



## Formowanie cebul przybyszowych w kulturach *in vitro* eksplantatów łuskowych zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum x chmielii* Chm.)

Maria Witomska, Agnieszka Ilczuk

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,  
Warszawa

### Formation of adventitious bulblets *in vitro* on scale explants in *Hippeastrum x chmielii* Chm.

#### Summary

Trials on micropropagation of a new interspecific hybrid *Hippeastrum x chmielii* are being carried out in the Department of Ornamental Plants at the Warsaw Agricultural University. In 2002-2003, an effect of BA on bulblet differentiation from explants of different size was tested. Initial material consisted of bulblets (5-6 mm of diameter, mean fresh weight 0,164 g) produced *in vitro* on MS medium without growth regulators. The bulblets were cut into halves or quarters along the main axis and placed polarly or apolarly on MS medium without growth regulators or with BA 1, 2, 4 or 8 mg·dm<sup>-3</sup>. Regeneration proceeded at 24°C under white, fluorescent light (24 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) for 16 hours and 8 hours of darkness.

On the explants with basal part in the medium, the cytokinin limited a number of bulblets regenerated on both types of explants. The bulbs cut into quarters formed more bulblets than those cut in halves. When the explants were placed apically, the numbers of regenerated bulblets were similar in all the treatments.

Fresh weight of bulblets regenerated on smaller explants (1/4 of a bulb) was higher when explants were placed polarly. Polarity did not affect the weight of bulblets produced on larger explants.

#### Key words:

*Hippeastrum x chmielii*, *in vitro*, BA, explant size, polarity, adventitious bulblets.

#### Adres do korespondencji

Maria Witomska,  
Katedra Roślin  
Ozdobnych,  
Szkoła Główna  
Gospodarstwa Wiejskiego,  
ul. Nowoursynowska 166,  
02-787 Warszawa.

## 1. Wstęp

Zwartnica Chmiela (*Hippeastrum x chmielii* Chm.) jest atrakcyjną rośliną cebulową, doskonałą do uprawy doniczkowej i na kwiat cięty. Wyselekcjonowane klony tego gatunku mają piękne barwy kwiatów, bujnie rosną i obficie kwitną. Aby można je było szybko wprowadzić do masowej uprawy, konieczne jest opracowanie efektywnej metody mikrorozmnażania.

Na organogenezę roślin cebulowych *in vitro* wpływa wiele czynników, m.in. wielkość i rodzaj eksplantatu (1-8), sposób ułożenia eksplantatu na pożywce (1,2,4,9-12) oraz regulatory wzrostu (2,5,13-16).

Celem pracy było ustalenie wpływu BA oraz wielkości i polarności eksplantatów na różnicowanie cebulek przybyszowych zwartnicy Chmiela.

## 2. Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 2002/2003 w Katedrze Roślin Ozdobnych SGGW. Materiałem były cebule klonu 18 zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum x chmielii* Chm.) o średnicy 5-6 mm i średniej świeżej masie 0,164 g. Uzyskano je *in vitro* z eksplantatów łuskowych na pożywce MS (17) bez regulatorów wzrostu. Cięto je na połowki (o średniej świeżej masie 0,082 g) lub ćwiartki (o średniej świeżej masie 0,041 g) wzdłuż osi głównej i wykładano na pożywkę MS bez regulatorów wzrostu oraz z 6-benzyloadeniną (BA) 1, 2, 4 lub 8 mg·dm<sup>-3</sup>, stroną bazalną lub apikalną. Regeneracja przebiegała przy 16-godzinnym oświetleniu białym światłem fluorescencyjnym (o natężeniu napromienienia kwantowego 24 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) i 8 godzin w ciemności.

Po trzech miesiącach oznaczono liczbę cebulek przybyszowych uformowanych na jednym eksplancie i obliczono liczbę cebulek uzyskanych z jednej cebuli. Oznaczono również świeżą masę zróżnicowanych roślin, cebulek, liści, i korzeni.

