

**CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA INICJACJĘ, STABILIZACJĘ
I ROZMNAŻANIE AGRESTU (*RIBES GROSSULARIA* L.)
W KULTURACH *IN VITRO***

FACTORS AFFECTING THE INITIATION, STABILIZATION
AND *IN VITRO* PROPAGATION OF GOOSEBERRY (*RIBES GROSSULARIA* L.)

Danuta Kucharska, Angelika Niewiadomska-Wnuk, Waldemar Kiszczak

Instytut Ogrodnictwa,
96-100 Skierniewice, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
danuta.kucharska@inhort.pl

Abstract

The increasing importance of gooseberry (*R. grossularia* L.) initiated our study on *in vitro* propagation of this species. There are few reports on micropropagation of gooseberry, which indicate several difficulties, also those related to the plant genotype. The aim of this study was to know the factors, influencing the initiation of *in vitro* cultures of 14 genotypes of gooseberry including medium composition. The experiments were focused on macro- and microelements and on single medium components and their role in processes of stabilization and shoot multiplication, and also on preventing hyperhydration. Apical and lateral buds were collected in the months of February–March and May–June. In both terms the mortality of the initial explants was high due to contaminations and phenolics oxidation. For all genotypes the effect of BAP and kinetin was evaluated. In order to eliminate hyperhydration of the explants, concentration of nitrogen was reduced to half of the MS. The usefulness of agars Plant and Bacto and Gelrite were investigated. Initiation of cultures in the second term was successful only from shoots taken from plants grown under covering. The most effective was initiation of cultures from the apical buds in the phase of intensive growth. Among three media tested, MS, WPM and QL, most advantageous to the cultures of gooseberry proved MS medium. Shoots on medium contained BAP multiplied well, were green, but they mostly formed dense rosettes. The addition of kinetin caused elongation of shoots, but at the same time increased shoot necrosis. Shoots multiplied in the medium solidified with Bacto agar were of the best quality.

Key words: gooseberry, *Ribes grossularia* L., BAP, kinetin, *in vitro* cultures

WSTĘP

Rozmnażanie wielu gatunków roślin jagodowych w kulturach *in vitro* jest coraz powszechniej stosowane, zarówno do zakładania mateczników, jak i plantacji produkcyjnych. Podstawową zaletą tej techniki jest możliwość uzyskania w krótkim czasie bardzo dużej liczby nowych, wyrównanych fe-

notypowo i genotypowo, wolnych od patogenów roślin (Zenkler 1984). Dowiedziono, iż rośliny z kultur *in vitro* wykazują większą juvenilność i produktywność. Jest wiele doniesień dotyczących zastosowania *in vitro* w rozmnażaniu roślin z rodzaju *Ribes*: *R. nigrum*, *R. aureum*, *R. odoratum* (Wainwright i Flegmann 1986; Brennan i in. 1989; Orlikowska i in. 1991; Reed i Chang 1997; Sedlák i Paprštejn 2012). Agrest (*Ribes grossularia*) jest cenną rośliną sadowniczą, która ciągle zyskuje na znaczeniu. Otrzymywanie sadzonek agrestu w tradycyjny sposób jest mało efektywne i długotrwałe (Czynczyk 2012). Doniesienia literaturowe na temat możliwości efektywnego mnożenia agrestu w kulturach *in vitro* są nieliczne i dotyczą pojedynczych odmian (Welander 1985; Wainwright i Flegmann 1985a,b; Reed i Hummer 2002). W poszczególnych etapach mikrorozmnażania agrestu stosowano odmienne pożywki oraz były różne sposoby postępowania. Podkreślano duży wpływ składu mineralnego pożywki na kultury agrestu a także sygnalizowano szereg trudności, takich jak: nadmierne uwodnienie, zamieranie pędów i różne reakcje badanych odmian na te same warunki kultury (Wainwright i Flegmann 1985a,b). To spowodowało, że w Instytucie Ogrodnictwa podjęto badania, których celem była pogłębiona analiza i optymalizacja metody mikrorozmnażania genotypów agrestu.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem badawczym było 8 odmian ustalonych agrestu: ‘Biały Triumf’, ‘Pax’, ‘Invicta’, ‘Kamieniar’, ‘Captivator’, ‘Resika’, ‘Hinsel’ i ‘Hinnonmaki Rot’, rosnących w karkasie i tunelu oraz 7 klonów selekcyjnych hodowli IO: klon 2/2, klon 2/33 klon 86, klon 101, klon 102, klon 108, klon 117, rosnących w kolekcji polowej. Doświadczenia w fitotronie prowadzono w stałej temperaturze 23–25 °C, przy długości dnia 16 godzin, w świetle białym, rozproszonym, o natężeniu 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

Doświadczenie 1

Wpływ terminu pobierania i rodzaju pąków na inicjację i stabilizację kultur *in vitro*

Materiał inicjalny pobierano w dwóch terminach: pierwszy w miesiącach luty–marzec – ścięte pędy wstawione do wody stymulowano do wyrastania pąków w warunkach szklarniowych oraz drugi w miesiącach maj–czerwiec – z pąków będących w fazie intensywnego wzrostu z pola i z karkasu. Pobierano pąki wierzchołkowe oraz boczne i płukano pod bieżącą wodą, a następnie w roztworze detergentu. Odkazanie powierzchniowe prowadzono w 0,1% roztworze chlorku rtęci przez 2 minuty lub w 1% roztworze chloraminy T przez 5 minut i wykładano na pożywkę inicjalną o zredukowanym do połowy składzie makro- i mikroelementów MS (Murashige i Skoog 1962) z dodatkiem 0,25 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ benzyloaminopuryny (BAP) oraz 250 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ albuminy mlecznej.

Eksplantaty inicjalne umieszczano w fitotronie. Po 4 tygodniach następowała stabilizacja kultur. Wtedy pędy przenoszono na pożywkę o składzie: $\frac{1}{2}$ soli MS, $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP lub $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetyny. Wartości opracowano statystycznie testem do porównywania dwóch frakcji Chi-kwadrat.

Doświadczenie 2

Wpływ makro i mikroelementów na liczbę i jakość pędów

Podjęto prace nad optymalizacją składu makro- i mikroelementów, zapewniającego najlepszy współczynnik namnażania, szczególnie liczbę pędów dłuższych niż 1 cm przydatnych do ukorzenia oraz ograniczenie liczby pędów nekrotycznych. Użyto pożywki: MS, WPM (Lloyd i McCown 1981) i QL (Quoirin i Lepoivre 1977) z dodatkiem witamin WPM, $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, $7,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ agaru Bacto. Badania prowadzono na 14 genotypach agrestu, w każdej kombinacji doświadczalnej było 30 eksplantatów. Po 4 tygodniach trwania pasażu oceniono parametry namnażania i wzrostu oraz liczbę pędów nekrotycznych. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic między średnimi użyto testu Kruskala-Wallisa ($p = 0,05$).

Doświadczenie 3

Wpływ składników pożywki na wzrost, namnażanie i przeciwdziałanie objawom witryfikacji w kulturach agrestu

W kolejnych badaniach sprawdzano wpływ $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetyny na namnażanie i jakość kultur. W celu eliminowania zjawiska witryfikacji pędów, eksplantaty wykładano na pożywkę MS o pełnym lub zredukowanym o połowę stężeniu jonów azotowych oraz dla 13 genotypów badano wpływ substancji zestalającej pożywkę: agaru Plant i Bacto oraz Gelrite. W każdej kombinacji doświadczalnej było 5 powtórzeń (słоекów), tzn. ok. 30 eksplantatów. Po 4 tygodniach trwania pasażu zostały ocenione: współczynnik namnażania, liczba pędów $>1 \text{ cm}$, nekrotycznych oraz szklistych. Wartości liczbowe określające wpływ cytokinin porównano statystycznie testem U Manna-Whitneya, a średnie określające wpływ substancji zestalającej testem Kruskala-Wallisa.

WYNIKI

Doświadczenie 1

Zarówno w terminie zimowym, jak i wiosennym następowały wypadki eksplantatów bezpośrednio po inicjacji kultur, spowodowane w większości zanieczyszczeniem mikroorganizmami oraz uszkodzeniami na skutek odkażania. Szczególnie dużo zanieczyszczeń grzybowych i bakteryjnych zaobserwowano po odkażaniu powierzchniowym 1% roztworem chloraminy. Stopień przeżywalności eksplantatów zależał od rodzaju eksplantatu (tab. 1).

Tabela 1. Wpływ rodzaju pąków oraz czasu pobierania na efektywność inicjacji kultur agrestu
 Table 1. Effect of bud type and date of buds collection on effectiveness of culture initiation

Odmiana/klon Cultivar/clone	Wypadki eksplantatów (%) Dying of explants (%)			
	izolacja luty–marzec February–March isolation		izolacja maj–czerwiec May–June isolation	
	pąki wierzchołkowe apical buds	pąki boczne lateral buds	pąki wierzchołkowe apical buds	pąki boczne lateral buds
‘Biały Triumf’ (tunel)	82,5 a	91,7 a	41,7 a	66,7 a
‘Captivator’ (tunel)	28,9 a	63,8 b	22,0 a	39,6 a
‘Hinsel’ (karkas)	52,3 a	91,4 b	6,3 a	79,6 b
‘Hinnonmaki Rot’ (tunel)	40,1 a	82,5 b	0 a	76,7 b
‘Invicta’ (tunel)	29,7 a	78,3 b	72,7 a	93,3 a
‘Kamieniar’ (tunel)	34,7 a	90,5 b	52,6 a	97,6 b
‘Pax’ (tunel)	22,2 a	39,7 a	100 a	96,0 a
‘Resika’ (karkas)	27,8 a	64,9 b	27,7 a	80,9 b
Klon 2/2 (pole)	18,5 a	63,7 b	74,5 a	97,6 a
Klon 2/33 (pole)	50,2 a	72,4 a	100 a	100 a
Klon 86 (pole)	63,7 a	92,1 a	100 a	100 a
Klon 101 (pole)	45,6 a	93,4 b	100 a	100 a
Klon 102 (pole)	74,5 a	82,1 a	100 a	100 a
Klon 108 (pole)	63,5 a	79,7 a	92,4 a	100 a
Klon 117 (pole)	61,7 a	82,7 a	100 a	100 a

Wartości w obrębie odmian oraz terminu izolacji oznaczone tą samą literą nie różnią się według testu Chi-kwadrat ($p = 0,05$).

Values within cultivar/clone and term of isolation marked with the same letter do not differ by Chi-square test ($p = 0.05$).

Więcej wypadków obserwowano wśród eksplantatów zakładanych z pąków bocznych niż z pąków wierzchołkowych. Wzrost podejmują te pąki boczne, które są zaczątkiem bocznego pędu. Agrest w pąkach bocznych tworzy również rozety liściowe, które w kulturach *in vitro* nie podejmują wzrostu i zamierają. Dla ośmiu genotypów istotnie lepsze do inicjowania kultur *in vitro* były pąki wierzchołkowe. U pozostałych, pomimo braku istotności, również mniej wypadków zaobserwowano po stronie pąków wierzchołkowych. Spośród badanych genotypów najłatwiej było inicjować kultury odmiany ‘Captivator’, ‘Pax’ i ‘Resika’ oraz klonu 2/2. Z siedmiu klonów selekcyjnych utrzymywanych tylko w kolekcji polowej, kultury pięciu udało się zainicjować jedynie w terminie zimowym. W terminie wiosennym dla dwóch genotypów zakażenia stanowiły od 75 do 97%, a u pozostałych sięgały 100%. W tym terminie kultury udało się zainicjować jedynie z roślin utrzymywanych w karkasie i tunelu.

Tabela 2. Wpływ cytokininy i rodzaju eksplantatu inicjalnego na procent pędów podejmujących wzrost w okresie stabilizacji kultur agrestu (A – 0,25 mg·dm⁻³ BAP; B – 0,5 mg·dm⁻³ kinetyny)

Table 2. Effect of types of cytokinin and initial explant on the percentage of the initial shoot growth during the stabilization of gooseberry cultures (A – 0.25 mg·dm⁻³ BAP, B – 0.5 mg·dm⁻³ kinetin)

Odmiana/klon Cultivar/clone	Cytokinin Cytokinin	Pąk wierzchołkowy Apical buds (%)	Pąk boczny Lateral buds (%)
‘Biały Triumf’	A	80,0 a	50,0 a
	B	66,3 a	25,0 a
‘Captivator’	A	82,0 a	50,0 a
	B	50,0 a	50,0 a
‘Hinsel’	A	85,7 a	80,0 b
	B	50,0 a	0 a
‘Hinnonmaki Rot’	A	100 a	66,7 a
	B	100 a	100 a
‘Invicta’	A	87,0 a	50,0 a
	B	36,7 a	44,0 a
‘Kamieniar	A	100 a	80 a
	B	71,4 a	62,0 a
‘Pax’	A	33,3 a	20,0 a
	B	30,0 a	20,0 a
‘Resika’	A	40,0 a	83,3 a
	B	44,4 a	100 a
Klon 2/2	A	100 a	95,0 a
	B	82,5 a	70,0 a
Klon 2/33	A	75,0 a	65,0 a
	B	40,0 a	40,0 a
Klon 86	A	35,5 a	10,0 a
	B	23,7 a	20,0 a
Klon 101	A	82,0 b	64,0 b
	B	10,0 a	10,0 a
Klon 102	A	74,3 a	68,4 a
	B	59,7 a	52,6 a
Klon 108	A	100 a	80,0 a
	B	90,0 a	78,2 a
Klon 117	A	100 a	82,5 a
	B	100 a	90,0 a

Wartości w obrębie odmian, rodzaju pożywki oraz rodzaju pąków oznaczone tą samą literą nie różnią się przy poziomie istotności $p = 0,05$ wg testu Chi-kwadrat.

Values within cultivar/clone, type of medium and type of buds marked with the same letter do not differ at significance level $p = 0.05$ by Chi-square test.

Dla inicjowania kultur *in vitro* agrestu korzystniejszy był termin zimowy. W okresie stabilizacji kultury (tab. 2), pomimo braku istotnych różnic, u większości genotypów na pożywce z dodatkiem $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP wzrost podejmowało więcej pędów niż na pożywce z dodatkiem $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetyny, zarówno z pąków wierzchołkowych, jak i z pąków bocznych.

Doświadczenie 2

U większości genotypów agrestu najwięcej pędów powstało na pożywce MS i WPM, a najmniej na pożywce QL (tab. 3). Liczba pędów $>1 \text{ cm}$ była najwyższa na pożywce MS. Na pożywce QL zaobserwowano największą liczbę pędów nekrotycznych dla siedmiu genotypów. Najlepszą jakość, tzn. kolor liści, grubość i pokrój, wykazywały pędy rosnące na pożywce MS, a pędy najkrótsze, słabej jakości obserwowano na pożywce QL.

Tabela 3. Wpływ składu mineralnego pożywki na długość i jakość pędów agrestu rozmnażanych *in vitro*

Table 3. Effect of the mineral composition of the medium on length and quality of gooseberry shoots propagated *in vitro*

Odmiana/klon Cultivar/clone	Liczba pędów ogółem Total number of shoots			Liczba pędów Number of shoots > 1 cm			Liczba pędów nekro- tycznych Number of necrotic shoots		
	QL	WPM	MS	QL	WPM	MS	QL	WPM	MS
‘Biały Triumf’	2,1a	2,3a	1,6a	1,8a	1,2a	1,5a	1,8b	0,2a	1,0b
‘Captivator’	1,1a	1,5a	1,6a	0,3a	0,1a	0,6a	0	0	0,1
‘Hinnonmaki Rot’	2,0a	4,4c	3,9b	1,4a	1,6a	2,8b	1,4b	0	0,3a
‘Hinsel’	1,1a	2,8b	3,0bc	1,1ab	0,7a	2,6c	1,1b	0,1a	0,1a
‘Invicta’	1,0a	4,0b	5,2bc	0,4a	2,5b	4,3bc	0	0,8b	0,2a
‘Pax’	1,7a	2,9b	3,0b	1,2a	1,7ab	2,2bc	1,3b	0,4a	0
‘Resika’	1,0a	1,8b	2,2bc	0,5a	0,7ab	1,6c	0	0	0
Klon 2/2	2,6a	2,9a	3,2b	1,2a	0,7a	1,6b	0	0	0
Klon 2/33	1,1a	2,3bc	3,1c	0,9a	0,3a	2,6b	0	0	0,6
Klon 86	1,8a	4,0b	4,3b	0,6a	0,5a	3,6b	1,3	0	0
Klon 101	2,7a	3,8b	5,1b	1,4a	1,2a	4,3b	0,4	0	0
Klon 102	1,6a	2,8b	4,0c	0,7a	0,8a	3,1b	0	0	0
Klon 108	1,8a	4,2b	3,9b	1,0a	1,5b	3,3c	1,7b	1,0a	0
Klon 117	1,5a	2,3b	2,6b	0,4a	0	1,1a	0	0	0

*Kombinacje znajdujące się w tej samej grupie jednorodnej oznaczone tą samą literą nie różnią się przy poziomie istotności $p = 0,05$ wg testu Kruskala-Wallis.

The combinations that are in the same homogeneous group marked with the same letter do not differ at significance level $p = 0.05$ by Kruskal-Wallis test.

Tabela 4. Wpływ cytokininy na mikrorozmnażanie agrestu (A – 0,25 mg·dm⁻³ BAP, B – 0,5 mg·dm⁻³ kinetyny)
 Table 4. Effect of cytokinin type on the shoot multiplication of gooseberry (A – 0.25 mg·dm⁻³ BAP, B – mg·dm⁻³ kinetin)

Odmiana/klon Cultivar/clone	Pożywka Medium	Liczba pędów/eksplantat The number of shoots/explant	% pędów > 1 cm % shoots > 1 cm
‘Biały Triumf’	A	2,2 a	0
	B	1,6 a	14,6
‘Captivator’	A	4,3 a	0
	B	3,8 a	2,2
‘Hinnonmaki Rot’	A	2,8	6,7
	B	0	0
‘Hinsel’	A	4,1 a	17,6 a
	B	3,6 a	29,7 b
‘Invicta’	A	3,8	0
	B	0	0
‘Kamieniar’	A	1,8 a	2,7 a
	B	1,2 a	10,9 a
‘Pax’	A	1,6 b	0
	B	0,8 a	20,0
‘Resika’	A	5,9 b	21,7 a
	B	3,1 a	32,5 a
Klon 2/2	A	5,0 b	3,5 a
	B	3,1 a	24,7 b
Klon 2/33	A	3,8 a	0
	B	2,9 a	13,5
Klon 86	A	2,2 a	0
	B	1,9 a	0
Klon 101	A	3,3	1,8
	B	0	0
Klon 102	A	4,0 b	0
	B	1,8 a	0
Klon 108	A	4,5 b	0
	B	3,2 a	15,0
Klon 117	A	5,5 b	7,6 a
	B	3,7 a	21,5 a

Wartości w obrębie odmian, rodzaju pożywki, oznaczone tą samą literą nie różnią się według testu nieparametrycznego U Manna-Whitneya ($p = 0,05$).

Values within cultivar/clone, medium type, marked with the same letter do not differ acc. to non-parametric U Mann-Whitney test ($p = 0.05$).

Tabela 5. Wpływ rodzaju substancji zestalającej na wysokość i jakość pędów w kulturach *in vitro* agrestu
 Table 5. Influence of type of solidifying agent on the length and quality of the gooseberry microshoots

Odmiana/klon Cultivar/clone	Liczba pędów ogółem Total number of shoots			Liczba pędów > 1 cm Number of shoots > 1 cm			Liczba pędów nekrotycznych Number of necrotic shoots			Liczba pędów szklistych Number of vitrification shoots		
	Agar Bacto	Agar Plant	Gelrite	Agar Bacto	Agar Plant	Gelrite	Agar Bacto	Agar Plant	Gelrite	Agar Bacto	Agar Plant	Gelrite
'Captiveator'	2,7 a*	1,6 a	2,7 a	0,5 a	0	0,4 a	0	0,4 a	0,1 a	0	0	0
'Hinnonmaki Rot'	5,3 ab	6,1 b	4,2 a	4,0 a	4,3 a	3,7 a	0,2 a	0,2 a	0,1 a	0	0	0
'Hinsel'	2,9 a	4,4 ab	5,1 b	1,7 a	3,7 ab	4,0 b	0,3 a	0,6 a	0,2 a	0	0,2 a	0,8 a
'Invicta'	4,5 a	7,8 ab	8,6 b	2,6 a	6,1 b	7,1 b	0	0	0	0,1 a	1,2 a	7,2 a
'Pax'	3,1 a	5,4 b	4,1 ab	2,0 a	4,7 b	3,7 ab	0	0	0,5	0	0,8 a	1,8 b
'Resika'	4,0 a	4,3 a	3,2 a	3,3 ab	3,5 b	2,3 a	0,2 a	0,3 a	0,1 a	0	0	0
Klon 2/2	3,8 ab	4,8 b	2,8 a	2,3 ab	3,6 b	1,1 a	0	0	0,7	0	0	0
Klon 2/33	4,8 a	5,5 ab	7,0 b	4,5 a	5,3 ab	6,3 b	0	0	0	0	0,6 a	5,2 b
Klon 86	2,6 a	3,3 ab	4,0 b	1,9 a	2,4 a	3,6 b	0	0	0	0	0,9 a	0,1 a
Klon 101	3,4 b	1,9 a	2,5 ab	2,3 b	0	0,2 a	0	0,2 a	0,2 a	0	0	0
Klon 102	4,0 a	4,6 a	4,0 a	2,8 a	2,0 a	2,5 a	0	0	0,1	0	0	0
Klon 108	4,9 a	6,4 a	5,0 a	2,9 ab	5,2 b	2,5 a	0	0	0	0	0	0
Klon 117	3,8 a	6,2 b	4,5 ab	2,0 a	4,6 b	0,8 a	0,1	0	0	0	0	0

*Kombinacje znajdujące się w tej samej grupie jednorodnej oznaczone tą samą literą nie różnią się według testu Kruskala-Wallis (p = 0,05).
 The combinations that are in the same homogeneous group marked with the same letter do not differ by Kruskal-Wallis test (p = 0.05).

Doświadczenie 3

Na etapie namnażania pędów zastosowano w pożywce pełne stężenie soli MS. Pędy podjęły namnażanie, jednak u większości genotypów zaobserwowano zjawisko nadmiernego uwodnienia pędów. Zastosowano zmodyfikowaną pożywkę MS, w której zredukowano do ½ zawartość azotu. U większości genotypów nastąpiło zmniejszenie skali tego zjawiska.

Pędy pozostające w obecności 0,25 mg·dm⁻³ BAP dobrze się mnożyły, jednak nie wyrastały i tworzyły zbite rozety, trudne do oddzielenia. Zastosowano dwie pożywki, które różnicowały wpływ BAP oraz 0,5 mg·dm⁻³ kinetyny (tab. 4). W obecności BAP u wszystkich genotypów nastąpiło zwiększenie liczby pędów w porównaniu do kinetyny, pędy były zielone i żywotne. W obecności kinetyny zwiększyła się liczba pędów >1 cm dla dziesięciu genotypów, ale zmniejszył się współczynnik namnażania, a pędy ‘Hinnonmaki Rot’, ‘Invicta’ oraz klonu 101 w obecności kinetyny zamarały. Tylko dla pięciu genotypów liczba pędów na pożywce zestalonej agarem Plant i Gelrite była istotnie wyższa niż z Bacto (tab. 5). Podobna tendencja utrzymała się w liczbie pędów dłuższych. Na pożywkach zestalonych Gelritem oraz agarem Plant, pomimo braku istotności, odnotowano większą liczbę pędów nekrotycznych niż na pożywce z agarem Bacto. Problem, który mógłby nasilać się w kolejnych pasażach, dotyczy pojawiania się zjawiska szklistości pędów. W istotnie większym stopniu szklistość wystąpiła w obecności agaru Plant i Gelrite niż na pożywce z agarem Bacto. Ze względu na te dwie badane cechy najlepszym agarem dla mikrorozmnażania agrestu można uznać agar Bacto.

DYSKUSJA

Niewiele jest doniesień literaturowych na temat mikrorozmnażania agrestu. Wskazują one na szereg trudności i dotyczą pojedynczych genotypów. Wainwright i Flegmann (1985a,b) opisuje mikrorozmnażanie odmian ‘Invicta’ i ‘Careless’, Welander (1985) – odmiany ‘Hinnonmaki Yellow’, a Mishra i in. (2005) – mikrorozmnażanie gatunku *Embllica officinalis* Gaertner, zwanego Indian Gooseberry. Więcej artykułów traktuje o roślinach z rodzaju *Ribes*, do której należy agrest, a w szczególności o porzeczkę czarnej i czerwonej (Orlikowska 1984; Wainwright i Flegmann 1986; Orlikowska i in. 1991; Ma i in. 1992; Arena i Martínez Pastur 1995; Kärkönen i in 1999; Ružić i Lazić 2006; Sedlák i Paprštejn 2012). Brak jest kompleksowej analizy dotyczącej agrestu, omawiającej jednocześnie większą liczbę genotypów. Wykazana w badaniach możliwość inicjacji kultur, zarówno z pąków śpiących, jak też w fazie intensywnego wzrostu, potwierdzają dane literaturowe. Wainwright i Flegmann (1985a) inicjowali kultury z pąków wierzchołkowych w okresie intensywnego wzrostu. Odnotowali silne brązowienie pędów za wyjątkiem pożywki o zredukowanym stężeniu soli. Welander (1985) inicjowała kultury z pąków śpiących w kwietniu, na pożywkach MS i QL, których

wpływ nie różnił się istotnie. Autorka zastosowała dodatek $0,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP oraz $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IBA i odnotowała 40–50% wypadki spowodowane zakażeniami i brakiem podejmowania wzrostu w okresie stabilizacji kultur. Inicjację z różnych części pędów i korzeni stosowali Mishra i in. (2005) w okresie kwiecień–czerwiec. Donoszą oni o szeregu trudności z zakażeniami, brązowieniem i zamieraniem pędów i podają, że najlepsze efekty uzyskali z pąków wierzchołkowych. Badano trzy pożywki najczęściej używane w kulturach *in vitro*: MS, WPM i QL. Pożywka MS zaliczana jest do podłoży bogatych i charakteryzuje się znaczną zawartością azotu azotanowego i amonowego. Pożywka WPM charakteryzuje się obniżoną ogólną zawartością soli, a zwłaszcza związków azotu i chloru oraz wysoką zawartością siarki. W pożywce QL jest silnie zredukowana ilość jonów amonowych, zwiększona zawartość jonów wapnia oraz brak jonów chloru. Welander (1985) podczas proliferacji pędów agrestu używała pożywki MS, natomiast podczas etapu wydłużania pędów MS oraz QL. Sugeruje ona lepszą przydatność pożywki QL do ukorzeniania oraz dłuższego przechowywania kultur. Dane te różnią się od naszych rezultatów, które wykazały, że na pożywce MS liczba pędów ogółem oraz $>1 \text{ cm}$ była istotnie wyższa niż na pożywce WPM oraz QL, na której wystąpiła również największa liczba pędów nekrotycznych. Na tej podstawie wytypowano do dalszych prac nad mikrorozmnażaniem agrestu pożywkę MS. Wainwright i Flegmann (1985a) do inicjacji i namnażania pędów używali pożywki MS o pełnym oraz zredukowanym do 1/10 stężeniu i różnych stężeniach NAA. Badając czynniki wpływające na mnożenie agrestu w kulturach *in vitro* skoncentrowano się na: regulatorach wzrostu (BAP i kinetyna), czynnikach zestalających (agary Plant, Bacto i Gelrite) oraz przeciwdziałaniu objawom witrifikacji. Wszyscy zajmujący się mikrorozmnażaniem rodzaju *Ribes* jako podstawową cytokininę wymieniają BAP, stosowaną w ilości $0,5\text{--}3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zarówno Wainwright i Flegmann (1985a,b), jak i Welander (1985) włączali do pożywki do namnażania pędów agrestu auksynę NAA oraz IBA. Rolę kinetyny badali Mishra i in. (2005) potwierdzając, co wykazano też w naszej pracy, małą przydatność tej cytokininy w procesie namnażania pędów. Agar, zarówno jego rodzaj, jak i stężenie, wyraźnie oddziałuje na intensywność wzrostu i morfogenezy poprzez dostępność składników pożywki (Ghashghaie i in. 1991). Gelrite nie zawiera tak jak agar zanieczyszczeń w postaci substancji fenolowych i siarki (Van Winkle i in. 2003). Autorzy dowodzą, iż Gelrite poprzez absorpcję niektórych pierwiastków ma zdolność zmiany kompozycji jonowej pożywki, co może modyfikować mikrorozmnażanie niektórych genotypów. Pozytywne działanie tej substancji w mikrorozmnażaniu jabłoni wykazał Pasqualetto i in. (1988), a podkładki *Rosa indica* ‘Major’ – Kucharska i in. (2001). Również dla agrestu na pożywce zestalanej Gelrite odnotowano wzrost liczby pędów ogółem oraz pędów dłuższych, ale jednocześnie zwiększyła się liczba pędów szklitych. Nadmierne

uwodnienie pędów *in vitro* przejawia się obniżeniem suchej masy oraz zawartości ligniny i celulozy, zmniejszoną zawartością wapnia, manganu, sodu, chlorofilu, a wysoką – potasu, zredukowaną biosyntezą etylenu oraz zakłóceniem polarnego transportu auksyn (Kevers i in. 2004). Szklistości pędów można przeciwdziałać przez zmniejszenie stężenia cytokinin, zwiększenie stężenia sacharozy i środka zestalającego oraz zmianę stężenia soli mineralnych, pamiętając o interakcji między wszystkimi składnikami pożywki (Ziv 1991). W naszych pracach dobre efekty uzyskano obniżając o ½ zawartość azotu w pożywce MS. Ze względu na liczbę pędów szklistych oraz zwiększenie liczby pędów nekrotycznych na agarze Plant i Gelrite do dalszego mikrozmnażania agrestu za najlepszy uznano agar Bacto.

WNIOSKI

1. Kultury agrestu można inicjować zarówno z pąków śpiących w miesiącach luty–marzec, jak i z pąków intensywnie rosnących w miesiącach maj–czerwiec.
2. Do izolacji bardziej przydatne są pąki wierzchołkowe niż pąki boczne.
3. Procent wypadów podczas inicjowania kultur zależy od genotypu, sposobu odkażania, rodzaju eksplantatu inicjalnego oraz od miejsca wzrostu roślin donorowych.
4. W okresie stabilizacji kultur agrestu najczęściej pędów podejmowało wzrost w obecności $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP w pożywce.
5. Najlepszą jakość wykazywały pędy rosnące na pożywce MS.
6. W obecności pełnego stężenia soli MS oraz $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP zaobserwowano zjawisko nadmiernego uwodnienia pędów agrestu. Zmniejszenie zawartości azotu do ½ znacznie ograniczało występowanie tego zjawiska.
7. W obecność $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP następował wzrost namnażania pędów przy równoczesnym zahamowaniu ich wydłużania.
8. Obecność $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetyny zwiększała liczbę pędów wydłużających się, jednak u kilku genotypów zwiększył się udział pędów nekrotycznych.
9. Za najlepszy agar zestalający pożywki do mikrozmnażania agrestu uznano Bacto.

Literatura

- Arena M.E., Martínez Pastur G.J. 1995. *In vitro* propagation of *Ribes magellanicum* Poiret. *Scientia Horticulturae* 62: 139–144. DOI: 10.1016/0304-4238(94)00747-4.
- Brennan R., Davidson D., Wilshin A., Millan S. 1989. An assessment of the *in-vitro* multiplication rates of fourteen black currant cultivars. *Journal of Horticultural Science* 64: 679–681. DOI: 10.1080/14620316.1989.11516008.
- Czynczyk A. 2012. Szkółkarstwo sadownicze. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, s. 284–288.

- Ghashghaie J., Brenckmann F., Saugier B. 1991. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 82: 73–78. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1991.820110.x.
- Kärkönen A., Simola L.K., Koponen T. 1999. Micropropagation of several Japanese woody plants for horticultural purposes. *Annales Botanici Fennici* 36: 21–31.
- Kevers C., Franck T., Strasser R.J., Dommes J., Gaspar T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181–191. DOI: 10.1023/b:ticu.0000016825.18930.e4.
- Kucharska D., Wiśniewska-Grzeszkiewicz H., Orlikowska T. 2001. Mikrorozmnażanie podkładki *Rosa indica* „Major”. *Biotechnologia* 3(54): 231–236.
- Lloyd G., McCown B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society* 30: 421–427.
- Ma F., Zhu X., Guo Ch., Zhang Q., Song W., Mei L., Hsiao A.I. 1992. Shoot tip culture of *Ribes nigrum in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 67(6): 751–759. DOI: 10.1080/00221589.1992.11516306.
- Mishra M., Chandra R., Tiwari R.K., Pati R., Pathak R.K. 2005. Micropropagation of certain underutilized fruit crops. *Small Fruits Review* 4(4): 7–18. DOI: 10.1300/j301v04n04_03.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Orlikowska T., Lisek A., Serwik M. 1991. Micropropagation of 9 genotypes of black currant. *Fruit Science Reports* 18(2): 51–62.
- Orlikowska T. 1984. Micropropagation of Roodknop cv. black currant. *Fruit Science Reports* 11(1): 5–17.
- Pasqualetto P.-L., Zimmerman R.H., Fordham I. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 31–40. DOI: 10.1007/bf00029573.
- Quoirin M., Lepoivre P. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae* 78: 437–442. DOI: 10.17660/actahortic.1977.78.54.
- Reed B.M., Chang Y. 1997. Medium- and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops. W: Razdan M.K., Cocking E.C. (red.), *Conservation of plant genetic resources in vitro*, vol. 1. Science Publishers, Enfield, USA, s. 67–105.
- Reed B.M., Hummer K.E. 2002. Cryopreservation of *Ribes*. W: Towill L.E., Bajaj Y.P.S. (red.), *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 50: 323–343. DOI: 10.1007/978-3-662-04674-6_23.
- Ružić D., Lazić T. 2006. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 71(4): 149–153.
- Sedlák J., Paprštejn F. 2012. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars. *Horticultural Science* 39: 21–25.

- Van Winkle S.C., Johnson S., Pullman G.S. 2003. The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant Cell Reports* 21: 1175–1182. DOI: 10.1007/s00299-003-0637-2.
- Wainwright H., Flegmann A.W. 1985a. The micropropagation of gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.): I. Establishment *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 60(2): 215–221. DOI: 10.1080/14620316.1985.11515621.
- Wainwright H., Flegmann A.W. 1985b. The micropropagation of gooseberry (*Ribes uva-crispa* L.). II: *In vitro* proliferation and *in vivo* establishment. *Journal of Horticultural Science* 60(4): 485–491. DOI: 10.1080/14620316.1985.11515655.
- Wainwright H., Flegmann A.W. 1986. Studies on the micropropagation of *Ribes* species. *Acta Horticulturae* 183: 315–322. DOI: 10.17660/actahortic.1986.183.45.
- Welander M. 1985. Micropropagation of gooseberry, *Ribes grossularia*. *Scientia Horticulturae* 26(3): 267–272. DOI: 10.1016/0304-4238(85)90114-1.
- Zenkter E. 1984. Wegetatywne rozmnażanie roślin metodą hodowli tkanek. W: Zenkter E. (red.), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*. PWN, Warszawa, s. 111–192.
- Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 27: 64–69.