

Małgorzata Podwyszyńska, Danuta Maria Goszczyńska
Zakład Biotechnologii Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach

Rozmnażanie in vitro róż i innych gatunków roślin użytkowych

I. Mnożenie pędów

1. Wstęp

Mikrorozmnażanie róż zyskuje coraz większą popularność w produkcji kwiaciarskiej. Wykorzystuje się je do rozmnażania róż miniaturowych [7, 8, 14, 39], do uzyskania materiału odwirusowanego oraz do reprodukcji nowych odmian i linii hodowlanych [4, 14]. W ostatnich latach producenci zaczęli interesować się możliwością wykorzystania tej metody do reprodukcji odmian róż przeznaczonych do uprawy na kwiat cięty. Okazało się, że róże rosnące na własnych korzeniach plonują podobnie do okulizowanych [38].

Szacuje się, że w Polsce rozmnażanych in vitro jest obecnie około 0,5 mln krzewów róż rocznie i pod względem produkcji roślin drzewiastych tą metodą róże znajdują się na drugim miejscu po różanecznikach. Za szerszym wykorzystaniem metody in vitro w produkcji róż przemawia obserwowane ostatnio rosnące zainteresowanie ich uprawą, jednak z wykorzystaniem nowych odmian: bardziej plennych, trwałych po ścięciu, dobrze przechowujących się i odpornych na transport. Wynika to z ogromnej popularności, jaką cieszy się ten gatunek wśród konsumentów.

Klasyczną metodę mikrorozmnażania roślin, w tym także róż, można podzielić na 4 etapy: I – stadium inicjalne, II – mnożenie pędów, III – ukorzenianie in vitro i IV – aklimatyzacja roślin w warunkach szklarniowych. Rozmnażaniu róż in vitro często towarzyszą pewne trudności, jak dostosowanie warunków rozmnażania do wymagań danego genotypu, mała zdolność mikrosadzonek do ukorzeniania oraz starzenie się kultur.

Pierwszy z powyższych problemów występuje we wszystkich etapach mikrorozmnażania i dotyczy ogromnych różnic pomiędzy wymaganiami poszczególnych genotypów w stosunku do składników pożywki oraz warunków fizycznych [4, 13, 14, 46]. Dubois i in. [14] są zdania, że poszukiwanie odpowiedniej pożywki jest zbyt kosztowne i może być uzasadnione tylko w wypadku genotypów szczególnie warto-

ściowych. W związku z tym autorzy sugerują, by hodowcy róż przy selekcji brali pod uwagę również taką cechę, jak zdolność danego genotypu do szybkiego rozmnażania *in vitro*.

Rozwiązywaniem wyżej wymienionych problemów zajmowali się badacze z wielu ośrodków naukowych na świecie. Ich prace koncentrowały się głównie na pokonywaniu barier w etapach mnożenia i ukorzenia *in vitro*. W dostępnej literaturze znaleziono zaledwie kilka publikacji dotyczących przygotowania kultur pędów róż do ukorzenia (zwiększania ich zdolności do rizogenezy) i zapobiegania starzeniu się pędów podczas ukorzenia *in vitro*. Z tego względu w niniejszym przeglądzie literatury przytoczono także prace prowadzone na innych gatunkach roślin z zakresu wyżej opisanych zagadnień.

Badania nad rozmnażaniem róż *in vitro* rozpoczęto w latach czterdziestych i dotyczyły one kultur kalusa [28]. Dopiero w 1967 roku, po raz pierwszy, otrzymano w kulturach kalusa regenerację zawiązków pędów, które jednak nie rozwijały się prawidłowo [21]. Udało się to osiągnąć kolejnym badaczom, którzy uzyskali już ukorzone pędy [24].

W następnych latach opracowano metodę mnożenia róż *in vitro* z pominięciem kultur kalusa, poprzez rozkrzewianie pędów i odcinanie mikrosadzonek. Taki system uznano za korzystniejszy i bezpieczniejszy dla masowego rozmnażania. W kulturach kalusa istnieje bowiem większe prawdopodobieństwo wystąpienia zmian genetycznych. Pierwszymi, którzy przedstawili technikę rozmnażania róż z pominięciem kultur kalusa, byli Hasegawa [19] oraz Skirvin i Chu [45]. Hasegawa [19] zapoczątkował kultury pędów *Rosa hybrida* 'Improved Blaze', wykorzystując wierzchołki pędów lub jednowęzłowe fragmenty pędów zawierające pąk boczny. Dezynfekcję przeprowadzono przez 10 min w 5,25 procentowym wodnym roztworze podchlorynu sodu z dodatkiem 0,1% Tweenu. Wyizolowane wierzchołki wzrostu i pąki boczne o wymiarach 3–7 mm regenerowano na pożywce wg Murashige i Skooga [32] o pH 5,8 zawierającej następujące składniki organiczne: inozytol $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, glicynę $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, po $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ tiaminy, pirydoksyny i kwasu nikotynowego, cukier 3% i agar 0,8% oraz cytokininę i auksynę. W opisany sposób zakładali kultury *in vitro* pędów róż wszyscy następni autorzy. Modyfikacji ulegał najwyżej sposób dezynfekcji lub wielkość eksplantatu. Badacze nie sygnalizowali żadnych problemów w stadium inicjalnym, stąd nie było ono przedmiotem szczegółowych badań. Hasegawa [19, 20] również jako pierwszy badał, która z cytokinin (2iP, kinetyna i BAP) i auksyn (IAA i NAA) efektywnie stymuluje rozkrzewianie pędu róży. Za optymalne dla regeneracji eksplantatów inicjalnych i krzewienia pędów uznał BAP o stężeniu $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i IAA $0,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Siarczan adeniny i $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (w zakresie od 10 do $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) nie miały wpływu na wzrost pędów, a podane w najwyższych stężeniach działały niekorzystnie. Autor pasażował pędy co 8 tygodni, uzyskując współczynnik rozmnażania 3–6. W pomieszczeniu wzrostowym utrzymywano 16-godzinne oświetlenie lampami fluorescencyjnymi o natężeniu $18 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ i temperaturę 26°C .

Przedstawioną metodę mnożenia można uznać za standardową, gdyż z niewielkimi modyfikacjami stosowana była przez większość autorów. Prowadząc badania z udziałem innych odmian róż BAP stosowano zawsze, zmieniano tylko stężenie tej cytokiny, często podawano inną niż IAA auksynę, a także dodawano kwas giberelinowy. Rzadziej modyfikacje dotyczyły składu mineralnego pożywki, sposobu jej zestalenia, stosowania dodatkowych substancji czy zmian temperatury i natężenia światła.

2. Składniki pożywki

Skład mineralny. W etapie mnożenia najczęściej stosowane są sole mineralne wg Murashige i Skooga [32] – MS. Valles i Boxus [46] obserwowali korzystniejsze oddziaływanie składników mineralnych pochodzących z pożywki Lepoivre [37]. Pożywka ta charakteryzuje się czterokrotnie niższą zawartością jonów NH_4^+ , o 40% wyższą zawartością Ca^{2+} , ponadto prawie nie występują w niej jony Cl^- . W mnożeniu *Rosa chinensis* Jack. uzyskano pozytywne rezultaty, wykorzystując skład mineralny z pożywki WPM – Woody Plant Medium, zalecanej do mnożenia roślin drzewiastych [29]. Lepsze współczynniki rozmnażania róż osiągnięto także stosując niższy niż w pożywce MS poziom makroelementów, tj. po $125 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KNO_3 , MgSO_4 i KH_2PO_4 oraz $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ [9] lub podanie innej niż w pożywce MS formy żelaza, a mianowicie sekwestren Fe 330 o stężeniu $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [14] lub chelat FeEDDHA – $86 \mu\text{M}$ (kwas etylenodwuaminodwu-O-hydroksyfenylooctowy) [47].

Regulatory wzrostu. Wybór odpowiedniego regulatora wzrostu, zwłaszcza z grupy auksyn i cytokinin, oraz podanie ich we właściwym stężeniu jest niezwykle ważne dla uzyskania pomyślnego efektu w etapie mnożenia róż. W badaniach nad rozkrzewianiem *Rosa hybrida* ‘Forever Yours’ oraz *Rosa x damascena* Mill. ‘Bridal Pink’ najlepsze rezultaty uzyskano stosując BAP o stężeniu $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i NAA $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [27, 43]. Wielu autorów zwraca uwagę na duże różnice w reakcji poszczególnych genotypów na stosowane regulatory wzrostu [4, 20, 46]. Odmiany uprawiane na kwiat cięty, a więc o silnej dominacji wierzchołkowej, wymagały wyższego stężenia BAP $2,5\text{--}5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, a nawet $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, natomiast odmiany róż z grupy rabatowych, okrywowych i miniaturowych, charakteryzujące się silną zdolnością do krzewienia, wymagały z reguły niższego stężenia BAP – $0,5\text{--}1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [7, 13]. Wymienieni autorzy stosowali także dodatek niewielkiej ilości ($0,1\text{--}0,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) auksyny IAA, IBA lub NAA. Obserwowano ponadto, że dodatek samego GA_3 nie wywołuje korzystnego efektu, podanie natomiast GA_3 łącznie z BAP stymuluje rozkrzewianie pędu i zapobiega nekrozom wierzchołka wzrostu, a dla niektórych odmian np. ‘Goldy’ jest niezbędne [13, 14, 40, 46].

Czynnikiem mechanicznym stymulującym rozkrzewianie pędów jest uszczykiwanie wierzchołków wzrostu. Zastosowanie takiego zabiegu wpłynęło na dwukrotne zwiększenie współczynnika rozmnażania [6, 14]. Voyiatzi i Voyiatzis [49] uzyskali

silną stymulację krzewienia poprzez dodanie do pożywki $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TIBA (kwas 2,3,5-trójodobenzoesowy) lub $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ MELA (ester metylowy kwasu laurowego). Autorzy sugerują, że związki te mogą skutecznie zastąpić pracochłonne uszczykiwanie pędów.

Źródło węgla. Podstawowym źródłem węgla dla roślin rozmnażanych *in vitro* jest egzogenna sacharoza. W warunkach słabego natężenia światła rośliny nie są bowiem zdolne do fotosyntezy lub proces ten zachodzi w zbyt niskim natężeniu, by produkować potrzebną ilość substancji organicznych. Dla większości gatunków roślin, także dla róż, stosuje się sacharozę o stężeniu 3%. Niekiedy autorzy uznawali 2% sacharozę za wystarczającą w mikrorozmnażaniu róż [3, 10]. Natomiast Davies [10] jako optymalne poleca 4% stężenie tego cukru.

Sacharoza jest podstawowym węglowodanem produkowanym przez większość roślin wyższych. Stanowi też główną formę transportową węglowodanów w roślinie. U kilku gatunków z rodziny *Rosaceae* najważniejszym produktem fotosyntezy jest sorbitol – alkohol wielowodoro-tlenowy, zwyczajowo zaliczany do cukrowców. Jest on także formą transportową. Spośród 6 form cukrów: sacharoza, sorbitol, fruktoza, fruktoza + glukoza i sacharoza zhydrolizowana, testowanych w mnożeniu *Malus sp.*, najodpowiedniejszy okazał się sorbitol w stężeniu $16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [44]. Natomiast zastąpienie sacharozy sorbitolem nie wpłynęło korzystnie na rozmnażanie *in vitro Prunus sp.* [5]. Nie spotkano się w literaturze z pracami dotyczącymi zastosowania sorbitolu do mikrorozmnażania róż.

Inne substancje dodawane do pożywki. Niektórzy badacze dodawali do pożywek związki przeciwdziałające utlenianiu substancji fenolowych wydzielanych przez pędy róż, jak kwas askorbinowy – $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ i poliwinilopiryrolidon (PVP-10) – $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [39] oraz cysteina – $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [9].

Badacze belgijscy uzupełniali pożywkę MS L-glutaminą – $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, jako organicznym źródłem azotu, z jednoczesnym rozcieńczeniem soli mineralnych do połowy [11, 16, 26, 31].

3. Kultury w pożywkach zestalonych, dwufazowych i płynnych

Pożywki zestalone. Najczęściej stosowanym środkiem do żelowania pożywek jest agar. Zestalona nim pożywka stanowi równocześnie nośnik dla roślin. Zarówno rodzaj, jak i stężenie agaru wyraźnie oddziaływały na intensywność wzrostu i rozwoju pędów *Rosa hybrida*, *Syringa vulgaris* L. i *Gerbera jamesonii* H. Bolex Hook [34]. Sugeruje się, że zmiany w procesach wzrostowych powstałe w wyniku użycia odmiennych agarów i ich stężeń, mogą być spowodowane różnymi zanieczyszczeniami dostającymi się do pożywki wraz z agarem [34] oraz zróżnicowaną dostępnością wody, jonów i cytokininy dla roślin [33].

W wypadku róż większość badaczy stosowała agar o stężeniu $6-8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [17]. Szczegółowe badania nad wpływem stężenia agaru (0; 4; 5,5; 6; 7,5; 8; 9 i $15 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) na wzrost i rozwój pędów *Rosa hybrida* 'Madame G. Delbard' przeprowadzili Ghashghaie i in. [18]. Wykazali oni, że wraz ze wzrostem stężenia agaru zmniejszała się potencjał wodny pożywki oraz liczba pędów i ich sucha i świeża masa. Najbardziej korzystne dla rozkrzewiania i wydłużania pędów okazało się stężenie agaru $7,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Na pożywce płynnej wszystkie rośliny były zwitryfikowane.

Spośród innych środków służących do zestalania pożywek coraz powszechniej stosowany jest **gellan-gum PS-60** o nazwach handlowych Gelrite (Kelco, Division of Merc & Co.Inc., USA) lub Phytigel (Sigma). O jego pochodzeniu oraz właściwościach fizykochemicznych informuje Scherer i Muller [43]. Gellan-gum jest polisacharydem zbudowanym z kwasu glukuronowego, ramnozy i glukozy. Izoluje się go z kultur bakterii *Pseudomonas elodea*. Nie zawiera takich zanieczyszczeń, jak agar, a więc substancji fenolowych i siarki. Pasqualetto i in. [33] wykazali korzystne działanie gellan gum na wzrost, rozkrzewianie i ukorzenianie pędów *Malus* sp. Z kolei Williams i Taji [51] obserwowali pozytywny wpływ tego środka na długoterminowe przechowywanie *in vitro* australijskich roślin drzewiastych.

W wypadku róży szczegółowe badania nad zastosowaniem w pożywce agaru i gellan gum wykazały, że rodzaj środka żelującego nie miał większego znaczenia dla rozkrzewiania i wzrostu pędów [36]. Jedynie, na pożywce zestalanej gellan gum (Gelrite i Phytigel) uzyskane mikrosadzonki były dłuższe, jednak ich jakość była niższa (pędy cienkie o lekko skręconych liściach). W związku z tym autorzy nie polecają stosowania gellan gum w kulturach róż *in vitro*.

Kultury płynne i dwufazowe. Największą zaletą pożywek płynnych jest znaczne zwiększenie współczynników rozmnażania roślin i skrócenie czasu pasażu [53]. Szybszy wzrost i intensywniejsze mnożenie wynika z możliwości łatwiejszego pobierania (całą powierzchnią tkanek) składników pokarmowych. Zastosowanie kultury płynnej u *Rhododendron* sp. pozwoliło na uzyskanie 10-krotnie wyższego współczynnika rozmnażania w porównaniu z pożywką zestaloną agarem [12]. Wykorzystanie pożywek płynnych w produkcji pozwala na obniżenie kosztów, gdyż wyeliminowany jest agar – najdroższy składnik pożywki. Możliwa jest też wymiana i kontrola pożywki bez przenoszenia materiału roślinnego. Prawdopodobnie, w dalszej perspektywie kultury płynne pozwolą na wprowadzenie mechanizacji i automatyzacji produkcji *in vitro* [2].

Maene i Debergh [30] zademonstrowali kultury dwufazowe polegające na podaniu pożywki płynnej w górnej warstwie nad pożywką zestaloną agarem. Autorzy stosowali ten system w kulturach rodzajów *Magnolia* L., *Spathiphyllum* Schott, *Cordyline* Commex Juss. i *Philodendron* Schott corr Schott i polecają go do zintensyfikowania mnożenia, stymulacji wzrostu wydłużeniowego pędów i ukorzeniania.

Aitken-Christie i Jones [2] opracowali metodę krótkoterminowego (4–6 godz. raz w tygodniu) zalewania pożywką płynną kultur wolno rosnących gatunków (*Pinus*

radiata) umieszczonych w podłożu zestalonym agarem. Przedstawiona metoda umożliwiła przetrzymywanie kultur w jednym pojemniku przez 1,5 roku, w ciągu którego raz w miesiącu odcinano pędy do ukorzenia.

Inną metodę, polegającą na zamgławianiu płynną pożywką kultur mnożących się roślin *Musa L.*, *Cordyline Commex Juss.* i *Nephrolepis Schott*, opracowali Wheathers i in. [50]. W systemie tym uzyskano 10-krotnie większe współczynniki rozmnażania w porównaniu do pożywek zestalonych agarem. Równocześnie nie obserwowano objawów szklistości pędów, które często występują w kulturach płynnych.

Dla róż metodę mnożenia w płynnej pożywce MS opracowali Chu i in. [8]. Do badań autorzy wybrali 4 odmiany *Rosa chinensis var. minima* (Sims) Voss. Określano wpływ stężenia BAP (2, 4 i 6 mg · l⁻¹), długości pasażu (3, 4, 5 i 6 tyg.) oraz ilości pożywki (50–210 ml). W naczyniach nie umieszczano żadnych nośników typu mostki z bibuły czy metalowe siatki. Rośliny same utrzymywały się na powierzchni pożywki. Najwyższy współczynnik rozmnażania – 4,7 uzyskano na pożywce płynnej zawierającej 4 mg · l⁻¹ BAP w cyklu 5-tygodniowego pasażu. Ponadto nie stwierdzono szklistości pędów. Dla porównania współczynnik rozmnażania na pożywce zestalonej agarem wynosił 1,8, a na pożywce dwufazowej – 2,8. Według autorów, korzystniejszy efekt mnożenia się róż na pożywce płynnej mógł być wynikiem łatwiejszego pobierania BAP przez rośliny.

4. Warunki fizyczne wpływające na wzrost i krzewienie pędów

Warunki zewnętrzne, jak światło, temperatura i wilgotność względna powietrza, utrzymywane w pomieszczeniu wzrostowym, a także okres pasażu odgrywają ważną rolę w mikrorozmnażaniu roślin.

Światło. W mnożeniu róż *in vitro* najczęściej poleca się 16-godzinne oświetlenie białym światłem lamp fluorescencyjnych o natężeniach: 4,8 μmol · m⁻² · s⁻¹ [23], 40 μmol · m⁻² · s⁻¹ [3], 100 μmol m⁻² · s⁻¹ [49], 27,6 μmol m⁻² · s⁻¹ [13], 15 μmol · m⁻² · s⁻¹ [39]. Jedynie Rout i in. [40] donosili o możliwości 14-godzinnego oświetlenia.

Temperatura. Optymalny poziom temperatury dla kultur *in vitro* waha się w granicach 21–26°C, w zależności od gatunku i odmiany. Szczegółowe badania nad wpływem temperatury na 10-tygodniowe przechowywanie 12 odmian kultur róż *in vitro* prowadzili Horn i in. [23]. Obserwowali oni, że współczynnik rozmnażania ulegał zmniejszeniu wraz z podwyższeniem temperatury. Ponadto wykazano duże różnice odmianowe w stosunku do wymagań termicznych. Odmiana ‘Pasadena’ najlepiej przechowywała się w temperaturze 12°C, inne, jak ‘Mercedes’, ‘Kardinal’, ‘Weise Queen Elisabeth’ i ‘Flamingo’ – w 18°C, a ‘Lorena’, ‘New Down’ i ‘Red Gold’ – w 24°C.

Wilgotność względna powietrza w pomieszczeniu wzrostowym. Wiele uwagi temu czynnikowi poświęcili Sallanon i Maziere [41]. Do podjęcia badań skłoniły ich wieloletnie obserwacje pogarszania się kultur róż *in vitro* w okresach zimowych, mimo że w pomieszczeniach wzrostowych utrzymywano identyczne warunki termiczne w ciągu całego roku. Badania wykazały, że wilgotność względna powietrza w okresie grzewczym ulega znacznemu obniżeniu nie tylko w fitotronach, ale także wewnątrz pojemników z materiałem roślinnym. Zdaniem autorów prowadziło to do deficytu wody w tkankach i przyczyniało się do słabszego wzrostu pędów. Autorzy uznali, że optymalna wilgotność względna powietrza w pomieszczeniu wzrostowym powinna wynosić 80%.

Czas trwania pasażu. Hasegawa [20], notując u róż współczynnik rozmnażania po 2, 4, 6 i 8 tygodniach pasażowania, stwierdził, że po upływie 4 tygodni jego wartość dochodziła do 4 i dalej nie wzrastała. Dłuższe przetrzymywanie kultur na tej samej pożywce powodowało starzenie się pędów. Również inni autorzy podają, że czas trwania pasażu odgrywa istotną rolę w mikrorozmnażaniu, lecz może się różnić w zależności od odmiany. Dla róż rabatowych 'Champion' i 'John Franklin' oraz mieszańca herbatniego 'John Paul II' najwyższe współczynniki rozmnażania uzyskano po 6 tygodniach, a dla odm. 'Landora' – uprawianej na kwiat cięty – po 8 tyg. [4]. Douglas i in. [13] uznali za optymalny dla wszystkich badanych genotypów róż miniaturowych, okrywowych i wielokwiatowych 6-tygodniowy cykl pasażowania, a Campos i Pais [7] dla róż z grupy Rosamini – cykl 4-tygodniowy. Z kolei Horn i in. [23] uważają, że 8-, a nawet 12-tygodniowy pasaż jest odpowiedni dla większości odmian.

5. Starzenie się kultur pędów

Problem starzenia się kultur pędów sygnalizowany był już w najwcześniejszych pracach dotyczących mikrorozmnażania róż [20]. Niektóre odmiany przetrzymywane na jednej pożywce dłużej niż 4 tygodnie wykazywały objawy żółknięcia liści i zamierania wierzchołków wzrostu. Charakterystyczne objawy przyspieszonego starzenia łączono z obecnością etylenu w atmosferze otaczającej rośliny [31]. Kolejne badania wykazały, że dodanie do pożywki ACC – prekursora etylenu ($0,5\text{--}10\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) lub etrelu ($0,1\text{--}10\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) stymulowało rozkład chlorofilu w tkankach, co w konsekwencji prowadziło do żółknięcia liści [11].

Etylen jest gazowym hormonem roślinnym produkowanym przez wszystkie tkanki [52]. Może więc akumulować się w zamkniętej atmosferze *in vitro* w fizjologicznie wysokich stężeniach i stymulować proces starzenia. Biosynteza etylenu przebiega według następującego schematu: metionina » S-adenozylometionina (SAM) » kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (ACC) » etylen (C_2H_4) [52]. Przemianę SAM do ACC katalizuje enzym syntetaza ACC, natomiast za przekształcenie ACC do

etylenu odpowiedzialny jest enzym EFE (ang. ethylene forming enzyme). Hipotetyczny enzym EFE został po raz pierwszy wyizolowany w 1991 roku przez Ververidis i John [48] i nazwany ACC oksydaza. Stosunkowo pełną charakterystykę enzymu ACC oksydazy, będącego wciąż przedmiotem intensywnych badań, podaje w pracy przeglądowej Kende [25].

W pracach nad zapobieganiem starzeniu się kultur róż *in vitro* wykorzystano inhibitory zarówno produkcji endogenego etylenu, jak i działania egzogenego etylenu [31]. Dodanie do pożywki AVG ($1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), skutecznego inhibitora ACC-syntetazy, wpłynęło najkorzystniej na zwiększenie współczynnika rozmnażania. Dodatni wpływ na rozmnażanie róż obserwowano także pod wpływem AIB ($50\text{--}500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Związek ten jest kompetycyjnym inhibitorem EFE [42]. Spośród poliamin (spermidyna, putrescyna i 1,3-diaminopropan), które dodawano do pożywki lub moczono pędy w sterylnych roztworach tych związków przed umieszczeniem na pożywce, jedynie diaminopropan wpłynął na wyraźne zwiększenie współczynnika rozmnażania. Wykazano również, że AVG hamował produkcję etylenu i przeciwdziałał starzeniu się pędów róż [11]. Z kolei Gaspar i in. [16] oraz Kevers i in. [26] twierdzili, że pewna ilość etylenu jest konieczna dla stymulacji rozkrzewiania pędów róż. Jednocześnie autorzy uzyskali najwyższe współczynniki rozmnażania, pod wpływem inhibitorów biosyntezy etylenu — AVG i CoCl_2 . Ich korzystny wpływ przejawiał się poprzez zwiększenie liczby międzywęźli i stymulowanie rozkrzewiania pędów. Obydwa związki hamowały także produkcję etylenu. Jony Co^{2+} są zaliczane do inhibitorów enzymatycznego systemu EFE [52].

Spośród inhibitorów działania etylenu do najskuteczniejszych i najczęściej stosowanych *in vitro* należą jony srebra (Ag^+). Rzadziej wykorzystywany jest 2,5-norbornadien – nienasycony węglowodór. Jony Ag^+ stosuje się powszechnie do przedłużania trwałości kwiatów ciętych. Mechanizm, przez który blokują one działanie etylenu, nie jest znany. Przypuszcza się, że Ag^+ blokuje miejsce na receptorze białkowym odpowiedzialnym za przyłączanie etylenu [1]. Tkanki roślinne stają się przez to mniej lub w ogóle niewrażliwe na etylen. Srebro stosowane jest w pożywce w postaci azotanu srebra (AgNO_3) i tiosiarczanu srebra (STS). Zastosowanie w kulturach *in vitro* róży, w pożywce, inhibitorów biosyntezy (AIB) i działania (AgNO_3) etylenu nie przyniosło oczekiwanych rezultatów [35]. Związki te hamowały wprawdzie starzenie liści, jednak AgNO_3 powodował deformację pędów, a AIB wywoływał chlorozę liści.

Pewien wpływ na opóźnienie procesu starzenia stymulowanego przez etylen przypisuje się jonom wapnia (Ca^{2+}). Uważa się, że wapń występujący w komórkach w odpowiednim stężeniu chroni błony komórkowe przed rozpadem [52]. Rolę wapnia w procesie starzenia roślin szeroko opisuje Ferguson [15] w pracy przeglądowej. Autor przytacza wiele przykładów zahamowania starzenia tkanek roślinnych poprzez traktowanie ich Ca^{2+} . Na przykład, uzyskano zmniejszenie utraty chlorofilu i degradacji białek we fragmentach liści *Zea* sp. i *Rumex* sp. w wyniku inkubacji w roztworze Ca^{2+} o stężeniu 1 M. Podobnie, przetrzymywanie odciętych liścieni ogórka w 0,1 M

roztworze Ca^{2+} zapobiegało rozpadowi chlorofilu i akumulacji peroksydazy, a także zmniejszyło produkcję etylenu. U róży z kolei, dzięki modyfikacji składu mineralnego pożywki poprzez dwukrotne zwiększenie stężenia wapnia i magnezu, uzyskano znaczne podwyższenie współczynników rozmnażania [36], zahamowano także starzenie się liści i zamieranie wierzchołków wzrostu pędów [35].

6. Podsumowanie

Na świecie mikrorozmnażanie róż stosowane jest jednak w ograniczonym zakresie, przede wszystkim dlatego, że wyprodukowane rośliny są zbyt drogie, a metoda nie jest wystarczająco wydajna. Współczynniki rozmnażania (2–3 z jednego pędu w ciągu 6 tyg.) są zbyt niskie. Wciąż dla wielu producentów barierą masowego rozmnażania niektórych odmian róż jest problem szybkiego starzenia się liści i zamierania wierzchołków wzrostu.

Zuwagi na powyższe problemy, a także ze względu na to, iż róże stają się w Polsce i w innych krajach najważniejszym gatunkiem spośród roślin ozdobnych, w kilku ośrodkach naukowych na świecie, także w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach, prowadzi się badania, których celem jest zwiększenie efektywności mikrorozmnażania i obniżenie kosztów produkcji [22, 35]. Prace koncentrują się głównie na poprawieniu jakości mikrosadzonek przez modyfikowanie składu mineralnego pożywki, dodawanie do niej retardantów wzrostu, stosowanie światła różnej jakości czy utrzymywanie wyższego stężenia CO_2 w atmosferze otaczającej rośliny. Wysoka jakość pędów jest bowiem jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za dalsze ich ukorzenianie i adaptację w szklarni, co z kolei decyduje o opłacalności produkcji sadzonek róż metodą *in vitro*.

Literatura

- [1] Aharoni N., Anderson J.D., Lieberman M. 1979. Production and action of ethylene in senescencing leaf disks. Effect of indoleacetic acid, silver ion and carbon dioxide. *Plant Physiol.* 64: 805–809.
- [2] Aitken-Christie J., Jones C. 1987. Towards automation: radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8: 185–196.
- [3] Alderson P.G., McKinless J., Rice R.D. 1988. Rooting of cultured rose shoots. *Acta Hort.* 226: 175–182.
- [4] Arnold N.P., Binns M.R., Barthakur N.N., Cloutier D.C. 1992. A study of the effect of growth regulators and time of plantlet harvest on the *in vitro* multiplication rate of hardy and hybrid tea roses. *J. Hort. Sci.* 67: 727–735.
- [5] Borkowska B., Szczerba J. 1991. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. *J. Exp. Bot.* 42: 911–915.
- [6] Bressan P.H., Kim Y.J., Hyndman S.E., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1982. Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107: 979–990.

- [7] Campos P.S., Pais M.S.S. 1990. Mass propagation of the dwarf rose cultivar 'Rosamini'. *Sci. Hort.* 43: 321–330.
- [8] Chu C.Y., Knight S.L., Smith M.A.L. 1993. Effect of liquid culture on the growth and development of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. 'Minima'). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 329–334.
- [9] Curir P., Damiano C., Cosmi T. 1986. In vitro propagation of some rose cultivars. *Acta Hort.* 189: 221–223.
- [10] Davies D.R. 1980. Rapid propagation of roses in vitro. *Sci. Hort.* 13: 385–389.
- [11] De Proft M.P., Van den Broek G., De Greef J.A. 1987. Involvement of ethylene on senescence and vitrification of in vitro cultured miniroses. *Acta Hort.* 212: 217–222.
- [12] Douglas G.C. 1984. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron* in vitro using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots in vivo. *Sci. Hort.* 24: 331–341.
- [13] Douglas G.C., Rutledge C.B., Casey A.D., Richardson D.H.S. 1989. Micropropagation of floribunda, ground cover and miniature roses. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 19: 55–64.
- [14] Dubois L.A.M., Roggemans J., Soyeurt G., De Vries D.P. 1988. Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated in vitro and in vivo by softwood cuttings. *Sci. Hort.* 35: 293–299.
- [15] Ferguson I.B. 1984. Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant, Cell and Environment.* 7: 477–489.
- [16] Gaspar T., Kevers C., Bouillenne H., Maziere Y., Barbe J.I. 1989. Ethylene production in relation to rose micropropagation through axillary budding. Biochemical and physiological aspect of ethylene production in lower and higher plants. Kluwer Academic Publisher, 303–312.
- [17] George E.F., Puttock D.J.M., George H.J. 1987. Plant culture media, vol I, Exegetics Limited, Edington, Westbury, England.
- [18] Ghashghaie J., Breckmann F., Saugier B. 1991. Effect of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 82: 73–78.
- [19] Hasegawa P.M. 1979. In vitro propagation of rose. *HortScience* 14: 610–612.
- [20] Hasegawa P.M. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 216–220.
- [21] Hill G.P. 1967. Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose. *Nature* 216: 596–597, cyt. za Valles i Boxus, 1987.
- [22] Horan I., Walker S., Roberts A.V., Mottley J., Simpkins I. 1995. Micropropagation of roses: The benefits of pruned mother-platlets at stage II and a greenhouse environment at stage III. *J. Hort. Sci.* 70(5): 799–806.
- [23] Horn W., Schlegel G., John K. 1988. Micropropagation of roses (*Rosa hybr.*). *Acta Hort.* 226: 623–626.
- [24] Jacobs G., Bornman C.H. 1968. Tissue culture studies on rose. Use of pith explant. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 11: 673–678, cyt. za Valles i Boxus, 1987.
- [25] Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 283–307.
- [26] Kevers C., Boyer N., Courduroux J.C., Gaspar T. 1992. The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28: 175–181.
- [27] Khosh-Khui M., Sink K.C. 1982. Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. *Sci. Hort.* 17: 371–376.
- [28] Kofler L. 1945. Bouturage de bourgeons de rosier en milieu nutritif aseptique. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 92(4–6): 78–81, cyt. za Valles i Boxus, 1987.
- [29] Lloyd G., McCown B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30: 421–427.
- [30] Maene L., Debergh P.C. 1985. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 5: 23–33.
- [31] Mekers O., Meiresonne L., Meneve I. 1984. Ethylene production inhibitors can improve in vitro propagation of roses. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 49/3b: 1139–1144.

- [32] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- [33] Pasqualetto P.L., Zimmerman R.H., Fordham I. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 14: 31–40.
- [34] Pierik R.L.M. 1991. Micropropagation of ornamental plants. *Acta Hort.* 289: 45–54.
- [35] Podwyszyńska M. 1994. Wpływ regulatorów wzrostu na ukorzenianie i aklimatyzację róż miniaturowych mnożonych *in vitro*. Praca doktorska, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice, 1–145.
- [36] Podwyszyńska M., Olszewski T. 1995. Influence of gelling agent on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homalomena. *Sci. Hort.* w druku.
- [37] Quoirin M., Lepoivre P., Boxus P. 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de meristems et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. in: C.R. Rech. 1976–1977 et Rapports de Synthèse, Stas. Cult. Fruit. et Maraich. Gembloux, 93–117.
- [38] Reist A. 1985. Culture *in vitro* (civ) en pépinière de rosiers: résultats d'exploitation de plants civ pour la coupe. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 4/17(6): 173–178.
- [39] Rogers R.B., Smith M.A.L. 1992. Consequence of *in vitro* and *ex vitro* root initiation for miniature rose production. *J. Hort. Sci.* 67: 535–540.
- [40] Rout G.R., Debata B.K., Das P. 1989. Micropropagation of *Rosa hybrida* L. cv. Queen Elisabeth through *in vitro* culture of axillary buds. *Orissa J. Hort.* 17(1–2): 1–9.
- [41] Sallanon H., Maziere Y. 1992. Influence of growth room and vessel humidity on the *in vitro* development of rose plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30: 121–125.
- [42] Satoh S., Esashi Y., 1983. α -aminoisobutyric acid, propylgallate and cobalt ion and the mode of inhibition of ethylene production by cotyledonary segments of coclebur seeds. *Physiol. Plant.* 57: 521–526.
- [43] Scherer P.A., Muller E. 1988. Multielement analysis of agar and gelrite impurities investigated by inductively coupled plasma emission spectrometry as well as physical properties of tissue culture media prepared with agar or the gellen gum – gelrite. *Acta Hort.* 226: 655–658.
- [44] Seingre D., O'Rourke J., Gavillet S., Moncousin C. 1991. Influence of carbon source and type of vessel on the *in vitro* proliferation of the apple rootstock EM IX. *Acta Hort.* 289: 157–159.
- [45] Skirvin R.M., Chu M.C. 1979. *In vitro* propagation of 'Forever Yours' rose. *HortScience* 14: 608–610.
- [46] Valles M., Boxus P. 1987. Micropropagation of several *Rosa hybrida* L. cultivars. *Acta Hort.* 212: 611–617.
- [47] Van der Salm T.P.M., Van der Toorn C.J.G., Hanisch ten Cate C.H., Dubois L.A.M., De Vries D.P., Dons H.J.M. 1994. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. 'Moneyway'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 73–77.
- [48] Ververidis P., John P. 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene – forming enzyme activity. *Phytochemistry* 30: 725–727.
- [49] Voyiatzi C., Voyiatzis D.G. 1988. Shoot proliferation of the rose cv. (H.T.) Dr Verhage as influenced by apical dominance regulating substances. *Acta Hort.* 226: 671674.
- [50] Weathers P.J., Cheethan R.D., Giles K.L. 1988. Dramatic increases in shoot number and lengths for *Musa*, *Cordyline* and *Nephrolepis* using nutrient mist. *Acta Hort.* 230: 39–44.
- [51] Williams R.R., Taji A.M. 1987. Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Australian woody plant species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 11: 151–156.
- [52] Yang S.F., Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155–189.
- [53] Zandvoort E.A., Holdgate D.P. 1991. Mechanisation in tissue culture systems. *Acta Hort.* 289: 203–212.

In vitro propagation of rose and other plant species

I. Shoot multiplication

Summary

Micropropagation of roses has been widely applied for mass production, introduction of new cultivars, selection of new lines and elimination of rose viruses by meristem tip culture. The effects of cultural factors affecting shoot multiplication of rose – the ingredients of the medium, environmental influences and culture systems, have been briefly reported. Also the problem of senescence of shoot culture and possibility of prevention of this process has been described.

Stosowane skróty

BAP	— 6-benzyloaminopuryna,
kinetyna	— 6-furfuryloaminopuryna,
2iP	— 6-(τ - τ -dwumetyloallilo)aminopuryna,
IAA	— kwas indolilo-3-octowy,
IBA	— kwas indolilo-3-masłowy,
NAA	— kwas naftylo-1-octowy,
GA ₃	— kwas giberelinowy,
AIB	— kwas α -aminoizomasłowy,
AOA	— kwas 1-aminooksyocetowy,
AVG	— aminoetoksywinyloglicyna,
ACC	— kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy