



Ukorzenianie *in vitro* i aklimatyzacja w szklarni mikrosadzonek piwonii chińskiej

Eleonora Gabryszewska, Ludwika Kawa-Miszczak

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa im. Szczepana Pieniążka, Skierniewice

Rooting *in vitro* and acclimatization in the greenhouse of herbaceous peony plantlets

Summary

The influence of sucrose concentration (10 and 30 g l⁻¹), low level of nitrogen salts (1/8 KNO₃, 1/8 NH₃NO₄), auxins (IBA 1 mg l⁻¹ + IAA 1 mg l⁻¹ + NAA 0,01 mg l⁻¹), and temperature (15°C, 20°C) on the rooting *in vitro* and acclimatization in the greenhouse of two cultivars ('Jadwiga', 'Professor Wójcicki') of *Paeonia lactiflora* were investigated. The level of endogenous carbohydrates in the peony shoots and roots during the rooting and acclimatization phases were analysed. There were a higher rooting and acclimatization percentage of 'Professor Wójcicki' cultivar than 'Jadwiga' cultivar. Also, more roots were produced by shoots of 'Professor Wójcicki' cultivar. The presence of auxins in the medium and the higher concentration of sucrose (30 g l⁻¹) stimulated number of roots/shoot. On the other hand, the higher rooting percentage was found on the auxin-free medium in the presence of high level of sucrose. The shoots of 'Professor Wójcicki' rooted best when cultured at 20°C, but the shoots of 'Jadwiga' at lower temperature – 15°C. During the rooting stage, the major sugars detected in the peony microplants were sucrose, glucose and fructose. After four weeks of acclimatization, the plantlets accumulated starch and showed strong inhibition of shoot growth, and dormant buds were developed.

Key words:

Paeonia lactiflora, rooting *in vitro*, acclimatization, carbohydrates.

Adres do korespondencji

Eleonora Gabryszewska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa
im. Szczepana Pieniążka,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

1. Wstęp

W dotychczasowych badaniach nad rozmnażaniem piwonii *in vitro* obserwowano małą zdolność do regeneracji korzeni oraz duże trudności podczas aklimatyzacji zarówno u piwonii drze-

wiastych, jak i bylin (2,3,5,6,9). Zastosowanie wysokiego stężenia sacharozy i auksyny (IBA) w fazie ukorzenia *in vitro* stymulowało powstawanie korzeni, ale równocześnie hamowało wzrost pędów i indukowało powstawanie pąków spoczynkowych (5). Zależność pomiędzy typem spoczynku, a rodzajem gromadzonych węglowodanów, wykazano u gatunku *Euphorbia esula* (1). Tendencję do gromadzenia skrobi i wysoką jej zawartość stwierdzono w pąkach znajdujących się w fazie „paradormancy”, natomiast podczas przejścia w fazę „endodormancy” zgromadzona skrobia była rozkładana do sacharozy (1,4).

Celem badań było określenie wpływu auksyn, temperatury i niskiego poziomu soli azotowych oraz sacharozy na ukorzenie *in vitro* i aklimatyzację w szklarni mikrosadzonek dwóch odmian piwonii chińskiej. Analizowano również zawartość węglowodanów w pędach i korzeniach mikrosadzonek w fazie ukorzenia i aklimatyzacji.

