



Długotrwałe przechowywanie eksplantatów pędowych w kulturach *in vitro* w temperaturach powyżej 0°C

Anna Lisek, Teresa Orlikowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Long-term *in vitro* storage of shoot explants at temperatures above 0°C

Summary

Long-term storage of shoots or nodal buds *in vitro*, in conditions which retard their growth, may be an alternative or supplementary method in the protection of plant resources and in the production of planting material for elite mother stocks. In this paper we describe the most important factors which influence the survival and further behaviour of stored explants.

Key words:

in vitro storage, temperature, hardening, osmotic pressure, irradiance, photoperiod, sucrose, growth regulators, containers, alginate beads.

1. Wstęp

Długotrwałe przechowywanie roślinnych kultur *in vitro* jest alternatywnym lub uzupełniającym sposobem prowadzenia kolekcji genetycznych. W kulturach *in vitro* można także przechowywać uwolnione od wirusów eksplantaty roślin przeznaczonych do produkcji szkółkarskiej drzew i krzewów. Długotrwałe przechowywanie powinno odbywać się w warunkach, które hamują lub spowalniają procesy metaboliczne, co zwalnia od konieczności częstego przeszczepiania na świeże pożywki. Najbardziej radykalnym sposobem długotrwałego utrzymywania eksplantatów bez przeszczepiania jest przechowywanie w temperaturze ciekłego azotu. Ten sposób umożliwia przechowanie tkanek roślinnych dowolnie długo, jednak ma zastosowanie tylko

Adres do korespondencji

Anna Lisek,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

3 (54) 134-144 2001

do genotypów, które łatwo regenerują całe rośliny z bardzo małych eksplantatów: merystemów, zarodków somatycznych i zygocytycznych oraz zawieszin komórkowych. Eksplantaty większe – pędy ukorzone lub nieukorzone albo pąki węzłowe można przechowywać przez określony czas w temperaturach niższych od temperatury otoczenia, najczęściej 2-4°C.

Warunki w czasie długotrwałego przechowywania kultur pędowych powinny zapewniać wysoką przeżywalność eksplantatów, stabilność genetyczną oraz zdolność do regeneracji pędów kątowych po przeszczepieniu na świeże pożywki. Zarówno warunki fizyczne w czasie przechowywania (niska temperatura, natężenie oświetlenia i fotoperiod, duże ciśnienie osmotyczne pożywki) jak i skład pożywki (stężenie cukrów i soli mineralnych, cytokinin i obecność retardantów wzrostu) powinny spowalniać procesy życiowe, a przede wszystkim hamować wzrost pędów. Na przeżywalność i kondycję kultur mogą także wpływać: typ eksplantatu, rodzaj i objętość naczyń, termin przenoszenia do chłodni po przeszczepieniu oraz hartowanie eksplantatów niską temperaturą przed przechowywaniem.

2. Rodzaj eksplantatów i ich stan fizjologiczny

W warunkach dodatniej temperatury, można przechowywać na pożywkach wierzchołki pędów z liśćmi, np. jabłoni, śliwy (1), moreli (2) lub bez liści (3), odcinki węzłowe pędów, np. ziemniaka (4,5), wieloroślinki, np. jabłoni (1, 6), sosny (7), pędy w fazie ukorzeniania, np. truskawki (8), wiązu (9), trzciny cukrowej (10) lub mikrocebunki (11). Bardzo ważna jest dobra kondycja wyjściowa eksplantatów. Na przykład pędy wykazujące objawy nadmiernego uwodnienia (szkliste) lub wytworzone na pożywkach z dużym stężeniem cytokininy (z prawdopodobną ukrytą szklistością) pierwsze tracą żywotność i zdolność do rozkrzewiania po przechowywaniu (7). Długotrwałe przechowywanie znoszą lepiej pędy dłuższe i grubsze (7).

3. Temperatura

3.1. Temperatura jako czynnik spowalniający wzrost kultur

Obniżenie temperatury radykalnie ogranicza metabolizm, czego skutkiem jest m. in. zahamowanie wzrostu. Kultury roślin pochodzących ze strefy umiarkowanej – jabłoni, grusza, śliwa, wiśnia, malina i truskawka przechowują się dobrze w temperaturach 2-4°C (12,1,13-16). Kultury roślin pochodzących ze stref cieplejszych – *Colocasia*, *Xanthosoma*, *Guazuma*, żeń-szeń, banan, a także winorośl wymagają do przechowywania wyższych temperatur: 9-25°C (17-21, 40). Kultury wszystkich roślin mogą być także przechowane przez pewien czas bez przeszczepiania w temperatu-

rach wzrostowych. Na przykład, ukorzone mikrośadzonki wiązu przechowywano do 30 miesięcy w 7°C (9), a kultury pędowe maliny przeżywały przez 6-12 miesięcy w 23°C na pożywkach o zwiększonym ciśnieniu osmotycznym (22). Trzeba jednak brać pod uwagę zależność taką, że im wyższa temperatura w czasie przechowywania, tym częściej kultury należy przeszczepiać (23).

3.2. Hartowanie niską temperaturą

Na przeżywalność eksplantatów może mieć wpływ hartowanie niską temperaturą przed umieszczeniem kultur w chłodni. Hartowanie ma na celu stopniową zmianę metabolizmu i przyzwyczajanie eksplantatów do dłuższego przebywania w chłodzie. Reed (14,15) poleca dla kultur maliny i truskawki następującą procedurę hartowania: 1 tydzień w temperaturze 25°C i 1 tydzień w temperaturach zmiennych: 16 h w -1°C i 8 h w 22°C. Stopniowe obniżanie temperatury z 24 do 9°C umożliwiło wydłużenie okresu przechowywania kultur *Nephrolepis exaltata* do 3 lat (24).

3.3. Oddziaływanie obniżonej temperatury na zdolność do tworzenia pędów po przechowywaniu

Przechłodzenie kultur roślin drzewiastych niejednokrotnie zwiększa współczynnik rozmnażania i poprawia zdolność do ukorzenia (6,23,25). Zwiększenie zdolności do tworzenia pędów kątowych (do rozkrzewiania) zależy od długości okresu chłodzenia. Kultury pędowe wiśni najlepiej rozkrzewiały się po 4, 6 lub 8 tygodniach chłodzenia w temperaturze 4°C, w zależności od odmiany (13). Zdolność do rozkrzewiania obniżała się do poziomu kultur niechłodzonych po około 12 tygodniach chłodzenia, a po 20 tygodniach ponownie wzrastała. W przypadku kultur innych roślin dłuższy okres w niskiej temperaturze nie wpływa na zdolność do namnażania. Na przykład, pędy *Trifolium repens* przechowywane w 5°C przez 10 miesięcy zachowały typową wydajność rozmnażania (26). Kultury *Prunus* przechowywane w -3°C rozkrzewiały się po przechowywaniu przez 10 miesięcy tak, jak kultury sukcesywnie przeszczepiane i inkubowane przez ten okres w temperaturze 23°C (27). U niektórych roślin obserwuje się okresowe obniżenie zdolności do namnażania. Na przykład, kultury maliny i truskawki tworzą znacznie mniej pędów w pierwszym pasażu po przechowywaniu w 4°C, w drugim pasażu rozkrzewianie jest bardziej intensywne, ale nie zawsze osiąga poziom kontroli nie przetrzymywanej w chłodni (28). Podobny efekt wystąpił przy przechowywaniu wiązu (9).

4. Światło

Natężenie światła oraz długość okresu świetlnego w ciągu doby, to kolejne czynniki mające wpływ na przechowywanie kultur. Powszechnie uważa się, że w obniżonej temperaturze korzystniejsze jest zastosowanie światła o niskiej intensywności. Jednak kultury jabłoni, wiśni, truskawki, topoli, kiwi, *Trifolium repens* można było przechowywać w ciemności od 3 miesięcy do 6 lat (6,8,12,13,29-31,26). Kultury *Nephrolepis exaltata* lepiej przechowywały się w ciemności niż na świetle, natomiast dla przechowywania pędów *Cordyline fruticosa* korzystniejsze było niskie natężenie światła 3-5 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (24). Kultury *Miscanthus x ogiformis* przechowywane przez 27 tygodni w 16°C na pożywce ukorzeniającej, lepiej przeżywały przy natężeniu światła 20 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ niż przy niższych natężeniach, z których najniższe – 5 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ istotnie obniżało przeżywalność kultur (32). Kultury banana przechowywano w 16°C przy natężeniu światła 25 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (21).

