

# Rozmnażanie *in vitro* *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit.

Eleonora GABRYCZEWSKA

GABRYCZEWSKA E. 2014. *In vitro* propagation of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *Wiadomości Botaniczne* 58(1/2): 1–16.

*Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. belongs to the family *Ranunculaceae*. The genus *Helleborus* comprises 22 species, which are distributed over different parts of Europe, West and East Asia. *H. purpurascens* is rare and endangered element of Polish flora, being protected by law. It is a Carpathian subendemic. In Poland it occurs only in the Western Bieszczady Mountains (Eastern Carpathians). It has been listed as a vulnerable species – VU (Mirek, Piękoś-Mirkowa 2008), a rare plants – R (Mirek et al. 2006) and a species of lower risk – LR (Kaźmierczakowa, Zarzycki 2001). *H. purpurascens* is rhizomatous, herbaceous perennial with ornamental and medicinal value. Hellebores can be propagated by seeds and rhizome division. The generative propagation is limited because the seeds require several months to germinate after dispersing from parental plants. Propagation via rhizome division has low multiplication rate and it is time-consuming. *In vitro* propagation of many plants plays a very important role in rapid multiplication of species and cultivars. Relatively little results on the hellebores micropropagation has been published. The objective of the study was to investigate the influence of various growth regulators (2iP, BAP, kinetin, IBA, NAA, GA<sub>3</sub>), sucrose (10, 30, 50 and 70 g l<sup>-1</sup>), different concentrations of nitrogen salts (25%, 50% according to the MS medium) and temperature (+15°C, +20°C) on multiplication and rooting rate of *H. purpurascens in vitro*. The axillary buds present at the base of leaf of *H. purpurascens* were used as an initial explants. The growth and development of shoots from the axillary buds were obtained on the modified MS medium supplemented with cytokinins (2iP, BAP, kinetin) and GA<sub>3</sub>. The influence of various growth regulators (2iP, BAP and kinetin – each at concentration 1.0 mg l<sup>-1</sup>, GA<sub>3</sub> 2.5 mg l<sup>-1</sup>, IBA 0.1 mg l<sup>-1</sup>) and sucrose (10, 30 g l<sup>-1</sup>) on the growth, development and multiplication rate were investigated. For rooting purposes, the single shoots were grown in the temperature of +15°C or +20°C on the media with different levels of sucrose (10, 30, 50, 70 g l<sup>-1</sup>) and nitrogen salts – KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (25%, 50% according to the MS medium) supplemented with IBA 1 mg l<sup>-1</sup> and NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>. Cultures were grown under 16 h of light provided by cool-white fluorescent lamps (Philips TLD 36W/95) at 80 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. On the control medium (without growth regulators), the multiplication rate (1.1–1.4) and growth of axillary shoots were very weak. Among the all treatments, the highest multiplication rate of axillary shoots (2.3) were found at the temperature of +15°C, on the medium supplemented with sucrose 30 g l<sup>-1</sup> and mixture of cytokinins (2iP, BAP and kinetin – each at concentration 1.0 mg l<sup>-1</sup>) with GA<sub>3</sub> 2.5 mg l<sup>-1</sup> and at the temperature of +20°C on the same basic medium but with IBA. The presence of GA<sub>3</sub> and/or IBA in the medium supplemented with cytokinins stimulated axillary shoot branching. Gibberellin (GA<sub>3</sub> – 2.5 mg l<sup>-1</sup>) used alone in the medium, did not affect the leaf blade outgrowth and the multiplication rate of axillary shoots. The higher temperature (+20°C) significantly inhibited the leaf growth. Rooting ability was mainly dependent on the sucrose level in the medium. Sucrose at concentrations of 30 and 50 g l<sup>-1</sup> strongly stimulated the rooting rate

(90% rooted shoots) at the temperature of +15°C and increased the number of roots per microplants (4.0–4.6) at the temperature of +20°C. The lowest (10 g l<sup>-1</sup>) and highest (70 g l<sup>-1</sup>) levels of sucrose inhibited the root formation. The high sucrose concentrations (50 and 70 g l<sup>-1</sup>) strongly increased the leaf senescence on the microplants growing in the temperature of +15°C on the medium containing low level of nitrogen (25% of KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> according to the MS medium)..

KEY WORDS: *Helleborus purpurascens*, endangered species, propagation *in vitro*, growth regulators, sugar, nitrogen, temperature

Eleonora Gabryszewska, Instytut Ogrodnictwa, Zakład Biologii Ogólnej i Molekularnej, Pracownia Fizjologii i Morfogenezy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, e-mail: Eleonora.Gabryszewska@inhort.pl

Wykaz stosowanych skrótów: BAP – 6-benzyl-aminopuryna; kinetyna – 6-furfuryloaminopuryna; 2iP – 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$  dimetyloalliloamino)puryna; IAA – kwas indolilo-3-octowy; IBA – kwas indolilo-3-masłowy; NAA – kwas naftylo-1-octowy; NOA – kwas naftoksy-1-octowy; GA<sub>3</sub> – kwas giberelinowy; MS – Murashige i Skoog (1962).

## WSTĘP

Gatunek *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. (ciemniernik czerwonawy, c. purpurowy) należy do rodziny *Ranunculaceae* (jaskrowate) (Tutin 1964, Nowicke, Skvarla 1983). W obrębie rodzaju *Helleborus* wydzielono 6 sekcji, w których znajdują się 22 gatunki występujące w różnych częściach Europy oraz w Zachodniej i Wschodniej Azji. *Helleborus purpurascens* należy do sekcji *Helleborastrum* (Mathew 1989, Zonneveld 2001, Meiners et al. 2011). W warunkach naturalnych gatunek ten obejmuje zwartym zasięgiem Karpaty Wschodnie i Południowe oraz Wyżynę Siedmiogrodzką. Obficie występuje także w Karpatach Zachodnich. Oprócz tego znany jest z Mołdawii i Podola, a liczne stanowiska sięgają do północnego skraju Niziny Węgierskiej. Północno-wschodnią granicę zasięgu geograficznego osiąga w Polsce (Mitka et al. 2001, Mitka, Michalik 2008). Jest on rzadkim i zagrożonym elementem polskiej flory, subendemitem ogólnokarpackim, gatunkiem objętym ścisłą ochroną prawną (Mitka, Michalik 2008). Na terenie naszego kraju występuje tylko w Bieszczadach

Zachodnich, gdzie został znaleziony po raz pierwszy w roku 1959 (Ralska-Jasiewiczowa 1960). Następnie potwierdzono istniejące stanowiska i odkryto kilka nowych (Szucki 1982, Bochenek 1998, Mitka, Bochenek 1998, Mitka et al. 2001, Mitka, Michalik 2008, Suder 2010). W Karpatach Polskich gatunek ten uznany jest za narażony na wyginiecie – VU (Mirek, Piękoś-Mirkowa 2008), natomiast w obrębie obszaru całej Polski za gatunek niższego ryzyka – LR (Kaźmierczakowa, Zarzycki 2001) lub rzadki – R (Mirek et al. 2006).

Ciemniernik czerwonawy jest hemikryptofitem, byliną (15–25 cm wysokości) o kwiatach (około 5 cm średnicy) barwy brązowo-brudnoczerwonej (Mitka, Michalik 2008). Posiada duże walory ozdobne i właściwości lecznicze. W ogrodnictwie jest szczególnie ceniony z powodu bardzo wczesnego wiosennego kwitnienia (marzec – kwiecień), podobnie jak inne gatunki z rodzaju *Helleborus* (Grabowska, Kubala 2011, Gabryszewska 2013, 2014). Poza ciemiernikami nie ma innych bylin, które zakwitają od późnej jesieni poprzez zimę do przedwiośnia. W Polsce ciągle są mało znane i rzadko spotykane w naszych ogrodach.

Rozmnażanie generatywne ciemierników jest długotrwałe, ponieważ nasiona kiełkują po kilku miesiącach, a rośliny zakwitają po 4–6 latach. Także rozmnażanie wegetatywne przez podział kłącza charakteryzuje się niską wydajnością.

Rozmnażanie roślin *in vitro* jest jedną z najważniejszych technologii rozmnażania roślin, powszechnie stosowaną w produkcji ogrodniczej w Polsce i na świecie. Zalety techniki *in vitro* sprawiają, że od kilkunastu lat znajduje

ona zastosowanie w ochronie *ex situ* zasobów genowych gatunków rzadkich, ginących, zagrożonych i chronionych (Fay 1992, Pence et al. 2006, Rybczyński, Mikuła 2006, Sarasan et al. 2006). Jednym z głównych zastosowań techniki *in vitro* w ochronie bioróżnorodności jest przechowywanie tkanek, organów lub kompletnych roślin w bankach genów *in vitro*. Gromadzony materiał roślinny utrzymuje się w warunkach spowolnionego wzrostu kultur *in vitro* lub zabezpiecza tkanki w ciekłym azocie (Rybczyński, Mikuła 2006, Engelman 2011, Mikuła et al. 2013). Wprowadzenie rozmnażania *in vitro* w ochronie gatunkowej ma na celu zachowanie lub powiększenie naturalnych populacji lub tworzenie sztucznych, poprzez reintrodukcję roślin do istniejących stanowisk lub tworzenie stanowisk zastępczych (Shimada et al. 2000, Kromer et al. 2007). Dzięki metodzie *in vitro* można także poznać cykl rozwojowy danego gatunku zagrożonego, jego biologię rozmnażania oraz wymogi żywieniowe (Marszał, Kromer 2004, Marszał-Jagacka et al. 2005, Kromer et al. 2007). Rozmnażanie *in vitro* i zakładanie plantacji dzikich roślin użytkowych (leczniczych, rolnych), należących do gatunków zagrożonych i chronionych, może znacząco przyczynić się do ograniczenia eksploatacji tych gatunków w warunkach ich naturalnego występowania.