2. Materiał i metody

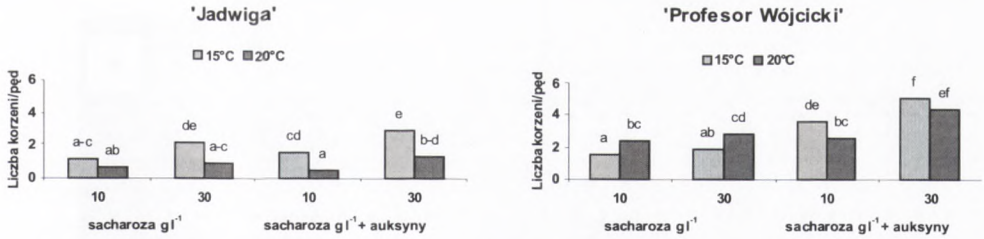
Materiałem roślinnym były kultury pędów piwonii chińskiej odmiany 'Jadwiga' i 'Profesor Wójcicki' pochodzące z mnożenia *in vitro* w temperaturze 15 i 20°C. Jako eksplantaty stosowano fragmenty kłącza zawierające 1-2 pędy. W fazie ukorzenia stosowano pożywkę MS o zmniejszonej zawartości soli azotowych (1/8 KNO₃ i 1/8 NH₄NO₃) zawierającą auksyny (IBA 1 mg l⁻¹ + IAA 1 mg l⁻¹ + NAA 0,01 mg l⁻¹) i GSH 0,1 mg l⁻¹ lub bez ich udziału. Do pożywki dodano sacharozę w stężeniach 10 i 30 g l⁻¹. Podczas ukorzenia *in vitro* pędy rosły w temperaturze 15 i 20°C, przy świetle o długości dnia 16 h. Jako źródło światła stosowano lampy fluorescencyjne Philips TLD 36W/95 – białe (80 μmol m⁻²s⁻¹).

Doświadczenia *in vitro* przeprowadzono metodą losową z 7-10 powtórzeniami dla traktowania. Powtórzenie stanowiło 5 eksplantatów umieszczonych w jednym słoiku. W szklarni sadzono tylko te rośliny, które wytworzyły korzenie. Po posadzeniu mikrosadzonki chłodzono w warunkach chłodnej szklarni (5-10°C) przez 10 tygodni. W doświadczeniu analizowano: liczbę korzeni/pęd, liczbę (%) roślin ukorzenionych i zaaklimatyzowanych oraz oznaczano zawartość węglowodanów pod koniec fazy ukorzenia (przed posadzeniem) i po 1 miesiącu aklimatyzacji w szklarni. Wyniki badań opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic użyto testu t-Duncana przy poziomie istotności 0,05. Zawartość węglowodanów (glukoza, fruktoza, sacharoza, skrobia) oznaczano metodami enzymatycznymi przy użyciu zestawu testów: testu sacharoza/D-glukoza/D-fruktoza; testu do oznaczania skrobi (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany).

3. Wyniki i dyskusja

Duże trudności z ukorzeniem *in vitro* i aklimatyzacją w szklarni piwonii zielnych i drzewiastych ograniczają zastosowanie metody mikrozmnażania tych gatunków na skalę produkcyjną. W przypadku *P. lactiflora* odmiana 'Jadwiga' wykazano, że zdolność rizogenezy *in vitro* uzależniona jest od wielu czynników takich jak: egzogenne regulatory wzrostu, faza fizjologiczna pędu, stężenie soli azotowych i sacharozy oraz temperatura, w której rosły kultury (5). Stwierdzono, że głównym czynnikiem stymulującym ukorzenie pędów piwonii chińskiej jest auksyna, a jej współdziałanie z innymi hormonami (JA-Me, ABA, etylenem) i sacharozą, reguluje proces rizogenezy. Obniżenie stężenia soli azotowych i sacharozy (C/N) w pożywce sprzyjało powstawaniu korzeni, jednak tylko przy wyższym stosunku węgla do azotu. Także dodanie GSH 0,1 mg l⁻¹, do pożywki o obniżonym poziomie soli mineralnych i sacharozy w stężeniu 30 g l⁻¹, stymulowało ukorzenie pędów rosnących w 15°C i sprzyjało aklimatyzacji mikrosadzonek (5). Wyniki omawianych badań uwzględniono przy określaniu warunków ukorzenia (temperatura, skład pożywki) w prezentowanych doświadczeniach.

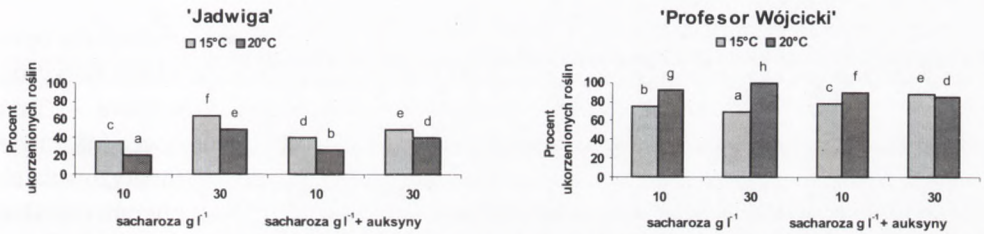
Większe zdolności ukorzenia i aklimatyzacji wykazywały pędy odmiany 'Profesor Wójcicki', w porównaniu z odmianą 'Jadwiga' (rys. 1-3). Obecność auksyn w pożywce i wyższy poziom sacharozy (30 g l⁻¹) wpływały korzystnie na liczbę tworzących się korzeni na pędzie. Zarówno u odmiany 'Profesor Wójcicki', jak i odmiany 'Jadwiga' najwięcej korzeni stwierdzono na pędach ukorzeniowych w temperaturze 15°C, w obecności auksyn i sacharozy w stężeniu 30 g l⁻¹ (rys. 1). W przypadku odmiany 'Jadwiga' temperatura 15°C korzystniej wpływała na liczbę powstających korzeni, w porównaniu z temperaturą 20°C. Natomiast u odmiany 'Profesor Wójcicki', pędy ukorzeniane w obecności auksyn wytwarzały więcej korzeni w temperaturze 15°C, a rosnące na pożywce bez auksyn w temperaturze 20°C. Najwięcej ukorzenionych pędów stwierdzono na pożywce bez auksyn, zawierającej sacharozę w stężeniu 30 g l⁻¹ ('Jadwiga' – 65%, 'Profesor Wójcicki' – 100%) (rys. 2). Pędy odmiany 'Jadwiga' najslabiej (20-26%) ukorzeniały się w temperaturze 20°C, przy stężeniu sacharozy 10 g l⁻¹, niezależnie od obecności lub braku auksyn w pożywce. Odmiana 'Profesor Wójcicki' wykazywała większą zdolność do rizogenezy; średnio ukorzeniało się od 70 do 100% pędów. Mikrosadzonki obydwu odmian bardzo słabo przeżywały podczas aklimatyzacji w szklarni, a liczba roślin zaaklimatyzowanych zależała od składu pożywki i temperatury stosowanej podczas fazy ukorzenia *in vitro* (rys. 3). Sadzonki odmiany 'Profesor Wójcicki' lepiej przeżywały i podejmowały wzrost, w porównaniu z sadzonkami odmiany 'Jadwiga'. Najwięcej roślin zaaklimatyzowanych (54%) stwierdzono u odmiany 'Profesor Wójcicki' – sadzonki te ukorzeniano w temperaturze 20°C, na pożywce zawierającej auksyny i wyższe stężenie sacharozy (fot. 1A). Po 3 miesiącach od posadzenia roślin w szklarni, obserwowano zasychanie i zamieranie liści. Równocześnie u podstawy zasychających pędów nadziemnych rozpoczęło się formowanie pąków spoczynkowych (pąków odnawiających) na kłęczu (fot. 1B).



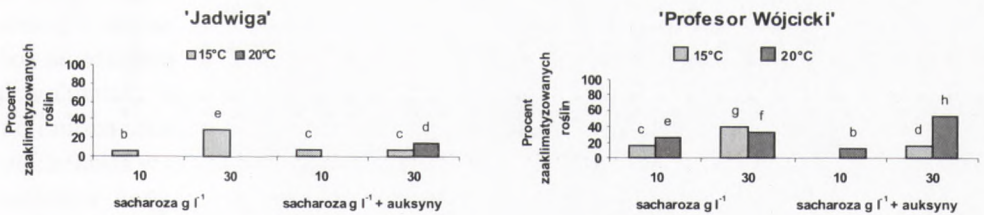
Rys. 1. Liczba korzeni na pędzie u piwonii chińskiej odmiany 'Jadwiga' i 'Profesor Wójcicki'.

Objaśnienia: Pędy ukorzeniano na pożywce MS zawierającej mieszaninę auksyn (IBA 1 mg l⁻¹ + IAA 1 mg l⁻¹ + NAA 0,01 mg l⁻¹) i GSH 0,1 mg l⁻¹ lub bez ich udziału.

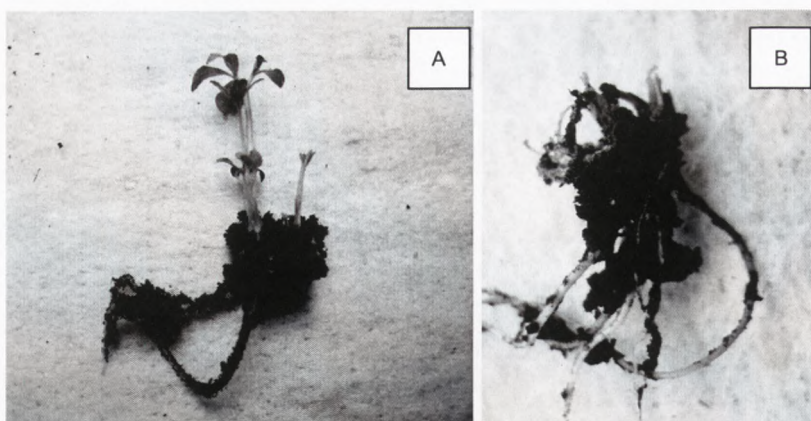
Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie wg testu t-Duncana (P = 0,05); ocenę istotności różnic wykonano osobno dla każdej odmiany.



Rys. 2. Liczba (%) ukorzenionych pędów piwonii chińskiej odmiany 'Jadwiga' i 'Profesor Wójcicki'.
Objaśnienia: patrz rys. 1.



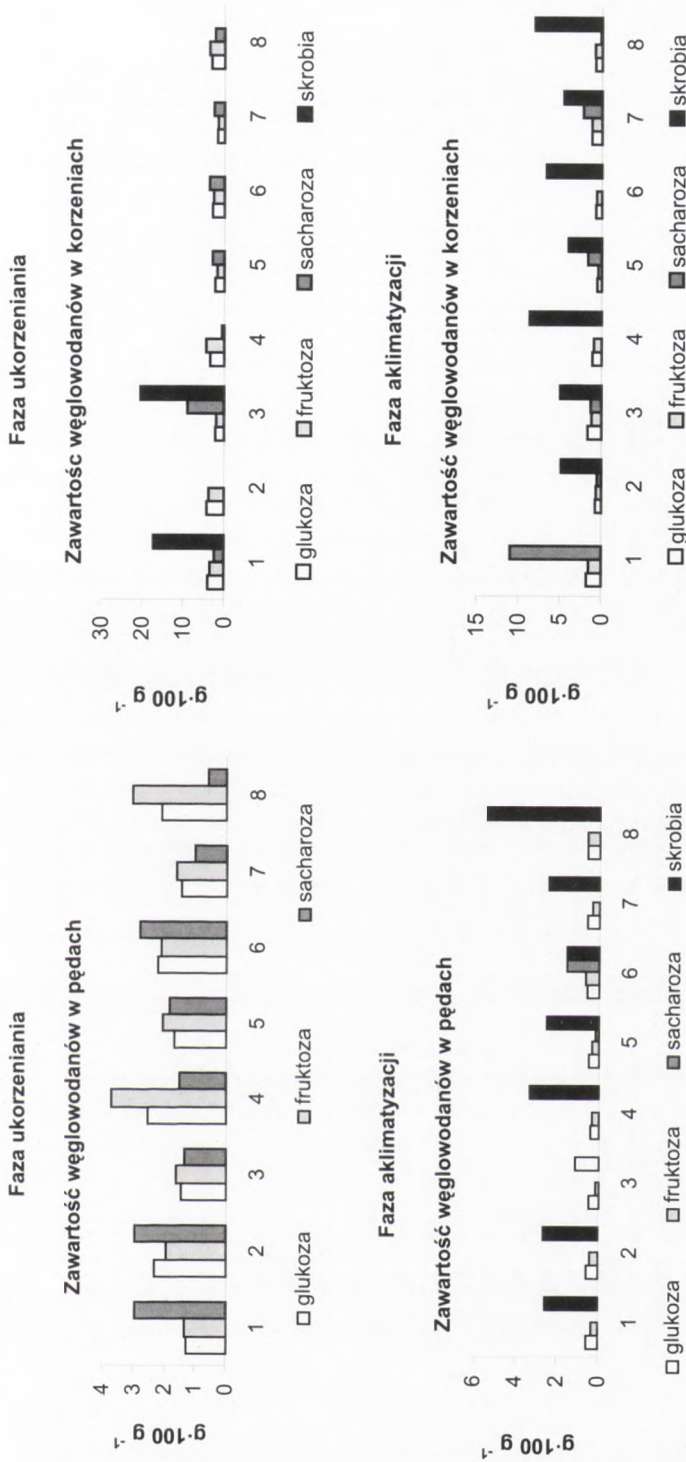
Rys. 3. Liczba (%) zaaklimatyzowanych roślin piwonii chińskiej odmiany 'Jadwiga' i 'Profesor Wójcicki'.
Objaśnienia: patrz rys. 1.



Fot. 1. Mikrosadzonka piwonii chińskiej odmiany 'Profesor Wójcicki' w trakcie aklimatyzacji w szklarni – 1 miesiąc po posadzeniu (A) i mikrosadzonka odmiany 'Jadwiga' w fazie formowania pąków spoczynkowych – po 3 miesiącach od posadzenia w szklarni (B).

W dotychczasowych badaniach dotyczących rozmnażania *in vitro* piwonii nie opracowano wydajnej metody ukorzenia i aklimatyzacji piwonii chińskiej. Korzystny wpływ pożywki płynnej na rizogenezę stwierdzono u dwu odmian *P. lactiflora* – 'Takinoyosooi' i 'Sarah Bernhardt'. Pędy ukorzeniały się w 57-100% na pożywce MS zawierającej IBA 1 mg l⁻¹, jednakże tylko połowa ukorzenionych pędów aklimatyzowała się w podłożu w szklarni (7). Bardzo słabe ukorzenie *in vitro* 3 odmian piwonii chińskiej uzyskano po wstępnym traktowaniu pędów wysokim stężeniem IBA (10 mg l⁻¹). Otrzymane *in vitro* mikrosadzonki zmarły na skutek infekcji grzybowych w pierwszym tygodniu po posadzeniu w szklarni (9). Zastosowanie niskiej temperatury i ciemności sprzyjało ukorzenianiu pędów piwonii z grupy *P. lactiflora* na pożywce zawierającej IBA lub IAA w stężeniu 0,2 mg l⁻¹. Jednak rośliny te po ukorzenieniu zapadały w głęboki spoczynek i do podjęcia wzrostu wymagały długiego okresu chłodzenia (2,8).

Pod koniec fazy ukorzenia *in vitro*, mikrosadzonki piwonii chińskiej odmiany 'Profesor Wójcicki' charakteryzowały się wysoką zawartością sacharozy, glukozy i fruktozy. Węglowodany te występowały zarówno w pędach, jak i korzeniach (rys. 4). Skrobię stwierdzono tylko w korzeniach roślin rosnących w temperaturze 15°C, na pożywce o niższej zawartości sacharozy (10 g l⁻¹). Największą ilość skrobi zgromadziły rośliny piwonii podczas aklimatyzacji w szklarni (1 miesiąc po posadzeniu roślin). Występowała ona w pędach i korzeniach, przy czym korzenie akumulowały znacznie więcej skrobi niż pędy. Wiązało się to z zahamowaniem wzrostu roślin i powstawaniem pąków spoczynkowych. Po 1 miesiącu aklimatyzacji roślin w szklarni, poziom glukozy i fruktozy znacznie się obniżył w pędach i korzeniach piwonii, w porównaniu z zawartością tych cukrów w fazie ukorzenia pędów *in vitro*. Podobnie zawartość sacharozy była bardzo mała lub nie stwierdzono jej obecności.



Rys. 4. Zawartość węglowodanów w pędach i korzeniach piwonii chińskiej odmiany 'Profesor Wójcicki' pod koniec fazy ukorzenia i po 1 miesiącu aklimatyzacji w szklarni.

