

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

Rozmnażanie in vitro róż i innych gatunków roślin użytkowych

II. Ukorzenianie mikrosadzonek

1. Wstęp

Ukorzenianie mikrosadzonek jest niezwykle ważnym i trudnym etapem w procesie masowego rozmnażania roślin in vitro. Wyprodukowanie dużej liczby mikrosadzonek o małych zdolnościach do ukorzeniania może się wiązać z poważnymi stratami finansowymi. Konieczna jest więc znajomość czynników wpływających na uzyskanie przez pędy gotowości do tworzenia korzeni przybyszowych. Zasadniczo czynniki te można podzielić na zewnętrzne (temperatura, światło, skład pożywki), na które można stosunkowo łatwo oddziaływać, oraz wewnętrzne (endogenne poziomy regulatorów wzrostu, substancji fenolowych) wynikające z cech genetycznych i fazy ontogenetycznej rośliny.

2. Ukorzenianie pędów in vitro

2.1. Składniki pożywki podstawowej

Sole mineralne. Obniżenie poziomu soli mineralnych w pożywce wpływa korzystnie na ukorzenianie większości roślin. W badaniach nad ukorzenianiem in vitro róż stosowano najczęściej składniki mineralne pożywki MS [38] rozcieńczone do 1/2, 1/3 lub 1/4 [25, 27, 38, 45, 50, 51]. Douglas i in. [14], przy dwukrotnym rozcieńczeniu soli mineralnych, uzyskali 40% ukorzenionych pędów, a przy czterokrotnym — 90%. Dalsze rozcieńczanie składników mineralnych dawało niezadowolające wyniki.

W wyjaśnieniu korzystnego wpływu niskiego stężenia soli mineralnych na ukorzenianie pędów Hyndman i in. [26] podają, że wynika ono z obniżenia poziomu azotu w pożywce. Zmniejszenie stężenia azotu do 1/8 (7,5 mM) w stosunku do jego zawartości w pożywce MS (60 mM) i rozcieńczenie pozostałych składników tylko do

połowy wpłynęło na uzyskanie najlepszego ukorzenia pędów róż. Uzupełnienie takiej pożywki NaCl do stężenia występującego w pożywce MS nie wpłynęło hamująco na ukorzenie. Natomiast, wraz ze wzrostem poziomu azotu zmniejszała się liczba korzeni. Autorzy podają, że spośród składników mineralnych azot odgrywa najważniejszą rolę w procesie rizogenezy. Jego obecność w pożywce jest konieczna w postaci jonów NO_3^- i NH_4^+ , a optymalny stosunek $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ wynosi dla róż 3 : 1. Mniejszą rolę w rizogenezie *in vitro* odgrywają jony boru, manganu i potasu [36] i nie badano ich wpływu na ukorzenie pędów róż.

Źródło węgla. Podobnie jak w etapie mnożenia, także w pożywce do ukorzenia konieczna jest obecność cukru będącego źródłem węgla. Niezdolne do samodzielnej fotosyntezy pędy pobierają go z pożywki w ciągu całego procesu rizogenezy. W większości publikacji zalecane stężenie sacharozy dla ukorzenia róż wynosi $30 \cdot \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Campos i Pais [5] polecają stężenie $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ tego cukru. Z kolei Rahman i in. [45] obserwowali najwięcej ukorzenionych pędów oraz najliczniejsze i najdłuższe korzenie na pożywce zawierającej $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ sacharozy. Badania nad stosunkiem zawartości węgla do azotu w pożywce i jego wpływ na ukorzenie róż prowadzili Hyndman i in. [26]. Wykazali oni, że dla procesu rizogenezy optymalny stosunek stężenia molarnego sacharozy do azotu mineralnego w pożywce powinien być wyższy od 10.

Badano również wpływ **aminokwasów** na ukorzenie pędów różnych gatunków drzew owocowych z rodziny *Rosaceae*. Kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, ornityna, tryptofan i arginina korzystnie oddziaływały na ukorzenie podkładek jabłoni P 2 i P 60, przy czym najsilniejszy addytywny wpływ obserwowano dla argininy ($200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) [40]. W przypadku *Cydonia oblonga* L. najwięcej ukorzenionych pędów uzyskano pod wpływem proliny podanej wraz z auksyną [39]. Pędy takie wyróżniały się również największą liczbą korzeni.

Witaminy wykazują dodatni wpływ na ukorzenie mikrosadzonek. Stwierdzono, że spośród 9 badanych witamin najkorzystniej na ukorzenie róż oddziaływały ryboflawina, pantotenian wapnia i kwas askorbinowy [7]. Nie wykazano natomiast dodatniego wpływu tiaminy ($0,1\text{--}1,7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) [27]. Przedmiotem najliczniejszych badań był wpływ ryboflawiny na ukorzenie mikrosadzonek różnych gatunków. Przypuszcza się bowiem, że witamina ta bierze udział w fotoutlenianiu auksyny. Drew i in. [15] zaproponowali efektywny sposób ukorzenia pędów *Carica papaya* L. na pożywce zawierającej $10 \mu\text{M}$ IBA i $31 \mu\text{M}$ ryboflawiny. Istotą tej metody było jednak zastosowanie w pierwszych 2 dniach ciemności, a w następnych 16-godzinne oświetlenie. Autorzy oparli swą metodę na założeniu, że auksyna konieczna jest tylko w pierwszej fazie do zainicjowania ukorzenia, po czym jej obecność może hamować wyrastanie korzeni. Korzystne działanie ryboflawiny polegało więc prawdopodobnie na utlenianiu auksyny na świetle.

