



Mikrorozmnażanie podkładki *Rosa indica* „Major”

Danuta Kucharska, Helena Wiśniewska-Grzeszkiewicz,
Teresa Orlikowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Micropropagation of rose rootstock *Rosa indica* 'Major'

Summary

Rosa indica 'Major' is a vegetatively propagated rootstock, valuable for greenhouse grown cultivars. *In vitro* propagation could help the supply of high quality plants for field stock plantations. Results from our experiments show that increase in the number of shoots > 1 cm can be obtained through the use of 2,2 g/l Gelrite instead of Plant agar and to reduction of 6-benzylaminopurine concentration to 1,5 mg/l. FeEDDHA chelate did not improve the quality of the cultures. Rooting of shoots could be more effective when riboflavine is added to the auxin medium in a one-step procedure or when microcuttings are subcultured after root induction to auxin free medium.

Key words:

micropropagation, *Rosa indica* 'Major', rose rootstock, Gelrite, perlite, liquid medium, riboflavine.

1. Wstęp

Podkładki stosowane w produkcji róż mają za zadanie modyfikować wzrost i rozkrzewianie odmian szlachetnych, zwiększać odporność roślin na nicienie, niesprzyjające warunki glebowe i klimatyczne oraz plonowanie zimowe róż szklarniowych. *R. indica* „Major” jest podkładką rozmnażaną wegetatywnie, która zmniejsza negatywny wpływ niedoświetlenia zimą i zbyt wysokiej temperatury latem (1). De Vries i Dubois (2) wykazali, że ukorzenianie sadzonek podkładek róż pochodzących z mateczników założonych z roślin rozmnażanych *in vitro* było lepsze niż

Adres do korespondencji

Danuta Kucharska,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

sadzonek pochodzących z mateczników założonych z sadzonek mnożonych tradycyjnie. Mateczniki takie są zazwyczaj wysoce produktywne przez kilka lat, po czym należy je zastąpić nowymi nasadzeniami. Szersze rozpowszechnienie wymienionej podkładki w Polsce może być przyspieszone w wyniku produkowania sadzonek do nasadzeń mateczników w kulturach *in vitro*. W literaturze można znaleźć trzy doniesienia na temat mikrorozmnażania *R. indica* „Major”, w tym jedno dostępne tylko jako informacja o namnażaniu pędów w artykule przeglądowym (3). Avramis i wsp. (4) donosili o masowym rozmnażaniu tej podkładki na pożywce Murashige i Skooga (5) z dodatkiem 2,0 mg/l 6-benzyloaminopuryny (BAP) i 0,1 mg/l kwasu naftylooctowego (NAA). Współczynnik rozmnażania wynosił od 1,8 do 2,2 pędu na miesiąc, co w dzisiejszych warunkach ekonomicznych jest daleko niewystarczające dla praktycznego zastosowania. Przesłanki te były powodem do podjęcia doświadczeń, których celem było poznanie warunków efektywnego mikrorozmnażania wyselekcjonowanego klonu *Rosa indica* „Major”. We wstępnie przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że na pożywce z dodatkiem 2 mg/l BAP można uzyskać około 5 pędów na miesiąc, ale pędy są krótkie, poniżej 1 cm, i przez to mniej przydatne do ukorzeniania. W pracy tej przedstawiamy wyniki z doświadczeń nad wpływem wysokości pędu, rodzaju środka żelującego oraz związku chemicznego będącego źródłem żelaza na namnażanie pędów, a także czasu oddziaływania auksyny, węgla aktywnego i ryboflawiny oraz pożywki płynnej na ukorzenianie pędów tej podkładki.

2. Materiał i metody

2.1. Zakładanie kultur

Wierzchołki szczytowych i bocznych pędów pobrane z kilkunastoletnich krzewów *Rosa indica* „Major” pozbawione rozwiniętych liści, płukano przez kilka godzin w bieżącej wodzie, a następnie sterylizowano w chlorku rtęci 0,1% przez 1-3 minut. Wierzchołki długości 5-10 mm wykładano na pożywkę zawierającą sole Murashige i Skooga – MS w stężeniu 1/2, witaminy MS, 30 g/l sacharozy, 1,0 mg/l BAP i 200 mg/l albuminy mlecznej.

