta.kochneva@uwr.edu.pl

Choroby grzybicze ro lin stanowi ogromny problem dla gospodarki i rolnictwa. Największe straty w uprawie lnu na świecie powodują infekcje grzybicze, takie jak fuzarioza lnu. Len (*Linum usitatissimum* L.) wykorzystywany jest w wielu gałęziach przemysłu jako źródło błonnika, oleju, związków bioaktywnych oraz jako roślina lecznicza, a zapotrzebowanie na ten roślina z roku na rok wzrasta. Władzie lnu jest spowodowane przez specyficzny patogen lnu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Choroba ta charakteryzuje się śródziemnymi i włośnicami, po czym rośliny brzośnieją i umierają. Grzybnia i zarodniki patogenu przeżywiają w resztkach lnu w glebie, a następnie rozprzestrzeniają się przez wiatr, powielając infekcję. Poszukuje się rozwiązań powyższych problemów, jedno z nich to badanie związków roślinnych biorących udział w odpowiedzi roślin na infekcję. Niektóre z nich wydają się całkiem obiecujące, jak na przykład apokarotenoidy: grupa związków o różnej budowie i funkcjach, powstająca w wyniku oksydacyjnego rozkładu karotenoidów katalizowanego przez dioksygenazy karotenoidowe lub na drodze nieenzymatycznej. Wśród apokarotenoidów znajdują się związki o potwierdzonym znaczeniu hormonalnym (kwas abscysynowy, strigolaktyny) oraz związki, dla których znaczenie sygnałowe jest jedynie postulowane, m.in.  $\beta$ -cyklocytral. Związki te mogą także brać udział w odpowiedzi na stres abiotyczny. Wiadomo również, że związki apokarotenoidowe biorą udział w zmianach metabolizmu roślin w czasie infekcji. Jednak nadal nie ma wystarczających informacji na ten temat. W prezentowanych badaniach okre-

lono wpływ związków apokarotenoidowych (m.in.  $\alpha$ ,  $\beta$ -jononów) na infekcję lnu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Wyniki wykazały, że lotne apokarotenoidy mogą odgrywać ważną rolę w odpowiedzi lnu na infekcję *Fusarium*. Dostarczaj także pomysłów na wykorzystanie danych związków jako środków ochrony roślin.

## The effect of apocarotenoids on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* infection of flax

Fungal infections are a huge problem for economics and agriculture. For example, the greatest losses in the cultivation of flax in the world are caused by fungal infections such as *Fusarium* wilt. Flax (*Linum usitatissimum* L.) is used in many industries as a source of fiber, oil, bioactive compounds, as a medicinal plant and the demand for this plant increases every year. *Fusarium* wilt of flax is caused by specific flax pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. This disease is characterized by yellowing and wilting of the leaves, after which the plant turns brown and dies. The mycelium and spores of the pathogen survive in the flax debris in the soil and then spread by the wind, multiplying the infection. Solutions to the above mentioned problems are being sought, one of which begins with the study of plant compounds involved in the plant response to infection. Some of them appear to be quite promising, for example apocarotenoids: a group of compounds with various structures and functions, formed as a result of the oxidative decomposition of carotenoids catalyzed by carotenoid dioxygenases or by a non-enzymatic route. Among the apocarotenoids there are compounds with confirmed hormonal importance (abscisic acid, strigolactones) and compounds for which signaling significance is only postulated, e.g.  $\beta$ -cyclocitral. These compounds may be also involved in the response to abiotic stress. It is also known that apocarotenoid compounds are involved in changes in plant metabolism during infection. But there is still insufficient information on this subject. In the presented research the effect of apocarotenoid compounds (including  $\alpha$ ,  $\beta$ -ionones) on the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* infection of flax were investigated. The results show that volatile apocarotenoids may have an important role in flax response to the *Fusarium* infection. They also provide ideas for using given compounds as plant protection products.



## Development of floating seedling cultures of *Hypericum perforatum* L. for a detailed understanding of the effects of engineered nanoparticles on plants

P. MATAM, G. FRANKLIN, D. MONDAL

Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences (IPG PAS), Poznań;  
e-mail: pmat@igr.poznan.pl

To establish floating seedling cultures of *Hypericum perforatum* L., regenerated shoots (2–5 cm) were cut and placed in jars containing 60 ml of half-strength liquid MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 1.5% sucrose and 0.5 mg/L indole-3-butyric acid. The cultures were maintained at 25°C in a growth chamber under a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness. Engineered metal and metal oxide nanoparticles were added to the culture medium. Analysing the profile of secondary metabolites after treatment by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) showed that the nanoparticles rapidly induced fluctuations in the secondary metabolism of the *H. perforatum* seedlings. Analysis of the biomass growth rate showed that treatment with nanoparticles *via* the roots did not affect plant growth during prolonged exposure.





## Wykorzystanie kultur in vitro grzybów zgniliznowych dla określenia ich wpływu na rozkład sosnowego substratu drzewnego

M. OSMENDA<sup>1</sup>, K. NAWROT-CHORABIK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Państwowe Gospodarstwo Leśne Lasy Państwowe Nadleśnictwo Olkusz;  
<sup>2</sup>Katedra Ochrony Ekosystemów Leśnych, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: malgorzata.osmenda@katowice.lasy.gov.pl

Sosna zwyczajna jest jednym z najważniejszych gatunków drzew lasotwórczych w Polsce. Drzewo to posiada szeroki areal bytowania występując na obszarze wielu siedlisk, takich jak bory, bory mieszane oraz lasy mieszane. Sosna zwyczajna posiada również zdolność do szybkiego wzrostu, co czyni ją jednym z najlepszych gatunków drzew przeznaczonych do produkcji surowca drzewnego. Drewno sosnowe charakteryzuje się dużą elastycznością, wytrzymałością na uszkodzenia mechaniczne oraz jasną barwą, dlatego znalazło szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, tj. budownictwie, produkcji papieru czy stolarstwie. Nie zmienia to faktu, że żywe drzewa oraz ich drewno stanowi doskonały substrat pokarmowy wielu gatunków grzybów występujących powszechnie w lasach. Grzyby zgniliznowe posiadają zdolność do przeprowadzania enzymatycznej dekompozycji licznych składników drewna wywołując przez to zgniliznę różnego rodzaju m.in. białą zgniliznę (rozkład celulozy, ligniny i hemicelulozy), brunatną zgniliznę (rozkład celulozy) i białą zgniliznę jamokowatą (rozkład celulozy i ligniny). Powstała zgnilizna sprawia, że drewno traci swoją pierwotną strukturę i wytrzymałość, uniemożliwiając jego wykorzystanie w branżach drzewnych, tj. tartacznictwie lub produkcji opakowań. Ze względu na obecny problem dotyczący pogorszenia jakości i właściwości drewna sosnowego przez oddziaływanie na nie licznych gatunków grzybów zgniliznowych przeprowadzono badania z wykorzystaniem kultur in vitro mające na celu określenie możliwości rozkładu substratu drzewnego przez różne grzyby zgniliznowe. W przeprowadzeniu badań wykorzystano kultury trzech gatunków grzybów, który-

mi były *Trichaptum fuscoviolaceum* (wywołuj cy białą zgnilizn ), *Postia ptychogaster* (wywołuj cy brunatną zgnilizn ) oraz *Porodaedalea pini* (wywołuj cy zgnilizn białą jamkowatą ). Możliwość rozkładu przez wybrane gatunki grzybów zbadano przy wykorzystaniu substratu pokarmowego, jakim były trociny wykonane z bieli i twardej sosny zwyczajnej. Obydwa rodzaje trocin zostały umieszczone w pojedynczych szalkach Petriego, w których następnie umieszczono pojedyncze kultury wybranych grzybów. Wyniki badań pokazały, że gatunkiem, który spowodował największy rozkład trocin bielastych i twardej sosny był *T. fuscoviolaceum*. Gatunek ten spowodował ubytek masy trocin bielastych o 3,7% większy w porównaniu do *P. ptychogaster* oraz o 2,5% w porównaniu do *P. pini*. Podobnie zalecono zaobserwowano w badaniu z wykorzystaniem trocin twardej sosny, gdzie *T. fuscoviolaceum* spowodował największą redukcję trocin, tzn. o 9,8% więcej w porównaniu do *P. ptychogaster* oraz o 12,3% do *P. pini*. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stopień rozkładu trocin sosnowych przez grzyby zależy od tempa rozwoju kultury grzybów oraz rodzaju zastosowanego substratu, na którym rozwijały się grzyby. Ponadto przeprowadzone badania stanowią podstawę do opracowania innowacyjnych metod biologicznej walki z gatunkami grzybów posiadających zdolność do intensywnego rozkładu surowca drzewnego.

## Use of in vitro rot fungi cultures to determine their impact on the pine wood substrate decomposition

Scots pine is one of the most important forest-forming tree species in Poland. This tree has a wide range of habitats, such as coniferous forests, mixed coniferous forests and mixed forests. Scots pine also has the ability to grow quickly, which makes it one of the best tree species intended for raw wood production. Pine wood is characterized by high flexibility, resistance to mechanical damage and light color, which is why it is widely used in many industries, such as construction, paper production and carpentry. That doesn't change the fact that living trees and their wood constitute an excellent food substrate for many species of fungi commonly found in forests. Rot fungi have the ability to enzymatically decompose numerous wood components, thereby causing various types of rot, including: white rot (decomposition of cellulose, lignin and hemicellulose), brown rot (decomposition of cellulose) and white pit rot (decomposition of cellulose and lignin). The resulting rot causes the wood to lose its original structure and strength, making it impossible to use in wood industries, such as sawmilling or packaging production. Due to the current problem of the quality and properties deterioration of pine wood due to the impact of numerous rot fungi species, research using in vitro cultures was carried out to determine the possibility of wood substrate decomposition by various rot fungi. The research involved the use of three rot fungi species: *Trichaptum fuscoviolaceum* (causing white rot), *Postia ptychogaster* (causing brown rot) and

*Porodaedalea pini* (causing white pit rot). The study on the possibility of decomposition by selected fungi species was carried out using a food substrate, which was sawdust made from the sapwood and heartwood of Scots pine. Both types of sawdust were placed in individual Petri dishes, into which single cultures of selected fungi were then placed. The research results showed that the species that caused the greatest decomposition of sapwood and heartwood sawdust was *T. fuscoviolaceum*. This species caused a 3.7% greater loss of sapwood sawdust mass compared to *P. ptychogaster* and 2.5% greater compared to *P. pini*. A similar relationship was observed in the study using heartwood sawdust, where *T. fuscoviolaceum* caused the greatest sawdust reduction, i.e. 9.8% more compared to *P. ptychogaster* and 12.3% more than *P. pini*. Based on the conducted research, it was found that the amount of pine sawdust decomposition by fungi depends on the development rate of the fungi culture and the type of substrate used on which the fungi developed. Moreover, the conducted research constitutes the basis for the innovative methods development to biologically combat fungal species that have the ability to intensively decompose wood raw materials.



## Zastosowanie heterotroficznych i autotroficznych siewek pszenicy jarej w badaniach tolerancji stresu wodnego

A. OSTROWSKA, T. HURA

Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego,  
PAN w Krakowie;  
e-mail: a.ostrowska@ifr-pan.edu.pl

Susze wiosenne stanowi poważnym zagrożeniem dla upraw zbóż jarych we wczesnych etapach wzrostu. Związane jest to m.in. z niedostatecznie rozwiniętym systemem korzeniowym w stadium siewki. Oprócz mechanizmów przystosowawczych do suszy glebowej równie ważne są te mechanizmy, które decydują o efektywnej regeneracji roślin w następującym po suszy okresie rehydratacji. Badania przeprowadzono na siewkach pszenicy jarej w fazie heterotroficznej (siewka 4-dniowa – odporna na deficyt wody) oraz autotroficznej wzrostu (siewka 6-dniowa – wrażliwa). Rośliny poddano działaniu 4-dniowej suszy, a następnie rehydratacji (24 godziny). W czwartym dniu suszy oraz po 24 godzinach rehydratacji wykonano analizy względnej zawartości wody, potencjału osmotycznego, zawartości chlorofilu, wymiany gazowej, aktywności aparatu fotosyntetycznego oraz ekspresji genów *HVA1* i *SRG6*.

U obydwu typów siewek, heterotroficznej i autotroficznej, w warunkach suszy zaobserwowano obniżenie zawartości wody, zwiększony wypływ elektrolitów, spadek intensywności fotosyntezy netto oraz przewodnictwa szparkowego. Wrażliwa siewka autotroficzna na dehydratację przejawiała się m.in. obniżeniem zawartości chlorofilu oraz spadkiem uwodnienia liści, a także zmianami w wartościach niektórych parametrów fluorescencji chlorofilu. U tego samego typu siewki stres wodny indukował wzrost ekspresji genów *HVA1* (892x) oraz *SRG6* (3x). Przeprowadzone analizy po 24 godzinach rehydratacji uwiaryściły bardziej efektywną regenerację siewek heterotroficznych w porównaniu do siewek autotroficznych. Siewki autotroficzne nadal charakteryzowały się obniżoną aktywnością fotosyntetyczną, czemu

towarzyszył utrzymujcy się wzrost poziomu transkryptu *HVA1*. Przeprowadzone badania potwierdziły odmienne odpowiedzi siewek heterotroficznych i autotroficznych na suszę i rehydrację. Dyskutowana jest możliwość wykorzystania tego typu badań w selekcji odmian pszenicy jarej efektywnie regenerujących się po ustąpieniu suszy glebowej. Różnica dwóch dni w zainicjowaniu suszy dała odmienne reakcje obu badanych grup siewek. Pokazuje to istotność dalszych badań nad reakcją siewek w zależności od wieku siewki.

## The use of heterotrophic and autotrophic spring wheat seedlings in water stress tolerance studies

Spring droughts pose a serious threat to spring cereal crops at early stages of their growth. One of the reasons is an insufficiently developed root system at the seedling stage. Apart from adaptation mechanisms to soil drought, the mechanisms determining efficient plant regeneration during post-drought rehydration are equally important. The study was carried out on spring wheat seedlings in the phase of heterotrophic (4-day-old seedlings resistant to water deficit) and autotrophic (6-day-old seedlings sensitive to water deficit) growth. The plants were subjected to a 4-day-long drought and then rehydration (24 hours). On the fourth day of drought and after 24 hours of rehydration, we analyzed relative water content, osmotic potential, chlorophyll content, gas exchange, activity of the photosynthetic apparatus, and the expression of *HVA1* and *SRG6* genes. Both heterotrophic and autotrophic seedlings responded to drought with a reduced water content, an increased leakage of electrolytes, and with lowered intensity of net photosynthesis and stomatal conductance. Sensitivity of the autotrophic seedlings to dehydration manifested as, for example, reduced chlorophyll content and leaf hydration, as well as changes in some chlorophyll fluorescence parameters. Moreover, water stress intensified the expression of the *HVA1* (892 times) and *SRG6* (3 times) genes. The analyzes performed after 24 hours of rehydration revealed more efficient regeneration of the heterotrophic than the autotrophic seedlings. The latter still had lowered photosynthetic activity and elevated level of the *HVA1* transcript. Our study confirmed different responses of heterotrophic and autotrophic seedlings to drought and rehydration. Experiments of this type can possibly be used to select spring wheat cultivars capable of efficient regeneration after soil drought. In the seedlings differing in age by only 2 days, drought activated different response pathways. This shows how important the seedling age is in the research on their response to drought.



## Quantification of gold and silver nanoparticles/ions in shoots and roots of floating seedling cultures of *Hypericum perforatum* L.

M. SAXENA, L. MUTHUKRISHNAN, G. FRANKLIN, D. MONDAL

Institute of Plant Genetics of the Polish Academy of Sciences (IPG PAS), Poznań;  
e-mail: msaxena@igr.poznan.pl

The accumulation of gold (Au) and silver (Ag) nanoparticles (NPs)/ions in the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. seedlings exposed to these NPs via their roots was investigated in floating seedlings. The changes in the content of NPs in the culture medium were monitored by UV-Vis spectroscopy and the concentration of NPs/ions in the roots and shoots of the seedlings was determined by total reflectance X-ray fluorescence spectroscopy (TXRF) using gallium as an internal standard. After a 7-day treatment with 10 ppm NPs, the roots and shoots of the seedlings were separated and ground to a fine powder in liquid nitrogen and freeze-dried. The dry biomass was digested in 65% nitric acid at 80°C for 15 minutes and analysed for Au and Ag content compared to the control seedlings. The results showed that the Ag-NPs depleted rapidly from the medium, while the concentration of Au-NPs did not change significantly over time. TXRF analysis showed that the seedlings accumulated a very high Ag concentration but only a very low amount of Au. A significantly higher Ag concentration was found in the shoots than in the roots, while an opposite trend was observed for Au. The rapid removal of Ag NPs from the medium in combination with the significantly higher amount of Ag in the shoots than in the roots indicates an efficient uptake of NPs/ions by the roots and subsequent transport into the aerial part of the *H. perforatum* seedlings.



## Wpływ krioprezerwacji poprzez kapsułkowanie- dehydratację na kinetykę wzrostu, potencjał embriogeniczny i wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach zawieszinowych *Gentiana capitata* Buch.-Ham. ex D.Don i *Gentiana decumbens* L.f.

M. MARKOWSKI<sup>1</sup>, Z. CZARNOMSKA<sup>1</sup>, K. TOMICZAK<sup>2,3</sup>, S. GRANICA<sup>1</sup>,  
M. PODWYSZYŃSKA<sup>4</sup>, M. MIKUŁA<sup>3</sup>, W. SZYPUŁA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny;

<sup>2</sup>Polska Akademia Nauk, Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności  
Biologicznej w Powsinie, Warszawa;

<sup>3</sup>Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików;

<sup>4</sup>Zakład Biologii Stosowanej, Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy,  
Skierniewice;

e-mail: wszypula@wum.edu.pl

Celem pracy była ocena wpływu sacharozy i krioprezerwacji na kinetykę wzrostu, potencjał embriogeniczny oraz wytwarzanie metabolitów wtórnych w kulturach zawieszinowych *Gentiana capitata* i *G. decumbens*. Kinetykę wzrostu, liczbę zregenerowanych somatycznych zarodków i zawartość DNA oceniano w płynnej pożywce Murashige i Skooga z dodatkiem 3% lub 6% sacharozy. Metabolity wtórne analizowano za pomocą UHPLC-DAD-IT-MS/MS. Przyrost biomasy oceniany po 4 tygodniach kultur był zawsze wyższy w pożywkach zawierających 3% sacharozy niż 6% sacharozy, niezależnie od gatunku i wynosił  $146 \pm 7\%$  dla *G. capitata* i  $116 \pm 22\%$  dla *G. decumbens*. Przyrost biomasy w kulturach zawieszinowych uzyskanych z krioprezerwowanego materiału roślinnego był zawsze niższy i po 4 tygodniach wynosił odpowiednio  $28 \pm 5\%$  i  $33 \pm 3\%$  dla *G. capitata* i *G. decumbens*. Przed enkapsulacją potencjał embriogeniczny zawieszin komórkowych *G. capitata* był średnio 7,5 razy większy niż u *G. decumbens* i był uzyskany w kulturach z dodatkiem 3% sacharozy oraz średnio 4,6 razy większy w przypadku kultur z pożywką zawierającą 6% cukru. U obu



gatunków zawiesiny komórkowe prowadzone w po ywce zawieraj cej 6% sacharozy wytwarzały wi cej zarodków somatycznych (odpowiednio  $3,7 \pm 0,6$  i  $0,8 \pm 0,2$  na 50 mg zawiesiny komórkowej *G. capitata* i *G. decumbens*) ni te uzyskane wpo ywce zawieraj cej 3% sacharozy (odpowiednio  $3,0 \pm 0,7$  i  $0,4 \pm 0,2$  na 50 mg zawiesiny komórkowej *G. capitata* i *G. decumbens*). Zmienno zawarto ci 2C DNA wykryto u *G. decumbens* poddanej działaniu wy szych st e sacharozy. Skład metabolitów wtórnych w zawiesinach komórkowych ró nił si od składu metabolitów w ro linach uprawianych in vitro. Ekstrakty z agregatów komórkowych nie zawierały sekoirydoidów typowych dla ro lin z rodziny Gentianaceae, ale niektóre pochodne benzofenonu i izowiteksyny (f awonoidy) wcze niej niezidentyfikowane u tych gatunków.

