

KRYSTYNA BOJARCZUK

## Regeneracja wybranych odmian różaneczników z pąków bocznych i przybyszowych w kulturach *in vitro*

### Abstract

Bojarczuk K. 1996. Regeneration of several Rhododendron cultivars from axillary and adventitious buds from *in vitro* cultures. Arbor. Kornickie 41: 109-125.

For the experiments initial explants of Rhododendron were made on several dates from flower and vegetative buds. The best growth and differentiation of callus tissue was obtained when initiating the culture in February and March, on a modified Anderson's medium – AL with L-cystein  $10 \text{ mg L}^{-1}$  and hormones: 2iP  $15 \text{ mg L}^{-1}$  and IAA  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . A high percentage of vegetative bud development was obtained when culture initiation was conducted from April to May and from August to September, on a medium – AL with L-cystein and hormones: 2iP  $4 \text{ mg L}^{-1}$  and IAA  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ . The best medium for shoots proliferation was in a medium – AL with a lower level of hormones: 2iP  $0.5\text{-}2 \text{ mg L}^{-1}$  and IAA  $0.25\text{-}0.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Multiplication of shoots was more effective in adventitious buds cultures then in axillary bud cultures but the rooting percentage of shoots obtained from these two cultures were similar. Microcuttings rooted best in *ex vitro* conditions in a non-sterile medium (peat and perlite 3:1) and after treatment with a talk preparation containing IBA 0.2%, nicotinic acid 0.1% and ascorbic acid 0.1%.

*Key words:* Rhododendron, adventitious and axillary buds culture, micropropagation.

*Address:* K. Bojarczuk, Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, 62-035 Kórnik, Poland.

Accepted for publication, April 1996.

### WSTĘP

Metoda rozmnażania cennych odmian drzew i krzewów w kulturach *in vitro* pozwala na uzyskanie z jednej rośliny matecznej dużej liczby roślin potomnych w stosunkowo krótkim czasie. Doświadczenia prowadzone w kulturach *in vitro* skoncentrowane są głównie nad usprawnieniem namnażania tkanek. Odpowiedni dobór składników pożywki, zwłaszcza substancji wzrostowych oraz wykorzystanie międzywęzli i węzłów pędów powstających *in vitro*, daje możliwość namnażania pędów w sposób ciągły. Przy rozmnażaniu roślin w kulturach *in vitro* nie ma więc konieczności prowadzenia specjalnych mateczników.

Prace badawcze dotyczące regeneracji różaneczników w kulturach *in vitro* koncentrują się na kontrolowaniu rozwoju pędów powstających z pąków pachwinowych oraz na tworzeniu pąków przybyszowych i regenerowania z nich kompletnych roślin (Anderson 1980, Fordham i in. 1982, Meyer 1982). Obie metody różnią się rozwojem kultur i przebiegiem organogenezy w warunkach *in vitro*. Konieczna jest więc dokładna ocena i selekcja fenotypu roślin pochodzących z mikrorozmnażania w celu utrzymania stałości odmianowej.

Specjaliści zajmujący się mikrorozmnażaniem roślin wrzosowatych, oprócz problemu z utrzymaniem odpowiedniego fenotypu, napotykają również na inne trudności, jak: brunatnienie kultur (wzrost zawartości w tkankach związków fenolowych i eluowanie ich do pożywki), karlenie pędów przy długotrwałym ich namnażaniu, ukorzenianie oraz adaptacja mikrosadzonek do warunków szklarniowych. Przy masowej produkcji roślin wymienione trudności w mikrorozmnażaniu mogą prowadzić do znacznych strat.

Celem prezentowanych badań było porównanie dwóch sposobów regeneracji różaneczników w kulturach *in vitro*: z pąków bocznych (pachwinowych) oraz poprzez kalus różnicujący się w pąki przybyszowe. Szczególną uwagę zwrócono na oddziaływanie makro- i mikroskładników oraz regulatorów wzrostu na morfogenezę różaneczników w powiązaniu z naturalną zdolnością tych roślin do regeneracji. Przedstawiona metoda mikrorozmnażania powinna mieć szczególne znaczenie przy rozmnażaniu tych gatunków i odmian różaneczników, które nadają się do uprawy w naszych warunkach klimatycznych, a nie mogą być rozmnażane tradycyjnymi metodami ze względu na brak mateczników czy trudności w ukorzenianiu sadzonek.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań nad regeneracją różaneczników w kulturach *in vitro* eksplantaty pozyskiwano z bogatej kolekcji tych roślin w Arboretum Kórnickim. W pierwszym etapie badań do doświadczeń wybrano różaneczniki odznaczające się dużą zdolnością do regeneracji np. *R. 'Cunningham's White'* czy *R. 'Catawbiense Boursault'* (Bojarczuk 1989, 1994). Opierając się na wstępnie opracowanej metodyce mikrorozmnażania, do badań włączono kolejne odmiany różaneczników, łącznie ponad 20. Prezentowane w pracy wyniki dotyczą następujących odmian różaneczników: 'Everestianum', 'Lee's Dark Purple', 'Queen Mary', 'Humboldt', 'America', 'Van Weerden Poelman', 'Van der Hoop', 'Dr. H.C. Dresselhuys', 'Catawbiense Album' i 'Effner'.

Eksplantatami inicjalnymi były pąki wegetatywne, głównie pąki wierzchołkowe lub część pędu z pąkiem tj. pojedynczy węzeł z pąkiem bocznym lub wierzchołkowym oraz pąki kwiatowe, z których pozyskiwano zawiązki (kwiat z szypułką). Eksplantaty moczo 2 godz. w substancji grzybobójczej Benlate 0,1%, a następnie odkażano 1,5% chloraminą T, 0,1% chlorkiem rtęci lub 5% podchlorynem wapnia z dodatkiem detergentu Tween 20, w stężeniu 0,05%. Pąki traktowane były tymi substancjami przez 5-15 min. Po kilkukrotnym wypłukaniu pąków w sterylnej wodzie moczo je przed wyłożeniem na pożywkę w roztworze antyoksydantów (L-cystei-

nie, w stężeniu 100 mg L<sup>-1</sup>, lub w mieszaninie kwasu askorbinowego 50 mg L<sup>-1</sup> z kwasem cytrynowym 75 mg L<sup>-1</sup>). Niektóre antyoksydanty jak L-cysteinę w stężeniu 10 mg L<sup>-1</sup> dodawano również do pożywek. Tak przygotowane eksplantaty wkładano na pożywki agarowe według Andersona – AN (1984), Lloyd i McCowna – WPM (1980), Economou i Reada – EK (1984), oraz na pożywkę zmodyfikowaną przez autorkę – AL (tabela 1). Do pożywek dodawano hormony w ilości 0,5-5 mg L<sup>-1</sup> IAA i 0,25-15 mg L<sup>-1</sup> 2iP.

