



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

mgr inż. Piotr Licznerski

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.:

**WPŁYW PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA BARWĘ
SIEWEK ORAZ ZMIANY BIOCHEMICZNE
I MOLEKULARNE U WYBRANYCH GATUNKÓW
KAKTUSÓW**

***Influence of ionizing radiation on the colour
of seedlings and biochemical and molecular changes
in selected cacti species***

DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE

DYSCYPLINA: ROLNICTWO I OGRODNICTWO

PROMOTOR

**DR HAB. JUSTYNA LEMA-RUMIŃSKA, PROF. UCZELNI
UNIwersytet KAZIMIERZA WIELKIEGO**

Bydgoszcz, 2023

1. WSTĘP

Rodzina Cactaceae jest stosunkowo liczna, gdyż składa się ze stu rodzajów i około 2000 gatunków kaktusów [Anderson, 2001]. Większość przedstawicieli tej rodziny w środowisku naturalnym występuje w obu Amerykach, jednak największe ich zagęszczenie jest na pustynnym i suchym obszarze Meksyku, w południowo-zachodniej części Stanów Zjednoczonych oraz w południowo-zachodniej części obszaru andyjskiego [Nyffeler i Eggli, 1997]. Na całym świecie kaktusy wzbudzają od lat duże zainteresowanie, jako rośliny ozdobne, które są szczególnie cenione i pożądane przez hodowców i kolekcjonerów. Nowoczesna hodowla roślin ozdobnych jest ukierunkowana na stosowanie nowych, cały czas doskonalonych oraz zaawansowanych metod (takich jak: modyfikacje genetyczne roślin) i narzędzi biotechnologicznych (takich jak: kultury *in vitro*, markery molekularne) [Schum 2003, Tymoszuć 2015]. W dobie dzisiejszej mechanizacji tradycyjne metody i narzędzia hodowli roślin stały się zbyt absorbujące, powolne oraz kosztowne w celu uzyskania nowych odmian, o niespotykanych dotąd cechach [Santoz-Diaz i in. 2003, Jeong i in. 2004, Lema - Rumińska i Kulus 2014; Pérez - Molphe-Balch i in. 2015, Licznerski i Lema-Rumińska 2021a,b]. Dzięki dobraniu odpowiednich metod hodowli w połączeniu z narzędziami biotechnologicznymi istnieje możliwość spełnienia wymagań rynkowych stawianych nie tylko przez szerokie grono konsumentów, ale również przez wysublimowaną grupę kolekcjonerów, którzy zwracają szczególną uwagę na nowe i konkurencyjne cechy jakościowe w odniesieniu do odmian wcześniej znanych [Lema-Rumińska i Licznerska 2004, Czekalski 2010, Kulpa 2012, Botelho i in. 2015, Licznerski i Lema - Rumińska 2021b]. Chociaż najnowocześniejsze metody hodowli oparte są obecnie o technologię edycji genów (CRISPR/Cas), to nadal czynnikami mutagenne do których zaliczane jest promieniowanie jonizujące (do którego należy również promieniowanie X), promieniowanie mikrofalowe, wysokiej energii fotony i elektrony, czy nanocząstki złota lub srebra oraz metanosulfonian etylu (EMS) stanowią cenne narzędzie zmian genetycznych szczególnie u roślin ozdobnych o dużych, nieznanym genomach oraz roślin poliploidalnych [Holme i in., 2019, Tymoszuć i Kulus, 2020, Miler i in. 2021; Nasri i in. 2021, Dada i in. 2022, Kulus i in. 2022].

W literaturze brakuje jednak badań nad wpływem promieniowania jonizującego u kaktusów, które stanowią ważną ekonomicznie gałąź produkcji na rynku ogrodniczym.

2. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ

Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że promieniowanie X wpływa na dynamikę kiełkowania nasion kaktusów, częstotliwość zmian morfologicznych, zmiany biochemiczne oraz zmiany na poziomie molekularnym. Spodziewano się również różnic pomiędzy badanymi gatunkami kaktusów.

Głównym celem badań jest ocena, czy i w jakim stopniu zastosowane promieniowanie X w różnych dawkach wpływa na dynamikę kiełkowania nasion w warunkach *in vitro*, częstotliwość zmian morfologicznych, zmiany biochemiczne oraz zmiany na poziomie molekularnym u wybranych gatunków kaktusów: *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera*.

Cele szczegółowe:

- Analiza dynamiki kiełkowania nasion w warunkach *in vitro* w zależności od czynników badawczych,
- Ocena barwy siewek przy pomocy katalogu barw RHSCC w zależności od czynników badawczych,
- Analiza zawartości metabolitów wtórnych – barwników roślinnych (karotenoidów i antocyjanów) oraz ocena zawartości chlorofilu a i chlorofilu b w tkankach przy pomocy metody spektrofotometrycznej w materiale roślinnym uzyskanym w wyniku napromienienia promieniowaniem X w stosunku do kontroli,
- Ocena molekularna uzyskanego materiału roślinnego uzyskanego w wyniku napromienienia promieniowaniem X w stosunku do kontroli przy pomocy markera SCoT (Start Codon Targeted).

3. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Materiałem badawczym były nasiona trzech gatunków kaktusów: *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* Ritt. oraz *Uebelmannia pectinifera* Buining, uzyskane z hodowli własnej (*Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* Ritt.) lub zakupione w firmie Kakteen Koheres z Niemiec (*Uebelmannia pectinifera* Buining.). Nasiona zostały napromienione promieniowaniem X o nominalnym potencjale 6 MV przy pomocy akceleratora Clinac 2300 CD w Zakładzie Radioterapii Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. Wyznaczenie wymaganego czasu ekspozycji zostało przeprowadzone w Zakładzie Fizyki Medycznej, przy pomocy system planowania Eclipse firmy Varian. Zastosowano dla każdego gatunku dawki promieniowania: 0 Gy (kontrola), 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy i 50 Gy. W danej kombinacji podczas napromieniania znajdowało się 500 nasion w woreczku strunowym o wymiarach 13,5 x 8 cm, które umieszczono w celu zwiększenia udziału promieniowania wtórnego na płytach solid water RW3 i przykryto warstwą bolusa o znanej grubości, który uwzględniono w obliczeniach czasu napromieniania.

