



Wpływ fotoperiodu na ekspresję genów kodujących fotoreceptory oraz genów związanych z metabolizmem flawonoidów podczas wzrostu mikrosadzonek rabarbaru ogrodowego w warunkach ex vitro

WSTĘP

Rabarbar (*Rheum L.*) jest warzywem należącym do rodziny rdestowatych (Polygonaceae) uprawianym głównie dla długich i grubych ogonków liściowych bogatych w naturalne składniki wykazujące szereg bioaktywności istotnych dla zdrowia człowieka, między innymi: polifenole, kwasy organiczne, mikroelementy oraz błonnik pokarmowy. Warzywo to jest atrakcyjnym produktem do bezpośredniej konsumpcji, przemysłu przetwórczego oraz farmaceutycznego.

Światło jest jednym z najważniejszych czynników wywierających wpływ na procesy życiowe roślin. W roślinnych kulturach *in vitro* światło działa głównie jako czynnik morfogenetyczny, jednak przez modyfikację zarówno spektrum światła, jak i długość jego działania, można regulować procesy morfogenezy. Od wielu lat mechanizm działania światła jest łączony z działaniem regulatorów wzrostu. Wykazano, że światło może wpływać na biosyntezę, transport i metabolizm, a także zmieniać wrażliwość tkanek na endogenne i egzogenne regulatory wzrostu. Jest także ważnym czynnikiem regulującym tworzenie metabolitów wtórnych, w tym kwasów fenolowych, flawonoidów i karotenoidów.

W komercyjnej produkcji sadzonek rabarbaru kluczowa jest wysoka jakość materiału roślinnego, dlatego też celem prezentowanych badań była ocena wpływu fotoperiodu na poziom ekspresji genów podczas wzrostu sadzonek rabarbaru w warunkach *ex vitro*.

