



Nauki Przyrodnicze

numer 4 (10)/2015

SELECTED ASPECTS OF ORNAMENTAL PLANTS MICROPROPAGATION

IN POLAND
AND WORLDWIDE



Nauki Przyrodnicze

ARTYKUŁY/ARTICLES

3-9. FIZJOLOGIA WYMIENIA ORAZ ETIOLOGIA POWSTAWANIA STANÓW ZAPALNYCH GRUCZOŁU MLEKOWEGO - MOŻLIWOŚCI OGRANICZANIA WYSTĘPOWANIA TEGO SCHORZENIA.

AUTORZY: DARIUSZ WOLSKI

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE

10-25. SELECTED ASPECTS OF ORNAMENTAL PLANTS MICROPROPAGATION IN POLAND AND WORLDWIDE.

AUTORZY: DARIUSZ KULUS

UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNO-PRZYRODNICZY
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH



Nauki Przyrodnicze

REDAKTOR NACZELNY

Mateusz Gortat

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

Dariusz Wolski

REDAKTOR TECHNICZNY

Paweł Kuś

RADA NAUKOWA:

prof. dr hab. Bogusław Makarski (UP Lublin)

dr hab. inż. Marek Stankevič (UMCS Lublin)

dr Sylwester Kowalik (UP Lublin)

dr Anna Stępniowska (UP Lublin)

lek. wet. mgr inż. Dariusz Wolski (UP Lublin)

mgr Mateusz Gortat (UP Lublin)

lek. med. Łukasz Pastuszak (Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny w Warszawie)

PROJEKT OKŁADKI

Robert Giza

ADRES DO KORESPONDENCJI

Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych

ul. Wyżynna 20/56, 20-560 Lublin

kontakt@ssnp.org.pl

www.naukiprzyrodnicze.ssnp.org.pl

Odpowiedzialność za treść i materiały graficzne ponoszą autorzy

DARIUSZ WOLSKI

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Fizjologii Zwierząt
ul. Akademicka 12,
20-950 Lublin
e-mail: darek.wolski@o2.pl

FIZJOLOGIA WYMIENIA ORAZ ETIOLOGIA POWSTAWANIA STANÓW ZAPALNYCH GRUCZOŁU MLEKOWEGO - MOŻLIWOŚCI OGRANICZANIA WYSTĘPOWANIA TEGO SCHORZENIA

PHYSIOLOGY OF UDDER AND ETIOLOGY OF FORMATION OF INFLAMMATIONS OF MAMMARY GLAND - MEANS OF CONSTRAINING THE OCCURRENCE OF THIS ILLNESS

STRESZCZENIE

STANY ZAPALNE GRUCZOŁU MLEKOWEGO szczególnie u wysokowydajnych krów mlecznych stanowią nadal poważny problem w chowie bydła mlecznego w Polsce i na świecie. Intensywność przemian fizjologicznych i metabolicznych zachodzących podczas sekrecji mleka naraża wymię na relatywnie duże obciążenie. Długotrwałe występowanie takiego stanu może prowadzić do miejscowego osłabienia odporności. Sytuacja ta potęgowana jest również, niewłaściwymi warunkami utrzymywania, niewłaściwym żywieniem oraz złą higieną doju. Długotrwałe oddziaływanie tych czynników przyczynia się do nadwyrężenia struktur anatomicznych wymienia, co ułatwia wnikanie do niego drobnoustrojów chorobotwórczych. Efektem tego jest powstawanie wymienionych stanów zapalnych określanych jako *mastitis*. Jednymi z konsekwencji występowania *mastitis* jest obniżenia wydajności, pogorszenie wartości technologicznej surowca. W skrajnych przypadkach może również dochodzić do utraty funkcji narządu. W artykule skupiono się na wynikających z budowy gruczołu mlecznego jego fizjologicznych funkcjach oraz możliwości ograniczania i leczenia *mastitis*.

SŁOWA KLUCZOWE: KROWY MLECZNE, MLEKO, PROFILAKTYKA, ZAPALENIE WYMIENIA, *MASTITIS*

SUMMARY

MAMMARY GLAND INFLAMMATIONS especially in high efficiency dairy cows are still a serious problem in the breeding of the dairy cattle in Poland and in the world. The intensity of the physiological and metabolic changes that occur during the secretion of milk exposes the udder to a relatively large burden. Long term occurrence of such a condition can lead to a local weakened immunity. This situation is intensified also with improper conditions of maintenance, improper nutrition and poor hygiene of milking. Long term effects of these factors contribute to the strain of the udder's anatomical structures, what facilitates the penetration of pathogens into it. The result is the formation of the udder inflammation known as *mastitis*. One of the consequences of the occurrence of *mastitis* is performance degradation, as well as deterioration of the technological value of raw material. In extreme cases, the loss of the organ's functions may occur. The article focuses on physiological functions resulting from the construction of mammary gland and the ability to limit and treat *mastitis*.

KEY WORDS: DAIRY COWS, MILK, PREVENTION, *MASTITIS*

WSTĘP

WYBRANE SCHORZENIE stanowi problem, z jakim coraz częściej borykają się hodowcy bydła, a szczególnie w czasach intensywnego rozwoju produkcji oraz jednostronnej selekcji w kierunku zwiększenia wydajności mlecznej. Doskonaleńie bydła mlecznego w zakresie zwiększania ilości produkowanego mleka przyczynia się do częstszego występowania zaburzeń związanych z homeostazą organizmu. Problem ten dotyczy również obszaru gruczołu mlecznego, który manifestowany jest często występującymi stanami podklinicznych i klinicznych stanów zapalnych gruczołu. Często zaburzenia te są nieuniknionym elementem produkcji, zwłaszcza w przypadku ferm wielkotowarowych. Szeroko rozumiana profilaktyka schorzeń wymienia oraz zaburzeń towarzyszących w okresie okołoporodowym jest nieodzownym elementem prawidłowego utrzymania zwierząt, a ponadto często jest równoznaczna z opłacalnością produkcji. Dlatego też duży nacisk kładzie się na zapobieganie zaburzeniom, którym towarzyszą stany zapalne wymienia. Artykuł skupia się na budowie i fizjologii gruczołu mlekowego, najczęściej występujących czynnikach zakaźnych i niezakaźnych wywołujących stany zapalne oraz sposobach ich zapobiegania. Celem pracy jest zapoznanie czytelnika z problemem schorzeń wymienia oraz zwrócenie uwagi na profilaktykę schorzeń tego narządu.

ANATOMIA I FIZJOLOGIA GRUCZOŁU MLEKOWEGO KROWY

GRUCZOŁ MLEKOWY, zwany również u krów wymieniem (*über*) składa się z czterech oddzielnych komór (ćwiartek) posiadających własne unaczynienie, tkankę gruczołową, tłuszcztową oraz unerwienie. Autonomia poszczególnych ćwiartek polega na posiadaniu

przeznieosobnej otoczki łącznotkankowej, oraz braku połączeń naczyniowych i nerwowych. Jest to istotna cecha, ponieważ galaktogenne procesy zapalne nie rozprzestrzeniają się z jednej ćwiartki na drugą. Jeśli jednak zakażenie następuje drogą hematogenną, wówczas bariera anatomiczna nie jest w stanie temu zapobiec.

Kluczową rolę w aspekcie fizjologii sekrecji mleka odgrywa tkanka gruczołowa. Jej proporcja w relacji do tkanki tłuszczowej czy łącznej zmienia się wraz ze stanem fizjologicznym, okresem laktacji czy wiekiem. Podstawowymi składowymi częścią gruczołowej wymienia są pęcherzyki mlekotwórcze, w których zachodzi właściwy proces sekrecji mleka. W połączeniu z układem krwionośnym, limfatycznym i przewodami wyprowadzającymi tworzą one zraziki, które połączone są w płaty. Płyty łączy wspólny przewód wyprowadzający, uchodzący do zatoki mlekonosnej, która łączy się z zatoką strzykową i uchodzi w kanał strzykowy. (LITWIŃCZUK I WSPÓŁAUT., 2005).

Wszystkie substraty niezbędne do wytworzenia mleka pochodzą z krwi dopływającej do wymienia tętnicami sromowymi. Proces wytworzenia mleka jest procesem skomplikowanym i wymagającym zaangażowania wielu szlaków metabolicznych w organizmie krowy. Aby powstał jeden litr mleka przez gruczoł mlekowy musi przepłynąć od 400 do 500 litrów krwi. Narząd ten jest więc bardzo przeciążony w wyniku użytkowania mlecznego, ponieważ procesy fizjologiczne w nim zachodzące wymagają ogromnych nakładów energetycznych (KRZYMOWSKI, 2005; MALINOWSKI I WSPÓŁAUT., 2000).

Zapoczątkowanie procesu laktogenezy, czyli produkcji mleka zależne jest od czynników hormonalnych i w uproszczeniu można podzielić go na dwa etapy. Pierwszym z nich jest wytworzenie niewielkiej ilości wydzieliny w komórkach nabłonka gruczołowego, która pojawia się około

4. tygodnia przed wycieleniem krowy. Rozpoczyna się wówczas transfer immunoglobulin do gruczołu mlekovego, a na 3 do 10 dni przed porodem wzrasta proces syntezy składników i wydzielania mleka. W tym czasie nasila się synteza laktazy i zwiększa się ilość wydzieliny o składzie zbliżonym do siary. Drugi etap odmienny fizjologicznie, sprowadza się do intensyfikacji syntezy i wydzielania mleka. Jest to efekt wstrzymania dopływu składników pokarmowych do macicy. W tym czasie inicjowany jest proces galaktopoezy (ciągłego wydzielania mleka). Kilka dni po porodzie skład mleka różni się od typowego. Jest to tak zwana siara (*colostrum*), której skład zmienia się do około 5 dnia laktacji. Po tym czasie mleko przyjmuje zawartość składników utrzymującą się na zbliżonym poziomie w dalszych fazach laktacji. (KRZYMOWSKI, 2005; MACIOŁEK I WSPÓŁAUT., 2007; MORDAK I WSPÓŁAUT., 2009)

Okres laktacji u krów mlecznych waha się przeciętnie od 300 do 305 dni. W tym czasie laktacja podlega zmianom, które można przyjąć jako pewne prawidłowości związane z wpływem zmian fizjologicznych i hormonalnych. Przebieg ciąży, rozwój płodu i poród wpływają również na prawidłowość laktacji, warunkując zarówno ilość jak i jakość wytwarzanego mleka. Na początku okresu laktacji dochodzi do wzrostu wydzielania mleka, a następnie po około 4. miesiącach produkcja zaczynie się obniża. W przebiegu laktacji dochodzi również do zmian jakościowych w składzie mleka. Poziom tłuszczy i białka po pięciu tygodniach po porodzie sukcesywnie zmniejsza się, a od 35. tygodnia po porodzie dochodzi do ponownego wzrostu. Poziom laktazy wzrasta do 3. tyg. po porodzie, następnie do około 25. tyg. pozostaje na stałym poziomie, po czym, aż do momentu zasuszenia dochodzi do zmniejszenia poziomu tego składnika. Jest to związane z procesem inwolucji

wymienia. Pod tym pojęciem należy rozumieć utratę możliwości wytwarzania mleka przez komórki nabłonka gruczołowego w następstwie procesów wstecznych. Spadek zdolności wytwarzania mleka w drugiej połowie laktacji jest powodowany przez estrogeny i progesteron, które bezpośrednio działają na receptory zlokalizowane na komórkach nabłonka gruczołowego. Zasadnicza inwolucja wymienia zachodzi w okresie zasuszenia, po 10-15 dniach dochodzi do nasilenia procesów wstecznych, mleko jest wydzielane do momentu, w którym ciśnienie mleka przekroczy ciśnienie krwi. Inwolucja zachodzi przy braku pozyskiwania mleka przez dłuższy okres. Okres zasuszenia powinien trwać w prawidłowych warunkach około 6-8 tygodni (KRZYMOWSKI, 2005; LITWIŃCZUK I WSPÓŁAUT.; 2005; PIECH, 2010; TISCHER I WSPÓŁAUT.; 2006; ZDUŃCZYK I WSPÓŁAUT., 2002).

DEFINICJA I PRZYCZYNY STANÓW ZAPALNYCH

GRUCZOŁU MLEKOWEGO

ZAPALENIE WYMIENIA, czyli *mastitis* definiowane jest jako utajony, przewlekły (podkliniczny) lub ostry (kliniczny) stan zapalny gruczołu mlekovego. Etiologia tego schorzenia związana jest przede wszystkim z ponadprzeciętnym rozwojem drobnoustrojów przedostających się do gruczołu. Takie stany mogą też wiązać się z podrażnieniami wywołanymi przez urazy mechaniczne, czynniki fizyczne i czynniki chemiczne, jak na przykład: skaleczenia, otarcia, środki dezynfekcyjne. Niemniej ważny jest również aspekt zastroju mleka wraz z patogenami i produktami ich przemian, co utrudnia skuteczność leczenia (MALINOWSKI, 2008).

Najczęstszą przyczyną mastitis są: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma*

bovis, *Corynebacterium bovis*. Spośród bakterii z grupy coli zapalenia wymienia wywołują przede wszystkim wspomniane *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Głównymi źródłami tych patogenów są kał i ściółka. Jak wykazały badania Krukowskiego (2006) rodzaj ściółki ma istotne znaczenie w zakresie bytowania w niej niektórych z tych bakterii. Bakterie typu coli (*E.coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) czy *Streptococcus uberis* występują powszechnie w środowisku i nie ma możliwości ich wyeliminowania. Jednak co ważne, można ograniczyć zakres i ilość ich występowania. Następną grupą są bakterie z grupy *Staphylococcus* znajdujące się w skórze i bytujące na wymionach krów. Stanowią zagrożenie podczas cofania się mleka w czasie doju. Wówczas dochodzić może do przeniesienia zarazków ze skóry do środka kanału strzykowego. Dotyczy to w głównej mierze krów z uszkodzonymi strzykami. Szczególnie niebezpieczną grupę stanowią zarazki pochodzące od zwierząt z mastitis w formie klinicznej oraz cierpiących na przewlekłą formę zapalenia. Są to *Arcanobacterium pyogenes*, mykoplasmy np. *Mycoplasma bovis*, drożdżaki i grzyby. Rzadko się zdarza, że do zakażenia dochodzi przez *Prototheca*, czyli algi. Przyczyną jest brak higieny podczas doju. Wymienione grupy drobnoustrojów powinny zostać rozpoznane po to, aby móc skutecznie zapobiegać przenoszeniu ich w stadzie, a także obrać strategię postępowania z problemem (BINEK, 2010; KRUKOWSKI, 2006; MARKIEWICZ I WSPÓŁAUT.; 2006, STRUZIK I WSPÓŁAUT. 2010; TISCHER I WSPÓŁAUT. 2006).

W zależności od czasu i nasilenia *Mastitis* wyróżniamy jego postać kliniczną i subkliniczną (podkliniczną). W klinicznej postaci wyróżnia się postać ostrą i podostrą zaś w sublinicznej - septyczną i aseptyczną. W przypadki postaci klinicznej zauważalny przebiegającej choroby mogą być są wi-

doczne „goły” okiem. Inaczej jest jednak w postaci podklinicznej, gdyż z reguły objawy są niewidoczne na pierwszy rzut oka. Dopiero podjęte badania szczegółowe wymienia i badania mleka mogą ujawnić toczący się stan chorobowy w gruczole mlecznym (MALINOWSKI, 2008; PIECH, 2010).

Doniesienia literaturowe z zakresu profilaktyki schorzeń wymienia wskazują na pewną prawidłowość, która dotyczy okresów występowania u krów zwiększonej podatności na zachorowania. Najczęściej obserwuje się występowanie zapaleń we wczesnym okresie zasuszania oraz przed wycieleniem. Okres zasuszania jest o tyle niebezpieczny, że istnieje łatwość dostania się patogenów do kanału strzykowego. W prawidłowym procesie zasuszania powinien wytworzyć się naturalny czop, który chroni przed nadmiernym wnikaniem drobnoustrojów do środka wymienia. Proces jego powstawania jest w dużej mierze upośledzony w stadach krów wysokowydajnych, ze względu na dużą produkcję mleka w okresie zasuszania, nieprawidłowy dój oraz prowadzoną pracę hodowlaną dającą do ciągłej poprawy wydajności mlecznej zwierząt. Nie może to jednak pozostać bez odpowiedzi organizmu na takie zabiegi hodowlane (BINEK, 2010; JAJOR, 2009).

SPOSODY LECZENIA I PROFILAKTYKI STANÓW ZAPALNYCH WYMENIA

UNIKANIE WYSTĘPOWANIA zapaleń gruczołu mlecznego krów wysokowydajnych nie jest prostym zadaniem. Leczenie tego schorzenia nie zawsze przynosi oczekiwane skutki, dlatego też jednym ze sposobów zapobiegania *mastitis* jest brakowanie sztuk, których leczenie nie przynosi zamierzonych skutków. Leczenie farmakologiczne powinno być dosto-

sowane do występujących na fermie drobnoustrojów i ich wrażliwości na leki. W szczególnie opornych stanach powinno być poprzedzone dokładną diagnostyką bakteriologiczną, pozwalającą na prawidłowe dobranie antybiotyku.

Nie bez znaczenia pozostaje również aspekt ekonomiczny. Źle rozumiana oszczędność hodowców np. związana z wyborem antybiotyków według ceny, może w wielu przypadkach powodować wzrost nakładów środków finansowych na leczenie, powstawanie odporności na antybiotyki, a w konsekwencji także brak wyleczenia. Forma przyjętego planu leczenia i rodzących leków zależy od postaci *mastitis* (MALINOWSKI I WSPÓŁAUT., 2000; POKORSKA I WSPÓŁAUT., 2012).

Subkliniczne formy zapaleń wymienia leczy się najczęściej w okresie zasuszenia. Istotnym aspektem tego okresu jest brak strat ekonomicznych związanych z utylizacją mleka w okresie laktacji. Ponadto w okresie zasuszenia antybiotyk utrzymuje się znacznie dłużej, aniżeli w przypadku regularnych dojów. Najlepsze efekty przynosi podawanie co najmniej przez 3 dni odpowiednio dobranego antybiotyku do chorej ćwiartki lub ćwiartek, a wspomagające może również być podawanie drugiego antybiotyku, ogólnie działającego w postaci iniekcji.

Inna strategia postępowania odnosi się do formy klinicznej. Leczenie podjąć należy natychmiast po zaobserwowaniu zmian, jednak przed rozpoczęciem leczenia należy pobrać próbki mleka do oznaczenia rodzaju drobnoustrojów i ich oporność na leki. Zaleca się częste zdajanie wymienia, a leczenie jest zwykle skojarzone. W przypadku ogólnego osłabienia organizmu krowy stosuje się leczenie wspomagające z użyciem wlewów kroplowych i środków przecizwapalnych (MALINOWSKI, 2010 A; MALINOWSKI, 2010 B; TISCHER, 2008).

Jednym ze sposobów profilaktyki *mastitis* w stadach krów wysokowydajnych jest zabezpieczanie strzyków przed

okresem zasuszenia. Stosuje się go zarówno u zwierząt z przewlekłym zapaleniem wymienia jak i u zwierząt zdrowych. U krów zasuszonych działanie antybiotyków trwa około 3-4 tygodnie, po czym ich działanie ustaje. Przed samym wycieleniem może nastąpić zakażenie drobnoustrojami, dlatego strzyki zabezpiecza się w okresie zasuszenia przez powlekanie ich preparatem zawierającym w swym składzie jod, kwas mlekowy lub chlorheksydynę. Preparaty te nie zawierają antybiotyków, stanowią jedynie barierę mechaniczną przed wnikaniem patogenów do kanału strzykowego. Po rozpoczęciu laktacji usuwa się go. Stosowany jest zazwyczaj w stadach nie mających dużych problemów z gruczołem mlekiem (JAJOR, 2009; TISCHER I WSPÓŁAUT., 2008).

Polecane przez wielu specjalistów jest zasuszania krów z udziałem antybiotyków. Podaje się preparaty z antybiotykiem do każdej ćwiartki w momencie zasuszenia krowy. Jednak trzeba pamiętać, że po podaniu takiego preparatu gruczoł mlekiem powinien wyprodukować odpowiednią ilość mleka, ponieważ to ono rozprowadza lek po całym wymieniu, co stwarza możliwości dotarcia do wszystkich zmienionych chorobowo miejsc w tkance gruczołowej. Takie ewentualne podanie preparatu krowie, która nie produkuje już mleka, nie spowoduje zamierzonych skutków. Stosowane są preparaty do kąpieli strzyków tuż po udoju w okresie laktacji. Preparat taki powinien zawierać substancje dezynfekujące np. jod, kwas octowy oraz substancje pielęgnujące takie jak gliceryna czy lanolina. Kąpieli podojowej powinny być poddane strzyki tuż po udoju. Jest to niezwykle ważne ze względu na to, że przez około pół godziny po doju, a u niektórych sztuk nawet dłużej kanał strzykowy pozostaje otwarty. Istnieje wówczas największe bezpieczeństwo wnikania drobnoustrojów, w tym chorobotwórczych. Ważne jest, aby preparat posiadał odpowiednie rozcieśczenie jeśli jest

on w formie stężonej, bo zbyt duże stężenie może powodować uszkodzenie skóry strzyków, zaś za słabe może nie spełnić swojej roli.

Kąpiel poudojowa niszczy bakterie znajdujące się na strzyku. Ponadto w ujściu kanału strzykowego tworzy czopującą kroplę, która uniemożliwia wnikanie zanieczyszczeń do wnętrza gruczołu mlekovego. Regularne stosowanie kąpieli strzyków zmniejsza podatność na zakażenia wymienia i ryzyko zachorowania na *mastitis* (BINEK, 2010, MALINOWSKI, 2010 A, MALINOWSKI, 2010 B, TISCHER, 2008). Odporność organizmu krowy jest jednym z kluczowych elementów podatności na wystąpienie zapalenia gruczołu mlekovego. To, że poszczególne zarazki występują w środowisku bytowania zwierząt nie musi przesądzać o tym, iż dana sztuka ulegnie zakażeniu. Niezwykle istotne znaczenie ma żywienie krów w każdej fazie laktacji i w okresie zasuszenia, gdyż w mieszankach paszowych przeznaczonych dla krów mlecznych nie może zabraknąć właściwego poziomu cynku (Zn), miedzi (Cu), selenu (Se), a także witaminy E (DRZAZGA, 2009; MORDAK, 2008; MORDAK, 2009).

PODSUMOWANIE

STANY ZAPALNE wymienia stanowią jeden z najczęstszych powodów brakowania krów w stadach, ze względu na duże koszty leczenia i długotrwałą terapię. Podejmowane próby leczenia, będące wynikiem prawidłowego badania i diagnostyki schorzeń gruczołu mlekovego często przynoszą oczekiwane skutki. Niemniej jednak wiele działań skierowanych przeciwko *mastitis* powinno uwzględniać sposoby zapobiegania temu schorzeniu poprzez odpowiednie żywienie, warunki zoohigieniczne, prawidłowo przeprowadzony dój oraz pielęgnację poudojową. Warto również pamiętać o odpowiednim doborze materiału genetycznego i wysokim statusie zdrowotnym stada.

LITERATURA

- BINEK M. 2010. Etiologiczne formy zapalenia wymienia u bydła oraz czynniki wpływające na jego leczenie. Magazyn Weterynaryjny, 1034-1040.
- DRZAZGA K. 2009. Odporność do poprawki. Tygodnik Rolniczy, 35, 40-41.
- JAJOR M. 2009. Mastitis czyha w ukryciu . Tygodnik Rolniczy, 30 , 39-40.
- LITWIŃCZUK Z., SZULC T. 2005. Hodowla i użytkowanie bydła. PWRiL, 187- 188 211- 214.
- MACIOŁEK H., ŁUKOMSKA D. 2007. Zapalenie wymienia wciąż aktualny problem. Hodowca Bydła, 9, 76 – 82.
- MALINOWSKI E., KŁOSSOWSKA A. 2000. Stan zdrowia wymienia krów punktem krytycznym w produkcji mleka. Prz. Mlecz., 9: 308 – 311.
- MALINOWSKI E. 2008. Podział zapaleń gruczołu mlekovego u krów. Magazyn Weterynaryjny, 990 – 992.
- MALINOWSKI E., SMULSKI S. 2007. Występowanie i profilaktyka zakażeń i zapaleń gruczołu mlekovego. Życie Weterynaryjne, 82 (6), 476-482.
- MALINOWSKI E. 2010. Zapalenie wymienia u bydła-leczenie. Część I. Bydło- ogólnopolskie czasopismo specjalistyczne, 6, 70 (A).
- MALINOWSKI E. 2010. Zapalenie wymienia u bydła-leczenie. Część II. Bydło- ogólnopolskie czasopismo specjalistyczne, 7, 66-69 (B).
- MARKIEWICZ H., MALINOWSKI E., KUŹMA K., SMULSKI S., KACZMAROWSKI M. 2006. Aktywność granulocytów krwi krów

zdrowych i z zapaleniem gruczołu mleковego. *Medycyna Weterynaryjna*, 62 (11), 1288.

MORDAK R., PREŚ J. KINAL S., NICPOŃ J. 2009. Problemy zdrowotne wysokoproducyjnych krów w okresie okołoporodowym. *Medycyna Weterynaryjna*, 65 (7), 444- 445.

MORDAK R. 2008. Monitorowanie problemów zdrowotnych stad bydła. *MedPharm Polska*, 157-173.

KRUKOWSKI H. 2006. Drobnoústroje środowiskowe jako przyczyna mastitis u krów. *Medycyna Weterynaryjna*, 62 (2), 189-192.

KRZYMOWSKI T. 2005. Fizjologia zwierząt, 630- 633, 636-647.

PIECH T. 2010. Zdrowy gruczoł mlekowski - zdrowe mleko. Część I. Bydło- Ogólnopolskie czasopismo specjalistyczne, 10, 64-68.

POKORSKA J., KUŁAJ D., ORMIAN M. 2012. Przyczyny brakowania krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej użytkowanych w fermie wielkotowarowej. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, t. 8 (2012), nr 2, 17-24.

STRUZIK J., NIEMIAŁTOWSKI M. 2010. Aktywacja wewnętrzjadowego czynnika transkrypcyjnego NF- KB w bakteryjnych zapalenach gruczołu mlekovego. *Medycyna Weterynaryjna*, 66 (11), 751-752.

TISCHER M., FRANK S., MAHLKOW-NERGE K. RINDERKRANKHEITEN. 2006. Choroby bydła- wydanie specjalne dla lekarzy weterynarii i zootechników, *Top Agrar Extra*, 68-71, 78-81, 92-95.

ZDUŃCZYK S., JANOWSKI T. 2002. Znaczenie estrogenów dla rozwoju, funkcji i sta-

nu zdrowotnego gruczołu mlekovego. *Medycyna Weterynaryjna*, 58 (9), 670- 672.

DARIUSZ KULUS

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych
Pracownia Biotechnologii Wydział Rolnictwa i Biotechnologii
ul. Bernardyńska 6-8,
85-029 Bydgoszcz
e-mail: dkulus@gmail.com

SELECTED ASPECTS OF ORNAMENTAL PLANTS MICROPROPAGATION IN POLAND AND WORLDWIDE WYBRANE ASPEKTY MIKROROZMNAŻANIA ROŚLIN OZDOBNYCH W POLSCE I NA ŚWIECIE

ABSTRACT

ORNAMENTAL PLANT species are an important part of the economy. For 40 years their production has been systematically transferred to laboratories and *in vitro* cultures. The most intensively exploited use of tissue cultures is micropropagation. It is a far more efficient method in comparison to the traditional methods. Micropropagation allows for the reduction of needed space and time. It is also climate and season-independent. Moreover, the plants obtained by these means are often characterized both by better quality and faster growth. Annual world production of ornamental plants by *in vitro* cultures (about 160 genera) during the past 10 years has increased from 800 million to 2 billion. These are mainly: roses, chrysanthemums, lilies, orchids, anthuriums and begonias. At the end of the last century, Poland was ranked third in terms of European plant production *in vitro*. With the advent of the 20th century, the European production of plants *in vitro* significantly decreased as a result of shifting laboratories to Asia. In 2000 in Europe, there were about 140 commercial laboratories operating (in Poland over 40). Today in Poland, there are approximately 20 commercial laboratories function-

ing, where a number of 40–100 million plants are annually produced (80–90 % are ornamental species) (GABRYSZEWSKA, 2013). The main obstacle limiting the wider use of tissue culture technology is high labour costs. It is believed that the coming years will bring further development of micropropagation technologies aimed at the automation of production, mainly with the use of bioreactors. The aim of this article is to present selected aspects of ornamental plant species micropropagation (production structure and share of costs).

KEYWORDS: HORTICULTURE, *IN VITRO* TISSUE CULTURES, MASS REPRODUCTION, PRODUCTION COSTS

STRESZCZENIE

Rośliny ozdobne stanowią istotną część gospodarki. Od 40 lat ich produkcja jest systematycznie przenoszona do laboratoriów i kultur *in vitro*. Najbardziej intensywnym zastosowaniem kultur tkankowych jest mikrorozmnażanie. Technologia ta jest zdecydowanie bardziej wydajna w porównaniu do metod tradycyjnych. Pozwala także na redukcję potrzebnej powierzchni i czasu. Produkcja na tej drodze jest także niezależna od

czynników klimatycznych. Ponadto rośliny uzyskane na tej drodze często charakteryzują się lepszą jakością i szybszym wzrostem. Światowa roczna produkcja roślin ozdobnych na drodze kultur *in vitro* (około 160 rodzajów) tylko w ciągu ostatnich 10 lat wrosła z 800 milionów do 2 miliardów. Do roślin reprodukowanych na tej drodze należą głównie: róże, chryzantemy, lilie, storczyki, anturia i begonie. Pod koniec ubiegłego stulecia Polska zajmowała wysoką trzecią lokatę pod względem europejskiej produkcji roślin na drodze kultur w szkle. Z początkiem XXI wieku europejska produkcja sadzonek *in vitro* znacznie spadła, co wiązało się z przeniesieniem produkcji do Azji. W 2000 roku w Europie funkcjonowało ponad 140 komercyjnych laboratoriów (w Polsce ponad 40). Obecnie w Polsce istnieje około 20 dużych laboratoriów komercyjnych, w których rocznie produkuje się 40 – 100 milionów mikrosadzonek (spośród których 80 – 90 % to rośliny ozdobne) (GABRYSZewska, 2013). Głównym ograniczeniem dalszego rozwoju technologii kultur w szkle są wysokie koszty pracownicze. Uważa się, że kolejne lata przyniosą dalszy rozwój technik mikrorozmnażania, nakierowany na automatyzację produkcji z zastosowaniem bioreaktorów. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wybranych aspektów (struktury produkcji oraz udziału kosztów) mikrorozmnażania najważniejszych gatunków roślin ozdobnych.

SŁOWA KLUCZOWE: KOSZTY PRODUKCJI, KULTURY TKANKOWE *IN VITRO*, MIKROROZMNAŻANIE, OGRODNICTWO

INTRODUCTION – THE MEANING OF ORNAMENTALS

ORNAMENTAL PLANTS accompany most of us on every stage of our life; from birth until death (SENGAR ET AL., 2010). Not surprisingly the demand for ornamentals is constantly growing (in Poland mostly since 1989) (MAROSZ, 2013a). In 1996 the ornamental cut flower market (the largest segment of the industry) in Western Europe exceeded \$12 billion in sales, 6.9 billion in the U.S. and 7.8 billion dollars in sales in Japan (LAWSON, 1996). In 2012 the value of the world floristic market was estimated at €70–90 billion and it is still growing (Sharma and Agrawal, 2012). The net worth of the ornamental horticulture sector in the Netherlands alone (the biggest producer of ornamental plants) in 2012 amounted to 5.28 billion euros (GOŁAS, 2013). In Poland, the value of horticultural market is not well known and, according to conservative estimates, may reach more than 2 billion euros (MAROSZ, 2013b). Swiss and Norwegians spent most *per capita* on ornamentals. The least ornamental plants are bought by consumers from countries with relatively lower GDP, e.g. Poland, Ukraine, Slovakia and Croatia (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012). These are, however, developing markets, where one can expect an increase in sales of ornamental plants, as compared to saturated markets in developed countries.

Horticultural industry resisted to two waves of the crisis: in 2008 and the second in 2011 (MAROSZ, 2013b). In Italy in 2008 the overall expenditure on ornamental plants has increased by 15.1% (2.34 billion euro) compared to 2005 (2.03 billion euro) (SCHIMENTI ET AL., 2010). In 2011 in numerous EU countries consumer spending on horticultural products despite the crisis have increased by about 100 million euros compared to 2010. In the years 2002–2010 in Poland the

surface of ornamental plant species nurseries has increased by 2354 ha, i.e. 90% (mostly small nurseries arose) (MAROSZ, 2013b).

Even though the area of ornamentals cultivation in Poland is only 0.04% of total arable land, it generates a 20% return of the total plant production, making it the most profitable branch of agriculture. The production value of flowers in Poland in recent years is several times greater than of vegetables, potato and that of cereals (JABŁOŃSKA AND OLEWNICKI, 2013). Popularity of cut and potted flowers, as well as that of ornamental trees and shrubs has been growing among Poles since the 70's of the 20th century. From the first half of the 90's during the last century to the first half of the last decade, the average expenditure *per capita* of a Warsaw citizen in terms of cut roses (which are the most popular among consumers) increased from 7-9 to 14-16 flowers (JABŁOŃSKA AND PERZYŃSKA, 2009). The analyses revealed that in 2007 only 1,67% of surveyed Warsaw inhabitants did not buy even one cut flower (JABŁOŃSKA AND PERZYŃSKA, 2009). Persons surveyed spent approximately 37 euros on ornamentals (mainly middle-aged people), including €11.50 on indoor pot plants and €5 on chrysanthemums for All Saints' Day, which was similar to 2003. Cut flowers were bought the most often - 98.33% of those surveyed, 3-6 times a year, 3-5 flowers at a time (JABŁOŃSKA AND PERZYŃSKA, 2009). As for potted plants, in 2003 a Warsaw citizen bought 2.5 plants (JABŁOŃSKA AND ZYNTEK, 2003), in 2006 - 4.3 plants (2.0 for themselves and 2.3 as gifts; JABŁOŃSKA AND GNIEWOSZ, 2007), while in 2007 - 3.0. (JABŁOŃSKA AND PYRZYŃSKI, 2009). However, in 2013 a Poznań citizen bought already 7-9 potted plants, mostly: *Phalaenopsis*, *Anthurium*, *Zamioculcas* and *Yucca* (HENSCHKE AND PANKOWSKA, 2013). Despite the increase in areas planted with ornamentals

(by 35% in the past 10 years) traditional reproduction methods no longer meet the growing requirements of the market. One of the main reasons for this situation is the unfavourable geographic location of Poland and other Central European countries (except for nurseries) (JABŁOŃSKA AND OLEWNICKI, 2013).

NATURAL PROPAGATION METHODS OF ORNAMENTAL PLANTS

PLANTS CAN BE produced by two ways: generatively by seeds or vegetatively/clonally (e.g. by cuttings, grafting, suckers, etc.). Seeds are usually highly efficient, however, the progeny obtained by these means is not identical with the mother plant. Some succulents (e.g. of the *Agave* genera) are hapaxanthic, i.e. they flower only once in their lifetime. As for *Agave* species it may take even 10-90 years (DEBNATH ET AL., 2010; KULUS, 2014b). Other species of hybrid origin (e.g. chrysanthemum, crocus, pelargonium) are sexually sterile and unable to produce seeds or do that extremely rarely. A similar situation is observed with members of the *Cactaceae* family (second most popular collector group of plants, following the orchids) which due to their extreme habitat, form seeds very rarely (LEMA-RUMIŃSKA AND KULUS, 2014). Traditional vegetative reproduction on the other hand, is less efficient since the number of lateral branches produced is smaller than that of seeds. Furthermore, these techniques are time consuming. For example, in Korea (main cactus producer) the grafting of 1 ha of *Gymnocalycium michanovihii* (Fric ex Gürke) Britton & Rose takes about 17,000hrs (approximately two years) (JEONG ET AL., 2004). Most of the problems associated with traditional vegetative reproduction methods can be overcome by the application of *in vitro* tissue cultures.

PLANT TISSUE CULTURE AND MICROPROPAGATION

TISSUE CULTURE is the most basic tool used in plant biotechnology, especially in micropropagation, i.e. a type of rapid vegetative reproduction performed under *in vitro* conditions. The concept of plant tissue cultures is based on totipotency (the ability of a single cell to divide and produce all of the differentiated cells in an organism) a term proposed by Steward in 1968 (READ, 2007). In this technology small fragments of plants/explants are grown on synthetic nutrient media in sterile, strictly controlled light and temperature conditions. This possibility was first proposed by a German botanist Haberlandt in 1902 (READ, 2007). Even though Haberlandt failed to obtain intact plants, great progress has been made in this field in the following years. The first significant use of tissue cultures in the production of ornamental plants took place in 1922 when Louis Knudson led his laboratory to an symbiotic orchid seed germination (ROUT ET AL., 2006). However, practical large-scale plant micropropagation was not achieved until the discovery of cytokinins and auxins (plant growth regulators - PGRs) stimulating proliferation and elongation of cells by Skoog's group at the University of Wisconsin (SKOOG AND MILLER, 1957; SKOOG AND TSUI, 1948). Today, there are many applications of *in vitro* cultures. They can be used for eliminating viruses (meristem cultures), breeding (mutation breeding, genetic transformation, embryo rescue, protoplast fusion, haploid production from anthers or ovules/ovaries) and conservation (by creating gene banks under slow-growth conditions or cryopreservation in liquid nitrogen). The most intensively exploited use of plant tissue cultures however, is micropropagation. The balance is reversed with genetic manipulation, plant breeding and the production of

secondary metabolites (RÍORDÁIN, 1992).

Micropropagation technology was first developed about 80 years ago in the U.S. and Western Europe. Then Gautheret (2003) obtained cultures of cambial tissues of *Acer pseudoplatanus* L.. From there it spread dynamically to other parts of the world. Morel's discovery, who was the first who described the mass propagation of orchids (MOREL, 1960, 1964), led to the foundation of commercial tissue culture laboratories by orchid growers. Since the early 1970's the orchid *in vitro* propagation techniques were modified and applied firstly to other ornamentals and later on to fruit and crop plants. In Poland, the review of historical development of the tissue culture method was presented by ZENKTELER AND ZENKTELER (2013). Their review paper shows that the *in vitro* culture technology started 67 years ago in this country. In 1968, the first commercial *in vitro* culture laboratory was created in Poland. Towards the end of the 1970's Poland had 120 *in vitro* laboratories, which was more than the whole number of laboratories in entire U.S. (ZENKTELER AND ZENKTELER, 2013). This number, however, decreased drastically in the following years (similarly to other European countries) (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012). The first ornamental plants propagated *in vitro* in Poland were *Gerbera* (mainly) and *Dianthus* genera. There was even a patent protection related to this topic granted by the government (MISZKE ET AL., 1987). Nowadays however, the production of *Gerbera* is greatly decreasing, while orchids are becoming more popular (GABRYSZewska, 2013). Unlike other biotechnological achievements, micropropagation is characterized by a high social acceptance and lack of prejudice.

The technology owes its growing popularity to many advantages. It is a much more efficient method in comparison to the traditional approach. As for *Cyclamen persicum*

Mill. it was possible to produce 40,000 progeny plants in 10 weeks just from 1 litre of medium via somatic embryogenesis (HOHE ET AL., 1999; HVOSLEF-EIDE ET AL., 2005). With *Cymbidium* orchid, even one million progeny from a single mother plant was produced in 12 months (JERZY AND KRZYMIŃSKA, 2005). Micropropagation also allows for the reduction of space needed, labour associated with agrotechniques and time. It is also climate and season-independent, allowing for whole-year production which is especially important with tropical species. Moreover, the plants obtained by these means are often characterized by better quality and faster growth, which is best shown with naturally slow-growing cacti whose growth pace is 3–7 times increased under *in vitro* conditions (PÉREZ-MOLPHE-BALCH AND DÁVILA-FIGUEROA, 2002). The technique can also be used in creating new, attractive cultivars by the occurrence of somaclonal variation (variation seen in plants that have been produced by plant tissue culture) as done with *Chrysanthemum x grandiflorum* / Ramat./ Kitam. (ZALEWSKA ET AL., 2007). It is also used for introducing new unknown species to the local market: e.g. *Tibouchina urvillea* (D.C.) Cogn. (KOZAK ET AL., 2010), *Gardenia jasminoides* J. Ellis (KOZAK, 2011).

A typical micropropagation protocol consists of culture initiation (preceded by explant isolation and disinfection – stage 0), multiplication/proliferation, rooting (sometimes multiplication and rooting occur simultaneously) and adaptation/hardening to *ex vitro* conditions. After that the plants can be transferred and acclimatized to field conditions (KULUS, 2014a). The success of the clonal propagation method depends on numerous factors: e.g. genotype, media, plant growth regulators and type of explant. The most often used PGRs for micropropagation of ornamentals via organogenesis and somatic embryogenesis are:

Naphthalenacetic acid (NAA) and Benzyl adenine (BA) (SHARMA AND AGRAWAI, 2012).

Over time, several micropropagation techniques have been developed (thin cell layer TCL, apical/axillary meristem culture, regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis) depending on the material source and the purpose sought to be achieved. Nowadays the most popular ones are axillary and adventitious shoot regeneration. The later one is more efficient. With *Turbinicarpus laui* Glass et Foster it was even possible to regenerate 270 adventitious shoots per explant on the most popular MS (MURSAHIGE AND SKOOG, 1962) medium with 8.8 µM BA (ROSAS ET AL., 2001). However, this technique is threatened with somaclonal variation occurrence due to a lack of meristem in the initial explant and presence of callus. In the future, somatic embryogenesis (regeneration of embryos from somatic cells without meiosis and fertilization) will probably be most popular. The technique is highly efficient allowing for the regeneration of hundreds of embryos from a single explant. The structures are bipolar and therefore, do not require additional rooting, which makes the protocol easier, faster and less expensive (KULUS, 2014a). According to Becwar, the number of possible to obtain somatic embryos from 1 g of fresh embryogenic callus may reach from 200 to even 1,500 (LATKOWSKA, 2002). With *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. it was possible to regenerate approximately 190 embryos from 1 g of explant tissue (LEMA-RUMIŃSKA AND KULUS, 2012). As for *Chrysanthemum x grandiflorum* 'Euro' 42 somatic embryos per one leaf explant were regenerated after 5 weeks on MS medium with 9.05 µM kinetin (KIN) and 9.29 µM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Plantlets were obtained by culturing of embryos on hormone-free MS medium and successfully acclimated in the glasshouse (NAING ET AL., 2013).

DEVELOPMENT OF MICROPROPAGATION INDUSTRY IN POLAND AND IN THE WORLD

ANNUAL WORLD production of ornamental plants by *in vitro* cultures (about 160 genera) in only the past 10 years has increased from 600-800 million to 2 billion, which is over 10% annually (ROUT ET AL, 2006; WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012). By comparison, in 1990 the number of plants produced per year by a single European commercial laboratory ranged from 1,000 to 11.6 million, with a total estimated production of the commercial sector reaching 180–210 million plants (RÍORDÁIN, 1992). The fastest growth of plant production by tissue culture was recorded in the years 1985-1990. During that time the production increased by about 550% (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012). The only exception within the decrease of *in vitro* plant productions are nurseries. Many commercial nurseries that started tissue culture laboratories abandoned them later, having discovered that they were too costly to operate (READ, 2007; ILCZUKET AL., 2013).

Research on *in vitro* reproduction of ornamental plants has been carried out for years in both scientific and some commercial laboratories. Most of them by trial and error techniques (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012). In 1988 in Europe there were 291 (154 official/137 commercial) laboratories functioning. In 1990 their number increased to 421 units (248 official/180 commercial) located within 17 countries. Most of them (248) were located in the Western part of the continent (mostly France—58, Netherlands—54 and Germany—53) with a total production of 212.5 million plants. Mainly ornamental plant species were micropropagated (157 million) (PIERIK, 1991). Gross of quantity of the production ob-

jects were small units. In 1988-1990, 30-40% of commercial laboratories employed 1-3 people, while 32% of official laboratories were of that size. Such small units are often ephemeral. On the other hand, nearly 25% of facilities had a production of $>10^6$, with a mean price of 0.3 ECU per plant. In 1992 the survey showed a total of 3,176 people working in the plant tissue culture industry (8 persons and 8 clean work stations per laboratory) (RÍORDÁIN, 1992). In 1995-1996, the entire European *in vitro* production reached 160 million plants (40 million in Poland alone, which at that time was ranked fifth in Europe) (ROUT, 2006). In the years 1996-1997, there were already 505 *in vitro* laboratories operating in Europe, of which 312 were official and 193 were commercial units (in Poland: 24 official and 7 commercial laboratories) (RÍORDÁIN, 2000). It is worth noting that the number of official laboratories is always higher than that of commercial ones. However, it is the commercial ones which employ more workers. In 1990 a mean of 10.5 people were working in commercial units, while only 6.1 in official ones (RÍORDÁIN, 1992). At the end of the last century, Poland was ranked third in terms of European plant production *in vitro* (these were mainly anthurium, pelargonium, orchids and especially potted perennials with ornamental foliage: *Calathea*, *Maranta*, *Croton*). The plants micropropagated there were exported, mostly to Germany and Holland (JERZY AND KRZYMIŃSKA, 2005). With the advent of the 20th century, the European production of plants *in vitro* significantly decreased as a result of shifting laboratories to Asia, mainly India and China (due to lower labour costs: 0.45\$ per rooted microshoot in the EU and 0.03\$ in Asia). In 2001/2002, there were only 292 official and 139 commercial laboratories in Europe remaining (in Poland – 40 and 7, respectively) (Ríordán, 2002). India with its low cost, skilled

labour as well as scientific manpower has a natural advantage. Additional advantageous factor is favorable tropical climate (which enables low heating costs in the laboratory/growth room required to maintain the temperature for optimum growth of the cultures and during plant acclimatization). In 2007, there were 46 established commercial tissue culture units in India. Their annual production capacity ranged between 1 million to 5 million plants (aggregate production capacity of 180 million plantlets per year) (TOMAR ET AL., 2007). Today, there are more than 70 established commercial tissue culture units there (BHOITE AND PALSHIKAR, 2014). Their production capacity ranges between 0.5 million to 10 million plants per annum (mainly *Aloe vera* L., *Anthurium*, *Cymbidium*, *Gerbera*, *Geranium*, *Lilium*, *Syngonium*) with an aggregate production capacity of about 200 million plantlets per year. In China, out of almost 300 species and cultivars of ornamental plants that can be micropropagated, about 100 have achieved commercial production. About 15,000-20,000 people in 2,500-3,000 enterprises are engaged in the tissue culture industry (LIU AND LIU, 2010). However, nowadays the production is returning to Europe, due to the worsening quality of Asian products and high costs of air transportation for plants (GABRYSZEWSKA, 2013).

Presently the main world producers of plants *in vitro* are: Italy and Holland (44% share of the market), Japan and Indonesia (34%) and the U.S. (14%) (GABRYSZEWSKA, 2013). Australia, South America and Africa control 6; 6 and 3% of the market, respectively (SHARMA, 2010). In Poland, there are about 20 commercial laboratories functioning, where the number of 40–100 million plants are annually produced (80–90% are ornamental species). Most of them (80%) are exported (mainly roses and chrysanthemums) to Holland, USA, Great Britain, Spain, Israel, Hungary, Czech

Republic, Turkey, Lithuania, USA, Ukraine and Russia (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012; ILCZUK ET AL., 2013). Most of the laboratories in Poland (16) are located in five central provinces. Generally, in Europe, in contrast to the U.S., such units are highly decentralized (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012).

The most important factor affecting the development of production via tissue cultures is the demand for the material produced via this technology (WRÓBLEWSKA AND RUDZKI, 2012). Four main groups of plants propagated under *in vitro* conditions can be distinguished. These are: 1) perennials (such as: *Chrysanthemum*, *Delphinium*, *Gentiana*, *Geranium*, *Hosta*, *Primula*, *Sedum*), 2) trees, shrubs and climbers (e.g. *Rhododendron*, *Rosa*, *Hydrangea*, *Magnolia*, *Syringa*), 3) potted plants (e.g. *Alocasia*, *Calathea*, *Ficus*, *Maranta*, *Syngonium*, *Yucca*), and 4) cut flowers (*Anturium*, *Lilium*, *Rosa*) (GABRYSZEWSKA, 2013). Perennials are the largest and most often reproduced group (in both commercial and scientific laboratories all around the globe). Their micropropagation protocols are also the best known. Trees and shrubs are more complicated in micropropagation (Liu and Liu, 2010). Quite often they require special media for woody plants WPM (LLOYD AND MC COWN, 1980) instead of the typically used MS medium. Therefore, their assortment is limited. It is mainly used to establish nurseries and in the production of certified nursery stock. However, interest in these plants is growing. Among this group, species of the *Rhododendron* and *Ficus* genera are the most frequently produced *in vitro* worldwide, while *Hydrangea*, *Kalmia* and *Pieris* are less popular. The least frequently studied and propagated are species used for cut flowers (GABRYSZEWSKA, 2013).

TISSUE CULTURE LABORATORIES

WORKING WITH PLANT TISSUE cultures requires access to a professional laboratory. Properly designed laboratories can reduce both the operational and energy costs. A tissue culture laboratory must be planned to accommodate the equipment and its use in the various stages of micropropagation. Contaminated materials and equipment cannot have any contact with the disinfected labware (so at least two rooms are necessary). The minimum area required for media preparation, transfer and primary growth shelves is about 14m² (AHLOOWALIA AND PRAKASH, 2002).

A typical tissue culture laboratory consists of: changing rooms (one for dirty and one for clean clothes), media preparation room, sterilization and storage room(s), transfer room (with laminar air-flow chambers – the most important work area, where the core activity takes place) and the growth room. Most plant tissue cultures for growth require room temperature (17–27°C, optimally 24–26°C) and a not too intense light ($8\text{--}15 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}/20\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Photoperiod is usually set to 16 hours of light and 8 hours of darkness. Air humidity is usually not controlled since it is very high in the culture vessel (even 100%).

Plant tissue culture laboratories have to be properly equipped, which is the main cost of such units reaching over 40%, i.e. more than buildings and greenhouses together (Table 1). The basic equipment in most tissue culture facilities includes the following: autoclave – necessary to sterilize media and other labware since spores of some fungi and bacteria only die at 121°C and at high pressure (0.1MPa); laminar air-flow chamber, which allows for culture initiation, handling and transfer from one vessel to another under a contamination-free en-

vironment (the chamber is equipped with high efficiency particulate air filters–HEPA with a pore diameter of 0.3μm, which stop any mechanical particles, even such as small viruses and viroids), UV lamps for room disinfection, weight scales (technical and analytical), pH meter, refrigerator-freezer to store chemicals and stock solutions, a magnetic stirrer for the agitation, redistiller for media preparation, gas flamed burners or glass-bead sterilizers, scalpel and forceps holders. Optionally, binoculars to excise small explants, drying oven and a laboratory glassware washer can be useful. Some large-sized commercial laboratories have sterile rooms in addition to laminar flow cabinets, but such equipment is usually very expensive (BHOITE AND PALSHIKAR, 2014).

HEAD	COST [%]
Land	3.0
Land development	3.4
Buildings	21.5
Utilities	9.8-19.0
Equipment	29.0-42.3
Green and shade house	18.3
Miscellaneous fixed asset	1.7

TABLE 1. Percentage share of fixed assets of tissue culture laboratories (based on TOMAR ET AL., 2007; BHOITE AND PALSHIKAR, 2014).

— HOW TO REDUCE COSTS? —

HIGH PRODUCTION COSTS are the main factor limiting the development of micropropagation technology. According to KOZAI (1991), micropropagated plants are 10 times more expensive than seedlings produced with a semi-automatic plug system. The potential of micropropagation can be tapped by cutting down the cost of production per plant by applying low-cost tissue culture, adopting practices and proper use of equipment and resources to reduce the unit costs of



FIGURE 1. Plastic bags are a good alternative to glass vessels as they require less space, are inexpensive and lightweight.

plant production without compromising the quality (SHARMA AND AGRAWAI, 2012).

The main obstacle is the labour/manpower, its cost, education and experience (Table 2). A micropropagation unit with an annual production capacity of 3 million plantlets may need 40–50 people at various positions including managerial, supervisory, skilled and unskilled (BHOITE AND PALSHIKAR, 2014). In developed countries, manpower can reach 60–80% costs (TOMAR ET AL., 2007) while in developing ones about 40% (BHOITE AND PALSHIKAR, 2014). In comparison, total material costs are about 20–40%, while amortization – 13% (BACH, 2004). Automation with the use of robots and bioreactors is suggested for reducing production costs and increasing micropropagation efficiency, provided that asepsis is maintained (SHARMA AND AGRAWAI, 2012). The labour cost comes down from conventional to semi-automated model by 50-70% and in fully automated model by

75% (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002). In order to maintain high efficiency, the employees should work not more than 4 hours per day under laminar flow hoods, they and preferably on a single bench. Afterwards they should undertake other operations, e.g. glassware washing, media preparation, etc. (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002).

RECURRING EXPENSES [PER MONTH]	COST [%]
Raw material	43.4
Manpower	35.0-41.8
Utilities (power, water)	7.8-19.0
Contingencies (marketing, office expenses, repair, etc.)	6.8-17.0

TABLE 2. Percentage share of monthly recurring expenses in a micropropagation laboratory (based on TOMAR ET AL., 2007; BHOITE AND PALSHIKAR, 2014).

The composition of the culture media has a tremendous influence on production costs. Sucrose and agar are the chief constituents which play a significant role in cost of production (BISWAS ET AL., 2014). Substitution of these and others medium components can greatly reduce costs and even improve the plantlets quality. For example, (re)distilled water can be substituted by boiled tap water. The latter costs only one third of the former, while a pH value of 6.0-6.5 is suitable for most ornamentals (LIU AND LIU, 2010). There was also no difference between chrysanthemum plants grown on medium with refined sucrose or table sugar (TEIXEIRA DA SILVA, 2014). Another possibility is applying sugar-free media. They have been successfully used with: *Chrysanthemum × grandiflorum*, *Cymbidium grandiflorum* Griff., *Dianthus caryophyllus* L., *Gypsophila paniculata* L., *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f., *Limonium sinuatum* (L.) Mill., *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.,

Anthurium andraeanum Linden ex André, *Spathiphyllum* 'Pallas' (Liu and Liu, 2010). As for such media, the contamination rate is lower and there are more new leaves than when cultured in sugar medium. Photoautotrophic micropropagation significantly increased the chrysanthemum shoot mass relative to control plants, even when the density of plants was doubled (TEIXEIRA DA SILVA, 2014). Furthermore, such plantlets are easier for acclimatization since they are autotrophic in comparison to the heterothropic ones from the sugar media. Also, natural extracts can be used instead of expensive PGRs. For example, there are some amino acids, 6-benzyl adenine (6-BA) and indoleacetic acid (IAA) in bamboo-shoot syrup (JIA ET AL., 1997 cited in LIU AND LIU, 2010). Also bean sprout juice and tomato juice are rich in vitamin B and C, which can increase callus induction (Dong and Li, 2007). The combination of 6-BA, NAA and aloe juice with appropriate concentrations could shorten the induction time and increase the induction rate of the clustered buds in *Begonia x hiemalis* Fotsch. (ZHANG ET AL., 2008). The most popular gelling agent (agar) can be substituted by konjac glucomannan, starch or isabgol, which not only reduces the cost, but also increases the quality of rooted plantlets. Coagulant composed of carrageen ($4\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) or xanthan ($0,5\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) costs 0.038 USD per $1 \cdot \text{dm}^3$ – only 20% of the cost of agar. Alternate media components are especially valuable during rooting. Here glass beads, glass wool, quartzite, foam, absorbent cotton, vermiculite, perlite, rockwool plugs, ceramic fiber and plant fiber can be used as support material instead of agar. These components can improve the medium porosity, gas diffusion and oxygen concentration which are favorable for rooting (PIERIK, 1991; LIU AND LIU, 2010). Reduction in the cost of basal salts can also contribute to the reduction in

the unit price of tissue culture produced plants. Therefore, alternatives to MS media are continuously developed for commercial purposes (BISWAS ET AL., 2014). Furthermore, bacteriostatic agents extracted from plants can be used for sterilization by adding them directly to the medium instead of autoclaving (LIU AND LIU, 2010). Experiments showed that, by using plantiotics instead of autoclave, the contamination rate could be kept in the acceptable level under 10% (CUI ET AL., 2004). Pressure cookers heated with gas can also be used rather than autoclaves in commercial production. This allowed CURVETTO ET AL. (2006) to obtain 60% clean cultures (80% in the 'traditional', i.e. autoclaved method) from *Lilium longiflorum* Thunb. 'Snow Queen' bulb scales. In recent years, several researches have been carried out in order to develop semi-automatic systems that use the principle of the growth in temporary immersion with the aim to avoid the tissue hyperhydricity and save medium (so-called RITA system). One should keep in mind though, that such systems can only be autoclaved few times and then replaced with new ones. Media used for micropropagation are a source of all necessary macro- and microelements, as well as, vitamins essential for plant development and growth. However, after a few weeks of culture the explants/microshoots are transferred to fresh media and the 'used' ones are treated as garbage. This is most unfortunate, because except for carbohydrates (which are rapidly metabolized by the plant, i.e. within two weeks from culture establishment – BOGUNIA AND PRZYWARA, 1999) other media components are still available, and potentially useful. HERMANN AND ZALEWSKA (2012) and HERMANN ET AL. (2012) developed an efficient method of solidified MS medium dehydration and granulation after using it for micropropagation. This allows for the production of a valuable fertil-

izer, which can be used in the further *ex vitro* growth of the plant (after mixing it with the substrate). By this means costs are highly reduced. This technology is already being applied by commercial *in vitro* laboratories in Poland.

The control of physical factors is also important. Electricity is the second major factor contributing to high costs. It can reach 20 to even 60% of production costs, depending on the country (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002; TOMAR ET AL., 2007). A large portion of electrical energy is used for autoclaving, air filtration in laminar-flow cabinets, lighting of the growth room and air conditioning (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002). Establishing a plant tissue culture laboratory in a suitable geographical area of low temperature and high humidity can reduce electricity cost (TOMAR ET AL., 2007). In a facility which produces five million plants, the electricity cost per thousand plants is around \$0.30 U.S. in Bangalore and Pune (India); the same is about U.S. \$0.80 in Delhi (AHLOOWALIA AND PRAKASH, 2002). Artificial lighting of cultures in the growth rooms is one of the most expensive. Lighting of shelves and cooling of the culture room consumes a major portion (85%) of electricity. At the same time this system is usually highly inefficient since fluorescent lights used for illumination provide minimal energy required for photosynthesis – lack of red and far-red part of natural daylight (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002). Fluorescent lamps (typically used with tissue cultures) can be substituted with light-emitting diodes (LEDs). Using LEDs can reduce energy consumption and enhance plantlet quality. Compared with fluorescent light, LEDs showed the obvious advantages on plantlets dry mass and carbohydrate contents (XU ET AL., 2009). Changing illumination from artificial to diffused natural light under plastic or glass is another low cost option in tissue culture. Moreover, plants hardened under such light are sturdy, and withstand acclimatization better in the field (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002). Such natural conditions have been used in "Bio-factories" in Cuba (BAEZAS-LOPEZ, 1995). Temperature control is another factor. Fluctuations in temperature during day and night can also allow to save expenses, without interfering the plants growth (CYBULARZ-URBAN et al., 2015).

According to the thermal requirements of different species for different micropropagation stages, accurate control of temperature gives the greatest savings.

Using simple plastic (polypropylene) bags as culture containers, instead of glass jars, can be done as observed in Belgian ILVO (Fig. 1). These bags are lightweight and can be hung in a greenhouse and reduced production costs by 60% (SAVANGIKAR, 2002 cited in AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002).

The unit cost of a plantlet is also highly determined by the efficiency of the protocol. The higher the multiplication rate, the lower the cost will be. Increase in shoot multiplication rate from 1.5 to 5, reduces labour cost of tissue culture by 96% per plant (AHLOOWALIA AND SAVANGIKAR, 2002). Lessening the number of stages during micropropagation will also lower the plant cost. Finally, the percentage of plants surviving acclimatization, contribute immensely to the unit cost of a microshoot (TOMAR ET AL., 2007).

CONCLUSION

THE PAST 40 YEARS have witnessed a series of systematic biotechnological advances made in horticultural production. These encompass optimization and establishment of *in vitro* culture techniques including somatic embryogenesis, synthetic seed production, plant regeneration via callus-mediated shoot organogenesis, adventitious shoot regeneration, haploids induction and genetic transformation (NAIK AND CHAND, 2011). These techniques are now widely applied in agriculture – the so-called green biotechnology (HUSSAIN ET AL. 2012). Micropropagation has developed from a research procedure to a major commercial operation due to its potential to produce millions of identical clones within a short span of time. However, high costs and small scales of plantlet demands are the main factors limiting its faster development (KERR-LIDDELL, 2008). Commercial micropropagation is profitable only when 100,000 plantlets of a single cultivar are sold. If the quantity of plantlets is less than one million, the price may be the same or even higher than that of cuttings or grafts (LIU AND LIU, 2010). Over 70% of the questioned Warsaw inhabitants admitted they would buy more plants if they were cheaper (JABŁOŃSKA AND GNIEWOSZ, 2007). Also in western societies the demand for plants depends on

demographic, seasonal and price factors (PALMA AND WARD, 2010). Therefore, simplifying or substituting culture medium (especially gelling agents) and plant growth regulators (PGRs), energy-saving environments, optimization of culture procedures, application of new culture systems (e.g. RITA) and apparatus (bioreactors) and integrated cost control are possible ways to promote commercial micropropagation of ornamental plants (BHATTACHARYA ET AL., 1994, LIU AND LIU, 2010). Other obstacles associated with micropropagation are: low regeneration rates of some species or cultivars, microshoot disorder manifested by tissue hyperhydrycity (the so-called vitrification), asynchrony of somatic embryos development and conversion and the occurrence of somaclonal variation (KULUS, 2014b). Another problem is the fact that research is not closely associated with production. Studies on micropropagation are conducted at research laboratories in universities, while commercial production is often carried out in small private units. There is a long path of technology transfer from universities to enterprises (LIU AND LIU, 2010). Furthermore, in 1990 no commercial firms were primarily interested in basic research (RÍORDÁIN, 1992). It would be better for a larger enterprise to have its own scientific research or technological development team on plant tissue culture. Despite these issues, *in vitro* tissue culture and micropropagation are believed to be the future of modern horticultural industry.

REFERENCES

- AHLOOWALIA B. S., PRAKASH J. 2002. Physical components of tissue culture technology. [In:] International Atomic Energy Agency, Low-cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna. Vienna, Austria, August 26-30.
- AHLOOWALIA B.S., SAVANGIKAR V.A. 2002. Low cost energy and labour. [In:] International Atomic Energy Agency, Low-cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna. Vienna, Austria, August 26-30.
- BACH A. 2004. Rozmnażanie wegetatywne. [In:] Biotechnologia Roślin. MALEPSZY S. (ed.) Wydawnictwo PWN, Warszawa, 261-272.
- BAEZAS-LOPEZ P. 1995. Cubans enlist the sun in virus-free propagation. Ceres 156: 15-16.
- BHATTACHARYA P., DEY S., BHATTACHARYYA B. C. 1994. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37, 15-23.
- BHOITE H. A., PALSHIKAR G. S. 2014. Plant tissue culture: A review. World Journal of Pharmaceutical Sciences 2 (6), 565-572.
- BISWAS K., BISWAS R., NEGI P. 2014. Novel low-cost culture media "KFA and KFA Plus" for micropropagation of *Mentha* spp. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3 (4), 172-182.
- BOGUNIA H., PRZYWARA L. 1999. Rola cukrów w roślinnych kulturach *in vitro*. Wiadomości Botaniczne 43(1/2), 25-36.
- CUI G., SHAN W. X., QIN X., SUN Z. X. 2004. The preliminary study on plant open-tissue-culture. Journal of Shandong Agricultural University 35 (4), 529-533.
- CURVETTO N., MARINANGELI P., MOCKEL G., 2006. Hydrogen peroxide in microprop-

- agation of *Lilium*. A comparison with a traditional methodology. *Biocell* 30(3): 497-500.
- CYBULARZ-URBAN T., HANUS-FAJERSKA E., BACH A. 2015. Callus induction and organogenesis in vitro of *Cattleya* from protocorm-like-bodies (PLBs) under different light conditions. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 14(6), 29-38.
- DEBNATH M., PANDEY M., SHARMA R., THAKUR G. S., LAL P. 2010. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: a unique fiber yielding plant with medicinal property. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (3), 177-187.
- DONG S. Q., LI B. W. 2007. Effects of natural extracts on callus induction of *Davidia involucrata* Baill Stem. *Journal of Anhui Agricultural Science* 35, 9176-9177.
- GABRYSZEWSKA E. 2013. Rozmnażanie in vitro roślin ozdobnych. [In:] Ogrodnictwo Ozdobne Sektorem Gospodarki Narodowej. RABIZA-ŚWIDER J., SKUTNIK E. (eds.). Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 41-48.
- GAUTHERET R. J. 2003. Plant tissue culture: the history. [In:] *Plant Tissue Culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. LAIMER M. and RÜCKER W. (eds). Springer, Vienna, 105-113.
- GOŁAS J. 2013. Produkcja i obrót roślinami ozdobnymi w Holandii. [In:] Ogrodnictwo Ozdobne Sektorem Gospodarki Narodowej. RABIZA-ŚWIDER J., SKUTNIK E. (eds.). Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 21-24.
- HENSCHKE M., PANKOWSKA K. 2013. Popyt na rośliny doniczkowe do dekoracji wnętrz w świetle badań ankietowych w Poznaniu. *Journal of Agribusiness and Rural Development* 4(30): 47-57.
- HERMANN J., ZALEWSKA M. 2012. Sposób dehydratacji agaru po mikrorozmnażaniu roślin. Patent no 211604.
- HERMANN J., ZALEWSKA M., HARASIMOWICZ-HERMANN G., LEMA-RUMIŃSKA J., TROCZYŃSKI M. 2012. Sposób porowania pożywki zestalonej agarem przeznaczonej do mikrorozmnażania roślin. Patent no 211611.
- HOHE A., WINKELMANN T., SCHWENKEL H-G. 1999. Cell growth in and differentiation of somatic embryos from suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. in bioreactors. [In:] *Reproduction of Cyclamen persicum Mill. through somatic embryogenesis using suspension culture systems (EUR 19697)*. SCHWENKEL H. G. (ed.). Public European Commission Directorate-General for Research.
- HUSSAIN A., QARSHI I. A., NAZIR H., ULLAH I. 2012. Plant tissue culture: current status and opportunities. InTech, pp. 1-28.
- HVOSLEF-EIDE A. K., OLSEN O. A. S., LYNGVED R., MUNSTER C., HEYERDAHL P. H. 2005. Bioreactor design for propagation of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81 (3), 265-276.
- ILCZUK A. E., JACYGRAD K., JAGIEŁŁO-KUBIEC A., PACHOLCZAK X. 2013. Rozmnażanie in vitro roślin drzewiastych – perspektywy i problemy. [In:] Ogrodnictwo Ozdobne Sektorem Gospodarki Narodowej. RABIZA-ŚWIDER J., SKUTNIK E. (eds.). Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 41-48.
- JABŁOŃSK A. L., GNIEWOSZ, A. 2007. Demand for indoor pot plants in Warsaw in 2006. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnstwa* 15, 117-126.
- JABŁOŃSK A. L., PERZYŃSKA K. 2009.

The level of demand for ornamental plants in Warsaw in 2007 and its determinants. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnstwa* 17, 119-132.

JABŁOŃSK A L. OLEWNICKI D. 2013. Ekonomiczne aspekty ogrodnictwa ozdobnego w Polsce. [In:] Ogrodnictwo Ozdobne Sektorem Gospodarki Narodowej. RABIZA-ŚWIDER J., SKUTNIK E. (eds.). Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 13-20.

JABŁOŃSKA A L., ZYNTEK A. 2005. Kształtowanie się popytu na kwiaty cięte i doniczkowe w Warszawie w 2003 roku. *Zeszyty Naukowe Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnstwa* 13, 119-126.

JEONG I. M., CHO H. C., LEE J. M. 2004. Production and breeding of cacti for grafting in Korea. *Chronica Horticulturae* 44, 7-10.

JERZY M., KRZYMIŃSKA A. 2005. Rozmnażanie roślin ozdobnych in vitro. [In:] Rozmnażanie wegetatywne roślin ozdobnych. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego, Poznań, 83-105.

KERR-LIDDELL S. R. 2008. Commercial tissue culture in Europe. *EPPO Bulletin* 21(2), 203-206.

KOZAI T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. [In:] *Micropropagation: Technology and Application*. DEBERGH P. C., ZIMMERMAN R. H. (eds). Kluwer Academic Publishers, London, pp. 447-471.

KOZAK D. 2011. The influence of light quality and BA on in vitro growth and development of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Acta Scientiarum Polonorum – Hortorum Cultus* 10 (4), 65-73.

KOZAK D., DĄBSKI M., STELMASZCZUK

M. 2010. The influence of light colour and growth regulators on branching and rooting of *Tibouchina urvilleana* (D.C.) Cogn. shoots in vitro. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 551, 125-131.

KULUS D. 2014a. Biotechnological methods of ornamental plants reproduction. [In:] *Jakość życia w badaniach młodych naukowców*. MUCHA-SZAJEK E. (ed.). Instytut Naukowo Wydawniczy Maiuscula, Poznań, 87-104.

KULUS D. 2014b. Micropropagation of selected *Agave* species. [In:] *PhD Interdisciplinary Journal*. CZUBENKO M. (ed.). Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 75-84.

LATKOWSKA M. J. 2002. Somatyczna embriogeneza roślin iglastych na przykładzie świerka pospolitego (*Picea bies* [L.] Karst.). *Biotechnologia* 4, 210.-226.

LAWSON R. H. 1996. Economic importance and trends in ornamental horticulture. *Acta Horticulturae* 432, 226-237.

LEMA-RUMIŃSKA J., KULUS D. 2012. Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2,4-D concentrations. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus* 11(4), 77-87.

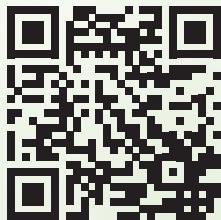
LEMA-RUMIŃSKA J., KULUS D. 2014. Micropropagation of cacti – a review. *Haseltonia* 19, 46-63.

LIU Q., LIU G. 2010. Commercial micropropagation of ornamental plants in China. *Chronica Horticulturae*, 50 (1), 16-20.

LLOYD G., MC COWN B. 1980. Commercially feasible micropropagation of moun-

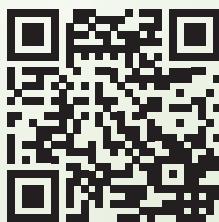
- tain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society 30, 421-427.
- MANI T., SENTHIL K., 2011. Multiplication of Chrysanthemum through somatic embryogenesis. Asian Journal of Pharmacy and Technology 1 (1), 13-16.
- MAROSZ A., 2013a. Określenie obecnej i prognozowanej wielkości produkcji grup producentów roślin ozdobnych, udział w rynku w ujęciu procentowym w Polsce i w odniesieniu do krajów UE. Instytut Ogrodnictwa Skierniewice, pp.2.
- MAROSZ A., 2003b. Analiza wielkości produkcji roślin szkółkarskich i róż (formuła wydajności i formuła kosztowa). Instytut Ogrodnictwa Skierniewice, pp. 2-4.
- MIESZKE W., SKUCIŃSKA B., PAWŁOWSKA H. 1987. Sposób rozmnażania gerbery. Patent no 134708.
- MOREL G. 1960. Producing virus-free Cymbidiums. American Orchid Society Bulletin 33, 473-478.
- MOREL G. 1964. Tissue culture – a new means for clonal propagation of orchids. American Orchid Society Bulletin.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.
- NAIK S. K., CHAND P. K. 2011. Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: a review. Plant Cell Reports 30 (5), 707-721. DOI 10.1007/s00299-010-0969-7.
- NAING A. H., KIM C. K., YUN B. J., YIN J. Y., LIM K. B. 2013. Primary and secondary somatic embryogenesis in Chrysanthemum cv. Euro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 112(3): 361-368.
- PALMA M. A., WARD R. W. 2010. Measuring demand factors influencing market penetration and buying frequency for flowers in the U.S. International Food and Agribusiness Management Review 13(1): 65-82.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH E., DÁVILA-FIGUEROA C. 2002. In vitro propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). In Vitro Cellular and Development Biology - Plant 38 (1), 73-78.
- PIERIK R. L. M. 1991. Micropropagation of ornamental plants. Acta Horticulturae 289, 45-54.
- READ P. E. 2007. Tissue culture propagation: where we are, where we're going. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society 57, 371-379.
- RÍORDÁINF.Ó. 1992. The European plant tissue culture industry – 1990. Agronomie 12, 743-746.
- RÍORDÁIN F. Ó. 2000. The directory of European plant tissue culture laboratories 1996-97. COST Action 822, Newbridge Research Center, pp. 2-38.
- RÍORDÁIN F. Ó. 2002. The directory of European plant tissue culture laboratories. COST Action 843, Newbridge Research Center, pp. 8.
- ROSAS M. M., ROSA M. A., GOLDAMMER M., AVILA M. (2001). Micropropagation of *Turbinicarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant 37: 400-404.

- ROUTG.R., MOHAPATRAA., JAINS.M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24, 531-560.
- SENGAR R. S., CHAUDHARY R., TYAGI S. K. 2010. Present status and scope of floriculture developed through different biotechnological tools. *Research Journal of Agricultural Sciences* 1 (4), 306-314.
- SHARMA P. 2010. Emerging biotech business opportunities. *Biotech Consortium India*, 33-43.
- SHARMA S. D., AGRAWAL V. 2012. Tissue culture aspects of ornamental plants. *Journal of Biotechnology* 1 (1), 40-48.
- SCHIMMENTI E., ASCIUTO A., GALATTI A., VALENTI M. 2010. Consumers of flowers and ornamental plants: an exploratory survey in the italian «Mezzogiorno» regions. *New Medit* 3, 36-46.
- SKOOG F., TSUI C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem and callus. *American Journal of Botany* 35, 782-87.
- SKOOG F., MILLER C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11, 118-131.
- TEIXEIRA DA SILVA J. A. 2014. Novel factors affecting shoot culture of chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflora*). *Botanica Lithuanica* 20(1), 27-40.
- TOMAR U. K., NEGI U., SINHA A. K., KUMAR P. 2007. An overview on economic factors influencing micro-propagation. *My Forest* 43, 523-534.
- WRÓBLEWSKA W., RUDZKI P. 2012. The production tendency of ornamental plants by tissue culture in Poland and the world. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia* 22 (4), 18-27.
- XU Z. G., CUI J., JIAO X. L. 2009. Biological effects and energy efficiency of different spectral energy distributions from LED on plantlets in vitro. *Acta Horticulturae Sinica* 9, 241-247.
- ZALEWSKA M., LEMA-RUMIŃSKA J., MILER N. 2007. In vitro propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae* 113, 70-73.
- ZENKTELER M., ZENKTELER E. 2013. 65 years of in vitro culture in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82(3): 183-192.
- ZHANG R. Y., JI Q., YU F. 2008. Effects of plant hormones and Aloe juice on rapid propagation in Rieger begonia. *Journal of Anhui Agricultural Science* 36 (20), 8477-8479.



WARUNKI PUBLIKACJI

1. Czasopismo działa w systemie Open Acces.
 2. Redakcja szczególnie jest zainteresowana artykułami z następujących dziedzin nauk przyrodniczych: agrobioinżynieria, biochemia, biologia, biotechnologia, chemia, ekologia, farmacja, medycyna, ochrona środowiska, ogrodnictwo, technologia przetwórstwa żywności, toksykologia, zoologia, zootechnika, żywienie człowieka i inne.
 3. Tekst musi zwierać następujące informacje: tytuł pracy, imię (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), nazwę i adres zakładu pracy (w przypadku uczelni: nazwę uczelni, wydział, katedrę/za- kład/ instytut, adres), adres poczty elektronicznej (e-mail).
 4. Do pracy należy dołączyć krótkie (nieprzekraczające 300 wyrazów) streszczenie w jęz. angielskim (wraz z tytułem) i polskim, informujące o zasadniczej jej treści. Dodatkowo w obu językach należy podać maksymalnie 5 słów kluczowych.
 5. Czasopismo publikuje prace w języku polskim lub angielskim.
6. Tekst:
- musi zawierać wstęp, podsumowanie/wnioski i literaturę oraz podział tekstu właściwego na nagłówki;
 - czcionka Times New Roman;
 - odstępy między wierszami: 1;
 - bez używania wyróżnień (np. podkreślenia), z wyjątkiem kursywy;
 - wyraźne odznaczenie tytułów i nagłówków bez ich centrowania;
 - zaznaczenie akapitów;
 - wszystkie śródtytuły bez numeracji, czcionką tej samej wielkości;
 - cytowane w tekście prace zaznaczamy przez podanie nazwiska autora(ów) (pisanych kapitalizowanymi literami) i roku publikacji w nawiasie półokrągłym, np. (BORKOWSKI, 2013), (FORNALIK I WSPÓŁAUT. I IN., 2011);
 - cytowaną literaturę należy zestawić na końcu maszynopisu bez numeracji, w alfabetycznej kolejności, według nazwisk autorów, w następujących formatach:
artykuł:
TAMASKI J. S., ZOMBAN M. 1999. Jak pisać artykuł. Nauki Przyrodnicze 1, 11-15.
rozdział:
GORTAT M. 2012. Fitinyany – substancje antyodżywcze w żywieniu ludzi i zwierząt.[W:] Toksykczne substancje chemiczne. LIPIŃSKI W. (red.). Instytut Naukowo-Wydawniczy SPATUM., Radom, 107-127.
książka:
SEIDENSTICKER J. 1992. Wielkie koty, królewskie stworzenia dzikiego świata. Elipsa, Warszawa.



WARUNKI PUBLIKACJI

7. Rysunki, schematy i fotografie:

- mają być wykonane w jednym z formatów: *.cdr, *.eps, *.tif, *.psd i dostarczone jako osobne pliki wraz ze zbiorem tekstowym. Redakcja nie przyjmuje figur w formacie: .doc czy .rtf;
- opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką odpowiedniej wielkości, nie mniejszą niż 12 punktów;
- podpisy pod rycinami powinny być zamieszczone na końcu artykułu na osobnej stronie;
- redakcja zaznacza sobie prawo odmówienia przyjęcia artykułu z uwagi na nieczytelny rysunek;
- autor artykułu oświadcza, że ma prawa autorskie do publikowanej grafiki;
- w przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, należy uzyskać z wydawnictwa zgodę na przedruk;

8. Do pracy należy dołączyć list przewodni, podpisany przez wszystkich autorów, zawierający następujące informacje (wzory pism znajdują się na stronie www.naukiprzyrodnice.ssnp.org.pl):

- oświadczenie o oryginalności artykułu i nieskładaniu analogicznej pracy do druku w innym czasopiśmie;
- określenie wkładu poszczególnych autorów w powstanie tekstu;
- informacje o źródłach finansowania (np. grant) w przypadku prac oryginalnych (podpisanie zgody na opublikowanie artykułu).

9. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i zwrotu poprawionego tekstu wiadomością e-mail do Redakcji w ciągu 4 dni od chwili otrzymania.

10. Przyjęcie pracy do druku jest równoznaczne z przeniesieniem przez Autora (Autorów) praw autorskich na rzecz Wydawcy.

11. Recenzja artykułu:

- do każdej oceny powołuje się co najmniej dwóch niezależnych recenzentów;
- rekomendowanym rozwiązaniem jest model, w którym autor(rzy) i recenzenci nie znają swoich tożsamości (tzw. „double-blind review proces”);
- ma mieć formę pisemną i kończyć się jednoznaczny wnioskiem co do dopuszczenia artykułu do publikacji lub jego odrzuceniu.

12. Kontakt z Redakcją:

Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych

ul. Wyżynna 20/56, 20-560 Lublin

e-mail: kontakt@ssnp.org.pl

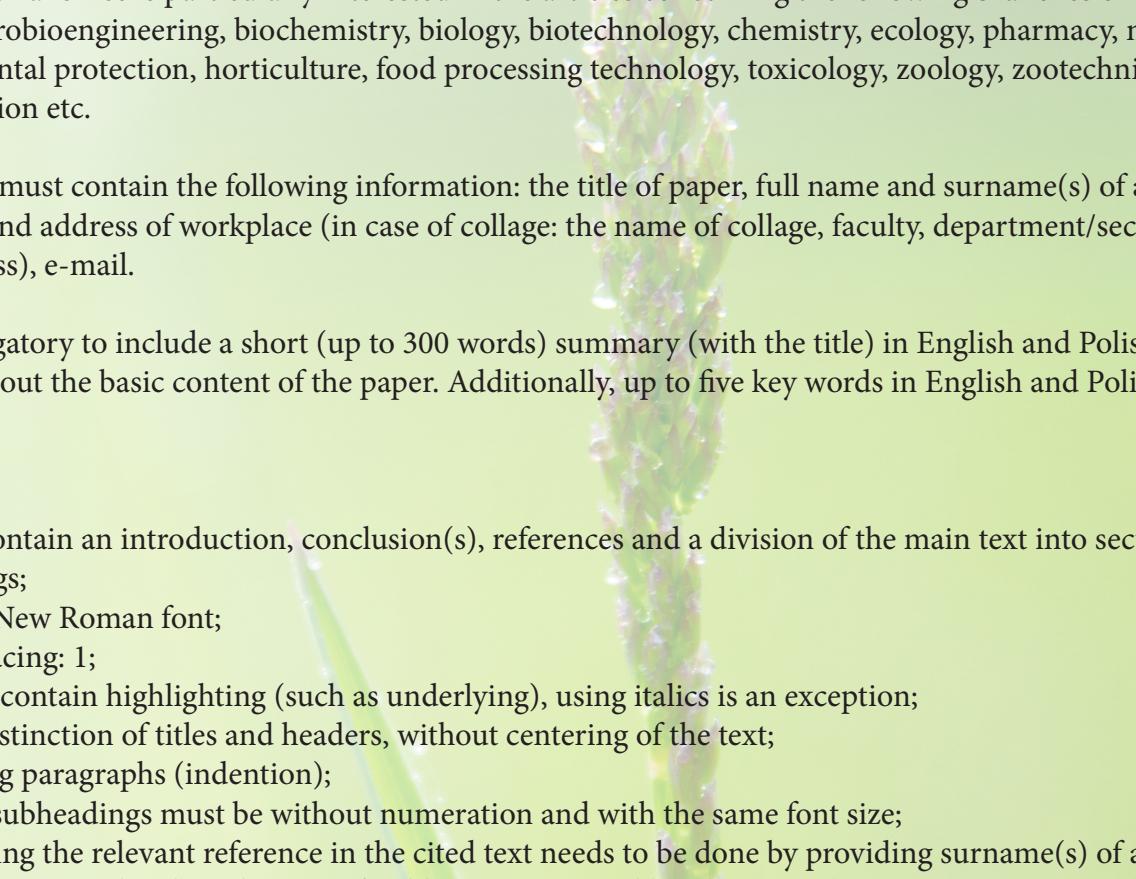
Redaktor naczelny: Mateusz Gortat, tel. 661 657 875

13. Artykuły prosimy nadsyłać na adres e-mail: kontakt@ssnp.org.pl

14. Autor ponosi koszty wszystkich pozytywnych recenzji w wypadku nie naniesienia poprawek do artykułu, co skutkuje brakiem możliwości publikacji.



ACCEPTANCE RULES OF ARTICLE TO PUBLISH

- 
 1. The academic journal functions in Open Access system.
 2. The editorial office is particularly interested in the articles concerning the following branches of natural science: agrobioengineering, biochemistry, biology, biotechnology, chemistry, ecology, pharmacy, medicine, environmental protection, horticulture, food processing technology, toxicology, zoology, zootechnics, human nutrition etc.
 3. The text must contain the following information: the title of paper, full name and surname(s) of author(s), the name and address of workplace (in case of collage: the name of collage, faculty, department/section/institute, address), e-mail.
 4. It is obligatory to include a short (up to 300 words) summary (with the title) in English and Polish, informing about the basic content of the paper. Additionally, up to five key words in English and Polish must be added.
 5. The text:
 - must contain an introduction, conclusion(s), references and a division of the main text into section headings;
 - Times New Roman font;
 - line spacing: 1;
 - cannot contain highlighting (such as underlying), using italics is an exception;
 - clear distinction of titles and headers, without centering of the text;
 - marking paragraphs (indentation);
 - all the subheadings must be without numeration and with the same font size;
 - indicating the relevant reference in the cited text needs to be done by providing surname(s) of author(s) (all letters capitalized) and a year of publication in round brackets, e.g. (BORKOWSKI, 2013), (FORNALIK et. all, 2011);
 - the cited literature needs to be arranged in the end of typescript, without numeration, in the alphabetic order according to surnames of the authors, in the following way:

the paper:
MAKARSKI B., GORTAT M. 2011. Effect of supplementation with copper in different chemical forms on selected physiological blood markers and content of minerals In selected tissues of turkeys. J. Elem. 16/4: 591-602. DOI: 10.5601/elementa.2011.16.4.08

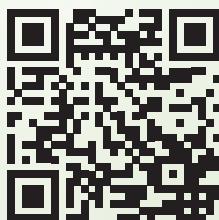
391-002

KULUS D. 2014a. Biotechnological methods of ornamental plants reproduction. [In:] Jakość życia w badaniach młodych naukowców. Mucha-Szajek E. (ed.). Instytut Naukowo Wydawniczy Maiuscula, Poznań, 87-104.

104.

books

SHARMA P 2010 Emerging biotech business opportunities Biotech Consortium India 33-43



ACCEPTANCE RULES OF ARTICLE TO PUBLISH

6. Drawings, diagrams and photographs:

- need to be provided in one of the following formats: *.cdr, *.eps, *.tif, *.psd and delivered as separate files with the text concerning them. The editorial office does not accept the files presented in .doc and .rtf format;
- descriptions on the drawing should be presented with the adequate font size (no less than 12);
- signatures under the drawing should be placed in the end of the article on a separate page;
- the editorial office reserves the right to refuse acceptance of the article due to unclear drawing;
- author of the article declares having copyright to the published graphics;
- if the authors intend to include in the article the illustrations of the cited authors of original works, the permission of the publisher to reprint the illustrations must be obtained.

7. Covering letter, signed by all the authors, needs to be included with the paper and should contain the following information:

- the statement about the originality of the article and not submitting the similar paper for publication in another journal;
- defining the contribution of individual authors in the creation of the text;
- information about the source of funding (e. g. grant) in the case of original works (signing permission to publish the article). The sample is available at www.naukiprzyrodnicze.ssnp.org.pl.

8. The authors are obliged to do proofread of the article and return the revised text via e-mail to the editorial office within four days from the date of receiving the article.

9. Acceptance for publication is tantamount to the transfer of copyright from the author(s) to the publisher.

10. The review of article:

- for each assessment at least two independent reviewers are appointed;
- the recommended solution is “double-blind evaluation process” in which both the reviewers and the authors do not know each other’s identity;
- is to be prepared in written form with the conclusion in the end which specify whether the article is going to be published or refused.

11. Contact:

Students Association of Natural Sciences

ul. Wyżynna 20/56, 20-560 Lublin

e-mail: kontakt@ssnp.org.pl

Editor in Chief: Mateusz Gortat, tel. 661 657 875

12. Please, send your article to the following e-mail: kontakt@ssnp.org.pl

13. The author bears the costs of all the positive reviews in the case of not making corrections to the article, as a result the article will not be approved for publication.



**Stowarzyszenie Studentów
Nauk Przyrodniczych**

www.ssnp.org.pl

www.naukiprzyrodnicze.ssnp.org.pl

