

**PRZECHOWYWANIE MATECZNIKA
PETUNII OGRODOWEJ (*Petunia hybrida*)
W KULTURACH *in vitro***

CZĘŚĆ II

**WPLYW WARUNKÓW PRZECHOWYWANIA I SKŁADU POŻYWKI
NA REGENERACJĘ PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH**

Maria Witomska, Monika J. Latkowska, Magdalena Jaślar

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wstęp

Metoda przechowywania kultur roślinnych w warunkach ograniczonego wzrostu umożliwia utrzymywanie kultur matecznych na niedużej powierzchni, bez konieczności ich częstego przenoszenia na świeże pożywki. Warunki przechowywania powinny zapewniać utrzymanie kultur w jak najlepszej kondycji oraz ich maksymalną przeżywalność i zdolności regeneracyjne po przeniesieniu do warunków umożliwiających wzrost. Przy właściwym doborze materiału roślinnego i warunków zewnętrznych, przechowywanie kultur roślinnych w warunkach ograniczonego wzrostu zapewnia ich wysoką przeżywalność, a kultury przeniesione do warunków wzrostowych, wykazują dużą zdolność do regeneracji pędów przybyszowych i korzeni. Stan przechowywanych kultur można ocenić na podstawie współczynnika rozmnażania roślin potomnych. Zależy on w dużym stopniu od zdolności danego gatunku, odmiany i genotypu do regeneracji po przeniesieniu do warunków wzrostowych. Stwierdzono, że w kulturach pędów jabłoni współczynnik rozmnażania wzrósł po przechowywaniu w niskiej temperaturze [ORLIKOWSKA 1992], a pędy koniczyny (*Trifolium repens* L.) zachowywały normalną wydajność rozmnażania po przeniesieniu do warunków umożliwiających ich wzrost [BHOJWANI 1981]. U niektórych gatunków, np. u maliny, obserwuje się jednak obniżenie zdolności do namnażania, zwłaszcza w pierwszych pasażach po przechowywaniu [LISEK, ORLIKOWSKA 2001a].

Zwiększenie ciśnienia osmotycznego pożywki utrudnia pobieranie z niej składników pokarmowych, przez co ogranicza wzrost pędów, jest więc często stosowane w trakcie przechowywania kultur *in vitro*. Efekt ten można uzyskać zwiększając stężenie cukrów metabolizowanych przez komórki, do których zalicza się sacharozę i glukozę [LISEK, ORLIKOWSKA 2001b]. Stężenie sacharozy i glukozy w pożywce można podnieść nawet do 6–9% [LISEK 2001]. Dodane do pożywki w wyższym stężeniu cukry zapewniają roślinom wyższy poziom węgla i często

wpływają na poprawę jakości przechowywanych roślin.

Celem pracy było określenie wpływu przechowywania kultur matecznych petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*) w temperaturze 24°C i 6°C i składu pożywki na zdolności pędów do późniejszego rozkrzewiania się i namnażania.

Materiał i metody

Materiałem doświadczalnym były rośliny petunii ogrodowej *Petunia hybrida* z Grupy Ursynia, kłón 42F, rozmnażane w kulturach *in vitro* na zmodyfikowanej pożywce MS [MURASHIGE, SKOOG 1962]. Pożywka o pH 5,7 zawierała zwiększoną dwukrotnie ilość NH_4NO_3 (3300 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) i trzykrotnie Na_2EDTA (112 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) oraz FeSO_4 (83 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$); 0,4 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ tiaminy i 1000 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ kazeiny. Zestawiona została przy użyciu 8 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ Difco Bacto Agar.

Do badań pobrano wierzchołkowe fragmenty pędów o długości 15 mm, które umieszczono na pożywce MS z dodatkiem regulatorów wzrostu: 0,03 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu indoliloctowego (IAA) oraz 1 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ kintyny, nazywanej dalej pożywką standardową. Badano trzy kombinacje składu pożywki:

- z dodatkiem 30 lub 60 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy;
- z dodatkiem 30 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy i 0,5 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ABA.