MATERIAŁY I METODY

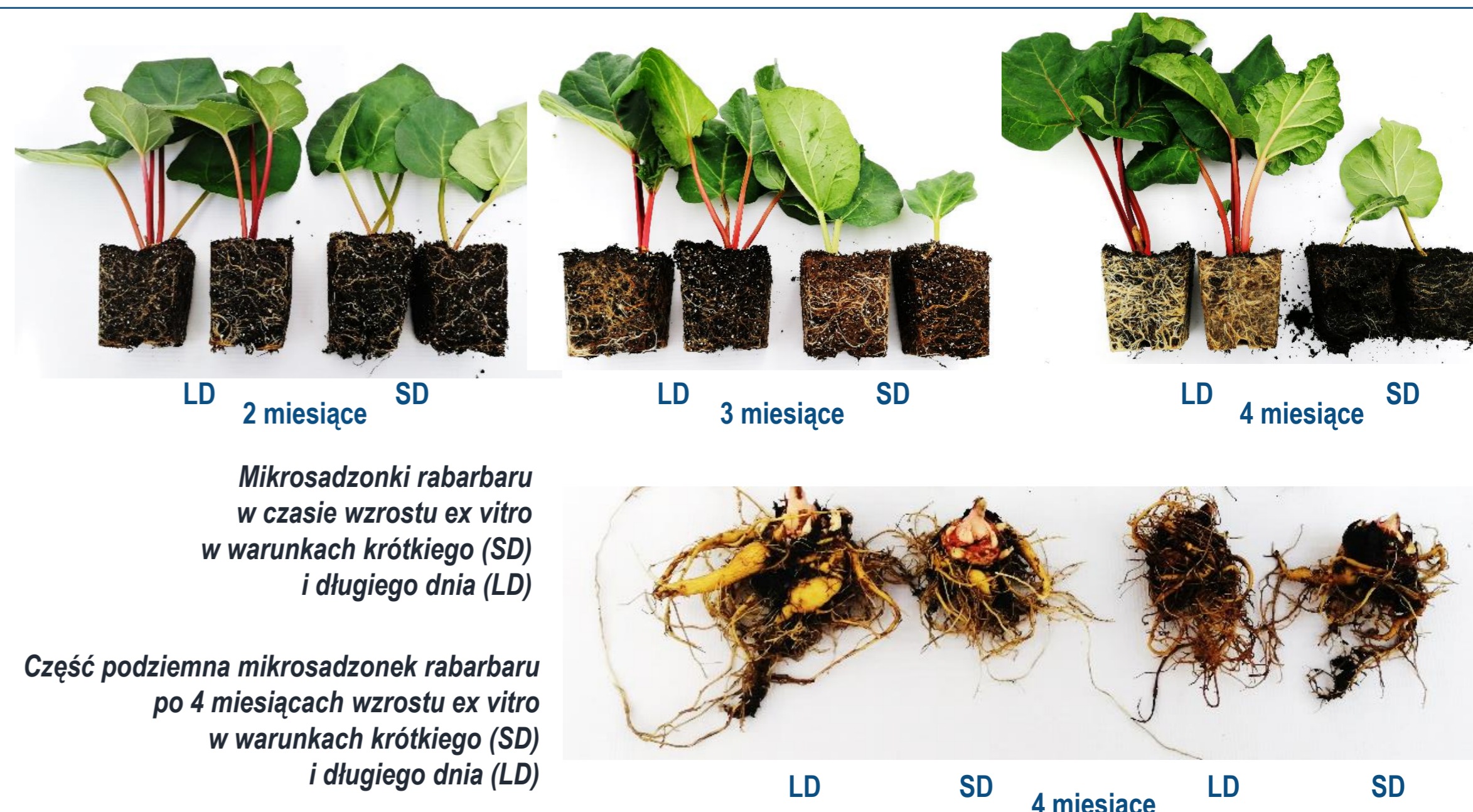
Rośliny rosły przez pięć miesięcy w kontrolowanych warunkach w fitotronie przy fotoperiodzie 10/14-h oraz 16/8-h (dzień/noc) i temperaturze 23°C. Co 4 tygodnie, 5-krotnie pobierano materiał roślinny do badań, z którego izolowano całkowity RNA zgodnie z metodyką opisaną przez Chang i wsp. (1993). Analizie ekspresji poddano geny kodujące: kryptochromy (*cry1*, *cry2*), fototropiny (*phot1*, *phot2*), fitochrom (*phyA*, *phyB*), receptor *UVR8* oraz enzymy związane z metabolizmem flawonoidów (*SERK1*, *CM*, *STSY*, *EXLA2*, *HMGR*), dla których zaprojektowano specyficzne startery (Tabela). Wszystkie analizy wykonano za pomocą techniki ilościowej reakcji PCR z prowadzonym na bieżąco pomiarem ilości produktów amplifikacji (real-time PCR/qPCR) przy użyciu zestawu KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems), w którym do pomiaru stężenia amplikonów wykorzystywany jest interkalujący barwnik SybrGreen. Względny poziom ekspresji badanych genów normalizowano w stosunku do genu referencyjnego (*GAPDH*). Sporządzono mapę, na której natężenie ekspresji genów przedstawiono w skali barwnej (*heat-map*). Pola w odcieniach czerwieni oznaczają nadekspresję genu, w odcieniach zieleni – wyciszenie, natomiast pola bezbarwne określają brak zmian w poziomie ekspresji danego genu względem jego ekspresji u roślin kontrolnych.

Startery wykorzystane do analiz ekspresji genów.

