

WPLYW BA I NAA NA RÓŻNICOWANIE CEBULEK PRZYBYSZOWYCH Z EKSPLANTATÓW DWUŁUSKOWYCH ZWARTNICY CHMIELA (*Hippeastrum x chmielii* CHM.) *in vitro*¹

Maria Witomska, Agnieszka Ilczuk

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wstęp

Różnicowanie cebulek przybyszowych na łuskowych eksplantatach inicjalnych zwartnicy w kulturach *in vitro* może zachodzić spontanicznie, ale obecność egzogennych regulatorów wzrostu stymuluje ten proces [HUANG i in. 1990; YANAGAWA, SAKANISHI 1977; BACH, PTAK 1997; WITOMSKA, NOSARZEWSKA 2001]. Wcześniejsze badania nad rozmnażaniem *in vitro* zwartnicy dowiodły, że benzyloamino-puryna (BA) i kwas α -naftalenoctowy (NAA) mogą korzystnie oddziaływać na formowanie cebulek przybyszowych u tych roślin [MIT i in. 1974; KUTYŁA, CHMIEL 2000; WITOMSKA, NOSARZEWSKA 2001; WITOMSKA 2002a, 2002b]. W pracach tych nie badano jednak wpływu szerokiego spektrum stężeń w/w regulatorów wzrostu na regenerację zwartnicy Chmiela.

Celem pracy było określenie wpływu BA, NAA i ich współdziałania na różnicowanie cebulek przybyszowych z eksplantatów dwułuskowych zwartnicy Chmiela w ramach badań prowadzonych nad optymalizacją rozmnażania tego nowego międzygatunkowego mieszańca.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w 2002/2003 r. w Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW. Materiałem były cebule klonu 18 zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum x chmielii* CHM.) o obwodzie 20 cm. Po zdjęciu suchych łusek okrywających cebule pokrojono na sadzonki dwułuskowe z kawałkiem piętki (15 mm wysokości i 8 mm szerokości). Tak przygotowane eksplantaty odkażano przez 15 sekund w 70-procentowym alkoholu etylowym, a następnie przez 20 minut w 6-procentowym roztworze Chloraminy T, po czym trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Zastosowano pożywkę MS [MURASHIGE, SKOOG 1962] w 12 kombinacjach: bez regulatorów wzrostu, wyłącznie NAA w stężeniach 0,1; 1, lub 5 mg·dm⁻³; 1 mg·dm⁻³ BA z w/w stężeniami NAA oraz 5 mg·dm⁻³ BA z tymi samymi stężeniami NAA. Regeneracja przebiegała w temperaturze 24°C, połowę eksplantatów umieszczono w ciemności, a drugą połowę przy 16 godzinnym oświetleniu białym światłem fluorescencyjnym (o natężeniu napromienienia kwantowego 24

¹ Badania wykonano w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych No 3P06R 07724.

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) i 8 godzinach w ciemności.

Po trzech miesiącach oznaczono procent eksplantantów regenerujących kalus, cebulki i korzenie oraz liczbę cebulek zróżnicowanych na jednym eksplantacie. Oceniono również wielkość uformowanych na świetle cebulek i liści oraz liczbę korzeni wg czterech klas bonitacyjnych:

Cebulki: 1 – średnica do 2 mm; 2 – od 2,1–4 mm; 3 – od 4,1–6 mm; 4 – powyżej 6,1 mm. Liście: 1 – bez liści; 2 – liście do 4 cm długości; 3 – od 4,1–8 cm; 4 – powyżej 8,1 cm. Korzenie: 1 – bez korzeni; 2 – 1–3 korzenie; 3 – 4–6 korzeni; 4 – powyżej 6 korzeni.

Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym, w każdej kombinacji było 25 eksplantatów. Wyniki opracowano statystycznie metodą jednoczynnikowej analizy wariancji, a do porównania średnich użyto testu t-Dunkana.

Wyniki i dyskusja

Regeneracja eksplantatów dwuuskowych zwartnicy Chmiela zachodziła we wszystkich kombinacjach, jednak jej efekt był różny (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Wpływ BA i NAA na regenerację zwartnicy Chmiela z eksplantatów dwuuskowych
Effect of BA and NAA on the regeneration of *Hippeastrum × chmielii* from twin scales

Regulatory wzrostu Growth regulators ($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$)			Procent eksplantatów*; % explants*				
	BA	NAA	nieregenerujących non regenerating	z kalusem with callus	z korzeniami with roots	z cebulkami with bulblets	
Światło Light	0	0	4	0	20	96	
		0,1	12	0	32	88	
		1	12	4	32	84	
		5	8	40	44	52	
	1	0	0	0	0	24	100
		0,1	0	0	0	28	100
		1	0	0	0	32	100
		5	0	12	56	88	
	5	0	0	0	0	28	100
		0,1	0	0	0	12	100
		1	0	4	24	96	
		5	0	32	34	68	
Ciemność Darkness	0	0	0	0	12	100	
		0,1	0	0	8	100	
		1	16	4	16	80	
		5	4	28	52	68	
	1	0	0	0	0	20	100
		0,1	0	0	0	16	100
		1	0	0	0	56	100
		5	0	13	64	88	
	5	0	0	0	8	8	92
		0,1	0	0	0	8	100
		1	0	12	22	88	
		5	0	36	44	64	

* Liczba eksplantatów w kombinacji 30 = 100%; Number of explants in the treatment 30 = 100%

Niewielki procent eksplantatów (4–16%) bez jakiegokolwiek oznak morfogenezy obserwowano na pożywce pozbawionej regulatorów wzrostu lub w obecności NAA. Procent eksplantatów różnicujących cebulki zależał od obecności egzogennych regulatorów wzrostu i ich stężenia. Bez regulatorów wzrostu cebulki uformowało 96% eksplantatów. Wzrastające stężenie NAA bez obecności BA zmniejszało zdolność eksplantatów do różnicowania cebulek. W obecności BA i 0–0,1 mg·dm⁻³ NAA cebulki różnicowało do 100% eksplantatów, niezależnie od warunków świetlnych (tab. 1). Najwyższy procent eksplantatów z kalusem i korzeniami obserwowano w obecności 5 mg·dm⁻³ NAA (tab. 1).

Liczba cebulek zróżnicowanych na jednym eksplantacie zwartnicy Chmiela zależała od obecności regulatorów wzrostu w pożywce (tab. 2). Najwięcej cebulek uformowały eksplantaty umieszczone na pożywce zawierającej 1 lub 5 mg·dm⁻³ BA albo 1 mg·dm⁻³ BA przy jednoczesnej obecności 0,1–1 mg·dm⁻³ NAA. Po zastosowaniu 5 mg·dm⁻³ NAA, niezależnie od obecności cytokiny, tworzyło się najmniej cebulek.

Tabela 2; Table 2

Wpływ BA i NAA na różnicowanie cebulek przybyszowych
z eksplantatów dwuluskowych zwartnicy Chmiela
Effect of BA and NAA on the bulblet regeneration from twin
scales of *Hippeastrum × chmielii*

Regulatory wzrostu Growth regulators (mg·dm ⁻³)		Liczba cebulek na eksplantat; Number of bulblets per explant		
BA	NAA	światło light	ciemność darkness	średnia mean
0	0	2,12	2,40	2,26 de
	0,1	2,92	2,44	2,68 bc
	1	1,80	2,48	2,14 de
	5	1,44	1,72	1,58 f
1	0	3,56	3,88	3,72 a
	0,1	3,48	2,92	3,20 ab
	1	3,60	2,84	3,22 ab
5	5	2,12	1,68	1,90 ef
	0	3,24	2,80	3,02 ab
	0,1	2,84	2,52	2,68 bc
	1	2,48	2,24	2,36 cd
	5	1,96	1,68	1,82 ef
Średnia; Mean		2,60 a	2,50 a	

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy poziomie $p = 0,05\%$; Value followed by the same letter are not significantly different $p = 0.05\%$

Światło i ciemność nie wpłynęły na liczbę cebulek uformowanych na eksplantacie zwartnicy Chmiela (tab. 2), podobnie jak u zwartnicy mieszańcowej [YANAGAWA, SAKANISHI 1977].

Największe cebulki z długimi liśćmi i licznymi korzeniami uzyskano na pożywce bez regulatorów wzrostu, a także w obecności 1 mg·dm⁻³ BA lub 5 mg·dm⁻³ BA z dodatkiem 0,1–1 mg·dm⁻³ NAA (tab. 3). Najmniejsze cebulki, z najkrótszymi liśćmi i najmniejszą liczbą korzeni, wyrosły w obecności 5 mg·dm⁻³ NAA, a także 5 mg·dm⁻³ BA i 5 mg·dm⁻³ NAA.

Tabela 3; Table 3

Wpływ BA i NAA na jakość roślin zwartnicy Chmiela zróżnicowanych na eksplantatach dwułuskowych na świetle

Effect of BA and NAA on the quality of plantlets *Hippeastrum* × *chmielii* formed on twin scales

Regulatory wzrostu Growth regulators (mg·dm ⁻³)		Ocena bonitacyjna Evaluation		
BA	NAA	cebulki (skala 1-4) bulblets (scale 1-4)	liście (skala 1-4) leaves (scale 1-4)	korzenie (skala 1-4) roots (scale 1-4)
0	0	3,27	3,07	3,07
	0,1	2,90	2,77	3,17
	1	2,93	2,73	2,30
	5	2,17	2,33	2,30
1	0	3,30	3,20	3,63
	0,1	2,83	2,50	3,73
	1	3,13	2,93	3,13
	5	3,03	3,00	2,27
5	0	2,93	2,80	3,10
	0,1	3,40	3,17	3,47
	1	3,43	3,27	3,27
	5	2,47	2,83	2,93

Nie potwierdziły się wyniki uzyskane dla eksplantatów dwułuskowych zwartnicy mieszańcowej, u której organogeneza była uzależniona głównie od obecności NAA w pożywce [Mii i in. 1974]. Autorzy ci uznali działanie kinetyny za mniej efektywne, a nawet toksyczne dla formowania cebulek przy wysokim stężeniu (10 mg·dm⁻³). Również wcześniejsze badania nad zwartnicą Chmiela wykazały, że obecność 1 mg·dm⁻³ BA i 0,1 mg·dm⁻³ NAA w pożywce korzystniej wpływała na różnicowanie cebulek na eksplantatach dwułuskowych w porównaniu z pożywką zawierającą 5 mg·dm⁻³ kinetyny i 0,5 mg·dm⁻³ IAA [WITOMSKA 2002b].

HUSSEY [1975] zauważył, że spośród różnych roślin z rodziny *Amaryllidaceae*, *Iridaceae* i *Liliaceae* tylko u *Hippeastrum* bezpośrednia organogeneza cebulek zachodziła bez auksyn lub przy bardzo niskim ich stężeniu. U zwartnicy mieszańcowej dobre efekty w formowaniu cebulek na eksplantatach łuskowych powodowało stosowanie znacznej przewagi BA w stosunku do NAA [BACH, PIĄK 1997; KUTYLA, CHMIEL 2000]. Również u *Hippeastrum vittatum* cebulki przybyszowe różnicują się dobrze w obecności BA 10 mg·dm⁻³ i NAA 1 mg·dm⁻³ [ARIEGA-AMADOR i in. 1998] lub BA 8 mg·dm⁻³ z dodatkiem NAA 4 mg·dm⁻³ i 60 mg·dm⁻³ siarczanu adeniny [SAKER i in. 1998]. U *Amaryllis belladonna* zalecany stosunek BA : NAA był zależny od pory roku i wynosił 24 : 1 wiosną i aż 40 : 1 jesienią [BRUYN i in. 1992]. Działające antagonistycznie w stosunku do auksyn morfaktyny czy kwas trójiodobenzoesowy (TIBA) sprzyjają formowaniu cebulek na pojedynczych łuskach zwartnicy mieszańcowej, w przeciwieństwie do NAA [OKUBO i in. 1999]. Obecność NAA w pożywce jest jednak konieczna do różnicowania cebulek na eksplantatach pędowych zwartnicy mieszańcowej, podczas gdy cytokininy: BA lub ZiP mają mniejsze znaczenie [PIERIK i in. 1990].

Liczba cebulek uzyskiwanych z jednego eksplantatu zależy nie tylko od egzogennych regulatorów wzrostu, lecz także od gatunku i klonu zwartnicy. Na pożywce bez regulatorów wzrostu u zwartnicy mieszańcowej udało się uzyskać

jedynie 1,2 cebulki [WITOMSKA 2002a], podczas gdy u zwartnicy Chmiela od 1,1–2,2 cebulek [WITOMSKA, NOSARZEWSKA 2001; WITOMSKA 2002b]. Zastosowanie BA $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ + NAA $0,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ umożliwiło uformowanie 1,7 cebulek u zwartnicy mieszańcowej [KUTYŁA, CHMIEL 2000]. Natomiast u zwartnicy Chmiela przy obecności BA $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ lub BA $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i NAA $0,1\text{--}1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ można uzyskać powyżej 3 cebulek z eksplantatu, co wydaje się niezłym efektem.

Liczba cebulek różnicowanych na eksplantacie jest też modyfikowana przez takie czynniki, jak jakość światła [BACH, PTAK 1997; WITOMSKA, NOSARZEWSKA 2001], stężenie sacharozy w pożywce [WITOMSKA 2002a; PIERIK i in. 1990] i wielkość eksplantatu [HUANG i in. 1990].

Wnioski

1. Różnicowanie cebulek przybyszowych na dwułuskowych eksplantatach zwartnicy Chmiela może zachodzić spontanicznie, jednak obecność odpowiednich stężeń BA i NAA stymuluje ten proces.
2. Obecność w pożywce wyłącznie BA ($1\text{--}5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) a także BA i niskiego stężenia NAA ($0,1\text{--}1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stymuluje proces różnicowania cebulek z eksplantatów, a także wpływa korzystnie na ich wielkość.
3. Zbyt wysoka koncentracja NAA ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) obniża procent eksplantatów różnicujących cebulki, liczbę cebulek z eksplantatu, wielkość cebulek i liści oraz liczbę korzeni.
4. Światło i ciemność nie wpływają na liczbę cebulek uformowanych na eksplantacie dwułuskowym.

Literatura

- ARTEAGA-AMADOR M., PEÑA-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 hipeastrum (Hippeastrum hybridum) w warunkach in vitro*. Zesz. Nauk. AR w Krakowie 318: 191–193.
- 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.
- HUANG C.W., OKUBO H., UEMOTO S. 1990. *Comparison of bulblet from twin scales and single scales in Hippeastrum x hybridum cultured in vitro*. Scien. Horticult. 42: 151–160.
- HUSSEY G. 1975. *Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26: 253–262.
- KUTYŁA M., CHMIEL H. 2000. *Wpływ rodzaju pożywki oraz wielkości eksplantatu na rozmnażanie Hippeastrum x hybridum w kulturach in vitro*. Zesz. Nauk. ISiK 7: 249–254.

- MII M., MORI T., IWASE N. 1974. *Organ formation from the excised bulb scales of Hippeastrum hybridum in vitro*. J. Hort. Sci. 49: 241–244.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473–497.
- OKUBO H., HUANG C., KISHIMOTO E., HUANG C.W. 1999. *Effects of anti – auxins and basal plate on bulbet formation in scale propagation of amaryllis (Hippeastrum hybridum)*. J. Japan Soc. for Hort. Sci. 68: 513–518.
- 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-BAHIR M. 1998. *Towards commercial production of ornamental bulbs in vitro*. Egyptian Journal of Horticulture 25(1): 113–128.
- WITOMSKA M. 2002a. *Effect of sucrose concentration, BA and NAA on regeneration in vitro of Hippeastrum × chmielii CHM*. Annals of Warsaw Agricultural University – SGGW Horticulture, Landscape Architecture 23: 17–22.
- WITOMSKA M. 2002b. *Wpływ regulatorów wzrostu i sacharozy na regenerację in vitro zwartnicy mieszańcowej (Hippeastrum hybridum) i zwartnicy Chmiela (Hippeastrum × chmielii CHM.)*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 483: 263–270.
- WITOMSKA M., NOSARZEWSKA R. 2001. *Wpływ barwy światła i regulatorów wzrostu na regenerację zwartnicy chmiela (Hippeastrum × chmielii CHM.) in vitro*. Roczn. AR w Poznaniu 33: 151–156.
- YANAGAWA T., SAKANISHI Y. 1977. *Regeneration of bulblets on Hippeastrum bulb segments excised from various parts of a parent bulb*. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 46: 250–260.

Słowa kluczowe: *Hippeastrum × chmielii* CHM., BA, NAA, *in vitro*

Streszczenie

W Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW prowadzone są badania nad optymalizacją rozmnażania *in vitro* nowego mieszańca międzygatunkowego – zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum × chmielii* CHM.).

Niniejsze badania przeprowadzono w 2002/2003 roku. Określono wpływ 6 – benzyloaminopuryny (BA) w stężeniach 0, 1 i 5 mg·dm⁻³ we współdziałaniu z kwasem α -naftalenooctowym (NAA) w stężeniach 0; 0,1; 1 i 5 mg·dm⁻³ na różnicowanie cebulek z eksplantatów dwułuskowych zwartnicy Chmiela. Regeneracja przebiegała w ciemności lub przy 16 godzinnym oświetleniu białym światłem fluorescencyjnym (o natężeniu napromienienia kwantowego 24 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) i 8 godzin ciemności.

Liczba cebulek zróżnicowanych na jednym eksplancie zależała od obecności regulatorów wzrostu w pożywce. Najwięcej cebulek zróżnicowały eksplantaty umieszczone na pożywce zawierającej wyłącznie BA 1 lub 5 mg·dm⁻³ lub BA 5 mg·dm⁻³ przy jednoczesnej obecności NAA 0,1 lub 1 mg·dm⁻³. W obecności NAA

5 mg·dm⁻³, niezależnie od obecności cytokininy, najniższy procent eksplantatów różnicował cebulki i tworzyło się najmniej cebulek na eksplantacie.

Warunki świetlne nie wpłynęły na liczbę cebulek przybyszowych uformowanych na eksplantacie.

EFFECT OF BA AND NAA ON BULBLET DIFFERENTIATION FROM TWIN SCALES OF *Hippeastrum × chmielii* CHM. *in vitro*

Maria Witomska, Agnieszka Ilczuk

Department of Ornamental Plants, Warsaw Agricultural University, Warszawa

Key words: *Hippeastrum × chmielii* CHM., BA, NAA, *in vitro*

Summary

Trials on micropropagation of a new interspecific hybrid *Hippeastrum × chmielii* CHM. are being carried out in the Department of Ornamental Plants at Warsaw Agricultural University. In 2002/2003 the effect of benzylaminopurine (BA) in concentrations: 0, 1 or 5 mg·dm⁻³ together with α -naphthleneacetic acid (NAA) in concentrations: 0; 0.1; 1 or 5 mg·dm⁻³ on the bulblet regeneration from twin scale explants was studied. Regeneration proceeded on MS medium, at 24°C, in darknes or under white, fluorescent light (24 μ mol·m⁻²·s⁻¹, for 16 hours and 8 hours darkness).

A number of bulblets regenerated on a single explant depended on the presence of growth regulators in the medium. The best regeneration was observed on medium with BA 1 or 5 mg·dm⁻³ or BA 1 mg·dm⁻³ together with NAA 0,1 or 1 mg·dm⁻³. In the presence of the highest NAA concentration (5 mg·dm⁻³) both the percentage of explants regenerating bulblets and the number of bulblets per explant were the lowest.

Light conditions did not affect bulblet regeneration on the twin scale explants.

Dr Maria **Witomska**

Katedra Roślin Ozdobnych

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

ul. Nowoursynowska 166

02-787 WARSZAWA