Tabela 1.

Skład pożywek stosowanych w doświadczeniach.

Table 1.

Composition of media used in the experiments.

Związki Components	Stężenia w mg L <sup>-1</sup> (Concentration mg L <sup>-1</sup> )			
	*	**	***	****
	AN	EK	AL	WPM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,0	400,0	420,0	400,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	80,0	–	–
KNO <sub>3</sub>	480,0	400,0	500,0	–
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	–	170,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	–	990,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	330,6	380,0	330,0	–
CaCl <sub>2</sub>	332,2	340,0	332,0	72,5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	–	–	–	386,0
Na <sub>2</sub> EDTA	74,5	74,5	93,0	37,3
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	55,7	55,7	70,0	27,8
MgSO <sub>4</sub>	180,7	180,0	270,0	180,7
MnSO <sub>4</sub>	16,9	17,0	17,0	23,3
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	6,2
NaMoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25
CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	–
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,05	0,05	0,25
KJ	0,3	–	–	–
Siarczan adeniny Adenine hemisulfate	80,0	80,0	80,0	80,0
Myo-inositol	100,0	100,0	100,0	100,0
Thiamine HCl	0,4	0,4	0,4	0,4
Sacharoza-Sucrose	30 g	20 g	30 g	30 g
Agar	8 g	6 g	8 g	8 g

\* – pożywka wg Anderson (1984). The medium of Anderson (1984).

\*\* – pożywka wg Economou i Read (1984). The medium of Economou and Read (1984).

\*\*\* – pożywka AN zmodyfikowana przez autorkę. Anderson (1984) medium modified by the author.

\*\*\*\* – pożywka wg McCown i Lloyd (1980). The medium of McCown and Lloyd (1980).

W doświadczeniach zastosowano również tzw. pożywkę dwufazową, tj. pożywkę stałą – agarową, na którą wlewano niewielką ilość pożywki płynnej zawierającej 1/4 pełnego składu pożywki standardowej.

Eksplantaty do doświadczeń pozyskiwano w kilku terminach. Z pąków kwiatowych izolowano zawiązki kwiatowe, które następnie szczepiono na sterylne pożywki. Pąki wegetatywne wykładano na pożywki po usunięciu zewnętrznych łusek. Inicjację kultur prowadzono w probówkach nakrytych szklanymi naczynkami (1 eksplantat w probówce). Na każdą kombinację doświadczenia przypadało 6 probówek w 4 powtórzeniach. Probówki z zaszczepionymi pąkami wegetatywnymi przeniesiono do pokoju hodowlanego o temperaturze 22-23°C, oświetlanym przez 16 godz. światłem jarzeniowo-rtęciowym o natężeniu 2500 lux (7500 mW m<sup>-2</sup>). Zawiązki kwiatowe przez pierwsze dwa tygodnie były zaciemnione, a następnie pozostawały w tych samych warunkach co pąki wegetatywne. Przy kolejnych pasażach co 5-6 tygodni oddzielano mikrosadzonki długości około 1,5 cm przeznaczając je do ukorzenia, a pozostałą część kultur przenoszono na nowe pożywki w celu dalszego namnażania. Kultury te umieszczano w kolbach lub słojach o pojemności 250-300 ml (3 kultury o średnicy 2 cm w jednym naczyniu). Na każdą kombinację przypadały 4 kolby w 3 powtórzeniach.

Mikrosadzonki ukorzeniano *ex vitro* w podłożu składającym się z mieszaniny torfu i perlitu w stosunku 3:1, o pH 4,5. Przed umieszczeniem w podłożu mikrosadzonki traktowane były preparatem talkowym zawierającym auksynę IBA 0,2%, niacynę 0,1% i kwas askorbinowy 0,1%. Stopień ukorzenia mikrosadzonek (SU) określano w skali 0-3: 0 – brak korzeni, 1 – słabo rozwinięty system korzeniowy, 2 – średnio rozwinięty, 3 – bardzo dobrze rozwinięty system korzeniowy. Proces ukorzenia mikrosadzonek trwał około 4-6 tygodni, po czym ukorzone sadzonki umieszczano w małych doniczkach i dalszą uprawę prowadzono w szklarni i w tunelu foliowym.

Wyniki doświadczeń poddano statystycznej analizie wariancji. Przy badaniu różnic między poszczególnymi kombinacjami zastosowano nowy wielokrotny test różnicy Duncan dla 5% wartości granicznych.

## WYNIKI

Inicjację kultur z zawiązków kwiatowych prowadzono od października do kwietnia, natomiast z pąków wegetatywnych od marca do września. Najlepszy rozwój i różnicowanie się kalusa powstałego z zawiązków kwiatowych uzyskano przy inicjacji kultur w lutym i marcu, stosując sterylizację eksplantatów chlorkiem rtęci w stężeniu 0,1% przez 7 min lub chloraminą T w stężeniu 1,5% przez 8 min (tabela 2). Gorsze wyniki inicjacji uzyskane w kwietniu spowodowane były dużymi zakażeniami kultur, prawdopodobnie w wyniku słabszej skuteczności sterylizatorów w momencie pęknięcia pąków i rozchylania się łusek. Najsłabszy rozwój kultur z zawiązków kwiatowych uzyskano przy pozyskiwaniu eksplantatów w okresie spoczynku roślin

Tabela 2.

Wpływ terminu pozyskiwania pąków na stopień rozwoju kalusa i pąków przybyszowych, po 6 tygodniach inkubacji zawiązków kwiatowych, na pożywce AN z dodatkiem hormonów: 2iP 15 mg L<sup>-1</sup> i IAA 5 mg L<sup>-1</sup>.

Table 2.

Influence of the time of initiation of cultures on the development of callus tissue and adventitious buds, after 6 weeks incubation of flower pedicels on the medium AN with hormones: 2iP 15 mg L<sup>-1</sup> and IAA 5 mg L<sup>-1</sup>.

Termin inicjacji – miesiąc, rok Date of initiation – month, year		% kultur z rozwijającym się kalusem % of cultures with differentiation of callus			
		'Queen Mary'		'Humboldt'	
		Chloramina Chloramine	HgCl <sub>2</sub>	Chloramina Chloramine	HgCl <sub>2</sub>
I	1992	58,3 b*	74,9 b	80,5 b	72,2 ab
II	1992	88,8 c	94,4 b	91,6 b	97,2 b
III	1992	91,6 c	94,4 b	94,4 b	97,2 b
IV	1992	36,1 a	55,5 a	27,7 a	52,7 a
Średnia Average		68,7	79,8	73,6	79,8

\* – liczby oznaczone tą samą literą nie różnią się między sobą statystycznie (P=0,05). Dotyczy to również tabel 3-9.

\* – values marked by the same letter do not differ from each other statistically (the same goes for Tables 3-9).

matecznych (od października do grudnia). Kultury uzyskane w tym okresie odznaczały się słabą zdolnością do tworzenia i rozwoju pąków przybyszowych.

Najlepsze wyniki inicjacji kultur z pąków wegetatywnych uzyskano wiosną w czasie rozpoczęcia intensywnego rozwoju roślin matecznych, tj. w kwietniu i maju, stosując do sterylizacji 5% podchloryn wapnia, przez 10-15 min (tabela 3). Drugim terminem, w którym można pozyskiwać pąki wegetatywne, jest okres po wykształceniu pąka szczytowego na pędzie jednorocznym (sierpień, wrzesień). Przy sterylizacji tych pąków najlepsze wyniki uzyskano, stosując chlorek rtęci w stężeniu 0,1%, przez 7 min (tabela 3).

Do inicjacji kultur nadają się głównie wierzchołkowe pąki wegetatywne. W przypadku jednak, kiedy pąki boczne z wierzchołkowej części pędu rozpoczną intensywne wydłużanie, kilka z nich można również wykorzystać jako eksplantaty inicjalne.

Istotnym problemem przy mikrorozmnażaniu może być brunatnienie tkanek spowodowane wypływem z eksplantatów związków fenolowych, co szczególnie widoczne jest przy stosowaniu dużych rozmiarów eksplantatów inicjalnych, np. pąka wierzchołkowego czy pąka z niewielką częścią pędu, tzw. eksplantatu węzłowego (Pierik 1988). Płukanie pąków przed wyłożeniem ich na pożywkę w antyoksydantach (L-cysteinie w stężeniu 100 mg L<sup>-1</sup> lub mieszaninie kwasu askorbinowego 50 mg L<sup>-1</sup> i kwasu cytrynowego 75 mg L<sup>-1</sup>), może zabezpieczyć eksplantaty przed brunatnieniem tkanek podczas inicjacji. Szczególnie wysoki procent kultur martwych

Tabela 3.

Wpływ terminu pozyskiwania pąków wegetatywnych i ich sterylizacji na rozwój kultur pąków bocznych *R. 'Humboldt'*, po 6 tygodniach inkubacji na pożywce AL z dodatkiem hormonów: 2iP 4 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

Table 3.

Influence of the dates of taking vegetative buds and their sterilisation on the degree of development of the axillary buds cultures of *R. 'Humboldt'*, after 6 weeks incubation on AL medium with hormones: 2iP 4 mg L<sup>-1</sup> and IAA 0.5 mg L<sup>-1</sup>.

Termin inicjacji kultur – miesiąc, rok Date of initiation – month, year		% rozwijających się pąków % of buds developing	
		Podchloryn wapnia Calcium hypochloride	Chlorek rtęci Mercuric chloride
III	1993	38,9 b	55,5 b
IV	1993	74,9 cd	77,8 cd
V	1993	91,6 d	55,5 b
VI	1993	11,7 a	8,3 a
VII	1993	38,9 b	72,2 c
VIII	1993	72,2 c	88,8 d
IX	1993	66,6 c	80,5 cd
Średnia Average		56,4	62,7

Tabela 4.

Wpływ L-cysteiny na stopień rozwoju 6-tygodniowych kultur kalusowych i kultur pąków bocznych na pożywce WPM.

Table 4.

Influence of L-cystein on the development of 6-week-old callus cultures and axillary buds cultures on (WPM) medium.

Odmiany Cultivars	% rozwijających się kultur % of developing		% martwych kultur % of dead	
	kalusowych callus cultures	pąków bocznych axillary buds cultures	kalusowych callus cultures	pąków bocznych axillary buds cultures
'Van Weerden Poelman'				
+ L-cystein	86,0	61,1 b	8,3	38,9 a
– L-cystein	77,7	27,7 a	11,1	55,5 b
'Humboldt'				
+ L-cystein	61,1	50,0 b	22,2	44,4 a
– L-cystein	55,5	22,2 a	22,2	77,7 b

uzyskano w wyniku brunatnienia tkanek pąków wegetatywnych inicjujących kulturę pąków bocznych (tabela 4).

Brunatnienie tkanek występuje również w dalszej hodowli kultur, w stadium intensywnego namnażania pędów. Największą liczbę pędów *R. 'Queen Mary'* uzyskano na pożywce stałej i dwufazowej z dodatkiem L-cysteiny (tabela 5). Kultury ho-

Tabela 5.

Wpływ antyoksydantów na rozwój 6-miesięcznej kultury kalusowej *R. 'Queen Mary'* hodowanej na pożywce AL stałej – agarowej (S) i dwufazowej – agarowej + płynnej (2F).

Table 5.

Influence of L-cystein on the development of a 6-month-old callus culture *R. 'Queen Mary'* on AL medium solidified by agar (S) or on the two-phase medium – agar + fluid (2F).

Traktowanie Treatments	Namnaż.* Proliferation	Chloroza** Chlorosis	Brunat.*** Browning
Kontrola – S Control	5,5 a	1,6 c	1,4 b
L – cysteina – S L – cystein	20,8 c	0,8 b	0,6 a
Kontrola – 2F Control	10,1 b	0,4 ab	2,1 c
L – cysteina – 2F	28,5 c	0,2 a	0,5 a

\* – liczba pędów > 1 cm z kolby o pojemności 300 mL; mean no. of shoots > 1 cm per 300 mL flask.

\*\* – stopień chlorozy w skali 0-3; degree of chlorosis on scale 0-3.

\*\*\* – stopień brunatnienia w skali 0-3; degree of browning on scale 0-3.

dowane na tych pożywkach odznaczały się mniejszym stopniem brunatnienia tkanek niż kultury na pożywkach bez L-cysteiny.