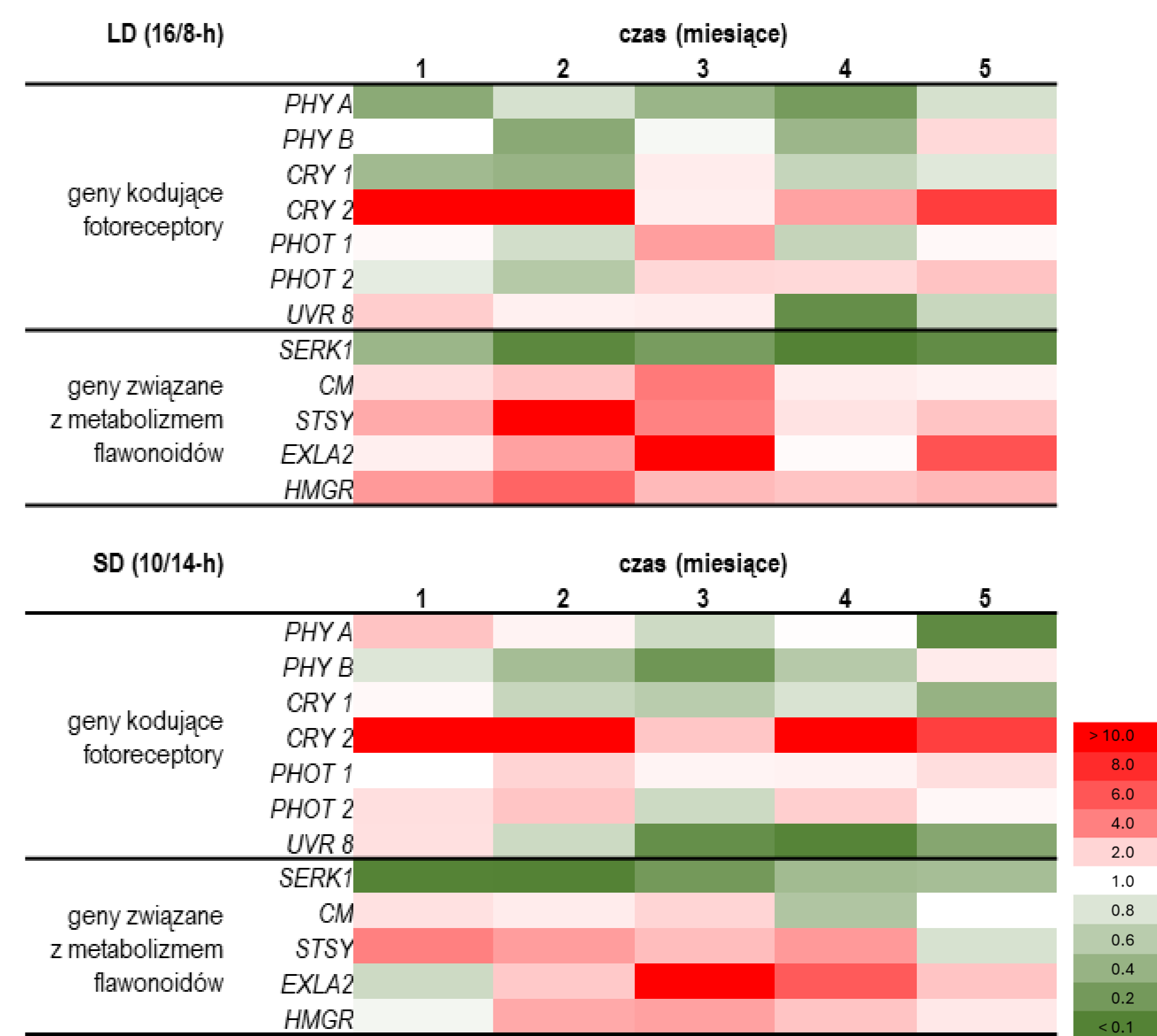
Lp.	Nazwa genu	Sekwencje starterów (For/Rev 5' → 3')
1	<i>cry1</i> cryptochrome 1	GGGTTTCTAGGTGGGCTC CGCACAAAGACAATGGATCATA
2	<i>cry2</i> cryptochrome 2	TGGACAATCCCCTGTTACAA GCTCCATGGATGATGGAT
3	<i>phot1</i> phototropin 1	CACTGATCCTAGGCTTCCCG GTGGTTAGATCAGTCTGGACC
4	<i>phot2</i> phototropin 2	CCTGCACACCCAGCTTATT CTTGATGACAGCAGCCCGT
5	<i>phyA</i> phytochrome A	TGAGTGACTGGTCTTCCGG CATTGCTCCTCAGTTCCTCT
6	<i>phyB</i> phytochrome B	CTCGTCTTTGAGAGGGGAC TCCAACAAAACAAACGCCGA
7	<i>UVR8</i> UV-B resistance 8 receptor	TCAGGAAAAGCTGGGTGTC CATCGTTAGGCCGTTTCA
8	<i>SERK1</i> somatic embryogenesis receptor kinase 1-like	CTGTCACCTTTGGTCATTGA TGACAGACAGATTATGTCGA
9	<i>CM</i> chorismate mutase 2	GCAGATCCTTCTGCTCCTT GGCGTCTTCCGATTTTC
10	<i>STSY</i> stilbene synthase	TGCAGGCTGAACATGAGTCC GGGACAAGCTTTGTTGGGG
11	<i>EXLA2</i> expansin-like a2	GGAGGCCAACTGAAGTGGT GGTACCACGAACCTGAAC
12	<i>HMGR</i> 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1	GAGGCTGTTAATGACGGAAGG CTGATTGGGAAGCAAGCTGAT
13	<i>GAPDH</i> glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	CTCAATGAGGCCACACAGA ACCAGTGTCTGGGAATG