Różne metody regeneracji *in vitro* stosuje się do rozmnażania ginących i zagrożonych gatunków: a) rozwój roślin z nasion (zarodników) w warunkach sterylnych, b) uaktywnianie pąków kątowych i namnażanie pędów, c) bezpośrednie powstawanie pąków przybyszowych na izolowanych fragmentach roślin, d) różnicowanie pąków przybyszowych z kalusa (regeneracja pośrednia) oraz e) powstawanie zarodków somatycznych z komórek lub tkanek (Fay 1992, Rybczyński, Mikuła 2006). W celu zachowania zmienności genetycznej preferowane jest zakładanie kultur z nasion, a także z zarodków nasion niedojrzałych (Fay 1992, Shimada et al. 2000, Pence et al. 2006, Marković et al. 2013). Najczęściej wykorzystywane są metody wegetatywnego rozmnażania *in vitro*, gdzie eksplantatami wyjściowymi do zakładania kultur są różne fragmenty roślin (pąki

wierzchołkowe i boczne, fragmenty liści, pędu, cebul lub bulw, części kwiatów lub kwiatostanów, itp.). W przypadku gatunków nie wytwarzających nasion bądź charakteryzujących się długotrwałym i mało wydajnym rozmnażaniem generatywnym, istnieje konieczność stosowania rozmnażania wegetatywnego *in vitro* (Rybczyński, Mikuła 2006, Sarasan et al. 2006, Engelman 2011).

Wykorzystanie kultur *in vitro* zwiększa wydajność mnożenia zarówno generatywnego, jak i wegetatywnego, gatunków ginących i zagrożonych oraz umożliwiłaby szybkie powiększenie populacji zagrożonych lub stworzenie populacji zastępczych w warunkach naturalnych. Metoda ta pozwala także na powiększenie kolekcji gatunków zagrożonych w ogrodach botanicznych, arboretach i bankach genów. Oszacowano, że około 5000 gatunków zagrożonych na świecie wymaga zastosowania kultur *in vitro* w celu ich zachowania (Pence 2011). Również inne gatunki roślin dzikich o dużym znaczeniu użytkowym rozmnaża się metodą *in vitro*. Są to drzewa i krzewy leśne, rośliny rolnicze i lecznicze oraz rośliny o dużych walorach dekoracyjnych, przeznaczone do uprawy w ogrodach. Ochronie dzikiej flory, w tym także gatunków zagrożonych i ginących, sprzyja uprawa dzikich roślin w ogrodach przydomowych, parkach i na terenach zieleni. „Jest nadzieja na to, że taka uprawa stanie się bardziej powszechna a firmy ogrodnicze będą dostarczały, oprócz wyszukanych odmian obcych roślin, także nasion i sadzonek dzikich roślin polskiej flory” (Olaczek 1998). Idea ochrony gatunków rodzimej flory w ogrodach, głównie naturalnych i dzikich, jest rozpowszechniana w krajach Europy Zachodniej od kilkunastu lat. W krajach tych nasiona i sadzonki gatunków roślin dzikich produkowane i sprzedawane są przez specjalistyczne firmy, co ogranicza lub eliminuje nielegalne pozyskiwanie roślin z naturalnego środowiska. Zastosowanie rozmnażania *in vitro* dla gatunków zagrożonych przyczynia się nie tylko do zachowania ich naturalnych zasobów, ale również rozpowszechnienia w uprawie ogrodniczej.

W literaturze brak jest danych o rozmnażaniu *in vitro* ciemiernika czerwonego, a tylko kilka prac dotyczy innych gatunków tego rodzaju,

głównie *H. niger* (Seyring 2002, Poupet et al. 2006, Dhooghe, Van Labeke 2007, Beruto et al. 2013).

Opracowanie metody rozmnażania *in vitro* ciemiernika purpurowego łączy się z potrzebą ochrony tego rzadkiego w naszej florze gatunku, jak i rozpowszechniania go jako rośliny ozdobnej. Metoda rozmnażania *in vitro* *H. purpurascens* jest także niezwykle istotna dla hodowli nowych odmian. Jest to jedyny gatunek występujący w Polsce w stanie dzikim i może mieć bardzo duże znaczenie w hodowli i uprawie ciemierników, ponieważ pochodzi z naszego klimatu i jest wytrzymały na mróz. Natomiast gatunki i odmiany sprowadzane z Europy Południowej lub Zachodniej nie zawsze wykazują wystarczającą mrozoodporność.

W ostatnim okresie coraz częściej prowadzone są badania dotyczące współzależności pomiędzy funkcją cukrów i rozpuszczalnych związków azotowych. Należy zaznaczyć, że cukry i związki azotowe są nie tylko substancjami troficznymi, ale pełnią funkcje cząsteczek sygnałnych przekazujących informacje dotyczące bieżącego statusu zaopatrzenia tkanek w węgiel i azot oraz o wzajemnych relacjach substancji zawierających te pierwiastki. W ten sposób wpływają również na morfogenezę i fazy rozwojowe roślin (Gibson 2005, Rolland et al. 2006, Starck 2006, Zheng 2009, Nunes-Nesi et al. 2010). W badaniach prowadzonych *in vitro* wykazano zróżnicowane działanie sacharozy lub/i soli azotu w procesie organogenezy, wzrostu i rozwoju u gatunków należących do rodzajów: *Rosa*, *Eucomis*, *Cymbidium*, *Clematis* i *Paeonia* (Caboche 1987, Taylor, Van Staden 2001, Ogura-Tsujita, Okubo 2006, Gabryszewska et al. 2008, Gabryszewska 2009, 2010). Niski poziom azotu w pożywce stymulował powstawanie pędów u gatunku *Clematis pitcheri* i u kilku gatunków *Cymbidium* (Gabryszewska et al. 2008, Ogura-Tsujita, Okubo 2006). U piwonii chińskiej podniesienie stężenia sacharozy przy obniżonym poziomie soli azotowych wpływało na wzrost współczynnika namnażania kultur rosnących w obecności cytokinin, a także stymulowało ukorzenianie pędów (Gabryszewska 2009).

## CEL BADAŃ

Celem badań było określenie wpływu regulatorów wzrostu, sacharozy i stężenia soli azotu oraz temperatury na namnażanie i ukorzenianie pędów *H. purpurascens* w warunkach *in vitro*.

## MATERIAŁ I METODY

Rośliny *Helleborus purpurascens*, będące w fazie kwitnienia, uzyskano z krajowej firmy zajmującej się rozmnażaniem roślin ogrodniczych. Eksplantatami inicjalnymi były pąki kątowe znajdujące się u podstawy liści. Wzrost i rozwój pędów z izolowanych pąków kątowych uzyskano na pożywce Murashige i Skooga (1962) zawierającej cytokininy (2iP, BAP i kinetynę – każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>) i GA<sub>3</sub> 0,5 mg l<sup>-1</sup> (Duchefa Biochemie, Holandia). Dalsze namnażanie prowadzono poprzez aktywację pąków kątowych w rozwijających się pędach. Stosowano pożywkę o takim samym składzie, jak w stadium inicjalnym. Materiał roślinny mnożono w temperaturze +15°C.

W doświadczeniu dotyczącym fazy namnażania stosowano zmodyfikowaną pożywkę MS (50% zawartości NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> i KNO<sub>3</sub>) zawierającą następujące regulatory wzrostu: cytokininy (BAP, kinetynę, 2iP – każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>), GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup> i IBA 0,1 mg l<sup>-1</sup> oraz sacharozę w stężeniu 10 lub 30 g l<sup>-1</sup>. Analizowano współdziałanie wymienionych substancji. Jako kontrolę stosowano zmodyfikowaną pożywkę MS nie zawierającą regulatorów wzrostu.

Pożywka MS używana podczas ukorzeniania *in vitro* pędów zawierała 25% lub 50% soli azotu (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> i KNO<sub>3</sub>) oraz sacharozę w stężeniu: 10, 30, 50, 70 g l<sup>-1</sup>. Do pożywki tej dodawano mieszaninę auksyn: IBA 1 mg l<sup>-1</sup> i NAA 0,1 mg l<sup>-1</sup> (Duchefa Biochemie, Holandia). W każdej kombinacji ukorzeniano po 20 pędów, a doświadczenie przeprowadzono w 2 seriach.

Ukorzenione pędy ciemiernika purpurowego sadzono do podłoża zawierającego torf i perli (4:1) i umieszczano w szklarni w warunkach wysokiej wilgotności na okres 4 tygodni. Po okresie

około 2 tygodni od posadzenia folia zabezpieczająca rośliny była stopniowo usuwana. Ze względu na zahamowanie wzrostu i wytwarzanie pąków spoczynkowych, po 2 miesiącach utrzymywania roślin w szklarni, poddano je chłodzeniu (+5°C) przez okres 2 miesięcy. Po okresie chłodu rośliny ponownie przeniesiono do szklarni w celu dalszej uprawy.