Inicjację kultur różaneczników z pąków wegetatywnych i kwiatowych można prowadzić na pożywkach o stężeniu składników mineralnych o połowę niższym od pożywki Andersona – AN (tabela 1 i 2). Dobre wyniki rozwoju kultur inicjalnych uzyskano również na pożywce AL, która zawierała większą koncentrację azotynu amonu i o 50% więcej magnezu, niż pożywka Andersona (tabela 1 i 3). Skład pożywki AL opracowała autorka testując ją na kulturach pędów bocznych i przybyszowych licznych odmian różaneczników. Na pożywce tej z dodatkiem cytokiny i auksyny bardzo dobrze rosły równie 6-miesięczne kultury *R. 'Queen Mary'*,

Tabela 6.

Rozwój 6-miesięcznej kultury kalusowej na pożywce AL z dodatkiem hormonów: 2iP 2 mg L<sup>-1</sup>, IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Pozostałe dane jak w tabeli 5.

Table 6.

Development of a 6-month-old callus culture on AL medium with hormones: 2iP 2 mg L<sup>-1</sup> and IAA 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Other details as in Table 5.

Odmiany Cultivars	Namnaż.* Proliferation	Długość pędów, cm Mean shoots length, cm	Rozwój kultury Develop. of culture	Chloroza Chlorosis	Brunat. Browning
'Queen Mary'	21,0 b	0,9 a	2,8 b	0,6 a	1,2 a
'Humboldt'	23,3 b	1,8 b	1,9 a	1,2 b	1,9 b
'America'	14,5 a	0,7 a	1,8 a	1,7 b	1,2 a
Średnia Average	19,6	1,1	2,2	1,2	1,4

\* – Stopień rozwoju kultury kalusowej w skali 0-3. Degree of development of the callus culture on scale 0-3.

Tabela 7.

Rozwój 6-miesięcznej kultury pąków bocznych na pożywce AL z dodatkiem hormonów: 2iP 2 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Pozostałe dane jak w tabeli 5 i 6.

Table 7.

Development of a 6-month-old axillary bud culture on AL medium with hormones: 2iP 2 mg L<sup>-1</sup> and IAA 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Other details as in Tables 5 and 6.

Odmiany Cultivars	Namnaż.* Proliferation	Długość pędów, cm Mean shoots length, cm	Rozwój kultury Develop. of culture	Chloroza Chlorosis	Brunat. Browning
'Quenn Mary'	8,5 b	1,3	2,6 b	0,6	1,1
'Humboldt'	6,9 b	1,6	2,9 b	1,0	0,9
'America'	4,0 a	1,3	2,1 a	0,8	0,8
Średnia Average	6,5	1,4	2,5	0,8	0,9

\* – Stopień rozwoju kultury w skali 0-3. Degree of development of the culture on scale 0-3.

R. 'Humboldt' i R. 'America' (tabela 6 i 7). Kultury hodowane na pożywce AL tworzą liczne pędy nadające się do ukorzenia. Z 6-miesięcznej kultury kalusowej (tj. kultury pąków przybyszowych) uzyskano znacznie wyższą liczbę pędów (19,6) niż z kultury pędów bocznych (6,5).

Zawartość i koncentracja składników mineralnych w pożywce AL wydaje się być najbardziej dostosowana do mikrorozmnażania większości badanych odmian różaneczników. Niektóre jednak odmiany różaneczników np. 'Humboldt' wymagają pożywek o zwiększonej zawartości niektórych składników. Pożywka AL-Fe zawiera o 15% więcej magnezu, 20% więcej żelaza i 100% więcej miedzi w porównaniu z pożywką Andersona (tabela 8). Kultury pędów bocznych i przybyszowych tej odmiany hodowane na pożywce AL-Fe odznaczały się niższym wskaźnikiem chlorozy pędów i brunatnienia tkanek oraz lepszym namnażaniem pędów, niż kultury na pożywkach standardowych (AN i EK).

Skład pożywek jest również bardzo istotny przy stosowaniu ich w formie płynnej. Przy hodowli kultur różaneczników na pożywce dwufazowej najlepszy ich rozwój uzyskano przy zastosowaniu pożywki stałej AL wraz z pożywką płynną 2F, o stężeniu czterokrotnie niższym od pożywki pełnej (tabela 5).

Istotne znaczenie w momencie inicjacji kultur ma rodzaj zastosowanych w pożywce substancji wzrostowych, a także ich stężenie. Najlepsze efekty inicjacji kultur z zawiązków kwiatowych uzyskano stosując hormony w wyższych stężeniach: 2iP 15 mg L<sup>-1</sup> i IAA 4 mg L<sup>-1</sup>, natomiast przy inicjacji kultur z pąków wegetatywnych najlepszy ich rozwój otrzymano stosując niższe stężenia hormonów: 2iP 4 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup> (tabela 2 i 3). Po 6 tygodniach od inicjacji przeniesiono kultury na pożywki o tym samym składzie makro- i mikrośladników lecz o zmniejszonej koncentracji hormonów: 2iP 0,5-2 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,25-0,5 mg L<sup>-1</sup> (tabela 6, 7 i 8).

Mikrosadzonki o długości około 1,5 cm pozyskiwane z kultur pąków bocznych jak i z kultur pąków przybyszowych (ryc. 1 i 2), nadają się do ukorzenia w wa-





Ryc. 1. Ośmiomiesięczna kultura pędów przybyszowych *R. 'Van der Hoop'*.

Fig. 1. Eight-month-old adventitious shoots culture of *R. 'Van der Hoop'*.

Tabela 8.

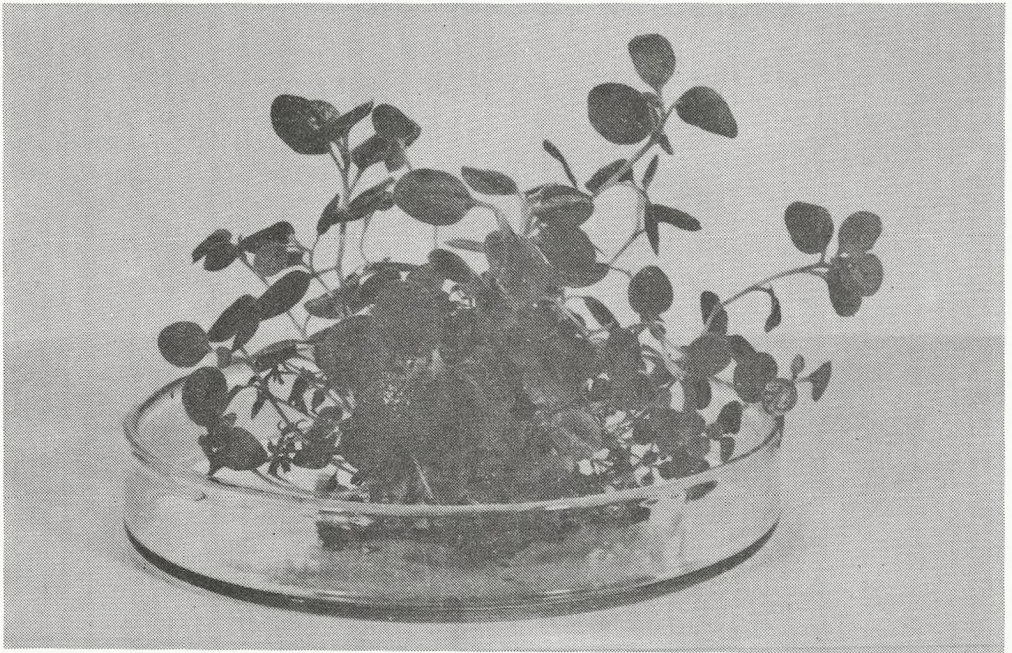
Wpływ pożywek na rozwój jednorocznych kultur kalusowych i pąków bocznych *R. 'Humboldt'* z zastosowaniem hormonów: 2iP 1 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,25 mg L<sup>-1</sup>. Pozostałe dane jak w tabeli 5.

Table 8.

Influence of media on the development of one-year-old callus culture and axillary buds cultures of *R. 'Humboldt'* using hormones: 2iP 1 mg L<sup>-1</sup> and IAA 0.25 mg L<sup>-1</sup>. Other details as in Table 5.

Pożywki Media	Kultury kalusowe Callus cultures			Kultury pąków bocznych Axillary buds cultures		
	Namnaż.* Proliferation	Chloroz.** Chlorosis	Brunat.*** Browning	Namnaż.* Proliferation	Chloroz.** Chlorosis	Brunat.*** Browning
AN	11,4 a	1,5 b	1,8 b	7,7 a	1,7 b	1,8 c
EK	13,2 a	1,5 b	1,6 b	9,4 a	1,6 b	1,8 c
AL	26,4 b	0,3 a	0,2 a	13,2 b	0,6 a	0,5 a
AL + Fe	29,5 b	0,3 a	0,2 a	18,7 c	0,4 a	1,0 b
Średnia Average	20,1	0,9	1,0	12,3	1,1	1,3

runkach *ex vitro* w niesterylnym podłożu zawierającym torf i perlit. Na procent ukorzenienia się sadzonek nie ma wpływu metoda hodowli kultur, lecz zdolność regeneracji korzeni przybyszowych poszczególnych odmian różaneczników. W najwyż-



Ryc. 2. Ośmiomiesięczna kultura pędów bocznych *R.* 'Van der Hoop'.

Fig. 2. Eight-month-old axillary shoots culture of *R.* 'Van der Hoop'.

Tabela 9.

Wpływ rośliny matcznej na regenerację systemu korzeniowego i wzrost pędów mikrosadzonek ukorzenianych w warunkach *ex vitro*.

Table 9.

Influence of the mother plants on the regeneration of root system and growth of microcuttings rooted *ex vitro*.

Odmiany Cultivars	% ukorzenionych mikrosadzonek % rooted microcuttings	Stopień* SU ukorzenienia Rooting intensity* SU	Średni wzrost pędów w cm Mean shoot length in cm
Everestianum	81,5 c	2,5 bc	3,5 bc
Lee's Dark Purple	71,6 bc	3,0 c	5,5 d
Van der Hoop	68,8 b	2,8 c	4,2 c
Boursault	62,6 b	2,3 b	3,5 bc
Catawbiense Album	62,6 b	2,4 b	3,3 b
Dr. H.C. Dresselhuys	47,9 a	2,2 b	4,4 c
Van Weerden Poelman	47,9 a	2,2 b	2,7 ab
Effner	39,5 a	1,6 a	2,6 a

\* SU  $\frac{\text{liczba sadzonek ukorzenionych w danej klasie} \times \text{nr klasy}}{\text{liczba ukorzenionych sadzonek w powtórzeniu}}$

\* SU  $\frac{\text{No. of rooted cuttings in a given class} \times \text{class no.}}{\text{No. of rooted cuttings in a replicate}}$



Ryc. 3. Mikrosadzonki R. 'Dr. H.C. Dresselhuys' uzyskane z kultur pąków przybyszowych (A) oraz z kultur pąków bocznych (B), po 6 tygodniach od wysadzenia do podłoża. Mikrosadzonki **prawe** – nie traktowane auksyną, **środkowe** – traktowane auksyną IBA 0,2%, **mikrosadzonki lewe** – traktowane preparatem talkowym zawierającym IBA 0,2%, kwas askorbinowy 0,1% i kwas nikotynowy 0,1%.

Fig. 3. Microcuttings of R. 'Dr. H.C. Dresselhuys' obtained from an adventitious buds culture (A) and an axillary buds culture (B), 6 weeks after planting in the medium. **The microcuttings on the right** – were untreated controls, **in the middle** – were treated with auxin IBA 0.2%, and **on the left** – were treated with a talk preparation containing IBA 0.2%, ascorbic acid 0.1% and nicotinic acid 0.1%.

szym procencie ukorzeniły się mikrosadzonki, takich odmian jak: 'Everestianum', 'Lee's Dark Purple', 'Van der Hoop', 'Boursault' (tabela 9) oraz mikrosadzonki *R. 'Dr. H.C. Dresselhuys'* traktowane preparatem proszkowym zawierającym auksynę i witaminy (rys. 3 i 4). Na ogół najlepiej ukorzeniały się mikrosadzonki tych odmian różaneczników, które wykazywały również duże zdolności do regeneracji w kulturach *in vitro*. Ukorzone mikrosadzonki różniły się również wzrostem pędów. Ta cecha nie zawsze była skorelowana ze zdolnością różaneczników do regeneracji korzeni przybyszowych. Różanecznik odmiany 'Dr. H.C. Dresselhuys' o słabych zdolnościach do regeneracji korzeni odznaczał się dobrym wzrostem pędów (tabela 9).

#### DYSKUSJA

Zdolność komórek, tkanek i organów do różnicowania pąków przybyszowych, bądź możliwość pobudzania do rozwoju pąków bocznych, stanowi kryterium przy wyborze sposobu rozmnażania wegetatywnego w kulturach *in vitro*. Rodzaj eksplantatu ma decydujący wpływ na przebieg rozwoju tkanek (Japichino i in. 1992). W wielu publikacjach dotyczących mikrorozmnażania roślin wrzosowatych do zainicjowania kultur *in vitro* najczęściej stosowano wierzchołkowe i boczne pąki wegetatywne bądź wyizolowane z nich wierzchołki pędów, z 2-4 zawiązkami liści (McCown i Lloyd 1982, Economou i Read 1984, Blazich i Acedo 1988). Rozwijające się na pożywkach pąki tworzyły pędy, które następnie rozkrzewiały się poprzez rozwój pąków bocznych. Kultury te zapewniają stabilność genetyczną i jwenilność roślin uzyskanych tą drogą (Pierik 1988). Mikrorozmnażanie roślin poprzez kultury pędów bocznych można po równać do tradycyjnej metody rozmnażania wegetatywnego tj. sadzonkowania, które jest prowadzone w warunkach kontroli większości czynników fizycznych i chemicznych.

Regenerację roślin w kulturach *in vitro* można uzyskać również z pąków przybyszowych powstałych z różnicującej się tkanki kalusowej bądź bez jej pośrednictwa, bezpośrednio na tkance eksplantatu. Głównym źródłem eksplantatów tworzących tkankę kalusową u roślin wrzosowatych są 2-3 mm odcinki pędów, liści lub zawiązki pąków kwiatowych (Meyer 1983, Economou i in. 1988, Japichino i in. 1992). Długotrwałe rozmnażanie roślin w kulturach kalusowych zwiększa możliwość uzyskania roślin o zmienionym genotypie (Pierik 1988). W przedstawionej pracy starano się porównać dwie metody regeneracji różaneczników w kulturach *in vitro*: z kultur pędów bocznych oraz z kultur kalusowych czyli pąków przybyszowych. Uzyskane wyniki wskazują, że genotyp rośliny oraz odpowiedni dobór pożywek do stadium rozwoju, w jakim znajduje się eksplantat, mają zasadniczy wpływ na proces morfogenezy i uzyskanie pożądaných efektów regeneracji w kulturach *in vitro*.

Istotne znaczenie w procesie mikrorozmnażania ma stan rozwoju rośliny matecznej w momencie pozyskiwania eksplantatu inicjalnego. W literaturze dotyczącej rozmnażania drzew i krzewów w kulturach *in vitro* pąki wegetatywne najczęściej pozys-

kiwano po zakończeniu spoczynku rośliny matecznej, w miesiącach od grudnia do maja, lub też z aktywnie rosnących tegorocznych przyrostów w okresie letnim (Pierik 1988, Holland i Fenn 1989, Bondok i in. 1990). Zawiązki kwiatowe różaneczników, z których uzyskuje się kalus różnicujący się w pąki przybyszowe, pozyskuje się po zakończeniu rozwoju pąków kwiatowych, od października do kwietnia (Meyer 1982). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że najlepszym terminem inicjacji kultur różaneczników jest okres po ustąpieniu spoczynku roślin matecznych, tj. luty i marzec, przy pozyskiwaniu eksplantatów z pąków kwiatowych oraz kwiecień i maj, przy inicjacji kultur z pąków wegetatywnych. Tylko dobrze wykształcone pąki oraz tkanki cięte po ustąpieniu spoczynku rośliny matecznej, w okresie ich aktywnego rozwoju fizjologicznego, dają gwarancje właściwej regeneracji w kulturach *in vitro*, tj. otrzymania dużej liczby pędów o dobrych zdolnościach do tworzenia korzeni przybyszowych (Pierik 1988, Evers i in. 1988). Termin pozyskiwania eksplantatów związany jest prawdopodobnie z zawartością endogennych regulatorów wzrostu, których poziom ulega wahaniom w zależności od fazy rozwojowej rośliny matecznej (Hartmann i in. 1990).

Podczas inicjacji kultur, a także w trakcie dalszej hodowli tkanek często pojawia się problem ich brunatnienia. W miejscu cięcia eksplantatu tworzą się produkty utleniania, którymi najczęściej są pochodne związków fenolowych. Przenikają one do pożywki hamując wzrost i różnicowanie się tkanek (Pierik 1988, Ling i in. 1988). W przeprowadzonych badaniach najlepsze efekty rozwoju kultur różaneczników uzyskano stosując antyoksydanty przed inicjacją kultur, mocząc eksplantaty w roztworze L-cysteiny lub mieszaniny kwasu cytrynowego i askorbinowego oraz dodając do pożywek L-cysteinę przez cały okres hodowli kultur. Zmniejszenie brunatnienia tkanek można uzyskać poprzez częste pasażowanie kultur na nowe płynne pożywki (Holland i Fenn 1989), traktowanie eksplantatów światłem niebieskim przez jeden tydzień od zainicjowania kultur (Ling i in. 1988) oraz dodanie do pożywek węgla aktywnego czy antyoksydantów. Zastosowanie antyoksydantów nie tylko hamuje brunatnienie kultur, lecz także często stymuluje wydłużanie i ukorzenianie pędów (Standardi i Romani 1990).

W początkowych badaniach nad regeneracją roślin wrzosowatych w kulturach *in vitro* najczęściej stosowano pożywkę Murashige i Skooga (1962), która dla tych roślin okazała się zbyt bogata w związki mineralne (Lyrene 1980). Opracowana dla roślin wrzosowatych pożywka Andersona (1975) zawierała zbyt dużo azotu, zwłaszcza dla kultur inicjalnych, dlatego wielu badaczy stosowało różne modyfikacje tej pożywki, dodając do niej więcej potasu i zmniejszając zawartość azotu, głównie w formie amonowej (Lloyd i McCown 1980, Wolfe i in. 1983, Hradilik i Fišerová 1988). W przeprowadzonych badaniach najlepsze wyniki inicjacji kultur zarówno z pąków wegetatywnych, jak i zawiązków kwiatowych, uzyskano na pożywce Andersona AN (1984) oraz na zmodyfikowanej przez autorkę pożywce Andersona (1984), która zawierała więcej potasu, magnezu i żelaza (pożywka AL). Pożywka ta była również najlepsza w dalszej hodowli kultur różaneczników, a zwiększenie w niej

stężenia mikrośladników, zwłaszcza żelaza, magnezu i miedzi, wyraźnie poprawiło jakość kultur, zmniejszając chlorozę liści i brunatnienie tkanek. Również inni autorzy (Wolfe i in. 1983, Economou i Read 1984) stwierdzili, że zwiększenie stężenia niektórych składników (np. magnezu czy żelaza) w pożywce Andersona (1975), stymuluje tworzenie się pędów i ich wydłużanie oraz poprawia jakość kultur.

Na przebieg regeneracji w kulturach *in vitro* może mieć wpływ forma zastosowanej pożywki – płynna lub stała. Niektórzy autorzy uważają, że korzystniejszy rozwój kultur uzyskuje się na pożywkach płynnych, ponieważ większa jest w nich zdolność roślin do absorpcji składników pokarmowych i hormonów. Z drugiej strony w pożywkach płynnych zwiększa się jednak tendencja do wityfikacji, tj. szklistości kultur (Paqus i Boxus 1987, Feito i in. 1994). W przedstawionych badaniach zastosowanie pożywki dwufazowej, tj. płynnej razem z pożywką agarową, niezależnie od sposobu regeneracji roślin w kulturach *in vitro*, wpłynęło na wzrost liczby pędów o długości powyżej 1 cm i poprawiło ich jakość.

Od czterdziestu lat znany jest wpływ cytokinin i auksyn na zjawisko organogenezy obserwowanej w kulturach *in vitro* (Skoog i Miller 1957). Łączny efekt tych dwóch grup substancji badano na wielu roślinach stwierdzając zazwyczaj modyfikujący wpływ auksyn na działanie cytokinin i odwrotnie. W badaniach nad regeneracją różaneczników w kulturach *in vitro* najczęściej stosowano cytokininę 2iP, natomiast z auksyn IAA i IBA (Anderson 1975, Fordham i in. 1982, Meyer 1982). W większości cytowanych publikacji nie zamieszczano dokładnych danych ilościowych i jakościowych, które pozwoliłyby na ocenę przydatności cytokinin w sterowaniu organogenezą różaneczników. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że przy inicjacji kultur kalusowych lepsze efekty uzyskuje się stosując wyższe stężenia cytokinin i auksyny (2iP 15 mg L<sup>-1</sup> i IAA 4 mg L<sup>-1</sup>), natomiast przy inicjacji kultur pędów bocznych korzystniejsze jest stosowanie niższych stężeń hormonów (2iP 4 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Wyższe stężenia 2iP i IAA w momencie inicjacji kultur roślin wrzosowatych stosowali również Lyrene (1980), Economou i in. (1988). Rodzaj eksplantatu, a także faza rozwoju rośliny matecznej, z której jest on pozyskiwany, decydują o wielkości stosowanych dawek substancji wzrostowych. Pąki wegetatywne pozyskiwane w okresie intensywnego rozwoju rośliny matecznej zawierają prawdopodobnie dużą ilość endogennych regulatorów wzrostu umożliwiających im intensywny wzrost w kulturach *in vitro*. Zbyt wysokie stężenie egzogennych hormonów może prowadzić do hamowania procesu organogenezy oraz do zaburzeń w morfogenezie.

Jak wykazały przeprowadzone badania, najlepsze rezultaty rozwoju kultur po 2-3 pasażach uzyskano na pożywce o obniżonej koncentracji cytokinin i auksyny. Badania te wykazały, że u różaneczników, zwłaszcza w okresie intensywnego rozwoju kultur, stosunkowo niewielki dodatek auksyny do pożywek zawierających cytokininę wzmacnia reakcję tkanek na cytokininę. Najlepszy wpływ na namnażanie się pędów różaneczników w ustabilizowanych kulturach pąków bocznych i przybyszowych miała auksyna IAA, w stężeniu 0,25-1 mg L<sup>-1</sup> oraz cytokinina 2iP, w stężeniu

0,5-2 mg L<sup>-1</sup>. Podobne wyniki reakcji hormonów na regenerację różaneczników w kulturach *in vitro* uzyskiwali Anderson (1984), Meyer (1982) oraz Economou i Read (1984).

Głównym celem regeneracji roślin w kulturach *in vitro* jest otrzymanie dobrze wykształconych pędów o długości powyżej 1 cm, które mogą być przeznaczone do ukorzenia. Bardzo dobre wyniki regeneracji korzeni przybyszowych wielu odmian różaneczników uzyskano w warunkach *ex vitro*, w podłożu składającym się z mieszaniny torfu i perlitu, o pH 4,5. Traktowanie mikrosadzonek przed umieszczeniem ich w niesterylnym podłożu auksyną (IAA lub IBA) w preparacie talkowym, w stężeniu 0,1-0,5% wpływa stymulująco na tworzenie się korzeni przybyszowych (Šifar 1994). W przedstawianej pracy najlepsze rezultaty ukorzenia wielu odmian różaneczników w warunkach *ex vitro* uzyskano traktując pędy preparatem wieloskładnikowym, który obok auksyny IBA, w stężeniu 0,2% zawierał również witaminy: niacynę i kwas askorbinowy. Na proces regeneracji korzeni przybyszowych mają wpływ ponadto związki współdziałające z auksynami, tzw. kofaktory, do których należą witaminy. Zastosowanie ich razem z auksynami stymulowało proces rizogenezy mikrosadzonek.

Uzyskane wyniki wykazały duże różnice między gatunkami i odmianami. Stwierdzono, że rodzaj stosowanych eksplantatów (pąki wegetatywne czy zawiązki pąków kwiatowych) nie miał istotnego wpływu na rozwój kultur inicjalnych poszczególnych odmian różaneczników. Przy prowadzeniu dalszej hodowli stwierdzono jednak, że regeneracja roślin poprzez kultury kalusowe, tj. kultury pąków przybyszowych, jest znacznie efektywniejsza niż z kultur pędów bocznych. Pędy otrzymane z tych dwóch rodzajów kultur wykazywały podobną zdolność do regeneracji korzeni przybyszowych i nie różniły się w adaptacji do warunków szklarniowych. Mimo że uzyskana zmienność somaklonalna w kulturach kalusowych jest większa niż w kulturach pędów bocznych, w ciągu kilku lat prowadzonych badań nie stwierdzono żadnych różnic we wzroście i kwitnieniu roślin niezależnie od sposobu ich regeneracji w kulturach *in vitro*.

#### STRESZCZENIE

Eksplantaty inicjalne pozyskiwano do doświadczeń w kilku terminach z pąków kwiatowych i wegetatywnych wybranych odmian różaneczników. Najlepszy wzrost i różnicowanie kalusa uzyskano przy inicjacji kultur z zawiązków kwiatowych w lutym i marcu, na zmodyfikowanej pożywce Andersona (1984) – AL z dodatkiem L-cysteiny (w stężeniu 10 mg L<sup>-1</sup>) i hormonów: 2iP, w stężeniu 15 mg L<sup>-1</sup> i IAA, w stężeniu 4 mg L<sup>-1</sup>. Wysoki procent rozwijających pąków wegetatywnych otrzymano przy inicjacji kultur w miesiącach kwietniu i maju oraz sierpniu i wrześniu, na pożywce AL z dodatkiem L-cysteiny (10 mg L<sup>-1</sup>) i hormonów: 2iP, w stężeniu 4 mg L<sup>-1</sup> i IAA w stężeniu 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Najlepsze efekty w tworzeniu się pędów

uzyskiwano na pożywce AL o zmniejszonym stężeniu hormonów: 2iP 0,5-2 mg L<sup>-1</sup> i IAA 0,25-0,5 mg L<sup>-1</sup>. Intensywniejsze namnażanie się pędów występowało w kulturach kalusowych (z pąków przybyszowych), niż w kulturach pąków bocznych. Nie stwierdzono natomiast różnic w ukorzenianiu się mikrosadzonek pozyskiwanych z tych dwóch sposobów regeneracji różaneczników. Mikrosadzonki najlepiej ukorzeniały się w warunkach *ex vitro* w niesterylnym podłożu składającym się z mieszaniny torfu i perlitu (w stosunku 3:1), przy traktowaniu ich preparatem talkowym zawierającym auksynę IBA w stężeniu 0,2%, kwas nikotynowy w stężeniu 0,1% i kwas askorbinowy w stężeniu 0,1%.

## LITERATURA

- ANDERSON W.C., 1975. Propagation of Rhododendron by tissue culture: Part 1. Development of a culture medium for multiplications of shoots. Inter. Plant. Prop. Soc. Com. Proc. 25: 129-135.
- ANDERSON W.C., 1980. Mass propagation by tissue culture: Principles and techniques. Proc. Conf. Nur. Prod. Fruit Plants through tissue Culture. Beltsville Maryland: 1-10.
- ANDERSON W.C., 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of Rhododendron. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (3): 343-347.
- BLAZICH F.A., ACEDO J.R., 1988. Micropropagation of flame azalea. Journal of Env. Horticulture 6 (2): 45-47.
- BOJARCZUK K., 1989. Badania nad mikrorozmnażaniem różaneczników. Arbor. Kórnickie 34: 89-100.
- BOJARCZUK K., 1994. In vitro rapid propagation of Rhododendron cultivars from callus and bud cultures. Acta Horticulturae 364: 35-40.
- BONDOK A.Z., EL-AGAMY S.Z., GOMAA A.H., 1990. In vitro propagation of Mariana 2624 plum root stock. Egypt. Jour. of Hort. 16 (1): 9-16.
- ECONOMOU A.S., READ P.E., 1984. In vitro shoot proliferation of Minnesota Deciduous Azaleas. HortScience 19 (1): 60-61
- ECONOMOU A.S., READ P.E., SPANOUDAKI M.J., 1988. Azalea regeneration from callus culture. Acta Horticulturae 226: 209-216.
- EVERS P.W., DONKERS J., PRAT A., VERMEER E., 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture. Wageningen.
- FEITO I., RODRIGUEZ A., CENTENO M.L., SANCHEZFAMES R., FERNANDEZ B., 1994. Effect of physical nature of the culture medium on the metabolism of benzyladenine and endogenous cytokinins in *Actinidia deliciosa* tissues cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 91 (3): 449-453.
- FORDHAM I., STIMART D.P., ZIMMERMAN R.H., 1982. Axillary and adventitious shoot proliferation of Exbury azaleas *in vitro*. HortScience 17 (5): 738-739.
- HARTMANN H.T., KESTER D.E. DAVIES F.T., 1990. Plant propagation. Principles and Practices. Prentice-Hall International Editions London.
- HOLLAND R.T., FENN P., 1989. Tissue culture propagation of pin oak. Proc. of Ann. Meet.-Arkansas State Hort. Soc. 109: 154-157.
- HRADILIK J., FIŠEROVÁ H., 1988. Kultivace frézii a rhododendronu *in vitro*. Acta Univ. Agricul. Facul. Agronomica 36 (1): 29-37.
- JAPICHINO G., McCULLOCH S., CHEN T.H.H., 1992. Adventitious shoot formation from leaf explants of Rhododendron. Plant Cell Tissue and Organ Culture 20 (3): 237-241.
- LING C.H., LESLIE K. CLAY L.K.C., 1988. Commercial conifer micropropagation. Inert. Plant. Prop. Soc. Com. Proc. 38: 209-215.
- LLOYD G., McCOWN B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Inter. Plant. Prop. Soc. Com. Proc. 30: 421-427.



- LYRENE P.M., 1980. Micropropagation of Rabbiteye Blueberries. HortScience 15 (1): 80-81.
- MCCOWN B.H., LLOYD G.B., 1982. A survey of the response of Rhododendron to *in vitro* culture. Plant. Cell. Tissue Organ Culture 2: 77-85.
- MEYER M.M., 1982. *In vitro* propagation of *Rhododendron catawbiense* from flower buds. HortScience 17 (6): 891-892.
- MEYER M.M., 1983. A new method for propagating woody plants from culture. American Nurserymen 1: 65-70.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- PAQUS M., BOXUS Ph., 1987. A model to learn vitrification the rootstock apple M.26 present results. Acta Horticulturae 212: 193-210.
- PERQUIN F.W., 1978. *In vitro* cultur. Prof. voor de Boomkw.: 46-50.
- PIERIK R.L.M. 1988. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. Acta Horticulturae 226: 25-40.
- ŠIFAR A., 1994. The effect of boron on the rooting of Rhododendron microcuttings *in vitro* under humidity tent. Acta Horticulturae 364: 41-43.
- SKOOG F., MILLER C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Sym. Soc. Exp. Biol. 11. The biological action of growth substances: 118-131.
- STANDARDI A., ROMANI F., 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of apple shoots. HortScience 25 (11): 1435-1436.
- WOLFE D.E., ECK P., CHEE-KOK CHIN., 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of Highbush Blueberry. HortScience 18 (5): 703-705.