

Hacquetia epipactis* (Apiaceae) – rozmnażanie *in vitro* i zdolność kiełkowania nasion w warunkach *ex situ

Hacquetia epipactis* (Apiaceae): *in vitro* propagation and germination capacity of seeds *ex situ

BARBARA NOWAK, EWA SITEK, ZBIGNIEW GAJEWSKI

*B. Nowak, E. Sitek, Z. Gajewski, Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin,
Wydział Ogrodniczy, Uniwersytet Rolniczy, al. 29 Listopada 5, 31-425 Kraków;
e-mails: bnowak@ogr.ar.krakow.pl, ewasitek@poczta.fm, zbychor@poczta.fm*

ABSTRACT: Demographic studies often point out the poor state of insular populations of *Hacquetia epipactis*. The species is under strict protection. This is due to both natural and anthropogenic factors, including the collection of intact plants for gardens. As a form of integrated protection, an attempt at *ex situ* propagation was undertaken using seeds and tissue culture.

KEY WORDS: micropropagation, tissue culture, transplants

Wstęp

Cieszynianka wiosenna (*Hacquetia epipactis*), gatunek objęty ścisłą ochroną gatunkową i ujęty w Polskiej Czerwonej Księdze Roślin w kategorii [V], ma ograniczony zasięg występowania w Polsce. Badania demograficzne często stwierdzają zły stan, zwłaszcza niewielkich, wyspowych populacji tego gatunku spowodowany zarówno czynnikami naturalnymi, jak i antropogenicznymi. Należy tu wymienić wzrost zacienienia, zagłuszanie przez rozrastające się jeżyny, zgryzanie przez dzikie zwierzęta, zrywanie kwiatostanów oraz pozyskiwanie całych roślin do prywatnych ogrodów (Duda i in. 2001; Malara i in. 2004). W związku z trudnościami w zdobyciu sadzonek (Radziul 2004) częsty jest proceder pozyskiwania roślin ze stanowisk naturalnych.

W naturze *Hacquetia epipactis* wykazuje cechy byliny o dwóch sposobach reprodukcji, tzn. może zachodzić zarówno rozmnażanie wegetatywne, jak

NOWAK B., SITEK E., GAJEWSKI Z. 2011. *Hacquetia epipactis* (Apiaceae) – rozmnażanie *in vitro* i zdolność kiełkowania nasion w warunkach *ex situ*. W: KAČKI Z., STEFAŃSKA-KRZACZEK E. (red.), Synantropizacja w dobie zmian różnorodności biologicznej. – *Acta Botanica Silesiaca* 6: 239–248.

i generatywne. Często obserwowane jest obfite kwitnienie i wiązanie owoców, znacznie rzadziej jednak notowane są siewki, a nawet jeśli wspomina się o ich występowaniu, to z uwagi na wysoką śmiertelność, podkreśla się marginalne znaczenie rozmnażania generatywnego w rozwoju kolejnych generacji. Niewiele jest informacji dotyczących warunków kiełkowania nasion. Na stanowiskach naturalnych siewki pojawiają się po upływie roku od wysiania, w maju, co sugeruje konieczność ich stratyfikacji. Pośrednio oszacowano, że w warunkach *in situ* kiełkuje około 3% zawiązanych nasion (Sitek, Nowak 2009). W jedynej znanej próbie oceny zdolności kiełkowania *ex situ*, nasiona zebrane w niepełnej dojrzałości i wysiewane w kontrolowanych warunkach skiełkowały na poziomie 30–40%, a przeżywalność pikowanych siewek wynosiła 80% (Duda i in. 2001).

W sytuacji, kiedy rozmnażany materiał mączny jest dostępny w ograniczonej liczbie roślin, jak w przypadku licznych gatunków roślin objętych ochroną i dodatkowo o małym potencjale reprodukcyjnym celowe jest stosowanie mikropropagacji jako rozmnażania klonalnego. Opracowanie alternatywnej metody rozmnażania – zarówno z zachowaniem istniejącej puli genowej, jak i ze stymulowaną zmiennością – pozwoli na dysponowanie metodą rozmnażania w aspekcie ochrony gatunku, ale też w celach użytkowych.