Węgiel aktywny dodany do pożywki w dawce $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ wpłynął dodatnio na ukorzenie pędów róż miniaturowych [2]. Natomiast inne badania wykazały ujemne

działanie tego składnika, przejawiające się opóźnionym o 6 tygodni wyrastaniem korzeni i zmniejszeniem liczby ukorzenionych pędów do 60% [5].

Odczyn pH pożywki w zakresie 5,5–5,9 jest najczęściej polecany do ukorzeniania róż. Rahman i in. [45] uznali pH 5,5 jako optymalny spośród przebadanych (4,5; 5,5; 6,5 i 7,5).

Ważnym czynnikiem w ukorzenianiu mikrosadzonek jest stężenie **agaru** w pożywce, które najczęściej polecane jest w zakresie $6\text{--}8\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. W badaniach nad wpływem różnych stężeń agaru ($3\text{--}15\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) na ukorzenianie róż jako optymalne uznano $6\text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [5, 45].

Douglas i in. [14] wykazali, że najkorzystniejsze dla ukorzeniania róż było zastosowanie **pożywki płynnej** z użyciem celulozowych korków typu Sorbarods (Baumgartner papiers SA, Szwajcaria) jako nośników. Tą metodą ukorzeniło się i zaaklimatyzowało 100% pędów. Natomiast w pożywce płynnej pozbawionej nośników Sorbarods oraz w pożywce zestalonej agarem liczba ukorzenionych pędów wynosiła odpowiednio 70% i 84%, a zaaklimatyzowanych około 85%. Z kolei najmniejszą liczbę – 61% ukorzenionych pędów i tylko 22% zaaklimatyzowanych – autorzy zanotowali w wypadku bezpośredniego ukorzeniania.

2.2. Auksyny

Kluczową rolę w ukorzenianiu odgrywają auksyny, które podawane egzogenicznie silnie stymulują ten proces. Poszczególne genotypy różnią się jednak wymaganiami w stosunku do **rodzaju i stężenia** tego regulatora wzrostu. Ważny jest również stan fizjologiczny mikrosadzonki, czyli jej gotowość do ukorzeniania. Do stymulacji ukorzeniania pędów róż stosuje się naturalną auksynę IAA lub syntetyczne IBA i NAA. Hasegawa [25] porównał efektywność działania IAA, IBA i NAA dodanych do pożywki w stężeniach od $0,03$ do $3\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ na ukorzenianie pędów *R. hybrida*. Przy stężeniu $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ IAA oraz $0,03\text{--}0,1$ NAA ukorzeniło się i zaaklimatyzowało blisko 100% pędów. IBA okazał się mniej skuteczny, gdyż przy stężeniu $0,1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zanotowano tylko 84% ukorzenionych mikrosadzonek. Z kolei Dubois i in. [18] oraz Campos i Pais [5] uznali IBA – $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ jako najkorzystniejszy dla ukorzeniania róż miniaturowych. Sauer i in. [50] uzyskali najlepsze wyniki z zastosowaniem IAA – $1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Niektórzy autorzy polecają stosowanie dwóch synergistycznie działających auksyn, jak NAA $0,1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ z IAA lub z IBA $0,05\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [27]; NAA $0,1\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ z IAA $0,5\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [45]. Natomiast Skirvin i Chu [51] uzyskali najwięcej ukorzenionych mikrosadzonek na pożywce nie zawierającej auksyny.

Czas traktowania auksynami ma również istotne znaczenie w ukorzenianiu pędów. W badaniach nad formowaniem korzeni przybyszowych stwierdzono, że obecność auksyn jest konieczna tylko w pierwszej fazie rizogenezy – powstawania primordiów. Okres ten wynosi od 2 do 6 dni w zależności od gatunku [35, 50]. Jednak w masowej produkcji ukorzeniane mikrosadzonki przebywają na pożywce zawiera-

jącej auksyny zazwyczaj przez 2–6 tygodni. W przypadku róż okres ten może wynosić 2 tygodnie [25, 26, 27], 3–5 tygodni [14, 18], a nawet 6 tygodni [45]. Jednak już po 10–14 dniach przebywania mikrosadzonek na pożywce z auksyną obserwowano objawy żółknięcia pędów i czernienia korzeni [5, 25, 42]. Z tego względu niektórzy autorzy zalecają przeprowadzenie stymulacji ukorzenia pędów na pożywce z auksyną tylko przez krótki 7–10-dniowy okres, a następnie przeniesienie ich na pożywkę bez tego regulatora w celu umożliwienia wzrostu wydłużeniowego pędów i korzeni [9, 15].