Pędy wyłożono do słoików o pojemności 300 ml zawierających 70 ml pożywki (po 5 pędów w słoiku), badając 400 pędów w każdej kombinacji. Powtórzeniem był słoik z pięcioma pędami petunii. Kultury umieszczono w fitotronie w temperaturze 24°C, przy 16 godzinnym oświetleniu białym światłem fluorescencyjnym o natężeniu napromienienia kwantowego 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ i 8-godzinnej nocy. Po 4 tygodniach połowę kultur z każdej kombinacji pozostawiono w fitotronie, a drugą część umieszczono w lodówce, w temperaturze 6°C, przy białym świetle fluorescencyjnym o natężeniu napromienienia kwantowego 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Kultury umieszczone w fitotronie i w lodówce traktowane były jako mateczniki, z których po 2, 4 i 6 miesiącach pobierano pędy i wykładano na pożywkę standardową. W każdej kombinacji było 25 pędów (5 słoików po 5 pędów). Kultury pędów umieszczano w fitotronie w warunkach opisanych powyżej. Co 6 tygodni przenoszono je na świeżą pożywkę. Po każdym z trzech pasaży określono liczbę i długość pędów przybyszowych uzyskanych z jednego eksplantatu oraz świeżą masę zespołu pędów (powstałego z jednego wyłożonego eksplantatu).

Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji, z zastosowaniem programu Statgraphics 4.1. Do oceny istotności różnic między średnimi zastosowano test t-Duncana przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki

Na pożywce zawierającej 30 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy, zarówno w temperaturze 24°C jak i 6°C, a na pożywce z 60 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy w temperaturze 6°C, udało się przechować pędy przez okres 6 miesięcy, z zachowaniem ich dobrej jakości (tab. 1). W przypadku pozostałych kombinacji – na pożywce zawierającej 60 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy w temperaturze 24°C oraz na pożywce z dodatkiem 30 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$

sacharozy i $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ABA w temperaturze 24°C i 6°C , pędy zamieraly już po 4 miesiącach przechowywania (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Wpływ składu pożywki i temperatury na długość okresu przechowywania roślin matecznych

Influence of medium composition and temperature on the length of storage period of mother plants

Pożywka standardowa Standard medium		Okres przechowywania; Storage time (miesiące; months)	
sacharoza; sucrose ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)	ABA ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)	24°C	6°C
30	0	6	6
60	0	4	6
30	0,5	4	4

Skład pożywki zastosowanej w trakcie przechowywania miał istotny wpływ zarówno na średnią liczbę i długość pędów przybyszowych, jak też na świeżą masę zespołu pędów (tab. 2). Największą liczbę pędów uzyskano z kultur przechowywanych na pożywce zawierającej $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy (12,7). Najmniej pędów wytworzyły kultury przechowywane na pożywce zawierającej $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy (6,0), ale obecność ABA w pożywce stymulowała późniejsze namnażanie pędów. Najdłuższe pędy uzyskano z kultur, które przechowywano na pożywce zawierającej $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy (13,8 mm). Największą świeżą masą odznaczały się pędy przechowywane na pożywce zawierającej $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy (1,5 g), a najmniejszą – na pożywce z $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy bez ABA (0,8 g).

Tabela 2; Table 2

Wpływ składu pożywki zastosowanej w trakcie przechowywania na średnią liczbę, długość oraz świeżą masę pędów z trzech pasażów

Influence of medium composition used during the storage period on the average number, length and fresh weight of shoots from 3 passages

Pożywka standardowa Standard medium		Liczba pędów Shoot number	Długość pędu Shoot length (mm)	Świeża masa zespołu pędów Fresh weight of shoots (g)
sacharoza sucrose ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$)	ABA ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)			
30	0	6,0a*	12,8a	0,8a
60	0	12,7c	13,8b	1,5c
30	0,5	9,0b	12,6a	1,0b

* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$; means followed by the same letter do not differ at the level of significance $\alpha = 0,05$

Długość okresu przechowywania nie miała wpływu na średnią liczbę i długość pędów, wywarła jednak wpływ na świeżą masę zespołu pędów (tab. 3). Pędy przechowywane przez dwa miesiące odznaczały się nieco większą świeżą masą (1,2 g) niż przechowywane przez cztery miesiące (1,1 g).

Tabela 3; Table 3

Wpływ okresu przechowywania
na średnią liczbę, długość i świeżą masę pędów z 3 pasaży

Influence of storage period on the number,
length and fresh weight of shoots from 3 passages

Okres przechowywania Storage period (miesiące; months)	Liczba pędów Shoot number	Długość pędu Shoot length (mm)	Świeża masa zespołu pędów Fresh weight of shoot cluster (g)
2	8,9a*	13,1a	1,2b
4	9,6a	12,9a	1,1a

* objaśnienia jak w tabeli 2; explanations see Table 2

Zaobserwowano różnice w liczbie i długości pędów między kolejnymi pasażami w warunkach umożliwiających ponowny wzrost kultur (tab. 4). Po pierwszym pasażu uzyskano najmniejszą liczbę pędów (8,0), były one jednak najdłuższe (13,7 mm). Nie zaobserwowano wpływu pasażu na świeżą masę zespołu pędów (tab. 4).