We wszystkich doświadczeniach stosowano pożywkę zestawioną mieszaniną agaru (0,2 %) i gerlity (1,2%) o pH 5,8 ustalonym przed sterylizacją. Następnie autoklawowano je w temperaturze +120°C pod ciśnieniem 1,25 hPa przez 15 minut. Doświadczenia prowadzono w temperaturze +15°C i +20°C, przy świetle o długości dnia 16 h. Jako źródło światła stosowano lampy fluorescencyjne Philips TLD 36W/95 – białe (80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Doświadczenia przeprowadzono metodą całkowicie losową z 3. powtórzeniami dla traktowania. Powtórzeniem był słoik zawierający 5–7 eksplantatów. Przeprowadzono 2 serie doświadczeń. Po 8 tygodniach wzrostu roślin (faza namnażania, faza ukorzeniania) wykonano następujące pomiary i obserwacje: liczba pędów/eksplantat, liczba liści i korzeni/pęd, długość liści i korzeni (mm), świeża masa pędu (mg) w fazie namnażania, świeża masa mikrosadzonek (mg) w fazie ukorzeniania, liczba ukorzenionych pędów (%).

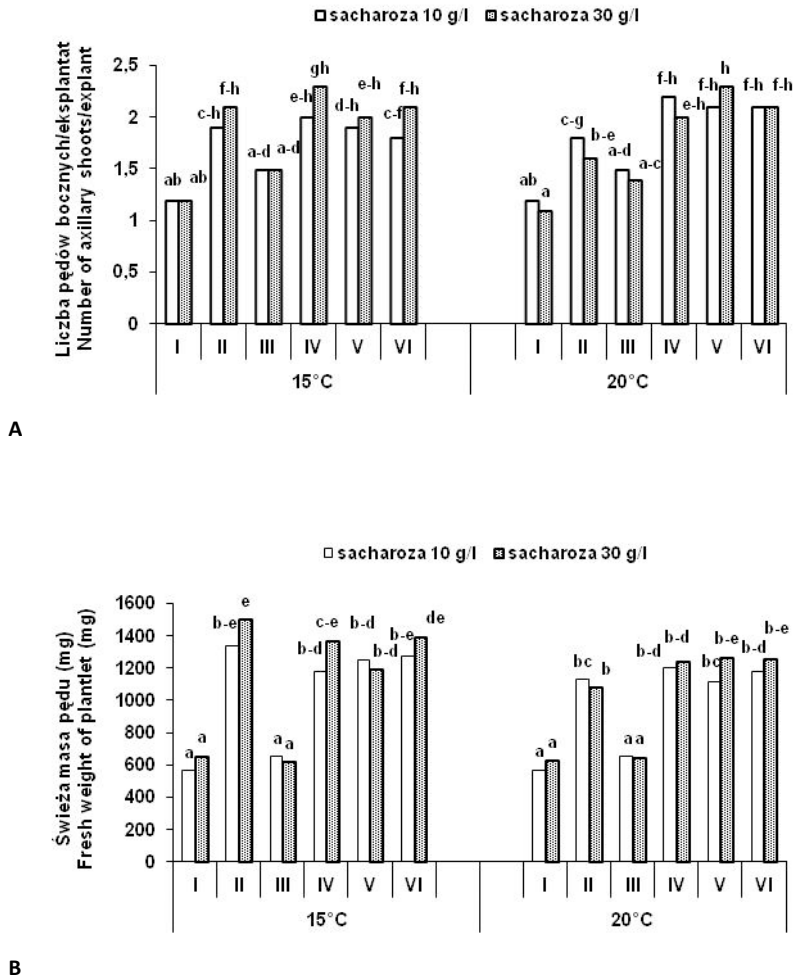
Wyniki doświadczeń opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic użyto testu t-Duncana przy poziomie istotności 0,05.

## WYNIKI I Dyskusja

W pracach badawczych nad rozmnażaniem *in vitro* różnych gatunków ciemiernika kultury pędów inicjowano z pąków kątowych (Dhooghe, Van Labeke 2007), wierzchołków pędów (Poupet et al. 2006) lub z siewek uzyskanych *in vitro* (Seyring 2002). U *Helleborus purpurascens* pędy boczne otrzymano z izolowanych pąków kątowych po 8–12 tygodniach wzrostu na pożywce MS zawierającej cytokininy: 2iP, BAP i kinetynę (każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>) i GA<sub>3</sub> 0,5 mg l<sup>-1</sup>. Te

samą pożywkę stosowano poprzez cały okres stabilizacji kultury. W przypadku innych gatunków ciemiernika (*H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. niger* i *H. orientalis*) izolowane pąki kątowe rozwijały się w pędy po okresie 7–14 tygodni na pożywce MS zawierającej 2iP 5 mg l<sup>-1</sup> i BAP 0,2 mg l<sup>-1</sup> (Dhooghe, Van Labeke 2007).

W celu określenia optymalnego składu pożywki do namnażania ustabilizowane kultury pędów bocznych ciemiernika purpurowego poddano działaniu różnych regulatorów (BAP, kinetyna, 2iP, GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup>, IBA 0,1 mg l<sup>-1</sup>), sacharozy w stężeniu 10 lub 30 g l<sup>-1</sup> i 50% zawartości soli azotu (wg składu pożywki MS). Pędy rosnące na pożywce kontrolnej (nie zawierającej regulatorów wzrostu) charakteryzowały się bardzo słabym wzrostem i niskim współczynnikiem namnażania (1,1–1,4) (Ryc. 1A i Ryc. 3). Spośród wszystkich traktowań, największy współczynnik namnażania pędów kątowych (2,3) uzyskano w kulturach rosnących w temperaturze +15°C, na pożywce z wyższą zawartością sacharozy (30 g l<sup>-1</sup>) i mieszaniną cytokinin (2iP, BAP, kinetyna – każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>) z dodatkiem GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup>, a także w temperaturze +20°C, w przypadku gdy wymieniona wyżej pożywka zawierała IBA 0,1 mg l<sup>-1</sup>, zamiast GA<sub>3</sub>. Wzrost stężenia sacharozy w pożywce nieznacznie podwyższał liczbę pędów bocznych, głównie w temperaturze +15°C, ale różnice te nie były istotne statystycznie. Brak regulatorów wzrostu w pożywce, jak i zastosowanie tylko GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup>, nie wpływały korzystnie na namnażanie pędów kątowych, wzrost i liczbę liści oraz świeżą masę pędów (Ryc. 1A,B i Ryc. 2A,B). Natomiast obecność GA<sub>3</sub> lub/i IBA podanych łącznie z cytokininami stymulowała uaktywnianie pąków kątowych i wzrost pędów oraz ich świeżej masy, ale różnice te nie były istotne w porównaniu z działaniem samych cytokinin, jednak pędy różniły się morfologicznie. Kultury pędów rosnące w obecności cytokinin z dodatkiem IBA lub/i GA<sub>3</sub> charakteryzowały się większą liczbą liści o dużych, lepiej wykształconych blaszkach liściowych (Ryc. 2A i Ryc. 3). Seyring (2002) w fazie namnażania pędów *H. niger* stosował pożywkę zawierającą BAP 0,5 mg l<sup>-1</sup> i GA<sub>3</sub>

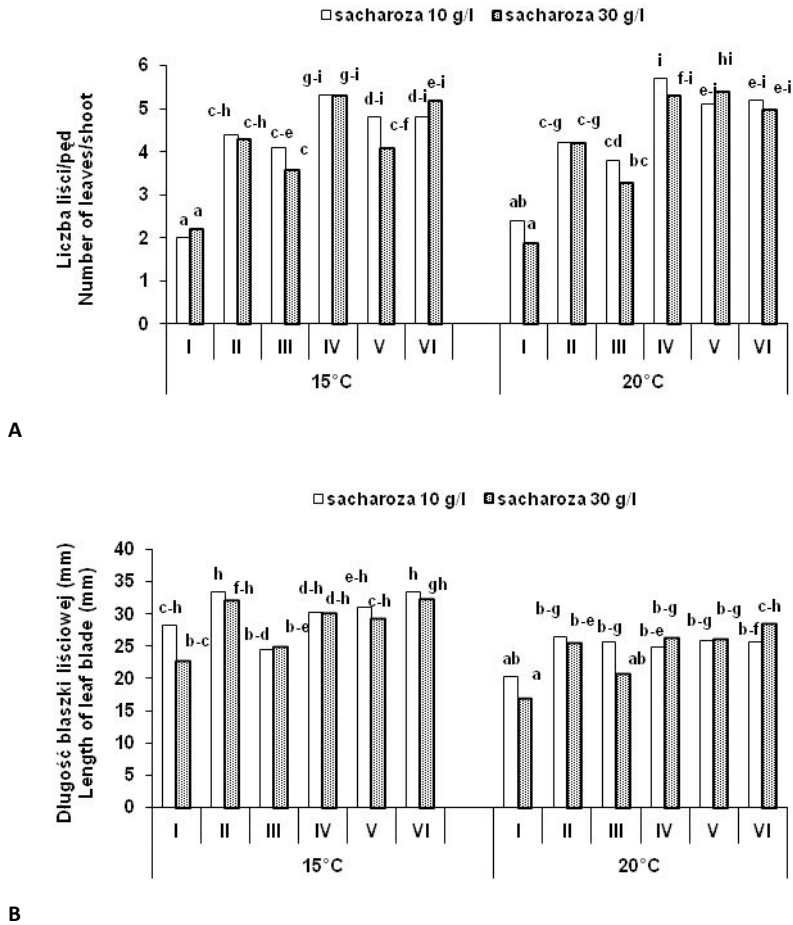


Ryc. 1. Wpływ regulatorów wzrostu (2iP, BAP, kinetyny, GA<sub>3</sub>, IBA), stężenia sacharozy i temperatury (+15°C, +20°C) na liczbę pędów bocznych (A) i świeżą masę pędu (B) *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. Objasnienia: I – kontrola, II – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>), III – GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup>, IV – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>) + GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup>, V – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>) + IBA 0,1 mg l<sup>-1</sup>, VI – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0 mg l<sup>-1</sup>) + GA<sub>3</sub> 2,5 mg l<sup>-1</sup> + IBA 0,1 mg l<sup>-1</sup>. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) według testu t-Duncana.

Fig. 1. The influence of growth regulators (2iP, BAP, kinetin, GA<sub>3</sub>, IBA), sucrose concentration and temperature (+15°C, +20°C) on the number of axillary shoots (A) and fresh weight of plantlet (B) of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. Explanations: I – control, II – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0 mg l<sup>-1</sup>), III – GA<sub>3</sub> 2.5 mg l<sup>-1</sup>, IV – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0 mg l<sup>-1</sup>) + GA<sub>3</sub> 2.5 mg l<sup>-1</sup>, V – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0 mg l<sup>-1</sup>) + IBA 0.1 mg l<sup>-1</sup>, VI – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0 mg l<sup>-1</sup>) + GA<sub>3</sub> 2.5 mg l<sup>-1</sup> + IBA 0.1 mg l<sup>-1</sup>. Means followed by the same letter do not differ at 5% level of significance t-Duncan's test.

1 mg l<sup>-1</sup>. W badaniach tych jednak nie porównano wpływu mieszaniny BAP i GA<sub>3</sub> z działaniem pożywki zawierającej tylko cytokininę. Silny wpływ gibereliny na aktywację pąków kątowych obserwowano u *Paeonia lactiflora* odmiana

'Jadwiga'. Egzogenna giberelina (GA<sub>3</sub>), podana w obecności cytokinin, znosiła hamujące działanie sacharozy i stymulowała wzrost pędów bocznych (Gabryszewska 2009). U innych gatunków roślin wykazano, że giberelina odgrywa istotną rolę



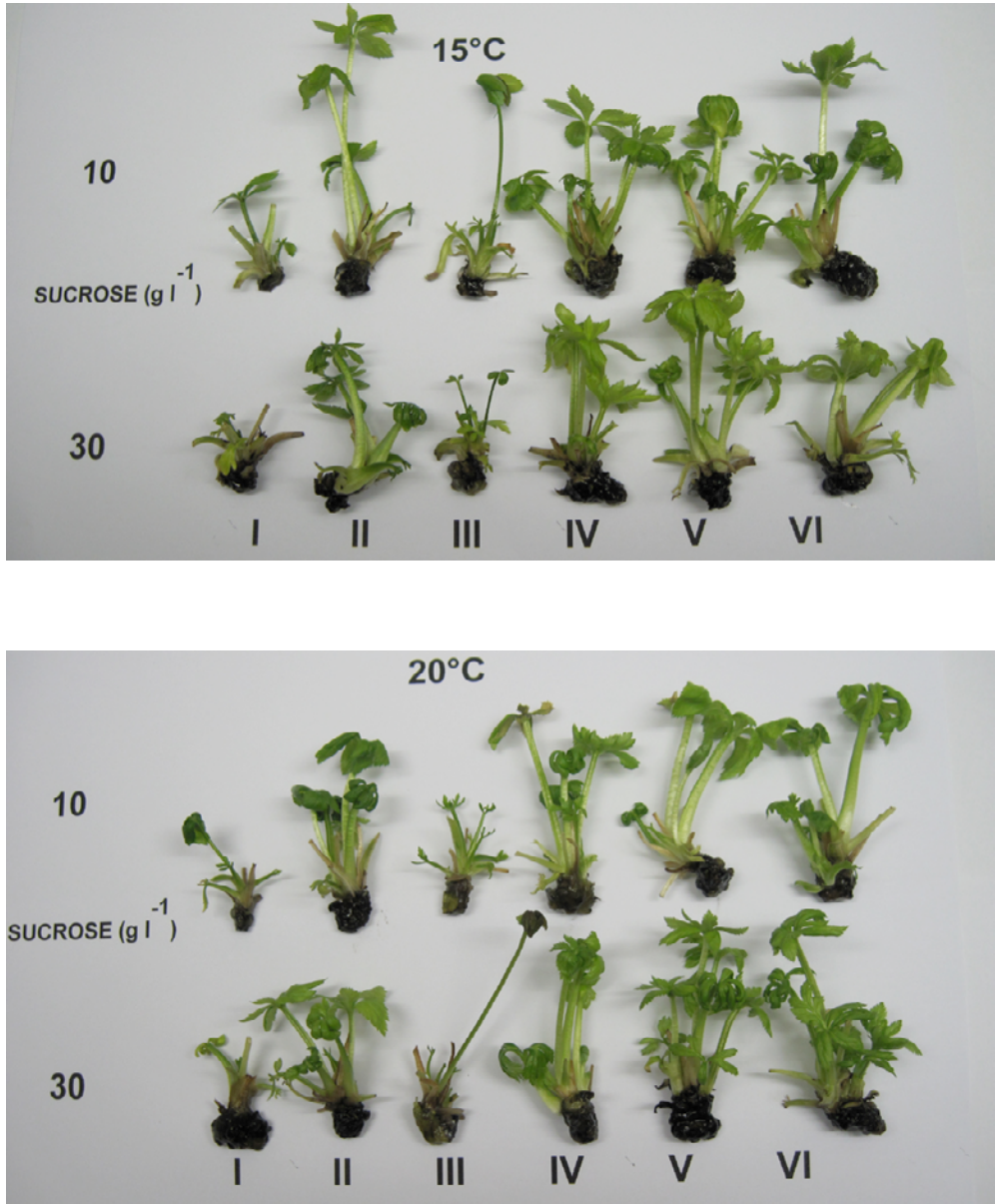
Ryc. 2. Wpływ regulatorów wzrostu (2iP, BAP, kinetyny, GA<sub>3</sub>, IBA), stężenia sacharozy i temperatury (+15°C, +20°C) na liczbę liści (A) i długość blaszki liściowej (B) *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. Patrz objaśnienia Ryc. 1.

Fig. 2. The influence of growth regulators (2iP, BAP, kinetin, GA<sub>3</sub>, IBA), sucrose concentration and temperature (+15°C, +20°C) on the number of leaves (A) and the length of leaf blade (B) of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. See explanations Fig. 1.

w regulacji podziałów komórkowych i we wzroście elongacyjnym komórki, a także uczestniczy w znoszeniu dominacji wierzchołkowej (ang. *paradormancy*) oraz aktywuje wzrost pąków kątowych. W procesie tym giberelina przeciwdziała hamującemu wpływowi cukrów (Chao et al. 2000, Horvath et al. 2003).

Zdolność regeneracji i namnażania pędów różnych gatunków ciemiernika *in vitro* zależała w dużej mierze od genotypu. Obserwowano znaczne różnice w wartości współczynnika namnażania u kilku innych gatunków ciemiernika (*H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. niger*

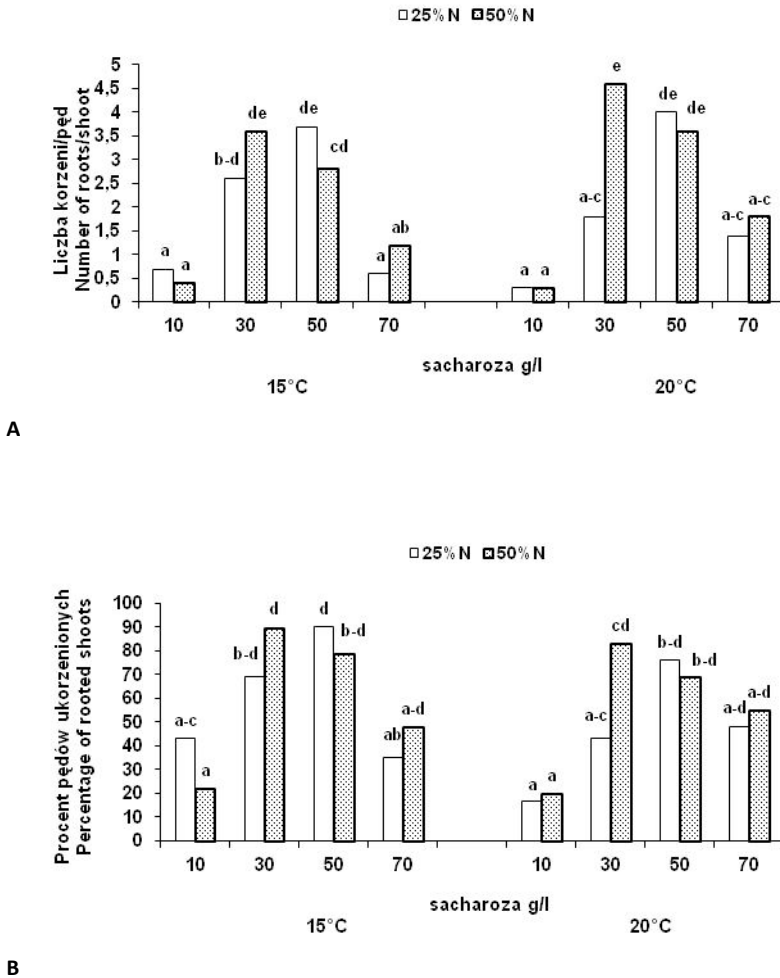
i *H. orientalis*) rosnących na pożywce MS zawierającej mieszaninę cytokinin (2iP 2 mg l<sup>-1</sup>, BAP 5 mg l<sup>-1</sup>) i dodatek NOA 0,1 mg l<sup>-1</sup> (Dhooghe, Van Labeke 2007). Największym współczynnikiem namnażania charakteryzował się *H. niger* (3,8 pędów/eksplantat), natomiast najniższym *H. foetidus* (1,3 pędów/eksplantat). Pozostałe gatunki, takie jak *H. argutifolius* i *H. orientalis*, miały współczynnik namnażania na poziomie 2 pędy/eksplantat. Poupet et al. (2006) stwierdzili dużą rozbieżność w zdolności namnażania różnych klonów *H. niger*, gdzie współczynnik namnażania wynosił od 2 do ponad 4 pędów/eksplantat. Także



Ryc. 3. Wpływ regulatorów wzrostu (2iP, BAP, kinetyna,  $GA_3$ , IBA), stężenia sacharozy (10 i 30  $g\ l^{-1}$ ) i temperatury (+15°C, +20°C) na wzrost i rozwój *in vitro* pędów *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. Objaśnienia: góra – sacharoza 10  $g\ l^{-1}$ , dół – sacharoza 30  $g\ l^{-1}$ ; I – kontrola, II – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0  $mg\ l^{-1}$ ), III –  $GA_3$  2,5  $mg\ l^{-1}$ , IV – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0  $mg\ l^{-1}$ ) +  $GA_3$  2,5  $mg\ l^{-1}$ , V – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0  $mg\ l^{-1}$ ) + IBA 0,1  $mg\ l^{-1}$ , VI – 2iP, BAP i kinetyna (każda w stężeniu 1,0  $mg\ l^{-1}$ ) +  $GA_3$  2,5  $mg\ l^{-1}$  + IBA 0,1  $mg\ l^{-1}$ .

Fig. 3. The influence of growth regulators (2iP, BAP, kinetin,  $GA_3$ , IBA), sucrose concentration (10 and 30  $g\ l^{-1}$ ) and temperature (+15°C, +20°C) on the growth and development *in vitro* of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. Explanations: upper – sucrose 10  $g\ l^{-1}$ , lower – sucrose 30  $g\ l^{-1}$ ; I – control, II – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0  $mg\ l^{-1}$ ), III –  $GA_3$  2.5  $mg\ l^{-1}$ , IV – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0  $mg\ l^{-1}$ ) +  $GA_3$  2.5  $mg\ l^{-1}$ , V – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0  $mg\ l^{-1}$  + IBA 0.1  $mg\ l^{-1}$ , VI – 2iP, BAP and kinetin (each at concentration 1.0  $mg\ l^{-1}$ ) +  $GA_3$  2.5  $mg\ l^{-1}$  + IBA 0.1  $mg\ l^{-1}$ .





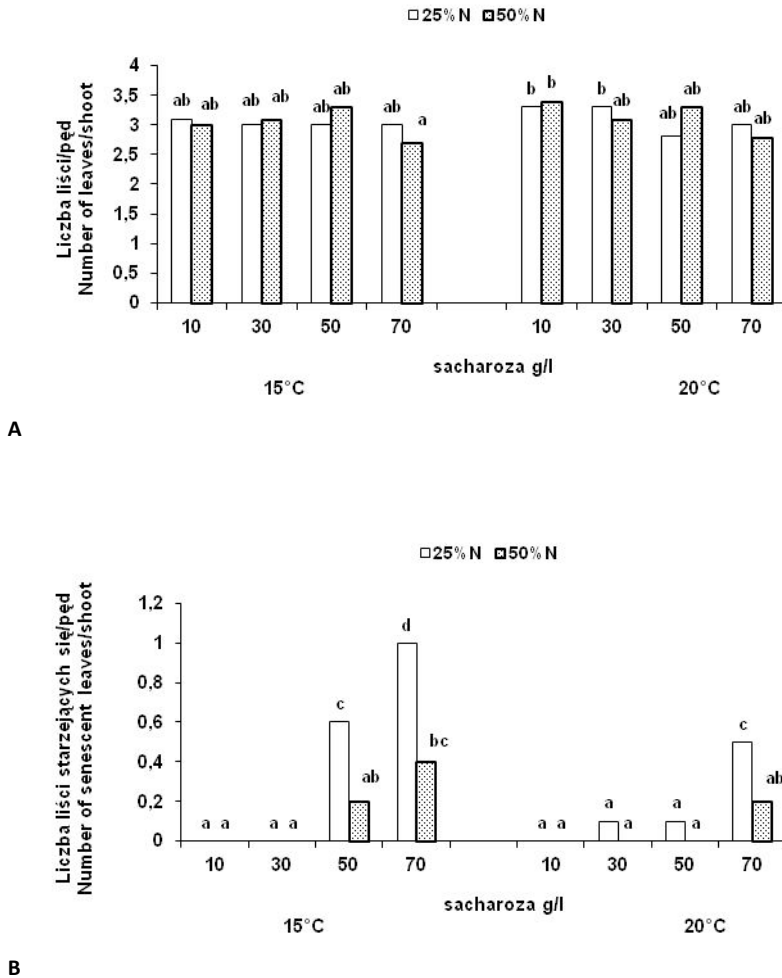
Ryc. 4. Wpływ stężenia sacharozy (10, 30, 50 i 70 g l<sup>-1</sup>) i soli azotu (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) w pożywce (25%, 50% według składu pożywki MS) oraz temperatury (+15°C, +20°C) na liczbę korzeni (A) i na procent pędów ukorzenionych (B) *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. rosnących *in vitro*. Objaśnienia: auksyny zawarte w pożywce do ukorzeniania – IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg l<sup>-1</sup>; średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) według testu t-Duncana.

Fig. 4. The influence of sucrose concentration (10, 30, 50 and 70 g l<sup>-1</sup>) and nitrogen salts (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) in the medium (25%, 50% according to the MS medium), and temperature (+15°C, +20°C) on the number of roots (A) and percentage of rooted shoots (B) of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. Explanations: auxins in the rooting medium – IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg l<sup>-1</sup>. Means followed by the same letter do not differ at 5% level of significance t-Duncan's test.

kultury *in vitro* uzyskane z różnych siewek *H. niger* wykazywały duże zróżnicowanie w liczbie namnażanych pędów (Seyring 2002). W przypadku *H. purpurascens* największy współczynnik namnażania wyniósł – 2,3 pędy/eksplantat.

Stosowane regulatory wzrostu oraz temperatura istotnie wpływały na liczbę i wzrost liści

*H. purpurascens in vitro* (Ryc. 2A,B i Ryc. 3). Zdecydowanie więcej liści wyrastało na pędach rosnących w obecności cytokinin podanych łącznie z GA<sub>3</sub> lub/i IBA w porównaniu z kontrolą (bez regulatorów wzrostu). Dodanie do pożywki samych cytokinin lub tylko gibereliny także słabiej wpływało na wyrastanie nowych liści.



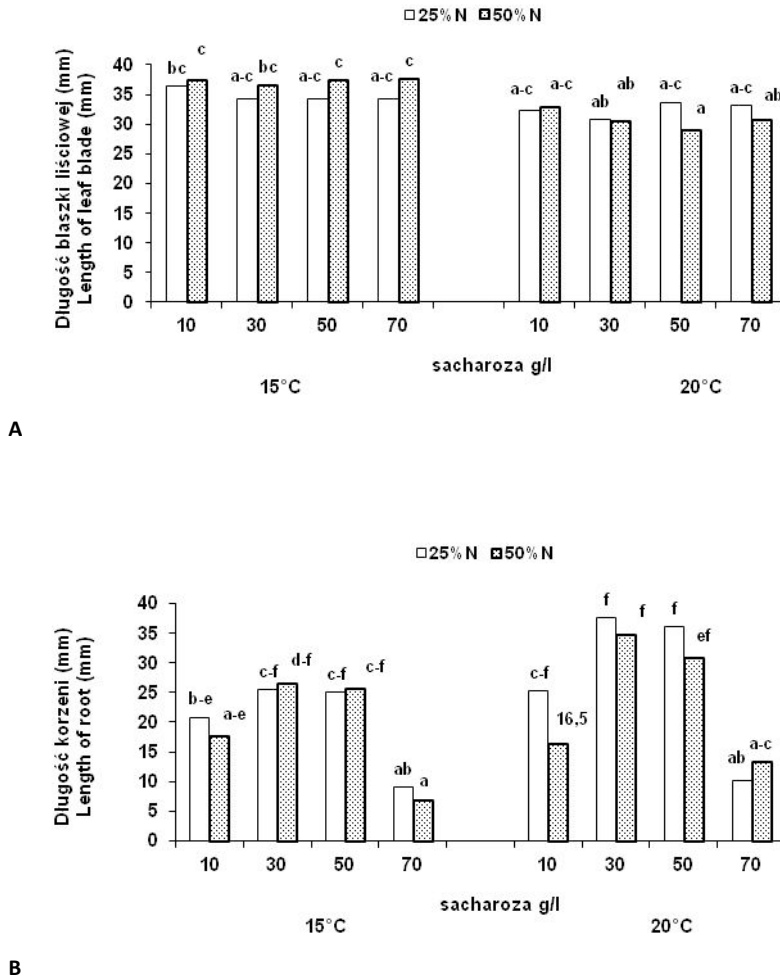
Ryc. 5. Wpływ stężenia sacharozy (10, 30, 50 i 70 g l<sup>-1</sup>) i soli azotu (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) w pożywce (25%, 50% według składu pożywki MS) oraz temperatury (+15°C, +20°C) na ogólną liczbę liści (A) i liczbę liści starzejących się (B) u *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. rosnących *in vitro*. Patrz objaśnienia Ryc. 4.

Fig. 5. The influence of sucrose concentration (10, 30, 50 and 70 g l<sup>-1</sup>) and nitrogen salts (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) in the medium (25%, 50% according to the MS medium), and temperature (+15°C, +20°C) on the number of leaves (A) and the number of senescent leaves (B) of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. See explanations Fig. 4.

Kultury pędów rosnące w temperaturze +20°C charakteryzowały się słabszym wzrostem wydłużeniowym liści.

W dotychczas opublikowanych pracach dotyczących rozmnażania *in vitro* ciemierników badania nad ukorzeniem pędów prowadzono w warunkach *ex vitro*, jak i *in vitro* (Seyring 2002, Poupet et al. 2006, Dhooghe, Van Labeke 2007). Uzyskano pozytywne wyniki

nad połączeniem fazy ukorzenia *ex vitro* z aklimatyzacją mikrosadzonek u kilku gatunków ciemiernika: *H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. niger* i *H. orientalis* (Dhooghe, Van Labeke 2007). Pędy przed posadzeniem umieszczano w temperaturze +5°C i moczoło przez okres jednego tygodnia w roztworze mieszaniny IBA 3 mg l<sup>-1</sup> i NAA 1 mg l<sup>-1</sup> w celu zaindukowania korzeni, a następnie umieszczano je w podłożu

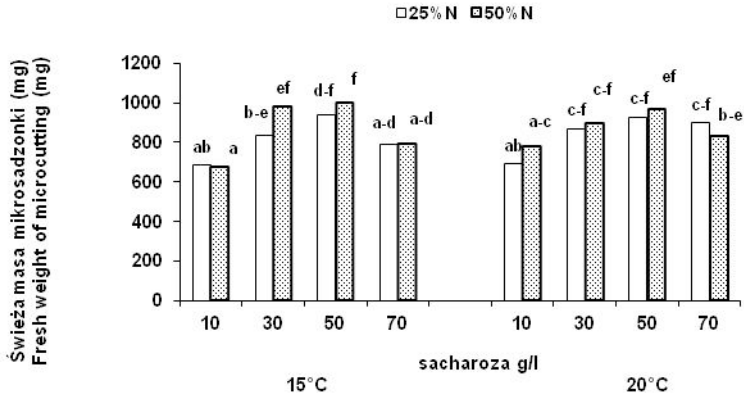


Ryc. 6. Wpływ stężenia sacharozy (10, 30, 50 i 70 g l<sup>-1</sup>) i soli azotu (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) w pożywce (25%, 50% według składu pożywki MS) oraz temperatury (+15°C, +20°C) na długość blaszki liściowej (A) i korzeni (B) u mikrosadzonek *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. Patrz objaśnienia Ryc. 4.

Fig. 6. The influence of sucrose concentration (10, 30, 50 and 70 g l<sup>-1</sup>) and nitrogen salts (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) in the medium (25%, 50% according to the MS medium), and temperature (+15°C, +20°C) on the length of leaf blade (A) and root (B) on microcuttings of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. See explanations Fig. 4.

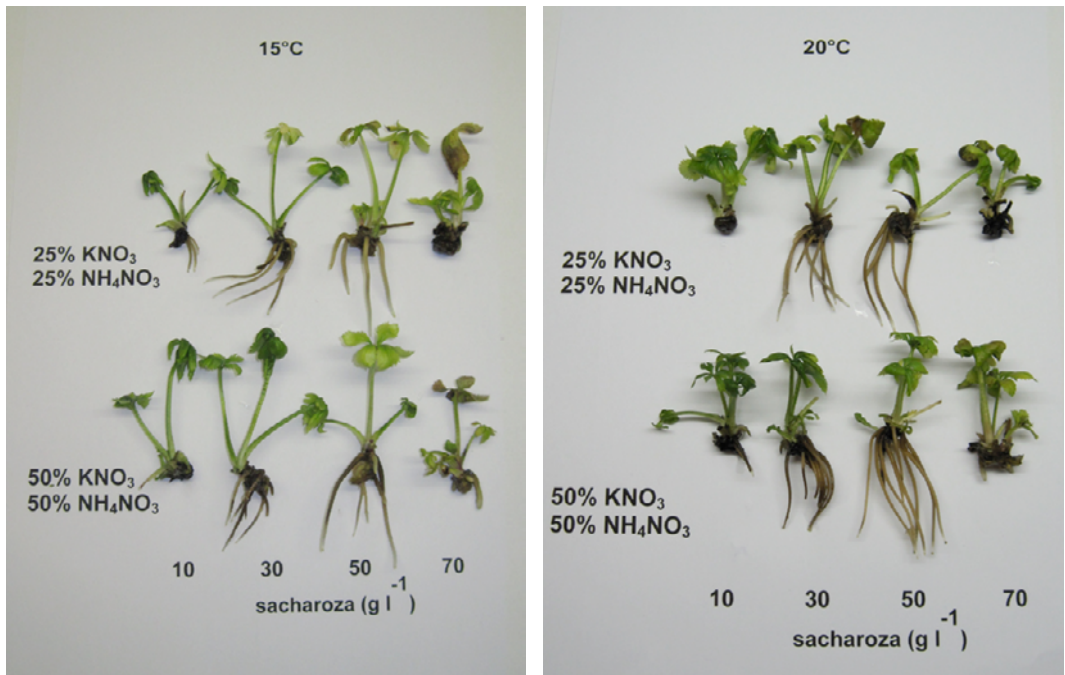
w warunkach wysokiej wilgotności. W kulturach *in vitro* badano wpływ różnych auksyn (IAA, IBA, NAA) i sposobów ich podawania na ukorzenianie pędów *H. niger* (Seyring 2002, Poupet et al. 2006). Seyring (2002) stwierdził, że pędy *H. niger* lepiej ukorzeniały się *in vitro* w obecności IBA, w porównaniu z NAA. Najwięcej pędów ukorzenionych (96,4%) stwierdzono po 8 tygodniach wzrostu pędów w obecności 1 mg l<sup>-1</sup>

IBA. Natomiast IBA w stężeniu 3 mg l<sup>-1</sup> najsilniej stymulował różnicowanie korzeni; powstawało średnio 4,5 korzenia/pęd. Poupet i wsp. (2006) obserwowali korzystny wpływ IAA na ukorzenianie pędów *H. niger* w porównaniu z działaniem IBA lub NAA. Jednak proces powstawania korzeni przebiegał w dwu fazach: I faza (2 tyg.) – indukcja wydłużania pędów i powstanie zawiązków korzeni (IAA 0,2 mg l<sup>-1</sup>, ciemność, 16°C); II



Ryc. 7. Wpływ stężenia sacharozy (10, 30, 50 i 70 g l<sup>-1</sup>) i soli azotu (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) w pożywce (25%, 50% według składu pożywki MS) oraz temperatury (+15°C, +20°C) na wzrost świeżej masy mikrosadzonek *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. *in vitro*. Patrz objaśnienia Ryc. 4.

Fig. 7. The influence of sucrose concentration (10, 30, 50 and 70 g l<sup>-1</sup>) and nitrogen salts (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) in the medium (25%, 50% according to the MS medium), and temperature (+15°C, +20°C) on the growth of fresh weight of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. microcuttings *in vitro*. See explanations Figs. 4.

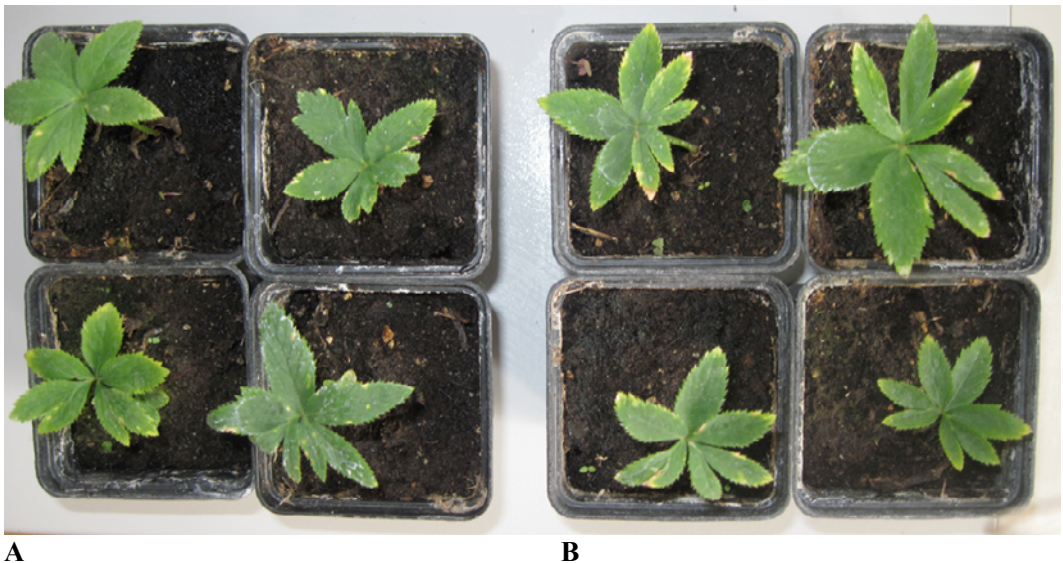


Ryc. 8. Wpływ stężenia sacharozy (10, 30, 50 i 70 g l<sup>-1</sup>) i soli azotu (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) w pożywce (25%, 50% według składu pożywki MS) oraz temperatury (+15°C, +20°C) na ukorzenie *in vitro* pędów *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit.

Fig. 8. The influence of sucrose concentration (10, 30, 50 and 70 g l<sup>-1</sup>) and nitrogen salts (KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) in the medium (25%, 50% according to the MS medium), and temperature (+15°C, +20°C) on the rooting *in vitro* of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit.

faza (4 tyg.) – rozwój systemu korzeniowego (IAA 1 mg l<sup>-1</sup>). Wydajność etapu ukorzenia pędów zawierała się w przedziale od 86% do 96%. W przypadku *H. purpurascens* analizowano wpływ różnych czynników (poziom sacharozy, zawartość soli azotu w pożywce, temperatura) na powstawanie korzeni na pędach rosnących *in vitro* w obecności mieszaniny egzogennych auksyn: IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg l<sup>-1</sup>. Spośród wszystkich badanych czynników sacharoza oddziaływała najsilniej na proces rizogenezy. Wzrost stężenia sacharozy (30 i 50 g l<sup>-1</sup>) w pożywce znacząco wpływał na zwiększenie liczby korzeni, a najwięcej ich powstawało (4,0–4,6 korzeni/pęd) na pędach rosnących w temperaturze +20°C. Zastosowanie soli azotu w stężeniu 50% (wg składu pożywki MS) korzystnie wpływało na powstawanie korzeni na pędach rosnących w obecności sacharozy w stężeniu 30 g l<sup>-1</sup> (Ryc. 4A i Ryc. 8). Sacharoza w stężeniach 30 i 50 g l<sup>-1</sup> w największym stopniu wpływała na wzrost świeżej masy mikrosadzonek i stymulowała liczbę ukorzenionych pędów (około 90%), jednak więcej

pędów ukorzeniało się w temperaturze +15°C niż w +20°C (Ryc. 4B i Ryc. 7). Natomiast sacharoza zastosowana zarówno w najniższym (10 g l<sup>-1</sup>), jak i najwyższym stężeniu (70 g l<sup>-1</sup>) silnie hamowała proces rizogenezy na pędach rosnących w obydwu temperaturach (Ryc. 4A,B i Ryc. 8). Poziom soli azotu w pożywce nie wpływał istotnie na ten proces. Współdziałanie sacharozy i soli azotu obecnych w pożywce oraz temperatury stwierdzono podczas formowania korzeni u *P. lactiflora* odmiany ‘Jadwiga’ (Gabryszewska 2009). W temperaturze +20°C, przy wyższym poziomie azotu (50% wg MS), wzrost stężenia sacharozy znacząco zwiększał liczbę korzeni na pędach piwonii, natomiast w obecności niższego stężenia soli azotowych (25% wg MS), liczba korzeni była na podobnym poziomie niezależnie od stężenia sacharozy w pożywce. W przypadku wzrostu pędów piwonii w wysokiej temperaturze (+25°C) wyższy poziom azotu sprzyjał ukorzenianiu, a wzrost stężenia sacharozy przy tym poziomie soli azotu hamował ukorzenianie. Wzajemne oddziaływanie sacharozy i soli azotu obserwowano także



Ryc. 9. Rośliny ciemiernika purpurowego (*Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit.) pochodzące z rozmnażania *in vitro*. Pędy ukorzeniano na pożywce zawierającej sacharozę w stężeniu 30 g l<sup>-1</sup> i KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (50% według składu pożywki MS) w temperaturze +15°C (A) lub +20°C (B).

Fig. 9. Plants of *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. propagated *in vitro*. Shoots were rooted on the media with 30 g l<sup>-1</sup> sucrose and KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (50% according to the MS medium) and temperature +15°C (A) or +20°C (B).

w procesie tworzenia korzeni *in vitro* u pędów róży odmiany ‘Improved Blaze’ (Hyndman et al. 1982). Wzrost stężenia sacharozy stymulował rizogenezę na pędach róż zarówno w obecności niskiego poziomu azotu (12,5% zawartości wg składu MS), jak i przy wysokiej dawce (100% zawartości wg składu MS), przy czym sacharoza znosiła hamujące działanie wysokiej zawartości soli azotu w pożywce i stymulowała ukorzenianie.

Wzrost wydłużeniowy korzeni ciemiernika purpurowego *in vitro* w największym stopniu zależał od stężenia sacharozy w pożywce (Ryc. 6B). Najdłuższe korzenie powstawały w temperaturze +20°C na pędach ukorzenianych w obecności sacharozy w stężeniach 30 i 50 g l<sup>-1</sup> i przy niskiej zawartości soli azotu w pożywce (25% wg składu pożywki MS). Najwyższy poziom sacharozy w pożywce (70 g l<sup>-1</sup>) bardzo silnie hamował wzrost korzeni.

Proces starzenia się liści na ukorzenianych mikrosadzonkach *H. purpurascens* istotnie zależał od poziomu sacharozy i soli azotu (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> i KNO<sub>3</sub>) w pożywce zawierającej auksyny: IBA 1 mg l<sup>-1</sup> + NAA 0,1 mg l<sup>-1</sup> (Ryc. 5B). Najwięcej liści (0,6 –1,0 liścia/pęd) z objawami starzenia stwierdzono w kulturach pędów rosnących w temperaturze +15°C na pożywkach o wysokiej zawartości sacharozy (50 i 70 g l<sup>-1</sup>) i przy niskim poziomie azotu (25% wg składu pożywki MS). Natomiast nie wykazano istotnego wpływu badanych czynników na ogólną liczbę liści i ich wzrost podczas ukorzeniania pędów (Ryc. 5A i Ryc. 6A). Starzenie się liści na mikrosadzonkach *H. purpurascens* zależało od wzajemnej relacji sacharozy i soli azotu w pożywce. Wysoki poziom sacharozy w stosunku do niskiej zawartości soli azotu najsilniej indukował proces starzenia się liści. U wielu innych gatunków wykazano, że wysoka relacja C/N wpływa na represję genów odpowiedzialnych za fotosyntezę i indukuje starzenie się liści (Paul, Driscoll 1997, Martin et al. 2002, Wingler et al. 2006, Araya et al. 2010).

Aklimatyzacja mikrosadzonek *H. purpurascens* w szklarni zależała od stężenia sacharozy i soli azotu stosowanych w pożywce podczas fazy ukorzeniania. Mikrosadzonki ukorzeniane na pożywce zawierającej sacharozę w stężeniu 30 g l<sup>-1</sup>

i 50% poziomu soli azotu (wg składu pożywki MS) wykazywały najlepszą zdolność przeżywania w warunkach szklarniowych (Ryc. 9). Jednak tylko kilkanaście roślin z tego traktowania podjęło wzrost po wcześniejszym chłodzeniu (+5°C) przez okres 2 miesięcy. Rośliny pochodzące z innych kombinacji zamierały w trakcie chłodzenia lub podczas procesu aklimatyzacji. Podobne problemy z aklimatyzacją mikrosadzonek stwierdzono u piwonii chińskiej (Gabryszewska 2009).

Podsumowując należy podkreślić, że spośród wszystkich analizowanych czynników (regulatory wzrostu, stężenie sacharozy, poziom NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> i KNO<sub>3</sub> w pożywce, temperatura) główną rolę w procesie uaktywniania pąków kątowych i rozwoju pędów bocznych u *H. purpurascens* odgrywają cytokiny i ich współdziałanie z GA<sub>3</sub> i/lub IBA. Natomiast egzogenna sacharoza stymuluje ukorzenianie pędów w obecności auksyn, ale równocześnie indukuje proces starzenia liści. Wysokie stężenie tego cukru wpływa także hamująco na indukcję i wzrost korzeni.

Przedstawione wyniki wskazują na możliwość rozmnażania *in vitro* *Helleborus purpurascens*. Niezbędne są jednak dalsze prace badawcze dotyczące zwiększenia zdolności aklimatyzacji mikrosadzonek w szklarni i ich wzrostu w dalszej uprawie. Mikro-rozmnażanie ciemiernika purpurowego może mieć zastosowanie w masowym rozmnażaniu tej rośliny dla celów ozdobnych lub leczniczych, co pozwoli na jej rozpowszechnienie. Rozmnażanie *in vitro* może być także jedną z form ochrony *Helleborus purpurascens ex situ*. Metody biotechnologiczne, w tym kultury *in vitro*, odgrywają znaczącą rolę w ochronie gatunkowej roślin (Rybczyński, Mikuła 2006, Engelman 2011, Mikuła et al. 2013). Są bardzo dobrym sposobem rozmnażania wielu gatunków zagrożonych i chronionych oraz ich długotrwałego utrzymywania w bankach genów. W Serbii opracowano metodę rozmnażania *in vitro* *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit., gatunku zagrożonego, biorąc pod uwagę różne jej zastosowania. Metoda ta będzie wykorzystana w celu zachowania tego gatunku, jak również do rozpowszechniania tej rośliny ze względu na walory dekoracyjne (Marković et al. 2013).

## LITERATURA

- ARAYA T., NOGUCHI K., TERASHIMA I. 2010. Effect of nitrogen nutrition on the carbohydrate repression of photosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Research* **123**(3): 371–379.
- BERUTO M., VIGLIONE S., BISIGNANO A. 2013. Micropropagation of *Helleborus* through axillary budding. *Methods in Molecular Biology* **994**: 259–267.
- BOCHENEK P. 1998. Uwagi o rozmieszczeniu *Helleborus purpurascens* (*Ranunculaceae*) w Bieszczadach Zachodnich (Karpaty Wschodnie). *Fragm. Florist. Geobot. Polon.* **5**: 89–99.
- CABOCHE M. 1987. Nitrogen, carbohydrate and zinc requirements for the efficient induction of shoot morphogenesis from protoplast-derived colonies of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **8**(3): 197–206.
- CHAO W. S., ANDERSON J. V., HORVATH D. P. 2000. Sugar plays a role in inhibition of underground adventitious bud growth in leafy spurge (*Euphorbia esula*). *Plant Physiol.* **124** (Suppl.): 46.
- DHOOGHE E., VAN LABEKE M. C. 2007. *In vitro* propagation of *Helleborus* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **91**: 175–177.
- ENGELMAN F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **47**(1): 5–16.
- FAY M. F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **28**(1): 1–4.
- GABRYSZEWSKA E. 2009. Rola regulatorów wzrostu, węglowodanów, soli mineralnych, glutationu i temperatury w rozmnażaniu *in vitro* piwonii chińskiej. Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa. Monografie i Rozprawy. Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice.
- GABRYSZEWSKA E. 2010. The effects of glucose and growth regulators on the organogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall. *in vitro*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* **18**(2): 309–320.
- GABRYSZEWSKA E. 2013. Rozmnażanie *in vitro* ciemiernika białego (*Helleborus niger* L.). Oferta wdrożeniowa. Ogólnopolska konferencja wdrożeniowa Nauka – Praktyce „Innowacyjne technologie dla polskiego ogrodnictwa”, Skierniewice, 10 grudnia 2013. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, s. 95–96.
- GABRYSZEWSKA E. 2014. Ciemierniki. Byliny zakwitające zimą. *Zieleń to Życie* **1**(9): 36–43.
- GABRYSZEWSKA E., KAWA-MISZCZAK L., WĘGRZYNOWICZ-LESIAK E., SANIEWSKI M. 2008. Wpływ temperatury oraz zróżnicowanego poziomu węgla/azotu w pożywce na wzrost i rozwój *Clematis pitcheri* *in vitro*. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* **524**: 73–81.
- GIBSON S. I. 2005. Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 93–102.
- GRABOWSKA B., KUBALA T. 2011. HELLEBORUS L. W: B. GRABOWSKA, T. KUBALA, Encyklopedia bylin, 1. Zysk i S-ka Wydawnictwo, Poznań, s. 439–442.
- HORVATH D. P., ANDERSON J. V., CHAO W. S., FOLEY M. E. 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends in Plant Science* **8**: 534–541.
- HYNDMAN S. E., HASEGAWA P. M., BRESSAN R. A. 1982. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultured rose shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **1**(1): 229–238.
- KĄZMIERCZAKOWA R., ZARZYCKI K. (red.) 2001. Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Wyd. 2. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków.
- KROMER K., ŻOŁNIERZ L., RAJ A., KWIAKOWSKI P., POTURALA D., BĄKIEWICZ M. J. 2007. Rozmnażanie w warunkach *in vitro* i zachowanie zasobów genowych rzeżuchy rezedolistnej (*Cardamine resedifolia*) z Karkonoskiego Parku. W: J. ŚTURSA, R. KNAPIK (eds), Geoekologiczne problemy Krkonoš. Sborn. Mez.Věd. Konf. říjen 2006. Svoboda n. Úpou. *Opera Corcontica* **44**(1): 317–326.
- MARKOVIĆ M., GRBIĆ M., DJUKIĆ M. 2013. Micropropagation of the endangered and decorative species *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41**(2): 370–377.
- MARSZAŁ J., KROMER K. 2004. Zastosowanie kultur *in vitro* w ochronie rzadkich i ginących gatunków paproci serpentynitowych z Dolnego Śląska. *Biotechnologia* **2**(65): 237–243.
- MARSZAŁ-JAGACKA J., KROMER K., ŚWIERKOSZ K. 2005. Ochrona *ex situ* zagrożonych gatunków paproci z rodzaju *Asplenium* przy wykorzystaniu kultur *in vitro*. *Biuletyn Ogrodów Botanicznych* **14**: 35–42.
- MARTIN T., OSWALD O., GRAHAM I. A. 2002. *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Pl. Physiol.* **128**(2): 472–481.
- MATHEW B. 1989. Hellebores. Edited by R. BIRD. Alpine Garden Society Publications, Ipswich.
- MEINERS J., DEBENER T., SCHWEIZER G., WINKELMANN T. 2011. Analysis of the taxonomic subdivision within the genus *Helleborus* by nuclear DNA content and genome-wide DNA markers. *Sci. Hort.* **128**: 38–47.
- MIKULA A., MAKOWSKI D., TOMICZAK K., RYBCZYŃSKI J. J. 2013. Kultury *in vitro* i krioprezewacja w zachowaniu różnorodności roślin – standardy dla banku genów. *Polish Journal of Agronomy* **14**: 3–17.
- MIREK Z., PIĘKOŚ-MIRKOWA H. (red.) 2008. Czerwona księga Karpat Polskich. Rośliny naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków.

- MIREK Z., ZARZYCKI K., WOJEWODA W., SZELĄG Z. (eds) 2006. Red list of plants and fungi in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- MITKA J., BOCHENEK P. 1998. Ciemiernik czerwony *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. w Polsce. *Chrońmy Przyr. Ojczystą* **54**(2): 18–27.
- MITKA J., MICHALIK S. 2008. Ciemiernik czerwony (C. purpurowy) – *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. W: Z. MIREK, H. PIĘKOŚ-MIRKOWA (red.), Czerwona księga Karpat Polskich. Rośliny naczyniowe. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków, str. 89–91.
- MITKA J., BOCHENEK P., MICHALIK S. 2001. *Helleborus purpurascens* Waldst. et Kit. – ciemiernik czerwony. W: R. KAŻMIERCZAKOWA, K. ZARZYCKI (red.), Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe. Wyd. 2. Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków, s. 119–120.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* **15**(3): 473–497.
- NOWICKE J. W., SKVARLA J. J. 1983. A palynological study of the genus *Helleborus* (*Ranunculaceae*). *Grana* **22**: 129–140.
- NUNES-NESE A., FERNIE A. R., STITT M. 2010. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant* **3**(6): 937–996.
- OGURA-TSUJITA Y., OKUBO H. 2006. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **42**: 614–616.
- OLACZEK R. 1998. Ochrona polskiej flory. W: R. OLACZEK, zdjęcia W. ŁAPIŃSKI, Przyroda Polski pod ochroną. Zarząd Główny Ligi Ochrony Przyrody – Wydawnictwo, Warszawa, s. 15–22.
- PAUL M. J., DRISCOLL S. P. 1997. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant, Cell and Environment* **20**: 110–116.
- PENCE V. C. 2011. Evaluation costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **47**: 176–187.
- PENCE V. C., CHARLS S. M., PLAIR M. A., JASKOWIAK M. A., WINGET G. D., CLEVELAND L. L. 2006. Integrating *in vitro* methods for propagating and preserving endangered plants. W: Z. XU, J. LI, Y. XUE, W. YANG (eds.), Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond. Proceedings of the 11th IAPTC&B Congress, August 13–18, 2006 Beijing, China. Springer, Dordrecht, The Netherlands, s. 363–373.
- POUPET R., CARDIN L., HENRI A., ONESTO J. P. 2006. Healthy *in vitro* propagation by meristem tip culture of *Helleborus niger*'s selected clone for cut flower. *Acta Horticulturae* **725**: 301–310.
- RALSKA-JASIEWICZOWA M. 1960. *Helleborus purpurascens* W. K. – nowy dla flory polskiej gatunek z Bieszczadów Zachodnich. *Helleborus purpurascens* W. K. – a new species for the Polish flora from the Bieszczady Zachodnie (East Carpathians). *Fragm. Florist. Geobot.* **6**(4): 497–500.
- ROLLAND F., BAENA-GONZALEZ E., SHEEN J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 675–709.
- RYBCZYŃSKI J. J., MIKULA A. 2006. Engagement of biotechnology in the protection of threatened plant species in Poland. *Biodivers. Res. Conservation* **3–4**: 361–368.
- SARASAN V., CRIPPS R., RAMSAY M. M., ATHERTON C., MCMICHEN M., PRENDERGAST G., ROWNTREE J. K. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* **42**: 206–214.
- SEYRING M. 2002. *In vitro* cloning of *Helleborus niger*. *Pl. Cell Rep.* **20**: 895–900.
- SHIMADA T., OTANI M., MORI M. 2000. *In vitro* propagation and recovery of a habitat of *Habenaria radiata* (*Orchidaceae*). *Acta Hort.* **560**: 481–484.
- STARCK Z. 2006. Różnorodność funkcji węgla i azotu w roślinach. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych* **55**(2/3): 243–257.
- SUDER D. 2010. Nowe stanowisko *Helleborus purpurascens* (*Ranunculaceae*) w Bieszczadach Zachodnich. *Fragm. Florist. Geobot. Polonica* **17**(1): 185–187.
- SZUCKI P. 1982. Nowe stanowisko *Helleborus purpurascens* (*Ranunculaceae*) w Bieszczadach Zachodnich. *Chrońmy Przyr. Ojczystą* **38**(6): 96–97.
- TAYLOR J. L. S., VAN STADEN J. 2001. The effect of nitrogen and sucrose concentration on the growth of *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt. plantlets *in vitro*, and on subsequent anti-inflammatory activity in extracts prepared from the plantlets. *Plant Growth Regulation* **34**: 49–56.
- TUTIN T. G. 1964. *Ranunculaceae*. W: T. G. TUTIN, V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS, D. A. WEBB (eds), Flora Europaea, 1. Cambridge Univ. Press, Cambridge, s. 206–242.
- WINGLER A., PURDY S., MACLEAN A., POURTAU N. 2006. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* **57**(2): 391–399.
- ZHENG Z. L. 2009. Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior* **4**(7): 584–591.
- ZONNEVELD B. J. M. 2001. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (*Ranunculaceae*) discriminate between species and sectional divisions. *Pl. Syst. Evol.* **229**(1–2): 125–130.