ACTA AGROBOTANICA
Vol. 57, z. 1-2 – 2004
s. 5–19

Regeneracja i wzrost piwonii (*Paeonia* spp.) *in vitro*

ELEONORA GABRYSZEWSKA

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice
Research Institute of Pomology and Floriculture, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice
Regeneration and growth of peony (*Paeonia spp.*) *in vitro*

(Otrzymano: 22.11.2002)

Summary

Vegetative propagation of peony is usually carried out by grafting onto herbaceous peony roots (tree peony) or by dividing tuberous root clumps (herbaceous peony). However, conventional propagation is time-consuming and too slow for a large production and therefore *in vitro* methods have been developed. The regeneration ability of different organs of herbaceous and tree peony has been reported in this review. The role of exogenous and endogenous growth regulators in the differentiation and growth of shoots, roots and somatic embryos is presented. The problem of dormancy in the somatic embryos and in the shoots or plants propagated *in vitro* are also discussed.

Key words: *Paeonia*, morphogenesis, growth regulators, dormancy, *in vitro*

WSTĘP

Rodzaj *Paeonia* – piwonia obecnie klasyfikowany jest w rodzinie piwoniowatych (*Paeoniaceae*), a według wcześniejszych systematyk znajdował się w rodzinie jaskrowatych (*Ranunculaceae*). Do rodzaju tego należą 33 gatunki, które naturalnie występują w umiarkowanej strefie Azji i w Azji Mniejszej, a także w Europie i w zachodniej części Ameryki Północnej. Rosną one na słonecznych zboczach w zbiorowiskach wysokich bylin górskich lub w jasnych lasach. Zdecydowana większość gatunków to byliny kłączowe, a tylko nieliczne to krzewy. Piwonie znane są jako rośliny ozdobne i lecznicze od ponad tysiąca lat w Chinach i Japonii. W Europie jako rośliny ogrodowe pojawiły się kilkaset lat później. Spośród wielu gatunków rodzaju *Paeonia*, najbardziej powszechne w uprawie są 2 gatunki bylin – *Paeonia officinalis* i *Paeonia lactiflora* oraz ich odmiany. Znacznie mniej rozpowszechnione są gatunki drzewiaste, a największe znaczenie z gatunków drewniejących ma *Paeonia suffruticosa*. W naszych warunkach klimatycznych piwonie drzewiaste są rzadko uprawiane

ponieważ nie wytrzymują surowych zim (Czarnecki, 1972; Buchheim, Meyer, 1992).

Piwonie – byliny rozmnaża się głównie wegetatywnie, przez podział starszych, silnie rozwiniętych roślin. Karpę korzeni marchwiastych dzieli się na fragmenty z 3-5 pąkami spoczynkowymi. Ta metoda rozmnażania jest jednak mało wydajna. W przypadku rozmnażania przez nasiona, kwitnące rośliny uzyskuje się po około 10 latach. Proces kiełkowania nasion trwa prawie 2 lata i wymaga zmiennych warunków środowiskowych. Dla rozwoju zarodka niezbędna jest wysoka temperatura (25°C), następnie wzrost korzeni zachodzi w temperaturze 15°C, a wzrost epikotylu rozpoczyna się po przechłodzeniu (5°C). Stąd też rozmnażanie generatywne stosuje się jedynie w celach hodowlanych. Odmiany piwonii drzewiastych można rozmnażać tylko wegetatywnie przez podział roślin, przez sadzonki bądź przez odkłady. Szeroko stosowane jest rozmnażanie przez szczepienie zrazów szlachetnych odmian piwonii drzewiastych na korzeniach *P. lactiflora*, *P. officinalis* lub na korzeniach siewek piwonii drzewiastych (Czarnecki, 1972; Buchheim, Meyer, 1992).

Ponieważ tradycyjne metody rozmnażania są mało efektywne i sprawiają liczne trudności, od wielu lat prowadzone są badania nad rozmnażaniem piwonii *in vitro* (Buchheim, Meyer, 1992). Prace te dotyczą zarówno wzrostu zarodków zygotycznych w kulturach *in vitro*, co ma na celu skrócenie okresu kiełkowania nasion, jak również oceny zdolności regeneracyjnych eksplantatów pobieranych z różnych organów piwonii i dalszego mnożenia *in vitro*.

Podczas rozmnażania *in vitro* bylin, krzewów i drzew wiele czynników wpływa na regenerację oraz na wzrost i spoczynek rozmnażanych organów. Są to zarówno właściwości izolowanych tkanek, jak również chemiczne i fizyczne czynniki środowiska: egzogenne substancje wzrostowe, temperatura, światło, warunki pokarmowe i inne.

Prezentowana praca ma na celu omówienie metod regeneracji i roli substancji wzrostowych oraz innych czynników w procesie morfogenezy i wzrostu piwonii w kulturach tkankowych.

Wykaz stosowanych skrótów: Regulatory wzrostu: BAP – 6-benzyloaminopuryna, kinetyna – 6-furfuryloaminopuryna, 2iP – 6-(γ, γ dimetyloalliloamino) puryna, iP – izopentenyloadenina, iPA – izopentenyloadenozyna, IAA – kwas indolilo-3-octowy, IBA – kwas indolilo-3-masłowy, NAA – kwas naftylo-1-octowy, 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, picloram – kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy, TDZ – tidiazuron, PAK – paklobutrazol, GA_3 – kwas giberelinowy, ABA – kwas abscysynowy. Pożywki podstawowe: MS – Murashige i Skoog (1962), LS – Linsmaier i Skoog (1965), SH – Schenk i Hildebrandt (1972), LB – Liau i Boll (1970).

Zdolności regeneracyjne różnych eksplantatów pierwotnych

W badanich nad rozmnażaniem *in vitro* piwonii drzewiastych i zielnych określono zdolności regeneracyjne różnych eksplantatów inicjalnych (Tab. 1 i 2). Różnice morfologiczne pomiędzy piwoniami drzewiastymi i zielnymi warunkowały rodzaj stosowanych eksplantatów pierwotnych. W przypadku piwonii zielnych, najczęściej

Tabela 1
Zdolności regeneracyjne pąków kątowych i wierzchołkowych u kilku gatunków rodzaju *Paeonia* – przegląd literatury

Table 1
The regeneration ability of axillary and main shoot tips of *Paeonia* species *in vitro* – review

