

Bożena Matysiak, Joanna Nowak

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

Anatomiczna i fizjologiczna charakterystyka roślin ozdobnych rozmnożonych in vitro

Wstęp

Metoda in vitro jest jedną z podstawowych metod rozmnażania wielu roślin użytkowych, a szczególnie roślin ozdobnych. Mikrorozmnażanie stwarza możliwość uzyskania dużej liczby jednolitego, wolnego od chorób materiału roślinnego w stosunkowo krótkim czasie. Eliminuje także potrzebę utrzymywania energochłonnych mateczników w szklarniach, daje możliwość produkcji całorocznej, a materiał roślinny rozmnożony in vitro może być łatwo transportowany.

Rośliny rozmnożone in vitro różnią się znacznie od roślin rozmnożonych sposobami tradycyjnymi. Specyficzna jest ich budowa anatomiczna, morfologiczna, jak również funkcjonowanie, co wynika z warunków wzrostu in vitro. Mikrorozmnażanie prowadzone jest w zamkniętych pojemnikach, w atmosferze nasyconej parą wodną oraz przy niskim natężeniu napromieniowania. Rośliny rosną na pożywkach zawierających makro- i mikroelementy, regulatory wzrostu oraz cukier, który jest źródłem węgla i energii dla procesów życiowych. Skład atmosfery w pojemnikach podczas wzrostu roślin ulega znacznym zmianom w ciągu doby. W nocy zwiększa się stężenie dwutlenku węgla wydzielanego przez rośliny w procesach oddechowych. W ciągu dnia stężenie dwutlenku węgla w atmosferze pojemnika spada, osiągając wartości zbliżone do punktu kompensacyjnego [42].

Mikrorozmnażanie jest nierozłącznie związane z koniecznością aklimatyzacji roślin do warunków, w jakich będą rosły w kolejnych etapach. Znajomość procesów zachodzących w roślinach rozmnożonych in vitro może ułatwić aklimatyzację, której prawidłowy przebieg często decyduje o powodzeniu mikrorozmnażania. Praca omawia zagadnienia dotyczące budowy morfologicznej i anatomicznej roślin pochodzących z kultur in vitro oraz ich gospodarke wodną i aktywność fotosyntetyczną.

Budowa anatomiczna roślin mnożonych in vitro

Zewnętrzna powierzchnia ścian komórkowych epidermy pokryta jest kutykulą, która chroni organy nadziemne roślin przed utratą wody oraz szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych. Przenikanie wody przez kutykulę uzależnione jest głównie od struktury oraz ilości wosków [23]. Rośliny mnożone in vitro pokryte są cieńszą warstwą kutykuli [24, 29, 30], mają również mniej wosku kutykularnego [18, 24] w porównaniu z roślinami zaaklimatyzowanymi do warunków szklarniowych. Analiza składu chemicznego wosku kutykularnego mikrosadzonek *Brassica oleracea* wykazała, że składa się on w większości ze składników polarnych (kwasów tłuszczowych, alkoholi pierwszorzędowych, aldehydów i estrów), natomiast zawiera mniej acyklicznych węglowodorów nasyconych i alkoholi drugorzędowych [43]. Większa zawartość składników polarnych w wosku umożliwia lepsze przenikanie pary wodnej.

Tworzenie oraz skład chemiczny kutykuli uzależniony jest od warunków środowiska, w jakich rosną rośliny [22]. Zmniejszenie wilgotności względnej powietrza in vitro stymuluje tworzenie wosku kutykularnego [46]. Zastosowanie czynników indukujących stres wodny, np. zwiększenie stężenia agaru i dodatek glikolu polietylenowego do pożywki, hamuje wzrost, ale przyspiesza formowanie wosku na liściach *Chrysanthemum morifolium* i *Brassica oleracea* in vitro [40].