Po napromienieniu nasiona kaktusów zostały poddane sterylizacji wstępnej, polegającej na płukaniu materiału pod bieżącą wodą przez 30 minut, następnie płukaniu w wodzie destylowanej z dodatkiem kropli detergentu 5-10 minut oraz moczeniu w 0,2% środka grzybobójczym (62,5 WG Switch, Syngenta) z dodatkiem detergentu przez około 17 godzin (na wytrząsarce) i moczeniu w 0,5% środka grzybobójczym Amistar 250 S.C. (Syngenta) przez 15 minut. Po tym czasie nasiona zostały wypłukane w wodzie destylowanej w ciągu 5-10 minut. W kolejnym etapie została wykonana sterylizacja właściwa w warunkach sterylnych. Nasiona zostały poddane kolejno działaniu 70% etanolu przez 5-10 sekund, 1,6 % roztworu podchlorynu sodu przez 30 minut i na koniec zostały przepłukane 3-krotnie przez 10 minut w sterylnej wodzie destylowanej. Następnie materiał był umieszczony (po 2 nasiona) na pożywce MS [Murashige i Skoog, 1962], zestalonej agarem ($8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) i pH ustalonym na poziomie 5,8 przed autoklawowaniem, w szalkach Petriego o średnicy 5,5 cm. Kultury *in vitro* (zaklejone parafilmem) były utrzymywane w pokoju wzrostowym, w temperaturze $24 \pm 2^\circ\text{C}$, przy 16 godzinnym fotoperiodzie (Philips TLD 54/34 W), przy średnim natężeniu napromienienia kwantowego $47,84 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Przez kolejne 8 tygodni były wykonywane codzienne obserwacje dotyczące dynamiki kiełkowania nasion. Przy czym za makroskopowy objaw kiełkowania nasion uznano pojawienie się korzonka zarodkowego. Po okresie 8 tygodni uzyskane z nasion siewki zostały ocenione pod względem zabarwienia przy pomocy katalogu barw RHSCC (1966), zmierzone, zważone i przeznaczone do dalszych analiz biochemicznych oraz molekularnych.

3.1. Analizy biochemiczne

Do badań biochemicznych przeznaczono losowo wybrane siewki z każdej kombinacji dawki promieniowania oraz barwy określonej za pomocą katalogu barw RHSCC. Badania wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej kombinacji z wyjątkiem siewek bezchlorofilowych u *Astrophytum spp.* 'Purple', oraz barwnych u *Copiapoa tenuissima*.

3.2. Ekstrakcja barwników roślinnych z uzyskanych siewek

Przygotowany materiał roślinny zważono na wadze analitycznej z dokładnością 0,1 mg, a następnie rozdrobniono każdą siewkę z osobna w moździerzu porcelanowym z dodatkiem kilkudziesięciu mg piasku kwarcowego, który ucierano wraz z siewką. Do ekstrakcji antocyjanów dodawano 3,5 ml 1% HCl w metanolu cz.d.a., natomiast do ekstrakcji karotenoidów i chlorofilu a oraz chlorofilu b dodawano 3,5 ml 100% acetonu cz.d.a. W kolejnym etapie ekstrakty przefiltrowano ilościowo przez lejek z bibułą filtracyjną (średnią, jakościową) do probówek o pojemności 3,5 ml. Wyznaczono maksima absorpcji przy charakterystycznej dla danego barwnika długości fali (λ_{max}) i wykonano pomiar absorbancji przy określonych długościach fal dla sumy: antocyjanów przy 530 nm, dla karotenoidów przy 440 nm, oraz chlorofili: 645 nm i 662 nm. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej kombinacji barwy i dawki promieniowania, poza wspomnianymi wyjątkami. Ocena zawartości antocyjanów, karotenoidów i chlorofili zostały wykonane przy pomocy spektrofotometru Shimadzu 1601PC wg zmodyfikowanej procedury Lichtenthaler i Buschmann [2001] oraz Wettstein [1957] i Harborne [1967] cyt. za Lema-Rumińska i Zalewska [2004].

3.3. Analizy molekularne

Z uzyskanych dwumiesięcznych siewek zostało wyizolowane DNA, z wykorzystaniem gotowych zestawów do izolacji DNA - Genomic Mini AX Plant (Spin), firmy A&A Biotechnology. Z każdej kombinacji dawki promieniowania oraz barwy określonej za pomocą katalogu barw RHSCC wykonano izolację

według protokołu Genomic Mini AX Plant (Spin). Do ekstrakcji wykorzystano około 100 mg świeżej masy siewki, które umieszczono w probówce o pojemności 1,5 ml i dokonano homogenizacji tkanek za pomocą urządzenia FastPrep®-24 (firmy MP Biomedicals). Pomiar czystości DNA przeprowadzono za pomocą NanoPhotometru® NP 80. Wyizolowane DNA było przechowywane w lodówce w temperaturze 6°C. Analizę molekularną przeprowadzono za pomocą siedmiu starterów SCoT (Start Codon Target, Collard i Mackill, 2009). Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze Thermal Cycler (BIO-RAD, model C1000 TOUCH) w objętości 25 µl. Na końcową objętość składało się: 2,5 µl startera, 12,5 µl PCR MIX Plus (A&A Biotechnology, Poland), w skład którego wchodziło 0,1 U/µl polimerazy *Taq* DNA, 4 mM MgCl₂, 0,5 mM każdego z dNTPs, 20 ng matrycy DNA oraz wodę jałową. Reakcja PCR polegała na wstępnej denaturacji w temperaturze 94°C przez 4 minut. Następnie przez 35 cykli: 1 minuta w temperaturze 94°C, 1 minuta w temperaturze przyłączania dla odpowiedniego starterów 10 minut w temperaturze 72°C. Po przeprowadzonej amplifikacji 10 µl produktu reakcji PCR zostało rozdzielone na 1,5% żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydyny w objętości 18 µl w buforze TBE pod napięciem 90V przez 20 minut a następnie przez 90 minut pod napięciem 110V w komorze Standard Power Pack25 (Biometria). Jako obciążaczka wykorzystano 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) oraz markera wielkości prążka GenRuler Express DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific). Uzyskane produkty zarchiwizowano za pomocą systemu archiwizacji żeli Gel Doc™XR+ (BIO-RAD).

3.4. Analizy statystyczne

Uzyskane wyniki analiz biochemicznych oraz parametry morfologiczne zostały opracowane statystycznie za pomocą analizy wariancji, przy poziomie istotności $p < 0,05$ z wykorzystaniem programu komputerowego Statistica 13.1 (StatSoft). Analizy molekularne zostały wykonane za pomocą programu GelAnalizier 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc). Wszystkie *loci* markera SCoT, wskazane dla każdego genotypu, policzone zostały z zastosowaniem systemu binarnego, gdzie obecność prążka oznacza (1) a brak (0). Otrzymana matryca stanowiła podstawę do obliczeń statystycznych. Do opracowania wyników zostanie wykorzystana analiza skupień (cluster analysis) metodą UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) przy pomocy programu Statistica 13.1 (StatSoft).

4. WYNIKI

4.1 Dynamika kiełkowania nasion w warunkach *in vitro* poddanych działaniu promieniowania X

Przez kolejne osiem tygodni od dnia sterylnej wysiewu nasion trzech gatunków kaktusów (*Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima*, *Uebelmannia pectinifera*), uprzednio poddanych działaniu promieniowaniu X w dawkach 0 Gy (kontrola), 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy, dokonano obserwacji dynamiki ich kiełkowania.

4.1.1 *Astrophytum spp.* 'Purple'

Przez pierwsze trzy dni prowadzenia doświadczenia w warunkach *in vitro* nie stwierdzono makroskopowego objawu kiełkowania nasion u kaktusa *Astrophytum spp.* 'Purple', które były poddane działaniu promieniowania X oraz nasion kontrolnych. Początek kiełkowania odnotowano czwartego dnia, gdy stwierdzono pojawienie się korzonka zarodkowego u jednej siewki z nasiona poddanego uprzednio promieniowaniu w dawce 20 Gy. Następnego dnia stwierdzono kiełkowanie dwóch nasion napromienionych tą dawką oraz dwóch, które uprzednio potraktowano dawką 15 Gy. Początek kiełkowania nasion nienapromienionych oraz nasion napromienionych wyższymi dawkami (25 i 50 Gy) był opóźniony o 3-4 dni w stosunku do dawek 15 – 20 Gy. Kolejne dni (od dnia szóstego do dziewiętnastego) były również najbardziej efektywne pod względem uzyskanej liczby kiełkujących nasion poddanych działaniu promieniowania X w dawce 15 i 20 Gy. Liczba kiełkujących nasion dla tych dwóch dawek (15 i 20 Gy) była wyższa niż nasion nienapromienionych (kontroli – 0 Gy) oraz nasion napromienionych dawkami 25 i 50 Gy. Dopiero 19-tego dnia obserwacji stwierdzono, że liczba kiełkujących nasion nie poddanych działaniu promieniowania zrównała się z liczbą kiełkujących nasion poddanych działaniu dawek promieniowania 20 Gy, a w kolejnych dniach (od 22 dnia obserwacji) liczba kiełkujących nasion kontrolnych zaczęła przewyższać wszystkie pozostałe kombinacje. Tendencja ta utrzymała się do zakończenia obserwacji. Od 14 do 18 dnia trwania kultury oraz od 36 do końca trwania obserwacji stwierdzono najmniej kiełkujących nasion poddanych promieniowaniu w dawce 50 Gy. Różnica w ilości kiełkujących nasion dla nasion poddanych działaniu promieniowania X w dawce 50 Gy w stosunku do kontroli wynosiła 22,13 %.

4.1.2 *Copiapoa tenuissima*

Przez siedem kolejnych dni prowadzenia kultury *in vitro* nie zaobserwowano pojawienia się kiełkujących nasion *Copiapoa tenuissima* nienapromienionych (kontrola) jak i napromienionych dawkami 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy czy 50 Gy. Ósmego dnia odnotowano początek kiełkowania nasion poddanych promieniowaniu X w dawkach 20 Gy oraz 50 Gy (odpowiednio po 2) oraz 15 Gy (1). Pierwsze kiełkujące nasiona kontrolne (5) i poddanych promieniowaniu 25 Gy (2) stwierdzono w dziewiątym dniu trwania doświadczenia. W kontroli (0 Gy) w dniach o dziewiątego do szesnastego dnia trwania kultury *in vitro* zaobserwowano powstanie największej liczby kiełkujących nasion. Tendencja ta zmieniła się od 17 dnia do końca trwania doświadczenia, gdzie najefektywniej kiełkowały nasiona uprzednio potraktowanych dawką promieniowania wynoszącą 25 Gy. Najmniej kiełkujących nasion stwierdzono natomiast od dziewiątego do 13 oraz od 16 do 17 dnia trwania kultury, które wcześniej poddano działaniu promieniowania X w dawce 15 Gy, a w 14 i 15 dniu oraz od 18 do zakończenia obserwacji dla kiełkujących nasion napromienionych dawką 20 Gy. Należy zaznaczyć, iż już od dziewiątego dnia doświadczenia do samego końca doświadczenia, zaobserwowano wytworzenie się mniejszej liczby kiełkujących nasion napromienionych dawką 15 Gy oraz 20 Gy w stosunku do kontroli (0 Gy) oraz wyższych dawek promieniowania (25 i 50 Gy). Natomiast w przypadku nasion napromienionych dawką 50 Gy, odnotowano, iż od 19 dnia trwania kultury uzyskano większą liczbę kiełkujących nasion w stosunku do kontroli. Najwięcej kiełkujących nasion uzyskano dla nasion napromienionych dawką 25 Gy (o 15,87 % więcej kiełkujących nasion w stosunku do kontroli).

4.1.3 *Uebelmannia pectinifera*

U gatunku *Uebelmannia pectinifera* przez pierwsze dwa dni nie zaobserwowano kiełkowania nasion. Początek kiełkowania stwierdzono trzeciego dnia (w ilości dwóch nasion) tylko dla nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem X w dawce 50 Gy. Czwartego dnia trwania obserwacji odnotowano początek kiełkowania nasion niepoddanych promieniowaniu (kontrola; 0 Gy) oraz tych, które poddano działaniu dawki 15 Gy, 20 Gy oraz 25 Gy. Największą liczbę kiełkujących nasion odnotowano dla nasion kontrolnych (10), natomiast najmniej dla nasion potraktowanych promieniowaniem X w dawce 15 Gy (1). Mimo, że od czwartego do szóstego

dnia trwania kultury *in vitro* odnotowano największą ilość kiełkujących nasion uzyskanych dla próby kontrolnej, wraz z upływem czasu tendencja ta uległa zmianie. Już siódmego dnia (dla zastosowanej dawki na nasiona 50 Gy), dziewiątego (dla nasion poddanych dawką 15 Gy oraz 25 Gy) oraz 11 dnia (dla materiału napromieniowanego dawką 20 Gy) prowadzenia doświadczenia uzyskano większą liczbę kiełkujących nasion niż w kontroli (0 Gy). Dopiero od 25 dnia trwania kultury do 57 dnia zaobserwowano, że mniejszą liczbę kiełkujących nasion otrzymano dzięki napromieniowaniu nasion dawką 25 Gy (o 8,48% w stosunku do kontroli). Należy zaznaczyć, iż już od 13 dnia do końca trwania doświadczenia największą liczbę kiełkujących nasion uzyskano dla nasion, które napromieniono promieniowaniem X w dawce 20 Gy (o 17,28% w stosunku do kontroli). Mniej efektywnym w stosunku do kontroli było zastosowanie dawki 20 Gy, ale bardziej korzystnym okazało się użycie dawek kolejno 15 Gy oraz 50 Gy.

4.2. Ocena barwy siewek i stężenia barwników roślinnych poddanych działaniu promieniowania X

Po upływie ośmiu tygodni od napromienienia nasion kaktusów *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera* dawkami 0 Gy (kontrola), 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy i założenia kultury *in vitro*, dokonano oceny barwy uzyskanych siewek (według katalogu RHSCC), a także określono stężenie barwników roślinnych (antocyjanów, karotenoidów, chlorofili a oraz chlorofili b) w nich zawartych.





