Wpływ chłodzenia cebul matecznych i regulatorów wzrostu na formowanie cebul przybyszowych zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum* x *chmielii* Chm.) *in vitro*

Agnieszka Ilczuk, Maria Witomska

Katedra Roślin Ozdobnych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Effect of bulb chilling and growth regulators on the *in vitro* bulblet regeneration in *Hippeastrum* x *chmielii* Chm.

Summary

Selected clones of a new intergeneric species *Hippeastrum* x *chmielii* Chm. grow vigorously, flower abundantly and produce flowers in clear, vivid colors. The hybrid is suitable both for cut flower production and as a pot plant. A great demand for planting the material is expected, therefore it is necessary to elaborate an efficient micropropagation method where due to application of growth regulators the bulblets can be differentiated from different tissues. To meet this goal, the trials were undertaken to propagate this hybrid from inflorescence shoots (scapes) obtained from bulbs (clone 2/7) chilled for 3, 5 or 7 months at 4°C. Both the length of chilling and the growth regulators in the MS medium affected bulblet regeneration. On the medium without growth regulators bulblets were scarce and appeared only on shoot explants from bulbs chilled for 5 months. The presence of 2 mg·dm^{-3} isopenthenyladenine (2iP) and 0,2 mg·dm^{-3} α-naphtylacetic acid (NAA), as well as combination of the same auxin with 2 mg·dm^{-3} benzyladenine (BA), stimulated bulblet formation on the explants. After 3 months of chilling, the regeneration was the poorest and the longer the chilling period was the more bulblets were produced on explants, but only in the presence of growth regulators.

Key words:
Hippeastrum x *chmielii, in vitro*, bulb chilling, adventitious bulblets.

Adres do korespondencji

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

biotechnologia
2 (65) 185–190 2004

1. Wstęp

Wyselekcjonowane klony nowego międzygatunkowego mieszańca – zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum* x *chmielii* Chm.) odznaczają się pięknymi barwami kwiatów, obficie kwitną i bujnie rosną. Mogą być stosowane do uprawy doniczkowej i na kwiat cięty (1). Ze względu na potrzebę wyprodukowania dużej ilości materiału nasadzeniowego niezbędne jest opracowanie efektywnych technik mikrorozmnażania. U roślin z rodziny *Amaryllidaceae*, do której należy zwartnica, formowanie cebul przybyszowych może zachodzić na różnych eksplantatach: fragmentach łusek, liściach, czy pędach kwiatostanowych (2-8). Organogenezę stymuluje miedzy innymi obecność regulatorów wzrostu w pożywce oraz oddziaływanie odpowiednią temperaturą na materiał inicjalny (7,9-13).

Celem pracy było określenie wpływu czasu chłodzenia cebul matecznych oraz regulatorów wzrostu w pożywce na formowanie cebul przybyszowych *in vitro* zwartnicy Chmiela z eksplantatów pędowych.

2. Materiał i metody

Badania wykonano w 2002 r. Materiałem były cebule klonu 2/7 zwartnicy Chmiela (*Hippeastrum* x *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 wysadzono 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 kwiatostanowego), 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 (14) w trzech kombinacjach: bez regulatorów wzrostu; 2 $mg \cdot dm^{-3}$ benzyloadeniny (BA) i 0,2 $mg \cdot dm^{-3}$ kwasu α-naftalenooctowego (NAA) lub 2 $mg \cdot dm^{-3}$ izopentyloadeniny (2iP) i 0,2 $mg \cdot dm^{-3}$ NAA. Regeneracja przebiegała w ciemności, w temperaturze 25°C. W każdej kombinacji było 25 eksplantatów wizualnie czystych. Po trzech miesiącach obliczono procent eksplantatów z cebulami oraz liczbę cebul uformowanych na jednym eksplantacie. Dokonano również oceny bonitacyjnej cebul wg 3 klas: **1** – cebule do 2 mm średnicy (o średniej świeżej masie 12 mg ± 1,2); **2** – cebule od 2,1 mm do 4 mm średnicy (o średniej świeżej masie 49 mg ± 4,9); **3** – cebule powyżej 4 mm średnicy (o średniej świeżej masie 118 mg ± 11,8). Policzono również liczbę liści wyrosłych z jednej cebuli.

Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji w programie Statgraphics 4.1, zgodnie

z dwuczynnikowym układem kombinacji doświadczalnych. Różnice między średnimi oceniono na podstawie wartości NIR, przyjmując poziom istotności $\alpha = 0,05$.

