

BOŻENA PAWŁOWSKA, BOŻENA SZEWCZYK-TARANEK

## AKTYWNOŚĆ FOTOSYNTETYCZNA PRZYLASZCZKI POSPOLITEJ (*HEPATIC A NOBILIS* SCHREB.) ROZMNAŻANEJ W KULTURACH *IN VITRO*

Z Katedry Roślin Ozdobnych  
Akademii Rolniczej im. Hugona Kollątaja w Krakowie

ABSTRACT. Adaptation rate of hepatica propagated by *in vitro* organogenesis and rooting was 65%. Studies with the use of Mini PAM fluorometer showed low photosynthetic activity of hepatica leaves in *in vitro* cultures, but it increased after several weeks of acclimatization in newly developed leaves.

**Key words:** *Hepatica nobilis*, *in vitro*, chlorophyll fluorescence, mini PAM 2000

### Wstęp

Przylaszczka pospolita (*Hepatica nobilis* Schreb.) jest wartościową byliną ze względu na wczesne kwitnienie, dekoracyjne ulistnienie, wyjątkową cienioznośność i długowieczność oraz tolerancję na niekorzystne warunki środowiska (Pindel 1998). Przylaszczka występuje w poszyciu lasów liściastych klimatu umiarkowanego półkuli północnej, a masowe jej pozyskiwanie ze stanowisk naturalnych w Polsce spowodowało, że od 2004 roku jest objęta całkowitą ochroną gatunkową (Piękoś-Mirkowa i Mirek 2006). Przylaszczka wciąż pozostaje byliną niszową, a główną przeszkodą w jej rozpowszechnieniu są trudności w rozmnażaniu, dlatego rzadko znajduje się w asortymencie szkółek ogrodniczych. Jednym ze sposobów zwiększenia wydajności procesu rozmnażania przylaszczki pospolitej jest zastosowanie techniki *in vitro*. Uważa się, że bez względu na zastosowaną metodę regeneracji, w kulturach *in vitro* otrzymane rośliny nie funkcjonują prawidłowo, głównie z dwóch powodów: niskiej fotosyntezy i zaburzeń w bilansie wodnym. Po wyjęciu ze szkła aktywność fotosyntetyczna roślin jest mała, co jest przyczyną ich słabej przeżywalności (Borkowska 2001, 2003). Metoda pomiaru fluorescencji chlorofilu jest istotną i nieinwazyjną techniką do określenia funkcjonowania fotosyntezy w roślinach. Badania liści adaptowanych do ciemności, prowadzone za pomocą aparatu PAM, pozwalają wyznaczyć różne parametry, które charakteryzują poszczególne etapy fotosyntezy (Lindqvist i Asp 2002).

Rocz. AR Pozn. CCCLXXXIII, Ogrodn. 41: 153-158

© Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań 2007

PL ISSN 0137-1738

Celem badań było określenie wpływu kultur *in vitro* na wydajność fotosyntetyczną przylaszczki pospolitej rozmnażanej drogą organogenezy.

## Material i metody

### Inicjacja, namnażanie i ukorzenianie

Do zapoczątkowania kultur *in vitro* przylaszczki pospolitej (*Hepatica nobilis* Schreb.) użyto pąków rozetowych, pochodzących z roślin rosnących na stanowisku naturalnym – z lasu liściastego położonego w Tenczynku koło Krakowa, na terenie Jury Krakowsko-Częstochowskiej. Pąki pobrano w czerwcu 2002 roku i poddano je dezynfekcji powierzchniowej w 0,1-procentowym roztworze sublimatu ( $\text{HgCl}_2$ ) przez 5 minut. Eksplantaty wykładano na pożywkę stałą o składzie podstawowym według **Murashige** i **Skooga** (1962), wzbogaconą w  $5 \mu\text{M}$  BA i  $0,5 \mu\text{M}$  NAA, o pH 5,8. Kultury przylaszczki umieszczano w fitotronie w temperaturze  $20^\circ\text{C}$ , wilgotności względnej powietrza 80%, przy 16-godzinnym dniu i natężeniu napromieniowania PPF  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pąki boczne uzyskane na etapie inicjacji kultur namnażano w cyklu 6-tygodniowym na pożywce MS zawierającej – podobnie jak na etapie inicjacji kultur –  $5 \mu\text{M}$  BA i  $0,5 \mu\text{M}$  NAA, o pH 5,8. Ukorzenianie pędów przylaszczki było poprzedzone ich chłodzeniem w temperaturze  $5^\circ\text{C}$  przez 10 tygodni, prowadzonym przez sześć tygodni w kulturach *in vitro* na pożywce MS zawierającej  $10 \mu\text{M}$  NAA (**Szewczyk i Pindel** 2004).

### Aklimatyzacja

Ukorzenione pędy przylaszczki pospolitej, kultywowane *in vitro* przez dwa lata, w grudniu 2004 roku wysadzono do skrzynek plastikowych wypełnionych substratem torfowym Klassmann TS1 i umieszczono w szklarni w temperaturze  $25/20^\circ\text{C}$ , na początku w wysokiej wilgotności względnej powietrza 85%. Po 12 tygodniach aklimatyzacji rośliny przesadzono do doniczek  $6 \times 6 \times 7$  cm wypełnionych substratem Klassmann TS2 i pozostawiono na kolejne 12 tygodni w szklarni, utrzymując podobną temperaturę. Wiosną pojemniki z roślinami wystawiono na poletkę doświadczalną Katedry Roślin Ozdobnych i uprawiano je przez dwa lata.

### Badania fluorescencji chlorofilu

Analizy wykonano na fluorometrze Photosynthesis Field Analyzer MINI PAM 2000 Portable Chlorophyll Fluorometer firmy WALZ GmbH Germany, za pomocą programu komputerowego WinControl Software for PAM Fluorometers (WALZ Germany). Do badań użyto liści pochodzących z różnych roślin:

- 1) rosnących *in vitro* przez dwa lata na pożywce namnażającej wzbogaconej w  $5 \mu\text{M}$  BA i  $0,5 \mu\text{M}$  NAA,
- 2) rozmnażanych *in vitro*, po 12 tygodniach aklimatyzacji (skrzynki),
- 3) rozmnażanych *in vitro*, po 24 tygodniach od wysadzenia do ziemi (12 tygodni w skrzynkach i 12 tygodni w doniczkach),

4) rozmnażanych *in vitro*, po pełnym okresie wegetacyjnym *ex vitro* w kolekcji Katedry Roślin Ozdobnych,

5) kontrolnych, pozyskanych ze stanowiska naturalnego w Tenczynku w 2002 roku i uprawianych w kolekcji Katedry Roślin Ozdobnych.

Do oznaczenia fluorescencji chlorofilu wybrano losowo po pięć roślin z każdej badanej grupy. Pomiar przeprowadzono na górnej stronie blaszki liściowej za pomocą urządzenia zaciemniającego 'dark leaf clip', przymocowanego do liści 20 minut przed rozpoczęciem pomiaru. Fluorescencję zmierzono przez optyczną wiązkę światłowodową, której koniec zbliżano do powierzchni liścia. Aby określić  $F_v/F_m$ , impuls wysycający światła wyemitowano 10 sekund po rozpoczęciu ekspozycji liścia na światło pomiarowe. Wykreślono krzywe adaptacji do światła po 20-minutowym zaciemnieniu obiektów (co pozwoliło ustalić następujące parametry  $F_v/F_m$ ,  $F_m$ , ETR).

## Wyniki i dyskusja

### Inicjacja, namnażanie i ukorzenie

Zastosowana metoda odkażania pąków rozetowych okazała się skuteczna w 90%, a 59% odkażonych eksplantatów regenerowało, rozwijając pąki boczne. Współczynnik namnażania pąków bocznych na pożywce MS zawierającej 5  $\mu\text{M}$  BA i 0,5  $\mu\text{M}$  NAA wynosił 6,5 na jeden regenerujący eksplantat, w cyklu sześciotygodniowym. Uzyskane pędy przylaszczki chłodzono w temperaturze 5°C przez 10 tygodni, a następnie umieszczano na pożywce MS wzbogaconej w 10  $\mu\text{M}$  NAA. Po sześciu tygodniach uzyskano 60% ukorzenionych roślin.