Podkładki *Prunus* przechowywały się lepiej przez 10 miesięcy w -3°C w ciemności, niż przy 16-godzinnym fotoperiodzie (27). Zastosowanie 12-godzinnego fotoperiodu wpłynęło pozytywnie na kondycję i przeżywanie kultur maliny (33) i mięty (34), przechowywanych w 4°C.

5. Ciśnienie osmotyczne pożywki

Zwiększone ciśnienie osmotyczne pożywki utrudnia pobieranie składników pokarmowych i tym samym ogranicza wzrost pędów, także w temperaturach wzrostowych. Ten czynnik można regulować stężeniem cukrów metabolizowanych lub nie-metabolizowanych przez rośliny oraz stężeniem agaru. Wyższe stężenie sacharozy (9%) wraz z redukcją stężenia soli MS do 1/4 ograniczało wyrastanie pędów w czasie przechowywania mikrocebulek lilii i zwiększało przeżywalność i regenerację po przechowywaniu w 25°C przez 28 miesięcy (11). Przechowywanie kultur ziemniaka w 20°C, na pożywce z wysokim stężeniem sacharozy (8%) przez 12 miesięcy, wpływało na zwiększenie współczynnika namnażania pędów i ich szybszy wzrost (35), ale nie hamowało zamierania pędów. Mannitol może działać jak krioprotektant, który chroni komórkę w czasie zamrażania (7). Dodatek mannitolu ma szczególne znaczenie przy przechowywaniu w obniżonej temperaturze kultur roślin wrażliwych na chłód. Na przykład, mannitol umożliwiał przechowywanie kultur tropikalnej rośliny *Xanthosoma* w temperaturze 13°C w ciemności, na pożywce z cytokininą i auksyną, przez 3 lata (18). Reakcja przechowywanych kultur tropikalnej rośliny *Colocasia esculenta* na dodatek mannitolu zależała od temperatury przechowywania; w temperaturze 9°C i w stężeniu 4,5 i 6% mannitol był toksyczny, natomiast poprawiał przeżywanie i zdolność do wznowienia wzrostu kultur przechowywanych do 42 miesięcy w temperaturze 28-24°C (17). Dodatek 1-4% mannitolu do pożywki poprawiał przeżywanie pędów *Cinchona ledgeriana*, przechowywanych w 12°C, natomiast za-

równy dla kultur *Cinchona* (36) jak i gruszy (16) przechowywanych w 26-28°C był szkodliwy. Dla przechowywania pędów żeńszczenia w temperaturze 15°C Juhui (20) proponował pożywkę z cytokininą i auksyną oraz 3% dodatkiem mannitolu. Vysocakaja (37) donosiła o pozytywnym wpływie mannitolu (1-4 g/l) na przeżywalność oraz ograniczenie nekroz pędów truskawki, przechowywanych w 25°C. Wyższe stężenie mannitolu – 5 g/l, wpłynęło ujemnie na przeżywalność i kondycję pędów przechowywanych w 25-28°C przez 5-9 miesięcy. W badaniach własnych wykazano, że dodatek do pożywki 10 g/l mannitolu oddziałował toksycznie na kultury truskawki „Senga Sengana” przechowywane w 23°C, ale nie w 4°C. Mannitol zwiększał przeżywalność oraz rozkrzewianie w czasie przechowywania kultur maliny odmiany „Norna” w 23°C oraz stymulował rozkrzewianie kultur maliny „Malling Seedling” w czasie przechowywania w 4°C, co zwiększało łączną liczbę pędów uzyskanych w dwóch pasażach namnożeńiowych po przechowywaniu (22 oraz wyniki nie publikowane).

Uważa się, że długie przechowywanie pędów na pożywce z mannitolem może być powodem nietypowej metylacji DNA (38), dlatego do przechowywania ziemniaka przez 8-12 miesięcy w 8°C lub 5-6 miesięcy w 18°C stosowano dodatek kwasu acetylosalicylowego i stwierdzono, że związek ten może być stosowany zamiast mannitolu (39).

6. Stężenie soli mineralnych, sacharozy i agaru w pożywce

Zredukowanie zawartości azotu w pożywce do 25 lub 50% stężenia standardowego poprawiło przeżywanie pędów maliny i mięty, przechowywanych przez 9 miesięcy w 25°C (33,34). Podobnie, zmniejszenie stężenia azotanu amonu o 6-25% wpłynęło pozytywnie na przeżywanie pędów winorośli, w temperaturze 28°C, przez 8-9 miesięcy (40). Metoda ta może mieć zastosowanie do przechowywania genotypów wrażliwych na niską temperaturę. Kultury trzciny cukrowej można przechowywać w 18°C przez 12 miesięcy, na pożywce bez regulatorów wzrostu, z obniżonym stężeniem soli mineralnych i witamin (10). Kondycja pędów *Prunus* i *Malus* przechowywanych na pożywce ze zredukowanym do (15 g/l) stężeniem sacharozy była lepsza w porównaniu z pędami, które przebywały na pożywce z 30 g/l sacharozy (1). Więcej kultur *Miscanthus x ogiformis* przeżywało przechowywanie przez 27 tygodni na pożywce o niższej koncentracji sacharozy (20 g/l) (32). Do przechowywania kultur *Coffea* przez 12 miesięcy, w temperaturze 20 i 27°C, najkorzystniejsze było stężenie sacharozy 20 g/l, natomiast zarówno stężenie 5 g/l sacharozy lub całkowity jej brak obniżał przeżywalność (41). Zwiększenie stężenia agaru w pożywce do 8 i 10% zwiększało kondycję kultur jeżyny, mięty i borówki przechowywanych przez 8 miesięcy w temperaturze fitotronu (42). Podobny wpływ na przechowywanie kultur chmielu miało stężenie agaru 12%. Zwiększenie stężenia agaru nie miało wpływu na przechowywanie kultur porzeczki i truskawki (42) oraz maliny (22).

7. Poziom cytokinin w pożywce

Innym czynnikiem silnie ograniczającym wzrost kultur w czasie przechowywania jest obniżenie stężenia lub wyeliminowanie cytokinin z pożywki. Zbyt wysoka koncentracja cytokininy może spowodować zbyt intensywne wyrastanie pędów (także przybyszowych) i/lub ich nadmierne uwodnienie po okresie przechowywania (3). Maliny i truskawki dobrze przechowywały się na pożywkach bez regulatorów wzrostu (14,15,33,37). Autorzy jednak nie podali, jaka była zdolność kultur do rozkrzewiania po przechowywaniu. Dodatek niewielkiej ilości cytokininy do pożywki poprawiał przeżywanie śliwy, jabłoni, porzeczki i in. (1,6,43) i zwiększał zdolność malin do rozkrzewiania w czasie przechowywania (28). Przy ustalaniu optymalnej koncentracji benzyloaminopuryny (BAP) należy brać pod uwagę zróżnicowanie genotypowe (44).

8. Retardanty wzrostu

Okres przebywania eksplantatów na pożywce bez przeszczepiania można wydłużyć przez dodatek retardantów, które powodują zahamowanie wzrostu roślin, ale także zwiększenie odporności na chłód oraz opóźnienie starzenia liści w ciemności. Retardanty były stosowane, m.in. w przechowywaniu winorośli i czereśni. Ich skuteczność była zależna od temperatury przechowywania. W stężeniu 750 mg/l chlorek chlorocholiny (CCC) umożliwiał przechowywanie winorośli w temperaturach 3 i 8°C przez 10 miesięcy (45), a w temperaturze 25°C przez 5-6 miesięcy. Paklobutrazol zwiększał o 40% przeżywanie pędów czereśni przechowywanej przez 13 miesięcy w 0,5°C. Efekt retardacji zanikał natychmiast po przeniesieniu do warunków wzrostowych (46). Paklobutrazol, ancymidol, unikonazol i daminozyd dodane do pożywki do namnażania mącznika powodowały znaczne skrócenie pędów bez zakłócania mikrorozmnażania (47). Na podstawie własnych wyników (nie publikowane) wykazano, że unikonazol nie miał wpływu na przeżywalność pędów maliny „Norna” w 4°C, natomiast oddziaływał ujemnie na przeżywanie pędów w 23°C przez 18 miesięcy. Odmienne oddziaływanie wykazał paklobutrazol, wpływając ujemnie na przeżywanie kultur maliny w 4°C i poprawiając przeżywanie w 23°C.