1 – sacharoza 10 g l⁻¹, 15°C; 2 – sacharoza 30 g l⁻¹, 15°C; 3 – sacharoza 10 g l⁻¹ + auksyny + GSH 0,1 mg l⁻¹, 15°C; 4 – sacharoza 30 g l⁻¹ + auksyny + GSH 0,1 mg l⁻¹, 15°C; 5 – sacharoza 10 g l⁻¹, 20°C; 6 – sacharoza 10 g l⁻¹ + auksyny + GSH 0,1 mg l⁻¹, 20°C; 7 – sacharoza 30 g l⁻¹, 20°C; 8 – sacharoza 30 g l⁻¹ + auksyny + GSH 0,1 mg l⁻¹, 20°C.

W rocznym cyklu rozwojowym *P. lactiflora* zmienia się rodzaj i ilość endogennych węglowodanów (10). Wysoka zawartość skrobi występuje w korzeniach piwonii chińskiej od zakończenia kwitnienia do końca okresu wegetacji, a jej poziom gwałtownie spada podczas szybkiego wzrostu wiosną. Cukry rozpuszczalne występujące w roślinach piwonii chińskiej w warunkach połowych to: fruktoza, glukoza i sacharoza. Najwyższy poziom sacharozy stwierdzono w okresie spoczynku zimowego pąków. Działała ona prawdopodobnie jako kryoprotektant, chroniąc pąki spoczynkowe przed uszkodzeniem przez mróz (10). Także pędy piwonii chińskiej rozmnażane *in vitro* charakteryzowały się wysoką zawartością skrobi, a jej obecność wiązała się z małą zdolnością proliferacji pędów i powstawaniem pąków spoczynkowych. Oprócz skrobi, występowały cukry rozpuszczalne takie jak glukoza i fruktoza oraz sacharoza na bardzo niskim poziomie (5).

Na podstawie otrzymanych wyników i danych literaturowych wskazuje się, że główną przyczyną zahamowania wzrostu piwonii *in vitro* i po aklimatyzacji może być spoczynek typu „paradormancy”, który wiąże się z obecnością wysokiego poziomu skrobi. Zastosowanie chłodzenia przed ukorzeniem, jak i ukorzenionych pędów *P. lactiflora* i *P. suffruticosa* tylko na krótko aktywowało wzrost, po czym rośliny ponownie wchodziły w spoczynek (3,5). W warunkach naturalnych, po okresie zimowego chłodu, rośliny piwonii podejmują wzrost i poziom skrobi spada, a następnie po wyrośnięciu pędów ponownie wzrasta przez lato aż do pierwszych chłódów (10). Chłodzenie roślin pochodzących z mnożenia *in vitro* nie wpływa na obniżenie poziomu skrobi. Może to wskazywać na zaburzenia metabolizmu, w których istotne znaczenie mają węglowodany i hormony roślinne oraz ich współdziałanie.

Stosowane skróty

- IAA – kwas indolilo-3-octowy
- IBA – kwas indolilo-3-masłowy
- NAA – kwas naftylo-1-octowy
- ABA – kwas abscysynowy
- JA-Me – jasmonian metylu
- GSH – zredukowany glutation
- MS – pożywka podstawowa wg Murashige i Skooga (1962)

Literatura

1. Anderson J., Chao W., Horvath D., Jia Y., Gesch R., (2005), *Meeting of Weed Science Society of America*, 121 (Abstract).
2. Albers M. R. J., Kunneman B. P. A. M., (1992), *Acta Hort.*, 314, 85-92.
3. Bouza L., Jacques M., Miginiac E., (1994), *Scientia Hort.*, 58, 223-233.
4. Chao W. S., Anderson J. V., Horvath D. P., (2005), *Leafy Spurge News*, XXVII (1), 9.

5. Gabryszewska E., (2009), Zesz. Nauk. Inst. Sad. Kwiac., Monografie i Rozprawy, 190.
6. Harris R. A., Mantell S. H., (1991), J. Hort. Sci., 66, 95-102.
7. Hosoki T., Ando M., Kubara T., Hamada M., Itami M., (1989), Plant Cell Rep., 8, 243-246.
8. Kunneman B. P. A. M., Albers M. R. J., (1989), Bloembollencultuur, 100, 16-17.
9. Tian D., (2008), PhD dissertation, Auburn University, Alabama, USA, II, 153-292.
10. Walton E. F., McLaren G. F., Bolding H. L., (2007), J. Hortic. Sci. Biotech., 82, 365-370.