

EFEKTYWNOŚĆ ROZMNAŻANIA *in vitro* ZWARTNICY CHMIELA (*Hippeastrum* × *chmielii* CHM.) Z EKSPŁANTATÓW PĘDOWYCH I ŁUSKOWYCH¹

Maria Witomska, Monika Latkowska

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wstęp

Wiele gatunków roślin cebulowych odznacza się niskim współczynnikiem rozmnażania naturalnego i dlatego poszukuje się wydajnych metod ich rozmnażania *in vitro*. Źródłem eksplantatów inicjalnych bardzo często są cebule, ale istnieją duże trudności z ich skutecznym odkażaniem [GIRMEN, ZIMMER 1988; WITOMSKA i in. 1998; ZIV, LILJEN-KIPNIS 2000]. U licznych gatunków wykorzystuje się alternatywnie szypuły kwiatowe lub kwiatostanowe [SOCHACKI, ORLIKOWSKA 1997; WITOMSKA, ŁUKASZEWSKA 1997; ZIV i in. 1997]. Wprawdzie czas pobrania tych eksplantatów jest ściśle związany z fazą rozwojową roślin, ale uzyskuje się z nich zazwyczaj więcej cebulek przybyszowych, niż z eksplantatów łuskowych [ZIV, LILJEN-KIPNIS 2000]. Efektywne wykorzystanie materiału inicjalnego jest szczególnie ważne wówczas, gdy jest go niewiele, np. w przypadku nowo wyhodowanych pojedynków czy klonów roślin.

Celem pracy było określenie wpływu regulatorów wzrostu i rodzaju eksplantatu na różnicowanie cebulek przybyszowych zwartnicy Chmiela, nowej, pięknej rośliny z rodziny *Amaryllidaceae*.

Materiał i metody

Badania wykonano w latach 2003–2004. Materiałem były cebule zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum* × *chmielii* CHM.) o obwodzie 18 cm, wykopane w listopadzie ze szklarni i przechowywane przez 6 miesięcy w temperaturze 10–12°C. Po tym czasie cebule przeniesiono do temperatury 18°C i wówczas zaczęły z nich wyrastać pędy kwiatostanowe. Gdy osiągnęły one wysokość 5–6 cm (od piętki cebuli do podstawy kwiatostanu), wycinano je z cebul i odkażano przez 15 s w 70% alkoholu etylowym, a następnie 15 min w 1% roztworze Chloraminy T, po czym płukano trzykrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Pędy krojono na fragmenty grubości 2 mm i wykładano na pożywkę zgodnie z ich biegunowością.

¹ Badania wykonano w ramach grantu KBN No. 3PO6R 07724.

Cebule cięto na sadzonki dwułuskowe (15 mm wysokości i 8 mm szerokości) i odkażano jw., stosując 6% roztwór Chloraminy T i wydłużając czas odkażania do 20 minut.

Zastosowano trzy warianty pożywki MS [MURASHIGE, SKOOG 1962]: bez regulatorów wzrostu, wzbogaconą w $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ benzyloadeniny (BA) + $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu α -naftalenooctowego (NAA) lub $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ izopentyloadeniny (2iP) + $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA. Doświadczenie powtórzono w dwóch terminach (7.05. i 28.05.2004 r.). Inkubacja przebiegała w ciemności, w temperaturze 24°C . W każdej kombinacji wyłożono po 72 eksplantaty pędowe i łuskowe, pojedynczo do probówek o wymiarach $24 \times 145 \text{ mm}$ (10 ml pożywki na probówkę). Stopniowo usuwano eksplantaty zainfekowane. Po 2 miesiącach obliczono procent eksplantatów wizualnie czystych w stosunku do wyłożonych i przeniesiono je na świeże pożywki (jw.). Z każdej kombinacji wybrano losowo 25 eksplantatów i po następnym miesiącu oceniono: procent eksplantatów z cebulkami i korzeniami, liczbę cebulek na eksplantacie oraz wielkość cebulek i długość liści według 3 klas bonitacyjnych: 1) – cebulki małe, do 2 mm średnicy, o średniej świeżej masie $12 \text{ mg} \pm 1,2$; 2) – cebulki średniej wielkości, o średnicy 2,1 – 4 mm i średniej świeżej masie $53 \text{ mg} \pm 5,3$; 3) – cebulki duże, o średnicy 4,1 – 6 mm i średniej świeżej masie $112 \text{ mg} \pm 11,2$; 1) – liście do 4 cm długości; 2) – liście długości 4,1 cm – 8 cm; 3) – liście powyżej 8 cm długości. Następnie obliczono średnią klasę bonitacyjną dla każdej kombinacji. Określono także liczbę cebulek przybyszowych uzyskanych faktycznie z 1 pędu lub z 1 cebuli w danej kombinacji, uwzględniając zainfekowane (1 cebula = 25 eksplantatów pędowych i 25 eksplantatów dwułuskowych).

Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym. Wyniki opracowano statystycznie metodą dwuczynnikowej analizy wariancji z zastosowaniem programu Statgraphics 4.1. Różnice między średnimi oceniono na podstawie wartości NIR, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Prawie wszystkie wizualnie czyste eksplantaty pędowe (92–100%) i łuskowe (100%) różnicowały cebulki (tab. 1). Wyjątek stanowiły eksplantaty pędowe na pożywce bez regulatorów wzrostu, z których tylko 12–24% wytworzyło cebulki. We wcześniejszych badaniach nad zwartnicą Chmiela, po przechowaniu cebul matecznych w temperaturze 4°C uzyskano znacznie gorsze efekty [ILCZUK, WITOMSKA 2003]. Także po długotrwałym przechowaniu cebul zwartnicy mieszańcowej w temperaturze 5°C procent eksplantatów formujących cebulki spadał [PIERIK i in. 1990]. Eksplantaty pędowe nie różnicowały wcale korzeni, natomiast łuskowe tworzyły korzenie zależnie od kombinacji: na pożywce bez regulatorów wzrostu wytwarzały korzenie słabo (20–24%), podczas gdy obecność egzogennych regulatorów zwiększała udział eksplantatów z korzeniami od 56 do 68% (tab. 1).

Regulatory wzrostu miały wpływ na liczbę cebulek uformowanych wyłącznie na eksplantatach pędowych, natomiast na eksplantatach łuskowych różnicowało się zawsze od 1,7 do 2,0 cebulek (tab. 1). Na pożywce bez regulatorów wzrostu z fragmentów pędów powstawało średnio 0,6–0,9 cebulki, a obecność hormonów zwiększała ich liczbę nawet ponad 20-krotnie. W obydwu terminach zachowały się takie same tendencje i nie zaobserwowano różnic pomiędzy oddziaływaniem

BA i 2iP w badanym stężeniu na obydwa rodzaje eksplantatów. W przypadku zwartnicy mieszańcowej rozmnażanej z fragmentów pędów różne odmiany reagowały odmiennie na stężenie auksyny (NAA) oraz rodzaj i stężenie cytokiny [PIERIK i in. 1990]. Na eksplantatach pędowych zwartnicy Chmiela bez udziału regulatorów wzrostu wyrosły cebulki bardzo małe (poniżej 2 mm średnicy), z krótkimi liśćmi (poniżej 4 cm długości). Obecność obydwu kombinacji regulatorów wzrostu stymulowała formowanie większych cebulek (o średnicy powyżej 2 mm) i dłuższych liści (do 8 cm długości), (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Wpływ rodzaju eksplantatu i regulatorów wzrostu na efektywność różnicowania cebulek przybyszowych zwartnicy Chmiela

The effect of explant type and growth regulators on bulblet regeneration in *Hippastrum × chmielii* CHM.

Rodzaj eksplantatu Explant type	Regulatory wzrostu Growth regulators (mg·dm ⁻³)	Procent eksplantatów z* Percentage of explants with*		Liczba cebulek Eksplantat Number of bulblets per explant	Ocena bonitacyjna (Skala 1-3) Evaluation (Scale 1-3)		Liczba cebulek z 1 pędu lub 1 cebuli** Number of bulblets per 1 shoot or 1 bulb**
		cebulkami bulblets	korzeniami roots		wielkości cebulek bulblet size	długości liści leaf length	
Pędowy Shoot (7.05.)	0	12	–	0,6a	0,3a	0,09a	5
	2,0 BA+0,2 NAA	100	–	13,9b	1,4b	1,25d	122
	2,0 2iP+0,2 NAA	96	–	15,6b	1,4b	1,72c	136
Pędowy Shoot (28.05.)	0	24	–	0,9a	0,5a	0,26ab	18
	2,0 BA+0,2 NAA	100	–	16,0b	1,8b	1,72e	280
	2,0 2iP+0,2 NAA	92	–	14,9b	1,7b	2,05e	324
Łuskowy Scale (7.05.)	0	100	24	1,7a	2,3c	0,86cd	37
	2,0 BA+0,2 NAA	100	68	2,0a	2,5c	0,51bc	42
	2,0 2iP+0,2 NAA	100	56	1,8a	2,4c	0,42ab	37
Łuskowy Scale (28.05.)	0	100	20	1,8a	2,3c	0,88cd	32
	2,0 BA+0,2 NAA	100	68	1,9a	2,4c	0,43ab	33
	2,0 2iP+0,2 NAA	100	60	1,7a	2,5c	0,52bc	35

* liczba eksplantatów w kombinacji 25 = 100%; number of explants in the treatment 25 = 100%

** liczba cebulek faktycznie uzyskana w danej kombinacji; effective number of bulblets obtained in the treatment

średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy poziomie istotności wynoszącym 5%; means followed by the same letter are not significantly different at 5% level of significance

Z eksplantatów łuskowych powstawały zawsze cebulki największe (do 4 mm średnicy), a liście były najdłuższe na pożywce bez hormonów (tab. 1). Badania nad zwartnicą Chmiela potwierdzają tezę, że eksplantaty łuskowe wielu roślin cebulowych mogą wytwarzać cebulki przybyszowe bez udziału egzogennych regulatorów wzrostu ze względu na wysoką zawartość endogennych hormonów w organach spichrzowych [SEABROOK, CUMMING 1977; PIERIK i in. 1990; WITOMSKA 2001]. Jednak obecność auksyn i cytokinin stymuluje ten proces u lilii [NOVAK, PETRU 1981], szachownicy kostkowej [KUKULCZANKA i in. 1989] i szachownicy cesarskiej [WITOMS-

KA 2001]. Na eksplantatach łuskowych zwartnicy mieszańcowej różnicuje się więcej cebulek w obecności znacznej przewagi BA w stosunku do NAA [BACH, PTAK 1997; KUTYŁA, CHMIEL 2000], podobnie u *Hippeastrum vittatum* [ARTEAGA-AMADOR i in. 1998; SAKER i in. 1998] i *Amaryllis belladonna* [DE BRUYN i in. 1992]. U tej ostatniej rośliny zalecany stosunek BA : NAA zmienia się w ciągu roku i wynosi 24 : 1 na wiosnę i aż 40 : 1 jesienią. Mimo dziesięciokrotnie wyższego stężenia cytokinin (BA i 2iP) w stosunku do NAA u zwartnicy Chmiela nie powstawało więcej cebulek przybyszowych z eksplantatów łuskowych niż na pożywce kontrolnej.

Eksplantaty pędowe prawie zawsze wymagają obecności egzogennych regulatorów wzrostu do inicjacji cebulek [ZIV i in. 1997; PODWYSZYŃSKA 1999]. Zdolność do formowania cebulek z powyższych eksplantatów zależy także od temperatury i długości okresu przechowywania materiału inicjalnego [ZIV i in. 1997], jego stadium rozwojowego oraz od pozycji eksplantatu na pędzie, co potwierdziły badania nad tulipanem [TAE, ALDERSON 1987], *Crinum macowanii* [SLABBERT i in. 1995], *Amaryllis belladonna* [DE BRUYN i in. 1992] i narcyzem [ZIV i in. 1997].

U 3 odmian narcyzów: Heweliusz, Carlton i Dutch Master uzyskano z pędów kwiatowych maksymalnie 2,6 cebul przybyszowych i 2,7 pędów z eksplantatów łuskowych [SOCHACKI, ORLIKOWSKA 1997]. Spośród innych roślin z rodziny *Amaryllidaceae* udało się uzyskać z jednego eksplantatu pędowego 4 cebulki u *Haemanthus coccineus*, 12 cebulek u *Narcissus tazetta* i 10 cebulek u *Nerine sarniensis*. Z eksplantatów łuskowych tych roślin uzyskano znacznie mniejsze liczby cebulek (odpowiednio 0, 6 i 4) [ZIV, LILIEN-KIPNIS 2000]. U zwartnicy Chmiela z dłuższych szypuł (10–12 cm) formowało się 6–7 cebulek z eksplantatu [ILCZUK, WITOMSKA 2003, 2004]. W niniejszej pracy, gdy pobrano eksplantaty z szypuł długości 5 cm, uzyskano do 16 cebulek z eksplantatu 2 mm grubości, co można uznać za wysoką efektywność. Zastosowana metoda pozwala otrzymać w stadium inicjalnym do 350 cebulek przybyszowych z 1 cebuli matecznej.

Wnioski

1. Efektywne różnicowanie cebulek przybyszowych na eksplantatach pędowych zwartnicy Chmiela może zachodzić wyłącznie w obecności egzogennych regulatorów wzrostu.
2. Na eksplantatach łuskowych, niezależnie od obecności regulatorów wzrostu w pożywce, powstaje dużo mniejsza liczba cebulek (1,7–2,0) niż na fragmentach pędów w obecności regulatorów wzrostu (13,9–16,0).
3. W celu dobrego wykorzystania materiału inicjalnego należy pobierać jednocześnie młode pędy i łuski cebul.

Literatura

ARTEAGA-AMADOR M., PENA-GARCIA E., PEREZ-MONTESINO D., TORRIENTE-CAMPOS Z., KANG-CHOLGYU, KANG C.G. 1998. *Disinfection of Hippeastrum vittatum explants as*

determining factor for large scale propagation with commercial aims in Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 19: 103–111.

BACH A., PTAK A. 1997. Wpływ jakości światła na regenerację *hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*) w warunkach *in vitro*. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie* 318: 191–194.

DE BRUYN M.II., FERREIRA D.I., SLABBERT M.M., PRETORIUS J. 1992. *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 179–184.

GIRMEN M., ZIMMER K. 1988. *In vitro* – Kultur von *Galanthus elwesii*. I. Sterilisation, Regeneration, Phytohormone. *Gartenbauwissenschaft* 53: 26–29.

ILCZUK A., WITOMSKA M. 2003. Wpływ chłodzenia cebul matecznych i regulatorów wzrostu na regenerację *in vitro* zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum* × *chmielii* CHM.) z eksplantatów pędowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 491: 103–110.

ILCZUK A., WITOMSKA M. 2004. Wpływ chłodzenia cebul matecznych i regulatorów wzrostu na formowanie cebul przybyszowych zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum* × *chmielii* Chm.) *in vitro*. *Biotechnologia* 2: 185–190.

KUKUŁCZANKA K., KROMER K., CZĄSTKA B. 1989. Propagation of *Fritillaria meleagris* L. through tissue culture. *Acta Hort.* 251: 147–153.

KUTYŁA M., CIEMIEL H. 2000. Wpływ rodzaju pożywki oraz wielkości eksplantatu na rozmnażanie *Hippeastrum* × *hybridum* w kulturach *in vitro*. *Zesz. Nauk. Inst. Ssadown. i Kwiciar.* 7: 249–254.

MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.

NOVAK F.J., PETRU E. 1981. Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. *Sci. Hort.* 14: 191–199.

PIERIK R.L.M., BLOKKER J.S., DEKKER M.W.C., DE DOES H., KUIP A.C., VAN DER MADE T.A., MENTEN Y.M.J., DE VETTEN N.C.M.H. 1990. Micropropagation of *Hippeastrum hybridum*. Integration of *in vitro* techniques in ornamental plant breeding. Proceedings of Symposium 10–14 November. Eucarpia, Section ornamentals. Centre for Plant Breeding Research, The Netherlands: 21–26.

PODWYSZYŃSKA M. 1999. Regeneracja i rozmnażanie tulipana *in vitro*. *Mat. Konf. „Rozmnażanie roślin *in vitro*” Inst. Sadown. i Kwiciar. Skierniewice, 14.04.1999:* 14–20.

SAKER M., RADY M., EL-BAHR M. 1998. Towards commercial production of ornamental bulbs *in vitro*. *Egyptian J. of Hort.* 25(1): 113–128.

SEABROOK J.E.A., CUMMING B.G. 1977. The *in vitro* propagation of *amaryllis* (*Hippeastrum* sp. hybrids.). *In Vitro* 13: 831–836.

SLABBERT M.M., BRUYN DE M.II., FERREIRA D.J., PRETORIUS J. 1995. Adventitious *in vitro* plantlet formation from immature floral stems of *Crinum macowanii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43(1): 51–57.

SOCIACKI D., ORLIKOWSKA T. 1997. Inicjacja kultur narcyza z różnych eksplantatów. *Zesz. Nauk. AR w Krakowie* 318: 199–202.

TAEB A.G., ALDERSON P.G. 1987. Micropropagation of tulip: optimising shoot production from floral stem explants. *Acta Hort.* 212, vol. II: 677–681.

WITOMSKA M. 2001. Wpływ regulatorów wzrostu na rozmnażanie *Fritillaria imperialis* L. 'Rubra Maxima' *in vitro*. *Zesz. Nauk. Inst. Sadown. i Kwiciar.* 9: 355–362.

WITOMSKA M., ŁUKASZEWSKA A. 1997. *Bulblets regeneration in vitro from different explants of Fritillaria imperialis*. Acta Hort. 430: 331–338.

WITOMSKA M., WILK T., ŁUKASZEWSKA A. 1998. *Wpływ sposobu odkażania cebul Fritillaria imperialis L. na poziom zakażeń eksplantatów i regenerację in vitro*. Zesz. Nauk. Inst. Sadown. i Kwiciar. 5: 121–130.

ZIV M., LILJEN-KIPNIS H., ALTMAN A. 1997. *The inflorescence stalk: a source of highly regenerative explants for micropropagation geophytes*. Acta Hort. 447: 107–111.

ZIV M., LILJEN-KIPNIS H. 2000. *Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro*. Plant Cell Reports 19(9): 845–850.

Słowa kluczowe: *Hippeastrum × chmielii* CHM., *in vitro*, eksplantaty pędowe i łuskowe

Streszczenie

Materiał inicjalny umieszczono na pożywce MS bez regulatorów wzrostu; z dodatkiem $2,0 \text{ mg BA} \cdot \text{dm}^{-3} + 0,2 \text{ mg NAA} \cdot \text{dm}^{-3}$ lub $2,0 \text{ mg 2iP} \cdot \text{dm}^{-3} + 0,2 \text{ mg NAA} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tylko 12–24% eksplantatów pędowych formowało cebulki bez egzogenych regulatorów wzrostu, a w ich obecności cebulki różnicowały się na prawie wszystkich eksplantatach (92–100%). Na eksplantatach łuskowych cebulki formowały się w 100%, niezależnie od obecności regulatorów wzrostu w pożywce. Średnio uzyskano 0,6–0,9 małych cebulek (o średnicy poniżej 2 mm) z eksplantatu pędowego na pożywce bez regulatorów wzrostu i aż 14–16 cebulek średniej wielkości (o średnicy 2,1–4 mm) w obecności obydwu kombinacji regulatorów wzrostu. Z eksplantatów dwułuskowych uzyskiwano około 2 dużych cebulek (o średnicy 4,1–6,0 mm), niezależnie od obecności regulatorów wzrostu.

EFFICIENCY OF *in vitro* PROPAGATION OF *Hippeastrum × chmielii* CHM. FROM SHOOT AND SCALE EXPLANTS

Maria Witomska, Monika Latkowska
Department of Ornamental Plants,
Warsaw Agricultural University, Warszawa

Key words: *Hippeastrum × chmielii* CHM., *in vitro*, shoot and scale explants

Summary

Initial plant material was cultured on MS medium without growth regulators, supplemented with $2.0 \text{ mg BA} \cdot \text{dm}^{-3} + 0.2 \text{ mg NAA} \cdot \text{dm}^{-3}$ or $2.0 \text{ mg 2iP} \cdot \text{dm}^{-3} + 0.2 \text{ mg NAA} \cdot \text{dm}^{-3}$. Only 12–24% of shoot explants formed bulblets in the absence of exogenous growth regulators, whereas in their presence almost all

explants produced bulblets (92–100%). Scale explants regenerated bulblets in 100%, regardless of the presence of growth regulators in the medium. On the average, 0.6–0.9 small bulblets (diameter: less than 2 mm) were obtained from a shoot explant in the medium without growth regulators and 14–16 bulblets medium sized (diameter: 2.1–4 mm) in the presence of both growth regulator combinations. Approximately 2 big bulblets (diameter: 4.1–6.0 mm) were obtained from twin scale explants in all medium types.

Dr hab. **Maria Witomska**
Katedra Roślin Ozdobnych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 166
02-787 WARSZAWA
e-mail: witomska@alpha.sggw.waw.pl