

## MIKROROZMNAŻANIE RABARBARU (*RHEUM RHAPONTICUM* L.)

### MICROPROPAGATION OF RHUBARB (*RHEUM RHAPONTICUM* L.)

**Dorota Krzyżanowska, Agata Kapuścińska, Urszula Kowalska,  
Waldemar Kiszczak, Danuta Prochaska, Krystyna Górecka**  
Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach

#### WSTĘP I CEL

Rabarbar (*Rheum rhaponticum* L.) jest rośliną wieloletnią uprawianą na dużym obszarze Europy i Ameryki Północnej (Foust i Marshall 1991). Dotychczas w Polsce był uprawiany na niewielkich powierzchniach, głównie w pobliżu większych miast. Od niedawna zainteresował się nim przemysł przetwórczy i zaczęto zakładać plantacje towarowe tego warzywa. Rabarbar rozmnażany z nasion daje bardzo zróżnicowane potomstwo (Zhao i in. 2005). Dlatego zwykle do zakładania plantacji stosuje się rośliny otrzymane przez podział karp (Lepse 2009). Jednak przy tym sposobie rozmnażania występuje silne porażenie chorobami wirusowymi: wirusem mozaiki rabarbaru, mozaiki rzepy, mozaiki gęsiówki, mozaiki tytoniu i innymi. Kultury *in vitro* i zastosowanie merystemów, jako eksplantatów wyjściowych, umożliwiają uzyskanie roślin wolnych od wirusów i intensywne namnożenie zdrowego materiału (Walkey 1968). Wierzchołki pędów izolowane z pąków mogą być wolne od wirusów. Prawdopodobnie wirusy nie zasiedlają merystematycznych regionów pąków wierzchołkowych (Walkey i in. 1969). Stosowanie odwirusowanych sadzonek powoduje uzyskiwanie wyższego plonu z plantacji rabarbaru (Lepse 2005). Walkey (1968) oraz Walkey i Mathews (1979) podejmowali próby odwirusowania rabarbaru poprzez kultury *in vitro* merystemów, jednak z jednego merystemu otrzymywali jeden pęd. Wyższy współczynnik namnażania uzyskali Lal i Ahuja (1989) u rabarbaru indyjskiego (*Rheum emodi* Wall.)

Celem prezentowanych badań było opracowanie najbardziej efektywnego sposobu wyjąławiania materiału wyjściowego do zakładania kultur merystemów i optymalnego składu pożywek do namnażania rabarbaru.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiał wyjściowy stanowiły pąki od 0,5 do 2,0 cm, wyrastające na częściach podziemnych karpki rabarbaru, przechowywanej w torfie, w

chłodni, w temp. +2°C. Wyjaławiano je przed izolacją merystemów 3 sposobami:

1. Płukanie pąków 24 godz. pod bieżącą wodą, traktowanie 70% etanolem przez 2 min. i 5% podchlorynem wapnia z 0,1% Tweenem 20 przez 20 min.
2. Płukanie pąków 24 godz. pod bieżącą wodą, traktowanie 70% etanolem przez 2 min. i 3% podchlorynem wapnia z 0,1% Tweenem 20 przez 20 min.
3. Płukanie pąków 5 min. 1% roztworem wodnym Tweenu 20, traktowanie 70% etanolem przez 0,5 min i 0,1% chlorkiem rtęci przez 1 min.

Z tak wyjałowionych pąków wypreparowywano merystemy w warunkach sterylnych przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. Wykładano je na pożywkę MS (Murashige i Skoog 1962) zawierającą 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, 2 mg·L<sup>-1</sup> BA (6-benzyloaminopuryna) i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA (kwas β-indolilo-3-masłowy), zestaloną agarem (6,5 g·L<sup>-1</sup>), pH 5,8 (pierwszy pasaż). Po dwóch tygodniach przeprowadzono obserwacje sterylności kultur, a po ok. 6 tygodniach wzrostu i rozwoju eksplantatów. Wykonano drugi pasaż na pożywkę o tym samym składzie, oraz na pożywkę MS zawierającą 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP (2-izopentyloadenina) i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA (kwas indolilo-3-octowy). Na pożywki regeneracyjne przenoszono rozety (pędy) albo liście. Po następnych 6 tygodniach obserwowano proces regeneracji w kulturach, a otrzymany materiał znowu dzielono na eksplantaty z liści i rozety. Umieszczano je na 6 pożywkach o zróżnicowanym składzie (trzeci pasaż). Były to pożywki na bazie MS z 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, różniące się zawartością substancji wzrostowych, zawierające:

1. 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA,
2. 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA,
3. 0,2 mg·L<sup>-1</sup> kinetyny i 1 mg·L<sup>-1</sup> IAA,
4. 5 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA,
5. 4 mg·L<sup>-1</sup> BA i 0,8 mg·L<sup>-1</sup> IAA,
6. 1 mg·L<sup>-1</sup> TDZ (tidiazuron) i 1 mg·L<sup>-1</sup> NAA (kwas α-naftylo-1-octowy).

Wszystkie pożywki zestalono agarem (6,5 g·L<sup>-1</sup>), pH doprowadzono do 5,8. Po tym pasażu obserwowano przebieg regeneracji. Wyodrębniono powstające regeneranty: kompletne rośliny, pędy, korzenie oraz kalus. Kompletne rośliny (ukorzenione pędy) wysadzano do podłoża torfowego i umieszczano w namiociku z folii dla zapewnienia wysokiej wilgotności.

## WYNIKI I DISKUSJA

Wszystkie stosowane sposoby wyjaławiania eksplantatów wyjściowych rabarbaru pozwoliły na uzyskanie sterylnego, żywego materiału roślinnego. Najwięcej czystych kultur uzyskano przy wyjaławianiu pąków pobranych z karpki rabarbaru 3 sposobem (płukanie pąków 5 min. 1% roztworem wodnym Tweenu 20, traktowanie 70% etanolem przez 0,5 min i 0,1% chlorkiem rtęci przez 1 min.). Z pąków tak sterylizowanych uzyskano 65,4% eksplantatów czystych. Tę metodę stosowali Lal i Ahuja (1989) do sterylizacji merystemów rabarbaru indyjskiego i otrzymywali z nich pędy. Wyjaławianie podchlorynem wapnia okazało się mniej efektywne, spośród eksplantatów wyjaławianych sposobami 1 i 2 obserwowano więcej niż 50% zakażeń.

Po 6 tygodniach od umieszczenia merystemów na pożywce MS zawierającej 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, BA (2 mg·L<sup>-1</sup>) i IBA (1 mg·L<sup>-1</sup>), 58,1% wytwarzało rozety.

Po drugim pasażu zaobserwowano różnice w regeneracji eksplantatów liściowych i rozet. Na pożywce MS, zawierającej 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA, ponad 30% eksplantatów liściowych i 25% rozet tworzyło nowe rozety, a ok. 60% eksplantatów zamarło. Natomiast na pożywce MS, zawierającej 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP BA i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA, 40% eksplantatów z rozet tworzyło nowe rozety, a tylko 5% eksplantatów z liści wykazywało organogenezę. Ponad 90% tych eksplantatów zamarło. Dla eksplantatów z liści korzystniejsza okazała się pożywka MS zawierająca 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA, a dla rozet pożywka 2 z 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP (tab. 1). Lassus i Voipio (1994), Farzami Sepehr i Ghorbanli (2005), Zhao i Grout (2003), Zhao i in. (2005), Lepse (2009) zakładali kultury *in vitro* rabarbaru ze sterylnych siewek. Nie obserwowali zamierania eksplantatów i uzyskiwali wysoki współczynnik namnażania.

Podczas trzeciego pasażu stwierdzono, że eksplantaty - rozety rozwijały się w wyższym procencie niż eksplantaty z liści. Na wszystkich stosowanych pożywkach od 50% do 100% tych eksplantatów wykazywało organogenezę. Natomiast eksplantaty z liści w 50% rozwijały się na pożywce MS zawierającej 4 mg·L<sup>-1</sup> BA i 0,8 mg·L<sup>-1</sup> IAA, a na pozostałych pożywkach w dużo niższym procencie. Również liczba martwych eksplantatów z liści była wysoka i wynosiła od 50% do ponad 80%. Żywe, nierozwinięte eksplantaty z liści obserwowano na pożywce MS zawierającej 0,2 mg·L<sup>-1</sup> kinetyny i 1 mg·L<sup>-1</sup> IAA, a rozety na pożywce MS zawierającej 5 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA (tab. 2).

Tabela 1. Regeneracja różnych eksplantatów rabarbaru na dwóch pożywkach podczas II pasażu

Table 1. Rhubarb explants regeneration on 2 media during the second passage

Pożywka MS zawierająca 30 g·L <sup>-1</sup> sacharozy Medium with 30 g·L <sup>-1</sup> of sucrose*	Eksplantat; Explant					
	Liście; Leaves (%)			Rozety; Rosettes (%)		
	Regenerujące rozety Regenerating rosettes	Żywe, nierozwinięte Alive, undeveloped	Martwe Dead	Regenerujące rozety Regenerating rosettes	Żywe, nierozwinięte Alive, undeveloped	Martwe Dead
1	33,3	0,0	66,7	25,0	16,7	58,3
2	5,5	0,0	94,5	40,0	40,0	20,0

\* 1 - MS z 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA,

2 - MS z 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA

Tabela 2. Rozwój eksplantatów rabarbaru na pożywkach regeneracyjnych podczas III pasażu

Table 2. Development of rhubarb explants on 6 regeneration media during the third passage

Pożywka MS zawierająca 30 g·L <sup>-1</sup> sacharozy Medium with 30 g·L <sup>-1</sup> of sucrose*	Eksplantat; Explant					
	Liście; Leaves (%)			Rozety; Rosettes (%)		
	Rozwijające się Developing	Żywe, nierozwinięte Alive undeveloped	Martwe Dead	Rozwijające się Developing	Żywe, nierozwinięte Alive undeveloped	Martwe Dead
1	16,7	0,0	83,3	100,0	0,0	0,0
2	25,0	0,0	75,0	75,0	0,0	25,0
3	16,7	33,3	50,0	100,0	0,0	0,0
4	25,0	0,0	75,0	50,0	25,0	25,0
5	50,0	0,0	50,0	100,0	0,0	0,0
6	33,3	0,0	66,7	100,0	0,0	0,0

\* 1 – MS, 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA

2 – MS, 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP BA i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA

3 – MS, 0,2 mg·L<sup>-1</sup> kinetyny i 1 mg·L<sup>-1</sup> IAA

4 – MS, 5 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA

5 – MS, 4 mg·L<sup>-1</sup> BA i 0,8 mg·L<sup>-1</sup> IAA

6 – MS, 1 mg·L<sup>-1</sup> TDZ i 1 mg·L<sup>-1</sup> NAA

Rozwój eksplantatów zależał od stosowanej pożywki. Z rozet nie uzyskano kompletnych roślin na żadnej ze stosowanych pożywek regene-

racyjnych, pędy powstawały na pożywce MS zawierającej 4 mg·L<sup>-1</sup> BA i 0,8 mg·L<sup>-1</sup> IAA. Rozety i kalus powstawały na wszystkich pożywkach, ale w różnym procencie, najczęściej na pożywce MS zawierającej 5 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA. Lal i Ahuja (1989) na pożywce zawierającej 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA uzyskali 8,9 pędu rabarbaru indyjskiego w przeliczeniu na eksplantat.

Kompletne rośliny uzyskiwano z eksplantatów z liści na pożywce MS zawierającej 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, 0,2 mg·L<sup>-1</sup> kinetyny i 1 mg·L<sup>-1</sup> IAA, pędy na pożywce MS z 30 g·L<sup>-1</sup> sacharozy, 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA, a rozety i kalus na pożywkach MS z 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA; MS z 5 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA oraz MS z 1 mg·L<sup>-1</sup> TDZ i 1 mg·L<sup>-1</sup> NAA (tab.3). Lal i Ahuja (1989) otrzymywali pędy rabarbaru indyjskiego z eksplantatów liściowych wyłożonych na pożywki zawierające 1 lub 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA. Na pożywkach z wyższą zawartością BA obserwowali witrifikację uzyskiwanych pędów. W prezentowanych badaniach na pożywce z 5 mg·L<sup>-1</sup> BA powstawał kalus i normalne pędy.

Tabela 3. Regeneracja rabarbaru z różnych eksplantatów na 6 pożywkach regeneracyjnych po III pasażu

Table 3. The rhubarb regeneration from different kinds of explant on 6 regeneration media after the third passage

Pożywka MS zawierająca 30 g·L <sup>-1</sup> sacharozy Medium with 30 g·L <sup>-1</sup> of sucrose*	Kategorie regenerantów z; The kind of regenerants from									
	Eksplantatów z liści; Explants of leaves					Eksplantatów z rozet; Explants of rosettes				
	Rośliny Plants (%)	Rozety Rosettes (%)	Rozety +kalus Rosettes +callus (%)	Korzenie Roots (%)	Kalus Callus (%)	Rośliny Plants (%)	Rozety Rosettes (%)	Rozety +kalus Rosettes +callus (%)	Korzenie Roots (%)	Kalus Callus (%)
1	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	50,0
2	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7	50,0	33,3
3	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	50,0
4	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	33,3	33,4	33,3	0,0
6	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

- \* 1 – MS, 2 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA
- 2 – MS, 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP BA i 0,01 mg·L<sup>-1</sup> IAA
- 3 – MS, 0,2 mg·L<sup>-1</sup> kinetyny (kinetin) i 1 mg·L<sup>-1</sup> IAA
- 4 – MS, 5 mg·L<sup>-1</sup> BA i 1 mg·L<sup>-1</sup> IBA
- 5 – MS, 4 mg·L<sup>-1</sup> BA i 0,8 mg·L<sup>-1</sup> IAA
- 6 – MS, 1 mg·L<sup>-1</sup> TDZ i 1 mg·L<sup>-1</sup> NAA

Otrzymane rośliny wysadzone do podłoża torfowego adaptowały się do warunków *ex vitro* w około 90%.

#### PODSUMOWANIE

Zastosowane sposoby wyjąławiania pąków rabarbaru pobranych z karpki umożliwiły uzyskanie sterylnego, żywego materiału roślinnego. Przy użyciu chlorku rtęci otrzymano 65,4% eksplantatów czystych.

Po pierwszym pasażu 58,1% merystemów wytwarzało rozety. Zaobserwowano różnice w regeneracji eksplantatów liściowych i rozet w zależności od stosowanej pożywki. W drugim pasażu najczęściej eksplantatów liściowych (ponad 30%) tworzyło nowe rozety na pożywce MS zawierającej  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA i  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA, natomiast na pożywce MS zawierającej  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP BA i  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA 40% rozet tworzyło nowe rozety, a tylko 5% eksplantatów z liści wykazywało organogenezę. W trzecim pasażu, z eksplantatów z liści uzyskiwano kompletne rośliny na pożywce MS  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  kinetyny i  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, pędy na pożywce MS z  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA i  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA, a rozety i kalus na pożywkach MS z  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2iP i  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA; MS z  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA i  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA oraz MS z  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ i  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA. Rozety tworzyły pędy na pożywce MS zawierającej  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA i  $0,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA, a rozety i kalus powstawały na większości pożywek, ale najczęściej na pożywce MS zawierającej  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA i  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA.