9. Rodzaj pojemników do przechowywania kultur oraz rodzaj zakrycia pojemników

Przy długoterminowym przechowywaniu ważny jest wybór właściwych pojemników i sposobu ich zamykania. Powinny one zajmować jak najmniejszą powierzchnię, zapewniać sterylność i niewysychanie pożywki. Mullin i Schlegel (8) proponowali kilkuletnie przechowywanie ukorzenionych pędów truskawki w 4°C w probówkach, jednak wadą tego sposobu była konieczność uzupełniania pożywki co 3 miesiące, co zwiększało pracochłonność i niebezpieczeństwo zakażenia kultur. Zastąpienie korków z waty plastikowymi znacznie zwiększyło przeżywalność kultur pędowych *Rauwolfia serpentina*, dzięki mniejszemu wysychaniu (48). Reed (14,15) polecała do przechowywania pędów maliny i truskawki torebki ze specjalnej folii polietylenowej – CultuSAK (49), dzięki którym można bardzo ekonomicznie wykorzystać komorę klimatyczną. W doświadczeniach prowadzonych w ISK wykazano lepszą przydatność mniejszych pojemników szklanych (200 ml) niż słoików standardowych (350 ml), do przechowywania pędów truskawki i maliny (50). Przechowywanie kultur bardziej rozkrzewionych, na przykład przenoszonych do chłodni po dłuższym okresie inkubowania w warunkach wzrostowych będzie zapewne bardziej bezpieczne w większych pojemnikach.

10. Termin przenoszenia kultur do przechowalni

Kilkupędowe eksplantaty podkładki jabłoni M 9 przenoszone do chłodni bezpośrednio po szczepieniu lepiej przeżywały i regenerowały po 7 miesiącach przechowywania niż przenoszone po 10 lub 20 dniach (6), natomiast pędy wierzchołkowe topoli tworzyły więcej pędów po 3 miesiącach przechowywania, gdy były przenoszone do chłodni po 7 i 14 dniach (29). Podobnie lepsze wyniki przechowywania osiągnięto, gdy pędy lilaka przenoszono do przechowalni po 14 dniach (51). W wymienionych doniesieniach wskazuje się, że kultury można przenosić do chłodni zarówno bezpośrednio po przeszczepieniu jak i po okresie kondycjonowania w warunkach wzrostowych, jednak zanim wystąpią objawy starzenia. Przeżywalność kultur *Prunus* przechowywanych w -3°C na pożywce z 0,3 mg/l BAP była wyższa, gdy przenoszono je do chłodni po 1-2 tygodniach od przeszczepienia (27). Kultury pędowe topoli przeżywały w 75% na pożywce zawierającej 0,3 mg/l BAP okres 24-miesięcznego przechowywania w 4°C, w ciemności, gdy wnoszono je do chłodni po 4 tygodniach (30). Termin przenoszenia do chłodni nie miał wpływu na przeżywalność i regenerację pędów maliny przechowywanych na pożywce bez cytokiny (28).

11. Skład atmosfery w naczyniu

Przy przechowywaniu kultur wrażliwych na etylen korzystny jest dodatek tiosiarczynu srebra do pożywki (5), który ogranicza deformacje pędów powodowane nagromadzeniem się etylenu w czasie przechowywania. Dorion i wsp. (52) stwierdzili, że obniżona koncentracja tlenu może zastąpić efekt niskiej temperatury w przechowywaniu brzoskwini i generalnie pomóc w przechowywaniu roślin wrażliwych na niską temperaturę.

12. Otoczkowanie eksplantatów w alginianie wapnia

Nową metodą wdrażaną do długoterminowego przechowywania jest zamykanie 3-5 mm wierzchołków wzrostu w otoczkach z alginianu wapnia, które można przechowywać w bardzo małych pojemnikach, bez pożywki. Próby takie robiono dla jabłoni, kiwi, brzozy, głogu i maliny (53), morwy (54), kamelii (55), goryczki (56), roślin tropikalnych *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don (19). Skuteczność przechowywania pędów w otoczkach alginianowych może być modyfikowana przez środowisko, w którym rozpuszcza się alginian. Do otoczkowania wierzchołków pędów roślin tropikalnych najlepsze, jak się okazało, były kapsułki na bazie wody (19), a dla kamelii na bazie pożywki MS, w połączeniu z sacharozą i regulatorami wzrostu (55). Podobnie, eksplantaty goryczki lepiej regenerowały, gdy otoczki sporządzono przy użyciu pożywki MS niż wody (56). Zdolność do regeneracji otoczkowanych pędów zależy także od temperatury przechowywania i od genotypu (19).