Gatunek **Plant species**	**Rodzaj eksplantatu** **Type of explant**	**Pożywka podstawowa i regulatory wzrostu (mg l^{-1})** **Basic medium and growth regulators (mg l^{-1})**	**Metoda regeneracji** **Method of regeneration**	**Autor** **Author**
P. lactiflora *P. suffruticosa*	Pąk kątowy Axillary bud	Modyfikacja pożywki MS* Modification of MS* medium Kinetyna (2,5) + NAA (2,5-10)	Kalus, korzenie Callus, roots	Meyer (1976b)
P. lactiflora	Pąk kątowy Axillary bud	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium 2iP (0,2) + NAA (1)	Kalus Callus	Lin (1980) *
P. lactiflora	Pąk kątowy Axillary bud	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium 2iP (15-30) + IAA (0,3) lub NAA (2,5)	Kalus, pędy Callus, shoots	Radtke (1983)
P. lactiflora	Pąk kątowy Axillary bud	Modyfikacja pożywki LS** Modification of LS** medium TDZ (1,1)	Merystemy pędowe Shoot meristems	Thomas (1987) *
P. lactiflora	Pąk kątowy i wierzchołkowy Axillary and main shoot tips	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium BAP (0,5) + GA_3 (1)	Proliferacja pędów kątowych Proliferation of axillary shoots	Hosoki i in. (1989)
P. suffruticosa	Pąk kątowy Axillary bud	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium Kinetyna (0,2-1) + BAP (0,5-1) + GA_3 (0,1-0,5)	Kalus, merystemy pędowe, pędy Callus, shoot meristems, shoots	Li i in. (1984)
P. suffruticosa	Pąk kątowy Axillary bud	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium BAP (1,1) + GA_3 (0,7)	Proliferacja pędów kątowych Proliferation of axillary shoots	Bouza i in. (1994a)
P. mlokosewitschii *P. tenuifolia*	Pąki wegetatywne Vegetative buds	Zmodyfikowana pożywka MS Cytokininy z dodatkiem auksyn (NAA,IAA) lub bez Modification of MS medium Cytokinins without or with auxins (NAA, IAA)	Kalus, pędy przybyszowe Callus, adventitious shoots	Orlikowska i in. (1998)

*cyt. za Buchheim i Meyer, 1992
cit. after Buchheim i Meyer, 1992

Tabela 2

Zdolności regeneracyjne eksplantatów inicjalnych pochodzących z różnych części roślin kilku gatunków rodzaju *Paeonia in vitro* – przegląd literatury

Table 2

The regeneration ability of initial explants isolated from different organs of *Paeonia* species *in vitro* – review

Gatunek **Plant species**	**Rodzaj eksplantatu** **Type of explant**	**Pożywka podstawowa i regulatory wzrostu (mg l^{-1})** **Basic medium and growth regulators (mg l^{-1})**	**Metoda regeneracji** **Method of regeneration**	**Autor** **Author**
P. suffruticosa	Blaszka i ogonek liściowy Leaf, petiole	Modyfikacja pożywki MS* Modification of MS medium BAP (2) + NAA (0,1 – 0,5)	Kalus, merystemy pędowe, rośliny Callus, shoot meristems, plants	Li i in. (1984)
P. lactiflora	Pęd, ogonek liściowy Shoot, petiole	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium 2iP (5) + NAA (2,5)	Kalus Callus	Radtke (1983)
P. suffruticosa	Pęd Shoot	Modyfikacja pożywki SH** lub LB*** Modification of SH or LB medium NAA (10) lub 2,4-D (0,2-2)	Kalus, korzenie Callus, roots	Gildow i Mitchell (1977)
P. lactiflora	Pąk kwiatowy, szypułka Flower bud, pedicel	Modyfikacja pożywki MS, Modification of MS medium 2iP (5) + NAA (2,5) lub Picloram (1)	Kalus Callus	Radtke (1983)
P. lactiflora *P. suffruticosa*	Pąk kwiatowy Flower bud	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium Kinetyna (2,5) + NAA(2,5-10)	Kalus, korzenie Callus, roots	Meyer (1976b)
P. mlokosewitschii *P. tenuifolia*	Podstawy ogonków liściowych i płatków kwiatowych, fragmenty liści, Bases of petioles and petals, leaf segments	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium BAP(0,1-1), Kinetyna (0,1-1), Zeatyna(0,5-1), 2iP(1-5) lub TDZ (0,01-0,1) IAA(0,1-1), NAA(0,1-0,05) GA_3(0,1-1)	Pędy przybyszowe, kalus Adventitious shoots, callus	Orlikowska i in. (1998)
P. lactiflora	Zarodek zygotyczny Zygotic embryo	Modyfikacja pożywki LS**** Modification of LS medium NAA (2,5) +2iP (0,4) NAA (0,5)	Kalus, korzenie, zarodki Callus, roots, embryos	Lin (1980) * Lin i in. (1987)
P. lactiflora	Zarodek zygotyczny i somatyczny Zygotic and somatic embryo	Modyfikacja pożywki LS Modification of LS medium GA_3 (500) lub TDZ (2,2)	Pędy, kalus, merystemy pędowe Shoots, callus, shoot meristems	Thomas (1987) *

cd. tab. 2

P. albiflora	Pylniki Anthers Zarodki zygotyczne Zygotic embryos	Pożywka MS, MS medium NAA(0,2)+BAP(0,5)+TDZ(0,4) TDZ(0,0002)+NAA(0,2) 2,4-D(0,2)+BAP(0,5) BAP(0,5)+GA_3(1)	Kalus, zarodki Callus, embryos Zarodki, rośliny Embryos, plants	Lee i Kim (1992) Kim i Lee (1995, 1996)
P. lactiflora *P. suffruticosa*	Korzeń Root	Modyfikacja pożywki MS Modification of MS medium Kinetyna (2,5) + NAA (2,2 – 10)	Kalus, korzenie Callus, roots	Meyer (1976b)
P. lactiflora	Korzeń Root	Modyfikacja pożywki LS Modification of LS medium 2,4-D (0,5 – 2)	Kalus Callus	Lin (1980) *

*cyt. za Buchheim i Meyer, 1992
cit. after Buchheim i Meyer, 1992

wykorzystywano pąki wegetatywne, które powstają przy nasadzie poszczególnych pędów – pod ziemią, czasami także w innych częściach zgrubiałych korzeni. Z pąków tych rośliny wznawiają wegetację w następnym roku. Dolne części pędów nadziemnych z powstałymi pąkami wegetatywnymi oraz korzenie zgrubiałe i cienkie tworzą tzw. karpę (Czarnecki, 1972). Pąki wegetatywne w okresie spoczynku pokryte są łuskami. Po rozpoczęciu wegetacji z pąka wegetatywnego rozwijają się boczne pąki kwiatowe (2-3), które znajdują się nad liśćmi, poniżej głównego pąka kwiatowego (Vasil'eva, 1976). Węzły poniżej pąków kwiatowych zazwyczaj nie wytwarzają pędów wegetatywnych (Wilkins, Halevy, 1985). Według Shannon i Kamp (1959) pąki wegetatywne występują u piwonii zielnych w dolnej, ulistnionej części pędu. Sadzonki pobierane z tej części pędu, zawierające pąk wegetatywny i liść, ukorzeniają się oraz wytwarzają kalus, ale pąk nadal pozostaje w spoczynku, pomimo stosowania chłodzenia oraz innych metod przerywających spoczynek. U piwonii drzewiastych pąki wegetatywne powstają w części nadziemnej pędu u podstawy liści (Wilkins, Halevy, 1985).

1. Pąki wegetatywne

Do badań zdolności regeneracyjnych piwonii zielnych, jak i drzewiastych najczęściej wykorzystywano pąki wegetatywne, z których izolowano pąki boczne lub wierzchołkowe (Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992; Radtke, 1983; Li i in., 1984; Hosoki i in., 1989; Harris, Mantell, 1991; Bouza i in., 1994a) (Tab. 1). Poważnym problemem w początkowej fazie kultur pąków były liczne zakażenia, a także brązowienie i zamieranie eksplantatów spowodowane wydzielaniem substancji fenolowych do pożywki. Regeneracja z pąków kątowych miała charakter bezpośredni, gdy izolowane pąki rozwijały się w pędy (Hosoki i in., 1989; Bouza i in., 1994a). Jednakże znacznie częściej pędy przybyszowe powstawały z kalusa, który tworzył się u podstawy izolowanych eksplantatów pierwotnych (Li i in., 1984; Gabryszewska, Marasek, 1997; Orlikowska i in., 1998).

Pąki kątowe *P. suffruticosa* rosnące na pożywce zawierającej BAP, kinetynę i GA_3 wytwarzały kalus, z którego powstawały liczne pąki przybyszowe (Li i in., 1984). Pąki te rozwijały się w pędy po przeniesieniu na pożywkę zawierającą BAP i GA_3. Natomiast bezpośredni rozwój izolowanych pąków kątowych w pędy, zachodził na pożywkach zawierających cytokininy. Regenerację pędów przybyszowych za pośrednictwem kalusa uzyskano u *P. mlokosewitschii* Lom. i *P. tenuifolia* L. (Orlikowska i in., 1998). Kalus powstawał u podstawy izolowanych pąków wegetatywnych, a następnie z kalusa różnicowały się pędy przybyszowe w obecności cytokinin lub cytokinin i auksyn (NAA, IAA). Radtke (1983) badał zdolności regeneracyjne kilku odmian *Paeonia lactiflora*. Jako eksplantaty pierwotne stosował pąki położone na osi liścia oraz pąki kątowe, które umieszczał na pożywce MS zawierającej IAA 0,3 mg l^{-1} i 2iP 30 mg l^{-1}. Wzrost rozpoczęły tylko pąki kątowe, jednakże wydzielały one substancje fenolowe do pożywki. Zastosowanie węgla aktywowanego w stężeniu 0,2% redukowało produkcję fenoli i eksplantaty te rozpoczęły wzrost elongacyjny oraz wytworzyły struktury podobne do liści, jednak nie uzyskano zregenerowanych roślin. W ciemności eksplantaty pierwotne produkowały kalus. Także Thomas (1987) (cyt. za Buchheim, Meyer, 1992) stosował pąki kątowe *P. lactiflora* jako eksplantaty pierwotne. Eksplantaty te pobierano z roślin przechłodzonych (5^0C). Poważnym problemem podczas inicjowania kultury było brązowienie i zamieranie eksplantatów oraz liczne zakażenia (35%). Kalus powstawał u podstawy izolowanych pąków kątowych rosnących na pożywkach zawierających 2iP 0,2 – 10,2 mg l^{-1}, BAP 0,2 –11,3 mg l^{-1} lub TDZ 0,002 – 1,001 mg l^{-1}. Pędy przybyszowe tworzyły się tylko u odmiany 'Emma Klehm' pod wpływem TDZ 1,101 mg l^{-1}. Pędy te po przeniesieniu na pożywkę bez regulatorów wzrostu zamierały po kilku miesiącach. Korzystny wpływ tidiazuronu na wzrost kalusa i regenerację pędów przybyszowych obserwowano u izolowanych pąków kątowych piwonii zielnej odmiany 'Jadwiga' (Gabryszewska, Marasek, 1997). Kalus powstawał w części bazalnej eksplantatów na pożywkach zawierających TDZ w stężeniach od 1 mg l^{-1} do 8 mg l^{-1}. Analiza histologiczna wykazała obecność skupień komórek merystematycznych zarówno na powierzchni, jak również we wnętrzu kalusa. Skupienia komórek we wnętrzu były wyraźnie odgraniczone od pozostałych komórek kalusa. Pędy i pąki przybyszowe regenerowały w miejscach skupień komórek merystematycznych różnicujących się z kalusa na pożywkach z TDZ 1-4 mg l^{-1}. Natomiast powstawanie tylko zawiązków pąków przybyszowych z kalusa, obserwowano przy bardzo wysokich stężeniach TDZ 8-16 mg l^{-1}. Pędy przybyszowe, uzyskane pod wpływem TDZ, mnożono dalej na pożywce zawierającej mieszaninę cytokinin (BAP, 2iP, kinetyna po 2 mg l^{-1} i TDZ 0,02 mg l^{-1}). Pozytywne wyniki przy izolacji pąków wierzchołkowych i bocznych z podziemnych pąków wegetatywnych *Paeonia lactiflora* otrzymał Hosoki i in. (1989). Izolowane pąki rozwijały się w pędy na zmodyfikowanej pożywce Murashige i Skooga (1962) zawierającej BAP 0,5 mg l^{-1} i GA_3 1 mg l^{-1}. Zastosowane regulatory wzrostu uaktywniały pąki kątowe i stymulowały namnażanie.

2. Fragmenty kwiatów, pędu, liści i korzeni

Słabszymi zdolnościami regeneracyjnymi charakteryzowały się eksplantaty inicjalne pobierane z innych części roślin piwonii np.: fragmenty blaszki liściowej

i ogonka liściowego (Radtke, 1983; Li i in., 1984; Orlikowska i in., 1998), fragmenty pędu (Gildow, Mitchell, 1977; Radtke, 1983; Orlikowska i in., 1998), pąki kwiatowe, części kwiatu i szypułki kwiatowe (Meyer, 1976b; Radtke, 1983; Orlikowska i in., 1998) oraz fragmenty korzeni (Meyer, 1976b; Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992). Wzrost kalusa uzyskano na izolowanych fragmentach liści i ogonków liściowych *Paeonia suffruticosa* wykładanych na zmodyfikowaną pożywkę MS zawierającą BAP 2 mg l^{-1} i NAA 0,1 - 0,5 mg l^{-1} (Li i in., 1984). Po przeniesieniu kalusa na pożywkę MS z IAA 0,2 – 0,5 mg l^{-1} i BAP 2 mg l^{-1} tworzyły się pędy przybyszowe, przy czym większą zdolność regeneracji wykazywał kalus powstały na fragmentach ogonków liściowych. Wzrost wydłużeniowy pędów uzyskano na pożywce MS o obniżonym stężeniu BAP 0,5 – 2 mg l^{-1} i zawierającej GA_3 0,2 – 0,5 mg l^{-1}. Radtke (1983) jako eksplantaty inicjalne stosował fragmenty pędu, ogonków liściowych, pąków kwiatowych i szypułek *Paeonia lactiflora*. Eksplantaty pobierane z pędu oraz ogonków liściowych wykładane na zmodyfikowaną pożywkę MS zawierającą NAA 0,25 mg l^{-1} i 2iP 5 mg l^{-1} produkowały duże ilości substancji fenolowych pomimo częstego przenoszenia na świeżą pożywkę. Najlepszy wzrost kalusa uzyskano z pąków kwiatowych i szypułek na pożywce MS zawierającą 2iP 5 mg l^{-1} i picloram 1 mg l^{-1}. W celu zmniejszenia produkcji substancji fenolowych, które powodowały zamieranie eksplantatów, izolowane fragmenty roślin płukano w roztworze kwasu askorbinowego (100 mg l^{-1}) i kwasu cytrynowego (150 mg l^{-1}). W badanich tych nie uzyskano organogenezy z kalusa. Również Meyer (1976b) otrzymał wzrost kalusa z pąków kwiatowych *P. lactiflora* i *P. suffruticosa* na pożywce MS zawierającej NAA 2,5 lub 10 mg l^{-1} i kinetynę 2,5 mg l^{-1}. Z kalusa tworzyły się korzenie, natomiast nie uzyskano regeneracji pędów. Gildow i Michell (1977) izolowali eksplantaty z etiolowanych pędów *P. suffruticosa*. Fragmenty pędów z roślin rosnących w temperaturze 15^{0}C produkowały więcej kalusa niż eksplantaty z pędów rosnących w temperaturze 25^{0}C. Najlepszy wzrost kalusa uzyskano na pożywce LB lub SH z dodatkiem 2,4-D 0,2 mg l^{-1} lub NAA 10 mg l^{-1}. Po przeniesieniu kalusa na pożywkę zawierającą 2,4-D 0,2 – 2 mg l^{-1} i kinetynę 0,1 mg l^{-1} tworzyły się tylko korzenie. U *P. mlokosewitschii* i *P. tenuifolia* izolowano fragmenty pędów, blaszek liściowych oraz różne części pąków kwiatowych: podstawę kwiatu, dolną część płatków i działek kwiatowych, fragmenty ścian zalążni, słupki i pylniki. Bezpośrednia regeneracja pędów przybyszowych zachodziła u podstawy ogonków liściowych i płatków kwiatowych, a także z fragmentów liści. W przypadku pozostałych eksplantatów tworzył się kalus (Orlikowska i in., 1998). Badano również zdolności regeneracyjne fragmentów korzeni piwonii drzewiastych i zielnych (Meyer, 1976b; Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992). Szybki wzrost kalusa uzyskano z fragmentów floemu korzeni na pożywce zawierającej 2,4-D 0,5 mg l^{-1}. Po przeniesieniu kalusa na pożywkę o wyższym stężeniu 2,4-D 1 i 2 mg l^{-1} obserwowano dalszy jego wzrost, ale nie otrzymano różnicowania pędów i korzeni.

Regulatory wzrostu stosowane w fazie mnożenia pędów

Pomimo uzyskania regeneracji pędów piwonii bezpośrednio na eksplantatach inicjalnych lub za pośrednictwem kalusa, tylko w kilku przypadkach utrzymywano zdolność dalszego pobudzania do rozwoju pędów kątowych lub regeneracji pędów

przybyszowych (Hosoki i in., 1989; Harris, Mantell, 1991; Bouza i in., 1994a; Gabryszewska, 1998). W przypadku *P. suffruticosa* badano wpływ różnych cytokinin (zeatyna, iP, iPA, kinetyna, BAP) na namnażanie pędów (Bouza i in., 1994a). Spośród wszystkich testowanych cytokinin, tylko BAP w stężeniu 1,1 mg l^{-1} indukowała powstawanie pędów kątowych oraz liści – średnio powstawało 2,9 pędu na jeden eksplantat. Przy łącznym podaniu BAP i iP uzyskano współczynnik namnażania (2,6) podobnej wielkości, jak przy zastosowaniu samej benzyloadeniny, ale w kombinacji tej powstawało mniej liści. Dodanie IBA w bardzo niskich stężeniach (0,008, 0,02 mg l^{-1}), razem z BAP (1,1 mg l^{-1}) nie wpływało korzystnie na współczynnik namnażania i wzrost wydłużeniowy pędu piwonii drzewiastej (Bouza i in. 1994a). Natomiast wyższe stężenie IBA (0,04 mg l^{-1}), przy zachowaniu tego samego stężenia BAP, ograniczało liczbę powstających pędów, hamowało ich wzrost oraz stymulowało powstawanie kalusa. Także zastosowanie gibereliny w pożywce nie stymulowało powstawania pędów oraz wyrastania liści. Natomiast znacznie większy współczynnik rozmnażania (3,2-4,1) oraz intensywniejszy wzrost wydłużeniowy pędu uzyskano po łącznym zastosowaniu GA_3 (0,4-0,7 mg l^{-1}) z BAP (1,1 mg l^{-1}), niż przy podaniu tylko cytokininy. Jednakże łączne podanie tych regulatorów wzrostu powodowało deformacje pąków kątowych i liści oraz nekrozy wierzchołków pędów, a także liści. Zaburzenia te obserwowano szczególnie przy niskim stężeniu jonów Ca^{2+} w pożywce (Bouza i in., 1994a). Harris i Mantell (1991) uzyskali największą wydajność mnożenia *in vitro* piwonii drzewiastej podczas wielokrotnego pasażowania w odstępach 3-tygodniowych. Do wzrostu i rozwoju pędów kątowych i pędów przybyszowych stosowano pożywkę MS zawierającą BAP 1 mg l^{-1} i 2iP 1 mg l^{-1}. Natomiast mnożenie pędów dwu odmian *P. lactiflora* ('Takinoyosooi', 'Sarah Bernhardt') prowadzono na zmodyfikowanej pożywce MS zawierającej BAP 0,5 mg l^{-1} i GA_3 1 mg l^{-1} z wykorzystaniem eksplantatów uzyskanych z podłużnego podziału pędów kątowych (Hosoki i in., 1989). Kultury wykładano na świeżą pożywkę co 36 dni. Przy zastosowaniu tej metody uzyskano około 300 do 700 roślin (w zależności od odmiany) z jednego eksplantatu pierwotnego. U piwonii zielnej odmiany 'Jadwiga' określono wpływ BAP, kinetyny, 2iP i TDZ, podawanych pojedynczo lub w mieszaninie oraz paklobutrazolu na powstawanie pędów kątowych i przybyszowych (Gabryszewska, 1998). Najwięcej pędów tworzyło się na pożywkach zawierających mieszaninę cytokinin (BAP 2 mg l^{-1} + kinetyna 2 mg l^{-1} + 2iP 2 mg l^{-1} + TDZ 0,02 mg l^{-1}). Natomiast zastosowanie TDZ lub PAK pojedynczo oraz w mieszaninie z BAP nie stymulowało różnicowania pędów. Podane w pożywce regulatory wzrostu silnie oddziaływały na morfologię pędów. Tidiazuron i BAP, dodane w wysokich stężeniach, powodowały deformacje blaszek liściowych, czego nie obserwowano podczas mnożenia pędów w obecności mieszaniny cytokinin i TDZ w bardzo niskim stężeniu. Znaczne zwiększenie współczynnika namnażania piwonii odmiany 'Jadwiga' uzyskano przy podaniu GA_3 (1 mg l^{-1}) do pożywki zawierającej mieszaninę cytokinin (Gabryszewska, 2001b).