Tabela 4; Table 4

Wpływ pasażu na liczbę, długość oraz świeżą masę pędów
Influence of growth period on the number, length and fresh weight of shoots

Pasaż Passage	Liczba pędów Shoot number	Długość pędu Shoot length (mm)	Świeża masa zespołu pędów Fresh weight of shoot cluster (g)
1	8,0a*	13,7b	1,1a
2	10,2b	12,6a	1,1a
3	9,5b	12,7a	1,1a

* objaśnienia jak w tabeli 2; explanations see Table 2

Temperatura, w jakiej przechowywano pędy, nie miała wpływu na średnią liczbę i długość pędów oraz na świeżą masę zespołu pędów (tab. 5).

Tabela 5; Table 5

Wpływ temperatury przechowywania
na średnią liczbę, długość oraz świeżą masę pędów

Influence of storage temperature on the number,
length and fresh weight of shoots

Temperatura Temperature	Liczba pędów Shoot number	Długość pędu Shoot length (mm)	Świeża masa zespołu pędów Fresh weight of shoot cluster (g)
6°C	9,4a*	13,7a	1,1a
24°C	9,1a	12,9a	1,1a

* objaśnienia jak w tabeli 2; explanations: see Table 2

Dyskusja

Najdłużej (przez okres 6 miesięcy) udało się przechować pędy petunii ogrodowej na pożywce zawierającej $30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy, zarówno w temperaturze 24°C , jak i 6°C oraz na pożywce z $60 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy w temperaturze 6°C . Lepsze wyniki uzyskano we wcześniejszych doświadczeniach nad przechowywaniem kultur petunii, gdzie w temperaturze 6°C na pożywce bez regulatorów wzrostu z dodatkiem $60 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy udało się je przechować przez 12 miesięcy. W doświadczeniach tych kultury umieszczone w temperaturze 24°C na pożywce niezawierającej regulatorów wzrostu przechowywano przez 6 miesięcy, podczas gdy w opisywanym doświadczeniu na pożywce z auksyną i cytokininą udało się przechować pędy tylko przez 4 miesiące [WITOMSKA i in. 2006].

Pomimo skrócenia okresu przechowywania kultur, obecność regulatorów wzrostu na pożywce może mieć jednak korzystny wpływ na ich późniejsze zdolności regeneracyjne. Jak stwierdzono, pędy maliny 'Malling Seedling' przechowywane na pożywce z BAP miały gorszą kondycję i mniej z nich przetrwało przechowywanie przez 24 miesiące, ale te które przeżyły były lepiej rozkrzewione niż pędy przechowywane na pożywce bez regulatorów wzrostu [LISEK, ORLIKOWSKA 2001b].

Podwyższone stężenie sacharozy w pożywce umożliwiało przycięcie pędów róży w temperaturze 2°C przez 6 miesięcy. Wpływało też pozytywnie na kultury, gdy umieszczano je na 2 miesiące w chłodni bezpośrednio po pasażowaniu lub krótkim (6 dni) okresie aklimatyzacji [DORION i in. 1991]. 8% stężenie sacharozy wpływało stymulująco na namnażanie i wzrost pędów ziemniaka przechowywanych w temperaturze 20°C przez 12 miesięcy [VERAMENDI i in. 1998]. Korzystny wpływ podwyższonego stężenia sacharozy w pożywce użytej do przechowywania kultur zaobserwowano również w przypadku kultur pędów petunii ogrodowej, gdzie największą liczbę pędów uzyskano na pożywce zawierającej $60 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ sacharozy.

Stwierdzono, że obecność kwasu abscysynowego w pożywce przy niższym stężeniu sacharozy, w temperaturze 6°C wpływa negatywnie na przeżywalność roślin mącznych i długość regenerowanych pędów petunii ogrodowej, zaś pozytywnie na ich namnażanie. Zastosowanie pożywki z kwasem abscysynowym pozwoliło natomiast na wydłużenie okresu przechowywania pędów ziemniaka do 36, a nawet 48 miesięcy w temperaturze 6°C i 10°C [ZAKLUKIEWICZ, SEKRECKA 1994]. Obecność kwasu abscysynowego umożliwiła też wydłużenie do 10 miesięcy okresu przechowywania kultur *Eucalyptus grandis*, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej przeżywalności pędów (80–90%) [WATT i in. 2000].

Zaobserwowano negatywny wpływ długotrwałego przechowywania roślin mącznych na liczbę pędów roślin potomnych petunii ogrodowej w pierwszym pasażu po przechowywaniu (8,0). W drugim i trzecim pasażu liczba pędów była już wyższa i wyniosła odpowiednio 10,2 i 9,5. Podobną zależność zaobserwowały LISEK i ORLIKOWSKA [2001a] po przechowywaniu pędów maliny w temperaturze 4°C . W pierwszym pasażu powstawało mniej pędów niż w następnych, a pędy pochodzące z kultur przechowywanych przez 24 miesiące rozkrzewiały się gorzej, niż przechowywane przez 18 miesięcy. Pozytywny wpływ przechowywania kultur w niskiej temperaturze na współczynnik rozmnażania zaobserwowano m.in. w przypadku kultur wiśni. Najwyższą liczbę pędów uzyskano po 4 lub 6 tygodniach (w zależności od odmiany) przechowywania w temperaturze 4°C [BORKO-

wska 1990]. Również pędy kiwi przechowywane w temperaturze 8°C [MONETTE 1986] oraz pędy jabłoni umieszczone w 4°C [ORLIKOWSKA 1992] wytwarzały więcej pędów po przechłodzeniu niż przed. Natomiast pędy koniczyny (*Trifolium repens*) przechowywane w temperaturze 5°C zachowywały typową wydajność rozmnażania [BHOJWANI 1981] podobnie jak kultury *Prunus* przechowywane w -3°C [MARINO i in. 1985]. U petunii ogrodowej nie odnotowano wpływu długości okresu przechowywania kultur (2 lub 4 miesiące) w temperaturze 6°C i 24°C na późniejsze namnażanie i wzrost wydłużeniowy pędów.

Wnioski

1. Na zmodyfikowanej pożywce MS zawierającej 0,03 mg·dm⁻³ IAA i 1 mg·dm⁻³ kinetyny można przechować rośliny mateczne petunii ogrodowej do 6 miesięcy.
2. Na długość okresu przechowywania roślin matecznych negatywnie wpływa obecność kwasu abscysynowego w pożywce, niezależnie od temperatury.
3. Długość okresu przechowywania roślin matecznych nie ma wpływu na średnią liczbę i długość pędów roślin potomnych uzyskanych po 3 pasażach, ale wpływa na ich świeżą masę.
4. Długotrwałe przechowywanie roślin matecznych wpływa negatywnie na liczbę pędów roślin potomnych uzyskanych po pierwszym pasażu po przechowywaniu, ale wpływa pozytywnie na ich wzrost wydłużeniowy, nie ma natomiast wpływu na świeżą masę pędów w kolejnych pasażach.
5. Wyższe stężenie sacharozy w pożywce (60 g·dm⁻³) wpływa pozytywnie na średnią liczbę i długość pędów oraz świeżą masę zespołów pędów roślin potomnych uzyskanych z 3 pasaży.
6. Obecność ABA w pożywce wpływa pozytywnie na średnią liczbę oraz świeżą masę zespołów pędów roślin potomnych uzyskanych z 3 pasaży, jednak w mniejszym stopniu niż wyższe stężenie sacharozy.
7. Temperatura przechowywania roślin matecznych nie wpływa na liczbę i długość pędów oraz świeżą masę zespołów pędów roślin potomnych.

Literatura

- BHOJWANI S.S. 1981. *A tissue culture method for propagation and low temperature storage of Trifolium repens genotypes*. *Physiol. Plant.* 52: 187–190.
- BORKOWSKA B. 1990. *Influence of low temperature storage on regenerative capacity of sour cherry cultures*. *Fruit Science Reports* 1: 1–7.
- DORION N., KADRI M., BIGOT C. 1991. *In vitro preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization*. *Acta Horticulturae* 298: 335–339.
- LISEK A. 2001. *Długoterminowe i średnioterminowe przechowywanie kultur pędowych w temperaturach powyżej 0°C*. *Mat. z konf. „Rozmnażanie roślin in vitro“*. Skierń-niewice, 25 IV 2001.
- LISEK A., ORLIKOWSKA T. 2001a. *Wpływ 6-benzylaminopuryny, hartowania chłodem*

oraz terminu przenoszenia kultur do przechowalni na długoterminowe przechowywanie pędów maliny 'Malling Seedling' w warunkach *in vitro*. *Biotechnologia* 3(54): 237–242.

LISEK A., ORLIKOWSKA T. 2001b. Długotrwałe przechowywanie eksplantatów pędowych w kulturach *in vitro* w temperaturach powyżej 0°C. *Biotechnologia* 3(54): 134–144.

MARINO G., ROSATI P., SAGRATI F. 1985. Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 73–78.

MONETTE P.L. 1986. Cold storage of kiwifruit shoot tips *in vitro*. *HortScience* 21(5): 1203–1205.

MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for the growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

ORLIKOWSKA T. 1992. Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 1–7.

VERAMENDI J., ARREGUI L.M., MINGO-CASTEL A.M. 1998. A simple method for medium-term conservation of potato germplasm. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4: 183–188.

WATT M.P., THOKOANE N.L., MYCOCK D., BLAKEWAY F. 2000. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 161–164.

WITOMSKA M., LATKOWSKA M.J., JAŚLAR M. 2006. Przechowywanie matecznika petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*) w kulturach *in vitro*. Cz. I. Wpływ długotrwałego przechowywania na jakość pędów i ich zdolność do ukorzeniania. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol.* 510: 691–698.

ZAKLUKIEWICZ K.E., SEKRECKA D. 1994. Kultury *in vitro* ziemniaka formą przechowywania genotypów i ich potencjalne możliwości dostarczania materiału do hodowli zachowawczej. *Prace OB PAN* 5/6: 347–352.

Słowa kluczowe: ABA, sacharoza, *Solanaceae*, temperatura, namnażanie pędów

Streszczenie

Określono wpływ przechowywania *in vitro* matecznika petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*) z Grupy Ursynia na zdolności pędów do późniejszego namnażania. Badano wpływ temperatury (24°C i 6°C), stężenia sacharozy (30 lub 60 g·dm⁻³) i ABA (0,5 mg·dm⁻³) w zmodyfikowanej pożywce MS na długość okresu przechowywania, liczbę, długość i świeżą masę pędów przybyszowych. Na pożywce MS zawierającej 0,03 mg·dm⁻³ IAA i 1 mg·dm⁻³ kinetyny kultury przechowywano przez 6 miesięcy. Obecność ABA w pożywce wpływała negatywnie na przechowywanie roślin, niezależnie od temperatury. Okres przechowywania kultur matecznych nie miał wpływu na liczbę i długość pędów przybyszowych. Wyższe stężenie sacharozy w pożywce wpłynęło pozytywnie na liczbę, długość pędów i świeżą masę regenerowanych pędów. Temperatura przechowywania roślin matecznych nie wywarła wpływu na wzrost roślin potomnych.

STORAGE OF STOCK CULTURES OF *Petunia hybrida in vitro*

PART II

INFLUENCE OF STORAGE CONDITIONS
AND MEDIUM COMPOSITION ON SHOOT REGENERATION
IN *Petunia hybrida*

Maria Witomska, Monika J. Latkowska, Magdalena Jaślar

Department of Ornamental Plants, Warsaw Agricultural University, Warszawa

Key words: temperature, ABA, sucrose, *Solanaceae*

Summary

The study estimated a possibility of the *in vitro* long-term storage of *Petunia hybrida* shoots (Ursynia Group). The effect of temperature (24°C i 6°C), sucrose (30 lub 60 g·dm⁻³) and ABA concentration (0.5 mg·dm⁻³) in the modified MS medium was studied in respect to a storage period, quantity, length and fresh weight of shoots. Cultures were stored for 6 months in the modified MS medium supplemented with 0.03 mg·dm⁻³ IAA and 1 mg·dm⁻³ kinetin. The presence of ABA in the medium had a negative effect on the length of storage period both at 6°C and 24°C. The length of storage period of stock cultures had no influence on the number, and length of adventitious shoots. A higher sucrose concentration in the medium had a positive effect on the number, length and fresh weight of shoots. Storage temperature did not have an effect on the growth of microcuttings.

Dr hab. Maria **Witomska**
Katedra Roślin Ozdobnych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159
02-776 WARSZAWA