2.2. Namnażanie pędów

Podstawowa pożywka dla rozkrzewiania podkładek róż zawierała sole i witaminy MS, 30 g/l sacharozy, 2,0 mg/l BAP, 0,1 mg/l kwasu indolilo-3-octowego (IAA), 1,0 mg/l kwasu gibberelowego (GA₃) i 7 g/l agaru Plant (Duchefa). Wykonano trzy doświadczenia: (A) nad wpływem wysokości inicjalnej pędów (< 1cm oraz 1-2 cm), (B) nad wpływem rodzaju substancji żelującej (agar Plant i Gelrite) oraz (C) nad

wpływem formy żelaza (chelaty etyleno-di-amino tetra-octan sodowo-żelazawy (FeNa EDTA) i etyleno-di-amino di-(-2-hydrofenylo)octan żelazawy (FeEDDHA), na namnażanie pędów kątowych.

2.3. Ukorzenianie i aklimatyzacja

Pędy o wysokości 1 cm indukowano do ukorzeniania na pożywce podstawowej, zawierającej sole MS w stężeniu 1/2 z dodatkiem 30 g/l sacharozy, 1,0 mg/l kwasu indolilo-3-masłowego (IBA) i 7 g/l agaru Plant. Przez pierwsze pięć dni pędy przebywały na tej pożywce w ciemności, a następnie przenoszono je do standardowego oświetlenia 16 h. Zastosowano trzy rodzaje traktowania sadzonek po okresie indukcji: 1) pędy pozostawały na pożywce indukcyjnej, 2) pędy przenoszono po 5 dniach na pożywkę identyczną, ale bez auksyny i z dodatkiem 5 g/l węgla aktywnego, 3) pędy przenoszono do naczynia z perlitem wysyconym pożywką płynną identyczną jak indukcyjna, ale bez auksyny. Następne dwa sposoby polegały na indukowaniu korzeni i ukorzenianiu pędów na jednej pożywce, takiej jak podstawowa, lecz z dodatkiem ryboflawiny w stężeniu 1,0 mg/l (4) lub ryboflawiny w stężeniu 5,0 mg/l (5). Ukorzenione pędy sadzono do mieszaniny torfu z perlitem (4:1), zabezpieczając przed wysychaniem osłoną z folii polietylenowej, a przed grzybami odglebowymi i szarą pleśnią 0,2% roztworem Kaptanu i 0,1% roztworem Rovralu.

2.4. Warunki prowadzenia doświadczeń, obserwacje i analiza statystyczna

W słoikach o pojemności 200 ml umieszczano po 4 pędy. Liczba pędów w kombinacji doświadczalnej wynosiła 24. Doświadczenia wykonano dwukrotnie. Cechy charakteryzujące rozkrzewianie – liczbę i długość pędów w wieloroślinkach określano po 6 tygodniach. Cechy charakteryzujące ukorzenianie – procent pędów ukorzenionych, liczbę i długość korzeni oraz długość pędów określano po 4 tygodniach. Analizę statystyczną prowadzono na wartościach średnich ze słoika. Istotność różnic określono przy $P = 0,05$.

3. Wyniki i dyskusja

Wierzchołki pędów rozpoczęły wzrost i rozkrzewianie już na pożywce inicjalnej, w czasie pierwszych 6 tygodni kultury. Przeciwnie do *Rosa manetti* (6), podkładka „Major” tworzyła w czasie pasażu na pożywce podstawowej prawie wyłącznie pędy niższe od 1 cm. W doświadczeniu A wykazano, że z pędów o wysokości od 1 do 2 cm otrzymano o 50% więcej pędów bocznych niż z pędów niższych od 1 cm (tab. 1A). Także Salehi i Khosh-Khui (7) wykazali, że u róż miniaturowych wielkość

eksplantatu inicjalnego (długość i średnica pędu) jest pozytywnie skorelowana z wydłużaniem i rozkrzewianiem pędów.

