

WPLYW CHŁODZENIA CEBUL MATECZNYCH I REGULATORÓW WZROSTU NA REGENERACJĘ *in vitro* ZWARTNICY CHMIELA (*Hippeastrum × chmielii* CHM.) Z EKSPLANTATÓW PĘDOWYCH

Agnieszka Ilczuk, Maria Witomska

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wstęp

W 1993 roku w Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW uzyskano mieszańca międzygatunkowego – zwartnicę Chmiela (*Hippeastrum × chmielii* CHM.). Wyselekcjonowane klony nowego gatunku zwartnicy charakteryzują się piękną barwą kwiatów, obfitym kwitnieniem, bujnym wzrostem. Nadają się do uprawy doniczkowej i na kwiat cięty. Ze względu na spodziewane duże zapotrzebowanie na materiał nasadzeniowy zwartnicy Chmiela niezbędne jest opracowanie wydajnych technik mikrorozmnażania.

Efektywność regeneracji *in vitro* zależy od wielu czynników endogennych i egzogennych. U roślin z rodziny *Amaryllidaceae*, do której należy zwartnica cebulki przybyszowe mogą formować się z różnych części roślin: fragmentów łusek, liści, pąków czy pędów kwiatostanowych [HUSSEY 1975; KROMER 1985; GABRYSZEWSKA, SANIEWSKI 1989; OKUBO i in. 1990; ZIV, LILJEN-KIPNIS 2000]. Różnicowanie cebulek z eksplantatów uzależnione jest między innymi od obecności regulatorów wzrostu w pożywce, a także od wstępnego traktowania materiału inicjalnego odpowiednią temperaturą [STIMART, ASCHER 1981 a, 1981b; AARTRIJK, BLOM-BARNHOORN 1984; PIERIK i in. 1990; ZIV i in. 1997; WITOMSKA 2000].

Celem pracy było ustalenie wpływu czasu chłodzenia cebul matecznych oraz egzogennych regulatorów wzrostu na rozmnażanie *in vitro* zwartnicy Chmiela z eksplantatów pędowych.

Materiał i metody

Badania wykonano w 2002 roku. Materiałem były cebule klonu 3/7 zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum × chmielii* CHM.) o obwodzie 20 cm. Wykopano je w listopadzie i przechowywano w temperaturze 4°C przez okres 3, 5 i 7 miesięcy. Po tym czasie zaprawiano je przez 15 minut w 0,2% roztworze Sportack Alpha i po osuszeniu wysadzano do skrzynek z mieszaniną torfu z perlitem (2 : 1). Inkubacja przebiegała w ciemności, w temperaturze 25°C. Gdy pędy kwiatostanowe osiągnęły 10–12 cm długości (od piętki cebuli do podstawy pąka kwiatostano-

wego), wycinano je z cebuli. Materiał odkażano przez 15 sekund w 70% alkoholu etylowym, a następnie 15 minut w 1% roztworze Chloraminy T, po czym płukano trzykrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Tak przygotowane pędy krojono na odcinki długości 1,5–2 mm i z zachowaniem biegunowości wykładano na pożywkę MS [MURASHIGE, SKOOG 1962] w trzech kombinacjach: bez regulatorów wzrostu; 2 mg·dm⁻³ benzyloadeniny (BA) i 0,2 mg·dm⁻³ kwasu α -naftalenooctowego (NAA) lub 2 mg·dm⁻³ izopentyloadeniny (2iP) i 0,2 mg·dm⁻³ NAA. Regeneracja przebiegała w ciemności, w temperaturze 25°C. W każdej kombinacji było 25 eksplantatów wizualnie czystych. Po trzech miesiącach obliczano procent eksplantatów z cebulkami oraz liczbę cebulek zregenerowanych na jednym eksplantacie. Dokonano również oceny bonitacyjnej cebulek wg 3 klas: 1 – cebulki do 2 mm średnicy; 2 – cebulki od 2,1 mm do 4 mm średnicy; 3 – cebulki powyżej 4 mm średnicy. Policzono także liczbę liści wyrosłych z 1 cebulki.

Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji w programie Statgraphics 4.1., zgodnie z dwuczynnikowym układem kombinacji doświadczalnych. Do oceny istotności różnic między średnimi użyto testu NIR, przyjmując poziom istotności 5%.