2.3. Substancje fenolowe

Do kofaktorów ukorzenia – obok azotu, cukru i auksyn – zaliczane są także niektóre substancje fenolowe, np. floroglucynol i florydżyna [36]. Uważa się, że ich wpływ na stymulację ukorzenia polega na regulowaniu poziomu auksyny poprzez oddziaływanie na aktywność oksydazy IAA. Floroglucynol ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) nie przejawiał jednak dodatniego działania na ukorzenie pędów róż [5, 27].

2.4. Etylen

Powszechnie znany jest fakt, że auksyny stymulują biosyntezę etylenu [54]. Natomiast Moncousin i in. [37] dowodzą, że wzmożona produkcja etylenu poprzedza wzrost produkcji endogennej auksyny, w następstwie czego pojawiają się zmiany morfogenetyczne, prowadzące do powstawania primordiów korzeni. Przeciwną opinię wyrazili Geneve i in. [24], stwierdzając, że etylen nie bierze żadnego udziału w ukorzeniu ogonków liściowych *Hedera helix* L., stymulowanym przez auksyny.

W wielu badaniach stosowano zatem inhibitory biosyntezy i działania etylenu w celu oddzielenia udziału auksyn od udziału etylenu w procesie rizogenezy. Wiadomo bowiem, że auksyna oddziałuje na wzrost biosyntezy etylenu przez stymulowanie aktywności syntetazy ACC, której inhibitorami są AOA i AVG [54]. Robins i in. [46] obserwowali zmniejszenie liczby korzeni u sadzonek *Phaseolus radiatus* L. (*Vigna radiata*) pod wpływem AVG. Natomiast Biondi i in. [3] stwierdzili, że AVG powodowała formowanie większej liczby korzeni u mikrosadzonek *Prunus avium* L., lecz redukowała ich wydłużanie, podczas gdy ACC wpłynął na zmniejszenie liczby ukorzenionych pędów. Z kolei Coleman i in. [8] obserwowali stymulację ukorzenia liści pomidora *in vitro* pod wpływem AgNO_3 inhibitora działania etylenu.

Szczegółowe badania nad rolą etylenu w procesie ukorzenia mikrosadzonek róż wykazały, że inhibitory działania (AgNO_3) i biosyntezy (AIB) etylenu dodane do pożywki, w najniższym spośród badanych stężeń ($2,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), stymulowały ukorzenie *in vitro*. Jednak po posadzeniu roślin w szklarni okazało się, że związki te wykazały niekorzystne działanie następcze, AIB wywoływał chlorozę liści i hamował dalszy wzrost roślin, a AgNO_3 powodował ich zamieranie [42].

2.5. Warunki fizyczne

Temperatura. Większość badaczy poleca utrzymywanie w czasie ukorzenia pędów róż temperatury od 21 do 28°C. Rahman i in. [45] – porównując temperatury w zakresie 24–32°C – uznali, jako optymalną, 28°C. Khosh-Khui i Sink [27] obserwowali poprawę ukorzenia poprzez chłodzenie ukorzenianych pędów przez pierwszy tydzień w 5°C i przetrzymywanie ich w następnym tygodniu w 22°C.

Światło. W ukorzeniu pędów ważną rolę odgrywa zarówno fotoperiod, jak i natężenie światła. Rahman i in. [45] – porównując 8-, 12- i 16-godzinny fotoperiod – uznali za optymalne 16-godzinne oświetlenie. Obserwowano, że najkorzystniejsze dla ukorzenia jest natężenie światła niższe o $12 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ od stosowanego w etapie mnożenia [27]. Wykazano także korzystne oddziaływanie cieniowania czarną folią strefy korzeniowej [27]. Jednak w masowej produkcji taki system byłby bardzo kłopotliwy. Wielu autorów zaleca więc stosowanie ciemności w pierwszej fazie ukorzenia pędów (przez 3–10 dni), co stwierdzono na przykładzie i *Malus* sp. [16, 40].

2.6. Inne czynniki

W literaturze bardzo często podkreśla się duże różnice pomiędzy genotypami pod względem zdolności do ukorzenia. Nie zawsze bowiem metoda rozmnażania *in vitro* opracowana dla jednej odmiany umożliwia mnożenie innej, pochodzącej z tego samego gatunku [17, 18]. Moncousin [36] uważa, że cecha dużej zdolności do ukorzenia jest niezwykle ważna szczególnie w istniejących obecnie warunkach ogromnej konkurencji na rynku roślin ozdobnych. Jednym ze sposobów szybkiego poznania zdolności nowej odmiany do rizogenezy jest próba ukorzenia jej sadzonek pędowych. Jeśli będą się one trudno ukorzeniać, to prawdopodobnie także *in vitro* wystąpią podobne problemy. Z kolei autor podaje, że metoda *in vitro* pozwala w wielu wypadkach przezwyciężyć tę barierę. Trudności w ukorzeniu pewnych odmian róż wynikają prawdopodobnie z zawartości endogennych auksyn oraz innych hormonów roślinnych, substancji fenolowych lub enzymów uczestniczących w ich przemianach i biosyntezie. Na przykład u mikrosadzonek *Asparagus* sp. wysoki poziom endogennych giberelin stanowił barierę ukorzenia [28]. Foong i Barnes [19] podają, że u trudno ukorzeniającego się *Rhododendron* L. 'Britannia' stwierdzono wyższy poziom GA₃ i 1000-krotnie niższy poziom kwasu abscyzynowego (ABA) w porównaniu do łatwo ukorzeniającego się *Rhododendron ponticum* L. Co więcej, najwyższe stężenie endogennego ABA w pędach obu odmian notowano w optymalnych dla ukorzenia okresach. Moncousin [36] uważa, że zdolność do ukorzenia poszczególnych genotypów zależy od różnej zawartości w pędach specyficznych fenoli o działaniu synergistycznym z auksyną, a także właściwa dla danej odmiany potencjalna aktywność przemian form związanych auksyn do form wolnych, gdyż tylko nie związane auksyny wykazują aktywność fizjologiczną [36]. Foong i Barnes [20] sugerowali, że

jednym z kluczowych endogennych czynników ukorzenia jest peroksydaza. Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że wysoka aktywność peroksydazy i β -glukozydazy związana jest z dużą gotowością pędów do formowania korzeni [48]. Autorzy sugerują, że poziom aktywności tych enzymów może być wskaźnikiem (markerem) zdolności do rizogenezy danych genotypów.

Ważnym czynnikiem decydującym o zdolności do ukorzenia jest **stan ontogenetyczny** rośliny matecznej, będącej donorem eksplantatów inicjalnych. Wiadomo, że pędy pobierane z kultur zainicjowanych ze starych roślin, nie będących w fazie juwenilnej (młodocianej), słabo się ukorzeniają [21]. W wypadku rozmnażania róż nie spotkano się w literaturze z problemem ukorzenia wynikającym ze stanu ontogenetycznego rośliny matecznej, ponieważ materiał pobierany do zapoczątkowania kultur pochodzi najczęściej z młodych roślin.

Ostatnim ze znanych czynników wpływających na ukorzenie jest długość pędów. Wykazano, że sadzonki róży długości poniżej 1 cm ukorzeniły się *in vitro* w 10%, podczas gdy dłuższe od 2 cm – w ponad 80% [14, 42]. Tendencję wzrostu zdolności mikrosadzonek do ukorzenia wraz ze zwiększającą się długością pędu obserwowano także u fikusa i kordyliiny [32].

3. Bezpośrednie ukorzenie w niesterylnym podłożu

Coraz częściej, ze względu na możliwość uzyskania lepszych efektów ekonomicznych, poleca się producentom zastąpienie ukorzenia *in vitro* ukorzeniem bezpośrednim w niesterylnych warunkach [10]. Ukorzenie i aklimatyzacja przebiegają wtedy równocześnie, przyczyniając się do skrócenia okresu produkcji o 2–3 tygodnie. Ponadto, wyeliminowanie etapu ukorzenia *in vitro* pozwala na znaczne obniżenie kosztów produkcji. Debergh i Maene [10] podają, że koszt ukorzenia *in vitro* stanowi średnio co najmniej 35% kosztów całkowitych. Koszty te dla *Begonia* sp. i *Ficus* sp. oceniono na 56% [11], a dla *Rhododendron* sp. nawet na 75% [1]. Oprócz wymienionych korzyści ekonomicznych metoda bezpośredniego ukorzenia ma też wiele innych zalet. Najważniejszą z nich jest znacznie łatwiejsze umieszczenie w podłożu pędu nie ukorzonego w porównaniu z ukorzonym [44]. W przyszłości pozwoli to na wprowadzenie automatyzacji tej czynności, a więc redukcję kosztownej robocizny. System korzeniowy wytworzony w warunkach *in vitro* jest ponadto mniej efektywny w porównaniu do systemu rozwiniętego w podłożu *ex vitro*. Nie występują w nim włósniki, wiązki przewodzące są wąskie i słabo wykształcone, a w czasie sadzenia korzenie łatwo ulegają uszkodzeniu [34]. Wymienione korzyści bezpośredniego ukorzenia przyczyniają się do coraz szerszego wykorzystania tej metody w produkcji. Powszechnie stosuje się ją dla gatunków odznaczających się dużą zdolnością do rizogenezy, jak *Kalanchoë* sp. [53], *Saintpaulia* sp. [52] i *Rhododendron* sp. [13].

Uzyskanie wysokiej efektywności w ukorzeniu mikrosadzonek *ex vitro* jest bardzo trudne. Świadczą o tym nieudane próby innych badaczy. Campos i Pais [5] ukorzeniali w substracie torfowym pędy róż, których podstawy traktowano 0,1-procentowym roztworem IBA przez kilka minut, jednak wszystkie mikrosadzonki zmarły. Douglas i in. [14], nie stosując auksyn, uzyskali w zależności od odmiany zaledwie od 22% do 61% ukorzenionych i zaaklimatyzowanych roślin. Autorzy ci osiągnęli poprawę do ponad 80% ukorzenionych mikrosadzonek dopiero przez wstępną indukcję rizogenezy pędów *in vitro*. Efektywną metodę bezpośredniego ukorzenia mikrosadzonek róż opracowali Rogers i Smith [47]. Spośród 4 badanych odmian róż miniaturowych, u trzech, pędy ukorzeniły się *ex vitro* w ponad 95%. Badacze ukorzeniali pędy 2-centymetrowej długości, traktując ich podstawy preparatem ukorzeniającym w pudrze, zawierającym 0,1% IBA.