3. Wyniki i dyskusja

Stwierdzono wpływ czasu chłodzenia cebul matecznych i regulatorów wzrostu na organogenezę zwartnicy Chmiela. Najwyższy procent eksplantatów różnicował cebule po pięciomiesięcznym chłodzeniu materiału inicjalnego. Po dłuższym lub krótszym okresie chłodzenia procent eksplantatów formujących cebule spadał (dane nie publikowane). Również u *Hippeastrum hybridum* stwierdzono podobny skutek po dłuższym okresie przechowywania cebul w niskiej temperaturze (10). Obecność regulatorów wzrostu stymulowała procent eksplantatów różnicujących cebule (dane nie publikowane), a także liczbę cebul na eksplantacie (tab. 1). Bez egzogennych regulatorów wzrostu cebule powstawały w niewielkiej liczbie tylko po pięciomiesięcznym chłodzeniu (tab. 1). W miarę przedłużania czasu chłodzenia cebul liczba formowanych cebul przybyszowych wzrastała (tab. 1). Największe cebule przybyszowe zróżnicowały się z eksplantatów pobranych z cebul chłodzonych przez 5 miesięcy, szczególnie bez obecności regulatorów wzrostu w pożywce (tab. 2). Nie zaobserwowano różnic w liczbie cebul zróżnicowanych na eksplantacie (tab. 1) oraz w wielkości cebul uformowanych w obecności stosowanych regulatorów wzrostu (tab. 2). Większą liczbę liści miały rośliny wyrosłe z materiału inicjalnego chłodzonego 5 miesięcy (tab. 3). Najwięcej liści wyrosło u roślin uformowanych na pożywce bez regulatorów wzrostu z materiału inicjalnego chłodzonego 5 miesięcy. Na wyrastanie liści korzystniej oddziaływała obecność 2 $mg \cdot dm^{-3}$ 2iP i 0,2 $mg \cdot dm^{-3}$ NAA niż 2 $mg \cdot dm^{-3}$ BA i 0,2 $mg \cdot dm^{-3}$ NAA.

Tabela 1

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

Czas chłodzenia (w miesiącach)	Liczba cebul na eksplantat			
	Regulatory wzrostu			Średnia*
	0	2 $mg \cdot dm^{-3}$ 2iP 0,2 $mg \cdot dm^{-3}$ NAA	2 $mg \cdot dm^{-3}$ BA 0,2 $mg \cdot dm^{-3}$ NAA	
3	0,0	1,6	3,3	**1,63 a**
5	2,0	2,6	5,2	**3,27 b**
7	0,0	7,2	5,9	**4,37 c**
Średnia*	**0,67 a**	**3,80 b**	**4,80 b**	

Dla porównania wszystkich średnich $NIR_{0,05}$ 1,82.

*Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($\alpha = 0,05$) wg testu t-Duncana.

Tabela 2

Wpływ czasu chłodzenia cebul i regulatorów wzrostu na wielkość zregenerowanych cebul

Czas chłodzenia (w miesiącach)	Ocena bonitacyjna (skala 1-3)			
	Regulatory wzrostu			Średnia*
	0	2 mg·dm^{-3} 2iP 0,2 mg·dm^{-3} NAA	2 mg·dm^{-3} BA 0,2 mg·dm^{-3} NAA	
3	0,0	2,2	2,0	**1,40 a**
5	2,5	1,7	1,4	**1,87 b**
7	0,0	1,9	2,0	**1,30 a**
Średnia*	**0,83 a**	**1,93 b**	**1,80 b**	

Dla porównania wszystkich średnich $NIR_{0,05}$ 0,39.

*Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (α = 0,05) wg testu t-Duncana.

Tabela 3

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

Czas chłodzenia (w miesiącach)	Liczba liści na cebulę			
	Regulatory wzrostu			Średnia*
	0	2 mg·dm^{-3} 2iP 0,2 mg·dm^{-3} NAA	2 mg·dm^{-3} BA 0,2 mg·dm^{-3} NAA	
3	0,0	1,5	1,6	**1,0 b**
5	2,0	1,4	1,1	**1,5 c**
7	0,0	1,1	0,3	**0,5 a**
Średnia*	**0,7 a**	**1,3 c**	**1,0 b**	

Dla porównania wszystkich średnich $NIR_{0,05}$ 0,32.

*Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (α = 0,05) wg testu t-Duncana.

Formowanie cebul przybyszowych u roślin z rodziny *Amaryllidaceae* zachodzi najbardziej efektywnie na eksplantatach łuskowych i fragmentach pędów kwiatostanowych (15-19). Eksplantaty łuskowe są trudne do odkażania, znacznie łatwiej uzyskuje się czysty materiał inicjalny z pędów (8,20). Jednak różnicowanie cebul przybyszowych zachodzi wyłącznie na pędach w odpowiednim stadium rozwoju (7,21,22). U *Hippeastrum hybridum* pędy bardzo młode (poniżej 2,5 cm długości) wykazują słabe zdolności regeneracyjne, najbardziej efektywnie formują się cebule z pędów długości 3-5 cm (10). U narcyza pobiera się szypułę jeszcze nie wyrosłą z cebuli, lecz już po wyjściu ze stanu spoczynku (7). U *Crinum macowanii* zaleca się pobieranie pędów długości 7-10 cm (23), a u *Fritillaria imperialis* – 20 cm (20). Stosunkowo niski procent eksplantatów różnicujących cebule u zwartnicy Chmiela prawdopodobnie był spowodowany pobraniem zbyt długich pędów (10-12 cm).

