



Fizjologiczna ocena roślin z kultur *in vitro*

Bożena Borkowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Physiological evaluation of *in vitro* originated plants

Summary

The aim of the present work was to evaluate the morphological and physiological status of strawberry shoots (cv. Senga Sengana) cultivated *in vitro* and their subsequent (out of glass vessels) ability to form plantlets with developed autotrophic metabolism. Standard medium recommended by Boxus was supplemented with glucose or sucrose 30 g/l. Biomass production and particular shoot formation were more efficient in the presence of glucose. The capacity of the shoots to form the root system and to develop photosynthetic activity was higher for shoots taken from the glucose-medium than the sucrose containing medium.

Key words:

strawberry, micropropagation, glucose, chlorophyll fluorescence acclimatization.

1. Wstęp

Pojęcie kultury *in vitro* lub kultury tkankowe obejmuje bardzo różne układy biologiczne, od kultur protoplastów czy komórek przez kultury kalusa aż po kultury organów. Rośliny można otrzymywać na drodze embriogenezy, organogenezy czy mikro-rozmnażania. Bez względu na metodę regeneracji, otrzymane rośliny po przeniesieniu do środowiska naturalnego powinny „funkcjonować” tak samo jak rośliny otrzymywane tradycyjnymi metodami rozmnażania (z nasion, sadzonkowania itd.). Uważa się, że rośliny otrzymywane metodą mikro-rozmnażania nie funkcjonują prawidłowo głównie z dwóch powodów: niskiej fotosyntezy i zaburzeń w bilansie wodnym. Rośliny jak również organy

Adres do korespondencji

Bożena Borkowska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

2 (53) 133–138 2001

i tkanki wykazują w kulturach *in vitro* metabolizm heterotroficzny lub mieszany z niewielkim udziałem autotroficznego. Po wyjęciu ze szkła aktywność fotosyntetyczna roślin jest w dalszym ciągu niska, co często jest przyczyną ich słabej przeżywalności.

Prowadzi się wiele doświadczeń nad procesami przystosowawczymi roślin pochodzących z kultur *in vitro*. Głównym celem tych badań jest określenie warunków, które zmniejszyłyby natężenie stresu i „wyzwoliły” procesy adaptacyjne roślin. Obecnie istnieje wiele technik umożliwiających ocenę stanu fizjologicznego roślin, posiadających bardzo małe pędy, liście i korzenie. Davies (1) podaje, że do określania stanu fizjologicznego roślin z kultur *in vitro* stosowane są mikrosondy za pomocą których można oceniać w poszczególnych komórkach status wodny i charakteryzować roztwory komórkowe oraz właściwości ścian komórkowych. Istnieją także metody oceny aktywności enzymów związanych ze ścianami komórkowymi. Morfologiczna ocena roślin (wzrost i budowa części zielonej i korzeni) może być prowadzona z „oddali” za pomocą kamer wideo. Technika wideo może mieć również zastosowanie do oceny funkcjonowania aparatów szparkowych, a zatem pośrednio do oceny transpiracji i fotosyntezy.

Aktywność fotosyntetyczną można oceniać zarówno sprawnością funkcjonowania fotosystemów (ocena fazy „jasnej” fotosyntezy) jak i na podstawie wymiany gazowej (faza „ciemniowa” fotosyntezy). Metodę pomiaru kinetyki indukcji fluorescencji chlorofilu *a* stosuje się zarówno do określenia stopnia wykształcenia jak i funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. Metoda ta pozwala na badanie w nie uszkodzonych liściach różnych aspektów fotosyntezy od przenoszenia energii wzbudzenia w skali pikosekundowej (jasna faza fotosyntezy) do wiązania CO₂, w minutach (ciemna faza fotosyntezy).