Wyniki i dyskusja

Stwierdzono wpływ czasu chłodzenia cebul matecznych i regulatorów wzrostu na regenerację zwartnicy Chmiela. Największy procent eksplantatów regenerujących cebulki uzyskano po trzymiesięcznym przechowywaniu materiału inicjalnego. W miarę przedłużania czasu chłodzenia procent eksplantatów formujących cebulki spadał (tab. 1). Podobny efekt obserwowano po długotrwałym przechowywaniu cebul *Hippeastrum hybridum* w temperaturze 5°C [PIERIK i in. 1990].

Tabela 1; Table 1

Wpływ czasu chłodzenia cebul i regulatorów wzrostu na regenerację cebulek z eksplantatów pędowych

Effect of chilling period and growth regulators on bulblet regeneration from shoot explants`

Czas chłodzenia (w miesiącach) Months of chilling	% eksplantatów z cebulkami*; % explants with bulblets*			
	regulatory wzrostu; growth regulators			średnia; mean
	0	2 mg·dm ⁻³ 2iP 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	2 mg·dm ⁻³ BA 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	
3	32	36	24	30,7
5	16	24	24	21,3
7	0	12	12	8,0
Średnia; Mean	16	24	20	

* Liczba eksplantatów w kombinacji 25 = 100%; Numer of explant in treatment 25 = 100%

Największą średnią liczbę cebulek (5,17) uzyskano z eksplantatów pochodzących z cebul chłodzonych 5 miesięcy, a najniższą po siedmiu miesiącach chłodzenia (tab. 2). Obecność regulatorów wzrostu w pożywce stymulowała formowanie cebulek. Najwięcej cebulek przybyszowych powstawało w obecności 2 mg·dm⁻³

2iP i 0,2 mg·dm⁻³ NAA po trzech i pięciu miesiącach chłodzenia. W obecności BA i NAA powstawała porównywalna liczba cebulek zarówno po pięcio-, jak i siedmimiesięcznym chłodzeniu cebul. Na pożywce bez regulatorów wzrostu eksplantaty z cebul chłodzonych 7 miesięcy nie formowały cebulek.

Tabela 2; Table 2

Wpływ czasu chłodzenia cebul i regulatorów wzrostu
na liczbę cebulek uformowanych na eksplantacie

Effect of chilling period and growth regulators on number of bulblets per explant

Czas chłodzenia (w miesiącach) Months of chilling	Liczba cebulek na eksplantat; Number of bulblet per explant			
	regulatory wzrostu; growth regulators			średnia; mean
	0	2 mg·dm ⁻³ 2iP 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	2 mg·dm ⁻³ BA 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	
3	2,9	5,8	2,9	3,87 b
5	4,4	6,5	4,6	5,17 c
7	0,0	2,8	4,2	2,33 a
Średnia; Mean	2,43 a	5,03 c	3,90 b	

Dla porównania wszystkich średnich $NIR_{0,05} = 1,46$; To compare all means $LSD_{0,05} = 1,46$
Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy poziomie $p = 0,05\%$; Value followed by the same letter are not significantly different $p = 0,05\%$

Największe cebulki powstały z eksplantatów pochodzących z cebul chłodzonych przez trzy miesiące (tab. 3). W miarę przedłużania czasu chłodzenia różnicowały się coraz mniejsze cebulki. Cebulki uformowane bez egzogennych regulatorów wzrostu były mniejsze niż zróżnicowane w ich obecności.

Tabela 3; Table 3

Wpływ czasu chłodzenia cebul i regulatorów wzrostu
na wielkość zregenerowanych cebulek

Effect of chilling period and growth regulators on size of regenerated bulblets

Czas chłodzenia (w miesiącach) Months of chilling	Ocena bonitacyjna (skala 1–3); Evaluation (scale 1–3)			
	regulatory wzrostu; growth regulators			średnia; mean
	0	2 mg·dm ⁻³ 2iP 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	2 mg·dm ⁻³ BA 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	
3	2,5	2,3	2,2	2,33 c
5	1,7	2,0	1,7	1,80 b
7	0,0	1,0	1,0	0,67 a
Średnia; Mean	1,40 a	1,77 c	1,63 b	

Dla porównania wszystkich średnich $NIR_{0,05} = 0,34$; To compare all means $LSD_{0,05} = 0,34$
Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy poziomie $p = 0,05\%$; Value followed by the same letter are not significantly different $p = 0,05\%$

Największą liczbą liści odznaczały się rośliny otrzymane z materiału inicjalnego chłodzonego trzy miesiące (tab. 4). Dłuższe chłodzenie wpływało negatywnie na badaną cechę. Obecność regulatorów wzrostu stymulowała wyrastanie większej liczby liści z cebulki.

Temperatura odgrywa ważną rolę w regeneracji roślin cebulowych *in vitro*. Wpływa ona na procesy biochemiczne i fizjologiczne warunkujące organogenezę i regulację spoczynku [STIMART i in. 1982; DELVALLEE i in. 1990; OKUBO 1992; WITOMSKA 2000]. Pozytywne efekty regeneracji różnych gatunków lili są uzależnione od chłodzenia cebul matecznych w temperaturze 0–5°C przez okres od 18 dni do 12 miesięcy przed pobraniem eksplantatów inicjalnych [STIMART, ASCHER 1981a, 1981b; TAKAYAMA, MISAWA 1983; AARTRIK, BLOM-BARNHOORN 1984]. Dłuższy czas chłodzenia przerywa stan spoczynku cebul i zmniejsza wymagania eksplantatów co do stężenia egzogennych auksyn [AARTRIK, BLOM-BARNHOORN 1981].

Tabela 4; Table 4

Wpływ czasu chłodzenia cebul i regulatorów wzrostu na liczbę liści wyrosłych z cebulki przybyszowej

Effect of chilling period and growth regulators on number of leaves per bulblet

Czas chłodzenia (w miesiącach) Months of chilling	Liczba liści na cebulkę; Number of leaves per bulblet			
	regulatory wzrostu; growth regulators			średnia; mean NIR _{0,05} ; LSD _{0,05} 0,18
	0	2 mg·dm ⁻³ 2iP 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	2 mg·dm ⁻³ BA 0,2 mg·dm ⁻³ NAA	
3	1,8	1,5	2,1	1,80 c
5	1,6	1,6	1,0	1,40 b
7	0,0	1,0	1,0	0,67 a
Średnia; Mean NIR _{0,05} ; LSD _{0,05} 0,18	1,13 a	1,36 b	1,63 b	

Dla porównania wszystkich średnich NIR_{0,05} = 0,30; To compare all means LSD_{0,05} = 0,30
Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy poziomie p = 0,05%; Value followed by the same letter are not significantly different p = 0,05%

U zwartnicy Chmiela najlepsze efekty dało pięćmiesięczne chłodzenie cebul matecznych, po którym nawet bez egzogennych regulatorów wzrostu formowały się ponad 4 cebulki na eksplantacie. Natomiast po siedmiu miesiącach chłodzenia cebul różnicowanie cebulek musiało być stymulowane obecnością regulatorów wzrostu w pożywce. U *Hippeastrum hybridum* bez regulatorów wzrostu obserwowano bardzo słabą regenerację cebulek z pędów. Obecność regulatorów wzrostu stymulowała formowanie cebulek, a reakcja na stężenie auksyny (NAA) oraz rodzaj i stężenie cytokiny (BA lub 2iP) zależała od odmiany [PIERIK i in. 1990].

Chłodzenie pędów hiacynta powoduje wzrost stężenia cukrów rozpuszczalnych i bardziej efektywną regenerację [BACH i in. 1992]. Pod wpływem temperatury 4°C wzrasta również poziom cukrów rozpuszczalnych w cebulach szachownicy cesarskiej, jednak formowanie cebulek z tego materiału zachodzi bardzo źle [WITOMSKA 2000]. Podobnie, jak u zwartnicy Chmiela, zdolność do regeneracji eksplantatów pędowych narcyza jest zależna od długości przechowywania cebul w temperaturze 15°C i obecności regulatorów wzrostu [ZIV i in. 1997]. Formowanie cebulek jest też uwarunkowane pozycją eksplantatu na pędzie, co udowodniono u tulipana [TAEB, ALDERSON 1987], *Crinum macowanii* [SLABBERT i in. 1995] i narcyza [ZIV i in. 1997].

U roślin z rodziny *Amaryllidaceae* formowanie cebulek przybyszowych przebiega najbardziej efektywnie na łuskach cebul i pędach kwiatostanowych [HOSOKI,

ASAHIRA 1980; SEABROOK, CUMMING 1982; MUJIB i in. 1991; SAKER i in. 1998; JACOBS i in. 1992]. Cebule są trudne do odkażenia, łatwiej uzyskać czysty materiał inicjalny z pędów [WITOMSKA, ŁUKASZEWSKA 1997; ZIV, LILJEN-KIPNIS 2000]. Warunkiem regeneracji jest pobranie młodych pędów, w odpowiednim stadium rozwojowym [TAEB, ALDERSON 1987; DE BRUYN i in. 1992; ZIV i in. 1997].

U *Narcissus* zaleca się pobieranie szczyły jeszcze nie wyrosłej z cebuli, ale po wyjściu ze stanu spoczynku [ZIV i in. 1997]. U *Hippeastrum hybridum* z pędów bardzo młodych (1–2,5 cm długości) cebulki różnicują się słabo, zaś najlepiej z pędów długości 3,1–5 cm [PIERIK i in. 1990]. U *Crinum macowanii* najbardziej przydatne są pędy długości 7–10 cm [SLABBERT i in. 1995], natomiast u *Fritillaria imperialis* – 20 cm [WITOMSKA, ŁUKASZEWSKA 1997]. Stosunkowo niski procent eksplantatów formujących cebulki u zwartnicy Chmiela można wytłumaczyć pobieraniem zbyt długich, za starych pędów (10–12 cm długości).

Wnioski

1. Czas chłodzenia cebul matecznych oraz obecność regulatorów wzrostu w pożywce wpływają na formowanie cebulek przybyszowych z eksplantatów pędowych.
2. Pięćmiesięczne chłodzenie materiału inicjalnego i obecność 2iP oraz NAA w pożywce powodują różnicowanie największej liczby cebulek na eksplantacie.
3. Największe cebulki, z największą liczbą liści powstają po trzech miesiącach chłodzenia materiału inicjalnego.

Literatura

- AARTRIJK J.VAN, BLOM-BARNHOORN G.J. 1981. *Growth regulator requirements for adventitious regeneration from Lilium bulb-scale tissue in vitro, in relation to duration of bulb storage and cultivar*. Sci. Hort. 14: 261–268.
- AARTRIJK J.VAN, BLOM-BARNHOORN G.J. 1984. *Adventitious bud formation from bulb-scale explants of Lilium speciosum Thunb. in vitro. Interacting effects of NAA, TIBA, wounding, and temperature*. J. Plant Physiol. 116(5): 409–416.
- BACI A., PAWŁOWSKA B., PUŁCZYŃSKA K. 1992. *Utilization of soluble carbohydrates in shoot and bulb regeneration of Hyacinthus orientalis L. in vitro*. Acta Hort. 325: 487–493.
- DE BRUYN M.H., FERREIRA D.I., SLABBERT M.M., PRETORIUS J. 1992. *In vitro propagation of Amaryllis belladonna*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 179–184.
- DELVALLEE I., PAFFEN A., DE KLERK G.J. 1990. *The development of dormancy in bulb-lets of Lilium speciosum generated in vitro. II. The effect of temperature*. Physiol. Plant. 80: 431–436.
- GABRYSZEWSKA E., SANIEWSKI M. 1989. *Czynniki regulujące wzrost i rozwój roślin ozdobnych z rodzin Liliaceae, Amaryllidaceae i Iridaceae in vitro*. Kosmos 38(4): 485–503.

- HOSOKI T., ASAHIRA T. 1980. *In vitro* propagation of *Narcissus*. Hort. Sci. 15(5): 602–603.
- HUSSEY G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. J. Exp. Bot. 91: 253–262.
- JACOBS G., RICHARD M., ALLDERMAN L.A., THERON K.I. 1992. Direct and indirect organogenesis in tissue cultures of *Nerine bowdenii* W. Watts. Acta Hort. 325: 475–479.
- KROMER K.D. 1985. Regeneration of some monocotyledonous plants from subterranean organs *in vitro*. Acta Agrobot. 38(2): 65–87.
- MUJIB A., JANA B.K., GHOSH P.D. 1991. Plantlet regeneration from flower bud callus in *Hippeastrum hybridum* 'Belladonna'. Environ. Ecology 9(2): 429–431.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473–497.
- OKUBO H. 1992. Dormancy in bulbous plants. Acta Hort. 325: 35–41.
- OKUBO H., HUANG C.W., UEMOTO S. 1990. Role of outer scale in twin-scale propagation of *Hippeastrum hybridum* and comparison of bulbet formation from single- and twin-scales. Acta Hort. 266: 59–65.
- 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.
- SAKER M., RADY M., EL-BAIR M. 1998. Towards commercial production of ornamental bulbs *in vitro*. Egyptian Journal of Horticulture. 25(1): 113–128.
- SEABROOK J.E.A., CUMMING B.G. 1982. *In vitro* morphogenesis and growth of *Narcissus* in response to temperature. Sci. Hort. 16: 185–190.
- SLABBERT M.M., BRUYN DE M.H., 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.
- STIMART D.P., ASCHER P.D. 1981a. The developmental responses of *Lilium longiflorum* Thunb. in tissue culture to constant or alternating temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4): 450–454.
- STIMART D.P., ASCHER P.D. 1981b. Foliar emergence from bulblets of *Lilium longiflorum* Thunb. as related to *in vitro* generation temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106(4): 446–450.
- STIMART D.P., ASCHER P.D., WILKINS H.F. 1982. Overcoming dormancy in *Lilium longiflorum* bulblets produced in tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107(6): 1004–1007.
- TAEB A.G., ALDERSON P.G. 1987. Micropropagation of tulip: optimising shoot production from floral stem explants. Acta Hort. 212: 677–681.
- TAKAYAMA S., MISAWA M. 1983. A scheme for mass propagation of *Lilium* *in vitro*. Sci. Hort. 18: 353–362.
- WITOMSKA M. 2000. Wpływ temperatury przechowywania cebul *Fritillaria imperialis* L. na poziom cukrów rozpuszczalnych, ABA i cytokinin oraz regenerację *in vitro*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 473: 335–341.

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

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*, chłodzenie cebul

Streszczenie

W 1993 roku w Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW uzyskano mieszańca międzygatunkowego – zwartnicę Chmiela (*Hippeastrum × chmielii* CHM.). Wyselekcjonowane klony nowego gatunku zwartnicy charakteryzują się piękną barwą kwiatów, obfitym kwitnieniem i bujnym wzrostem. Nadają się do uprawy doniczkowej i na kwiat cięty. Ze względu na spodziewane duże zapotrzebowanie na materiał nasadzeniowy zwartnicy Chmiela niezbędne jest opracowanie wydajnych technik mikrorozmnażania.

W tym celu podjęto próbę różnicowania cebulek przybyszowych z pędów kwiatostanowych uzyskanych z cebul (klon 3/7) po trzech, pięciu i siedmiu miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C. Stwierdzono wpływ czasu chłodzenia cebul na procent eksplantatów regenerujących cebulki i liczbę cebulek na eksplantat. Pięciomiesięczne chłodzenie cebul i obecność w pożywce 2 mg·dm⁻³ izopentyloadeniny (2iP) oraz 0,2 mg·dm⁻³ kwasu α-naftalenoctowego (NAA) stymulowały różnicowanie cebulek przybyszowych. Wydłużenie czasu chłodzenia cebul o 2 miesiące wpływało negatywnie na procent eksplantatów regenerujących cebulki oraz na liczbę cebulek uformowanych na eksplantacie.

EFFECT OF BULB CHILLING AND GROWTH REGULATORS ON THE *in vitro* REGENERATION FROM SHOOT EXPLANTS IN *Hippeastrum × chmielii* CHM.

Agnieszka Ilczuk, Maria Witomska

Department of Ornamental Plants, Warsaw Agricultural University, Warszawa

Key words: *Hippeastrum × chmielii* CHM., *in vitro*, bulb chilling

Summary

In 1993 a new hybrid *Hippeastrum × chmielii* was obtained in the Department of Ornamental Plants at Warsaw Agricultural University. Selected clones grow vigorously and flower abundantly, producing flowers in bright vivid colors. They can be grown for cut flowers or as pot plants. As a great demand for planting material can be expected it is necessary to elaborate efficient methods of vegetative propagation of these new creations. In order to meet this goal trials

were undertaken to obtain bulblet regeneration *in vitro* from flower shoots (scapes) grown out from bulbs (clone 3/7) stored 3, 5 or 7 months at 4°C. Both length of chilling period and growth regulators present in the medium affected a percentage of regenerating explants and a number of bulblets per explant. Five month chilling and presence of 2 mg·dm⁻³ isopentenyladenine (2iP) together with 0.2 mg·dm⁻³ α-naphthylacetic acid (NAA) stimulated bulblet regeneration. Prolonging the storage period by 2 months decreased both the percentage of regeneration and the bulblet number per explant.

Mgr Agnieszka Ilczuk
Katedra Roślin Ozdobnych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 166
02-787 WARSZAWA