Temperatura oddziałuje na procesy biochemiczne i fizjologiczne wpływające na regulację spoczynku i organogenezę roślin cebulowych *in vitro* (13, 24-26). Chłodzenie cebul lilii w temperaturze 0-5°C przez czas od 18 dni do 12 miesięcy przed pobraniem eksplantatów inicjalnych pozytywnie wpływa na różnicowanie cebul przybyszowych (9,11,12,27). Po dłuższym czasie chłodzenia cebule wychodzą ze stanu spoczynku i potrzebują mniejszego stężenia egzogennych auksyn dla różnicowania cebul przybyszowych (28). Chłodzenie pędów hiacynta powoduje podniesienie stężenia cukrów rozpuszczalnych i bardziej efektywną regenerację (29). U szachownicy cesarskiej przechowywanej w temperaturze 4°C także wzrasta poziom cukrów rozpuszczalnych, ale różnicowanie cebul przybyszowych z takiego materiału jest prawie niemożliwe (13). Zdolność do regeneracji eksplantatów pędowych narcyza zależy od czasu przechowywania cebul w temperaturze 15°C i egzogennych regulatorów wzrostu (7). Różnicowanie cebul zależy także od pozycji eksplantatu na pędzie, co zaobserwowano u *Crinum macowanii* (23), tulipana (22) i narcyza (7).

U zwartnicy Chmiela najlepsze efekty dało pięciomiesięczne chłodzenie cebul matecznych, po którym nawet bez egzogennych regulatorów wzrostu formowały się 2 cebule na eksplantacie. Natomiast po trzech i siedmiu miesiącach chłodzenia cebul różnicowanie cebul przybyszowych musiało być stymulowane obecnością regulatorów wzrostu w pożywce. U *Hippeastrum hybridum* bez egzogennych regulatorów wzrostu obserwowano bardzo słabą regenerację cebul z pędów. Obecność regulatorów wzrostu stymulowała formowanie cebul, a reakcja na stężenie auksyny (NAA) oraz rodzaj i stężenie cytokininy (BA lub 2iP) zależała od odmiany (10).

4. Wnioski

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

Literatura

1. Chmiel H., Szymański P., (2001), Roczn. AR Pozn. CCCXXXII, Ogrodn., 33, 39-44.
2. Gabryszewska E., Saniewski M., (1989), Kosmos, 38(4), 485-503.
3. Hussey G., (1975), J. Exp. Bot., 91, 253-262.
4. Kromer K. D., (1985), Acta Agrobotanica, 38(2), 65-87.
5. Linde van der P. C. G., (1992), Acta Hort., 325, 419-427.
6. Okubo H., Huang C. W., Uemoto S., (1990), Acta Hort., 266, 59-65.
7. Ziv M., Lilien-Kipnis H., Altman A., (1997), Acta Hort., 447, 107-111.
8. Ziv M., Lilien-Kipnis H., (2000), Plant Cell Reports, 19 (9), 845-850.

9. Aartrijk J. van, Blom-Barnhoorn G. J., (1984), J. Plant Physiol., 116(5), 409-416.
10. 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), *Proceedings of Symposium 10-14 November. Eucarpia, Section ornamentals*, Centre for Plant Breeding Research, The Nederlands, 21-26.
11. Stimart D. P., Ascher P. D., (1981a), J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106 (4), 450-454.
12. Stimart D. P., Ascher P. D., (1981b), J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106 (4), 446-450.
13. Witomska M., (2000), Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Roln., 473, 335-341.
14. Murashige T., Skoog F., (1962), Physiol. Plant., 15, 473-497.
15. Hosoki T., Asahira T., (1980), Hort. Sci., 15(5), 602-603.
16. Jacobs G., Richard M., Allderman L. A., Theron K. I., (1992), Acta Hort., 325, 475-479.
17. Mujib A., Jana B. K., Ghosh P. D., (1991), Environ. Ecology, 9 (2), 429-431.
18. Saker M., Rady M., El-Bahr M., (1998), Egyptian Journal of Horticulture, 25(1), 113-128.
19. Seabrook J. E. A., Cumming B. G., (1982), Sci. Hort., 16, 185-190.
20. Witomska M., Łukaszewska A., (1997), Acta Hort., 430, 331-338.
21. de Bruyn M. H., Ferreira D. I., Slabbert M. M., Pretorius J., (1992), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 31, 179-184.
22. Taeb A. G., Alderson P. G., (1987), Acta Hort., 212, vol. II, 677-681.
23. Slabbert M. M., Bruyn de M. H., Ferreira D. J., Pretorius J., (1995), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 43(1), 51-57.
24. Delvallee I., Paffen A., de Klerk G. J., (1990), Physiol. Plant., 80, 431-436.
25. Okubo H., (1992), Acta Hort., 325, 35-41.
26. Stimart D. P., Ascher P. D., Wilkins H. F., (1982), J. Amer. Soc. Hort. Sci., 107, 6, 1004-1007.
27. Takayama S., Misawa M., (1983), Sci. Hort., 18, 353-362.
28. Aartrijk J. van, Blom-Barnhoorn G. J., (1981), Sci. Hort., 14, 261-268.
29. Bach A., Pawłowska B., Pułczyńska K., (1992), Acta Hort., 325, 487-493.