W metodzie *ex vitro* do zainicjowania rizogenezy bardzo często konieczne jest zastosowanie auksyny. Oprócz traktowania podstaw pędów preparatami ukorzeniającymi w pudrze wykorzystuje się też inne metody. Maene i Debergh [32] zaproponowali stosowanie roztworu wodnego auksyny, wlewane na pożywkę zestaloną agarą pod koniec ostatniego pasażu poprzedzającego ukorzenie. Mikrosadzonki można też sadzić w podłożu nasyconym auksynami lub opryskiwać je po posadzeniu roztworami auksyn [23]. Pomyślne wyniki uzyskano w badaniach nad bezpośrednim ukorzeniem mikrosadzonek róż dwóch odmian 'White Gem' i 'Starina' o odmiennych zdolnościach do rizogenezy [42]. Wykazano, że mikrosadzonki trudno ukorzeniającej się 'White Gem', posadzone do substratu torfowego, wytworzyły korzenie i zaaklimatyzowały się podobnie jak te, które wcześniej ukorzeniano *in vitro*, w ponad 80%, gdy podlewano je lub opryskiwano roztworem IBA o stężeniu $0,1-1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Jednak pędy ukorzenione wcześniej *in vitro* rosły szybciej. W wypadku odmiany 'Starina', łatwo ukorzeniającej się, bezpośrednie ukorzenie pędów w substracie torfowym w szklarni połączone z opryskiwaniem roztworem auksyn ($\text{IAA } 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lub $\text{IBA } 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) okazało się korzystniejsze od ukorzenia *in vitro*. Mikrosadzonki posadzone bezpośrednio w substracie ukorzeniły się w 98%, a ich system korzeniowy był znacznie lepiej rozwinięty.

4. Przygotowanie pędów do ukorzenia

Pędy przeznaczone do ukorzenia powinny być bardzo dobrej jakości, szczególnie w wypadku ukorzenia *ex vitro*. Większość gatunków mnożonych *in vitro* wymaga specjalnego przygotowania kultur pędów do pozyskiwania mikrosadzonek, ponieważ są one nieco odmienne pod względem morfologicznym i fizjologicznym [44]. Mają ciekłą kutykulę i nieprawidłowo funkcjonujące aparaty szparkowe czy słabo rozwinięte wiązki przewodzące. Sallanon i in. [49] obserwowali, że aparaty szparkowe pędów róż *in vitro* nie zamykały się w ciemności. W komórkach szparko-

wych autorzy stwierdzili brak aktywności ATPazy i 10-krotnie mniejszą zawartość wapnia w porównaniu do jego zawartości w roślinach *ex vitro*. Ponadto Donnelly i Skelton [12] stwierdzili, że w przeciwieństwie do roślin zaaklimatyzowanych hydrotody (szparki wodne) u mikrosadzonek róży nie zamykały się po przeniesieniu roślin ze szkła do warunków o niskiej wilgotności. Zdaniem autorów niezdolność hydrotod do zamykania się jest jedną z przyczyn ogromnej wrażliwości mikrosadzonek na stres wodny. Przeniesienie takich pędów do warunków *ex vitro* wymaga więc bardzo starannej opieki przez okres 2–3 tygodni, tj. utrzymania wysokiej wilgotności względnej około 95%, wysokiej temperatury 23–28°C oraz cieniowania i ochrony przed chorobami i szkodnikami. Po tym okresie rośliny można już stopniowo hartować. Szczególnie pracochłonnej opieki wymagają rośliny drzewiaste. W celu podniesienia tolerancji mikrosadzonek roślin drzewiastych na stres wodny próbowano pobudzić do funkcjonowania aparaty szparkowe pędów jabłoni przez traktowanie ich bezpośrednio po wyjęciu ze szkła kwasem absycynowym, mannitolem, wyższym stężeniem CO₂ lub przetrzymywaniem w ciemności [4]. Żadna z powyższych prób nie przyniosła oczekiwanych rezultatów.

Capellades i in. [6], prowadząc badania z udziałem kultur *in vitro* pędów róż mnożonych na pożywce MS zawierającej 3 mg · l⁻¹ BAP w warunkach 100% wilgotności względnej powietrza i 25 μmol · s⁻¹ · m⁻² intensywności światła, wykazali, że efektywność ukorzeniania i aklimatyzacji można zwiększyć specjalnie przygotowując pędy w końcowej fazie mnożenia. Autorzy uzyskali mikrosadzonki najbardziej zbliżone anatomicznie do roślin już zaaklimatyzowanych, gdy w ostatnim pasażu zmniejszono zawartość BAP w pożywce do 1,5 mg · l⁻¹, zwiększono intensywność światła do 80 μmol · s⁻¹ · m⁻² i zmniejszono wilgotność względną do 75%. Uzyskane w ten sposób pędy miały mniej aparatów szparkowych, które jednak nie wystawały ponad epidermę i zamykały się po przeniesieniu do warunków o wilgotności 40%. Ponadto liście nie miały hydrotod, a komórki epidermy były dłuższe.

Badania wykazały, że jednym z najważniejszych czynników wpływających na zdolność do rizogenezy pozyskiwanych mikrosadzonek jest stężenie BAP stosowane na etapie mnożenia. Mimo że przy wysokim stężeniu cytokininy uzyskano więcej pędów, były one mniejsze, miały drobniejsze liście, słabiej się ukorzeniły *in vitro* i gorzej zaaklimatyzowały w szklarni [43]. Uzyskane wyniki wskazują, że BAP używana w zbyt wysokim stężeniu w okresie namnażania wpływa hamująco na ukorzenianie pędów róż i osłabia ich zdolności adaptacyjne do warunków szklarniowych. Z tego względu polecano wprowadzenie dodatkowego pasażu przed ukorzenianiem, w którym pożywka byłaby pozbawiona cytokininy lub zawierała niewielką jej ilość [41, 42].

Mikrosadzonki przeznaczone do ukorzeniania nie powinny być nadmiernie uwodnione. Pędy zwitryfikowane są zazwyczaj krótkie i ukorzeniają się sporadycznie. Mają one bardzo cienką kutykulę i zdegenerowane wiązki przewodzące, dlatego rośliny zamierają wkrótce po posadzeniu w szklarni [55]. Ziv [55] przedstawia wiele

metod przeciwdziałania szklistości pędów różnych gatunków roślin, jak zmniejszenie stężenia BAP w pożywce dla jabłoni, zwiększenie zawartości agaru w kulturach gerbery, zwiększenie stężenia Ca^{2+} w wypadku goździków.

Aktywność fotosyntetyczna roślin w warunkach *in vitro* utrzymuje się na bardzo niskim poziomie. W ciągu ostatnich 6 lat prowadzono szereg badań nad możliwością zwiększenia aktywności fotosyntetycznej pędów *in vitro*. Wyższy bowiem poziom aktywności fotosyntetycznej mikrosadzonek w ostatniej fazie mnożenia znacznie ułatwia i przyspiesza aklimatyzację [30]. Langford i Wainwright [31] próbowali pobudzić pędy róż do intensywniejszej fotosyntezy poprzez zmniejszenie stężenia cukru w pożywce. Na pożywce zawierającej 1–2% cukru rośliny pobierały nieco więcej CO_2 niż na pożywce z 4% stężeniem cukru, jednak ich współczynnik rozmnażania był znacznie niższy. Kozai [30] podaje, że jedną z przyczyn cudzożywności roślin *in vitro* jest mała zawartość CO_2 w atmosferze wewnątrz pojemników z kulturami. Autor wykazał, że pod koniec 16-godzinnego oświetlenia stężenie CO_2 uległo zmniejszeniu z 3000 ppm do 90 ppm. Wzbogacenie atmosfery CO_2 (500–3000 ppm) oraz zastosowanie wyższego natężenia światła ($100\text{--}180 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) umożliwiło zwiększenie aktywności fotosyntetycznej mikrosadzonek i w konsekwencji przyczyniło się do lepszego ukorzeniania i aklimatyzacji goździka, zatrwianu, cymbidium, ziemniaka i róży [29, 30]. Dzięki takiej technice możliwe było wyeliminowanie cukru z pożywki, co korzystnie wpłynęło na zmniejszenie ryzyka zakażenia roślin. Ponadto w kulturach samożywnych rozwój tkanek okrywających przebiega prawidłowo, dzięki czemu zwiększają się zdolności przystosowawcze roślin do warunków szklarniowych. Wyższą efektywność bezpośredniego ukorzeniania mikrosadzonek róż sadzonych w substracie torfowym poprzez zwiększenie stężenia CO_2 i natężenia światła obserwowali także Matysiak i in. [33].

5. Podsumowanie

Proces ukorzeniania sadzonek jest etapem krytycznym w metodzie masowego rozmnażania roślin *in vitro*. Obecnie prowadzi się wiele badań nad poszukiwaniem wyznaczników, czyli markerów, lub wskaźników gotowości pędów do tworzenia korzeni przybyszowych. Są to badania prowadzone w zakresie fizjologii i biochemii roślin, a także biologii molekularnej. Poszukuje się markerów nie tylko morfologicznych, takich jak stopień zdrewnienia pędu, wielkość i wygląd liści, lecz także markerów biochemicznych i molekularnych, jak zawartość w tkankach specyficznych enzymów czy kwasów nukleinowych, których obecność ściśle wiązałaby się z gotowością do rizogenezy. Wiele badań prowadzi się również nad zwiększeniem lub wywołaniem gotowości do ukorzeniania i obejmują one wszystkie wymienione wyżej zagadnienia. Ponadto w ostatnich latach pojawiło się wiele prac nad wpływem jakości światła (czerwonego, dalekiej czerwieni czy niebieskiego) na ukorzenianie [22].

Celem tych badań jest wyeliminowanie lub ograniczenie stosowania powszechnie wykorzystywanych w ogrodnictwie preparatów stymulujących ukorzenianie (nieobojętnych dla środowiska), zawierających wysoce aktywne auksyny, i zastąpienie ich traktowaniem sadzonek światłem o danej długości fali przez określony czas. Wydaje się, że poszukiwanie nowych czynników fizycznych indukujących rizogenezę jest jak najbardziej celowe.