### The influence of cryopreservation via encapsulation-dehydration on growth kinetics, embryogenic potential and secondary metabolite production of cell suspension cultures of *Gentiana capitata* Buch.-Ham. ex D.Don and *Gentiana decumbens* L.f.

This study aimed to assess the impact of sucrose concentrations and cryopreservation on growth kinetics, embryogenic potential, and secondary metabolite production in cotyledon-derived cell suspensions of *Gentiana capitata* and *G. decumbens*. Growth kinetics, somatic embryo regeneration, and 2C DNA content were evaluated in cell suspensions cultured in liquid Murashige and Skoog medium with 3% and 6% sucrose, either encapsulated in calcium alginate or non-encapsulated, and subjected to cryopreservation via encapsulation-dehydration or kept non-cryopreserved. Secondary metabolites were analyzed using UHPLC-DAD-IT-MS/MS. Biomass growth rates were consistently higher with 3% sucrose compared to 6%, regardless of *Gentiana* species, reaching maximum rates of  $146 \pm 7\%$  for *G. capitata* and  $116 \pm 22\%$  for *G. decumbens* at 4 weeks. Cryopreserved cultures displayed lower growth rates, measuring  $28 \pm 5\%$  and  $33 \pm 3\%$  for *G. capitata* and *G. decumbens*, respectively, after 4 weeks. *G. capitata* exhibited 7.5 times higher SE productivity than *G. decumbens* in 3% sucrose medium and 4.6 times higher in 6% sucrose medium before encapsulation. Both species' cell suspensions cultured with 6% sucrose produced more SEs ( $3,7 \pm 0,6$  and  $0,8 \pm 0,2$  per 50 mg of cell suspension for *G. capitata* and *G. decumbens*, respectively) than those from 3% sucrose medium ( $3,0 \pm 0,7$  and  $0,4 \pm 0,2$  per 50 mg cell suspension for *G. capitata* and *G. decumbens*, respectively). Variations in 2C DNA content were observed in *G. decumbens* tissues treated with higher sucrose concentrations. Analysis of secondary metabolites revealed differences between cell suspensions and in vitro grown plants, with the absence of typical Gentianaceae secoiridoids and the presence of previously unidentified benzophenone and isovitexin derivatives.





## Wpływ czasu dehydratacji powietrznej w procesie krioprezerwacji korzeni transformowanych *Polyscias filicifolia* na ich stabilność genetyczną i profil fitochemiczny

A.A. ŚLIWIŃSKA<sup>1</sup>, K. TOMICZAK<sup>2,3</sup>, M. OBRĘBSKI<sup>1</sup>, B. WILEŃSKA<sup>4</sup>,  
R.M. KIEŁKIEWICZ<sup>1</sup>, M. PODWYSZYŃSKA<sup>5</sup>, J.M. ZIELEŻNICKA<sup>1</sup>, A. MIKUŁA<sup>2</sup>,  
K. SYKŁOWSKA-BARANEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny;

<sup>2</sup>Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej,  
Warszawa;

<sup>3</sup>Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików;

<sup>4</sup>Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski;

<sup>5</sup>Instytut Ogródnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, Skierniewice;

e-mail: anita.sliwinska@wum.edu.pl

Opracowanie skutecznej procedury kriokonserwacji ma kluczowe znaczenie dla utrzymania stabilności na poziomie morfologicznym i genetycznym, a także biosyntezy metabolitów wtórnych w materiale roślinnym. Transformowane korzenie (KT) *Polyscias filicifolia* poddano dehydratacji osmotycznej (OD), następnie dehydratacji powietrznej (AD), lub bez niej, przez 3 do 6 godzin w celu przechowywania kriogenicznego w ciekłym azocie. Stabilność genetyczną zregenerowanych korzeni transformowanych *P. filicifolia* oceniano za pomocą dwóch markerów: powtórzone odcinków DNA pomiędzy mikrosatelitami (ISSR) i ukierunkowanych na kodony startowe (SCoT), wraz z zawartością jądrowego DNA. Ocenę morfologiczną przeprowadzono na podstawie przeżywalności i wzrostu biomasy wiekowej i suchej. Analizy ilościowe i jakościowe kwasu chlorogenowego (CGA) i kwasu oleanolowego (OA) przeprowadzono przy użyciu HPLC-UV-Vis i HPLC-PDA-ESI-HRMS. Do badania potencjału antyoksydacyjnego wykorzystano test 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylu (DPPH) i siłę

przeciwutleniając i redukując elazo (FRAP). Poddanie KT *P. filicifolia* tylko dehydracji osmotycznej było niewystarczające, aby skutecznie chronić je przed krioprezervacją. Najwyższy współczynnik przeżywalności (93%) i wzrost biomasy (nawet 3-krotny) zaobserwowano dla KT poddanych OD, a następnie 6-godzinnej AD. Najdłuższy czas AD miał negatywny wpływ na stabilność genetyczną *P. filicifolia* KT. Dłuższy czas trwania AD generował większy stres, co znalazło odzwierciedlenie w wysokiej zawartości kwasu CGA. Analiza HPLC-PDA-ESI-HRMS potwierdziła, że głównym metabolitem był kwas CGA, któremu towarzyszyły pochodne kwasu ferulowego, kwas 3,5-O-dikawoilochoinowy i kwas 5-p-kumaroilochoinowy. Profil biosyntezy zwanego związku w KT pozostawał niezmierny podczas hodowli przez okres do 12 miesięcy. Największą aktywność przeciwutleniającą, z zastosowaniem metod: DPPH i FRAP, wykazały ekstrakty poddane działaniu OD, które charakteryzowały się jednocześnie nie najwyższą całkowitą zawartością fenoli. Wyniki naszych badań wskazują, że OD, po którym następuje 4-godzinna AD, zapewnia najlepszą ochronę korzeni transformowanych *P. filicifolia* pod względem stabilności genetycznej i biosyntezy metabolitów wtórnych.

## The influence of air dehydration time in the cryopreservation process of *Polyscias filicifolia* transformed roots on their genetic stability and phytochemical profile

The development of an effective cryopreservation procedure is crucial for maintaining stability at the morphological and genetic levels, as well as for the biosynthesis of secondary metabolites in plant material. Transformed roots (TR) of *Polyscias filicifolia* were subjected to osmotic dehydration (OD) followed by air dehydration (AD) for 3 to 6 hours for cryogenic storage in liquid nitrogen. The genetic stability of regenerated *P. filicifolia* transformed roots was assessed using two markers: inter simple sequence repeats (ISSR) and start codon-targeted repeats (SCoT), along with nuclear DNA content. Morphological assessment was carried out based on the survival and growth of fresh and dry biomass. Quantitative and qualitative analysis of chlorogenic acid (CGA) and oleanolic acid (OA) was performed using HPLC-UV-Vis and HPLC-PDA-ESI-HRMS. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test and the iron-reducing antioxidant power (FRAP) test were used to assess the antioxidant potential. Subjecting *P. filicifolia* TRs only to osmotic dehydration was insufficient to effectively protect them during cryopreservation. The highest survival rate (93%) and biomass increase (up to 3-fold) were observed for TRs subjected to OD followed by 6-hour AD. Prolonged AD durations had a negative impact on the genetic stability of *P. filicifolia* TR. Longer AD duration generated greater stress, which was reflected in high CGA content. HPLC-PDA-ESI-HRMS analysis confirmed that the main metabolite was CGA acid, accompanied by ferulic acid derivatives, 3,5-O-di-

caffeoylquinic acid, and 5-p-coumaroylquinic acid. The profile of the biosynthesized compound in TR remained unchanged during culture for up to 12 months. The highest antioxidant activity using the DPPH and FRAP methods was demonstrated by extracts treated with OD, which were also characterized by the highest total phenol content. The results of our study indicate that OD followed by 4-hour AD provides the best protection of *P. filicifolia* transformed roots in terms of genetic stability and secondary metabolite biosynthesis.



## Wpływ białka AFP III na krioprezerwację wierzchołków wzrostu *Rosa multiflora*

E. TOMIAK<sup>1</sup>, K. HURA<sup>2</sup>, B. PAWŁOWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

<sup>2</sup>Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;

e-mail: ewelina.tomiak@urk.edu.pl

Warunkiem skutecznej krioprezerwacji jest zabezpieczenie tkanek przed formowaniem się kryształków lodu w komórkach, tym samym ochrona przed nieodwracalnymi zniszczeniami błon cytoplazmatycznych i ich półprzepuszczalności. Białkiem o właściwościach kriochronnych jest AFP typu III, zmienia ono dynamikę krystalizacji wody, hamując wzrost kryształków lodu w komórkach. W badaniach testowano wpływ białka AFP dodawanego do krioprotektantów na skuteczność krioprezerwacji merystemów wierzchołkowych *Rosa multiflora*. Merystemy wierzchołkowe wyizolowane z pędów pobranych w styczniu, zastosowano metodę kropli witrifikacji. Stosowano dwa rodzaje roztworów krioprotektantów: PVS2 i VSL, w wersji podstawowej oraz wzbogaconej w białko AFP III w stężeniach 500 i 1000  $\mu\text{M}$ . Testowano dwa czasy traktowania krioprotektantem: 15 i 30 minut. Po rozmroeniu oceniono przeżywalność (eksplantaty zielone i rozwijające się) i regenerację (rośnięcie w 3 tygodniu po rozmroeniu). Zmierzono przepuszczalność membran cytoplazmatycznych eksplantatów na podstawie wycieku elektrolitów. Pomiarów dokonano po przygotowaniu eksplantatów do rozmroenia – przed umieszczeniem w ciekłym azocie oraz po rozmroeniu. Łącznie badano 6 kombinacji roztworów kriochronnych i dwa czasy traktowania. Wyciek elektrolitów liczonego wg wzoru:  $EL\% = L_1/L_{II} \times 100\%$ . Suplementacja roztworów krioprotektantów białkiem AFP III miała pozytywny wpływ na przeżywalność i regenerację eksplantatów po krioprezerwacji dla obu badanych roztworów przy traktowaniu 15-minutowym. Najlepsze przeżywalność (55%) i regenerację (50%) odnotowano, stosując

krioprotektant PVS2+AFP1000  $\mu\text{M}$  przez 15 minut. Najwyższy procent regeneratów uzyskano dla merystemów traktowanych przez 30 minut krioprotektantem VSL + AFP 1000  $\mu\text{M}$  – 58%. Wyniki z przepuszczalności membran, potwierdzają uzyskane wyniki obserwacji wizualnych dotyczącej przepuszczalności merystemów, przy tym samym poziomie wycieku elektrolitów, odnotowano wyższą przepuszczalność.

## The effect of AFP type III protein on cryopreservation of the apical meristems of *Rosa multiflora*

The condition for effective cryopreservation is to protect tissues against the formation of ice crystals in cells, thus protecting them against irreversible damage to the cytoplasmic membranes and their semi-permeability. A protein with cryoprotective properties is AFP type III, it changes the dynamics of water crystallization, inhibiting the growth of ice crystals in cells. In study the effect of AFP protein added to cryoprotectants was tested on the effectiveness of cryopreservation of the apical meristems of *Rosa multiflora*. Apical meristems isolated from dormant buds collected in January were frozen using the drop vitrification method. Two types of cryoprotectant solutions were used: PVS2 and VSL, in the basic version and enriched with AFP III protein at concentrations of 500 and 1000  $\mu\text{M}$ . Two treatment times were tested: 15 and 30 minutes. After thawing, survival (green and developing explants) and regeneration (growing at week 3 after thawing) were assessed. Cytoplasmic membrane permeability was measured on the basis of the electrolyte leakage. Measurements were made after preparing the explants for freezing – before placing them in liquid nitrogen and after thawing. In total, six combinations of cryoprotective solutions and two treatment times were tested. Electrolyte leakage was calculated according to the formula:  $\text{EL}\% = L_1/L_{11} \times 100\%$ . Supplementation of cryoprotectant solutions with AFP III protein had a positive effect on the survival and regeneration of explants after cryopreservation for both tested solutions for 15 min treatment. The best survival (55%) and regeneration (50%) were observed using the cryoprotectant PVS2+AFP1000  $\mu\text{M}$  for 15 minutes. The highest percentage of regenerants was obtained for meristems treated for 30 min with cryoprotectant VSL + AFP 1000  $\mu\text{M}$  – 58%. The results from membrane permeability confirm the obtained results of visual observations regarding the survival of meristems; with a lower level of electrolyte leakage, higher survival was noted.



## Fizjologiczne i molekularne konsekwencje inhibicji amoniakolizacji *L*-fenyloalaniny u pszenżyta jarego

K. URBAN<sup>1</sup>, A. OSTROWSKA<sup>1</sup>, M. WÓJCIK-JAGŁA<sup>2</sup>, T. HURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ekofizjologii, Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego  
PAN, Kraków;

<sup>2</sup>Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie;  
e-mail: k.urban@ifr-pan.edu.pl

Amoniakolizacja *L*-fenyloalaniny (PAL) jest kluczowym enzymem w syntezie związków fenolowych u roślin. Zawartość tych substancji zależy także od dostępu do węglowodanów (pierwotny metabolizm), które poprzez szlak kwasu szikimowego wykorzystywane są w syntezie metabolitów wtórnych (m.in. związków fenolowych). Celem podjętych badań była weryfikacja założenia, że inhibicja enzymu PAL wywołuje zmiany w pierwotnym i wtórnym metabolizmie, a także w aktywności fotosyntetycznej analizowanej na różnym poziomie organizacji roślin. Badania przeprowadzono na siewkach pszenżyta jarego. Zastosowano dolistną aplikację inhibitora PAL (hydrazyd kwasu 4-hydroksybenzoesowego, HBH) przez osiem dni. Przeprowadzone zostały analizy poziomu HBH, związków fenolowych oraz w węglowodanów. Wykonano pomiary intensywności fotosyntezy, aktywności aparatu fotosyntetycznego oraz ekspresji wybranych genów związanych z fotosyntetycznym włączeniem CO<sub>2</sub> oraz funkcjonowaniem aparatu fotosyntetycznego. Potwierdzono zawartość inhibitora HBH w siewkach po dolistnej aplikacji. Inhibitor wywołał istotne obniżenie zawartości związków fenolowych, któremu towarzyszyła akumulacja rozpuszczalnych w węglowodanów. Zaobserwowano wzrost efektywności przepływu elektronów poza pierwotny akceptor QA oraz pułapkowania energii przez centra reakcji w PSII. Wzrosła intensywność fotosyntezy oraz karboksylacji. U siewek traktowanych HBH nastąpił wzrost ekspresji genów kodujących podjednostki wiązki Rubisco, trzy izoformy aktywazy Rubisco oraz białko Rieskiego. Przepro-

wadzone badania wskazuj na mo liwo zastosowania inhibitora PAL do poprawy aktywno ci fotosyntetycznej zbo jarych.

## Physiological and molecular consequences of *L*-phenylalanine ammonia lyase inhibition in spring triticale

Phenylalanine ammonia lyase (PAL) is a key enzyme in the synthesis of phenolic compounds in plants. The content of phenolics also depends on the availability of carbohydrates (primary metabolism), which through the shikimic acid pathway are used in the synthesis of secondary metabolites (including phenolic compounds). The aim of this study was to verify an assumption that PAL inhibition would induce changes in primary and secondary metabolism, as well as in photosynthetic activity analysed at different levels of plant organization. The plant material were spring triticale seedlings. A foliar application of a PAL inhibitor (4-hydroxybenzoic acid hydrazide, HBH) was carried out for eight days. Then, the levels of HBH, phenolic compounds, and carbohydrates were assayed. Intensity of photosynthesis, activity of photosynthetic apparatus and expression of selected genes associated with photosynthetic CO<sub>2</sub> binding and functioning of the photosynthetic apparatus were measured. The presence of HBH in the leaves was confirmed following its application. The inhibitor significantly decreased the level of phenolic compounds, and stimulated accumulation of soluble carbohydrates. Increased efficiency of electron flow beyond the primary QA acceptor and energy trapping by reaction centres in PSII were observed, together with increased intensity of photosynthesis and carboxylation. The HBH-treated seedlings exhibited elevated expression of genes encoding the Rubisco major subunit, three Rubisco activase isoforms, and Rieske protein. Our research indicates the possibility of using a PAL inhibitor to improve photosynthetic activity of spring cereals.



## Kriokonserwacja plumul dębu bezszypułkowego (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) przy użyciu kriopłytek aluminiowych: wpływ krioprotekcji i podsuszania

U. WASILEŃCZYK<sup>1</sup>, M.K. WAWRZYNIAK<sup>2</sup>, J.P.R. MARTINS<sup>2</sup>, P. KOSEK<sup>1</sup>,  
P. CHMIELARZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Leśny Bank Genów Kostrzyca, Miłków;

<sup>2</sup>Instytut Dendrologii PAN, Kórnik;

e-mail: Urszula.wasilenczyk@lbg.lasy.gov.pl

Nasiona *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. (d b bezszypułkowy) s klasyf kowane jako recalcitrant, tj. wra liwe na odwodnienie i niskie temperatury, dlatego te nie mog by przechowywane w bankach genów w konwencjonalnych warunkach. Jednak e, zarodki niektórych gatunków recalcitrant mog by przechowywane w ciekłym azocie (–196°C). Niestety, dla wielu gatunków, w tym dla prawie całego gatunku *Quercus*, skuteczna metoda kriokonserwacji jest nadal nieznana. W niniejszym badaniu zaproponowaliśmy skuteczny protokół kriokonserwacji zarodków *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. zamrażamy c plumule (merystem wierzchołkowy p du) na aluminiowych płytkach kriogenicznych. W tym celu we wgl bieniach aluminiowych płytek kriogenicznych umieszczono wyizolowane plumule (wielko ci 1,0–1,5 mm), a nast pnie otoczkowano je za pomoc alginianu wapnia. W celu krioprotekcji, otoczkowane plumule zanurzano wraz z aluminiow płytk w roztworze zawieraj cym 2,0 M glicerol i 1,0 M sacharoz na 40 minut w temperaturze 25°C, a nast pnie podsuszano w komorze z laminarnym przepływem przez 2 h. Po tym czasie aluminiowe płytki wraz z podsuszonymi plumulami zamro ono bezpo rednio w ciekłym azocie (–196°C), w którym były przechowywane przez 30 minut. W celu odmro enia plumul, płytki aluminiowe wyj to z ciekłego azotu i umieszczono w 1,0 M roztworze sacharozy o temperaturze 25°C, w którym pozostały przez 15 minut w celu ponownej rehydratacji. Stosuj c powy sz metodyk najwy sza prze ywalno plumul po



odmro eniu wyniosła 83,4%. W niniejszym badaniu po raz pierwszy przedstawiono udany, prosty i skuteczny protokół kriokonserwacji zarodków *Quercus petraea*, który mógłby zostać wykorzystany w bankach genów. Eksperyment ten został z powodzeniem powtórzony na nasionach pochodzących z 10 proveniencji w przeciągu dwóch lat, wykazując średnio ponad 50% oraz prawidłowy wzrost plumul w kulturach in vitro w zakresie od 26 do 77%.

## Cryopreservation of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) plumules using aluminium cryo-plates: influence of cryoprotection and drying

Whole seeds of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. (sessile oak) are classified as recalcitrant, i.e. sensitive to dehydration and low temperatures, so they cannot be stored in gene banks under conventional conditions. However, the germplasm of some recalcitrant seeded species can be stored in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Unfortunately, for many species, among them for almost the whole genus *Quercus*, an effective cryostorage method is still unknown. In this study, we propose a successful cryostorage protocol for *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. germplasm using plumules (a shoot apical meristem of an embryo) frozen on aluminium cryo-plates. For this purpose, the plumules (size 1.0- 1.5 mm) were placed in the wells of a cryo-plate and embedded in calcium alginate gel. For cryoprotection, the encapsulated plumules were immersed together with the aluminium plate in cryoprotectant solution containing 2.0 M glycerol and 1.0 M sucrose for 40 min at  $25^{\circ}\text{C}$  and desiccated under a laminar flow cabinet for 2 h. After this time, the aluminium cryo-plates with plumules were directly immersed in liquid nitrogen and then cryostored for 30 min. For rewarming, cryo-plates with plumules were removed from liquid nitrogen and immersed in 1.0 M sucrose solution and rehydrated for 15 min at  $25^{\circ}\text{C}$ . Using the method described above, the highest survival rate of the plumules after cryostorage was 83.4%. This study presents, for the first time, a successful, simple and efficient protocol for the cryopreservation of *Quercus petraea* germplasm that could be used in gene banks. The experiment was successfully repeated on seeds from 10 various provenances over two years, demonstrated more than 50% survival and regrowth after cryopreservation, ranging from 26 to 77%.



## Indeks nazwisk

### A

Adamus A. 213  
Akik J. 137  
Androsiuk P. 117  
Andrys D. 55  
Andrzejska A. 51  
Antkowiak M. 35  
Augustyniak-Toman B. 253, 258, 262  
Augustynowicz J. 188

### B

Banach-Albińska B. 37  
Barański R. 14, 16, 27, 129, 186  
Bednarek P.T. 117, 233  
Beruto M. 14, 16, 21  
Betekhtin A. 77, 111,  
Bielecka M. 135, 192  
Bieniasz M. 171  
Bilińska G. 61  
Biswas S. 255  
Błażejczak A. 196  
Boba A. 103, 105,  
Buch K. 171  
Buchcik W.M. 256  
Bujewska I. 90  
Bülöw F. 192  
Burgberger-Stawarz M. 107, 253, 258, 262  
Burian M. 219, 260

### C

Chachłowska D. 213  
Chmielarz P. 280  
Chmielewska B. 69  
Chojnowski M. 260  
Chuda A. 213  
Cio M. 119, 133  
Czajkowska L. 206  
Czarnomska Z. 271

### D

Daghama D.S. 73  
Depta A. 215  
Domaska A. 103  
Doroszewska T. 215  
Dubas E. 73, 223  
Duliński R. 208  
Dupire F. 196  
Dyduch-Siemska M. 176  
Dynkowska W.M. 233  
Dziurka K. 75  
Dziurka M. 75, 204  
Dziwak M. 135, 178, 192

### E

Ekiert H. 49, 174

### F

Ferrier M. 53  
Figas A. 121, 162  
Franklin G. 225, 226, 255, 264, 270

### G

Gabryszewska E. 137  
Gaj M.D. 43, 256  
Gajecka M. 69  
Galant-Jakubowska A. 92  
Galek R. 184  
Gałzka M. 204  
Gałzowska S. 159  
Gasparis S. 231  
Gevrenova R. 192  
Gierek K. 208  
Giglioli-Guivarc'h N. 53  
Godel-Jdrychowska K. 111  
Granica S. 271  
Gruszka Z. 121  
Grzebelus E. 77, 111, 157, 217

Grzegorzczuk-Karolak I. 180, 182  
Grzyb M. 123  
Gumulak-Wołoszyn N. 125  
Guzik Z. 262

## H

Hanus-Fajerska E. 127  
Hoffe R.E. 73  
Huber D. 129  
Hura K. 276  
Hura T. 268, 278

## J

Jadczak P. 55  
Jafernik K. 204  
Jakobina M. 184  
Jakovljević D. 200, 249  
Jankowska U. 111  
Jasińska D. 235  
Jdryczka M. 65  
Jdrzejczyk I. 33  
Jeziorek M. 202  
Junka A. 57

## K

Kaczmarczyk J. 119  
Kacprzyńska A. 131, 143, 147  
Kapsa E. 83  
Kawiak A. 47  
Kawka-Lipińska M. 246  
Kamierczak A. 123  
Kamierczak U. 99  
Kicel A. 198  
Kielkiewicz R.M. 273  
Kielkowska A. 67, 213, 217, 219, 242  
Kiirika L. 255  
Kiszczak W. 260  
Kiwior-Wesołowska A. 43  
Klimek-Chodacka M. 129, 186  
Kochneva Y. 61, 99, 253, 258, 262  
Kocot D. 39, 133  
Kokotkiewicz A. 49, 174  
Kolton A. 188  
Kope P. 223  
Korbecka-Glinka G. 246  
Korytkowski K. 149

Korzeniowska W. 192  
Kosek P. 280  
Kostyn K. 61, 105  
Kovacik M. 73  
Kowalska J. 35  
Kozłowska W. 57, 135, 192  
Komińska A. 127  
Krasnodubski C. 221  
Królicka A. 47, 188, 190, 194  
Krupa-Malkiewicz M. 101  
Kruszka D. 200  
Krzemińska M. 180, 182  
Krzewska M. 73, 223  
Kubica P. 49, 174, 188, 190, 204  
Kulma A. 103, 253, 258, 262  
Kulpa D. 55  
Kulpińska A. 33  
Kulus D. 33, 35  
Kumlehn J. 73  
Kurczyńska E. 77, 111  
Kusibab T. 86  
Kwiecień I. 49

## L

Lanoue A. 53  
Laurain-Mattar D. 196  
Lema-Rumińska J. 51  
Lokesh V. 225, 226

## Ł

Łuczkiwicz M. 49, 174  
Łyczko J. 184

## M

Majchrzak G. 226  
Majos D. 88, 137  
Makowski W. 159, 188, 190  
Maksylewicz A. 73  
Malarz J. 59  
Malik M. 137  
Malinowska M. 53  
Malinowski T. 31  
Makowski D.R. 233  
Marasek A. 237  
Marasek-Ciołakowska A. 219  
Marat M. 237

- Marciniak P. 139, 149  
 Markiewicz M. 227  
 Markowski M. 271  
 Martins J.P.R. 280  
 Ma lanka M. 131, 141  
 Matam P. 264  
 Matkowski A. 57, 135, 192  
 Matyjewicz A. 190  
 Matysik E. 229  
 Matysik P. 229  
 Mazur J. 131  
 Mezoued I. 244  
 Mierziak-Derecka J. 61, 107, 258, 262  
 Mikołajczak O. 162  
 Mikołajczyk S. 71  
 Mikuła A. 123, 273  
 Mikuła M. 271  
 Miler N. 79  
 Milewska-Hendel A. 77  
 Miłoszewski M.M. 231  
 Mondal D. 255, 264, 270  
 Mora ska E. 196  
 Moro czyk J. 43  
 Mozhejko A. 47  
 Mrzygłód K. 159  
 Muszy ska E. 75  
 Muthukrishnan L. 270  
 Mynett K. 31, 237
- N
- Nadolska-Orczyk A. 231  
 Nawrot-Chorabik K. 125, 265  
 Nawrot-Hadzik I. 135, 192  
 Niewiadomska-Wnuk A. 31, 164  
 Noga-Szyrsze A. 86  
 Norwa K. 88, 137  
 Norwa P. 88, 137  
 Novák O. 253  
 Nowak B. 39  
 Nowak K. 43, 143  
 Nowicka A. 223  
 Nyambura M.H. 244
- O
- Obrbski M. 273  
 Ochatt S.J. 14, 16, 22  
 Ochmian I. 101  
 Olejniczak-Idczak M. 229  
 Oleszczuk S. 65  
 Olszak-Przyby H. 246  
 Olszewska M.A. 198  
 Orlikowska T. 13, 15, 31  
 Orłowska R. 117, 233  
 Osmenda M. 265  
 Ostrowska A. 268, 278  
 Owczarek-Januszkiewicz A. 182
- P
- Pałczy ska K. 202  
 Pałka P. 145  
 Parzymies M. 37  
 Patelska J. 235  
 Pawłowska B. 143, 145, 147, 276  
 Pecinka A. 73  
 Pecio Ł. 192  
 Pecio S. 192  
 Perez-Perez R. 77  
 Pet ik I. 253  
 Pietrosiuk A. 202  
 Pi ski A. 77, 111  
 Podwyszy ska M. 13-16, 219, 227, 237, 271, 273  
 Poliszuk J. 153  
 Potrykus M. 47, 190, 194  
 Preisner M. 105  
 Prokopiuk B. 133, 147, 153  
 Przyborowski J.A. 151  
 Ptak A. 196
- R
- Radosz J. 86  
 Rakesh S. 255  
 Riseman A. 127  
 Róg L. 83  
 Rugie S. 47, 194  
 Rybczy ski J. 13, 15
- S
- Sadok I. 204  
 Sadowska K. 51  
 Sala K. 77  
 Salachna P. 119

Samek L. 213  
Sawuła A. 99, 253, 258, 262  
Saxena M. 270  
Selvakesavan R.K. 225, 226  
Sharafan M. 53  
Siatkowski I. 71  
Sikora E. 53  
Simlat M. 196  
Sitarek M. 260  
Sitek E. 39  
Skala E. 155, 198  
Skrzypek E. 200, 240, 249  
Skrzypkowski W. 242  
Skupien-Rabian B. 111  
Sochacki D. 139, 149  
Sowa S. 65  
Spina R. 196  
Springer A. 73, 223  
Sroka J. 190  
Stafniak M. 192  
Starzyk M. 107  
Stelmach-Wityk K. 157, 217  
Stojakowska A. 59  
Sujkowska-Rybkowska M. 75  
Sulima P. 151  
Sulot O. 151  
Sykłowska-Baranek K. 202, 273  
Szakiel A. 202  
Szalaj U. 35  
Szarejko I. 69  
Szewczyk A. 186  
Szewczyk K. 71, 244  
Szewczyk-Taranek B. 153  
Szklarczyk M. 213  
Szopa A. 49, 53, 171, 174, 188, 190, 204  
Sztafrowski D. 105  
Szumny A. 184  
Szymaska J. 155  
Szymonik K. 157, 217  
Szyp-Borowska I. 97  
Szypuła W. 271

liwiska A.A. 273

liwiska E. 77

## T

Taciak M. 235  
Thiel M. 47, 194  
Tokarz B. 159, 188, 190  
Tokarz K.M. 159, 188, 190  
Tomasiaak A. 77  
Tomaszewska-Sowa M. 121, 162  
Tomiak E. 276  
Tomiczak K. 109, 271, 273  
Treggell A. 41  
Trojak-Goluch A. 246  
Trzewik A. 31, 164, 237  
Tymoszuak A. 33, 35, 51

## U

Ukalska J. 97  
Urban K. 278

## V

Viehmanna I. 33  
Volante A. 133  
Vuiko M. 88

## W

Wąligórski P. 166, 200  
Wąrczoł M. 196, 200, 249  
Wąsileczyk U. 280  
Wąwrzynieak M.K. 280  
Węigt D. 71, 244  
Węnda-Piesik A. 35  
Weng A. 192  
Węremczuk-Jęyna I. 206  
Wileńska B. 273  
Winceniak J. 127  
Winięcki J. 33  
Wiszniewska A. 127, 208  
Wójcik A.M. 256  
Wójcik D. 237  
Wójcik-Jągła M. 278  
Wójda T. 97  
Wójnarowicz J. 35  
Wójtania A. 166  
Wójtasiak-Górna W. 61, 107, 253, 258  
Wypychowska A. 258  
Wýrostek J. 186

Y

Yamada K. 223

Z

Zaj czkowska M. 139

Zakrzewski P. 202

Zalewski I. 262

Zaranek M. 77, 111

Zbieszczyk J. 69

Zblewska D. 135, 192

Zdziechowska-Dudek M. 235

Zenkteler E. 13, 15

Zenkteler M. 13, 15

Ziele nicka J.M. 273

Zieli ska S. 57, 135

Zimmerman M. 90

Zimny J. 65, 117

ebrowski J. 117

uk M. 99, 221

ur I. 71, 73, 223

Redaktor Naczelny Wydawnictwa  
Dr hab. in . Andrzej Wał ga, prof. URK

Redaktorzy Naukowi  
Dr hab. in . Anna Kapczy ska, prof. URK  
Dr hab. in . Agata Ptak, prof. URK  
Prof. dr hab. in . Bo ena Pawłowska

Redakcja i korekta  
Magdalena Kot- Kania  
Andrzej Kaczmarczyk

Skład i łamanie  
Regina Wojtyłko

Za tre merytoryczn streszcze odpowiadaj Autorzy

Do cytowa /For citation

XVI Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro i Biotechnologii Ro lin: Biotechnologia i kultury in vitro ro lin w badaniach podstawowych i aplikacyjnych, Kraków 23- 25 wrze nia 2024 r.  
Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Kraków 2024.

Wydano za zgod Rektora Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie  
Copyright © Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, Kraków 2024

ISBN 978- 83- 66602- 85- 4

Publikacje Wydawnictwa UR w Krakowie mo na naby w siedzibie Wydawnictwa.  
Prowadzona jest równie sprzeda wysyłkowa (tel. 12 662 51 60).  
Ksi garnia internetowa: [www.wydawnictwo.urk.edu.pl](http://www.wydawnictwo.urk.edu.pl)

Wydawnictwo UR w Krakowie  
31- 425 Kraków, al. 29 Listopada 46  
tel. (12) 662 51 57, 662 51 59  
e- mail: [wydawnictwo@urk.edu.pl](mailto:wydawnictwo@urk.edu.pl)  
[www.wydawnictwo.urk.edu.pl](http://www.wydawnictwo.urk.edu.pl)

Ark. wyd. 16,00; Ark. druk. 18,00; Nakład 210 egz.  
Druk i oprawa: DRUKMAR, 32- 080 Zabierzów, ul. Rzemie lnicza 10