WYNIKI

- Wyniki badań wykazały, że mikrosadzonki rabarbaru są bardzo wrażliwe na krótki dzień. Po 4 tygodniach wzrostu w warunkach 10-h fotoperiodu sadzonki cechowały się zahamowanym wzrostem i tworzeniem liści, obniżoną masą ogonków liściowych i kłączy oraz szybkim żółknięciem. W warunkach 16-h fotoperiodu intensywny wzrost sadzonek bez indukcji spoczynku uzyskiwano przez co najmniej 5 miesięcy.
- Analiza molekularna wykazała, że długość dnia miała zróżnicowany wpływ na zmiany w poziomie ekspresji badanych genów. Wykazano, że zahamowanie wzrostu mikrosadzonek w warunkach dnia krótkiego było zbieżne z silną nadekspresją *cry2* oraz nieznaczną indukcją *phyB* przy wyciszeniu *phyA*. Te rodzaje białek są odpowiedzialne za tolerancję roślin na cień – kryptochrom 2 wpływa na wzrost roślin poprzez regulację ekspresji genów w odpowiedzi na niedobór światła, natomiast fitochromy to białka odpowiadające za ograniczenie wzrostu roślin (krótkie lodygi) oraz wzrost zawartości chlorofilu w liściach. W warunkach dnia krótkiego obserwowano także wzrost ekspresji genów kodujących fototropiny (*phot1*, *phot2*), odpowiedzialne za fototropizm oraz fotomobilizację chloroplastów w warunkach cienia.
- W warunkach dnia długiego wzrost sadzonek był intensywny, przy wyciszeniu ekspresji genów kodujących fitochromy oraz kryptochrom 1.
- W warunkach dnia długiego obserwowano silny wzrost ekspresji genów związanych z metabolizmem flawonoidów, szczególnie po 2-3 miesiącach wzrostu. W warunkach dnia krótkiego geny te ulegały wyciszeniu. Wyjątek stanowił gen kodujący receptor *SERK1*, który pozostał silnie wyciszony, niezależnie od warunków wzrostu mikrosadzonek rabarbaru.



Względna ekspresja badanych genów kodujących fotoreceptory oraz genów związanych z metabolizmem flawonoidów podczas wzrostu *ex vitro* mikrorozmnażanych sadzonek rabarbaru. Czerwona linia przedstawia względną ekspresję badanego genu u roślin kontrolnych. Wartości powyżej 1.0 oznaczają nadekspresję, a wartości poniżej 1.0 – wyciszenie badanego genu.



Wpływ fotoperiodu na ekspresję genów kodujących fotoreceptory oraz genów związanych z metabolizmem flawonoidów podczas wzrostu *ex vitro* mikrorozmnażanych sadzonek rabarbaru. Mapa cieplna przedstawia względną ekspresję badanych genów w porównaniu do kontroli.

PODSUMOWANIE

- Zoptymalizowano metodę oceny względnego poziomu ekspresji genów kodujących fotoreceptory oraz genów kodujących białka związane z metabolizmem flawonoidów u rabarbaru ogrodowego.
- Wykazano, że stres niedoboru światła może mieć znaczący wpływ na wczesną indukcję spoczynku u mikrosadzonek rabarbaru ogrodowego.
- Zahamowanie wzrostu sadzonek było równoległe z indukcją ekspresji genów związanych z odpowiedzią rośliny na zmieniające się warunki świetlne – tolerancją na cień (m.in. kryptochromy, fitochromy czy fototropiny).