13. Interakcja wymienionych czynników

Podjmując decyzję o warunkach długotrwałego przechowywania kultur należy mieć świadomość, że ostateczny wynik będzie zależał od współdziałania wielu czynników. Wybór temperatury przechowywania zależy od wymagań roślin i warunków technicznych. Im temperatura bliższa 0°C, tym bardziej zahamuje wzrost pędów. Dłuższe przechowywanie w temperaturach wzrostowych wymaga oświetlenia, prowadząc równocześnie do wyczerpania pożywki i jej wyschnięcia. Ciemność w przechowalni lub światło bardzo niskiej intensywności jest możliwe tylko w przypadku niskiej temperatury. Zakrycie naczyń powinno być na tyle szczelne aby nie powodować wysychania pożywki, ale wrażliwe genotypy należy zabezpieczyć przed szkodliwym wpływem etylenu przez zmniejszenie liczby eksplantatów w naczyniu, wentylację naczyń lub włączenie do pożywki związków zawierających azotan srebra, który powoduje zmniejszenie wrażliwości na etylen. Dodatek cytokinin do pożywki jest związany z wymaganiami genotypu. Ich nadmiar w pasażu poprzedzającym prze-

Tabela 1

Propozycje długotrwałego przechowywania eksplantatów w kulturach *in vitro* dla wybranych roślin uprawnych

| Roślina | Rodzaj eksplantatu | Rodzaj naczynia i przykrycia | Pożywka | | | Kondycjonowanie/hartowanie | Temperatura i światło | Okres przechowywania/ % przeżywających | Autoryzacja |
|------------------------------|--------------------|--------------------------------|--|---|--|---|--|---|-------------|
| | | | Regulatory wzrostu | Inne składniki pożywki* | | | | | |
| koniczyna | pędy | | BAP – 0,2 mg/l | | | 5 dni w fitotronie | 5°C w ciemności | 10 mies. – 100% | (26) |
| szparag jadalny | wierzch. 1,5 cm | słoiki 200 ml | kin – 1 mg/l NAA – 0,5 mg/l | mannotol – 40 g/l | | 5 dni w 28°C | 5°C w ciemności | 12 mies. – 90% | (57) |
| ziemniak | odcinki 1-węzłowe | probówki/p-propylen + parafilm | – | mannotol – 20 g/l sacharaza – 40 g/l STS – 9 mg/l | | 2 tyg. w 25°C/ /60 $\mu\text{moli/m}^2/\text{s}$ | 6°C – 20 $\mu\text{moli/m}^2/\text{s}$ | 16 mies. – 100% | (5) |
| wiąz | ukorzone pędy | probówki/polietylen | IBA – 2,5 μM | 0,2% węgla aktywn. | | 1-2 mies. w fitotronie | 7°C/8 h – 7 W/m ² | 24 mies. – 100% | (52) |
| topola | wierzch. pędów | słoiki 7,6x7,6 cm | BAP – 1,3 μM | | | 1 mies. w fitotronie | 4°C w ciemności | 24 mies. – 70% | (30) |
| dąb korkowy | wierzch. pędów | słoiki 300 ml | BAP – 2,2 μM IAA – 0,6 μM | | | bezpóstr. | 5°C w ciemności | 2 lata – 50% | (58) |
| mięta | wierzch. pędów | torebki foliowe CultuSAK | – | 50% N | | 1 tydz. w fitotronie | 4°C – 25 $\mu\text{moli/m}^2/\text{s}$ – 12 h | 30 mies. | (34) |
| malina | poj. pędy | torebki foliowe CultuSAK | – | 25% N | | 1 tydz. w fitotronie + 1 tydz. 22°C/8 h i -1°C/16 h | 4°C – 12 $\mu\text{moli/m}^2/\text{s}$ – 12 h | 12 mies. | (33) |
| winorośl | odcinki węzłowe | probówki/parafilm | BAP – 1 μM | NH ₄ NO ₃ – 25% | | bezpóstr. | 28°C – 40 $\mu\text{moli/m}^2/\text{s}$ – 16 h | 10 mies. – 70% | (40) |
| jabłoń | wierzch. pędów | probówki/parafilm | BAP – 5 mg/l | agar 10 g/l | | bezpóstr. | 1°C w ciemności | 12 mies. – 100% | (12) |
| paproć ozdobna | wielorośl. | słoiki 50 ml/parafilm | Kin – 4,5 μM IAA – 2,3 μM | | | po 1 mies. w fitotr. | 9°C w ciemności | 3 lata – 100% | (24) |
| Illia orientalna i azjatycka | mikrocebulki | probówki + szklane korki/folia | – | MS 1/4 + 9% sach. | | 2 tyg. w 2°C | -2°C | 28 mies. – 75% | (11) |

chowywanie oraz w czasie przechowywania sprzyja nekrozom w czasie przechowywania i nadmiernemu uwodnieniu pędów w czasie namnażania po przechowywaniu. Dodatek cytokinin do pożywki, na której przechowywane są pędy, szczególnie gdy kultury są inkubowane przez kilka dni po przeszczepieniu w temperaturze wzrostowej, stymuluje tworzenie pędów bocznych w czasie przechowywania, a tym samym zwiększa pulę pędów wyjściowych do dalszego namnażania. Pobieranie składników pokarmowych z pożywki redukuje takie czynniki, jak niska temperatura, niskie stężenie soli i regulatorów wzrostu, wysoka koncentracja agaru i cukrów.

Przykłady procedur stosowanych do długotrwałego przechowywania kultur wybranych roślin uprawnych podano w tabeli 1. Należy jednak liczyć się z potrzebą modyfikacji warunków dla poszczególnych odmian.

14. Uwagi końcowe

Eksplantaty roślinne powinny być przechowywane w warunkach zapewniających stabilność genetyczną. Przechowywanie eksplantatów pędowych lub węzłowych w warunkach mało intensywnego metabolizmu oraz rozmnażanie przechowywanych eksplantatów wyłącznie przez pędy kątowe, minimalizują zagrożenie zmiennością somaklonalną. Jednakże, należy stworzyć system kontroli, który na podstawie wczesnej analizy markerów morfologicznych, cytologicznych i/lub molekularnych, mógłby z dużym prawdopodobieństwem gwarantować identyczność fenotypową wytworzonych roślin.

Literatura

1. Eckhardt A., (1989), Arch. Gartenbau, 37, 131-140.
2. Pérez-Tornero O., Ortín-Párraga F., Egea J., Burgos L., (1999), HortScience, 34, 1277-1278.
3. Druart Ph., (1984), CEC Seminar *In Vitro Techniques: Propagation and Long Term Storage*, Braunschweig, 167-171.
4. Sarkar D., Naik P. S., (1998), Euphytica, 102, 275-280.
5. Sarkar D., Kaushik S. K., Naik P. S., (1999), Plant Cell Reports, 18, 897-903.
6. Orlikowska T., (1992), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31, 1-7.
7. Aitken-Christie J., Singh A. P., (1987), in: Eds. Bonga J. M., Durzan Don J., *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 2, *Specific Principles and Methods: Growth and Developments*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 285-304.
8. Mullin R. H., Schlegel D. E., (1976), HortScience, 11, 100-101.
9. Dorion N., Godin B., Bigot C., (1993), Scientia Horticulturæ, 56, 51-59.
10. Taylor P. W. J., Dukic S., (1993), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34, 217-222.
11. Bonnier F. J. M., van Tuyt J. M., (1997), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49, 81-87.
12. Lundergan C., Janick J., (1979), HortScience, 14, 514.
13. Borkowska B., (1990), Fruit Science Reports, 1, 1-7.
14. Reed B. M., (1991), Plant Cell Reports, 10, 431-434.
15. Reed B. M., (1992), Fruit Varieties Journal, 46, 98-102.

16. Wanas W. H., Callow J. A., (1986), in: Eds. Withers L. A., Alderson P. G., *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, Butterworths, England, 285-290.
17. Bessembinder J. J. E., Staritsky G., Zandvoort E. A., (1993), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 121-127.
18. Zandvoort A., Hulshof M. J. H., Staritsky G., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36, 309-316.
19. Maruyama E., Kinoshita I., Ishii K., Ohba K., Saito A., (1997), *Plant Cell Reports*, 16, 393-396.
20. Juhui H., (1995), *Scientia Agricultura Sinica*, 28, 24-30.
21. van den Houwe I., de Smet K., Tezenas du Montcel H., Swennen R., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 269-274.
22. Lisek A., Orlikowska T., (1999a), VIII Ogólnopolski Zjazd Naukowy Hodowców Roślin Ogrodniczych *Hodowla Roślin Ogrodniczych u progu XXI wieku*, Lublin, 315-318.
23. Perez-Tornero O., Ortin-Parraga F., Egea J., Burgos L., (1999), *HortScience*, 34, 1277-1278.
24. Hvoslef-Eide A. K., (1992), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 167-174.
25. Bouza L., Jacques M., Maziere Y., Arnaud Y., (1992), *Scientia Horticulturae*, 52, 143-155.
26. Bhojwani S. S., (1981), *Physiol. Plant.*, 52, 187-190.
27. Marino G., Rosati P., Sagrati F., (1985), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 73-78.
28. Lisek A., Orlikowska T., (2001), *Biotechnologia*, 3(54), 134-144.
29. Hausman J. F., Neys O., Kevers C., Gaspar T., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 65-67.
30. Son H. S., Chun Y. W., Hall. R. B., (1991), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 161-168.
31. Monette P. L., (1986), *HortScience*, 21, 1203-1205.
32. Hansen J., Kristiansen K., (1997), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 161-169.
33. Reed B. M., (1993), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118, 890-895.
34. Reed B. M., (1999), *HortScience*, 34, 350-352.
35. Veramendi J., Arregui L. M., Mingo-Castel A. M., (1998), *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4, 183-188.
36. Hunter C. S., (1986), in: Eds. Withers L. A., Alderson P. G., *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, Butterworths, England, 291-301.
37. Vysockaja O. N., (1994), *Fizjologia Rastienij*, 41, 935-941.
38. Harding K., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 31-38.
39. Lopez-Delgado H., Jimenez-Casas M., Scott I. M., (1998), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54, 145-152.
40. Moriguchi T., Yamaki S., (1989), *HortScience*, 24, 372-373.
41. Bertrand-Desbrunais A., Noirot M., Charrier A., (1992), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31, 105-110.
42. Gunning J., Lagerstedt H. B., (1985), *International Plant Prop. Soc.*, 35, 199-205.
43. Brennan R. M., Millam S., Davidson D., Wilshin A., (1990), *Acta Horticulturae*, 280, 109-112.
44. Bertrand-Desbrunais A., Noirot M., Charrier A., (1991), 27, 333-339.
45. Alleweldt G., Harst-Langenbucher M., (1987), *Vitis*, 26, 57-64.
46. Snir I., (1988), *HortScience*, 23, 304-305.
47. Ziv M., (1990), *Acta Horticulturae*, 280, 207-214.
48. Sharma N., Chandel K., (1992), *Plant Cell Reports*, 11, 200-203.
49. Kane M. E., Philman N. L., Lee T. M., (1990), *Proc. Fla.State Hort.Soc.*, 103, 182-186.
50. Lisek A., Orlikowska T., (2001), *Acta Horticulturae* (w druku).
51. Pinker I., Jesch H. H., Democh G., (1993), *Gartenbauwissenschaft*, 58, 11-14.
52. Dorion N., Regnard J. L., Serpette I., Bigot C., (1994), *Scientia Horticulturae*, 57, 201-213.
53. Piccioni E., Standardi A., (1995), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 221-226.
54. Pattnaik S. K., Sahoo Y., Chand P. K., (1995), *Scientia Horticulturae*, 61, 227-239.
55. Ballester A., Janeiro L. V., Vieitez A. M., (1997), *Scientia Horticulturae*, 71, 67-78.
56. Pawłowska B., Bach A., Malik M., (1996), *Zeszyty Naukowe Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy*, 197 – Rolnictwo, 39, 123-128.
57. Bekheet S. A., (2000), *Biol. Plant.* 43, 179-183.
58. Romano A., Martins-Loução M. A., (1999), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 155-157.
59. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 471-494.