4.2.1 *Astrophytum spp.* 'Purple'



W wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion *Astrophytum spp.* 'Purple' uzyskano 1869 siewek, z czego 1425 powstało z nasion poddanych działaniu promieniowania jonizującego X o odmiennej dawce. Najwięcej siewek bezchlorofilowych uzyskano z nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem w dawce 50 Gy (5,12 %), natomiast najmniej dla siewek kontrolnych, niepoddanych działaniu czynnika mutagennego (1,33 %). Wśród siewek pozbawionych chlorofilu stwierdzono najwięcej tych o pomarańczowej barwie (27), natomiast najmniej było siewek charakteryzujących się barwą czerwoną (6) oraz kremowo – żółtą (9). W przypadku siewek chlorofilowych najwięcej stwierdzono egzemplarzy o barwie brunatnej (1748 siewek), natomiast najmniej mających zielone zabarwienie (79).

W przypadku *Astrophytum spp.* 'Purple' wszystkie badane siewki kremowo - białe, bez względu na zastosowaną dawkę promieniowania nie zawierały antocyjanów, karotenoidów, chlorofilu a i chlorofilu b (Tabela 1). W przypadku siewek bezchlorofilowych o barwie pomarańczowej dokonano oceny stężenia barwników roślinnych z uwagi na ich występowanie w badanych siewkach.

Tabela 1. Barwa siewki (wg katalogu RHSCC) oraz stężenie sumy antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu a oraz b w przeliczeniu na 1 g świeżej masy siewki w zależności od dawki promieniowania X u *Astrophytum spp.* 'Purple'.

Dawka promieniowania X [Gy]	Barwa siewki (wg RHSCC)	Stężenie barwników [mg·dm ⁻³]			
		antocyjany	karotenoidy	chlorofil a	chlorofil b
0	176 B, C	23,64 c*	40,91 d	41,53 g	35,81 a
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	30,47 a	38,82 f	45,58 d	26,12 e
15	176 B, C	17,42 c	57,41 a	75,21 a	33,50 b
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	13,56 i	41,70 e	51,01 chki	30,10 c
20	176 B, C	15,45 f	45,09 cf	43,06 f	21,41 f
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	24,37 b	47,85 b	66,50 bc	27,12 d
25	176 B, C	22,88 e	29,85 e	35,76 h	13,51 h
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	23,20 d	33,33 cf	44,57 e	19,83 g
50	176 B, C	14,18 h	17,97 g	24,74 bhk	8,28 i
	144 A, C	12,40 j	8,33 i	11,15 hi	4,06 j
	28 C	14,68 g	11,49 h	7,88 j	7,70 i

[barwa uzyskanych siewek:  - brunatna,  - zielona,  - pomarańczowa,  - kremowo - biała;

 - stężenie najwyższe;  - stężenie najniższe

*dane w kolumnach oznaczone tymi samymi literami alfabetu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

4.2.2 *Copiapoa tenuissima*

W wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion dla *Copiapoa tenuissima* uzyskano 777 siewek, z czego 636 powstało w wyniku działania promieniowania jonizującego X o odmiennej dawce na nasiona. W wyniku napromieniowania nasion dawkami od 15 do 50 Gy uzyskano w sumie 17 siewek barwnych (9,60 %), charakteryzujących się pomarańczowo – brunatnym oraz żółto – kremowym

zabarwieniem. Najwięcej siewek barwnych stwierdzono u siewek powstałych z nasion poddanych promieniowaniu w dawce 50 Gy (4,90%), natomiast najmniej dla siewek kontrolnych (1,85%).

U *Copiapoa tenuissima* najwyższe stężenie antocyjanów oraz chlorofilu b stwierdzono dla siewek powstałych z nasion uprzednio poddanych promieniowaniu X w dawce 15 Gy, natomiast karotenoidów oraz chlorofilu a dla siewek kontrolnych (dawka 0 Gy). Najmniejsze stężenie antocyjanów stwierdzono w wyniku zastosowania promieniowania w dawce 50 Gy, natomiast karotenoidów oraz chlorofilu a i b dla próbek kontrolnych (dawka wynosząca 0 Gy). Dla gatunku *Copiapoa tenuissima* stwierdzono najwyższe stężenie antocyjanów ($46,76 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dla siewki o barwie zielonej, powstałej z nasiona poddanego promieniowaniu X w dawce 15 Gy, natomiast najniższe ($0,44 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), dla siewki brunatnej, która powstała dzięki zastosowaniu promieni rentgenowskich w dawce 50 Gy (Tabela 2). Pozostałe siewki barwy zielonej, otrzymane z nasion potraktowanych promieniowaniem X (w dawce 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy) również miały wyższe stężenie antocyjanów w stosunku do próby kontrolnej ($2,83 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Próbkki wyekstrahowane z siewek barwy brunatnej (uzyskanych z nasion potraktowanych działaniem czynnika mutagennego w dawce 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy), posiadały niższe stężenie antocyjanów w stosunku do próbek uzyskanych z siewek kontrolnych ($\text{Gy} = 0$), o tym samym zabarwieniu. Siewki poddane czynnikowi mutagennemu barwy żółto - kremowej posiadały mniejsze stężenie antocyjanów w stosunku do siewki kontrolnej barwy brunatnej, jednakże większe od siewki barwy zielonej. Największe i najmniejsze stężenie karotenoidów odnotowano dla siewek kontrolnych, kolejno dla barwy zielonej ($52,40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), barwy brunatnej ($5,28 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).







W przypadku siewek o zabarwieniu zielonym, wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania stężenie karotenoidów malało (od $39,38 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – zastosowana dawka na nasiono: 15 Gy do $32,84 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – użyta dawka 25 Gy i $33,21 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – podana dawka 50 Gy). Ekstrakty z siewek barwy brunatnej oraz żółto - kremowej, niezależnie od uprzednio zastosowanej dawki promieniowania, zawierały większe stężenie karotenoidów w stosunku do próbek kontrolnych, które nie były narażone na działanie czynnika.

Największe ($87,32 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i najmniejsze ($7,32 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stężenie chlorofilu a stwierdzono również dla próbek wyekstrahowanych z siewek kontrolnych. Działanie promieniowania X wpłynęło znacznie na obniżenie stężenia chlorofilu a u siewek barwy zielonej, otrzymanych z nasion potraktowanych działaniem promieni rentgenowskich, jednakże w przypadku

siewek barwy brunatnej, których nasiona były również poddane działaniu promieniowaniu X odnotowano znaczny wzrost stężenia chlorofilu a. W przypadku chlorofilu b największe stężenie ($36,97 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stwierdzono w ekstraktach uzyskanych dla siewki barwy zielonej, uzyskanej z nasiona poddanego promieniowaniu o dawce 15 Gy, natomiast najniższe dla próby kontrolnej barwy brunatnej ($3,30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Siewki barwy brunatnej, pomarańczowo-brunatnej oraz żółto - kremowej, których nasiona uprzednio były potraktowane promieniowaniem X posiadały wyższe stężenie antocyjanów w stosunku do siewek kontrolnych tej samej barwy, jednakże niższe aniżeli siewek kontrolnych barwy zielonej.