Powstawanie korzeni i aklimatyzacja roślin

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

zarówno piwonii drzewiastych, jak i bylin. W przypadku *P. lactiflora* stwierdzono korzystny wpływ pożywki płynnej na rizogenezę. Pędy ukorzeniały się w 57%-100% na pożywce MS zawierającej IBA 1 mg l^{-1}. Jednakże tylko połowa ukorzenionych pędów aklimatyzowała się w podłożu w szklarni (Hosoki i in., 1989). Zastosowanie niskiej temperatury i ciemności sprzyjało ukorzenianiu pędów piwonii z grupy *P. lactiflora* na pożywce zawierającej IBA lub IAA w stężeniu 0,2 mg l^{-1}. Uzyskane rośliny wymagały długiego okresu chłodzenia, ponieważ po ukorzenieniu zapadały w głęboki spoczynek (Kunneman, Albers, 1989). U *P. suffruticosa* stwierdzono zależność pomiędzy długością pasażu podczas mnożenia a liczbą ukorzenionych pędów oraz ich zdolnością do przeżywania w szklarni (Harris, Mantell, 1991). Najwięcej pędów ukorzeniało się w przypadku stosowania 5-tygodniowego pasażu, w porównaniu z 3 i 4-tygodniowym pasażem. Natomiast w szklarni przeżywały tylko rośliny z pasażu 5-tygodniowego (27%), a wszystkie pozostałe zamierały. Do indukcji ukorzeniania stosowano pożywkę MS zawierajcą IBA 1 mg l^{-1}. Szczegółowe badania nad regeneracją korzeni *P. suffruticosa* prowadził Bouza i in. (1994b). Pojedyncze pędy rozwinięte z pąków kątowych traktowano auksynami w różny sposób: a/ pędy wykładano na pożywkę MS zawierającą 3% sacharozę i IBA 0,5 – 2 mg l^{-1}, b/ podstawy mikrosadzonek zanurzano w roztworze IBA 2 –20 mg l^{-1} na okres 1-4 godzin, a następnie pędy umieszczano na pożywce MS z 3% sacharozą i 0,3% węglem aktywowanym, c/ w pierwszym etapie pędy umieszczano (1-10 dni) na pożywce indukującej ukorzenianie – 4% sacharoza i IBA 1-15 mg l^{-1}, w drugim etapie pędy przenoszono na pożywkę MS z 3% sacharozą i 0,3% węglem aktywowanym. Dodatkowo zastosowano również kombinację z pożywką płynną, gdzie nośnikiem dla pędów był wermikulit. Spośród wszystkich metod najbardziej efektywna (80% ukorzenionych pędów) okazała się metoda dwuetapowa: indukcja korzeni w ciemności na pożywce zawierającej IBA 15 mg l^{-1} (10 dni), a następnie wzrost korzeni na pożywce MS z 0,3% węglem aktywowanym. Tworzenie korzeni na pożywce płynnej było bardzo słabe (27%) i u podstawy pędów powstawał obfity kalus. Bouza i in. (1994c) badali zależność pomiędzy zawartością cytokinin i auksyn w zregenerowanych pędach *P. suffruticosa*, a ich zdolnością do ukorzeniania *in vitro*. Metodą HPLC-ELISA oznaczano poziom endogennego IAA oraz N6-benzyladeniny, którą stosowano podczas mnożenia pędów. Pędy pochodzące z 5-tygodniowego pasażu wykazywały największą zdolność ukorzeniania (87%), natomiast pędy z krótszych pasaży charakteryzowały się wysoką zawartością BAP i słabą rizogenezą (25%-55% pędów ukorzenionych). Indukcja ukorzeniania związana była z gwałtownym wzrostem zawartości IAA, po którym następował 10-krotnie niższy wzrost poziomu endogennej ribofuranosyl-isopentenyladeniny. Podczas rozwoju korzeni stwierdzono bardzo słabą i przemijającą akumulację isopentenyladeniny, co prawdopodobnie było przyczyną zahamowania wzrostu pędów. Rozwój korzeni przebiegał najlepiej na pożywce zawierającej węgiel aktywowany. W warunkach tych zawartość IAA w korzeniach była 3-krotnie niższa.

Somatyczna embriogeneza

Zarodki somatyczne u *P. lactiflora* tworzyły się bezpośrednio na izolowanych eksplantatach, którymi były liścienie zarodków zygotycznych lub pylniki (Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992; Li i in., 1984; Thomas, Meyer, 1987)

bądź drogą pośrednią z udziałem kalusa (Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992; Lin i in., 1987). Najlepszy wzrost kalusa z zarodków zygotycznych *P. lactiflora* uzyskano na pożywce LS z dodatkiem NAA 2,5 mg l^{-1} i 2iP 0,4 mg l^{-1}, natomiast najwięcej zarodków somatycznych powstawało z kalusa rosnącego na zmodyfikowanej pożywce LS zawierającej NAA 0,5 mg l^{-1} i KNO_3 3800 mg l^{-1} (Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992). Bezpośrednią embriogenezę na zarodkach zygotycznych *P. lactiflora* uzyskano pod wpływem 2,4-D 0,5 mg l^{-1} (Kim, Lee, 1995). Natomiast na pożywkach zawierających NAA 0,2 mg l^{-1} i BAP 0,01 mg l^{-1} powstawanie zarodków somatycznych było znacznie słabsze. Glutamina wpływała stymylująco na wzrost i rozwój korzeni. Stwierdzono wpływ temperatury na rozwój zarodków somatycznych. W temperaturze 25°C powstawały liczne formy albinotyczne, których obserwowano znacznie mniej w temperaturze 15°C. Zastosowanie GA_3 redukowało liczbę form albinotycznych (Kim, Lee, 1995). Kim i Lee (1996) określili wpływ różnych regulatorów wzrostu i temperatury na indukcję embriogenezy oraz na dalszy rozwój roślin *P. lactiflora*. Zarodki somatyczne najlepiej różnicowały się z liścieni rosnących na pożywce zawierającej 2,4-D 0,2 mg l^{-1} i BAP 0,2 mg l^{-1}. Chłodzenie zarodków w temperaturze 1°C przez 45 dni stymulowało kiełkowanie. Zastosowanie BAP 0,5 mg l^{-1} i GA_3 1 mg l^{-1} sprzyjało rozwojowi roślin z zarodków, przy czym proces ten zachodził znacznie lepiej w temperaturze 18°C niż w 25°C. Bezpośrednie tworzenie się zarodków somatycznych bez udziału egzogennych substancji wzrostowych uzyskano na powierzchni liścieni zarodków zygotycznych *P. lactiflora*. Somatyczna embriogeneza zachodziła na zmodyfikowanej pożywce LS zawierającej sacharozę w stężeniu 4% i NH_4NO_3 3300 mg l^{-1}. Zarówno zarodki somatyczne uzyskane bezpośrednio z liścieni, jak i te otrzymane z udziałem kalusa, w swoim rozwoju przechodziły przez stadium globularne, sercowate i torpedy. Izolowane z tkanki macierzystej zarodki tworzyły korzenie i liścienie, jednak nie otrzymano roślin, ponieważ nie rozwijały się liście (Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992; Lin i in., 1987; Thomas, Meyer, 1987). Lee i in. (1992) uzyskali embriogenezę za pośrednictwem kalusa z pylników *P. albiflora* (*P. lactiflora*). Indukcja kalusa zachodziła na pożywce MS zawierającej NAA 0,2 mg l^{-1} + BAP 0,5 mg l^{-1} + TDZ 0,4 mg l^{-1} u pylników, które wcześniej traktowano temperaturą 5°C przez 5 dni. Chłodzenie pylników przez 10 dni w temperaturze 5°C sprzyjało powstawaniu zarodków z kalusa na pożywce w obecności NAA 0,2 mg l^{-1} i TDZ 0,002 mg l^{-1}. Inicjacja pędów i korzeni była najlepsza przy udziale BAP 0,5 mg l^{-1} lub TDZ 0,002 mg l^{-1}.

Spoczynek a regeneracja i wzrost piwonii *in vitro*

Podczas regeneracji i rozmnażania piwonii *in vitro* poważnym problemem jest spoczynek, zarówno izolowanych zarodków zygotycznych, jak również zarodków somatycznych i kultur pędów w fazie mnożenia oraz roślin w trakcie ukorzeniania i aklimatyzacji.

Zarodki zygotyczne piwonii rozwijające się *in vitro* na pożywce LS, wykazywały spoczynek epikotylu, tak samo jak nasiona w warunkach *in vivo*, a chłodzenie kultur zarodków w temperaturze 5°C (6-8 tygodni) przerywało spoczynek (Meyer, 1976a; Zilis, Meyer, 1976). Natomiast spoczynek epikotylu u *P. lactiflora* nie ustępował, w przypadku moczenia nasion (po usunięciu okrywy) w roztworze GA_3

10 mg l^{-1}, a także u kultur izolowanych zarodków zygotycznych na pożywkach zawierających GA_3 10 lub 25 mg l^{-1} (Lin, 1980 – cyt. za Buchheim, Meyer 1992). Z drugiej strony, zastosowanie egzogennych giberelin zastępowało chłodzenie i spoczynek częściowo ustępował w nasionach *P. suffruticosa* (Barton, Chandler, 1957). Thomas i Meyer (1986) badali wpływ różnych stężeń GA_3 (100, 250, 500, 750, 1000 mg l^{-1}) na przełamanie spoczynku epikotylu i rozwój siewek *P. lactiflora* w kulturach *in vitro*. Zarodki zygotyczne rosły na zmodyfikowanej pożywce LS. Giberelina bardzo silnie stymulowała wzrost epikotylu; wraz ze wzrostem stężenia GA_3 (do 500 mg l^{-1}) obserwowano więcej powstających liści oraz dłuższe ogonki liściowe. Jednakże GA_3 w wysokich stężeniach powodował deformację liścieni i rozwijających się liści. Siewki, uzyskane *in vitro*, bardzo słabo aklimatyzowały się w warunkach szklarniowych. Większość z nich zamierała na skutek zasychania liści oraz działania patogenów grzybowych. Część siewek, pozostawiona w warunkach *in vitro*, rozwijała się prawidłowo i tworzyła normalne morfologicznie liście. Zastosowanie kultur *in vitro* oraz gibereliny skróciło okres kiełkowania nasion *P. lactiflora* z 2 lat do 6 tygodni.

Także zarodki somatyczne *P. lactiflora*, uzyskane z zarodków zygotycznych charakteryzowały się spoczynkiem epikotylu (Thomas, 1987 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992). W celu przerwania spoczynku, zarodki somatyczne z widocznym epikotylem oraz bez wyraźnie wykształconego epikotylu, traktowano GA_3. Pod wpływem GA_3 500 mg l^{-1}, większość (75%) wyszczepionych zarodków somatycznych wytwarzała duże, zielone liścienie. Prawidłowe liście rozwijały się u 29% zarodków traktowanych giberelinią, jednakże liście te były mniejsze i ich rozwój opóźniony, w porównaniu z rozwojem liści zarodków zygotycznych *in vitro*. Natomiast zarodki somatyczne nie traktowane giberelinią, tworzyły małe liścienie, o kremowej barwie. Prawidłowe liście wogóle się nie rozwijały. Pomimo tego, że zarodki somatyczne traktowane GA_3 podejmowały wzrost, jednak ich aklimatyzacja w szklarni była bardzo słaba.

Zahamowanie wzrostu, a w późniejszym okresie zamieranie pędów i merystemów przybyszowych, powstających z eksplantatów pierwotnych obserwowano u *P. lactiflora* (Thomas, 1987 – cyt. za Buchheim, Meyer, 1992). Buchheim i Meyer (1992) sugerowali, że pędy przybyszowe, podobnie jak zarodki somatyczne, znajdują się w spoczynku i zastosowanie GA_3 lub niskiej temperatury może przerwać spoczynek. Podczas długotrwałego mnożenia *in vitro* piwonii zielnej odmiany 'Jadwiga' obserwowano zmiany morfologiczne pędów, takie jak u roślin wchodzących w okres spoczynku. Było to zahamowanie wzrostu, powolne starzenie się liści i ich zamieranie oraz powstawanie pąków, zamiast intensywnie rosnących pędów (Gabryszewska, 2001a). Zastosowanie fluridonu – inhibitora biosyntezy ABA, podczas mnożenia pędów spoczynkowych, silnie stymulowało wyrastanie liści oraz powstawanie pędów, szczególnie w obecności światła czerwonego. Natomiast egzogenny ABA hamował wzrost liści i nieznacznie ograniczał różnicowanie pędów piwonii odmiany 'Jadwiga'. Działanie fluridonu było znoszone poprzez równoczesne zastosowanie egzogennego ABA, co przejawiało się zahamowaniem wzrostu liści i pędów. Hamujące działanie ABA na wzrost pędów i liści oraz przeciwdziałający wpływ fluridonu w tym procesie mogą świadczyć o udziale kwasu abscysynowego w indukcji i utrzymywaniu spoczynku pędów piwonii rozmnażanych *in vitro*. Także u piwonii

odmiany 'Jadwiga' badano wpływ GA_3 na wzroast i rozwój pędów *in vitro* oraz na ustępowanie spoczynku (Gabryszewska, 2001b). Dodanie GA_3 1 mg l^{-1} do pożywki silnie stymulowało namnażanie pędów oraz wzrost liści u eksplantatów spoczynkowych i niespoczynkowych. Silniejsze działanie GA_3 na wzrost i rozwój pędów obserwowano u eksplantatów chłodzonych (+4°C) niż kultur ciągle rosnących w temperaturze 20°C lub 25°C. Zastosowanie paklobutrazolu, inhibitora biosyntezy giberelin, hamowało wzrost i różnicowanie pędów oraz liści zarówno u eksplantatów chłodzonych, jak i kultur rosnących w temperaturze 20°C i 25°C. Korzystne działanie GA_3 we wzroście pędów i liści oraz odwrotny efekt paklobutrazolu mogą wskazywać na udział gibereliny w ustępowaniu spoczynku pędów piwonii odmiany 'Jadwiga'.

Objawy spoczynku u pędów piwonii obserwowano także w fazie ukorzeniania *in vitro* oraz podczas aklimatyzacji (Kunneman, Albers, 1989; Bouza i in., 1994d). W przypadku piwonii z grupy *P. lactiflora* pędy wchodziły w spoczynek po ukorzenianiu *in vitro* na pożywkach zawierających IAA lub IBA w stężeniu 0,2 mg l^{-1} (temperatura 12°C-15°C, ciemność) (Kunneman, Albers, 1989). Długi okres chłodzenia przełamywał spoczynek roślin. Również u *P. suffruticosa* odmiany 'Mme de Vatry', podczas ukorzeniania *in vitro* eksplantatów zawierajacych pąki kątowe, dochodziło do zahamowania wzrostu i rozwoju pędów (Bouza i in., 1994d). Chłodzenie ukorzenionych pędów (2 miesiące w temperaturze 4°C) pozytywnie wpływało na ich wzrost, co przejawiało się zwiększoną aktywnością mitotyczną w wierzchołkach pędów. Po chłodzeniu znacznie zwiększał się poziom IAA w pędach oraz cytokinin w korzeniach, natomiast ABA prawie całkowicie zanikał. Podobne zmiany endogennych substancji wzrostowych obserwowano u roślin matecznych *in vivo* po okresie zimowego chłodu. W przeciwieństwie do korzeni roślin matecznych, nigdy nie oznaczono auksyn w korzeniach roślin zregenerowanych *in vitro*. Natomiast poziom cytokinin w chłodzonych pędach był prawie 20-krotnie niższy, niż w pąkach roślin matecznych *in vivo*. Pomimo zmian endogennych substancji wzrostowych, rozwój pędów po chłodzeniu był bardzo słaby. Pędy nie wydłużały się, powstawały tylko 1-2 liście oraz nie tworzyły się pąki kątowe. Słabemu rozwojowi pędów towarzyszył szybki spadek zawartości endogennych cytokinin i IAA oraz akumulacja ABA. Autorzy powyższej pracy sugerują, że eksplantaty *P. suffruticosa* podczas regeneracji *in vitro* tracą zdolność regulacji metabolizmu hormonów. Zaburzenia te utrzymują po przeniesieniu roślin do warunków *in vivo* i uniemożliwiają aklimatyzację roślin w szklarni.

PODSUMOWANIE

W dotychczasowych badaniach szczegółowo określono zdolności regeneracyjne eksplantatów pochodzących z organów wegetatywnych i generatywnych piwonii zielnych. Natomiast w przypadku piwonii drzewiastych poznano głównie potencjał regeneracyjny pąków wierzchołkowych i bocznych. W większości przypadków uzyskano jedynie regenerację kalusa, pędów przybyszowych czy zarodków somatycznych, a dalszy wzrost i rozwój roślin był zahamowany. Na podstawie przedstawionych wyników można przypuszczać, że słaby wzrost pędów podczas regeneracji oraz w fazie mnożenia czy aklimatyzacji roślin wiąże się z indukcją i utrzymywaniem spoczynku. Zastosowanie niskiej temperatury lub egzogennej gibereliny przerywało

spoczynek, jednakże metabolizm regulatorów wzrostu w roślinach regenerowanych *in vitro* różnił się od metabolizmu tych substancji u roślin matecznych. Po chłodzeniu, w roślinach pochodzących z rozmnażania *in vitro*, produkcja cytokinin była znacznie mniejsza, a biosynteza ABA gwałtownie wzrastała, w porównaniu z chłodzonymi roślinami matecznymi. Prawdopodobnie zaburzenia te są główną przyczyną niepowodzeń w procesie regeneracji i wzrostu piwonii *in vitro*. Wydaje się, że podstawową przyczyną niepowodzeń jest indukcja spoczynku powodowana określonymi warunkami (temperatura, światło, węglowodany) w kulturach *in vitro*. Z tego względu dalsze badania powinny mieć na celu określnie roli tych czynników w indukcji, utrzymywaniu i ustępowaniu spoczynku piwonii rozmnażanej *in vitro*. Problemy pojawiające się podczas ukorzeniania i aklimatyzacji piwonii drzewiastych, jak również i zielnych dotychczas nie zostały w pełni rozwiązane i dlatego metoda rozmnażania *in vitro* nie może być stosowana na skalę masową w produkcji ogrodniczej (Seyring, 2000; Sidibe i in., 2000; Zeng i in., 2000).

LITERATURA

Barton L.V., Chandler C., 1957. Physiological and morphological effects of gibberellic acid on epicotyl dormancy of tree peony. Contrib. Boyce. Thomson Inst. 19: 201-214.

Bouza L., Jacques M., Miginiac E., 1994a. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. Mme de Vatry: developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. Scientia Hort. 57: 241-251.

Bouza L., Jacques M., Miginiac E., 1994b. Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. Mme de Vatry. Scientia Hort. 58: 223-233.

Bouza L., Jacques M., Sotta B., Miginiac E., 1994c. Relations between auxin and cytokinin contents and *in vitro* rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). Plant Growth Regul. 15: 69-73.

Bouza L., Jacques M., Sotta B., Miginiac E., 1994d. The reactivation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) vitroplants by chilling is correlated with modifications of abscisic acid, auxin and cytokinin levels. Plant Science 97: 153-160.

Buchheim J. A. T., Meyer M. M., 1992. Micropropagation of peony (*Paeonia spp.*). Biotechnology in Agriculture and Forestry, 20. [In:] High-tech and micropropagation IV (Ed. Y.P.S.Bajaj), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 269-285.

Czarnecki W., 1976. Piwonie, PWRiL, Warszawa: str. 116.

Gabryszewska E., 1998. The influence of cytokinins, thidiazuron, paclobutrazol and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. 'Jadwiga' *in vitro*. Jour. Fruit Ornam. Plant Res., 3-4: 157-168.

Gabryszewska E., 2001a. Effects of ABA, fluridone and light quality on growth and dormancy of tissue-cultured herbaceous peony shoots. Acta Hort. 560: 407-410.

Gabryszewska E., 2001b. The influence of GA_3, paclobutrazol, light quality and temperature on the growth and dormancy release of peony (*Paeonia* L.) shoots *in vitro*. COST Action 843, Quality enhancement of plant production through tissue culture, Annual Meeting, 18-20 October 2001, Rome, Italy, (Abstr.) 82-83.

Gabryszewska E., Marasek A., 1997. Wpływ tidiazuronu na wzrost kalusa i regenerację pędów peonii (*Paeonia x hybrida*) *in vitro*. Zeszyty Nauk. Akad. Rol. w Krakowie 318: 177-181.

Gildow F. E., Mitchell J. P., 1977. Initiation, growth and nuclear characteristics of tissue cultures of *Paeonia suffruticosa*. Physiol. Plant. 58: 790-795.

Harris R. A., Mantell S. H., 1991. Effects of Stage II subculture durations on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). J. Hort. Sci. 66: 95-102.

Hosoki T., Ando M., Kubara T., Hamada M., Itami M., 1989. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by longitudinal shoot-split method. Plant Cell Rep. 8: 243-246.

Kim Y. S, Lee B. K., 1995. Effects of plant growth regulators and culture temperature on embryo culture of *Paeonia albiflora*. Jour. Kor. Soc. Hort. Sci. 36: 255-262.

Kim Y. S, Lee B. K., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledon culture of *Paeonia albiflora*. Jour. Kor. Soc. Hort. Sci. 37: 827-830.

Kunneman B. P. A. M., Albers M. R. J., 1989. Tissue culture of peony is not yet producing plants. Bloembollencultuur 100: 16-17.

Lee B. K., Ko J. A., Kim Y. S., 1992. Studies on the thidiazuron treatment of anther culture in *Paeonia albiflora*. Jour. Kor. Soc. Hort. Sci. 33: 384-395.

Li Y., Wu D., Pan S., Wei Z., Xu Z., Li X., 1984. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa*. Kexue Tongbao 29: 1675-1678

Lin J. J., Thomas J. A., Meyer M. M., 1987. Tissue culture and embryoid formation in *Paeonia lactiflora* Pall. Am. Peony Soc. Bull. 263: 24-30.

Meyer M. M., 1976a. Culture of *Paeonia* embryos by *in vitro* techniques. Am. Peony Soc. Bull. 217: 32-35.

Meyer M. M., 1976b. Culture of *Paeonia* callus by tissue culture techniques. Am. Peony Soc. Bull. 218: 27-29.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Orlikowska T., Marasek A., Kucharska D., 1998. Regeneration of *Paeonia mlokosewitschii* Lom. and *P. tenuifolia* L. *in vitro* from different explants. Acta Soc. Bot. Pol. 3-4: 223-227.

Radtke G. W., 1983. Tissue culture of herbaceous peonies. Am. Peony Soc. Bull. 246: 19-23.

Seyring M., 2000. Loss rate is still too high. TASPO-Gartenbaumagazin. 10: 30-31.

Shannon J., Kamp J. R., 1959. Trials of various possible propagation methods of herbaceous peonies. III State Flor. Assoc. Bull. 197:4-7.

Sidibe A., Feserova H., Tesarova M., 2000. Transfer of some plant species from *in vitro* to *in vivo* growth in the greenhouse conditions. Ann. Agric. Res. 21: 317-322.

Thomas J. A., Meyer M. M., 1986.Tissue culture and anatomical studies of *Paeonia lactiflora*. HortScience 21: (Abstr.) 774

Thomas J. A., Meyer M. M., 1987. *In vitro* embryogenesis and development of *Paeonia lactiflora* Pall. *In Vitro* 23: (Abstr.) 70A.

Vasil'eva M. Y., 1976. The formation of renewal organs in herbaceous peonies. Ref. Zhurnal 55: (Abstr.) 930.

Wilkins H. F., Halevy A. H., 1985. *Paeonia*. [In:] Handbook of flowering IV (Ed. H.A. Halevy) CRC Press, Boca Raton, FL, pp 2-4.

Zeng D. X., Yin W. L., Zhao X. Q., Wang H. F., 2000. Propagation of Chinese tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). Journal Beijing Forestry University 22: 90-95.

Zilis M. R., Meyer M. M., 1976. Rapid *in vitro* germination of immature, dormant embryos. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 26: 272-275.

Streszczenie

Wegetatywne rozmnażanie piwonii zielnych polega na podziale podziemnego kłącza zawierającego zgrubiałe korzenie marchwiaste, natomiast u piwonii drzewiastych szeroko stosowane jest rozmnażanie poprzez szczepienie zrazów na korzeniach piwonii zielnych. Ponieważ tradycyjne rozmnażanie trwa bardzo długo i jest mało efektywne, od wielu lat prowadzone są badania nad rozmnażaniem piwonii *in vitro*.

Niniejsza praca zawiera przegląd literatury dotyczący zdolności regeneracyjnych eksplantatów pierwotnych izolowanych z różnych organów piwonii zielnych i drzewiastych. Omówiono rolę egzogennych i endogennych regulatorów wzrostu w procesie różnicowania i wzrostu pędów, korzeni oraz zarodków somatycznych. Przedstawiono również problem spoczynku u zarodków somatycznych oraz pędów i roślin rozmnażanych *in vitro*.