Doświadczenia założono w układzie całkowicie losowym, w każdej kombinacji było 30 eksplantatów. Wyniki opracowano statystycznie metodą dwuczynnikowej analizy wariancji, a dla porównania średnich użyto testu t-Duncana.

## 3. Wyniki i dyskusja

Przy polarnym ułożeniu eksplantatów na pożywce stężenie BA i wielkość eksplantatu miały wpływ na liczbę formowanych cebulek (tab. 1). Na pożywce bez cytokininy i w obecności 1-4 mg·dm<sup>-3</sup> BA eksplantaty różnicowały podobną liczbę cebulek, natomiast przy stężeniu 8 mg·dm<sup>-3</sup> BA liczba cebulek była mniejsza. Eksplantaty małe (1/4 cebuli) ułożone polarnie wytwarzały więcej cebulek niż eksplantaty duże (1/2 cebuli). Najmniej cebulek uformowały eksplantaty duże przy najwyższym stężeniu

niu BA (tab. 1). Przy apolarnym ułożeniu eksplantatów obecność i stężenie BA oraz wielkość eksplantatu nie wpływały na liczbę formowanych cebulek (tab. 2).

Tabela 1

Wpływ BA i wielkości eksplantatu ułożonego polarnie na formowanie cebulek przybyszowych

Wielkość eksplantatu	Liczba cebulek z eksplantatu					Średnia*	Liczba cebulek z 1 cebuli
	Stężenie BA (mg · dm <sup>-3</sup> )						
	0	1	2	4	8		
1/2 cebuli	1,43	1,60	1,26	1,60	0,96	<b>1,37 a</b>	2,76
1/4 cebuli	1,96	1,43	1,80	1,60	1,50	<b>1,66 b</b>	6,64
Średnia*	<b>1,70 b</b>	<b>1,52 ab</b>	<b>1,53 ab</b>	<b>1,60 ab</b>	<b>1,23 a</b>	–	–

\* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) wg testu t-Duncana

Tabela 2

Wpływ BA i wielkości eksplantatu ułożonego apolarnie na formowanie cebulek przybyszowych

Wielkość eksplantatu	Liczba cebulek z eksplantatu					Średnia*	Liczba cebulek z 1 cebuli
	Stężenie BA (mg · dm <sup>-3</sup> )						
	0	1	2	4	8		
1/2 cebuli	1,23	1,63	1,46	1,60	1,43	<b>1,47 a</b>	2,94
1/4 cebuli	1,86	1,53	1,66	1,53	1,16	<b>1,54 a</b>	6,16
Średnia*	<b>1,54 a</b>	<b>1,58 a</b>	<b>1,56 a</b>	<b>1,56 a</b>	<b>1,30 a</b>	–	–

\* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) wg testu t-Duncana

U zwartnicy Chmiela wszystkie eksplantaty wyłożone na pożywkę zarówno polarnie, jak i apolarnie różnicowały cebulki przybyszowe. U *Lilium longiflorum* polarność ułożenia eksplantatów nie miała wpływu na procent łusek różnicujących cebulki ani na liczbę cebulek uformowanych na eksplantacie (9). Również u *Amaryllis belladonna* polarność sadzonek dwułuskowych nie miała wpływu na regenerację (2). U *Nerine bowdenii* przy polarnym ułożeniu eksplantatów łuskowych tylko 15% różnicowało cebulki, natomiast aż 79% przy ułożeniu apolarnym. Polarne ułożenie stymulowało jednak liczbę cebulek uzyskanych z eksplantatu (4), podobnie jak u zwartnicy Chmiela i *Amaryllis belladonna*, gdy eksplantatami były ćwiartki małych cebul (2).

Wydajność i charakter regeneracji zależą od wielkości eksplantatów. Tak, jak u zwartnicy Chmiela, lepsze efekty regeneracji uzyskano po krojeniu łusek cebul

*Lilium speciosum* na eksplantaty mniejsze. Wprawdzie większe fragmenty łusek ( $15 \times 15$  mm) różnicowały więcej pędów niż mniejsze ( $5 \times 5$  mm), ale łącznie uzyskano kilkakrotnie większą liczbę pędów z tej samej powierzchni łuski (1). Podobnie u tulipana pędy krojone na 2 lub 4 części wykazywały wyższy potencjał regeneracyjny niż całe pędy (8).

U hiacyntha liczba cebulek była proporcjonalna do długości eksplantatów, a efekt ten wyjaśniany jest większą zawartością składników pokarmowych w łuskach długich (7). W szczegółowych badaniach nad *Hippeastrum hybridum* wykazano, że sadzonki dwułuskowe długości 20 mm różnicują 2,1 cebulek, długości 10 mm – 1,5 cebulek, natomiast sadzonki jeszcze krótsze nie różnicują cebulek wcale (6). Podobnie na najszerszych eksplantatach łuskowych tego gatunku formowała się największa liczba cebulek (5). U *Nerine bowdenii* eksplantaty pędowe długości 1 mm wytwarzały kalus, długości 3 mm – kalus i cebulki, a 5 mm długości – korzenie (4). Dla różnych gatunków roślin i rodzajów eksplantatów istnieje zatem pewna optymalna, ekonomiczna wielkość eksplantatu.

Tabela 3

Wpływ BA i sposobu ułożenia eksplantatów małych ( $1/4$  cebuli) na świeżą masę (g) zregenerowanych roślin

	Sposób umieszczenia eksplantatów	Stężenie BA ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ )					Średnia*
		0	1	2	4	8	
Całe rośliny	strona bazalna	0,569	0,459	0,367	0,338	0,368	<b>0,420 b</b>
	strona apikalna	0,322	0,296	0,527	0,315	0,217	<b>0,335 a</b>
	Średnia*	<b>0,445 b</b>	<b>0,377 ab</b>	<b>0,447 b</b>	<b>0,327 a</b>	<b>0,293 a</b>	–
Cebulki przybyszowe	strona bazalna	0,268	0,178	0,143	0,170	0,178	<b>0,187 a</b>
	strona apikalna	0,182	0,148	0,280	0,165	0,123	<b>0,179 a</b>
	Średnia*	<b>0,225 c</b>	<b>0,163 ab</b>	<b>0,211 bc</b>	<b>0,168 ab</b>	<b>0,150 a</b>	–
Liście	strona bazalna	0,224	0,224	0,179	0,147	0,198	<b>0,194 b</b>
	strona apikalna	0,103	0,113	0,194	0,114	0,088	<b>0,122 a</b>
	Średnia*	<b>0,163 ab</b>	<b>0,168 ab</b>	<b>0,186 b</b>	<b>0,130 a</b>	<b>0,143 ab</b>	–
Korzenie	strona bazalna	0,076	0,055	0,044	0,021	0,034	<b>0,046 b</b>
	strona apikalna	0,036	0,034	0,042	0,041	0,005	<b>0,032 a</b>
	Średnia*	<b>0,056 c</b>	<b>0,045 bc</b>	<b>0,043 bc</b>	<b>0,031 bc</b>	<b>0,019 a</b>	–

\* Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) wg testu t-Duncana

Świeża masa roślin zwartnicy Chmiela uformowanych na eksplantatach małych ( $1/4$  cebuli) była wyższa przy ułożeniu stroną bazalną na pożywce (tab. 3). Na pożywce bez cytokininy i przy niższych stężeniach BA ( $1-2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) świeża masa roślin była wyższa niż przy wysokiej koncentracji BA ( $4$  i  $8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

Sposób ułożenia eksplantatów małych nie wpływał na świeżą masę cebulek (tab. 3). Cebulki o najwyższej świeżej masie uformowały się na pożywce bez cytokininy, a bardzo niską świeżą masę miały cebulki zróżnicowane w obecności  $8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BA.

Polarne ułożenie eksplantatów małych (1/4 cebulki) stymulowało świeżą masę liści i korzeni (tab. 3). Liście o najniższej świeżej masie uzyskano w obecności 4 mg·dm<sup>-3</sup> BA, w pozostałych kombinacjach świeża masa liści nie różniła się. Świeża masa korzeni była najniższa przy 8 mg·dm<sup>-3</sup> BA, w pozostałych kombinacjach nie wykazywała różnic (tab. 3).

Nie zaobserwowano różnic w świeżej masie roślin i cebulek (tab. 4) uformowanych na eksplantatach dużych (1/2 cebuli) wyłożonych polarnie lub apolarnie. Na świeżą masę roślin i cebulek wpływała obecność i stężenie BA w pożywce. Najwyższą świeżą masą odznaczały się rośliny i cebulki zróżnicowane bez obecności BA, a najniższą – w obecności wysokich stężeń BA (tab. 4).

Tabela 4

Wpływ BA i sposobu ułożenia eksplantatów dużych (1/2 cebuli) na świeżą masę (g) zregenerowanych roślin

	Sposób umieszczenia eksplantatów	Stężenie BA (mg·dm <sup>-3</sup> )					Średnia*
		0	1	2	4	8	
Całe rośliny	strona bazalna	0,623	0,397	0,460	0,393	0,348	<b>0,444 a</b>
	strona apikalna	0,485	0,426	0,467	0,291	0,299	<b>0,394 a</b>
	Średnia*	<b>0,554 c</b>	<b>0,412 ab</b>	<b>0,463 bc</b>	<b>0,342 a</b>	<b>0,323 a</b>	–
Cebulki przybyszowe	strona bazalna	0,307	0,160	0,190	0,173	0,184	<b>0,203 a</b>
	strona apikalna	0,275	0,230	0,257	0,134	0,173	<b>0,214 a</b>
	Średnia*	<b>0,291 b</b>	<b>0,195 a</b>	<b>0,224 ab</b>	<b>0,154 a</b>	<b>0,178 a</b>	–
Liście	strona bazalna	0,224	0,163	0,210	0,170	0,129	<b>0,179 b</b>
	strona apikalna	0,150	0,153	0,148	0,130	0,118	<b>0,140 a</b>
	Średnia*	<b>0,187 b</b>	<b>0,158 ab</b>	<b>0,179 b</b>	<b>0,150 ab</b>	<b>0,123 a</b>	–
Korzenie	strona bazalna	0,091	0,045	0,059	0,049	0,035	<b>0,056 b</b>
	strona apikalna	0,059	0,042	0,051	0,027	0,004	<b>0,037 a</b>
	Średnia*	<b>0,075 c</b>	<b>0,044 b</b>	<b>0,055 b</b>	<b>0,038 ab</b>	<b>0,020 a</b>	–

\* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) wg testu t-Duncana

Z eksplantatów dużych wyrastały rośliny o wyższej świeżej masie liści i korzeni (tab. 4) przy polarnym ułożeniu na pożywce. Świeża masa liści i korzeni była najwyższa bez obecności BA w pożywce, a najniższa przy stężeniu 8 mg·dm<sup>-3</sup> BA.

Świeża masa roślin zróżnicowanych na małych eksplantatach zwartnicy Chmiela była wyższa przy ułożeniu polarnym, a przy użyciu eksplantatów dużych polarność nie miała wpływu na tę cechę. Na świeżą masę roślin wpływała obecność i stężenie BA w pożywce. Największą świeżą masę uzyskiwały rośliny i cebulki uformowane bez BA.

U *Nerine bowdenii* świeża masa cebulek była dwukrotnie wyższa przy apolarnym ułożeniu eksplantatów na pożywce (4), natomiast u *Lilium longiflorum* nie stwierdzo-

no różnic w wielkości i masie cebulek uformowanych na eksplantatach wyłożonych polarnie i apolarnie (9).

Obecność w pożywce BA ( $1-5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), a także BA we współdziałaniu z niskim stężeniem NAA ( $0,1-1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) stymulowała różnicowanie cebulek z eksplantatów luskowych zwartnicy Chmiela i wpływała korzystnie na ich wielkość (16). Również u *Hippeastrum hybridum* (5,14), *Hippeastrum vittatum* (13,15) i *Amaryllis belladonna* (2) cebulki przybyszowe różnicują się dobrze przy znacznej przewadze BA w stosunku do NAA.

U roślin z rodziny *Amaryllidaceae* cebulki różnicują się zawsze na bazalnych częściach łusek, bez względu na sposób ułożenia na pożywce. Cebulki formują się z komórek epidermy i subepidermy znajdujących się w pobliżu tkanki naczyniowej, którą przemieszczają się endogenne stymulatory wzrostu w kierunku bazypetalnym (18). Jakkolwiek apolarnie ułożenie eksplantatów luskowych dało bardzo dobre efekty u *Nerine* (4), wyniki te nie potwierdziły się u zwartnicy Chmiela. Dla różnicowania cebulek przybyszowych tego ostatniego gatunku bardziej korzystne okazało się polarne wykładanie na pożywkę eksplantatów małych. Prawdopodobnie wystąpił tu tzw. efekt zranienia, który zakłóca polarne przemieszczanie auksyn (1).

#### 4. Wnioski

1. Tylko przy polarnym ułożeniu eksplantatów stężenie BA w pożywce i wielkość eksplantatu miały wpływ na liczbę uformowanych cebulek.

2. Świeża masa roślin uformowanych na eksplantatach małych (1/4 cebuli) zależała od sposobu ułożenia na pożywce oraz od obecności i stężenia BA.

3. Świeża masa roślin zróżnicowanych na eksplantatach dużych (1/2 cebuli) nie była zależna od sposobu ułożenia na pożywce, natomiast wpływały na tę cechę obecność i stężenie BA.

Badania wykonano w ramach grantu KBN No 3PO6R 07724.

#### Literatura

1. Aartrijk J. van, Blom-Barnhoorn G. J., (1983), Z. Pflanzenphysiol., 110, 355-363.
2. Bruyn M. H., Ferreira D. I., Slabbert M. M., Pretorius J., (1992), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31, 179-184.
3. Huang C. W., Okubo H., Uemoto S., (1990), Sci. Hort., 42, 151-160.
4. Jacobs G., Richard M., Allderman L. A., Theron K. I., (1992), Acta Hort., 475-479.
5. Kutyła M., Chmiel H., (2000), Zeszyty Naukowe ISiK, 7, 249-254.
6. Okubo H., Huang C. W., Uemoto S., (1990), Acta Hort., 266, 59-65.
7. Pierik R. L. M., Post A. J. M., (1973), Sci. Hort., 3, 293-297.
8. Taeb A. G., Alderson P. G., (1987), Acta Hort., 212, vol. II, 677-681.

9. Leshem B., Lilien-Kipnis H., Steinitz B., (1982), *Sci. Hort.*, 17, 129-136.
10. Pierik R. L. M., Ruibing M. A., (1973), *Neth. J. Agric. Sci.*, 21, 129-138.
11. Seabrook J. E. A., Cumming B. G., (1977), *In vitro*, 13, 831-836.
12. Yanagawa T., Sakanishi Y., (1977), *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 46, 250-260.
13. Arteaga-Amador M., Pena-Garcia E., Perez-Montesino D., Torriente-Campos Z., Kang-Cholgyu, Kang C. G., (1998), *Revista del Jardin Botanico Nacional*, 19, 103-111.
14. Bach A., Ptak A., (1997), *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie*, 318, 191-193.
15. Saker M., Rady M., El-Bahr M., (1998), *Egyptian Journal of Horticulture*, 25(1), 113-128.
16. Witomska M., Ilczuk A., (2003), *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol.*, 491, 355-361.
17. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
18. Yanagawa T., Sakanishi Y., (1980), *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 49, 119-126.