#### Literatura

- Farzami-Sephehr M., Ghorbanli M. 2005. Formation of catechin in callus cultures and micropropagation of *Rheum ribes* L. Pak. J. Biol. Sci. 8 (10): 1346-1350.
- Foust C.M., Marshall D.E. 1991. Culinary rhubarb production in North America: history and recent statistics. Hort Science 26:1360-1363.
- Lal N., Ahuja P.S. 1989. Propagation of indian rhubarb (*Rheum emodi* Wall.) using shoot-tip and leaf explant culture. Plant Cell Rep. 8: 493-496.
- Lassus C., Voipio I. 1994. Micropropagation of rhubarb with special reference to weaning stage and subsequent growth. Agric. Sci. Finland 3: 89-194.
- Lepse L. 2005. Adapting technology for local rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) clones propagation *in vitro*. Agronomijas Vestis (Latvian Journal of Agronomy) 8: 324-327.
- Lepse L. 2009. Comparison of *in vitro* and traditional propagation methods of rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) according to morphological features and yield. Acta Hort. (ISHS) 812: 265-270.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- Walkey D.G.A. 1968. The production of virus-free rhubarb by apical tip culture. *J. Hort. Sci.* 43: 283.
- Walkey D.G.A., Fitzpatrick J., Woolfitt J.M.G. 1969. The inactivation of virus in cultured shoot tips of *Nicotiana rustica* L. *J. Gen. Virol.* 5: 237-241.
- Walkey D.G.A., Mathews K.A.M. 1979. Rapid clonal propagation of rhubarb (*Rheum rhaponticum*) from meristem-tips in tissue culture. *Plant Sci. Let.* 14: 287-289.
- Zhao Y., Grout B.W.W. 2003. Inadvertent selection for unwanted morphological forms during micropropagation adversely affects field performance of European rhubarb (*Rheum rhaponticum*). *Acta Hort.* 616: 301-308.
- Zhao Y., Grout B.W.W., Crisp P. 2005. Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum rhaponticum*) PC49, compared to conventional plants. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 82: 357-361.

Dorota Krzyżanowska, Agata Kapuścińska, Urszula Kowalska, Waldemar Kiszczak, Danuta Prochaska, Krystyna Górecka

#### MICROPROPAGATION OF RHUBARB (*Rheum rhaponticum* L.)

##### Summary

The main goal of presented research was to develop the most effective way of plant material sterilization, which later was used to establish meristem cultures and optimal composition of culture media for rhubarb proliferation. Three different ways of bud sterilization was examined. Rhubarb buds were taken from underground rhizomes and subsequently surface-sterilized before meristem isolation with 70% ethanol and sodium hypochlorite or mercury chloride. Meristems cut out from sterile buds were induced on MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing sucrose 30 g·L<sup>-1</sup>, BA 2 mg·L<sup>-1</sup> and IBA 1 mg·L<sup>-1</sup> (first passage). Sterility inspection was made after 2 weeks of culture, growth and development observations were taken after 6 weeks of culture. Explants passages: first- on the same medium, on medium containing 30 mg·L<sup>-1</sup> sucrose, 30 mg·L<sup>-1</sup> 2iP, 0.01 mg·L<sup>-1</sup> IAA and third- on six media with different composition. Six culture media containing various plant hormones – cytokinine and auxine were examined. Two types of explants was used—from rosettes and leaves (entire leaves or their pieces). All presented methods enabled to give alive sterile plant explants. After using mercury chloride for bud sterilization we obtained 65,4% of sterile explants. After first passage 58,1% of meristems generated rosettes. For rosettes the most effective was MS medium supplemented with BA 5 mg·L<sup>-1</sup> and IBA 1 mg·L<sup>-1</sup>. Plants were obtained from leaves explants on MS medium containing kinetine 0,2 mg·L<sup>-1</sup> and IAA 1 mg·L<sup>-1</sup>. The number of rosettes induced from shoot explants was the highest on the MS medium containing BA 2 mg·L<sup>-1</sup> and IBA 1 mg·L<sup>-1</sup>, MS with 2iP 30 mg·L<sup>-1</sup> and IAA 0,01 mg·L<sup>-1</sup> and MS with BA 5 mg·L<sup>-1</sup> and IBA 1 mg·L<sup>-1</sup>. Received plants trans-

ferred to peat-based substrate were successfully adapted to the *ex vitro* conditions in 90%.

Prezentowane badania były finansowane z Programu Wieloletniego realizowanego w Instytucie Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach pt. „Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodnictwa w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodnictwa oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”; obszar tematyczny 1: ”Strategia bezpiecznego stosowania środków ochrony roślin w produkcji ogrodnictwa”; zadanie 1.17: „Opracowanie technologii produkcji odwirusowanych sadzonek warzyw z zastosowaniem kultur tkanek”.