Jako miarę sprawności fotochemicznej PSII przyjmuje się stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej (Fv/Fm), zwany także wskaźnikiem inhibicji centrum PSII. Parametr ten odzwierciedla wydajność wykorzystania światła w pierwotnych reakcjach fotosyntezy. Przyjmuje się za Bjorkmanem i Demmingiem (2), że wartość Fv/Fm wynosząca 0,832 (częściej przyjmuje się wartość 0,800 jako graniczną) jest typowa dla zdrowych liści wielu gatunków roślin przebywających w warunkach nie stresowych. Niższa wartość tego parametru świadczy o obniżeniu sprawności fotochemicznej PSII lub niepełnym wykształceniu centrum fotochemicznego (3-5). Czulym wskaźnikiem oceny fotosyntezy jest Sc (*area*) (6). Sc jest wskaźnikiem zwartości nie zredukowanych akceptorów elektronów i wskazuje na zdolność przekazywania energii pomiędzy PSII i PSI. Wreszcie na podstawie dwóch innych wskaźników (Fs i Rfd) można wnioskować o sprawności funkcjonowania enzymatycznej (ciemniowej) fazy fotosyntezy. Fs (*steady state*) odczytywany jest na końcu fazy świetlnej fotosyntezy (wartość stała po całkowitym wygaszeniu). Wzrost Fs świadczy o inhibicji PSII spowodowanej nieodbieraniem energii do reakcji enzymatycznych. Rfd jest to tzw. współczynnik witalności (7). Określa on współdziałanie fazy świetlnej fotosyntezy z ciemniową. Wzrastająca wartość Rfd (skorelowana z niską wartością Fs) świadczy o prawidłowym przebiegu procesów enzymatycznych.

Sprawność przechodzenia roślin z metabolizmu heterotroficznego dominującego w kulturach *in vitro* do autotroficznego jest związana z warunkami ostatniego pasażu w szkle i następnie z warunkami w czasie aklimatyzacji. Badania prowadzone w Zakładzie Fizjologii i Biochemii ISK dotyczą warunków ostatniego pasażu przed ukorzeniem (głównie cukrów dodawanych do pożywki); warunków ukorzenia (z przechodzeniem do ukorzenia poza szkłem); oraz procesu aklimatyzacji (włączając mikoryzę).

W pracy przedstawiono wyniki dotyczące roli cukrów w ostatnim pasażu namnożeniowym pędów truskawek w ukorzeniu *ex vitro*, wzroście roślin i aktywności fotosyntetycznej liści, które były wytworzone jeszcze w szkle (w czasie ostatniego pasażu namnożeniowego) oraz liści wytwarzanych poza szkłem (w czasie kontynuowania wzrostu).

2. Materiały i metody

Kultury truskawek odm. Senga Sengana (*Fragaria x ananassa* Duch.) były zakładane i prowadzone wg metody opracowanej przez Boxusa (8) i zmodyfikowanej przez nas obniżeniem stężenia BA (0,5 mg/l) i IBA (0,1 mg/l). Kultury przebywały w kamerze fitotronowej w temp. 23°C i przy gęstości strumienia fotosyntetycznych fotonów (PPFD) 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Źródłem światła były lampy fluorescencyjne (Philips) emitujące światło białe – ciepłe w fotoperiodzie 16/8 godz (dzień/noc). Pędy do ukorzenia brano były z 7-10 pasażu (licząc od założenia kultur).

W ostatnim pasażu namnożeniowym (z którego pędy były pobierane do ukorzenia) w miejsce glukozy 40 g/l (polecanej w standardowej metodzie Boxusa) dodawana była sacharoza lub glukoza, w stężeniu 30 g/l. Ukorzenie wykonywane było *ex vitro* zgodnie z metodą opisaną w pracy Borkowska i in. (9).

Ocenę wzrostu roślin pochodzących z pożywki z glukozą lub sacharozą przeprowadzono po 4 tygodniach ukorzenia w multiplatach (bezpośrednio przed wysadzeniem do doniczek) i po raz drugi po 4 tygodniach wzrostu w doniczkach, w szklarni.

Fluorescencja chlorofilu mierzona była fluorymetrem typu PEA (Hansatech, Anglia). Liście zaciemniane były przez 20 min, po czym włączano lampę emitującą światło o długości fali 650 nm. Maksymalna intensywność napromieniowania na powierzchni liścia wynosiła 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i oświetlenie trwało 2 min. Pierwsze pomiary fluorescencji wykonane były przed ukorzeniem (koniec ostatniego pasażu namnożeniowego); drugi pomiar – po 4 tygodniach ukorzenia w multiplatach (przed sadzeniem do doniczek).

Wyniki opracowane były statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic określana była testem Duncana przy poziomie wiarygodności 0,05.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Ocena morfologiczna

Tworzenie biomasy i formowanie poszczególnych pędów w kulturach *in vitro* było zależne od rodzaju cukru w pożywce. W obecności glukozy biomasa kultur, także liczba pędów nadających się do ukorzenia była istotnie większa niż w obecności sacharozy dodanej do pożywki (tab. 1). Na podstawie wcześniejszych wyników (10) wskazano, że różnice we wzroście kultur są związane z inną dynamiką wykorzystania glukozy i sacharozy. Glukoza dodana do pożywki jest wykorzystywana od pierwszych dni pasażu, podczas gdy sacharoza musi najpierw być zhydrolizowana. W rezultacie pod koniec pasażu, w pożywce zostaje niewiele cukru jeżeli był dodany w formie glukozy natomiast jeżeli źródłem węgla była sacharoza pożywka ciągle jest bogata w cukier (prawie wyłącznie w formie glukozy po hydrolizie sacharozy).

Tabela 1

Charakterystyka kultur truskawki odm. Senga Sengana rosnących na pożywce wg Boxusa zawierającej glukozę (30 g/l) lub sacharozę (30 g/l), po pełnym pasażu namnożeńiowym

Parametry	Cukier dodany do pożywki	
	glukoza	sacharoza
liście – świeża masa (mg)	520 b	311 a
liście – sztuki	22,5 b	4,3 a
ogonki liściowe > 1cm (szt/kolbkę)	84,8 b	39,6 a

Proces ukorzenia i wzrost ukorzenionych roślin był istotnie lepszy, gdy pędy (sadzunki) pochodziły z pożywki z glukozą. Różnice były szczególnie widoczne w systemie korzeniowym (tab. 2). Stosunek liści do korzeni był korzystniejszy dla roślin otrzymanych z pędów (sadzunek) z pożywki z glukozą. Dobrze rozwinięty system korzeniowy jest niezbędny nie tylko do zaopatrywania rośliny w wodę i składniki pokarmowe, ale także do „odbioru” asymilatów.

Tabela 2

Porównanie roślin odm. Senga Sengana otrzymanych z pędów (sadzunek) pochodzących z kultur *in vitro*, w których źródłem węgla była glukoza lub sacharoza

Stadium rozwoju	Cukier w pożywce przed ukorzeniem	Koronka – sucha masa (mg)	Korzenie – sucha masa (mg)	Stosunek liści : korzeni (s.m.)
koniec ukorzenia	glukoza	23,6 a	7,03 b	4,10 a
	sacharoza	20,9 a	5,33 a	4,91 a
4 tygodnie wzrostu w doniczkach	glukoza	150,1 a	30,81 b	4,78 a
	sacharoza	151,2 a	23,18 a	6,33 b

3.2. Ocena aktywności fotosyntetycznej

Bezdiskusyjna jest rola cukrów w pożywce w czasie prowadzenia pasażu namnożeniowych. Ze względu na brak prawidłowej fotosyntezy dodany cukier jest jedynym (lub głównym) źródłem węgla. Zróżnicowane są natomiast poglądy na temat roli cukrów w czasie ostatniego pasażu przed wyjęciem roślin/pędów ze szkła. Wielu autorów uważa, że bardzo ważne dla przyszłej aktywności fotosyntetycznej roślin jest obniżenie zawartości cukru w pożywce w czasie ostatniego pasażu (11-14). Rośliny/organy mogąc skorzystać z gotowego źródła węgla „nie czują potrzeby” uruchamiania fotosyntezy. Istnieją także poglądy przeciwnie, że rozwój aparatu fotosyntetycznego jest niezależny od obecności cukru w pożywce (15,16). Zwolennicy tej teorii uważają, że cukry pobrane z pożywki są gromadzone w tkance i stanowią „zapas” węgla, który umożliwia prawidłowe funkcjonowanie roślin zanim rozpocznie się proces fotosyntezy.

Czynnikiem, który może regulować aktywność fotosyntetyczną jest także budowa roślin. Fotosynteza może mieć prawidłowy przebieg tylko wtedy kiedy jej produkty są stale zużytkowywane. Dla młodych roślin, które „składają się” wyłącznie z liści i systemu korzeniowego – korzenie są głównym odbiorcą asymilatów. Powstaje zatem pytanie czy opisane różnice w budowie morfologicznej mogły mieć wpływ na aktywność fotosyntetyczną rosnących roślin?

Niższa wartość parametru F_v/F_m dla liści z pożywki w której źródłem węgla była sacharoza wskazuje, że pod koniec ostatniego pasażu namnożeniowego funkcjonowanie PSII było nieco gorsze niż w liściach hodowanych w obecności glukozy. Ważne jest jednak, że w czasie ukorzeniania, kiedy nowe liście dopiero zaczynały powstawać, w liściach pochodzących z kultur *in vitro* aktywność PSII była ciągle prawidłowa (tab. 3). Wartość parametru S_c , istotnie większa dla liści pochodzących z kultur rosnących w obecności glukozy, świadczyła również o przewadze fotosyntetycznej tej grupy kultur. W czasie ukorzeniania, wartość S_c dla liści wytworzonych jeszcze w czasie „życia w szkle” wzrastała i była wyższa niż dla liści dopiero wyrastających (tab. 3). Wyższa wartość parametru F_s i niższa R_{fd} dla liści pochodzących z kultur w których źródłem węgla była sacharoza wskazuje, że także procesy enzymatyczne (ciemniowa część fotosyntezy) przebiegają gorzej niż w liściach z kultur rosnących na glukozie.

Wartość wybranych parametrów fluorescencji chlorofilu

Stadium rozwoju	Cukier w pożywce (przed ukor- zeniem)	Parametry fluorescencji							
		Fv/Fm		Sc		Fs		Rfd	
		liście utworzone							
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i> *	<i>in vivo</i> **	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
przed ukorzeniem***	glukoza	0,836 a		436 b		1041 a		1,37 b	
	sacharoza	0,809 a		244 a		1204 a		1,03 a	
koniec ukorzenia	glukoza	0,831 a	0,814 a	683 b	440 a	997 a	721 a	1,83 a	2,16 a
	sacharoza	0,829 a	0,824 a	560 a	430 a	1010 a	771 a	1,77 a	2,26 a

* w czasie ostatniego pasażu namnożeniowego, przed wyjęciem pędów do ukorzenia *ex vitro*,

** w czasie ukorzenia *ex vitro*,

*** koniec ostatniego pasażu.

4. Wnioski

Aktywność fotosyntetyczna może być modyfikowana także przez skład mineralny pożywki. Tendencje zostają jednak zachowane te same. Kultury truskawek rosące na pożywce z glukozą wykazują lepsze funkcjonowanie procesów fotosyntetycznych.

Doświadczenia były prowadzone w ramach akcji COST 836 i były częściowo finansowane przez KBN.

Literatura

- Davies W. J., (1999), Symp. Methods and Markers for Quality Assurance in Micropropagation, 24-27 August, Cork, Ireland.
- Bjorkman O., Demming B., (1987), *Planta*, 170, 489-504.
- Triques K., Rival A., Beule T., Puard M., Roy J., Nato A., Lavergne D., Havaux M., Verdeil J-L., Sangare A., Hamon S., (1997), *Plant Sci.*, 127, 39-51.
- Rival A., Beule T., Lavergne D., Nato A., Havaux M., Puard M., (1977), *J. Plant Physiol.*, 150, 520-527.
- Murkowski A., Wróblewski T., Burza W., Skórska E., (1999), *Horticultural Sci.*, 5 (1-2), 50-52.
- Murkowski A., Skórska E., (1997), *Current Topics in Biophysics*, 21 (1), 72-78.
- Lichtenthaler H. K., Buschmann C., Rinderle U., Schmuck G., (1986), *Radiation and Environmental Biophysics*, 25, 297-308.
- Boxus Ph., (1992), *Transplant Production Systems*, Eds. Kurata K., Kozai T., 151-162, Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Borkowska B., Szczygieł A., Pierzga K., (1999), *J. Fruit, Ornamental Plant Res.*, 7 (1), 1-10.
- Borkowska B., (2000), *Acta Hort.*, 530, 333-338.
- Wainwright H., Scrase J., (1989), *Scientia Hort.*, 38, 261-267.
- Welander M., Welander N. T., Brackmann A. S., (1989), *J. Hort. Sci.*, 64, 361-366.
- Watanabe K., Watanabe N. T., Shimada N., (1990), *Plant Tissue Cult. Lett.*, 7, 74-79.
- De Riek J., (1995), PhD thesis, Univ. Gent, Belgium.
- Lees R. P., Evans E. H., Nicholas J. R., (1991), *J. Exp. Bot.*, 42, 605-610.
- Grout B. W. W., Millam S., (1995), *Ann. Bot.*, 55, 129-131.