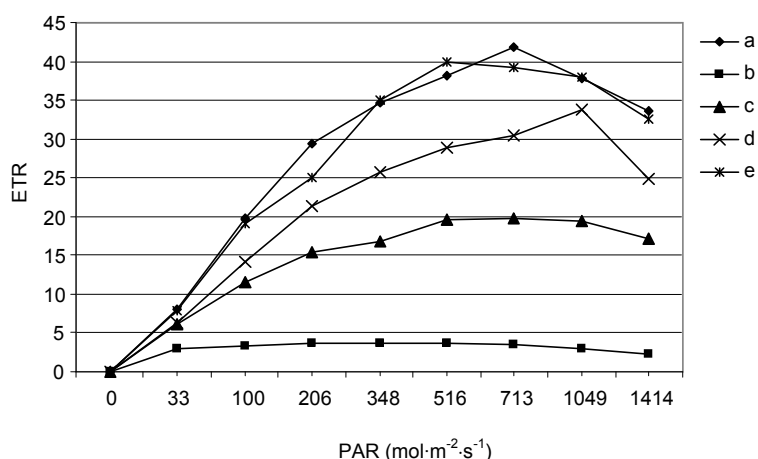
### Aklimatyzacja

65% ukorzenionych pędów przylaszczki pospolitej wysadzonych do skrzynek wypełnionych substratem torfowym przyjęło się w czasie aklimatyzacji w szklarni. W pierwszych czterech tygodniach adaptacji liście wykształcone w kulturach *in vitro* zamierały, a jedna przyjęta roślina wykształciła średnio od dwóch do trzech nowych liści właściwych. Po 12 tygodniach aklimatyzacji jedna roślina wytworzyła średnio około 3,5 korzenia, o średniej długości 38 mm. Następnie rośliny były uprawiane w doniczkach i w pierwszym roku przetrzymały w 78%. Na wiosnę wytworzyły średnio 4,7 liścia właściwego o długości 67 mm. W kolejnym sezonie wegetacyjnym wszystkie przylaszczki przetrzymały i na wiosnę zakwitły.

### Badania fluorescencji chlorofilu

Według Borkowskiej (2003) fotosynteza zachodzi w kulturach *in vitro*, a jej znaczenie może być bardzo duże. Krzywe adaptacji liści do światła w mierzonym zakresie PAR (0-1414  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , odpowiadające promieniowaniu w zakresie 400-700 nm), wykreślone w trakcie prowadzenia analiz na fluorometrze Mini PAM, pozwoliły ustalić, że przylaszczka rosnąca w kulturach *in vitro* jest aktywna fotosyntetycznie. Krzywe

ETR (współczynnik fotosyntetycznego transportu elektronów) charakteryzują przebieg fotosyntezy w liściach badanych roślin (ryc. 1). Krzywe wskazują na bardzo małą aktywność fotosyntetyczną liści *in vitro* (max ETR 3,6) w porównaniu z liśćmi roślin pochodzących ze stanowiska naturalnego (max ETR 41,9). Wraz z wydłużaniem się czasu aklimatyzacji aktywność fotosyntetyczna liści przylaszczki wzrastała i po roku uprawy *ex vitro* osiągnęła poziom zbliżony do charakterystycznego dla roślin ze stanowiska naturalnego (ryc. 1). Przebieg krzywych ETR wskazuje na stosunkowo niski potencjał fotosyntetyczny przylaszczki. Przylaszczka dobrze toleruje zacienienie, w przeciwieństwie do roślin światłolubnych, ma też mały współczynnik wzrostu i wolniejszy metabolizm (Grime 1965).



Ryc. 1. Przebieg krzywych ETR, wyznaczonych na fluorometrze MINI PAM 2000, w liściach przylaszczki pospolitej (*Hepatica nobilis* Schleb) po adaptacji do światła, pochodzących z rośliny: a) ze stanowiska naturalnego (kontrola), b) rosnących *in vitro*, c-e) rozmnażanych *in vitro* po aklimatyzacji: 12 tygodni (c), 24 tygodnie (d), rok (e)

Fig. 1. ETR curves obtained with the use of MINI PAM 2000 fluorometer in hepatica (*Hepatica nobilis* Schleb) leaves after adaptation to light, derived from plants: a) growing in open air (control), b) cultured *in vitro*, c-e) cultured *in vitro* after acclimatization: 12 weeks (c), 24 weeks (d), one year (e)

Wydajność fotosystemu PS II, mierzona po całkowitym zaciemnieniu liścia, określająca maksymalną aktywność fotochemiczną jest wyrażana parametrem  $F_v/F_m$ . Bjorkman i Demmig (1987) określają optymalny poziom wskaźnika fluorescencji  $F_v/F_m$  na poziomie nie niższym niż 0,83 dla większości roślin naczyniowych. W liściach przylaszczek kultywowanych *in vitro* wartość wskaźnika fluorescencji wynosiła 0,740, natomiast mierzona na powstałych w czasie aklimatyzacji liściach zbliżała się do poziomu optymalnego; po 24 tygodniach aklimatyzacji zanotowano  $F_v/F_m$  0,822 (tab. 1). Wartości poniżej 0,830 wskazują na uszkodzenie centrów reakcji PS II, czyli fotoinhibicję, obserwowaną często u roślin w warunkach stresowych (Maxwell i Johnson 2000, Johnson i in. 1999). Maksymalna wartość fluorescencji badanych liści ( $F_m$ ) kształtowała się na poziomie od 1195 u roślin ze stanowiska naturalnego do 2284 u roślin w warunkach *in vitro*.

**Tabela 1**

**Średnia wartość parametrów  $F_v/F_m$  oraz  $F_m$  w badanych liściach przylaszczki pospolitej**  
**Mean values of  $F_v/F_m$  and  $F_m$  parameters in examined leaves of *Hepatica nobilis***

Pochodzenie liści Leaf origin	Parametry fluorescencji Fluorescence parameters	
	$F_v/F_m$	$F_m$
Kontrola – stanowisko naturalne Control – natural habitat	0,831	1195
Kultury <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> cultures	0,740	2 284
12 tygodni aklimatyzacji z kultur <i>in vitro</i> 12 weeks of acclimatization from <i>in vitro</i> cultures	0,816	1 356
24 tygodnie aklimatyzacji z kultur <i>in vitro</i> 24 weeks of acclimatization from <i>in vitro</i> cultures	0,822	1 624
Po roku uprawy, z kultur <i>in vitro</i> After one year in the field from <i>in vitro</i> cultures	0,832	1 213

### Wnioski

1. Przebieg krzywych ETR wskazuje na niski potencjał fotosyntetyczny przylaszczki
2. *Hepatica nobilis* rozmnażana *in vitro* charakteryzuje się małą aktywnością fotosyntetyczną.
3. Podczas adaptacji do warunków *ex vitro* aktywność fotosyntetyczna stopniowo wzrasta, a liście wykształcone w czasie aklimatyzacji mają zbliżony do roślin *in situ* poziom wskaźnika  $F_v/F_m$  po upływie roku.

### Literatura

- Bjorkman O., Demmig B.** (1987): Proton field of CO<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence at 77K among vascular plants do diverse origin. *Planta* 170: 489-504.
- Borkowska B.** (2001): Fizjologiczna ocena roślin z kultur *in vitro*. *Biotechnology* 2, 53: 133-138.
- Borkowska B.** (2003): Fotosynteza jako marker fizjologiczny jakości kultur pędowych i otrzymanych roślin. *Biotechnology* 3, 62: 30-38.
- Grime J.P.** (1965): Shade tolerance in flowering plants. *Nature* 9: 161-163.
- Johnson G.N., Young A.J., Scholes J.D., Horton P.** (1999). The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Environ.* 16: 673-690.
- Lindqvist H., Asp H.** (2002): Effects of lifting date and storage time on changes in carbohydrate content and photosynthetic efficiency in three deciduous species. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 77, 3: 346-354.
- Maxwell K., Johnson G.N.** (2000): Chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 19: 29-85.

- Murashige T., Skoog F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Piękoś-Mirkowa H., Mirek Z.** (2006): *Flora Polski. Rośliny chronione.* Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa.
- Pindel Z.** (1998): Warunki glebowe i świetlne stanowisk naturalnego występowania przylaszczki pospolitej (*Hepatica nobilis* Schreb.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 461: 349-356.
- Szewczyk B., Pindel Z.** (2004): Wpływ chłodzenia eksplanatów przylaszczki pospolitej (*Hepatica nobilis* Schreb.) na wzrost w warunkach *in vitro*. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 236, Agric. 94: 217-222.

PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF HEPATICA (*HEPATICA NOBILIS* SCHREB.)  
PROPAGATED *IN VITRO*

S u m m a r y

*Hepatica* micropropagation *in vitro* on MS medium supplemented with 5  $\mu$ M BA and 0,5  $\mu$ M NAA allowed to obtain high propagation rate of lateral buds (6.5 buds/explant per 3-week cycle). Plants were chilled before rooting at 4°C and placed on MS medium containing 10  $\mu$ M NAA. Plants established after 15-week acclimatization in a greenhouse (65%) were planted in pots; 75% of plants survived. Measurement of chlorophyll fluorescence in hepatica leaves using Mini PAM fluorometer (Walz, Germany) demonstrated low photosynthetic activity of hepatica cultured *in vitro*, but this activity rose in successive weeks of acclimatization.