ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN-POLONIA
VOL. IV, 9 SECTIO EEE 1996

Katedra Roślin Ozdobnych Wydziału Ogrodniczego Akademii Rolniczej w Lublinie

Danuta KOZAK, Marek DĄBSKI

Wpływ cytokinin na regenerację pędów *Nematanthus gregarius in vitro*

The Influence of Cytokinins on Shoot Regeneration of *Nematanthus gregarius in vitro*

Nematanthus gregarius (syn. *N. radicans, Hypocyrta radicans*) jest zimozielonym płożącym lub lekko wzniesionym półkrzewem o mięsistych błyszczących liściach. Ma drobne, pękate, pomarańczowożółte kwiaty, pojawiające się od sierpnia do marca. Jest to bardzo dekoracyjna roślina nadająca się do uprawy w wiszących pojemnikach. Można ją rozmnażać z sadzonek pędowych a także metodą *in vitro*, która pozwala na znaczne zwiększenie współczynnika namnażania. Skład pożywki, a przede wszystkim zawartość w niej substancji wzrostowych, decyduje o przebiegu procesów regeneracyjnych. W piśmiennictwie brak opracowań dotyczących wpływu regulatorów wzrostu na regenerację *Nematanthus gregarius in vitro*. Do mnożenia *in vitro* innych roślin z rodziny *Gesneriaceae* stosowano głównie benzyloadeninę w zakresie stężeń od 0,005 do 5 mg/dm^3 (Start i Cumming, 1976; Cooke, 1977; Vazquez i in., 1977; Bilkey i McCown, 1979; Cassells i Plunkett, 1984; Peck i Cumming 1984; Vlahos, 1989). Rzadziej stosowaną cytokininą była kinetyna (Johnson, 1978; Harney i Knap, 1979; Smith i Norris, 1983; Lubomski, 1986). Do indukcji i namnażania pędów wielu innych roślin doniczkowych stosowane są pożywki wzbogacone benzyloadeniną (Soczek i Hempel, 1988; Badzian i in., 1989; Al- Juboory i in., 1991; Amo i Picazo, 1992; Samyn, 1993; Nobre, 1994), kinetyną (Miller i Murashige, 1976; Henny, 1978; Torres i Natarella, 1984) lub 2iP (Miller i Murashige, 1976; Economou i Spanoudaki, 1985). Celem przeprowadzonych badań było porównanie wpływu trzech cytokinin na wzrost i rozwój pędów *Nematanthus gregarius in vitro* oraz wytypowanie optymalnego poziomu cytokininy do namnażania pędów tego gatunku.

MATERIAŁ I METODA

Eksplantatami inicjalnymi były wierzchołki i fragmenty węzłowe pędów pobrane z roślin *Nematanthus gregarius* rosnących w szklarni produkcyjnej. Materiał roślinny sterylizowano w podchlorynie sodu zawierającym 0,5% aktywnego chloru w czasie 30 minut. Środek sterylizujący usuwano przez trzykrotne płukanie w sterylnej wodzie destylowanej. Eksplantaty wykładano na zmodyfikowaną pożywkę podstawową zawierającą sole mineralne wg Murashige'a i Skooga (1962; żelazo podano w formie NaFeEDTA w ilości 40,3 mg/dm^3)

oraz NaH_2PO_4 (170 mg/dm^3), mezoinozytol (100 mg/dm^3), tiaminę (0,4 mg/dm^3), pirydoksynę (0,5 mg/dm^3), glicynę (2 mg/dm^3), sacharozę (30 g/dm^3). Pożywkę uzupełniono benzyloadeniną (BA) w ilości 8,9 i kwasem indolilo-3-octowym (IAA - 2,8). Kwasowość pożywki ustalono na pH 5,7 za pomocą 1n NaOH i 1n HCl. Pożywkę zestalono agarem w ilości 6,5 g/dm^3. Probówki umieszczono w fitotronie w warunkach 16-godzinnego oświetlenia lampami jarzeniowymi LF 40 W i temperaturze 22°C. Gęstość strumienia fotonów (PFD) w zakresie promieniowania fotosyntetycznie czynnego wynosiła 35 mol m^{-2} s^{-1} na poziomie roślin. Zregenerowane pędy mnożono na pożywce MS uzupełnionej kinetyną w ilości 23,2 i IAA - 2,8 Z ustabilizowanych kultur pobrano pędy długości 10 mm i wyłożono do kolb Erlenmayera na pożywkę podstawową MS, uzupełnioną jedną z trzech cytokinin [BA, kinetyna, izopentenyloadenina (2iP)] w stężeniach: 5, 10, 25 i 50 . Jako kontrolną zastosowano pożywkę bez cytokinin. Każda kombinacja zawierała 30 pędów. Doświadczenie obejmowało dwa 6-tygodniowe pasaże. Połowę materiału roślinnego zanalizowano po pierwszym pasażu (6 tygodni wzrostu), a pozostałą część (wieloroślinki) przeniesiono w całości na pożywkę o takim samym składzie jak poprzednio i oceniono po drugim pasażu (12 tygodni wzrostu). W obu przypadkach określono procent eksplantatów regenerujących pędy boczne oraz analizowano następujące cechy: średnią liczbę, długość i świeżą masę pędów bocznych. Doświadczenie powtórzono dwukrotnie. Wyniki liczbowe opracowano statystycznie przy pomocy analizy wariancji dla danych nieortogonalnych. Dla oceny istotności różnic między średnimi zastosowano przedziały ufności T-Tukeya przy poziomie istotności 0,05%.

WYNIKI

Analiza wyników doświadczenia po pierwszym pasażu (6 tygodni wzrostu *in vitro*) wykazała, że pędy *Nematanthus gregarius* najlepiej krzewiły się na pożywkach zawierających BA oraz w kombinacjach z dodatkiem kinetyny lub 2iP w najwyższym stężeniu. Na pożywkach tych 100% eksplantatów regenerowało pędy boczne a liczba uzyskanych pędów wahała się od 4,6 do 7,5. Na pożywce kontrolnej oraz w kombinacjach zawierających kinetynę lub 2iP w niskich stężeniach nie obserwowano regeneracji pędów bocznych. Pędy regenerujące w ciągu pierwszych sześciu tygodni kultury charakteryzowały się bardzo słabym wzrostem elongacyjnym i osiągnęły długość od 2,2 do 6,2 mm. Oceniając ogólną świeżą masę zregenerowanych pędów stwierdzono, że była ona największa na pożywce zawierającej 10 µM BA (73,4 mg; tab. 1).

Porównując regenerację pędów bocznych po drugim pasażu (12 tygodni wzrostu *in vitro*), największą liczbę pędów uzyskano na pożywkach uzupełnionych BA. Średnia liczba pędów regenerujących z jednego eksplantatu wynosiła od 20,0 do 52,0 szt. Obserwowano zwiększanie się liczby pędów przy wzroście stężenia BA od 5 do 25 µM. Dalszy wzrost poziomu BA w pożywce wpływał na zmniejszenie liczby pędów. Na pożywkach zawierających kinetynę lub 2iP współczynnik namnażania pędów był znacznie niższy i wynosił od 0,1 do 8,1. Nie obserwowano regeneracji pędów na pożywce kontrolnej oraz przy dodatku 5 µM kinetyny, natomiast przy obecności 5 i 10 µM 2iP pędy regenerowały sporadycznie. Oceniając wzrost elongacyjny zregenerowanych pędów stwierdzono korzystny wpływ BA. Pędy rozwijające się na pożywce zawierającej BA w ilości 10 µM wykazywały najsilniejszy wzrost wydłużeniowy (12,1 mm). Dalszy wzrost stężenia tej cytokininy wpływał na zmniejszenie długości pędów. W obecności kinetyny i 2iP obserwowano słabszy wzrost pędów (od 3,9 do 7,5 mm). Świeża masa pędów zależała zarówno od rodzaju cytokininy, jak i od jej stężenia. Ogólna świeża masa zregenerowanych pędów wahała się od 18,4 do 2650,4 mg i była najwyższa przy obecności 50 µM BA (tab. 2). Pędy boczne uzyskane na wszystkich badanych pożywkach charakteryzowały się prawidłowym pokrojem.

W trakcie doświadczenia obserwowano regenerację korzeni. W obu pasażach największą ich liczbę stwierdzono na pożywce kontrolnej.

Tab. 1. Wpływ cytokinin na regenerację pędów bocznych *Nematanthus gregarius* po 6 tygodniach wzrostu *in vitro*
The influence of cytokinins on the lateral shoot regeneration of *Nematanthus gregarius* after 6 weeks of culture *in vitro*

Cytokinina Cytokinin	Stężenie Concentration (μM)	Eksplantaty regenerujące pędy boczne Explants regenerating lateral shoots (%)	Średnia liczba pędów bocznych/1 eksplantat Mean number of lateral shoots/1 explant	Średnia długość pędu bocznego Mean length of lateral shoot (mm)	Ogólna świeża masa pędów bocznych Total fresh weight of lateral shoots (mg)
Kontrola Control	0	0	0_f	0_e	0_d
BA	5	100	4,7 cd	4,6 b	39,4 bc
	10	100	5,5bcd	6,2 a	73,4 a
	25	100	7,5 a	5,1 ab	65,2 a
	50	100	6,5 ab	5,3 ab	68,0 a
Kinetyna Kinetin	5	0	0 f	0 e	0 d
	10	20	0,2 ef	4,5 bc	7,0 d
	25	86,6	1,6 e	2,4 d	8,2 d
	50	100	4,6 d	3,0 cd	30,1 c
2iP	5	0	0 f	0 e	0 d
	10	0	0 f	0 e	0 d
	25	60	0,9 ef	2,2 d	7,9 d
	50	100	5,8 abc	4,4 bc	53,1 ab

* średnie oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie
means followed by the same letter are not significantly different

Tab. 2. Wpływ cytokinin na regenerację pędów bocznych *Nematanthus gregarius* po 12 tygodniach wzrostu *in vitro*
The influence of cytokinins on the lateral shoot regeneration of *Nematanthus gregarius* after 12 weeks of culture *in vitro*

Cytokinina Cytokinin	Stężenie Concentration (μM)	Eksplantaty regenerujące pędy boczne Explants regenerating lateral shoots (%)	Średnia liczba pędów bocznych/1 eksplantat Mean number of lateral shoots/1 explant	Średnia długość pędu bocznego Mean length of lateral shoot (mm)	Ogólna świeża masa pędów bocznych Total fresh weight of lateral shoots (mg)
Kontrola Control	0	0	0 e	0 f	0_e
BA	5	100	20,0 c	9,4 ab	651,1 b
	10	100	27,9 d	12,1 a	1075,5 b
	25	100	52,0 a	6,6 bcd	1768,7 a
	50	100	38,4 a	7,6 bc	2650,4 a
Kinetyna Kinetin	5	0	0 f	0 f	0 c
	10	100	2,4 d	3,9 de	14,4 c
	25	100	6,4 d	6,5 bc	90,4 c
	50	100	8,1 d	5,8 cd	110,4 c
2iP	5	6,7	0,1 e	6,5 bc	18,6 c
	10	13,3	0,2 d	5,2 cd	15,4 c
	25	100	2,7 d	7,5 bc	54,0 c
	50	100	7,4 d	7,1 bc	112,9 c

* średnie oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie
means followed by the same letter are not significantly different

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że pędy *Nematanthus gregarius* najlepiej krzewiły się na pożywce wzbogaconej benzyloaminopuryną. Cytokinina ta jest polecana do namnażania wielu roślin doniczkowych. Al - Juboory i in. (1991) najlepsze krzewienie pędów *Hedera canariensis* uzyskali na pożywce z dodatkiem 20 μM BA. W przypadku *Brassaia actinophylla* cv. Amate optymalną do namnażania pędów była pożywka uzupełniona BA w ilości 3,5 mg/dm^3 (Badzian i in., 1989). BA w stężeniach 1-2 mg/dm^3 stosowano do rozkrzewiania pędów: *Ficus lyrata* (Soczek i Hempel, 1988), *Beaucarnea recurvata* (Samyn, 1993), *Ficus benjamina* Starlight (Amo i Picazo, 1992), *Myrtus communis* (Nobre, 1994).

Kinetyna użyta w niniejszym doświadczeniu w zakresie stężeń od 5 do 50 μM wykazywała słabszy wpływ na krzewienie się pędów *Nematanthus gregarius* w porównaniu do BA. Wielu autorów stosowało tę cytokininę do indukcji pędów z liści *Saintpaulia ionantha* (Harney i Knap, 1979; Smith i Norris, 1983; Lubomski, 1986), *Sinningia speciosa* (Johnson, 1978) czy *Peperomia* Red Ripple (Henny, 1978) lub do indukcji kultur z wierzchołków pędów *Cordyline terminalis* Bicolor i *Dracaena godseffiana* (Miller i Murashige, 1976), oraz *Exacum affine* (Torres i Natarella, 1984). Kinetynę dodawano do pożywek w zakresie stężeń od 0,3 do 10 mg/dm^3.

W przedstawionych badaniach izopentenyloadenina (w stężeniach od 5 do 50 μM) wykazywała, podobnie jak kinetyna, słaby wpływ na regenerację pędów *Nematanthus gregarius*. W badaniach innych autorów stosowano wyższe stężenia 2iP do namnażania pędów. Economou i Spanoudaki (1975), polecają do mikrorozmnażania *Gardenia jasminoides* pożywki wzbogacone 2iP w ilości 98 μM. Podobnie Miller i Murashige (1976) stosowali 20 mg/dm^3 (98 μM) 2iP do indukcji pędów *Syngonium podophyllum* Roxan. W przypadku *Scindapsus aureus* autorzy ci za optymalny poziom 2iP uznali 10 mg/dm^3.

W niniejszym doświadczeniu największą długość pędów w obu pasażach uzyskano na pożywce zawierającej BA w stężeniu 10 μM. Dalsze zwiększanie stężenia tej cytokininy (do 50 μM) wpływało na zmniejszenie się długości pędów. Wielu autorów poleca stosowanie cytokinin w niższych stężeniach ze względu na to, że ich wysoki poziom w pożywce może powodować drobnienie pędów oraz niekorzystne zmiany anatomiczne i morfologiczne (Podwyszyńska i Hempel, 1989).

WNIOSKI

1. Cytokininy wpływają istotnie na wzrost i rozwój pędów *Nematanthus gregarius*. Spośród badanych cytokinin, zastosowanych w zakresie stężeń od 5 do 50 μM, najsilniejsze działanie wykazywała benzyloaminopuryna.

2. Wzrost zawartości BA w pożywce w granicach 5 - 25 μM stymulował krzewienie się pędów. Optymalne pod tym względem jest stężenie 25 μM.

PIŚMIENNICTWO

Al-Juboory K.H., Williams D.J., Skirvin R.M., 1991. Growth regulators influence on root and shoot development of micropropagated Algerian ivy. Hort. Sci. 26(8): 1079-1080.

Amo J. B. Del, Picazo I., 1992. *In vitro* propagation of *Ficus benjamina* cv. Starlight from axillary buds with BAP and phloroglucinol. Gartenbauwissenschaft 57(1): 29-32.

Badzian T., Fotyma-Kern J., Hennen G.R., Oglesby R. P., 1989. The influence of 6-benzyladenine and thidiazuron on organogenesis of *Brassaia actinophylla* Endl. cv. Amate shoot explants. Acta Horticulturae 251: 191-197.

Bilkey B., McCown B. H., 1979. *In vitro* culture and propagation of *Episcia sp.* (Flame Violets). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104 (1): 109-114.

Cassells A.C., Plunkett A., 1984. Production and growth analysis of plants from leaf cuttings, and from tissue cultures of disks from mature leaves and young axenic leaves of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Sci. Hort. 23: 361-369.

Cooke R. C., 1977. Tissue culture propagation of African violets. HortScience 12 (6): 549.

Economou A. S., Spanoudaki M. J., 1985. *In vitro* propagation of *Gardenia*. HortScience 20(2): 213.

Harney P.M., Knap A., 1979. A technique for the *in vitro* propagation of African violets using petioles. Can. J. Plant Sci. 59: 263-266.

Henny R. J., 1978. *In vitro* propagation of *Peperomia* Red Ripple from leaf discs. Hort Sci. 13(2): 150-151.

Johnson B.B., 1978. *In vitro* propagation of *Gloxinia* from leaf explants. Hort Sci. 13(2): 149-150.

Lubomski M., 1986. Rozmnażanie fiołka afrykańskiego metodą kultur *in vitro*. Ogrodnictwo 11: 24-25.

Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Miller L.R., Murashige T., 1976. Tissue culture propagation of tropical foliage plants. In vitro 12(12): 797-813.

Nobre J., 1994. *In vitro* shoot proliferation of *Myrtus communis* L. from field-grown plants. Scientia Horticulturae 58(3): 253-258.

Peck D. E., Cumming B. G., 1984. *In vitro* vegetative propagation of cape primrose using the corolla of the flower. HortScience 19 (3): 399-400.

Podwyszyńska M., Hempel M., 1989. Wpływ następczy 6-benzyloaminopuryny na ukorzenianie się pędów *Rosa hybrida in vitro* oraz ich aklimatyzację w niesterylnym podłożu ogrodniczym. Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice ser. B, 13: 77-85.

Samyn G.L.J., 1993. *In vitro* propagation of ponytail palm: producing multiple shoot plants. Hort Sci. 28(3): 225.

Smith R. H., Norris R. E., 1983. *In vitro* propagation of African violet chimeras. Hort Sci. 18: 436-437.

Soczek U., Hempel M., 1988. The influence of growth regulators on shoot development of *Ficus lyrata in vitro*. Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice ser. B, 12: 153-161.

Start N.G., Cumming B.G., 1976. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. HortScience 11: 204-206.

Torres K.C., Natarella N. J., 1984. *In vitro* propagation of *Exacum*. Hort Sci. 19(2): 224-225.

Vazquez A.M., Davey M.R., Short K.C., 1977. Organogenesis in cultures of *Saintpaulia ionantha* (African violet). Acta Horticulturae 78:249-258.

Vlahos J. C., 1989. Regeneration of two cultivars of *Achimenes longiflora* DC. *in vitro*. Acta Horticulturae 251: 255-273.

SUMMARY

Shoots 10 mm long were taken from aseptically grown shoot clusters of *Nematanthus gregarius* and cultured *in vitro* on the medium containing different concentrations (5, 10, 25, 50 μM) of cytokinins (BA, kinetin, 2iP). The shoots were subcultured twice at 6-week intervals. The highest proliferation rate (52.0) was obtained on a medium containing 25 μM of BA.