

## AKLIMATYZACJA CEBUL NARCYZA (*Narcissus L.*) OTRZYMANÝCH W KULTURACH ZARODKÓW SOMATYCZNYCH

Małgorzata Malik, Anna Bach

Katedra Roślin Ozdobnych, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

### Wstęp

Narcyzy rozmnażane w warunkach *in vitro* mogą tworzyć cebule przybyszowe [LANGENS-GERRITS, NASHIMOTO 1997; SOCHACKI, ORLIKOWSKA 1999], zarodki somatyczne [SAGE i in. 2000; MALIK, BACH 2004] i cebule przybyszowe formowane w kulturach zarodków somatycznych [MALIK 2003].

Proces aklimatyzacji cebul przybyszowych narcyza opisali dotychczas SQUIRES i in. [1991], LANGENS-GERRITS i NASHIMOTO [1997], LANGENS-GERRITS i DE KLERK [1999] oraz SOCHACKI i ORLIKOWSKA [1999] określając wpływ typu eksplantatu, ukorzenia, dodatku węgla aktywnego do pożywki, stężenia sacharozy oraz soli mineralnych w pożywce, temperatury kultywacji, chłodzenia, warunków świetlnych i masy cebul na ten proces. SAGE i in. [2000] obserwowali prawie 100% wschody, kiedy wysadzali do sterylnych podłoży rośliny narcyza uzyskane w wyniku rozwoju zarodków somatycznych traktowanych chłodem (4°C). Niewiele jest natomiast informacji na temat adaptacji do warunków *ex vitro* cebul narcyza otrzymanych w wyniku somatycznej embriogenezy.

Wzrost *ex vitro* roślin powstałych w wyniku rozwoju zarodków somatycznych zależy od czynników występujących w kulturach *in vitro* [VON ARNOLD i in. 2002].

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie wpływu warunków *in vitro* na późniejszą aklimatyzację cebul narcyza otrzymanych z zarodków somatycznych.

### Materiał i metody

Do doświadczeń użyto cebul narcyza (*Narcissus L.*) odmiany 'Carlton', otrzymanych z zarodków somatycznych indukowanych na pożywce zawierającej 25  $\mu\text{M}$  2,4-D i 5  $\mu\text{M}$  BA według sposobu opisanego w pracy MALIK i BACH [2004]. Zarodki somatyczne formowały cebule przybyszowe na pożywce zawierającej 5  $\mu\text{M}$  BA i 0,5  $\mu\text{M}$  NAA. Badano wpływ następujących czynników na efekty aklimatyzacji:

- wielkość cebul: użyto cebul niechłodzonych i nieukorzenionych o masie od 50–1000 mg wydzielając następujące klasy wielkości: poniżej 100 mg, 100–200 mg, 201–300 mg, 301–400 mg, 401–500 mg, powyżej 500 mg;

- długość okresu chłodzenia: cebule wykładano na pożywkę bez regulatorów wzrostu (12 tygodni), wzbogaconą sacharozą w stężeniu 3 lub 6%, i poddawano działaniu temperatury 5°C przez 6, 9 lub 12 tygodni; przed rozpoczęciem chłodzenia oraz w kontroli utrzymywano temperaturę 21°C;
- stężenie substancji wzrostowych: gibereliny (cebule wykładano na 4 tygodnie na pożywkę z gibereliną GA<sub>3</sub> w stężeniu 0, 5 i 15 μM) lub auksyny w pożywce (cebule wykładano na 8 tygodni na pożywki bez auksyny lub zawierające 1, 2 lub 5 μM NAA lub IAA).

We wszystkich doświadczeniach stosowano pożywkę według MURASHIGE i SKOOG (MS) [1962].

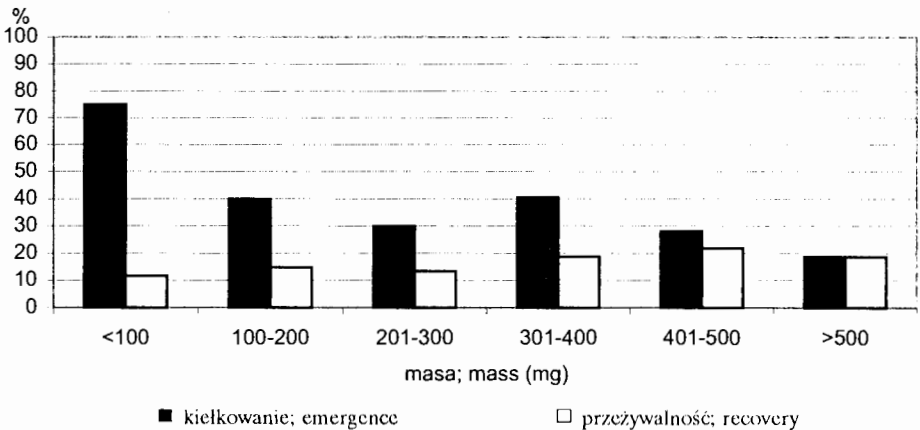
Tak przygotowane cebule wysadzano w fitotronie do mieszanki ziemi ogrodowej, torfu i perlitu (1 : 1 : 1). Pojemniki z roślinami przykryto włókniną Agryl i folią. Rozwój roślin przebiegał na świetle o natężeniu napromieniowania kwantowego (PAR) 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, w temperaturze 20°C.

Określając efekty aklimatyzacji posłużono się dwoma wskaźnikami: procentem cebul rozwijających liście oraz procentem przeżywalności, czyli procentem cebul, które rozwinęły liście, a następnie zasychały tworząc twardą (o ciasno ułożonych łuskach) cebulę okrytą tuniką. Pomiarów oraz obserwacji wykonywano co 4 tygodnie.

Wyniki opracowano metodą analizy wariancji. Porównania średnich dokonano za pomocą testu Duncana, przy poziomie istotności różnic  $\alpha = 0,05$ . Minimalna liczba obiektów w każdej kombinacji doświadczenia wynosiła 10 sztuk w 5 powtórzeniach.

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że rozwijanie liści przez cebule narcyza oraz przeżywalność cebul w warunkach *ex vitro* zależą od takich czynników jak: masa cebul, długość okresu chłodzenia cebul przed ich wysadzeniem, stężenie sacharozy w pożywce, stężenie gibereliny, stężenie i rodzaj auksyny w pożywce.



Rys. 1. Rozwijanie liści i przeżywalność cebul narcyza w zależności od masy wysadzanych cebul

Fig. 1. Effect of bulb weight on the emergence and recovery of daffodil

Rozpatrując wpływ masy cebul narcyza uzyskanych z zarodków somatycznych zaobserwowano, że cebule o masie poniżej 100 mg rozwijały liście najlepiej (75%), natomiast przeżywalność ich była najniższa (11,8%). Procesowi aklimatyzacji do warunków *ex vitro* najlepiej poddawały się cebule o masie z przedziału 401–500 mg (21,9% przeżywalności). Zauważono, że wraz ze wzrostem masy wyjściowej maleje różnica pomiędzy liczbą cebul formujących liście, a liczbą cebul przeżywających okres aklimatyzacji (rys. 1). SQUIRES i in. [1991] uzyskiwali najwyższą przeżywalność, kiedy wysadzali cebule przybyszowe narcyza o masie powyżej 200 mg.

Traktowanie roślin narcyza przez 6–12 tygodni temperaturą 5°C, przed wysadzeniem do podłoża, przerywa spoczynek cebul [HUSSEY 1982; SQUIRES, LANGTON 1990; SQUIRES i in. 1991; LANGENS-GERRITS, NASHIMOTO 1997]. W niniejszej pracy wpływ chłodzenia i stężenia sacharozy na rozwijanie liści przez cebule okazał się nieistotny, chociaż tylko cebule chłodzone najdłużej (9 i 12 tygodni) skiełkowały w 100% (tab. 1). Natomiast przeżywalność cebul była najwyższa w przypadku cebul chłodzonych 9 tygodni przy stężeniu sacharozy 3%. Podwyższenie stężenia sacharozy z 3 do 6% powodowało wzrost przeżywalności cebul nie chłodzonych lub chłodzonych przez okres 6 tygodni oraz spadek przeżywalności cebul dłużej chłodzonych (9 i 12 tygodni).

Tabela 1; Table 1

Wpływ okresu chłodzenia oraz stężenia sacharozy w pożywce na rozwijanie liści i przeżywalność cebul narcyza (*Narcissus L.*) odmiany 'Carlton'

Effect of cold storage and sucrose concentration in the medium on daffodil (*Narcissus L.*) 'Carlton' bulb emergence and recovery

Długość okresu chłodzenia (tygodnie) Duration of cold storage (weeks)	Cebule rozwijające liście Bulb emergence (%)		Przeżywalność cebul Bulb recovery (%)	
	stężenie sacharozy sucrose concentration (%)		stężenie sacharozy sucrose concentration (%)	
	3	6	3	6
0	87,5a	90,0a	43,9b	72,6c
6	95,0a	90,0a	15,5a	44,9b
9	100,0a	100,0a	99,0d	71,5c
12	100,0a	100,0a	80,1cd	41,6b

średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie; means followed by the same letters do not differ significantly

W celu przełamania spoczynku cebul narcyza oprócz traktowania chłodem stosuje się pożywki wzbogacone gibereliną [SEABROOK 1990]. W przeprowadzonych doświadczeniach giberelina w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  wpływała korzystnie zarówno na wyrastanie liści jak i przeżywalność *ex vitro* (tab. 2). Wyższe stężenie gibereliny – 15  $\mu\text{M}$ , nie wywoływało zmian w porównaniu do kontroli.

Wyniki wielu badań nad aklimatyzacją otrzymanych metodami *in vitro* roślin z rodziny *Amaryllidaceae* wskazują na fakt korzystnego wysadzania do podłoża cebul ukorzenionych [PIERIK i in. 1990; LILIE-N-KIPNIS i in. 1992, 1994; MC ALISTER i in. 1998; LANGENS-GERRITS, DE KLERK 1999]. Niskie stężenia NAA i IAA w pożywkach, jakim poddano cebule przybyszowe narcyza korzystnie wpłynęły na ich ukorzenianie. Najwięcej cebul ukorzeniło się na pożywkach wzbogaconych

NAA, bez względu na zastosowane stężenie tej auksyny (tab. 3). Do ukorzenia cebul narcyza KOZAK i DAŃSKI [1989], CHOW i in. [1992] oraz RIERA i in. [1996] używali pożywek o niskiej koncentracji NAA. Najmniej cebul formujących korzenie obserwowano na pożywkach bez regulatorów wzrostu lub zawierających IAA (51–63%), jednak tylko te cebule przeżywały okres aklimatyzacji. Największą liczbę cebul rozwijających liście obserwowano, kiedy cebule narcyza kultywowano na pożywkach nie zawierających regulatorów wzrostu (87,5%) lub zawierających 5  $\mu\text{M}$  IAA (75%). Najwyższą przeżywalnością (75%) charakteryzowały się cebule ukorzone na pożywkach nie zawierających żadnej z auksyn.

Tabela 2; Table 2

Wpływ gibereliny na rozwijanie liści przez cebule narcyza (*Narcissus* L.) odmiany 'Carlton' oraz przeżywalność cebul

Effect of gibberellin on daffodil (*Narcissus* L.) 'Carlton' bulb emergence and recovery

Stężenie GA <sub>3</sub> GA <sub>3</sub> concentration ( $\mu\text{M}$ )	Cebule rozwijające liście Bulb emergence (%)	Przeżywalność cebul Bulb recovery (%)
0	50a	15a
5	90b	55b
15	35a	0a

średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie; means followed by the same letters do not differ significantly

Tabela 3; Table 3

Wpływ auksyn na formowanie korzeni przez cebule narcyza w warunkach *in vitro* oraz na rozwijanie liści i przeżywalność cebul *ex vitro*

Effect of auxin on *in vitro* rooting and *ex vitro* daffodil bulb emergence and recovery

Auksyna Auxin ( $\mu\text{M}$ )	Cebule ukorzone <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> rooted bulbs (%)	Cebule rozwijające liście Bulb emergence (%)	Przeżywalność cebul Bulb recovery (%)
Kontrola; Control	52a	87,5c	75,0c
NAA 1	80bc	54,2b	0,0a
NAA 2	85c	22,9a	0,0a
NAA 5	96c	33,4a	0,0a
IAA 1	63ab	58,4b	29,2b
IAA 2	62ab	50,0b	18,8b
IAA 5	51a	75,0c	25,0b

średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się między sobą istotnie; means followed by the same letters do not differ significantly

Poznanie wpływu czynników, które korzystnie oddziałują na aklimatyzację cebul przybyszowych narcyzów powstałych w kulturach zarodków somatycznych przyczyni się do szybkiego rozmnożenia i wprowadzenia nowych odmian.

### Literatura

CHOW Y.N., SELBY C., HARVEY B.M.R. 1992. *A simple method for maintaining high multiplication of Narcissus shoot cultures in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ

Culture 30: 227–230.

HUSSEY G. 1982. *In vitro* propagation of *Narcissus*. Annals of Botany 49: 707–719.

KOZAK D., DĄBSKI M. 1989. The influence of BA and NAA on the regenerative capabilities of young leaf sections of *Narcissus cv. Carlton* *in vitro*. Prace Inst. Sadown. i Kwiciar. Seria B 13: 99–104.

LANGENS-GERRITS M., DE KLERK G.J. 1999. Micropropagation of flower bulbs. *Lily and Narcissus*. Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols 111: 141–147.

LANGENS-GERRITS M., NASHIMOTO S. 1997. Improved protocol for the propagation of *Narcissus in vitro*. Acta Horticulturae 430: 311–313.

LILIEN-KIPNIS II., AZIZBEKOVA N., ZIV M. 1994. Scaled-up proliferation and regeneration of *Nerine* in liquid cultures. Part II. Ontogeny of somatic embryos and bulblet regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 117–123.

LILIEN-KIPNIS II., ZIV M., KAHANY S., AZIZBEKOVA N. 1992. Proliferation and regeneration of *Nerine* in liquid culture. Acta Horticulturae 325: 467–473.

MALIK M. 2003. Somatyczna embriogeneza i organogeneza w kulturach pędów i załączni narczyza (*Narcissus L.*) odmiany 'Carlton'. Praca doktorska wykonana w Katedrze Roślin Ozdobnych AR Kraków, Kraków 2003.

MALIK M., BACII A. 2004. Wpływ regulatorów wzrostu na indukcję kalusa embriogenicznego w kulturach narczyza (*Narcissus L.*) odmiany 'Carlton'. Folia Univ. Agric. Stetin. 2004, Agricultura 94: 115–118.

MC ALISTER B. G., STRYDOM A., VAN STADEN J. 1998. *In vitro* propagation of some *Cyrtanthus* species. South African J. of Botany 64(3): 228–231

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

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* hybrids. Proceedings. Integration of *in vitro* techniques in ornamental plant breeding. Eucarpia. Wageningen 10–14 November 1990, The Netherlands: 21–27.

RIERA R., BASTIDA J., VILADOMAT F., CODINA C. 1996. Application of double-phase culture medium in micropropagation of *Narcissus leonensis*. Abstracts: Seventh International Symposium on Flower Bulbs, March 10–16, 1996, Israel: 85.

SAGE D.O., LYNN J., HAMMATT N. 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. Plant Science 150: 209–216.

SEABROOK J.E.A. 1990. *Narcissus (Daffodil)*, w: Ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Bajaj Y.P.S. *Handbook of Plant Cell Culture V: Ornamental Species*. McGraw-Hill Publishing Company, New York: 577–597.

SOCIACKI D., ORLIKOWSKA T. 1999. Uzyskiwanie cebul przybyszowych narczyza w kulturach *in vitro* i efektywność procesu aklimatyzacji. Mat. Ogólnop. Konf. „Postęp w rozmnażaniu roślin ozdobnych”, 16–17 września, Kraków: 94–97.

SQUIRES W.M., LANGTON F.A. 1990. Potential and limitations of *Narcissus* micropropagation: an experimental evaluation. Acta Horticulturae 226: 67–73.

SQUIRES W.M., LANGTON F.A., FENLON J.S. 1991. Factors influencing the transplantation success of micropropagated narcissus bulbils. J. of Horticultural Science 66(6): 661–671.

VON ARNOLD S., SABALA I., BOZHOKOV P., DYACHOK J., FILONOVA L. 2002. *Developmental pathways of somatic embryogenesis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233–249.

**Słowa kluczowe:** *Narcissus* L., aklimatyzacja, somatyczna embriogeneza, cebule narcyza

### Streszczenie

Warunki podczas fazy *in vitro* wpływają następnie na aklimatyzację roślin narcyza (*Narcissus* L.) 'Carlton'. Procesowi aklimatyzacji najlepiej poddają się cebule o masie z przedziału 401–500 mg. Najwyższą przeżywalnością (99%) charakteryzują się cebule chłodzone 9 tygodni, hodowane na pożywkach z sacharozą w stężeniu 3%. Podwyższenie stężenia sacharozy nie wpływa na wzrost liczby cebul rozwijających liście. W przypadku cebul nie chłodzonych dodatek do pożywki gibereliiny w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  wpływa korzystnie zarówno na procent cebul rozwijających liście, jak i procent przeżywalności *ex vitro*. Proces aklimatyzacji przeżywały cebule do których ukorzenienia nie stosowano auksyny lub użyto IAA. Cebule narcyza chłodzone w temperaturze 5°C przez 9 tygodni aklimatyzują się najlepiej.

### ACCLIMATIZATION OF DAFFODIL (*Narcissus* L.) BULBS OBTAINED IN SOMATIC EMBRYOS CULTURES

Małgorzata Malik, Anna Bach

Department of Ornamental Plants, Agricultural University, Kraków

**Key words:** *Narcissus* L., acclimatization, somatic embryogenesis, daffodil bulbs

### Summary

Acclimatization of daffodil (*Narcissus* L.) 'Carlton' bulbs depends on the *in vitro* culture conditions. Bulbs of 401–500 mg gave the greatest transplantation success. The highest bulb recovery was observed when the bulbs were cooled for 9 weeks and cultured on media supplemented with 3% sucrose. Elevated concentrations of sucrose in the medium gave no benefit on the increase of bulb emergence. The addition of gibberellin at 5  $\mu\text{M}$  to the medium has beneficial effect on *ex vitro* bulb emergence percent as well as on bulb recovery percent. Bulbs rooted on auxin free medium or a medium supplemented with IAA best recovered the acclimatization process.

Dr Małgorzata Malik  
Katedra Roślin Ozdobnych  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja  
Al. 29 Listopada 54  
31–425 KRAKÓW  
e-mail: romalik@cyf-kr.edu.pl