Rośliny mnożone in vitro charakteryzują się słabym zróżnicowaniem tkanki miększowej liści na warstwę palisadową i gąbczastą oraz dużą liczbą przestworów międzykomórkowych [2, 3, 12, 27, 30, 34, 41, 47, 48]. Komórki miększowe liści *Liquidambar styraciflua* mają w warunkach in vitro większe wakuole, mniejszą ilość cytoplazmy oraz spłaszczone i bezgranowe chloroplasty w porównaniu z komórkami miększowymi liści roślin zaaklimatyzowanych do warunków szklarniowych [47]. Niewłaściwym kształtem chloroplastów oraz mniejszą zawartością chlorofilu charakteryzują się mikrosadzonki *Pelargonium zonale*, *Rosa rugosa* i *Spathiphyllum floribundum* [34].

Budowa anatomiczna liści powstałych z zawiązków liściowych zainicjowanych in vitro ulega nieznacznym modyfikacjom w warunkach ex vitro. Fabri i in. [15] wykazali, że liście *Fragaria x ananassa* powstałe in vitro stają się grubsze i większe po kilkudniowej aklimatyzacji, lecz nie zmienia się liczba warstw komórek palisadowych oraz liczba przestworów międzykomórkowych. Autorzy sugerują, że zwiększenie grubości oraz wielkości liści spowodowane jest zwiększeniem rozmiaru komórek, a nie ich liczby. Zmiany obserwowane w liściach *Prunus cerasus* po kilkudniowej aklimatyzacji — to podwójna warstwa komórek palisadowych i mniej przestworów międzykomórkowych [30]. Zwiększenie natężenia napromieniowania z 50 do $315 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ w warunkach in vitro, jak również ex vitro zmniejsza liczbę przestworów międzykomórkowych oraz przyczynia się do powstawania typowego układu gran w chloroplastach *Liquidambar styraciflua* [27].

Aparaty szparkowe roślin mnożonych in vitro wystają ponad powierzchnię epidermy, a komórki przyszparkowe są zaokrąglone w porównaniu z zagłębionymi i

eliptycznymi komórkami przysparkowymi roślin rosnących w szklarni [1, 4; 12, 27, 48]. W warunkach *in vitro* aparaty szparkowe występują na górnej i dolnej powierzchni liści *Rubus idaeus* [12], a liczba aparatów szparkowych w przeliczeniu na jednostkę powierzchni liścia jest większa u *Liquidambar styraciflua* [48], *Malus domestica* [1] i *Rosa hybrida* [4], natomiast mniejsza u *Prunus insititia* [2] w porównaniu z roślinami rosnącymi w szklarni. Komórki przysparkowe roślin *in vitro* zawierają więcej skrobi i chloroplastów [29, 30].

Aparaty szparkowe roślin *in vitro* nie są zdolne do zamykania się w pierwszym etapie po wyjęciu "ze szkła" [2, 52]. Zastosowanie czynników indukujących szybkie zamykanie aparatów szparkowych, takich jak: ciemność, Ca^{+2} , mannitol, ABA, zwiększenie stężenia CO_2 w atmosferze, było nieskuteczne [48, 52].

Nieprawidłowe funkcjonowanie aparatów szparkowych przypisywane jest niewłaściwej strukturze ścian komórek przysparkowych, które zawierają mniej kutyny, pektyn oraz celulozy [52], nieprawidłowej strukturze mikrofibryli celulozowych [29, 30, 52] oraz słabej selektywności w akumulowaniu jonów potasu i magnezu przez komórki przysparkowe [45].

Odmienna budowa oraz funkcjonowanie aparatów szparkowych roślin mnożonych *in vitro* wynika z warunków środowiska, w jakich mnożone są rośliny. Zwiększenie natężenia napromieniowania oraz zmniejszenie wilgotności *in vitro* zmniejsza liczbę aparatów szparkowych na jednostce powierzchni liści oraz powoduje, że są one zagłębione i mają eliptyczny kształt [4, 27]. Stymulację zamykania aparatów szparkowych uzyskano poprzez zwiększenie różnicy ciśnienia pary wodnej pomiędzy liśćmi a atmosferą *in vitro* [17], zmniejszenie wilgotności powietrza *in vitro* [29, 46] oraz obniżenie stężenia soli przy równoczesnym zwiększeniu stężenia agaru w pożywce [52]. Zdolność aparatów szparkowych mikrosadzonek *Malus domestica* do zamykania się zwiększa się po 5–6 dniach aklimatyzacji, a proces ten przyspiesza zmniejszona do 30–40% względna wilgotność powietrza [2].

Rośliny mnożone *in vitro* są wiotkie, ponieważ zawierają mniejszą ilość tkanek wzmacniających: kolenchymy i sklerenchymy. Cienka jest również warstwa perydermy [13]. Tkanka ksylemowa w miejscu połączenia pędu i korzeni u *Brassica oleracea* charakteryzuje się niewłaściwą strukturą, co utrudnia przepływ wody do liści [18]. Natomiast struktura i funkcjonowanie tkanki ksylemowej w miejscu połączenia pędu i korzeni *Prunus cerasus* są prawidłowe [29, 30]. Korzenie powstałe *in vitro* nie funkcjonują właściwie po przeniesieniu do podłoża *ex vitro* i zastępowane są przez nowe, w pełni funkcjonalne korzenie, które powstają w nowych warunkach [7].

Cechy morfologiczne liści powstałych *in vitro* w niewielkim stopniu ulegają zmianom w warunkach szklarniowych [15, 34]. Jedynie liście, których inicjacja nastąpiła *ex vitro* nie różnią się istotnie od liści roślin mnożonych tradycyjnie [2, 13, 47], co może oznaczać, że całkowita adaptacja mikrosadzonek uzależniona jest od powstawania nowych, w pełni funkcjonalnych liści [2, 14, 15, 19, 34, 47].

Gospodarka wodna roślin mnożonych in vitro

Rośliny mnożone in vitro po wyjęciu "ze szkła" mają trudności w utrzymaniu dodatniego bilansu wodnego, ponieważ ilość pobieranej wody nie rekompensuje ilości wody traczonej w wyniku transpiracji. Liście odcięte od mikrosadzonek *Prunus insititia* tracą ponad 50% całkowitej zawartości wody w ciągu 30 minut, podczas gdy liście odcięte od roślin rosnących w szklarni tracą tę samą ilość wody po 90 minutach [3]. Szybkość utraty wody przez rośliny jest wysoka bezpośrednio po wyjęciu "ze szkła" i zmniejsza się po kilku dniach aklimatyzacji [2].

Przyczynami nadmiernej utraty wody przez mikrosadzonki po wyjęciu "ze szkła" są: specyficzna struktura oraz mechanizm funkcjonowania aparatów szparkowych [2, 17], mała ilość wosku kutykularnego [46, 52], duża ilość polarnych komponentów wosku [43] oraz cienka warstwa kutykuli [29]. Udział transpiracji kutykularnej w transpiracji ogólnej mikrosadzonek może być niewielki [39], co wskazywałoby, że nieodpowiednie funkcjonowanie aparatów szparkowych w większym stopniu przyczynia się do utraty wody przez rośliny po wyjęciu "ze szkła" [37]. Jednakże udział transpiracji kutykularnej w transpiracji ogólnej, a także szybkość utraty wody przez rośliny mogą być różne u różnych gatunków [44]. Przewodność szparkowa oraz kutykularna mikrosadzonek *Malus domestica* jest znacznie większa niż u *Prunus* i *Liquidambar styraciflua* mierzona w tych samych warunkach. Przewodność kutykularna w stosunku do przewodności szparkowej wynosi 6% u *Liquidambar styraciflua* i 55% u *Prunus*. Podczas aklimatyzacji znacznie obniża się przewodność szparkowa *Malus domestica* i *Prunus*.

Transpiracja mikrosadzonek po wyjęciu "ze szkła" uzależniona jest od warunków wzrostu ex vitro. Wysokie natężenie napromieniowania zwiększa przewodność szparkową oraz transpirację mikrosadzonek [31, 34, 49], przez co może negatywnie wpływać na ich aklimatyzację i wzrost, szczególnie w pierwszym etapie wzrostu "poza szkłem", ponieważ narusza bilans wodny roślin. Z kolei podwyższone stężenie dwutlenku węgla w atmosferze zmniejsza przewodność szparkową mikrosadzonek, dzięki czemu mniejsza jest transpiracja [31]. Ten pozytywny efekt obserwuje się w warunkach niskiego natężenia napromieniowania, gdyż wysokie natężenie napromieniowania silnie stymuluje transpirację kutykularną.

Sposobem ograniczającym nadmierną transpirację mikrosadzonek po wyjęciu "ze szkła" może być stymulacja transpiracji in vitro poprzez zwiększenie różnicy ciśnienia pary wodnej pomiędzy liśćmi a atmosferą [17] lub poprzez wymuszoną wentylację pojemników powietrzem o niskiej wilgotności, około 50% [50]. Obniżenie wilgotności względnej powietrza in vitro stymuluje zamykanie aparatów szparkowych oraz przyspiesza powstawanie wosku kutykularnego, co ogranicza utratę wody ex vitro [2, 46]. Zwiększenie różnicy ciśnienia pary wodnej pomiędzy liśćmi a atmosferą in vitro można uzyskać przez pokrycie pożywki cienką warstwą parafiny [46], regulację stężenia agaru w pożywce [7], kondensację pary wodnej na pożywce przy schładzanych spodach pojemników [28], zastosowanie perforowanych przykryć [6] lub użycie desykantów in vitro [52].

Aktywność fotosyntetyczna roślin mnożonych in vitro

Rośliny *Betula* [41], *Brassica oleracea* [19], *Fragaria x ananassa* [20], *Musa cavendishii* [38], *Prunus avium* [36], *Rubus idaeus* [11], *Solanum tuberosum* i *Nicotiana tabacum* [33] charakteryzują się małą aktywnością fotosyntetyczną in vitro. Punkt kompensacyjny CO₂ roślin in vitro jest znacznie wyższy niż roślin zaaklimatyzowanych do warunków szklarniowych i wynosi około 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ dla *Homalomena* [31, 32] i *Nicotiana tabacum* [33], ponad 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ dla *Solanum tuberosum* oraz poniżej 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ dla *Asparagus officinalis* [49]. Świetlny punkt kompensacyjny *Asparagus officinalis* wynosi około 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [49], a punkt wysycenia światłem aparatu fotosyntetycznego *Pelargonium zonale* w zakresie 50–80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [34].

Mała aktywność fotosyntetyczna mikrosadzonek oraz intensywne procesy fotooddychania [14] i oddychania [38] powodują, że rośliny w pierwszym okresie po wyjęciu "ze szkła" mogą wykazywać ujemny bilans węglowy [19].

Przyczynami małej aktywności fotosyntetycznej roślin in vitro są niski poziom natężenia napromieniowania, utrudniona wymiana gazowa in vitro [9] oraz obecność cukru w pożywce [5, 21, 40]. Cukier dodawany do pożywek in vitro stymuluje oddychanie roślin oraz podnosi świetlny punkt kompensacyjny [35]. Niska aktywność fotosyntetyczna roślin in vitro na pożywkach zawierających cukier związana jest z akumulacją skrobi w chloroplastach [5] lub wolniejszą regeneracją 1,5-dwufosforybulozy [21]. Aktywność karboksylazy rybulozodwufosforanowej (RuBISCO) w warunkach in vitro na pożywkach zawierających cukier jest mocno ograniczona [5], wzrasta natomiast aktywność karboksylazy fosfoenolopirogronianowej [21].

Aktywność fotosyntetyczna liści powstałych in vitro może się zwiększać [33, 34, 51], pozostawać na tym samym poziomie przez kilka tygodni [8, 49] lub zmniejszać podczas wzrostu ex vitro [11, 19, 20, 49]. Liście powstałe in vitro, których aktywność fotosyntetyczna maleje, ex vitro są źródłem asymilatów dla nowo powstających liści [20].

Wzrost roślin w warunkach ex vitro uzależniony jest od szybkości uaktywniania się centrów reakcji fotochemicznych w liściach powstałych in vitro lub też szybkiego powstawania nowych, w pełni funkcjonalnych liści. Sposobami zwiększającymi aktywność fotosyntetyczną roślin są asymilacyjne doświetlanie oraz dokarmianie roślin dwutlenkiem węgla. Z danych literaturowych wynika, że reakcja gatunków na wysoki poziom natężenia napromieniowania jest różna. Zwiększanie natężenia napromieniowania w pierwszym etapie po transplantacji nie zwiększa natężenia fotosyntezy *Betula* [41], *Homalomena* [31, 32], *Rubus idaeus* [11] i nieznacznie przyspiesza fotosyntezę *Liquidambar styraciflua* [26], natomiast istotnie zwiększa aktywność fotosyntetyczną *Asparagus officinalis* [49], *Chrysanthemum x morifolium* [14], *Cymbidium* [25] i *Fragaria x ananassa* [50]. Badania prowadzone przez Reuthera [34] na *Pelargonium zonale* wykazały, że punkt wysycenia światłem aparatu fotosyntetycznego wzrasta po tygodniowym okresie uprawy ex vitro w warunkach wysokiego

natężenia napromieniowania ($260 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) co oznacza, że liście zainicjowane *in vitro* stopniowo przystosowują się do nowych warunków. Matysiak i Nowak [31, 32] wykazały, iż aktywność fotosyntetyczna mikrosadzonek *Homalomena* uprawianych przez 8 tygodni *ex vitro* w warunkach niskiego natężenia napromieniowania ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) utrzymuje się na podobnym poziomie jak aktywność fotosyntetyczna roślin bezpośrednio po wyjęciu "ze szkła". Natomiast aktywność fotosyntetyczna mikrosadzonek uprawianych przez 8 tygodni przy wysokim natężeniu napromieniowania ($150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) jest znacznie wyższa.

Zwiększenie stężenia dwutlenku węgla zwiększa aktywność fotosyntetyczną mikrosadzonek *Asparagus officinalis* [49], *Cymbidium* [25], *Homalomena* [31, 32], *Pelargonium zonale* i *Spathiphyllum floribundum* [34], *Solanum tuberosum* i *Nicotiana tabacum* [33] oraz przyspiesza ich wzrost w warunkach *in vitro* [14, 16, 31, 32]. Jednocześnie podwyższone stężenie CO_2 zmniejsza fotooddychanie mikrosadzonek [31], przez co korzystnie wpływa na ich bilans węglowy.

Wyniki ostatnich badań wykonanych przez Diaz-Perez i in. [10] wskazują na istnienie ścisłej korelacji pomiędzy natężeniem fotosyntezy a względną zawartością wody w liściach mikrosadzonek. Im większy jest spadek zawartości wody, tym niższa jest aktywność fotosyntetyczna liści. Spadek zawartości wody w mikrosadzonkach po wyjęciu "ze szkła" może oddziaływać niekorzystnie na nowo powstające liście podczas aklimatyzacji i zmniejszać aktywność fotosyntetyczną roślin nawet po kilku tygodniach uprawy *ex vitro* [49]. Świadczy to, iż procesy fizjologiczne zachodzące w mikrosadzonkach są ze sobą ściśle powiązane, co jest prawidłowością dotyczącą nie tylko roślin rozmnożonych *in vitro*.

Podsumowanie

1. Specyficzne warunki środowiska *in vitro* przyczyniają się do powstawania roślin o odmiennej budowie anatomicznej i morfologicznej oraz specyficznym funkcjonowaniu.
2. Mikrosadzonki po wyjęciu "ze szkła" mają trudności w utrzymaniu dodatniego bilansu wodnego ze względu na niezamykające się aparaty szparkowe oraz cienką kutykulę zawierającą mniej wosków.
3. Przyczynami małej aktywności fotosyntetycznej mikrosadzonek są: niski poziom natężenia napromieniowania, utrudniona wymiana gazowa *in vitro* oraz obecność cukru w pożywce.
4. Przed przeniesieniem do warunków naturalnych, mikrosadzonki powinny być aklimatyzowane, aby zminimalizować stres wywołany drastyczną zmianą warunków środowiska.

Literatura

- [1] Blanke M.M., Belcher A.R. 1989. Stomata of apples leaves cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 85–89.
- [2] Brainerd K.E., Fuchigami L.H. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 515–518.
- [3] Brainerd K.E., Fuchigami L.H., Kwiatkowski S., Clark C.S. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. *HortScience* 16: 173–175.
- [4] Capellades M., Fontarnau R., Carulla C., Debergh P. 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 141–145.
- [5] Capellades M., Lemeur R., Debergh P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 21–26.
- [6] Debergh P.C. 1991. Acclimatization techniques of plants from in vitro. *Acta Hort.* 289: 291–300.
- [7] Debergh P.C., Maene L.J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14: 335–345.
- [8] Deng R., Donnelly D.J. 1993. In vitro hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. *HortScience* 28: 1048–1051.
- [9] Desjardins Y., Laforge F., Lussier C., Gosselin A. 1988. Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue-cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Hort.* 230: 45–54.
- [10] Diaz-Perez J.C., Shackel K.A., Sutter E.G. 1995. Effect of in vitro-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120: 435–440.
- [11] Donnelly D.J., Vidaver W.E. 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 177–181.
- [12] Donnelly D.J., Vidaver W.E. 1984 a. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 172–176.
- [13] Donnelly D.J., Vidaver W.E., Lee K.Y. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4: 43–50.
- [14] Dube S.L., Vidaver W. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown in vitro. An automated system for measurement of photosynthesis in vitro. *Physiol. Plant.* 84: 409–416.
- [15] Fabri A., Sutter E., Dunston S.K. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Hort.* 28: 331–337.
- [16] Galzy R., Compan D. 1992. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 239–244.
- [17] Ghashghaie J., Brenckmann F., Saugier B. 1992. Water relations and growth of rose plants cultured in vitro under various relative humidities. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 51–57.
- [18] Grout B.W.W., Aston M.J. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* 17: 1–7.
- [19] Grout B.W.W., Aston M.J. 1978. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.* 17: 65–71.
- [20] Grout B.W.W., Millam S. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Ann. Bot.* 55: 129–131.
- [21] Hdider C., Desjardins Y. 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 27–33.

- [22] Hull H.M., Morton H.L., Wharrie J.R. 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *Bot. Rev.* 41: 421–451.
- [23] Jeffree C.E., Baker E.A., Holloway P.J. 1975. Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. *New Phytol.* 75: 539–549.
- [24] Johansson M., Kronstedt-Robards E.C., Robards A.W. 1992. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. *Protoplasma* 166: 165–176.
- [25] Kozai T., Hayashii M., Hirose Y., Kodama T., Watanabe I. 1987. Environmental control for acclimatization of in vitro cultured plantlets. I. Development of the acclimatization unit for accelerating plantlet growth and test cultivation. *J. Agric. Meteorol. Jpn.* 42: 349–358.
- [26] Lee N., Wetzstein H.Y., Sommer H.E. 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.* 78: 637–641.
- [27] Lee N., Wetzstein H.J., Sommer H.E. 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of in vitro- and in vivo-developed sweetgum leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 167–171.
- [28] Maene L.J., Debergh P.C. 1987. Optimization of the transfer of tissue cultured shoots to in vivo conditions. *Acta Hort.* 212: 335–348.
- [29] Marin J., Gella R. 1987. Factors affecting acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. Symposium Florizel, Plant Micropropagation in Horticultural Industries, 92–100, Arlon, Belgium.
- [30] Marin J.A., Gella R. 1988. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? *Acta Hort.* 230: 105–110.
- [31] Matysiak B., Nowak J. 1994. Carbon dioxide and light effects on photosynthesis, transpiration and ex vitro growth of *Homalomena* 'Emerald Gem' plantlets. *Scientia Hort.* 57: 353–358.
- [32] Matysiak B., Nowak J. 1995. Wpływ światła i dwutlenku węgla na fotosyntezę, przeżywalność i wzrost ex vitro roślin z rodziny Araceae. Materiały 1. Ogólnopolskiej Konferencji: Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin, 15–17 grudnia 1994 roku, Kraków.
- [33] Pospisilova J., Solarova J., Catsky J., Ondrej M., Opatrny Z. 1988. The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. *Photosynthetica* 22: 205–213.
- [34] Reuther G. 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under in vitro and greenhouse conditions. *Acta Hort.* 226: 91–98.
- [35] Reuther G. 1992. Stimulation of photoautotrophy of in vitro plants. *Acta Hort.* 300: 59–75.
- [36] Righetti B., Magnanini E., Infante R., Predieri S. 1990. Ethylene, ethanol, acetylaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* 78: 507–510.
- [37] Santamaria J.M., Kerstiens G. 1994. The lack of control of water loss in micropropagated plants is not related to poor cuticle development. *Physiol. Plant.* 91: 191–195.
- [38] Schoch P.G., Lefevre B., Teisson C., Ganry J. 1989. Photosynthese et respiration de bananier in vitro. *Photosynthetica* 23: 113–118.
- [39] Shackel K.A., Novello V., Sutter E. 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue cultured apple plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 468–472.
- [40] Short K.C., Warburton J., Roberts A.V. 1987. In vitro hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. *Acta Hort.* 212: 329–334.
- [41] Smith M.A.L., Palta J.P., McCown B.H. 1986. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown Asian white birch. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 11: 437–442.
- [42] Solarova J. 1989. Photosynthesis of plant regenerants. Diurnal variation in CO₂ concentration in cultivation vessels resulting from plantlets photosynthetic activity. *Photosynthetica* 23: 100–107.
- [43] Sutter E. 1984. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plants grown in vitro. *Can. J. Bot.* 62: 74–77.
- [44] Sutter E. 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 234–238.

- [45] Wardle K., Short K. 1981. Responses of stomata in epidermal strips of *Vicia faba* to carbon dioxide and growth hormones when incubated on potassium chloride and potassium iminodiacetate. *Journal of Experimental Botany* 32: 303–309.
- [46] Wardle K., Dobbs E.B., Short K.C. 1983. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 386–389.
- [47] Wetzstein H.Y., Sommer H.E. 1982. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Amer. J. Bot.* 69: 1579–1586.
- [48] Wetzstein H.Y., Sommer H.E. 1983. Scanning electron microscopy of in vitro-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 475–480.
- [49] Yue D., Desjardins Y., Lamarre M., Gosselin A. 1992. Photosynthesis and transpiration of in vitro cultured asparagus plantlets. *Scientia Hort.* 49: 9–16.
- [50] Yue D., Gosselin A., Desjardins Y. 1993. Re-examination of the photosynthetic capacity of in vitro-cultured strawberry plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118: 419–424.
- [51] Yue D., Gosselin A., Desjardins Y. 1993 a. Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, photosynthesis and transpiration of geranium plantlets in vitro. *Canadian Journal of Plant Science* 73: 249–256.
- [52] Ziv M., Schwartz A., Fleminger D. 1987. Hardening aspects of micropropagated carnation plants having malfunctioning stomata. Symposium Florizel, Plant Micropropagation in Horticultural Industries, 47–54, Arlon, Belgium.

Anatomical and physiological characteristics of micropropagated ornamental plants — review

Summary

Tissue culture conditions were selected to provide the optimal environment for rapid plant multiplication. Plantlets develop under aseptic conditions on the media containing saccharose, mineral nutrients and growth regulators at low irradiance and very high relative humidity. These conditions result in formation of plantlets with abnormal leaf morphology, anatomy and functioning in comparison to seedlings grown under natural conditions. Reduced epicuticular waxes, impaired stomatal function, poorly developed palisade layer with a significant amount of mesophyll air space were observed in plantlets. In addition, their photosynthetic activity may be reduced. When transferred to ex vitro conditions plantlets are subjected to desiccation and their growth is often slow. To minimize the effect of transplantation stress, the plantlets should be acclimatized before exposition to natural conditions.