Tabela 2. Barwa siewki (wg katalogu RHSCC) oraz stężenie antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu a oraz b w przeliczeniu na 1 g świeżej masy siewki w zależności od dawki promieniowania X u *Copiapoa tenuissima*.

Dawka promieniowania X [Gy]	Barwa siewki (wg RHSCC)	Stężenie barwników [$\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$]			
		antocyjany	karotenoidy	chlorofil a	chlorofil b
0	176 B, C	26,22 c*	5,28 fk	7,32 m	3,30 k
	144 A, C	2,83 l	52,40 a	87,32 a	29,73 d
15	176 B, C	17,75 h	23,10 e	31,23 f	16,32 g
	144 A, C	46,76 a	39,38 b	36,74 d	36,97 a
	158 B, C	24,18 d	21,20 f	17,47 j	24,00 e
20	176 B, C	14,36 j	13,22 i	20,38 h	26,84 a
	144 A, C	6,06 k	37,87 c	43,81 b	35,04 b
	158 B, C	11,29 i	22,78 e	19,85 i	23,84 e
25	176 B, C	21,72 f	19,06 g	29,95 g	13,23 h
	144 A, C	22,46 e	32,84 d	36,36 e	30,09 d
	158 B, C	7,61 i	18,00 f	16,60 k	20,83 f
50	176 B, C	29,20 b	13,64 h	15,99 l	7,61 j
	144 A, C	19,27 g	33,21 d	40,03 c	33,63 c
	163 A	0,44 l	8,45 j	8,37 ł	10,53 i

[barwa uzyskanych siewek:  - brunatna,  - zielona,  - pomarańczowo-brunatna,  - żółto-kremowa;  - stężenie najwyższe;  - stężenie najniższe]

*dane w kolumnach oznaczone tymi samymi literami alfabetu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

4.2.3 *Uebelmannia pectinifera*

W wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion *Uebelmannia pectinifera* najwięcej powstałych siewek charakteryzowało się barwą brunatno – zieloną (69,80%), natomiast najmniej siewek miało barwę brunatno – brunatną (10,20%).

W przypadku kontroli, której nasiona nie zostały poddane działaniu czynnika mutagennego w postaci promieniowania X, spośród 50 siewek najwięcej było barwy zielono – zielonej (74%), natomiast najmniej brunatno – brunatnej (8%). W przypadku siewek powstałych z nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem sytuacja wyglądała odmiennie, gdyż w przypadku zastosowania dwóch najniższych dawek promieniowania nie uzyskano wcale siewek barwy brunatno – brunatnej (20 Gy) bądź stosunkowo małe ilości (dla 15 Gy – 10% siewek miało barwę brunatno – brunatną). Z kolei w wyniku zastosowania na nasiona dawek 25 Gy i 50 Gy spowodowało uzyskanie najmniejszej liczby siewek (kolejno 4% oraz 2,22%) barwy zielono – zielonej w stosunku do pozostałych barw. W wyniku zastosowania promieniowania na nasiona w dawkach od 15 do 50 Gy stwierdzono największą liczbę powstałych siewek koloru brunatno – zielonego (od 68,89% do 96% w stosunku do całkowitej liczby siewek).

Podczas dokonywania charakterystyki morfologicznej siewek *Uebelmannia pectinifera* powstałych z nasion poddanych promieniowaniu w zróżnicowanej dawce (od 0 Gy do 50 Gy), oprócz parametrów dotyczących ich barwy, dokonano oceny świeżej masy, długości, szerokości siewki i długości jej najdłuższego korzenia.

Siewki kontrolne, powstałe z nasion niepoddanych działaniu czynnika mutagennego w postaci promieniowania X posiadały najwyższe oceniane parametry (tj. świeżą masę, średnią wartość długości siewek, szerokość epikotyli oraz najwyższą wartość długości najdłuższego korzenia), wyjątek stanowiła długość najdłuższego korzenia siewek uzyskanych przy dawce 50 Gy, która nie różniła się istotnie od siewek z kombinacji kontrolnej. Najniższe natomiast mierzone parametry odnotowano dla siewek uzyskanych z nasion uprzednio potraktowanych dawką 15 Gy (świeża masa, średnia wartość długości hipokotyli oraz epikotyli, szerokość epikotyli, najwyższa średnia wartość długości najdłuższego korzenia), jednak przy dawce 50 Gy długość siewki nie różniła się istotnie od siewek z kombinacji kontrolnej a szerokość epikotyli była najniższa.

Największe stężenie wszystkich analizowanych barwników roślinnych stwierdzono w ekstraktach siewek, powstałych z nasion poddanych promieniowaniu w dawce 15 Gy. Natomiast najmniejsze stężenie antocyjanów stwierdzono dla ekstraktu pochodzącego z siewki powstałej z nasiona poddanego promieniowaniu 25 Gy, a karotenoidów oraz chlorofilu a i b dla siewek kontrolnych.

W przypadku *Uebelmannia pectinifera* największe stężenie antocyjanów ($93,19 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stwierdzono dla siewki barwy brunatno – brunatnej, którą uzyskano w wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion uprzednio poddanych promieniowaniu X w dawce 15 Gy, natomiast najmniej ($5,00 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dla siewki charakteryzującej się barwą brunatno – zieloną, która powstała w wyniku działania promieni X w dawce 25 Gy (Tabela 3). Działanie promieniowania rentgenowskiego w każdej zastosowanej dawce wpłynęło korzystnie na zwiększenie zawartości antocyjanów w powstałych siewkach barwy brunatno – brunatnej (od $34,84 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $93,19 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz zielono – zielonej (od $13,48 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $32,30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku do siewek kontrolnych, charakteryzujących się tą samą barwą (brunatno – brunatna: $9,61 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, zielono – zielona: $13,06 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Siewki o zabarwieniu brunatno – zielonym, powstałe z nasion napromieniowanych dawkami 15 Gy oraz 50 Gy miały większe stężenie antocyjanów (kolejno: $18,14 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $18,94 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku do kontroli o tej samej barwie. Jednakże inne siewki brunatno – zielone, poddane czynnikowi mutagennemu w dawce 20 Gy ($7,30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz 25 Gy posiadały niższe stężenie tego barwnika.

W przypadku karotenoidów i chlorofilu a, najwyższe stężenia barwników odnotowano dla siewki o barwie zielono – zielonej, uzyskanej w wyniku napromieniowania nasiona dawką wynoszącą 15 Gy (kolejno $53,53 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $85,82 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), a najmniej dla siewki kontrolnej barwy brunatno – brunatnej (kolejno: $3,09 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $3,80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Wszystkie siewki barwy zielono – zielonej, powstałe w wyniku napromieniowania nasion, posiadały wyższe stężenie karotenoidów (od $4,16 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $53,53 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku dla siewek kontrolnych ($3,77 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), charakteryzujących się tą samą barwą. Wszystkie siewki barwy brunatno – zielonej, powstałe w wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion uprzednio napromieniowanych wykazywały niższe stężenie karotenoidów w stosunku do kontroli posiadającej tę same zabarwienie ($16,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W przypadku chlorofilu a siewki barwy zielono – zielonej, poddane uprzednio działaniu promieniowania w dawkach 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy posiadały niższe jego stężenie (od $6,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $26,77 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku

do kontroli ($27,41 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Natomiast wszystkie siewki barwy brunatno – zielonej charakteryzowały się wyższym stężeniem chlorofilu a (od $11,03 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ do $21,74 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) w stosunku do siewki kontrolnej ($5,59 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Ostatniego ocenianego barwnika roślinnego – chlorofilu b, stwierdzono najwięcej w siewce barwy zielono – zielonej ($35,47 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), która powstała z nasiona napromieniowanego dawką 15 Gy, natomiast najmniej w próbie kontrolnej barwy brunatno – zielonej ($1,93 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Każda z siewek barwy brunatno – brunatnej (od $11,80 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ do $28,96 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) oraz brunatno – zielonej (od $3,52 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ do $6,59 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) posiadała wyższe stężenie chlorofilu b w stosunku do kontroli o tej samej barwie (kolejno: $2,12 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz $7,76 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). W przypadku barwy zielono – zielonej, tylko siewka, której nasiono uprzednio zostało poddane promieniowaniu X w dawce 20 Gy posiadała niższe stężenie chlorofilu b ($2,07 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) w stosunku do rośliny kontrolnej o tej samej barwie ($7,76 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$).

Tabela 3. Barwa siewki (wg katalogu RHSCC) oraz stężenie antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu a oraz b w przeliczeniu na 1 g świeżej masy siewki w zależności od dawki promieniowania X u *Uebelmannia pectinifera*.

Dawka promieniowania X [Gy]	Barwa siewki (wg RHSCC)	Stężenie barwników [$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$]			
		antocyjany	karotenoidy	chlorofil a	chlorofil b
0	164A – 164A	9,61 k*	3,09 l	3,80 l	2,12 k
	143 A,B - 143 A,B	13,06 f	3,77 l	27,41 e	7,76 h
	164A - 143 A,B	11,70 j	16,01 f	5,59 l	1,93 kl
15	164A – 164A	93,19 a	43,50 b	68,74 ab	27,40 b
	143 A,B - 143 A,B	24,00 f	53,53 a	85,82 a	35,47 ab
	164A - 143 A,B	18,14 h	8,69 h	14,28 h	4,13 j
20	164A – 164A	55,91 c	20,27 d	32,47 d	11,80 f
	143 A,B - 143 A,B	13,49 i	4,16 k	6,25 k	2,07 k
	164A - 143 A,B	7,30 l	6,83 j	11,03 j	3,52 j
25	164A – 164A	34,84 d	24,53 c	40,73 c	12,51 e
	143 A,B - 143 A,B	13,48 i	17,58 f	26,77 f	11,12 g
	164A - 143 A,B	5,00 l	7,26 i	11,22 i	3,83 j
50	164A – 164A	61,29 b	51,77 a	79,22 ab	28,96 b
	143 A,B - 143 A,B	32,30 e	19,80 e	23,64 g	18,62 d
	164A - 143 A,B	18,94 g	13,11 g	21,74 g	6,59 i

[barwa uzyskanych siewek: ■ - brunatno – brunatna, ■ - zielono – zielona ■ - brunatno – zielona;

■ - stężenie najwyższe; ■ - stężenie najniższe]

*dane w kolumnach oznaczone tymi samymi literami alfabetu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

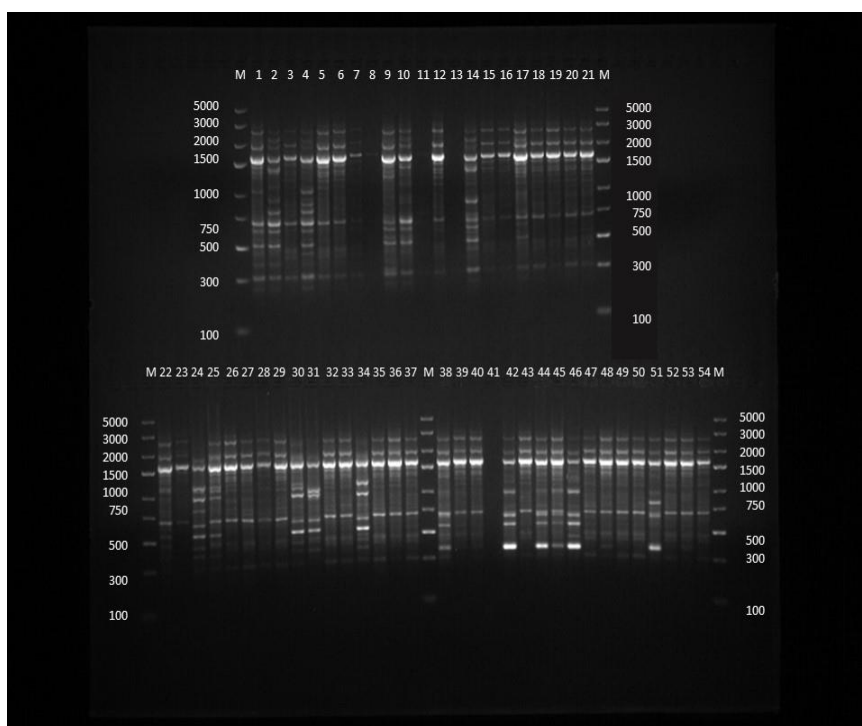
4.3. Analiza molekularna siewek kaktusów uzyskanych w warunkach *in vitro* z nasion poddanych działaniu promieniowania X.

Liczba uzyskanych produktów dla *Astrophytum spp.* 'Purple' wyniosła ogółem 1544, na jeden starter średnio wyniosła 220,57. Najwięcej produktów u *Astrophytum spp.* 'Purple' uzyskano dla startera S25, a najmniej dla S8. Zakres wielkości prążków wahał się od 353 do 4878 par zasad (Ryc. 1). Uzyskano maksymalnie 31 *loci* dla startera S25. Stwierdzono bardzo wysoki polimorfizm (od 59,09% dla startera S12 do 100% dla S3 i S8) w wyniku działania promieniowania X.

Dla *Copiapoa tenuissima* liczba produktów wyniosła łącznie dla wszystkich starterów 926. Na jeden starter średnio przypadło 132,28 produktu. Starter S13 generował najwięcej produktów, najmniej starter S8. Zakres wielkości prążków wahał się od 319 do 3733 par zasad. Największą liczbę *loci* (29) wygenerował starter S25. Polimorfizm wahał się od 53,33% dla startera S13 do 100% dla startera S8.

Dla *Uebelmannia pectinifera* uzyskano dla wszystkich starterów 1255 produktów, średnio 179,29 na jeden starter. Najwięcej produktów generował starter S12, najmniej S4. Zakres wielkości prążków wyniósł od 329 do 4312 par zasad. Największą liczbę *loci* wygenerował starter S33, najmniej S4. Najniższy polimorfizm wygenerował starter S13 (65%), najwyższy polimorfizm (100%) dały startery S3 i S8.

Wyniki analizy skupień UPGMA badanych genotypów u *Astrophytum spp.* 'Purple' pokazały, że największy dystans genetyczny wystąpił pomiędzy genotypem 11 (siewka kremowo-biała, która powstała w wyniku działania dawki 20 Gy promieniowania X), który utworzył odrębny klaster od pozostałych. W obrębie dwóch subklastrów odrębne skupienie utworzył genotyp nr 2 stanowiący siewkę o barwie zielonej nie poddanej działaniu promieniowania X (kontroli). Najmniejszy dystans genetyczny stwierdzono natomiast pomiędzy genotypem nr 7 (pomarańczowa) i 8 (czerwona) poddane działaniu promieniowania w dawce 15 Gy oraz nr 5 (siewka zielona) i 6 (siewka kremowo-biała) poddane działaniu promieniowania w dawce 15 Gy, a także pomiędzy genotypem nr 20 (pomarańczowa) i 21 (czerwona), które były poddane działaniu promieniowania w dawce 50 Gy.



Rycina 1. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S3: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum spp.* 'Purple', M marker wielkości; Dół: M - marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M - marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M- marker wielkości.

Analiza skupień u *Copiapoa tenuissima* wykazała 2 oddzielne klastry. W jednym skupione były genotypy 3 (siewka brunatna poddana działaniu promieniowania 15 Gy, 9 i 10 (odpowiednio siewka brunatna i zielona, dawka 25 Gy) oraz genotyp nr 13 (siewka brunatna poddana dawce 50 Gy), natomiast w drugim wszystkie pozostałe genotypy. Najmniejszy dystans genetyczny stwierdzono pomiędzy genotypami 11 i 12 poddanymi działaniu promieniowania X w dawce 25 Gy oraz pomiędzy genotypami 6 i 7 poddanymi dawce promieniowania X 20 Gy.

Analiza UPGMA dla *Uebelmannia pectinifera* wykazała bardzo duży dystans genetyczny pomiędzy genotypem 14 (siewka brunatno-zielona, uzyskana w wyniku ekspozycji na dawkę 50 Gy) a pozostałymi genotypami, przy czym genotyp nr 13 i 4 utworzył klastery, który rozgałęził się na kolejne subklastry, przy czym w jednym subklastrze genotyp 13 (siewka brunatno-brunatna, 50 Gy) tworzył odrębne odgałęzienie od genotypu 4 (siewka brunatno-brunatna, 15 Gy) i pozostałych genotypów.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Promieniowanie X wpłynęło na dynamikę kiełkowanie nasion u badanych gatunków kaktusów:

- u *Astrophytum spp.* 'Purple' promieniowanie X w dawce 15 i 20 Gy przyspieszyło początek kiełkowania nasion o 3-4 dni, w stosunku do nasion nienapromienionych (kontrolnych), nasiona napromienione wyższymi dawkami (25-50 Gy) kiełkowały o 1-2 dni później niż nasiona kontrolne. Najwięcej kiełkujących nasion uzyskano dla nasion niepoddanych działaniu promieniowania X (kontrolnych - 0 Gy), natomiast dawka promieniowania 50 Gy najbardziej wpłynęła na obniżenie liczby kiełkujących nasion w stosunku do kontroli (o 22,13 %) oraz pozostałych dawek promieniowania;
- u *Copiapoa tenuissima* dawka promieniowania 20 i 50 Gy przyspieszyła początek kiełkowania nasion o 1 dzień w stosunku do kontroli (0 Gy). Zaobserwowano wytworzenie się mniejszej liczby kiełkujących nasion napromienionych dawką 15 Gy oraz 20 Gy w stosunku do kontroli (0 Gy), natomiast wyższe dawki promieniowania

(25 i 50 Gy) dały większą liczbę kiełkujących nasion niż nasiona nienapromienione (kontrola 0 Gy). Najwięcej kiełkujących (wzrost o 15,87%) nasion uzyskano dla nasion napromienionych dawką 25 Gy w stosunku do nasion nienapromienionych (kontroli);

- u *Uebelmannia pectinifera* dawka 50 Gy przyspieszyła początek kiełkowania nasion o 1 dzień w stosunku do kontroli i pozostałych dawek promieniowania. Największą liczbę kiełkujących nasion uzyskano dla nasion, które napromieniono promieniowaniem X w dawce 20 Gy (o 17,28% więcej niż w kontroli). Dawki promieniowania 15 i 50 Gy także zwiększyły liczbę kiełkujących nasion, natomiast dawka 25 Gy obniżyła o 8,48% w stosunku do kontroli liczbę kiełkujących nasion.

2. Zastosowane na nasiona promieniowanie X wpłynęło na udział procentowy siewek bezchlorofilowych u *Astrophytum spp.* ‘Purple’ lub barwnych u *Copiapoa tenuissima* oraz zróżnicowane zabarwienie siewek u *Uebelmannia pectinifera*. Stwierdzono ponadto istotny wpływ promieniowania na parametry morfologiczne siewek u *Copiapoa tenuissima* i *Uebelmannia pectinifera*.

- u *Astrophytum spp.* ‘Purple’ udział procentowy siewek bezchlorofilowych rósł wraz z wielkością dawki promieniowania i był największy dla dawki 50 Gy. Zastosowanie promieniowania X spowodowało powstanie nowej barwy siewek (czerwonej), która dotąd nie była stwierdzona u *Astrophytum spp.* ‘Purple’;

- u *Copiapoa tenuissima* udział procentowy siewek barwnych rósł wraz z wielkością dawki promieniowania i był najwyższy dla dawki 50 Gy. Użycie dawki promieniowania 25 Gy oraz 50 Gy spowodowało uzyskanie nowej barwy siewek (pomarańczowo – brunatnej), która dotąd nie była stwierdzona u *Copiapoa tenuissima*; parametry morfologiczne siewek były najwyższe przy dawce 25 Gy, a najniższe przy 20 i 50 Gy.

- u *Uebelmannia pectinifera* wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X stwierdzono spadek liczby siewek barwy zielono – zielonej, natomiast wzrost liczby siewek barwy brunatno – zielonej; parametry morfologiczne siewek były najwyższe w kombinacji kontrolnej (0 Gy), a najniższe przy 15 Gy.

3. Stwierdzono istotny wpływ promieniowania X na barwę siewek oraz zróżnicowane stężenie barwników roślinnych w siewkach.

- u *Astrophytum spp.* 'Purple' wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X stwierdzono spadek stężenia barwników roślinnych, także w obrębie danej barwy. Wyjątkiem było promieniowanie w dawce 15 Gy, które wpłynęło na zwiększenie zawartości karotenoidów oraz chlorofilu a w siewkach barwy brunatnej. Zastosowanie promieniowania w dawce 50 Gy spowodowało uzyskanie najniższego stężenia antocyjanów, chlorofilu b oraz karotenoidów w siewkach barwy zielonej i chlorofilu a w siewkach barwy pomarańczowej. W siewkach kremowo-białych nie stwierdzono obecności antocyjanów i karotenoidów.

- u *Copiapoa tenuissima* wpływ promieniowania X był zróżnicowany i zależał od barwy siewek. Wraz ze wzrostem dawki promieniowania w siewkach brunatnych nastąpił wzrost stężenia karotenoidów, chlorofilu a i chlorofilu b w stosunku do kontroli, natomiast w siewkach zielonych nastąpił wzrost stężenia antocyjanów i chlorofilu b, a spadek karotenoidów i chlorofilu a.

- u *Uebelmannia pectinifera* stwierdzono bardzo pozytywny wpływ promieniowania X w dawce 15 Gy na stężenie wszystkich badanych barwników, we wszystkich barwach siewek w stosunku do kontroli. Pozostałe dawki promieniowania także wpłynęły pozytywnie na zwiększenie zawartości barwników roślinnych, z wyjątkiem dawki 25 Gy u siewek brunatno-zielonych, która istotnie wpłynęła na obniżenie w nich stężenia antocyjanów w stosunku do kontroli.

4. Stwierdzono istotny wpływ promieniowania X na zróżnicowanie genetyczne siewek badanych gatunków kaktusów przy pomocy markera SCoT.

- stwierdzono bardzo wysoki poziom polimorfizmu w siewkach poddanych działaniu promieniowania X: *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima*, *Uebelmannia pectinifera*;

- analiza UPGMA wykazała bardzo duży dystans genetyczny u badanych genotypów poddanych działaniu promieniowania X u wszystkich gatunków kaktusów.

5. Promieniowanie jonizujące może być wykorzystane w hodowli radiomutacyjnej do uzyskiwania nowych odmian kaktusów.

6. LITERATURA

1. Anderson E. F., 2001. The Cactus Family. Timber Press, Portland, OR, USA.
2. Botelho F. B. i in., 2015. Ornamental Plant Breeding. Ornamental Horticulture: 9-16.
3. Collard B.C.Y., Mackill D.J., 2009. Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants Plant Mol. Biol. Rep., 27: 86-93. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>.
4. Czekalski M., 2010. Ogólna uprawa roślin ozdobnych. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu; 3: 191-192.
5. Dada K. E., Animasaun D. A., Mustapha O. T., Bado S., Foster B. P., 2022. Radiosensitivity and biological effects of gamma and X-rays on germination and seedling vigour of three *Coffea arabica* varieties. Journal of Plant Growth Regulation; 42: 1582-1591.
6. Holme I.B., Gregersen P.L., Brinch-Pedersen H., 2019. Induced Genetic Variation in Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. Front Plant Sci. 10, 1468, doi:10.3389/fpls.2019.01468.
7. Jeong I. M., Cho H. C., Lee J. M., 2004. Production and breeding of cacti for grafting in Korea. Chronica Horticulturae; 44: 7-10.
8. Kulpa D., 2012. Somatyczna embriogeneza w kulturach chryzantemy wielokwiatowej (*Chrysanthemum* × *grandiflorum*) (Ramat.) Kitam.). Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Szczecin: ss: 7-76.
9. Kulus D., Tymoszek A., Jędrzejczyk I., Winiecki J., 2022. Gold nanoparticles and electromagnetic irradiation in tissue culture systems of bleeding heart: biochemical, physiological, and (cyto) genetic effects. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 149:715–734 <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02236-1>.
10. Lema-Rumińska J., Kulus D., 2014. Micropropagation of cacti – a review. *Haseltonia* 19: 46-63. DOI:10.2985/026.019.0107
11. Lema-Rumińska J., Licznarska I., 2004. Wpływ regulatorów wzrostu na regenerację kaktusa *Copiapoa tenuissima* Ritt f. *monstruosa* z eksplantatów merystematycznych. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 236 (94): 109-114.
12. Lema-Rumińska J., Zalewska M., 2004. Studies on flower pigments of chrysanthemum mutants: Nero and Wonder groups. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*; 3(1): 125-135.
13. Licznarski P., Lema-Rumińska J., 2021a. Kierunki i metody hodowli kaktusów z rodzaju *Astrophytum*. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze - fauna i flora. Część II*; 85-93.
14. Licznarski P., Lema-Rumińska J., 2021b. Charakterystyka rodzaju *Astrophytum*. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze - fauna i flora. Część II*; 85-93.
15. Miler N., Jędrzejczyk I., Jakubowski S., Winiecki J., 2021. Ovaries of *Chrysanthemum* Irradiated with High-Energy Photons and High-Energy Electrons Can Regenerate Plants with Novel Traits. *Agronomy* 11: 1111. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061111>.

16. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
17. Nasri F., Zakizadeh H., Vafae Y., Mozafari A.A., 2021. In vitro mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 149: 657-673. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02163-7>.
18. Nyffeler R., Eggli U. 1997. Comparative Stem Anatomy and Systematics of *Eriosyce sensu lato* (Cactaceae). *Ann. Bot.*; 80: 767-786.
19. Santos-Diaz M.S., Mendez-Ontiveros R., Arredondo-Gomez A. 2003. In vitro organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plants*; 39: 480-484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.047
20. Schum A., 2003. Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method? *Acta Hort.* 612: 47-60.
21. Tymoszek A., 2015. Hodowla chryzantemy wielkokwiatowej na drodze mutagenyzy indukowanej promieniowaniem X i gamma. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*; 582: 101-113.
22. Tymoszek A., Kulus D., 2020. Silver nanoparticles induce genetic, biochemical, and phenotype variation in chrysanthemum. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 143:331–344. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01920-4>.

NETOGRAFIA:

1. GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc