

Regeneracja pelargonii w warunkach *in vitro*

AGNIESZKA WOJTANIA, ELEONORA GABRYSZEWSKA

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Waryńskiego 14, 96-100 Skierniewice
Research Institute of Pomology and Floriculture, Waryńskiego 14, 96-100 Skierniewice,
Poland

Regeneration of *Pelargonium in vitro*

(Otrzymano: 19.07.2002)

Summary

Pelargonium sp. has been a subject of numerous studies to determine the effectiveness of *in vitro* techniques to produce a large number of pathogen-free plants. Regeneration of pelargonium plants from the different initial explants as well via organogenesis as via somatic embryogenesis has been obtained. The most effective adventitious shoot formation has been achieved from shoot tips and axillary buds using cytokinin or cytokinin/auxin combinations. Leaf explants, whose general have lower organogenic potency, regenerate better in the presence of thidiazuron. This growth regulator stimulate the somatic embryos production from hypocotyl and cotyledone explants too. The main problem in tissue culture propagation of *Pelargonium* has been the high tendency to formation of vigorously growing callus with low organogenic potency and rapid senescence of cultures. Moreover, the significant differences in requirements to the medium composition (minerals, organic compounds and growth regulators) between *Pelargonium* cultivars has been observed. This makes difficult to develop an universal method of *Pelargonium* micropropagation.

Key words: organogenesis, somatic embryogenesis, *Pelargonium*, *in vitro*

WSTĘP

Pelargonie należą do nielicznych roślin, które od wielu lat cieszą się niezmienną popularnością, znajdując zastosowanie jako rośliny doniczkowe, rabatowe, balkonowe, a ostatnio również jako rośliny okrywowe. Na sukces ten składają się prace hodowców, którzy oferują nowe odmiany o udoskonalonych cechach, jak również nowe technologie uprawy i rozmnażania. Szczególną uwagę zwraca się na zdrowotność roślin, która jest podstawowym czynnikiem decydującym o opłacalności produkcji. W związku z występowaniem na pelargoniiach wielu chorób powodowanych przez bakterie (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, *Corynebacterium fascians*)

i wirusy (PLCV, PRSV, PFBV, PLPV) zaleca się aby rośliny przeznaczone na mateczniki pochodziły z rozmnażania *in vitro* (Kamińska, 1997; Orlikowski, 1997). Badania nad rozmnażaniem pelargonii tą metodą rozpoczęto już w latach 60-tych i dotyczyły głównie oceny morfologii tkanki kalusowej tworzącej się na eksplantatach inicjalnych (Pillai, Hildebrandt, 1969). Dalsze badania pozwoliły na uzyskanie regeneracji pędów na drodze organogenezy z różnych eksplantatów inicjalnych. W ostatnim dziesięcioleciu otrzymano efektywną inicjację i dalszy rozwój zarodków somatycznych. Sukcesem zakończyły się również próby transformacji genetycznej prowadzone na *Pelargonium x hortorum*.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu badań nad rozmnażaniem w warunkach *in vitro* 3 gatunków pelargonii: *P. x hortorum* (*P. zonale*), *P. x hederacifolium* (*P. peltatum*), *P. x domesticum* (*P. grandiflorum*) w oparciu o dane literaturowe i prace prowadzone w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach.

Stosowane skróty: BA – 6-benzylaminopuryna, GA₃ – kwas giberelinowy, IAA – kwas indolilo-3-octowy, IBA – kwas indolilo-3-masłowy, NAA – kwas naftylo-1-octowy, 2,4-D- kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy, 2iP- 6-(γ , γ -dwumetyloallilo)aminopuryna, *m*-topolina – *meta*-topolina, 3-hydroksy-benzyladenina, kinetyna – 6-furfuryloaminopuryna, TDZ – tidiazuron, TIBA- 2,3,5 – kwas trójjodobenzoesowy

Regeneracja pędów na drodze organogenezy

1. Czynniki stymulujące indukcję organogenezy

Istotnym czynnikiem warunkującym zainicjowanie wzrostu kultur jest właściwy dobór eksplantatów pierwotnych i stworzenie im optymalnych warunków rozwoju (tab.1). U pelargonii inicjację regeneracji obserwowano na różnych eksplantatach. Najczęściej stosowano pąki wierzchołkowe (Horn, 1988; Reuther, 1975; Reuther, 1988; Theiler, 1977) i pąki kątowe (Cassells, Carney, 1987; Reuther, 1988), ogonki i blaszki liściowe (Cassells, 1979; Stefaniak, Zenktele, 1982) oraz fragmenty korzeni (Chang i in., 1996; Doyle i in., 2000). Regeneracja pędów następowała zwykle drogą pośrednią z udziałem tkanki kalusowej. W zależności od genotypu formowanie pędów przybyszowych obserwowano bezpośrednio na tkance kalusowej powstającej z eksplantatu pierwotnego lub było inicjowane po przeniesieniu kalusa na świeżą pożywkę. Spośród eksplantatów pierwotnych najwyższą zdolnością regeneracyjną charakteryzowały się pąki wierzchołkowe, które równocześnie stanowią najlepsze źródło eksplantatów w przypadku uwalniania roślin od chorób bakteryjnych i wirusowych. Corneanu i Corneanu (1991) otrzymali inicjację wzrostu u 100% pąków wierzchołkowych *P. grandiflorum* z wydajnością 15–17 pędów na 1 eksplantat, natomiast w przypadku pąków kątowych zdolność regeneracyjną posiadało 67% eksplantatów, z których powstawały średnio 3–4 pędy na 1 eksplantat. Mimo takich samych warunków wzrostu pędy *P. zonale* regenerowały znacznie słabiej, dając 3–5 pędów na 1 pąk wierzchołkowy i 1 pęd na 1 pąk kątowy (Corneanu, Corneanu, 1991). Horn (1988) badając zdolności regeneracyjne *P. grandiflorum* uzyskał inicjację regeneracji u 85% pąków wierzchołkowych, z których

następnie tworzyły się 3-4 pędy na 1 eksplantat. Według Corneanu i Corneanu (1991) istotny wpływ na efektywność regeneracji, oprócz warunków wzrostu, ma termin pobierania eksplantatów. Spośród 3 badanych terminów (grudzień, marzec, kwiecień) najwyższą zdolnością regeneracyjną charakteryzowały się pąki pobrane w kwietniu.

W ostatnim czasie Doyle i in. (2000) uzyskali intensywną regenerację pędów *P. x hortorum* z fragmentów korzeni pochodzących z siewek rosnących w warunkach *in vitro*. Według autorów dużą zaletą tej metody jest łatwa dostępność i obfitość pozyskiwanych eksplantatów pierwotnych, jak również wysoka stabilność genetyczna zregenerowanych roślin.

Pomyślny wzrost eksplantatów pierwotnych pelargonii był ściśle związany z zaspokojeniem ich wymagań pokarmowych. Pod względem składników mineralnych większość badanych genotypów preferowało pożywkę wg Murashige i Skooga (1962) lub Linsmaiera i Skooga (1965) oraz ich modyfikacje (tab. 1). Wielu autorów zwracało również uwagę na istotny wpływ składników organicznych np. hydrolizatu kazeiny (Horn, 1988), mleka kokosowego (Abo El - Nil, Hildebrandt, 1971) i aminokwasów (Theiler, 1977).

Kolejnym bardzo istotnym czynnikiem warunkującym efektywne zainicjowanie wzrostu i dalszego rozwoju kultur pelargonii był właściwy dobór regulatorów wzrostu, zwłaszcza z grupy cytokinin i auksyn. Prace przedstawione w literaturze wykazały duże różnice w reakcji poszczególnych genotypów na stosowane regulatory wzrostu (tab. 1), co stanowi poważne utrudnienie w opracowaniu uniwersalnej metody rozmnażania pelargonii w warunkach *in vitro*. Spośród cytokinin, do zainicjowania wzrostu pąków wierzchołkowych i kątowych stosowano kinetynę (Abo El-Nil, Hildebrandt, 1971; Reuther, 1975; Hammerschlag, 1978; Stefaniak, Zenkteler, 1982; Brown, Charlwood, 1986; Horn, 1988; Corneanu, Corneanu, 1991), BAP (Theiler, 1977; Reuther, 1983; Cassells, Carney, 1987), 2iP (Reuther, 1983) lub zeatynę (Cassells, 1979), które podawano oddzielnie lub z auksyną, głównie z NAA (Abo El- Nil, Hildebrandt, 1971; Hammerschlag, 1978; Cassells, 1979) i z IAA (Horn, 1988; Reuther, 1988). Wojtania i Gabryszewska (2001) uzyskały natomiast dobre wyniki po zastosowaniu *m*-topoliny. W porównaniu z BAP, cytokinina ta miała korzystny wpływ na efektywność powstawania pędów kątowych *Pelargonium x hederacifolium* 'Bonete' i *P. x hortorum* 'Bargpalais' i w znacznym stopniu hamowała tworzenie się tkanki kalusowej. W przypadku eksplantatów liściowych, które z reguły posiadały niższy potencjał regeneracyjny w porównaniu z pąkami wierzchołkowymi i kątowymi, wzrost efektywności regeneracji uzyskano po zastosowaniu tidiazuronu (Robichon i in., 1997; Wojtania i in., 1997). Wysoka aktywność tego regulatora była obserwowana głównie w stosunku do pelargonii bluszczolistnych. Badania prowadzone w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa wykazały, iż TDZ znacznie intensywniej niż BAP stymulował zainicjowanie regeneracji zarówno na blaszkach, jak i ogonkach liściowych *Pelargonium x hederacifolium* 'Bonete' (Wojtania i in., 1997), co również obserwowano dla innych gatunków – *Prunus domestica* (Lis, 1994) i *P. serotina* (Hammat, Grant, 1998), *Vaccinium pahalae* (Shibli, Smith, 1996), *Gardenia jasminoides* (Al-Juboory i in., 1998). W przypadku *Pelargonium x hortorum*

Tabela 1

Wpływ genotypu, eksplantatu inicjalnego i warunków wzrostu na zainicjowanie kultur pelargonii *in vitro* na drodze organogenezy lub embriogenezy somatycznej – przegląd literatury

Table 1

The effect of genotype, initial explant and the growth conditions on the initiation of *Pelargonium* cultures through organogenesis or somatic embryogenesis *in vitro* – review

Gatunek Species	Rodzaj eksplantatu Explant	Rodzaj regeneracji Regeneration response	Pożywka podstawowa i regulatory wzrostu [mg · l ⁻¹] Basic medium and growth regulators [mg · l ⁻¹]	Autorzy Authors
<i>P. x hortorum</i>	pylnik anther	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	W*: 2,5 kinetyna + 2- 2,5 NAA MS*: 2,5 kinetyna + 0,5 NAA	Abo El-Nil i Hildebrandt (1971)
<i>P. zonale</i> <i>P. peltatum</i> <i>P. zonale</i> x <i>P. peltatum</i>	pak wierzchołkowy shoot-tip	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	LS***: 1 kinetyna + 1 IAA	Reuther (1975)
<i>P. zonale</i> <i>P. peltatum</i>	pak wierzchołkowy shoot-tip	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	MS: 0,2 BAP + 1 IBA	Theiler (1977)
<i>P. x hortorum</i>	pak wierzchołkowy shoot-tip	kalus, korzenie callus, roots	Mod. LS: 5 kinetyna + 1 NAA	Hammerschlag (1978)
<i>P. x hortorum</i> <i>P. x domesticum</i>	ogonek liściowy petiol	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	MS: 2 zeatyna + 1 NAA MS: 2 zeatyna + 0,01 TIBA	Cassells (1979)
<i>P. x hortorum</i> <i>P. peltatum</i>	ogonek liściowy petiol	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	MS: 10 kinetyna + 0,1 NAA MS: 1 BAP + 1 IAA	Stefaniak i Zenkeler (1982)
<i>P. australe</i> <i>P. citriodorum</i> <i>P. crispum</i> <i>P. graveolens</i> <i>P. filifolium</i> <i>P. quercifolium</i> <i>P. tomentosum</i>	fragment pędu shoot section	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	MS: 0,2 kinetyna + 1 2,4 -D MS: 0,5 BAP + 0,05 NAA	Brown i Charlwood (1986)
<i>P. zonale</i> <i>P. peltatum</i>	pak wierzchołkowy shoot-tip	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	LS: 0,1-2 BAP lub 2iP + 0,25-1 IAA	Reuther (1983)
<i>P. x domesticum</i>	ogonek liściowy, fragment pędu petiol, shoot section	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	MS: 1 BAP + 0,1 2,4-D MS: 1 BAP	Cassells i Carney (1987)

<i>P. peltatum</i>	pąk wierzchołkowy i kątowy shoot-tip and axillary bud	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	½ LS; 0,1 BAP + 0,1 2iP + 0,5 IAA	Reuther (1988)
<i>P. grandiflorum</i>	pąk wierzchołkowy i kątowy, blaszka liściowa shoot-tip, axillary bud, leaf blade	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	Mod. MS; 2 kinetyna + 1 IAA + 1 GA ₃ Mod. MS; 4 kinetyna + 2 IAA	Horn (1988)
<i>P. grandiflorum</i> <i>P. zonale</i>	pąk wierzchołkowy i kątowy	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	MS; bez regulatorów wzrostu MS; 10 kinetyna	Corneanu i Corneanu (1991)
<i>P. x hortorum</i> <i>P. x domesticum</i>	ogonek liściowy, hypokotyl petiole, hypocotyl	zarodki somatyczne somatic embryos	GCM****; 0,5 BAP + 2,2 2,4-D MS; 0,5 BAP + 0,2 - 2,0 IAA	Marsolais i in. (1991)
<i>P. x hortorum</i>	hypokotyl hypocotyl	zarodki somatyczne somatic embryos	MS; 0,09 - 0,2 TDZ	Visser i in. (1992)
<i>P. x hortorum</i>	hypokotyl hypocotyl	zarodki somatyczne somatic embryos	MS; 0,1 - 0,3 TDZ	Gill i in. (1992)
<i>P. x hortorum</i>	hypokotyl, liść hypocotyl cotyledon	zarodki somatyczne somatic embryos	MS; 0,2 TDZ	Murthy i in. (1996)
<i>P. x hortorum</i>	hypokotyl hypocotyl	zarodki somatyczne somatic embryos	MS; 2,2 TDZ + 1,8 ASA	Hutchinson i Saxena (1996)
<i>P. x hederacifolium</i>	blaszka i ogonek liściowy leaf blade and petiole	kalus callus kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	Mod. MS; 2-4 TDZ Mod. MS; 0,1 2iP + 1 GA ₃	Wojtania i in. (1997)
<i>P. peltatum</i>	blaszka i ogonek liściowy leaf blade and petiole	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	½ MS; 0,5 - 1 TDZ	Robichon i in. (1997)
<i>P. x hortorum</i>	korzeń root	kalus, pędy przybyszowe callus, adventitious shoots	2 MS; 0,02-0,04 TIBA + 0,4 - 0,6 TDZ	Doyle i in. (2000)

Stosowane skróty:

Abbreviations used: *W – White (1961), **MS – Murashige i Skoog (1962), ***LS – Linsmaier i Skoog (1965), ****GCM – Marsolais (1992)

intensywne tworzenie pędów przybyszowych pod wpływem tidiazuronu, podanego łącznie z TIBA, następowało na eksplantatach korzeniowych (Doyle i in., 2000).

Oprócz składników pożywki, innymi czynnikami determinującymi wzrost i rozwój roślin w kulturach *in vitro* są: światło i temperatura. Jak wynika z danych literaturowych, regeneracja pędów pelargonii następowała zwykle za pośrednictwem tkanki kalusowej i często jej jakość miała decydujący wpływ na przebieg organogenezy. Jednym z czynników modyfikujących strukturę i barwę tkanki kalusowej jest rodzaj i natężenie światła. Inicjacja wzrostu kalusa na eksplantatach pierwotnych następowała zarówno na świetle jak i w ciemności. Jednakże brak światła obniżał

liczbę regenerujących eksplantatów (Stefaniak, Zenkteler, 1982), jak również stymulował powstawanie kalusa o niskich zdolnościach do organogenezy, charakteryzującego się kremową barwą i luźną strukturą (Cassells, 1979). Podobny typ kalusa obserwowała Wojtania i in. (1998) w obecności światła czerwonego. Kultury kalusa rosły najintensywniej w świetle białym i niebieskim (Ward, Vance, 1968; Hammerschlag, 1978). W tych warunkach stwierdzono również tworzenie się organogennej tkanki kalusowej o zwartej strukturze, z licznymi zawiązkami pędów (Wojtania i in., 1998). Podczas inicjacji wzrostu kultur pelargonii stosowano 16-godzinne oświetlenie o natężeniach napromieniowania kwantowego: $12\text{--}60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Hammerschlag, 1978), $138 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Cassells, 1979), $13,2\text{--}18 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Horn, 1988), $34 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Robichon i in., 1997). W zależności od genotypu poziom optymalnej temperatury dla pelargonii rosnącej w warunkach *in vitro* wahał się w granicach $20\text{--}27^\circ\text{C}$.

Niezależnie jednak od rodzaju eksplantatów i warunków ich wzrostu, dla niektórych genotypów nie obserwowano w ogóle regeneracji lub tylko jej zainicjowanie, a po krótkim czasie obumieranie tkanek. Theiler (1977), prowadząc badania na wielu gatunkach i odmianach pelargonii, podzielił je na łatwo, średnio i opornie regenerujące. Do ostatniej grupy zalicza się głównie pelargonie bluszczolistne, które mają tendencję do nadmiernego tworzenia tkanki kalusowej o luźnej strukturze, bez zdolności do organogenezy (Theiler, 1977; Reuther, 1983; Wojtania i in., 1998). Eksplantaty inicjalne genotypów wykazujących aktywność wzrostową w warunkach *in vitro* pozostawały zwykle na pożywce wyjściowej przez okres 4–6 tygodni. Po tym czasie, kalus z zainicjowanymi na swej powierzchni pąkami i drobnymi pędami przybyszowymi był przenoszony na świeżą pożywkę stymulującą tworzenie i rozwój pędów przybyszowych.

2. Mnożenie i wzrost pędów

Pomimo wielu pozytywnych wyników dotyczących regeneracji pelargonii *in vitro*, w literaturze niewiele jest informacji na temat późniejszego namnażania pędów. Większość autorów ograniczało się do określenia liczby pędów tworzących się na eksplantatach inicjalnych. Jest to przede wszystkim związane z szybkim starzeniem się kultur. Reuther (1988) obserwował, iż pędy przybyszowe powstające z tkanki kalusowej zainicjowanej z merystemów wierzchołkowych mnożyły się intensywnie jedynie po pierwszym przeniesieniu na świeżą pożywkę. Po następnym pasażu następował gwałtowny spadek ilości tworzących się pędów z równoczesną tendencją do powstawania kalusa, który w krótkim czasie tracił zdolność do organogenezy. W celu zachowania wysokiego wigoru roślin, a także posiadania ciągłego źródła roślin dla elitarnych mateczników prowadzono rozmnażanie pelargonii według określonego cyklu (Cassels, Carney, 1987; Reuther, 1988). Zainicjowane na eksplantatach inicjalnych pędy *P. grandiflorum* były namnażane na zmodyfikowanej pożywce LS zawierającej BAP ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), 2iP ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) i NAA ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Po ukorzenieniu, w fazie 6–8 międzywęźli pędy – donory były defoliowane i po podziale na fragmenty pędu z węzłem stanowiły źródło eksplantatów do następnego cyklu. Utrzymanie dobrej kondycji kultur pędów *P. zonale* i *P. peltatum* przez okres 3–4 miesięcy było możliwe przez przetrzymywanie ich w warunkach niskiej intensywności światła

(600 – 1000 luksów), 12-godzinny fotoperiodzie i niskiej temperaturze (6°C) (Reuther, 1983). W porównaniu z pożywką inicjalną, w etapie rozwoju pędów pelargonii nie stosowano kinetyny, którą zastępowano zwykle BAP (Stefaniak, Zenkterler, 1982; Brown, Charlwood, 1986), obniżano stężenie auksyn (Abo El-Nil, 1971) lub całkowicie eliminowano je z pożywki (Cassells, Carney, 1987) ze względu na obserwowany w ich obecności nadmierny wzrost tkanki kalusowej. Cassells (1979) uzyskał natomiast wzrost liczby rozwijających się pędów przybyszowych *P. x hortorum* i *P. x domesticum* z pąków zainicjowanych na tkance kalusowej po zastosowaniu inhibitora polarnego transportu auksyn – TIBA.

Podobnie jak w przypadku zdolności regeneracyjnych, tak i procesy starzenia się kultur pelargonii w dużym stopniu zależą od genotypu. Kalus pelargonii o pachnących liściach pozostawał aktywny po powtarzających się pasażach na pożywcę zawierającej BAP (5 mg · l⁻¹) i NAA (1 mg · l⁻¹) przez ponad 3 lata. Przeniesiony na pożywkę „różnicującą” zawierającą 0,5 mg · l⁻¹ BAP i 0,05 mg · l⁻¹ NAA wykazywał tendencję do tworzenia pędów (Brown, Charlwood, 1986). Badania prowadzone w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa pozwoliły na uzyskanie namnażania się pędów *P. x hortorum* i *P. x hederæfolium* po 2 latach wzrostu w warunkach *in vitro*. Dla obydwu genotypów powstawanie pędów przybyszowych i rozwój pąków kątowych z pojedynczych pędów najlepiej przebiegało na pożywcę uzupełnionej *m*-topoliną w stężeniu 1,0 – 1,5 mg · l⁻¹. Cytokina ta ponadto korzystnie wpływała na jakość pędów (intensywnie zielone, prawidłowo wykształcone, bez deformacji) w porównaniu z tradycyjnie stosowaną BAP. W badaniach tych zaobserwowano również, iż dodatkowo stymulujący wpływ na jakość pędów miało dodanie do pożywki z *m*-topoliną mieszaniny aminokwasów: glicyny, glutaminy i cysteiny – każdy w stężeniu 10 mg · l⁻¹. Pędy *P. x hederæfolium* i *P. x hortorum* rosnące w ich obecności charakteryzowały się większymi blaszkami liściowymi, bardziej wyrównanym wzrostem pędów w zespole namnożonych pędów oraz dłuższą trwałością pędów (Wojtania, Gabryszevska, 2001).

Jednym z dodatkowych czynników, pozwalających opóźnić procesy starzenia się pędów pelargonii jest rygorystyczne przestrzeganie terminów pasażowania kultur. Niezależnie od odmiany, większość autorów jako optymalny termin pasażowania uznało okres 3–4 tygodni. Przedłużający się pasaż niezależnie od pozostałych warunków wzrostu wpływał niekorzystnie na jakość pędów i w konsekwencji prowadził do ich zamierania.

3. Ukorzenianie i aklimatyzacja pędów

W przeciwieństwie do poprzednich etapów rozmnażania pelargonii *in vitro*, w czasie ukorzeniania pędów nie obserwowano większych problemów. Korzenie powstawały zarówno w obecności auksyny, głównie IAA w stężeniu 0,1–1,8 mg · l⁻¹ (Reuther, 1975, 1983; Horn, 1988; Chang i in., 1996), jak i na pożywcę bez regulatorów wzrostu (Robichon i in., 1997; Doyle i in., 2000). Według Reuthera (1983), podstawowym warunkiem efektywnej rizogenezy jest odpowiednia długość pędów. Potwierdziły to badania Corneanu i Corneanu (1991). Ukorzeniając pędy różnej długości (<5, 5–10, >10 mm) *P. grandiflorum* i *P. zonale*, autorzy ci zaobserwowali, że najlepiej ukorzeniały się pędy najdłuższe (92 – 96%). W przypad-

ku tworzenia przez dany genotyp drobnych pędów, wskazane jest wprowadzenie dodatkowego pasażu w celu przygotowania pędów do rizogenezy. Dla *P. x hederaefolium* wzrost wydłużeniowy pędów osiągnięto w obecności 2iP ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) i GA_3 ($1,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Stymulujący wpływ na powstawanie korzeni u *P. x hederaefolium* miało również współdziałanie auksyn (IAA + IBA) ze światłem czerwonym, dając 100% ukorzenionych pędów. Jednak ze względu na równoczesne obniżanie jakości pędów, bardziej korzystnym było ukorzenianie pędów w świetle białym (Wojtania i in., 1998).

Ukorzenione pędy pelargonii z reguły bardzo dobrze aklimatyzowały się do warunków szklarniowych i z łatwością podejmowały dalszy wzrost. Wśród roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* wielu autorów obserwowało jednak występowanie różnorodnych zmienności określanych jako zmienność somaklonalna (Borkowska, 1995). Do najczęściej obserwowanych u pelargonii należały zmiany epigenetyczne obejmujące wybarwienie i kształt liści oraz kwiatów jak również siłę wzrostu roślin (Cassells, Carney, 1987; Reuther, 1988). Część zmian była krótkotrwała, występująca jedynie w warunkach *in vitro* i zanikająca po przeniesieniu do szklarni. Do najdłużej utrzymujących się zmienności u pelargonii należała karłowatość roślin, zwłaszcza gdy równocześnie towarzyszyły jej deformacje liści (Reuther, 1988). Częstotliwość wystąpienia zmienności somaklonalnej była ściśle uzależniona od genotypu, rodzaju eksplantatu inicjalnego oraz typu regeneracji.

Regeneracja na drodze embriogenezy somatycznej

Rozwój metod rozmnażania pelargonii poprzez zarodki somatyczne nastąpił w ostatnim dziesięcioleciu i był przede wszystkim zasługą zespołu badaczy kanadyjskich. Jako eksplantaty inicjalne stosowali oni głównie hypokotyle i liścienie sievek, uzyskane z nasion rozwijających się na pożywce wg MS (Murphy, 1997) i umieszczanych w ciemności w temperaturze 25°C . Z reguły tworzenie zarodków somatycznych następowało za pośrednictwem tkanki kalusowej i wymagało obecności w pożywce indukcyjnej zarówno cytokininy jak i auksyny. Początkowe badania wykazały, iż najbardziej korzystny wpływ na formowanie zarodków somatycznych miała BAP ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) w połączeniu z IAA ($0,2 - 2,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) lub z 2,4-D ($2,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), (tab. I). W obecności samej BAP następowało tylko zgrubienie eksplantatów i okazyjne tworzenie zarodków, natomiast pod wpływem samej auksyny obserwowano tworzenie korzeni (Visser i in., 1992). Według Marsolais i in. (1991) bardzo istotnym w układzie cytokinina/auksyna było stężenie auksyny; różne w zależności od genotypu. Przy zbyt wysokim stężeniu auksyny zainicjowane zarodki kończyły swój rozwój na stadium globularnym, natomiast przy zbyt niskim następowało tworzenie struktur pośrednich pomiędzy zarodkami somatycznymi a zawiązkami pędów. Dalsze doświadczenia wykazały, iż zarodki somatyczne formowały się szybciej i w większych ilościach pod wpływem tidiazuronu, który w przypadku pelargonii zastępował działanie układu cytokinino-auksynowego. Przypuszcza się, iż TDZ jest odpowiedzialny za biosyntezę i metabolizm auksyn, wpływa na wzajemny stosunek endogennych cytokinin i auksyn, który sprzyja powstawaniu zarodków somatycznych (Visser i in., 1992; Gill i in., 1993). Wzmoczoną regenerację pod wpływem tidiazuronu

tłumaczy się także jako efekt przystosowania roślin do warunków stresu. W komórkach roślin traktowanych TDZ stwierdzono bowiem intensywną akumulację jonów mineralnych i innych metabolitów „stresu” – proliny i kwasu abscysynowego (Murch i in., 1997). Stymulujący wpływ TDZ na indukcji zarodków somatycznych stwierdzono również u innych gatunków – *Arachis hypogea* (Murthy i in., 1995), *Rhododendron catawbiense* (Vejsadová i in., 1999), *Tulipa* (Podwyszyńska i in., 1997). W przeciwieństwie do innych cytokinin tidiazuron wykazuje wysoką aktywność w szerokim zakresie stężeń (Murch i in., 1997). W przypadku pelargonii, optymalne stężenie TDZ wahało się w zależności od odmiany od 0,1 do 2,2 mg · l⁻¹. Z reguły stężenie wyższe niż 2,2 mg · l⁻¹ było toksyczne i powodowało zamieranie eksplantatów. Istotnym był również właściwy okres dawkowania TDZ. W zależności od genotypu i stężenia TDZ obserwowano, iż optymalnym jest okres od 2 do 8 dni. Przy ciągłym dawkowaniu TDZ przez 4 tygodnie następowało całkowite zahamowanie tworzenia zarodków (Visser i in., 1992).