Tabela 1

Namnażanie pędów *Rosa indica* „Major”, w zależności od inicjalnej długości pędów (A), rodzaju substancji żelującej (B) oraz formy żelaza (C)

Założenia doświadczeń A, B i C	Średnia liczba pędów	(%) pędów > 1 cm długości
A. BAP 2 mg/l, Plant agar		
pędy inicjalne < 1 cm	4,6 a	0
pędy inicjalne 1-2 cm	6,6 b	0,1
B. BAP 1,5 mg/l, pędy inicjalne < 1 cm		
agar Plant 7 g/l	5,8 a	14,7 a
Gelrite 2,2 g/l	6,8 b	28,2 b
C. BAP 1,0 mg/l, Gelrite 2,2 g/l, pędy inicjalne < 1 cm		
FeNaEDTA 36,7 mg/l	6,2 b	22,7 a
FeEDDHA 100 mg/l	5,0 a	34,0 a

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $P = 0,05$, w obrębie poszczególnych doświadczeń.

Zastąpienie agaru Plant Gelritem spowodowało zwiększenie liczby wszystkich pędów i udziału pędów wyższych (tab. 1B). Dostępność składników pożywki, wynikająca z właściwości środka żelującego, ma duże znaczenie dla liczby i wysokości pędów róż (8), ale równocześnie powoduje zagrożenie szklistością. Szklistości można przeciwdziałać w różny sposób, przede wszystkim przez zmniejszenie stężenia BAP, zwiększenie stężenia sacharozy i środka żelującego, zmianę stężenia soli mineralnych, pamiętając o interakcji wszystkich składników pożywki (9). Avramis i wsp. (4) rozmnażali *R. indica* „Major” na pożywce MS z dodatkiem 2,0 mg/l BAP, zmodyfikowanej w wyniku zmniejszenia stężenia azotanu amonu. Współczynnik rozmnażania był nieznacznie wyższy, ale praktycznie nieistotny.

Van der Salm i wsp. (10) polecali dla poprawienia jakości kultur pędowych róży, a szczególnie dla zapobiegania żółknięciu liści, zastąpienie żelaza w formie FeNaEDTA związkami FeEDDHA. W naszych doświadczeniach taka modyfikacja zapobiegała żółknięciu liści, wówczas gdy kultury nie były przeszczepiane przez okres dłuższy niż 8 tygodni (dane nie publikowane). W doświadczeniach trwających 6 tygodni liście nie żółkły, a dodatek FeEDDHA spowodował istotne zmniejszenie liczby i nieistotne zwiększenie udziału pędów > 1 cm (tab. 1C).

W naszym doświadczeniu udział pędów tworzących korzenie był najniższy (88%), a korzenie najkrótsze (0,3 cm) w kombinacji, gdzie mikrosadzonki pozostawały przez cały okres ukorzeniania na jednej pożywce z auksyną (tab. 2). Dodatek ryboflawiny do tej pożywki, która przyspiesza rozkład auksyny na świetle (11) spowodował, że ukorzeniło się 91 i 97% pędów, a korzenie były cztery razy dłuższe – 1,3 cm. Podobny efekt miało przenoszenie pędów po zaindukowaniu korzeni na pożywce z auksyną na pożywkę bez auksyny – agarową z węglem aktywnym lub płynną

z perlitem (97% pędów ukorzenionych i 1,4 cm długość korzeni). W tych kombinacjach dodatkowo korzystne było zwiększenie wysokości pędów, szczególnie na pożywce płynnej z perlitem (1,4 i 1,7 cm).

Tabela 2

Ukorzenianie *Rosa indica* „Major”, w zależności od przenoszenia mikrosadzonek po zaindukowaniu korzeni na pożywkę bez auksyny oraz dodatku ryboflawiny

Warunki ukorzeniania mikrosadzonek	(%) pędów ukorzenionych	Średnia liczba korzeni	Średnia długość korzeni w cm	Średnia długość pędu ukorzenionego w cm
1) bez przenoszenia	88,3 a	5,5 a	0,3 a	1,4 a
2) przenoszone na pożywkę agarową z węglem aktywnym	97,0 a	4,6 a	1,4 b	1,7 ab
3) przenoszone na perlit z płynną pożywką	97,0 a	5,1 a	1,4 b	1,9 b
4) bez przenoszenia + ryboflawina (1 mg/l)	91,0 a	5,4 a	1,3 b	1,4 a
5) bez przenoszenia + ryboflawina (5 mg/l)	97,0 a	5,5 a	1,3 b	1,4 a

Indukcja ukorzeniania w ciemności przez 5 dni, przy 1 mg/l IBA. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $P = 0,05$.

Avramis i wsp. (12) ukorzeniali mikrosadzonki podkładki *R. indica* „Major” na zmodyfikowanej pożywce MS z dodatkiem 0,1 mg/l NAA, ze skutecznością do 80%. Nie podali jednak informacji o cechach świadczących o jakości ukorzenionych sadzonek. Stymulowanie indukowania i wyrastania korzeni na jednej pożywce jest sposobem bardziej praktycznym i tańszym, jednak nie zawsze takie warunki sprzyjają wzrostowi pędów i wydłużaniu korzeni. Niektóre genotypy róż są wrażliwe na nadmiar auksyny i produkowanego w jej obecności etylenu (13), a wówczas skuteczne może być przenoszenie pędów po zaindukowaniu korzeni na pożywkę bez dodatku auksyny lub przyspieszenie degradacji auksyny pod wpływem ryboflawiny.

4. Wnioski

Mikrorozmnażanie podkładki *Rosa indica* „Major” *in vitro* jest zadowalające pod względem ilościowym i jakościowym w następujących warunkach:

- namnażanie pędów: pożywka MS zestalona Gelritem (2,2 mg/l), z dodatkiem 1,5 mg/l BAP,
- ukorzenianie pędów: pożywka MS w stężeniu $\frac{1}{2}$ z dodatkiem 1 mg/l IBA i 5 mg/l ryboflawiny; pierwsze 5 dni w ciemności, albo (korzystniejsza wersja) indukcja korzeni w ciemności, na pożywce z 1 mg/l IBA, a po 5 dniach przenoszenie pędów do pożywki bez auksyny, agarowej z węglem aktywnym lub płynnej w perlicie,

– aklimatyzacja roślin w szklarni, w podłożu torf z perlitem (4:1), po zabezpieczeniu fungicydami przed chorobami grzybowymi i folią przed wyschnięciem.

Literatura

1. Pertwee J., (1995), *Production and marketing of roses*, 2^{ed}, Patchfast Publishing, England, 30-31.
2. de Vries D. P., Dubois L. A. M., (1994), *Gartenbauwissenschaft*, 59, 81-85.
3. Rout G. R., Samantaray S., Mottley J., Das P., (1999), *Scientia Hort.*, 81, 201-228.
4. Avramis T., Hugard J., Jonard R., (1982), *C. R. Acad. Sc. Paris, Série III*, 294, 63-68.
5. Murashige T., Skoog L., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
6. Kucharska D., Golis A., Podwyszyńska M., Wiśniewska-Grzeszkiewicz H., Orlikowska T., (2000), *Zeszyty Naukowe ISK*, 7, 365-374.
7. Salehi H., Khosh-Khui M., (1997), *J. Hort. Sci.*, 72, 673-676.
8. Ghashghaie J., Brenckmann F., Saugier B., (1991), *Physiol. Plant.*, 82, 73-78.
9. Ziv M., (1991), *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 27, 64-69.
10. van der Salm T. P. M., van der Toorn C. J. G., Hanish ten Cate C. H., Dubois L. A. M., de Vries D. P., Dons H. J. M., (1994), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 73-77.
11. Gorst J. R., Slaytor R. A., de Fossard R. A., (1983), *J. Exp. Bot.*, 34, 1503-1515.
12. Avramis T., Hugard J., Jonard R., (1982), *C. R. Acad. Sc. Paris, Série III*, 294, 679-682.
13. Podwyszyńska M., Goszczyńska D. M., (1994), *Prace Ogródu Bot. PAN*, 5/6, 261-266.