Cieszynianka należy do rodziny selerowatych skupiającej szereg gatunków bogatych w olejki eteryczne, wiele z nich jest roślinami przyprawowymi, inne wzbudzają zainteresowanie jako potencjalne rośliny lecznicze i przemysłowe z uwagi na zawartość rozmaitych metabolitów wtórnych, dlatego stanowią one częsty obiekt badań biotechnologicznych a postęp dokonany w ostatnich latach jest ogromny (Ekiert 2000). Pomimo tak znacznego zainteresowania rodziną brak jest dostępnych danych odnośnie rozmnażania cieszynianki *in vitro*, a z zaliczanych do tej samej podrodziny *Saniculoideae* rodzajów rozmnażanie w kulturach tkankowych opisano jedynie dla rodzaju *Eryngium* (Ignacimuthu i in. 1999; Arockiasmay i in. 2002; Mohamed-Yasseen 2002; Martin 2004; Thiem, Wiatrowska 2007).

Celem badań była ocena zdolności do kiełkowania nasion cieszynianki jako elementu wyjściowego do stworzenia kolekcji roślin żywych oraz opracowanie biotechnologicznych metod propagacji cieszynianki zarówno z zachowaniem istniejącej w naturze puli genów jak i z indukowaniem zmienności somaklonalnej.

1. Materiał i metody

1.1. Rozmnażanie *in vitro*

Kultury *in vitro* inicjowane były z nasion, wierzchołkowych pąków wegetatywnych oraz fragmentów liści i ogonków liściowych.

Dwunasienne rozłupnie po stratyfikacji przez 3 miesiące w wilgotnym piasku + 4°C, były sterylizowane przez 30 s. w 70% etanolu, potem przez 10 lub 15 min. w 0,1% HgCl₂, a następnie płukane trzykrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Połowa nasion w obu wariantach sterylizacji przed wysiewem była zanurzana w 0,7% chloraminie. Każdą kombinację stanowiły 3 lub 4 kolby zawierające po 5 nasion wysianych na pożywkę MS (Murashige, Skoog 1962) zestaloną agarem 0,8%, pH 5,8. Nasiona na pożywkach umieszczono w fitotronie w warunkach 16/8 h fotoperiodu, w temperaturze 24 ± 2°C.

Pąki wierzchołkowe pobierane w fazie spoczynku od października do grudnia z roślin znajdujących się w prywatnej kolekcji były sterylizowane przez 30 s. w 70% etanolu, a następnie przez 5 lub 10 min w 0,1% HgCl₂ i trzy razy płukane w sterylnej wodzie destylowanej. Połowa pąków dodatkowo przed wyszczepieniem była zanurzana w 0,7% chloraminie. Pąki po sterylizacji wykładane były na pożywkę stabilizującą MS z dodatkiem 0,5 mg/l BAP i 0,1 mg/l IBA oraz 100 mg/l floriglucynolu. Po około 6 tygodniach pąki przeniesiono na pożywkę o tym samym składzie, na której pod koniec pasażu pąki rozpoczęły proliferację. Efektem proliferacji były skupienia pąków wierzchołkowych otoczonych liśćmi, traktowanych dalej jako eksplantaty, będące odpowiednikiem ramet.

Po rozpoczęciu proliferacji, w fazie namnażania, zostały przetestowane trzy pożywki zawierające MS z dodatkiem 0,1 mg/l IBA oraz 100 mg/l floriglucynolu różniące się zawartością cytokiny BAP: 0,5; 0,75 oraz 1,0 mg/l. Na zestaloną pożywkę w 100 ml kolbkach wyszczepiano po pięć 2-liściowych eksplantatów (=ramet) o wysokości ok. 2 cm. Po 7–8 tygodniach eksplantaty były przenoszone na świeżą pożywkę. Doświadczenie oceniające namnażanie wykonano trzykrotnie, zakładając każdorazowo po 4 kolbki w kombinacji (łącznie 12 kolbek w kombinacji). Pod koniec każdego pasażu oceniano współczynnik namnożenia (liczbę wytworzonych pąków), liczbę liści dla poszczególnych pąków oraz ich wysokość. Za wysokość eksplantatu przyjęto długość największego liścia wraz z ogonkiem. Wyniki porównano analizą wariancji z wykorzystaniem testu t-Studenta dla p=0,05.

Liście sterylizowane były przez 30 s. w 70% etanolu, a następnie przez 6 min w 0,1% HgCl₂. Fragmenty blaszki liściowej (ok. 0,5 cm × 0,5 cm z fragmentem głównego nerwu) oraz ogonków liściowych (ok. 1 cm) wyszczepiane były na pożywkę: liście odosiową powierzchnią w kontakcie z pożywką, ogonki liściowe poziomo lub pionowo na pożywce. Dla każdej kombinacji pożywka/eksplantat wszczepiano po 5 eksplantatów do 8 kolbek, z których połowę umieszczano w warunkach 16/8 h fotoperiodu, a drugą połowę w ciemności w fitotronie w temperaturze 24 ± 2°C. Łącznie przebadano 39 pożywek różniących się składem regulatorów wzrostu i antyoksydantów. Testowanymi regulatorami wzrostu były: IBA, NAA, 2,4 – D, Dicamba, BAP, picloram, zeatyna, kinetyka oraz TDZ w różnych kombinacjach i stężeniach,

a jako antyoksydanty stosowano kwas cytrynowy, k. askorbinowy, floroglucynol lub węgiel aktywowany.

1.2. Kielkowanie nasion *ex situ*

Nasiona *Hacquetia epipactis* bezpośrednio po dojrzewaniu (początek czerwca) wysiewano do wystawionych na zewnątrz skrzynek z brunatną glebą leśną w dwóch kombinacjach: przykryte ziemią (kielkowanie w ciemności) i na powierzchni (kielkowanie na świetle). Dla obu kombinacji wysiano nasiona w postaci dwunasiennych rozłupni w czterech seriach po 100 nasion. Nasiona poddano naturalnej stratyfikacji.

2. Wyniki

2.1. Rozmnażanie *in vitro*

Nasiona po sterylizacji ściemniały, ale po kilku dniach na pożywce spęczniały a pierwsze siewki pojawiły się po 4 tygodniach. Zastosowane metody sterylizacji nasion charakteryzowały się niską skutecznością; odsetek zakażeń był wysoki (18–44% w poszczególnych kombinacjach), tylko pojedyncze nasiona kiełkowały (0–10%), a siewki bardzo szybko zamierały.

Skuteczność stosowanych metod sterylizacji pąków wierzchołkowych wahała się w granicach 75–100%, i wszystkie czyste pąki w ciągu dwóch miesięcy rozpoczynały wzrost a potem namnażanie. Wskutek proliferacji wyszczepianych pąków inicjujących kulturę, a potem wyszczepianych eksplantatów powstawały skupienia pąków otoczonych liśćmi, nie wytwarzające wyraźnego pędu (kłącza) na testowanych pożywkach.

Największy współczynnik rozmnożenia cieszynianki – 2,16 – był odnotowany dla eksplantatów wyszczepianych na pożywkę z największą dawką cytokininy (tab. 1), jednak pokrój roślin (wysokość, liczba liści) na wszystkich pożywkach był podobny (ryc. 1). Nowe pąki rozwijały się zarówno u nasady wyszczepionych liści, jak i na krawędzi cięcia, po spodniej stronie eksplantatu. Na wszystkich pożywkach dochodziło do spontanicznego ukorzenia się eksplantatów z jednakową efektywnością. Ukorzone rośliny zostały wysadzone do sterylnej podłoża (perlit i substrat torfowy, w stosunku 1:1), gdzie przeszły aklimatyzację. i zostały wysadzone w kolekcji UR.

Skuteczność odkażania eksplantatów liściowych była bardzo zróżnicowana w zależności od terminu pobierania materiału matecznego co mogło być związane z warunkami pogodowymi (temperatura, wilgotność). Eksplantaty reagowały silnym brązowieniem na krawędziach cięcia i często zamierały, dlatego konieczne

Tabela 1. Efektywność procesu rozmnażania i ukorzenia eksplantatów *Hacquetia epipactis* na pożywkach ze zróżnicowaną zawartością BAP

Table 1. The effectiveness of the proliferation and rooting of *Hacquetia epipactis* explants on media with diversified content of BAP

Pożywka/ Medium [mg/l]	Współczynnik rozmnożenia/ Multiplication coefficient	Liczba liści eksplantatów/ Leaf number per explantat	Wysokość eksplantatów/ Height of explants	% ukorzenia/ % of rooting	Liczba korzeni eksplantatów/ Root number per explant
MS + 0,1 IBA + 0,5 BA	1,62 a*	3,18 a	1,97 a	10,8 a	1,7 a
MS + 0,1 IBA + 0,75 BA	1,74 a	3,03 a	1,72 a	12,4 a	1,2 a
MS + 0,1 IBA + 1,0 BA	2,16 b	2,91 a	1,73 a	15,0 a	2,0 a

Objaśnienia: *Wartości liczbowe w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie dla $p=0,05$, zgodnie z testem t-Studenta.

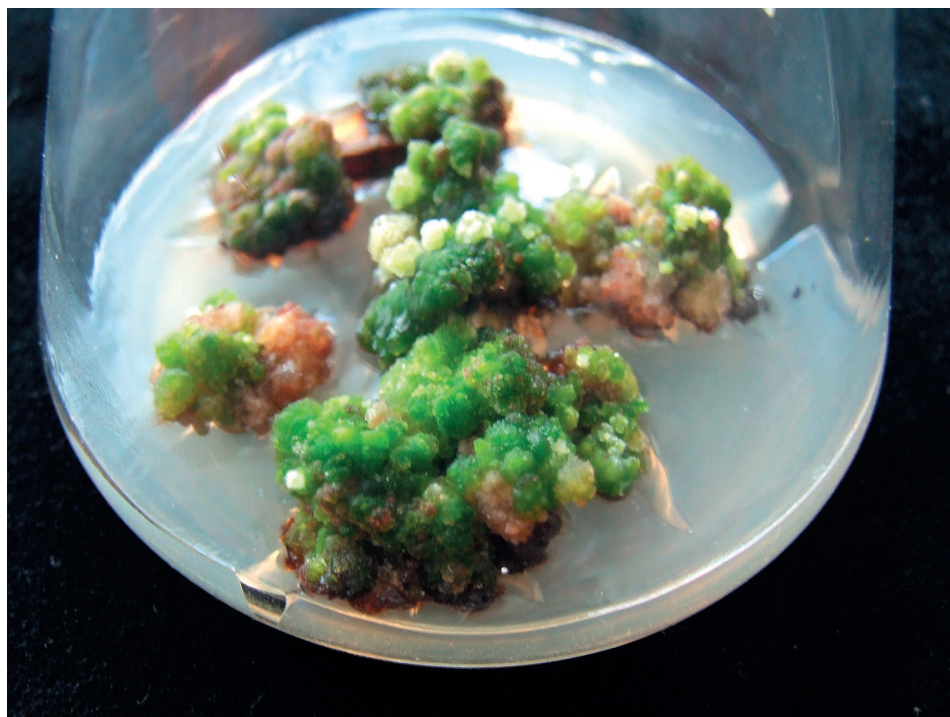
Explanations: *Values within columns followed by the same letter do not differ significantly for $p=0.05$, according to t-Student's test.



Ryc. 1. Eksplantaty cieszynianki wiosennej po 3 tygodniach kultury na pożywce MS z 0,1 mg/l IBA i 0,5 mg/l BA

Fig. 1. *Hacquetia epipactis* explants after 3 weeks of cultivation on medium MS with 0.1 mg/l IBA and 0.5 mg/l BA

było wprowadzenie do pożywek substancji hamujących utlenianie. Z licznych pożywek, na których kultywowano fragmenty liści i ogonków liściowych, jedynie na pożywce mineralnej MS z dodatkiem, 10 mg/l kwasu askorbinowego, 10 mg/l kwasu cytrynowego, 100 mg/l floroglucynolu, 10,0 mg/l TDZ oraz 2,5 mg/l NAA zestawionej agarem 0,8%, na krawędziach ogonków liściowych w ciemności wykształcił się wolno rosnący, zwarty kalus. Kalus pasażowany co 3 miesiące na świeżą pożywkę (bez dzielenia) kontynuował wzrost w jednakowym tempie zarówno w ciemności jak i po przeniesieniu na światło (ryc. 2). Obserwacje mikroskopowe pozwoliły na odnotowanie zjawiska ksylogenezy zarówno w kalusie rosnącym w ciemności, jak i na świetle.



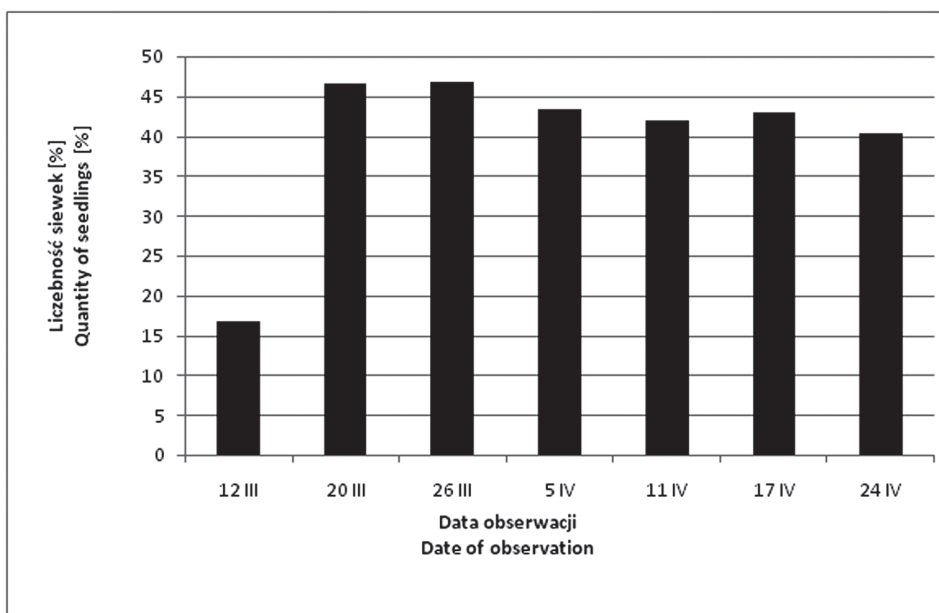
Ryc. 2. Kalus powstały na pożywce MS zawierającej 100 mg/l floroglucynolu, 10,0 mg/l TDZ i 2,5 mg/l NAA po 3 miesiącach kultury na świetle

Fig. 2. Callus produced on medium MS supplemented with 100 mg/l phloroglucinol, 10.0 mg/l TDZ, and 2.5 mg/l NAA

2.2. Kielkowanie nasion *ex situ*

Nasiona wysiane do podłoża stopniowo brązowiły do końca czerwca. Kielkowały epigeicznie dopiero w kolejnym roku. Pierwsze siewki w fazie dwóch

liścieni obserwowano w połowie lutego. Zdolność kiełkowania nasion *H. epipactis* w warunkach *ex situ* pod koniec marca wyniosła średnio 46,75%. Po tym terminie tylko sporadycznie obserwowano kolejne wschody (ryc. 3), a jednocześnie część siewek więdła i zamierała prawdopodobnie na skutek żerowania larw ziemiórek. Nie stwierdzono różnic w zdolności i tempie kiełkowania pomiędzy nasionami kiełkującymi w ciemności i na świetle. Wytwarzanie pierwszych liści młodocianych obserwowano w drugiej połowie kwietnia – wykształciły się u 20,5% siewek. W maju ze względu na przegęszczenie część siewek przepikowano, jednak po około dwóch tygodniach wszystkie przepikowane siewki zamaryły.



Ryc. 3. Dynamika liczebności siewek *Hacquetia epipactis* wysiewanych do podłoża po naturalnej stratyfikacji

Fig. 3. Dynamics of number of *Hacquetia epipactis* seedlings after natural stratification in the soil

3. Dyskusja

Najmniej inwazyjnym dla roślin donorowych sposobem inicjacji kultur tkankowych w celu mikorpropagacji jest wysiew nasion na pożywkę. W prezentowanych badaniach ta metoda okazała się nieskuteczna. Nasiona kiełkowały słabo i było dużo zakażeń. W przyszłości należałoby zaproponować stratyfikację nasion na pożywkę w warunkach jałowych, co jednocześnie zapewni optymalną wilgotność oraz ograniczy rozwój mikroorganizmów.

Wysoce efektywne okazało się inicjowanie kultury z pąków wierzchołkowych. Rośliny uzyskane w drodze mikropropagacji pobudzonych do namnażania na pożywkach pąków wierzchołkowych i bocznych reprezentują genotyp roślin matecznych. Izolowanie jednak takich pąków z roślin matecznych *Hacquetia epipactis* nie jest możliwe bez znacznego uszkodzenia kłącza roślin macierzystych, co nie jest pożądane u wolno rosnących gatunków. Prowadzony monitoring kłączy, z których pozyskano pąki wierzchołkowe do założenia kultur pozwolił na zaobserwowanie rozwoju pąków śpiących, z których rośliny te we wszystkich przypadkach odtworzyły nowe wierzchołki. Nie odnotowano zatem niekorzystnego wpływu pobierania pąków wierzchołkowych na dalszy rozwój rośliny macierzystej cieszynianki.

U namnażanych eksplantatów cieszynianki nie zaobserwowano wykształcania pędów: rozwijały się skupienia pąków otoczonych liśćmi, zarówno pąków kątowych pojawiających się u podstawy liści wyszczepianego eksplantatu, jak i pąków przybyszowych formujących się u jego podstawy na krawędzi cięcia, podczas gdy w kulturach rodzaju *Eryngium* eksplantaty namnażały się wytwarzając pędy. Jednak zarówno *E. foetidum* (Ignacimuthu i in. 1999; Arockiasmay i in. 2002; Mohamed-Yasseen 2002; Martin 2004) jak i rodzimy mikołajek polny *E. campestre* (Thiem, Wiatrowska 2007) rosnąc w naturalnych warunkach taki pęd wykształcają, podczas gdy cieszyniankę charakteryzuje inny typ wzrostu: posiada wolno rosnące kłącze bez pędów nadziemnych. Stopień rozmnożenia cieszynianki na pożywkach nie był duży, podobnie słabo krzewiły się wierzchołki pędów *E. campestre*. Skuteczną metodą rozmnożenia mikołajka była organogeneza pośrednia, gdyż na organogennym kalusie wykształcały się liczne pędy (Thiem, Wiatrowska 2007). Jednak dla cieszynianki udało się uzyskać tylko wolno rosnący kalus z początkami różnicowania. W przyszłości może on stanowić stadium wyjściowe do uzyskania roślin w organogenezie pośredniej z potencjalnie wzbudzoną zmiennością. Taki materiał mógłby być cenny w pracach hodowlanych dla uzyskania nowych form ozdobnych gatunku.

Odnotowana w doświadczeniu zdolność do kiełkowania nasion jest porównywalna do tej wcześniej uzyskanej przez Dudę i in. (2001) Nieudanym natomiast zabiegiem, w przeciwieństwie do opisywanych wcześniej wyników, było pikowanie, po którym wszystkie siewki zamarły. Rośliny pikowane we wcześniejszych badaniach (Duda i in. 2001) były przenoszone z naturalnego stanowiska z grudką ziemi, co minimalizowało prawdopodobieństwo uszkodzenia korzeni. Zabieg taki jest utrudniony w sytuacji, gdy siewki rosną zbyt gęsto i prawdopodobnie to stało się przyczyną zamierania. Należy rozważyć też możliwość istnienia związków mikoryzowych w warunkach naturalnych, a nie istniejących w podłożach sztucznych. W takim wypadku korzenie roślin łatwiej znoszą uszkodzenia i adaptacje do nowego miejsca.

Opracowanie różnych metod rozmnażania *ex situ* pozwoli z jednej strony na zachowanie zasobów genowych zarówno na poziomie populacji jak i gatunku, z drugiej strony na generowanie bioróżnorodności skutkiem zmienności somaklonalnej wynikającej z rozmnażania *in vitro*. Indukowana zmienność może być podstawą do hodowli nowych form ozdobnych. Rośliny uzyskane w drodze propagacji *ex situ* dostępne w handlu mogłyby stanowić alternatywę dla roślin pozyskiwanych ze stanowisk naturalnych

Literatura

- AROCKIASMAY S., PRAKASH S., IGNACIMUTHU S. 2002. Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum* L. – *Biologia Plantarum* **45**(1): 129–132.
- DUDA J., PUCHALSKI J., SZENDERA W. 2001. Studies on distribution and generative propagation of *Hacquetia epipactis* (SCOP.) DC. – *Biuletyn Ogrodów Botanicznych i Arboretów* **10**: 23–29.
- EKIERT H. 2000. Medicinal plant biotechnology: the Apiaceae family as the example of rapid development. – *Pharmazie* **55**: 561–567.
- IGNACIMUTHU S., AROCKIASAMY S., ANTONYASAMY M., RAVICHANDRAN P. 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a codiment. – *Plant Cell Tiss. Cult.* **56**: 131–137.
- MALARA J., GANCARCZYK-GOLA M., GOLA T. 2004. Charakterystyka populacji cieszynianki wiosennej (*Hacquetia epipactis* (Scop.) DC. w Porębie koło Zawiercia. – *Chrońmy Przyr. Ojcz.* **60**(2): 61–68.
- MARTIN K.P. 2004. In vitro propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. – *Scientia Horticulturae* **102**: 277–282.
- MOHAMED-YASSEEN Y. 2002. In vitro regeneration, flower and plant formation from petiolar and nodal explants of cilantro (*Eryngium foetidum* L.). – *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **38**: 423–426.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – *Physiol. Plant.* **15**: 473–97.
- RADZIUL E. 2004. Rośliny cenne, rzadkie, poszukiwane. – PWRiL, Warszawa, 262 ss.
- SITEK E., NOWAK B., 2009. Status of the *Hacquetia epipactis* (Apiaceae) population in the 'Cieszynianka' floristic reserve in Mogilany village near Kraków (Pogórze Wielickie Foothills, S Poland). – W: MIREK Z., NIKIEL A. (red.), Rare, relict and endangered plants and fungi in Poland. – W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków, s. 479–486.
- THIEM B., WIATROWSKA I. 2007. Mikrorozmnażanie *Eryngium campestre* L. – *Materiały 54 Zjazdu PTB „Botanika w Polsce - sukcesy, problemy, perspektywy”*, Szczecin 3–8 IX 2007, s. 123.

Summary

Demographic studies often point out the poor state of insular populations of *Hacquetia epipactis*. The species is under strict protection. This is due to both natural and anthropogenic factors, including the collection of intact plants for gardens. As a form of integrated protection, an attempt at *ex situ* propagation was undertaken using seeds and tissue culture. The seeds germinated after the natural stratification during the next season. However, they did not survive transplanting. A complete *in vitro* plant was obtained only from bud apex explants. The highest multiplication coefficient (2.16) was obtained MS medium supplemented with 0.1 mg/l IBA and 1.0 mg/l BAP. The microplants rooted spontaneously on all media tested with same effectiveness.