Autorzy prac dotyczących embriogenezy somatycznej pelargonii obserwowali ponadto, iż eksplantaty inicjalne wykazujące zdolność do tworzenia zarodków (ogonki liściowe, hypokotyle i liścienie siewek) w obecności tidiazuronu charakteryzowały się zróżnicowanym potencjałem regeneracyjnym. Najwięcej zarodków somatycznych tworzyło się na liścieniach i hypokotylach pobranych z 1-tygodniowych siewek. Gill i in. (1992) obserwowali, iż eksplantaty pochodzące z siewek 2-, 3-, 4-, 5-, i 6- tygodniowych, wraz z „wiekiem” regenerowały słabiej. O zdolnościach regeneracyjnych powyższych eksplantatów w dużym stopniu decydował ponadto sposób ich przygotowania. Według Murthy i in. (1996) zarodki tworzyły się szybciej i bardziej efektywnie na ogonkach liścieniowych niż na nienaruszonych liścieniach. Gill i in. (1992) uzyskali ponad 8-krotny wzrost wydajności embriogenezy somatycznej u *Pelargonium x hortorum*, gdy stosowali zamiast fragmentów hypokotyli cienkowarstwowe eksplantaty hypokotylowe, składające się z komórek epidermy i kilku warstw komórek subepidermalnych. Na każdym eksplantacie cienkowarstwowym tworzyło się przeciętnie od 40 do 60 zarodków, dając w sumie 400–600 zarodków/1 hypokotyl, gdy na całych hypokotylach o podobnej wielkości i wieku obserwowano powstawanie ok. 50 zarodków. Tak znaczne różnice wynikały z wielkości obszarów embriogennych, które w przypadku fragmentów hypokotyli były ograniczone do górnej powierzchni cięcia, a u eksplantatów cienkowarstwowch obejmowały całą ich powierzchnię. Zastosowanie cienkowarstwowch eksplantatów hypokotylowych pozwoliło ponadto na ograniczenie tworzenia tkanki kalusowej na początku stadium inicjalnego i skróciło do 1 tygodnia okres potrzebny do zainicjowania formowania zarodków.

Do innych czynników odpowiedzialnych za przebieg embriogenezy u pelargonii należy zaliczyć: mineralny i organiczny skład pożywki oraz rodzaj i stężenie cukru. Większość autorów (tab. 1) najlepszą inicjację i późniejszy rozwój zarodków somatycznych obserwoowało na pożywce według Murashige i Skooga (1962). Marsolaïs i in. (1991) natomiast jako najlepszą uznali opracowaną przez nich specjalnie dla pelargonii pożywkę, oznaczoną skrótem GCM. W stosunku do pożywki MS nie zawierała ona jonów amonowych, miała podwyższone stężenie jonów azotanowych i inne modyfikacje zawartości makro- i mikroelementów. W obecności tych

samych regulatorów wzrostu liczba zarodków tworzących się na fragmentach ogonków liściowych rosnących na pożywce GCM, MS i B5 wynosiła kolejno: 4,3; 1,6 i 1,0 na jeden eksplantat. Kolejnym czynnikiem wpływającym na efektywność embriogenezy somatycznej pelargonii było stężenie i rodzaj cukru. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż spośród testowanych źródeł węgla (sacharoza, glukoza, maltoza, ekstrakt maltozy) częstotliwość powstawania zarodków somatycznych była porównywalna na pożywce z sacharozą i glukozą w stężeniu 3%. Wyższe stężenia cukru działały z reguły hamująco na wzrost zarodków, a w przypadku eksplantatów cienkowarstwowych prowadziły do plazmolizy komórek (Marsolaïs i in., 1991; Gill i in., 1992).

Na szczególną uwagę zasługują także aminokwasy. Wcześniejsze badania prowadzone m.in. na kulturach marchwi, lucerny i kukurydzy wykazały, iż dodanie ich do pożywki indukcyjnej korzystnie wpływało na liczbę tworzących się zarodków, ich jakość i późniejsze przekształcanie w rośliny (Wetherell, Dougall, 1976; Stuart, Strickland, 1984; Armstrong, Green, 1985). Mechanizm działania aminokwasów nie jest znany. Sugeruje się, iż oprócz dostarczania kulturom azotu, wpływają na przemiany puryn i modyfikują wrażliwość komórek na auksynę (Grimes, Hodges, 1990; Stuart, Strickland, 1984). Preferencje co do typu i stężenia aminokwasu są cechą danego genotypu. U pelargonii wzrost liczby zarodków obserwowano, gdy do pożywki indukcyjnej zawierającej tidiazuron, dodano glutaminę w stężeniu 10–30 mM (Gill i in., 1992) lub prolinę w stężeniu 10 mM (Marsolaïs i in., 1991).

Interesujące są wyniki ostatnich badań dotyczące współdziałania TDZ z bakterią z rodzaju *Bacillus*. Murthy i in. (1999) uzyskali bowiem wzrost intensywności embriogenezy somatycznej *P. x hortorum* na hypokotylach, gdy eksplantaty inicjalne przed wyłożeniem na pożywkę z tidiazurem były poddawane kokultywacji z bakterią.

Z reguły rozwój zarodków pelargonii następował przez typowe dla embriogenezy stadia rozwojowe: globularne, sercowate, torpedy i wczesnych liścieni. Badania histologiczne wykonane przez Gill i in. (1992) po 4 tygodniach wzrostu zarodków indukowanych uprzednio na pożywce z TDZ wykazały, iż były one w różnych stadiach rozwojowych. Hutchinson i Saxena (1996) uzyskali bardziej zsynchronizowany rozwój zarodków pod wpływem współdziałania TDZ ($2,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) z ASA (kwas acetylosalicylowy) zastosowanym w stężeniu $1,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Po okresie indukcji zarodki były oddzielane od eksplantatów inicjalnych i przenoszone pojedynczo lub w zespołach na pożywkę podstawową bez regulatorów wzrostu w celu rozwoju w rośliny. Najbardziej efektywne (70–80%) przekształcanie się zarodków w prawidłowo wykształcone rośliny uzyskano dla *P. x hortorum* Bailey odmiany 'Scarlet Orbit Improved' i odmiany 'Sprinter Scarlet' (Gill i in., 1992) oraz dla *P. x hortorum* Bailey odmiany 'Ringo Rose' (Murthy i in., 1996).

Duże zainteresowanie embriogenezą somatyczną wynika nie tylko z faktu efektywnego rozmnożenia roślin, ale również z możliwości wykorzystania zarodków do produkcji sztucznych nasion. Jak do tej pory nie znalazło to jednak praktycznego zastosowania w rozmnażaniu pelargonii z powodu niedostatecznej wiedzy na temat tworzenia zarodków na pożywkach płynnych (Mithila i in., 2001).

Podsumowanie

Przedstawione powyżej dane wskazują na znaczny postęp w pracach nad rozmnażaniem pelargonii *in vitro*. Jednakże ze względu na specyficzne wymagania poszczególnych genotypów co do składu mineralnego pożywek oraz rodzaju i stężenia regulatorów wzrostu wszelkie uogólnienia i określenie jednej, optymalnej i uniwersalnej metody rozmnażania pelargonii w warunkach *in vitro* jest nadal trudne i wskazuje na potrzebę dalszej optymalizacji warunków wzrostu i rozwoju tej rośliny. Zastosowanie technik *in vitro* na skalę produkcyjną jest ponadto utrudnione ze względu na niską przeżywalność eksplantatów, gwałtowny spadek zdolności regeneracyjnych zainicjowanych kultur oraz występowanie różnorodnych zmienności. Te ostatnie wiążą się przede wszystkim z regeneracją z udziałem tkanki kalusowej, której występowanie obserwowano większość autorów zarówno podczas organogenezy jak i embriogenezy somatycznej. Spośród badanych gatunków pelargonii największą skłonnością do tworzenia tkanki kalusowej i tym samym do niestabilności genetycznej cechowały się pelargonie bluszczolistne. Istotnym zatem jest przeprowadzenie dalszych badań nad uzyskaniem bezpośredniej regeneracji pędów. Jak do tej pory stosunkowo jednolity materiał namnożeniowy uzyskano w wyniku regeneracji pędów z eksplantatów korzeniowych, pochodzących z siewek rosnących w warunkach *in vitro*. Kontynuacji wymagają również prace nad embriogenezą somatyczną, uznawaną jako najbardziej efektywną drogę wegetatywnego rozmnażania roślin. Jak dotąd została opisana jedynie dla odmian *P. x hortorum* i *P. x domesticum* rozmnażanych z nasion, które stanowią niewielki procent ogólnej produkcji pelargonii w Polsce i w Europie. Dalszy rozwój technik *in vitro* stwarza ponadto możliwość zastosowania ich w procesie transformacji, dzięki któremu możemy uzyskać rośliny posiadające genetyczną odporność na choroby bakteryjne i wirusowe.

LITERATURA

- Abo El - Nil M. M., Hildebrandt A. C., 1971. Differentiation of virus-symptomless geranium plant from anther callus. *Plant Disease Reporter* 55(11): 1017–1020.
- Al- Juboory K. H., Skirvin R. M., Williams D. J., 1998. Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Scientia Hort.* 72: 171–178.
- Armstrong C. L., Green C. E., 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207–214.
- Borkowska B., 1995. Zmienność w kulturach *in vitro*. *Wiadomości Botaniczne* 39(3/4): 53–57.
- Brown J. T., Charlwood B. V., 1986. The control of callus formation and differentiation in scented pelargoniums. *J. Plant Physiol.* 123: 401–408.
- Cassells A. C., 1979. The effect of 2,3,5- triiodobenzoic acid on caulogenesis in callus cultures of tomato and *Pelargonium*. *Physiol. Plant.* 46: 159–164.
- Cassells A. C., Carney B. F., 1987. Adventitious regeneration in *Pelargonium x domesticum* Bailey. *Acta Hort.* 212: 419–424.

- Chang Ch., Moll B. A., Evenson K. B., Gultinan M. J., 1996. *In vitro* plantlet regeneration from cotyledon, hypocotyl and root explants of hybrid seed geranium. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 45:61–66.
- Corneanu M., Corneanu G. C., 1991. The genotype, explant type and medium composition influence on *in vitro* multiplication in *Pelargonium* sp. *Acta Hort.* 289: 101–102.
- Doyle B. M., Lawton D. K., Cassells A. C., 2000. Adventitious regeneration in root culture of a selection of *Pelargonium x hortorum* cultivars: an assessment of caulogenic potential, and genetic stability. *Acta Hort.* 530: 225–230.
- Gill R., Gerrath J. M., Saxena P. K., 1992. High-frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*). *Can. J. Bot.* 71: 408–413.
- Grimes H. D., Hodges T. K., 1990. The inorganic $\text{NO}_3^-:\text{NO}_4^{+}$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 136: 362–367.
- Hammat N., Grant N. J., 1998. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Reports* 17: 526–530.
- Hammerschlag F. A., 1978. Influence of light intensity and date of explantation on growth of geranium callus. *HortScience* 13(2): 153–154.
- Horn W., 1988. Micropropagation of *Pelargonium x domesticum* (*P. grandiflorum* – hybrids). *Acta Hort.* 226: 54–58.
- Hutchinson M. J., Saxena P. K., 1996. Acetylsalicylic acid enhanced and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Reports* 15: 512–515.
- Kamińska M., 1997. Choroby wirusowe. W: Ochrona pelargonii, red. L. Orlikowski, PLANTPRESS, Kraków; 19–24.
- Lis E. K., 1994. Wpływ tiazuronu na regenerację śliw (*Prunus domestica* L.) z liści w kulturach *in vitro*. I Ogólnopolska Konferencja „Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin”, Kraków: 19–24.
- Marsolais A. A., Wilson D. P., Tsujita M. J., Senaratna T., 1991. Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*P. x hortorum*) and regal (*P. x domesticum*) geranium. *Can. J. Bot.* 69: 1188–1193.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Murch S. J., Krishna Raj S., Saxena P. K., 1997. Thidiazuron-induced morphogenesis of regal geranium (*Pelargonium domesticum*): A potential stress response. *Physiol. Plant.* 101: 183–191.
- Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K., 1995. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea* L.): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol. Plant.* 94: 268–276.
- Murthy B. N. S., Singh R. P., Saxena P. K., 1996. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv Ringo Rose) cotyledonary cultures. *Plant Cell Reports* 15: 423–426.
- Murthy B. N. S., Vettakkorumakankav N. N., Krishna Raj S., Odumeru J., Saxena P. K., 1999. Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium x hortorum* mediated by a bacterium. *Plant Cell Reports*. 18: 607–613.
- Orlikowski L., 1997. Bakteriozy i choroby grzybowe. W: Ochrona pelargonii, red. L. Orlikowski, PLANTPRESS, Kraków; 25–42.

- Pillai S. K., Hildebrandt A. C., 1969. Morphogenetic changes of geranium callus in suspension cultures. *Phytomorphology* 19(2): 154–159.
- Podwyszyńska M., Marasek A., Gabryszewska E., 1997. Indukcja tworzenia pędów przybyszowych i zarodków somatycznych w kulturach *in vitro* tulipana. *Zeszyty Naukowe A.R. Kraków* 318: 195–198.
- Reuther G., 1975. Untersuchung zur Vermehrung von Pelargonienvarietäten durch Gewebekultur. *Gartenbauwissenschaft* 4: 181–187.
- Reuther G., 1983. Propagation of disease-free pelargonium cultivars by tissue culture. *Acta Hort.* 131: 311–319.
- Reuther G., 1988. Variability of *Pelargonium peltatum* cultivar in long-term in vitro culture of disease-free nucleus stock. *Acta Hort.* 226: 647–654.
- Robichon M. P., Renou J. P., Jalouzet R., 1997. Plant regeneration of ivy leaved geranium through shoot organogenesis. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 49: 209–212.
- Shetty K., Asano Y., 1991. The influence of organic nitrogen sources on the induction of embryogenic callus in *Agrostis alba* L. *J. Plant Physiol.* 139: 82–85.
- Shibli R. A., Smith M. A. L., 1996. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (Ohelo) and *V. myrtillus* (Biberry) leaf explants. *HortScience* 31(7): 1225–1228.
- Stefaniak B., Zenkteler M., 1982. Regeneration of whole plants of geranium from petiole cultures *in vitro*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 51: 167–172.
- Stuart D. A., Strickland S. G., 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters* 34: 165–174.
- Theiler R., 1977. *In vitro* culture of shoot tips of *Pelargonium* species. *Acta Hort.* 78: 403–412.
- Vejsadová H., Šedivá J., Pretová A., 1999. *Rhododendron* and *Dendranthema*. *Biologia* 54(7): 28.
- Visser Ch., Qureshi J. A., Gill R., Saxena P. K., 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol.* 99: 1704–1707.
- Ward H. B., Vance B. D., 1968. Effects of monochromatic radiations on growth of *Pelargonium* callus tissue. *J. Expt. Bot.* 19: 119–120.
- Wetherell D. F., Dougall D. K., 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37: 97–103.
- Wojtania A., Gabryszewska E., 2001. Effect of cytokinins and amino acids on multiplication of *Pelargonium* cultivars. *Acta Soc. Bot. Pol.* 70 (2): 203–207.
- Wojtania A., Gabryszewska E., Marasek A., 1998. Possibility of *Pelargonium hederacifolium* cv. Bonete shoot regeneration from callus cultures. *J. Fruit Ornam. Plant Res.* 6 (3–4): 171–180.
- Wojtania A., Gabryszewska E., Marasek A., 1997. Wpływ tidiazuronu i BAP na regenerację pędów *Pelargonium x hederacifolium* z liści *in vitro*. Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin ZFR PAN Kraków: 249–254.

Streszczenie

Zastosowanie technik *in vitro* w rozmnażaniu pelargonii pozwala na uzyskanie roślin wolnych od chorób bakteryjnych i wirusowych. W wyniku wieloletnich prac regenerację pędów pelargonii uzyskano zarówno poprzez organogenezę, jak i embriogenezę somatyczną. Najbardziej efektywne tworzenie pędów przybyszowych obserwowano z wierzchołków pędu i pąków kątowych pod wpływem samej cytokininy lub cytokininy podanej z auksyną. W przypadku eksplantatów liściowych, które charakteryzowały się niższym potencjałem regeneracyjnym, wzrost efektywności regeneracji uzyskano po zastosowaniu TDZ. W jego obecności następowało również najbardziej intensywne tworzenie zarodków somatycznych inicjowanych na hypokotylach i liścieniach siewek. Główne problemy występujące podczas rozmnażania pelargonii *in vitro* to: nadmierne tworzenie tkanki kalusowej bez zdolności do organogenezy oraz szybkie starzenie się kultur. U pelargonii należących do odrębnych grup obserwuje się ponadto zróżnicowane zapotrzebowanie na składniki mineralne i organiczne oraz regulatory wzrostu, co jest poważnym utrudnieniem w opracowaniu uniwersalnej metody mikrorozmnażania pelargonii.