Literatura

- [1] Anderson W.C., Meagher G.W. 1977. Cost of propagating broccoli plant through tissue culture. *HortScience* 12: 543–544.
- [2] Badzian T., Hennen G.R., Fotyma-Kern J. 1991. In vitro rooting of clonal propagated miniature rose cultivars. *Acta Hort.* 289: 329.
- [3] Biondi S., Diaz T., Iglesias I., Gamberini G., Bagni N. 1990. Polyamines and ethylene in relation to adventitious root formation in *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* 78: 474–483.
- [4] Brainerd K.E., Fuchigami L.H. 1982. Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, CO₂. *J. Exp. Bot.* 33: 388–392.
- [5] Campos P.S., Pais M.S.S. 1990. Mass propagation of the dwarf rose cultivar 'Rosamini'. *Scientia Hort.* 43: 321–330.
- [6] 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.
- [7] Chu M.C., Skirvin R.M. 1986. Effect of vitamins on root development in micropropagation of miniature roses. Abstracts of XXII International Horticultural Congress, 10–18 August, California, Davies, USA, 1131.
- [8] Coleman W.K., Huxter T.J., Reid D.M., Thorpe T.A. 1980. Ethylene as an endogenous inhibitor of root regeneration in tomato leaf disks cultured in vitro. *Physiol. Plant.* 48: 519–525.
- [9] Collet G.F., Le C.L. 1987. Effect of auxin during in vitro rhizogenesis of rose and apple trees. *Acta Hort.* 212: 273–280.
- [10] Debergh P.C., Maene L.J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14: 335–345.
- [11] Donnan A., Davidson S.E., Williams C.L. 1978. Establishment of tissue culture grown plants in the greenhouse environment. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 91: 235–237.
- [12] Donnelly D.J., Skelton F.E. 1989. Comparison of hydrotome structure in micropropagated plantlets and greenhouse-grown 'Queen Elizabeth' rose plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 841–846.
- [13] 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. *Scientia Hort.* 24: 331–341.
- [14] 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.
- [15] Drew R.A., McComb J.A., Considine J.A. 1993. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. in vitro in relation to auxin sensitive phases and use of riboflavin. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 1–7.
- [16] Druart P., Kevers C., Boxus P., Gaspar T. 1982. In vitro promotion of root formation by apple shoot through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 429–436.
- [17] Dubois L.A.M., De Vries D.P. 1991. Variation in adventitious root formation of softwood cuttings of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss cultivars. *Scientia Hort.* 47: 345–349.

- [18] 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. *Scientia Hort.* 35: 293–299.
- [19] Foong T.W., Barnes M.F. 1981. The hormone levels in stem cuttings of difficult-to-root and easy-to-root rhododendrons. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 176(1): 13–22.
- [20] Foong T.W., Barnes M.F. 1981. Rooting 'cofactors' in rhododendron: the fraction and activity of components from an easy-to-root and difficult-to-root variety. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 176(6): 507–523.
- [21] Franclet A., Boulay M., Bekkaoui F., Fouret Y., Verschoore-Martouzed B., Walker N. 1987. Rejuvenation. W: Cell and Tissue Culture in Forestry, red. Bonga J.M. i Durzan D.J.; Martinus Nijhoff, Dordrecht: 232–248.
- [22] Gabarkiewicz B., Gabryszewska E., Rudnicki R.M. 1995. Wpływ jakości światła na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. *Postępy Nauk Rolniczych* 4 (w druku).
- [23] Gabryszewska E., Warabieda D. 1992. Ukorzenianie mikrosadzonek lilaka zwyczajnego (*Syringa vulgaris* L.) odm. Florent Stepman *in vitro* i *in vivo*. *Rośliny Ozdobne Ser. B* 17: 189–202.
- [24] Geneve R.L., Hackett W.P., Swanson B.T. 1990. Root initiation in debladed petioles from juvenile and mature English ivy in response to inhibitors of ethylene biosynthesis and action. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 128–131.
- [25] Hasegawa P.M. 1980. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 216–220.
- [26] Hyndman S.C., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral salts. *HortScience* 17(1): 82–83.
- [27] Khosh-Khui M., Sink K.C. 1982. Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. *Scientia Hort.* 17: 371–376.
- [28] Khunachak A., Chin C.K., Le T., Gianfagna T. 1987. Promotion of asparagus shoot and root growth by growth retardants. *Plant Cell, Org. Cult.* 11: 97–110.
- [29] Kozai T. 1990. Photoautotrophic of *Rosa* plantlets under high CO₂ and high photosynthetic photon flux. Abstracts of VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, Holandia, 110.
- [30] Kozai T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. W: Micropropagation: Technology and Application; red. Debergh P.C., Zimmerman R.H.; Kluwer Academic Publishers: 447–470.
- [31] Langford P.J., Wainwright H. 1987. Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.* 60: 633–640.
- [32] Maene L., Debergh P.C. 1983. Rooting of tissue cultured plants under *in vivo* conditions. *Acta Hort.* 131: 201–208.
- [33] Matysiak B., Kubik M., Podwyszyńska M., Nowak J. 1993. Wpływ światła i dwutlenku węgla na wiązanie ¹⁴CO₂, aklimatyzację i wzrost mikrosadzonek *Rosa hybrida* 'White Gem'. Materiały – VIII Ogólnopolski Zjazd Kwiaciarzy, 9–10 listopada, ISK Skierniewice, 9–10.
- [34] McClelland M.T., Smith M.A.L., Carothers Z.B. 1990. The effect of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 23: 115–123.
- [35] Mitsuhashi-Kato M., Shibaoko H., Shimokorijama M. 1978. The nature of the dual effect of auxin on root formation in *Azukia* cuttings. *Plant Cell Physiol.* 19: 1535–1542.
- [36] Moncousin C. 1991. Rooting of microcuttings. *Acta Hort.* 289: 301–327.
- [37] Moncousin C., Favre J.M., Gaspar T. 1989. Early changes in auxin and ethylene production in vine cuttings before adventitious rooting. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 19: 235–242.
- [38] Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- [39] Orlikowska T. 1988. Propagation of quince S1 (*Cydonia oblonga* Mill) *in vitro*. *Fruit Sci. Rep.* 15: 157–165.

- [40] Orlikowska T. 1992. Influence of arginine on *in vitro* rooting of dwarf apple rootstock. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31: 9–14.
- [41] Podwyszyńska M. 1992. In vitro propagation of *Aglaonema* sp. *Folia Hort.* IV/1: 105–114.
- [42] Podwyszyńska M. 1994. Wpływ regulatorów wzrostu na ukorzenianie i aklimatyzację róż miniaturowych mnożonych *in vitro*. Praca doktorska. Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice: 1–145.
- [43] Podwyszyńska M., Hempel M. 1989. The after effect of 6-benzylaminopurine on rooting *in vitro* and acclimatization of *Rosa hybrida*. *Rośliny Ozdobne Ser. B* 13: 77–85.
- [44] Preece J.E., Sutter E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. W: *Micropropagation: Technology and Application*; red. Debergh P.C. i Zimmerman R.H.; Kluwer Academic Publishers: 71–94.
- [45] Rahman S.M., Hossain M., Rafiul Islam A.K.M., Joarder O.I. 1992. Effect of media composition and culture conditions on *in vitro* rooting of rose. *Scientia Hort.* 52: 163–169.
- [46] Robins J.A., Kays S.J., Dirr M.A. 1983. Enhanced rooting of wounded mung bean cuttings by wounding and ethephon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 325–329.
- [47] 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.
- [48] Saare-Surminski K., Lieberei R. 1994. Rooting of *Baptisia tinctoria* L.: Investigations of enzyme activity of peroxidases and β -glucosidases. Abstracts VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, 22.
- [49] Sallanon H., Laffray D., Coudret A. 1991. Ultrastructure and functioning of guard cells of *in vitro* cultured rose plants. *Plant. Physiol. Biochem.* 29: 333–339.
- [50] Sauer A., Walther F., Preil W. 1985. Different suitability for *in vitro* propagation of rose cultivars. *Gartenbauwissenschaft* 50: 133–138.
- [51] Skirvin R.M., Chu M.C. 1979. *In vitro* propagation of 'Forever Yours' rose. *HortScience* 14: 608–610.
- [52] Smith R.H., Norris R.E. 1983. *In vitro* propagation of African violet chimeras. *HortScience* 18: 436–437.
- [53] Tymoszek J., Hempel M. 1987. The comparison of the quality of *Kalanchoë blosfeldiana* plants obtained by rooting of microcutting *in vitro* and *in vivo*. Proc. Symp. Florizel, Arlon, Belgium, 112.
- [54] Yang S.F., Hoffman N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155–189.
- [55] Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. W: *Micropropagation – Technology and Application*, red. Debergh P.C., Zimmerman R.H., Kluwer Academic Publishers: 45–70.

In vitro propagation of rose and other plant species II. Rooting of microcuttings

Summary

Adventitious rooting of cuttings is a critical and very important process in horticultural mass production either in traditional vegetative multiplication or with propagation *in vitro*. Several factors affecting rhizogenesis of *Rosa* sp. shoots and other species have been reported in this review. External factors, which are relatively easy to control (temperature, light, medium composition) and internal factors (endogenous level of growth regulators, phenolic compounds) resulting from ontogenic stage and genotype are presented. The comparison of the different rooting procedures *in vitro* and *ex vitro*, and preparation of the microcuttings to the rooting through improving their quality and rooting ability are also discussed.

Stosowane skróty

MS	— pożywka wg Murashige i Skoog [38],
BAP	— 6-benzyloaminopuryna,
IAA	— kwas indolilo-3-octowy,
IBA	— kwas indolilo-3-masłowy,
NAA	— kwas naftylo-1-octowy,
GA ₃	— kwas giberelinowy,
AOA	— kwas 1-aminooksyoctowy,
AIB	— kwas α -aminoizomasłowy,
AVG	— aminoetoksywinyloglicyna,
ACC	— kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy