

Wykorzystanie technik *in vitro* do rozmnażania tulipanów, uwalniania od wirusów i wytwarzania tetraploidów

Abstrakt. W Polsce jest wiele wartościowych rodzimych odmian tulipana zasługujących na szersze rozpowszechnienie ze względu na wysokie walory ozdobne, plenność i przystosowanie do naszych warunków klimatycznych. Dzięki metodzie rozmnażania *in vitro*, można przyspieszyć zarówno prace hodowlane jak i wprowadzenie na rynek nowej odmiany. W związku z tym w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach 15 lat temu podjęto prace nad udoskonaleniem metody mikrorozmnażania tulipanów. Rezultatem naszych badań było uzyskanie cyklicznego namnażanie pędów przybyszowych tej byliny dzięki zastosowaniu tidiazuronu (TDZ) (wcześniej nie stosowanego w kulturach *in vitro* tulipana) w połączeniu z 6(γ,γ-dwumetyloalliloamino)-puryna (iP). Istotnie poprawiono też skuteczność zawiązywania mikrocebulek, w przypadku tulipana bardzo ważnego etapu, gdyż tylko cebule są zdolne do ukorzeniania i dalszego wzrostu w gruncie. Dzięki specjalnemu traktowaniu pędów w ostatnim cyklu namnożeniowym przed chłodzeniem pędów (indukcja formowania cebulek) znacznie zwiększono efektywność tego procesu. Otóż do pożywki dodawano tylko iP (bez TDZ), wydłużano ten ostatni cykl namnożeniowy do 12 tyg. i w jego 6. tyg. dodawano pożywkę płynną bez cytokinin, ale z dodatkiem retardantów wzrostu. Dalsze zwiększenie skuteczności wytwarzania cebulek uzyskano poprzez traktowanie pędów estrem metylowym kwasu jasmonowego (MeJA) w 6. tyg. po chłodzeniu. W związku z całkowitym porażeniem niektórych polskich odmian wirusami, opracowanie metodę uwalniania materiału roślinnego od tych patogenów. Efektem naszych badań była eliminacja wirusów z 6 genotypów tulipana poprzez zastosowanie chemioterapii rybawiryną. W ostatnich latach poszukiwane są triploidy i tetraploidy tulipanów. W naszych badaniach poliploidyzacji poddawano ekplantaty inicjalne oraz kępki pędów, które traktowano kolchicyną, oryzaliną lub amiprofosem metylu (APM). Ostatecznie uzyskano tetraploidy u dwóch odmian.

Słowa kluczowe: *Tulipa*, mikrorozmnażanie, uwalnianie od wirusów, rybawiryna, tetraploidy

Wprowadzenie

W Polsce jest wiele wartościowych rodzimych odmian tulipana zasługujących na szersze rozpowszechnienie ze względu na wysokie walory ozdobne, plenność i przystosowanie do naszych warunków klimatycznych. W przypadku tulipana, rozmnożenie nowych odmian do ilości 10 000 cebul jest długotrwałe i drogie. Od wyselekcjonowania pierwszych siewek do pojawienia się na rynku nowej odmiany mija 20-25 lat. Dzięki wykorzystaniu metody rozmnażania *in vitro*, okres ten można skrócić. Techniki *in vitro* są powszechnie stosowane do szybkiego rozmnożenia nowych genotypów wielu roślin użytkowych. Jednakże systemy regeneracyjne tulipana *in vitro* opisywane w dostępnej literaturze w latach 90-tych ubiegłego wieku, kiedy rozpoczynano badania w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach (IO), były mało wydajne. Nie uzyskiwano efektywnej regeneracji wtórnej umożliwiającej cykliczne namnażanie pędów/cebul. To dzięki klasycznym metodom opartym na cyklicznym namnażaniu, technologie mikrorozmnażania wielu innych roślin użytkowych, np. gerbery, lili, róż, anturium, czy ziemniaków charakteryzują się wysoką wydajnością i są powszechnie stosowane w polskiej i zagranicznej produkcji ogrodniczej. Większość opisanych metod mikrorozmnażania tulipana opierała się na bezpośredniej regeneracji pędów lub mikrocebulek na eksplantatach inicjalnych [Nishiuchi 1980, Rice i in. 1983; Le Nard i in. 1987; Alderson i Taeb 1990; Baker i in. 1990]. We wszystkich tych metodach produktem finalnym rozmnażania tulipana *in vitro* była mikrocebulka. A w przypadku systemów, w których na eksplantatach inicjalnych regenerowały pędy, w drugim i zarazem ostatnim etapie mikrorozmnażania indukowano w pędach rozwój cebulek, które po wyjęciu ze szkła i kilkutygodniowym przechowywaniu, sadzono *ex vitro*. Opisane metody pozwalały uzyskać najwyżej około 200 mikrocebulek z jednej wyjściowej cebuli. Ostatnio wysoki potencjał regeneracyjny wykazano dla eksplantatów pozyskiwanych z siewek *Tulipa tarda* rozwijających się *in vitro* [Maślanka i Bach 2014]. Wydaje się, że metoda ta może być wykorzystana z powodzeniem do rozmnażania dzikich gatunków tulipana, np. zagrożonych wyginięciem. Jednak użycie siewek jako eksplantatów inicjalnych nie pozwala na zastosowanie jej w produkcji odmian uprawnych, gdyż te wymagają do klonowania eksplantatów pozyskiwanych z organów wegetatywnych.

Z badań przeprowadzonych w IO wynika, że krajowe odmiany i klony hodowlane oraz długo reprodukowane zagraniczne odmiany tulipanów były w wysokim stopniu porażone przez wirusy [Podwyszyńska i in. 2005, Sochacki i Podwyszyńska 2006]. U innych geofitów wykazano, że w przypadku całkowitego porażenia odmian, możliwe jest wyeliminowanie wirusów poprzez kultury *in vitro* merystemów i/lub dodatkowe zastosowanie chemioterapii i/lub termoterapii [Spiegel i Loebestein 1995]. U tulipana, nie stosowano dotychczas technik *in vitro* do rozmnażania wolnych od wirusów roślin.

Nie stosowano też technik molekularnych do sprawdzania tożsamości genetycznej rozmnożonych *in vitro* tulipanów. Tożsamość genetyczna z odmianą macierzystą jest szczególnie ważna w przypadku wdrażania do praktyki ogrodniczej nowej technologii produkcji lub/i nowych odmian. Powszechnie wiadomo, że mikrorozmnażaniu może towarzyszyć zmienność somaklonalna, w wyniku której pojawiają się rośliny o odmiennym fenotypie w stosunku do rośliny matecznej. Przyczyną zmienności są najczęściej mutacje genetyczne [Karp 1995, Bairu i in 2011]. Potwierdzenie tożsamości genetycznej roślin szybko zakwitających czy innych, których fenotyp łatwo ocenić przy pomocy markerów morfologicznych, jest najczęściej wystarczająco wiarygodne dla potrzeb produkcji *in vitro*. Natomiast w przypadku roślin o długim cyklu rozwojowym, jak np. palma olejowa, standardowo wymagane jest opracowanie systemu oceny zgodności genetycznej przy pomocy markerów molekularnych [Rival i in. 2000]. Dotyczy to drzew, krzewów i wielu bylin, na których zakwitnięcie trzeba czekać kilka lat, u tulipanów do 5-6 lat. Nowa technika mikrorozmnażania tulipana wraz z systemem kontroli jakości (zdrowotności i tożsamości genetycznej) może być wdrożona w polskich laboratoriach komercyjnych. W Europie, Polska zajmuje pierwsze miejsce pod względem ilości wyprodukowanych *in vitro* roślin. W 2002 wyprodukowano około 70 mln mikrosadzonek o wartości 87 mln. zł [Jabłońska 2005].

Badania wychodziły naprzeciw wysokim wymaganiom stawianym jakości materiału rozmnożeniowego, jakie obowiązują w krajach Unii Europejskiej. Mikrosadzonki, jak inne produkty, podlegają kontroli jakości. Otóż dla roślin ozdobnych rozmnażanych wegetatywnie, podobnie jak dla innych roślin użytkowych, stworzono system oceny wg schematów klasyfikacji i kwalifikacji materiału rozmnożeniowego, nadzorowany przez Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin (European and Mediterranean Plant Protection Organization - OEPP/EPPO), zgodnie z dyrektywą 91/682/EEC o handlu roślinami ozdobnymi. Schematy kwalifikacyjne lub klasyfikacyjne zostały opracowane dla kilku najważniejszych roślin, np., narcyzów i tulipanów [Anonim 2002a,b]. Zalecenia wg ww.

schematów obejmują kontrolę zdrowotności, w tym obecności wirusów oraz tożsamości genetycznej.

Celem badań realizowanych w IO było opracowanie wydajnej metody mikrorozmnażania tulipana dla potrzeb hodowli zachowawczej, twórczej oraz produkcji zdrowego materiału roślinnego. W dalszej kolejności opracowano metodę wytwarzania tetraploidów z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Badania realizowano w kilku etapach w ciągu 15 lat. Obejmowały one następujące zagadnienia:

1. zwiększenie efektywności poszczególnych etapów mikrorozmnażania: stadium inicjalnego, cyklicznego namnażania pędów przybyszowych i formowania cebul;
2. embriogeneza somatyczna;
3. skrócenie okresu uprawy potrzebnego do zakwitnięcia roślin pochodzących z mikrorozmnażania;
4. weryfikacja nowoopracowanej metody poprzez ocenę zdrowotności uzyskanych roślin (wykrywanie obecności wirusów selekcja negatywna i uwalniania od tych patogenów);
5. ocena tożsamości genetycznej / zmienności somaklonalnej mikrorozmnażanych roślin przy pomocy markerów morfologicznych i molekularnych;
6. wytwarzanie tetraploidów.

1. Zwiększenie efektywności poszczególnych etapów mikrorozmnażania

W pierwszym etapie badań dążono do zwiększenia zdolności regeneracyjnych eksplantatów inicjalnych służących do zapoczątkowania kultur *in vitro*. Następnie poszukiwano optymalnych warunków do regeneracji wtórnej, umożliwiającej cykliczne namnażanie pędów. **W etapie pierwszym – inicjalnym** badano wpływ regulatorów wzrostu, jakości światła i ciemności na regenerację pierwotną. W badaniach cytologicznych określano charakter regeneracji. **W etapie drugim - namnażania pędów** - badano wpływ jakości światła i węglowodanów na współczynnik namnażania. **Trzeci etap mikrorozmnażania to indukcja i formowanie cebul** w kulturach pędów. Proces formowania cebul (tuberyzacja) jest niezwykle ważny, gdyż w przypadku kultur *in vitro* tulipana tylko pędy w formie cebul są zdolne do efektywnego ukorzeniania i dalszego wzrostu *ex vitro*. Napotkano tu na szereg trudności. W kolejnych doświadczeniach, w oparciu o analizę endogennych fitohormonów, optymalizowano warunki poszczególnych faz powstawania cebul, zwiększając stopniowo efektywność tego etapu.

1.1. Stadium inicjalne i namnażanie pędów przybyszowych. W dostępnej literaturze w latach 90-tych ubiegłego wieku i w pierwszych latach XXI wieku, gdy rozpoczynano badania, znaleziono wiele informacji na temat bezpośredniej regeneracji pędów lub mikrocebul na eksplantatach inicjalnych, jednak nie były to systemy oparte na cyklicznym namnażaniu pędów przybyszowych [Riviere i Muller 1976, Nishiuchi 1980, Rice i in. 1983, Le Nard i in. 1987, Alderson i Taeb 1990, Baker i in. 1990, Hulscher i in. 1992, Hulscher i Krijsheld 1995, Kuijpers i Langens-Gerrits 1997, Langens 2001, Bach i Ptak 2002]. Wymienieni badacze zapoczątkowywali kultury *in vitro* z fragmentów cebul i wykazali, że zdolności regeneracyjne zależą od wielu czynników: rodzaju eksplantatów inicjalnych (pąki wegetatywne, fragmenty łusek lub fragmenty pędu kwiatowego); pozycji eksplantatu na pędzie kwiatowym; statusu fizjologicznego cebuli (chłodzone, niechłodzone); regulatorów wzrostu stosowanych w pożywce - zwłaszcza cytokinin, a także paklobutrazolu, kwasu jasmonowego, auksyn (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy - 2,4-D, kwas naftylo-1-octowy - NAA, pikloram); światła lub ciemności oraz temperatury. Stosunkowo wysoką efektywność regeneracji inicjalnej uzyskano dzięki wykorzystaniu jako eksplantatów inicjalnych fragmentów załazni izolowanych z cebul chłodzonych [Bach i Ptak 2001]. Stosując pożywkę zawierającą 25 μM pikloramu i 0,5 μM 6-benzyloaminopuryny (BAP) uzyskiwano z jednego eksplantatu około 20 zarodków somatycznych.

Cytokiny, które stosowali wszyscy ww. autorzy – BAP, 6(γ,γ -dwumetyloalliloamino)-puryna (iP) i zeatyna – nie były w stanie pobudzić pędów zregenerowanych na eksplantatach inicjalnych do dalszego intensywnego namnażania. Generalnie niskie zdolności regeneracyjne tulipana *in vitro* przypisywano uszkodzeniom komórek epidermalnych (z których rozwijają się pierwsze pędy) na skutek działania tulipalin lub stresu oksydacyjnego [Van Rossum i in. 1997]. Relatywnie wysokie zdolności regeneracyjne wykazano dla fragmentów pędów kwiatowych (pobieranych z cebul chłodzonych), inkubowanych w ciemności na pożywce zawierającej BAP i NAA - oba związki w stężeniu po 1 mg l^{-1} , z dodatkiem 5 mg l^{-1} iP [Le Nard i in. 1987]. Dlatego też w naszych badaniach warunki takie stosowano w kontroli, a jako eksplantaty inicjalne wykorzystano fragmenty pędu kwiatowego. W naszych pracach skupiono się na czynnikach przez innych nie badanych. Do prac włączono więc tidiazuron (TDZ) – regulator wzrostu wcześniej nie stosowany w kulturach *in vitro* tulipana [Podwyszyńska i Rojek 2000, Podwyszyńska i Marasek 2003]. Badania wykazały, że TDZ przejawiał silniejsze działanie morfogenne, niż powszechnie stosowane cytokiny - BAP i iP, przy czym swoją wysoką aktywność TDZ przejawiał tylko w obecności NAA. Wyniki te korespondują z licznymi

doniesieniami, w których wykazano, że TDZ - pochodna dwufenylomocznika, indukuje procesy morfogenetyczne znacznie silniej niż cytokininy purynowe [Huetteman i Preece 1993]. Silną aktywność TDZ przypisuje się jego działaniu bezpośredniemu - przyłączania się do receptorów cytokininowych) [Spichal i in. 2005] lub pośredniemu - zwiększeniu akumulacji endogennych cytokinin poprzez hamowanie aktywności oksydazy/dehydrogenazy cytokininowej (CKX) [Zatloukal i in. 2008]. Ten wysoce aktywny związek był często wykorzystywany do indukowania rozwoju kalusa, zarodków lub pędów przybyszowych *in vitro* u gatunków powszechnie uznawanych za „trudne” w rozmnażaniu, np. peonii czy liliowca [Gabryszewska 1997, Gabryszewska i Wojtania 2005]. Ostatnio TDZ zastosowano z powodzeniem do indukowania rozwoju pędów przybyszowych z pąków wegetatywnych izolowanych z cebul niechłodzonych [Maślanka i Bach 2013].

W kolejnych badaniach własnych wykazano, że jeden z inhibitorów biosyntezy giberelin – paklobutrazol, dodany do pożywki łącznie z cytokininami (BAP + 2iP lub TDZ) wzmacniał ich działanie [Podwyszyńska i Marasek 2003]. Natomiast obecność flurprimidolu generalnie powodowała deformacje rozwijających się struktur (Podwyszyńska i in. 1997). W naszych badaniach struktury rozwijające się w obecności paklobutrazolu były krótsze i różniły się morfologicznie od powstających w obecności samego TDZ [Podwyszyńska i Marasek 2003].

Inne badania prowadzone w IO wykazały, że światło, zarówno białe jak i czerwone, prawie całkowicie hamowało procesy różnicowania w tkankach eksplantatów inicjalnych [Podwyszyńska i Rojek 2000]. Natomiast w ciemności, na pożywce z TDZ i NAA procent eksplantatów regenerujących struktury podobne do zarodków był bardzo wysoki (72.7-100%) u wszystkich badanych odmian. Ciemność podczas regeneracji inicjalnej tulipana polecali także Le Nard i in. [1987], Hulscher i in. [1992], Bach [2000] i Ptak i Bach [2007]. Taeb i Alderson [1990a] stwierdzili z kolei, że światło mieszane (czerwone i dalekiej czerwieni, w proporcji mniejszej niż 3,4 do 1) o wysokiej intensywności (gęstość strumienia fotosyntetycznych fotonów – PPFD: $44 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), stosowane w 16-godz. fotoperiodzie, pozytywnie wpływało na formowanie pędów. Różnice między wynikami własnymi a cytowanych autorów mogły wynikać stąd, iż używali oni innej odmiany tulipana i stosowali światło o stosunkowo wysokiej intensywności. Korzystny wpływ światła czerwonego, przy naświetlaniu ciągłym, na formowanie i namnażanie kalusa embriogennego oraz rozwój zarodków somatycznych różnych geofitów - frezji, hiacynta, lilii i cyklamena wykazały także Bach i in. [2000]). Bach [2000] stwierdziła ponadto, że zarodki somatyczne tulipana, lilii i hiacynta rozwijały się prawidłowo wówczas, gdy eksplantaty inicjalne poddawano sekwencji

zmieniających się warunków świetlnych: ciemności (indukcja embriogeniczności), światła niebieskiego (inhibicja kaulogenezy, rozwój zarodków) i światła czerwonego (formowanie cebul). Maślanka i Bach [2007] wykazały również, że traktowanie światłem zarodków somatycznych tulipana w późniejszej fazie rozwojowej – liścieniowej, stymulowało rozwój liści (konwersję w rośliny).

Obserwacje wykonane w ramach naszych prac wykazały, że tworzące się w ciemności podłużne struktury, po przeniesieniu na pożywkę o niższej zawartości TDZ i NAA, i umieszczeniu w świetle o 16-godz. fotoperiodzie, rozwijały się w charakterystyczne formy [Podwyszyńska i Marasek 2003]. W procesie tym można było wyróżnić cztery następujące po sobie fazy: 1) rozwój rosnącego do góry liścienia, określanego terminem „neoformation” [Le Nard i wsp. 1987] lub „pędem bez merystemu” [Hulscher i in. 1992]; 2) formowanie u podstawy liścienia zawiązka korzenia zarodkowego (te dwie fazy przebiegały w ciemności podczas dwóch pierwszych miesięcy); 3) rozwój skróconego lub dłuższego stolonu, rosnącego w dół do pożywki; 4) rozwój jednego lub kilku merystemów pąków wegetatywnych na wierzchołku stolonu (rozwijały się one w 3. i 4. miesiącu kultury inicjalnej). Analiza histologiczna wykazała, że struktury podobne do liści powstawały z warstwy komórek epidermalnych fragmentów pędu kwiatowego i nie wykazywały połączeń waskularnych z tkanką macierzystą. Nie obserwowano dalszego rozwoju korzenia zarodkowego. Powstawanie regularnych struktur - liścienia i na jego przeciwnym biegunie stolonu przypominało rozwój zarodka zygotycznego. Różnicę w strukturach rozwijających się *in vitro* w porównaniu do zarodków zygotycznych, stanowił brak rozwoju korzenia zarodkowego u tych pierwszych. Niimi [1978, 1980] wykazał, że zarodek zygotyczny w nasieniu tulipana nie jest w pełni dojrzały – nie ma wykształconego zawiązka korzenia ani merystemu wierzchołkowego pędu. Do prawidłowego rozwoju potrzebuje on traktowania niską temperaturą przerywającą spoczynek. Autor wykazał, że zawiązek korzenia pojawia się po 40 dniach chłodzenia w temperaturze 4°C; po 70 dniach rozwija się zawiązek pędu, z którego powstaje cebula. W niedojrzałym, jeszcze nie chłodzonym zarodku zygotycznym, widoczne były dwie wiązki przewodzące – jedna skierowana do wierzchołka liścienia a druga ku dołowi - do wierzchołka stolonu. W pracy własnej, w strukturach rozwijających się *in vitro* obserwowano podobne dwie wiązki przewodzące [Podwyszyńska i Marasek 2003]. Wszystkie te spostrzeżenia wskazują, że regeneracja specyficznych struktur na eksplantacie inicjalnym miała charakter embriogenezy somatycznej. Przy czym merystemy pąków przybyszowych, tworzące się na stolonie (w obecności TDZ i w temperaturze 23°C), zamiast cebulki wytwarzały pędy przybyszowe. Jeśli chodzi o przyczyny zahamowania rozwoju

korzenia zarodkowego, można przypuszczać, że było to spowodowane brakiem traktowania niską temperaturą oraz obecnością w pożywce TDZ, który silnie hamuje powstawanie korzeni [Preece i Imel 1991].

Opis procesu regeneracji pierwotnej tulipana z komórek somatycznych, w takim ujęciu, przedstawiono po raz pierwszy [Podwyszyńska i Marasek 2003]. Ułatwiło to zrozumienie charakteru regeneracji wtórnej, umożliwiającej wydajne cykliczne namnażanie pędów przybyszowych. Odbywało się ono na świetle o 16-godz. fotoperiodzie. Zasychające wierzchołki liścieni przycinano, odwracano struktury, tak by pąki formujące się na rozrastających się stolonach były skierowane do góry. Na powierzchni tkanki merystematycznej (nieforemnej, o gładkiej, żółtawej powierzchni), wywodzącej się ze stolonu, formowały się kępki pąków/pędów przybyszowych, które cyklicznie - co 8 tygodni - dzielono na mniejsze i przenoszono na świeżą pożywkę o niższej, niż w stadium inicjalnym, zawartości TDZ i NAA. W niniejszej pracy kultury pędów odmian modelowych namnażano nawet do 8 lat. Usuwanie opisanej wyżej tkanki merystematycznej lub oddzielanie pojedynczych pędów ograniczało powstawanie nowych merystemów.

W badaniach własnych wykazano, że jakość światła wpływała na dalsze namnażanie pędów przyszowych, natomiast nie wpływała na zdolności pędów do tworzenia cebul. W świetle czerwonym u wszystkich badanych genotypów uzyskiwano około 30% pędów mniej, niż w świetle białym [Podwyszyńska i Rojek 2000].

Kolejnym czynnikiem badanym w etapie namnażania pędów był rodzaj węglowodanów stosowanych w pożywce [Podwyszyńska 2001]. W kulturach roślinnych *in vitro* cukry rozpuszczalne służą jako źródło węgla oraz jako czynnik osmotyczny. U tulipana *in vivo* zmiany w zawartości i proporcji endogennych węglowodanów odgrywają ważną rolę w rozwoju i różnicowaniu organów: kwiatu, łodygi i cebul potomnych [Le Nard i De Hertogh 1993]. W kulturach tulipana *in vitro*, stwierdzono, że relatywnie wysoki poziom endogennej sacharozy, ale niski glukozy i skrobi w pędach, predysponuje je do formowania cebul po chłodzeniu (indukującym proces tuberyzacji) [Taeb i Alderson 1990b].

W badania własnych bardziej intensywny wzrost i namnażanie pędów, u trzech spośród pięciu badanych odmian tulipana, obserwowano na pożywkach zawierających cukry proste: glukozę, fruktozę lub kombinację obu cukrów [Podwyszyńska 2001]. Przypuszczano, że obserwowany intensywny wzrost pędów w obecności heksoz, mógł wynikać z szybszego, niż sacharozy, pobierania cukrów prostych z pożywki tak, jak to wykazano między innymi w kulturach *in vitro* wiśni (Borkowska i in. 1995). Autorzy dowiedli, że sacharoza przed pobraniem była hydrolizowana do heksoz. W tej postaci cukry dostawały się do pędów, gdzie

szybko następowała ich synteza do sacharozy. Korzystniejszy wpływ glukozy i fruktozy, niż sacharozy, na regenerację pędów wykazano także u hiacynta (Bach i in. 1992).

2.1. Formowanie cebul. Przy mikrorozmnażaniu tulipana poprzez namnażanie pędów przybyszowych bardzo ważna jest wysoka zdolność pędów do formowania cebulek *in vitro*, gdyż tylko w formie cebul możliwa jest aklimatyzacja rozmnożonego materiału w warunkach *ex vitro*. Kluczowe czynniki indukujące proces rozwoju cebul tulipana *in vitro* zostały określone przez innych badaczy [Nishiuchi 1980, Rice i in. 1983, Le Nard i in. 1987]. Proces indukowania rozwoju cebul zachodzi podczas traktowania pędów niską temperaturą 5°C przez 10-12 tyg.; na pożywce bez cytokinin, o podwyższonym stężeniu sacharozy z 3% do 6-7%. Dalszy wzrost cebul odbywa się na tej samej pożywce, przez następne 8-12 tygodni, w temperaturze 20-23°C. W badaniach własnych pierwsze próby uzyskania cebul w kulturach pędów przybyszowych zakończyły się niepowodzeniem, mimo iż pędy traktowano zgodnie z ww. zasadami (dane niepublikowane). Przypuszczano, że użyte pędy nie były zdolne do odpowiedzi na czynniki indukujące rozwój cebul, gdyż prawdopodobnie nie uzyskały odpowiedniego statusu fizjologicznego i/lub morfologicznego. Takie przypuszczenie nasunęło się w związku z doniesieniem dotyczącym procesu formowania cebul przez pędy regenerujące bezpośrednio na eksplantatach inicjalnych [Taeb i Aldersona 1990b]. Autorzy uzyskali znaczny wzrost efektywności tego procesu poprzez wydłużenie okresu stadium inicjalnego (przebiegającego w temperaturze 20°C) z 8 do 12 lub 16 tyg. Zdaniem badaczy, pozytywne rezultaty wynikały z tego, że w strukturach, którym pozwolono dłużej rozwijać się w 20°C, wytworzyły się zawiązki cebul.

W badaniach własnych zastosowano, w pewnym sensie, podobny zabieg - wydłużono ostatni cykl namnożeniowego (poprzedzający chłodzenie) do 14 tyg., przy czym w jego 8-mym tyg. dolano pożywkę płynną bez cytokinin, ale z dodatkiem auksyny NAA i/lub retardantów wzrostu – ancymidolu lub paklobutrazolu [Podwyszyńska 2006a]. W kontroli nie dolewano pożywki płynnej. Samo wydłużenie ostatniego pasażu do 14 tyg. pozwoliło uzyskać cebule u około 40-70% pędów u dwóch spośród trzech badanych odmian - ‘Prominence’ i ‘Blenda’. Uzupełnienie pożywką płynną bez regulatorów wzrostu powodowało dodatkowy pozytywny efekt, a dodatek NAA i/lub paklobutrazolu lub ancymidolu skutkowało dalszym istotnym wzrostem efektywności formowania cebul. Podsumowując można stwierdzić, że dzięki takiemu zabiegowi uzyskano dobrze rozwinięte pędy, znajdujące się w odpowiedniej fazie fizjologicznej, w której były one zdolne do reakcji na czynnik chłodu. Korzystny wpływ auksyn oraz inhibitorów wzrostu na rozwój cebul *in vitro* różnych geofitów stwierdzono już

wiele lat temu. Obecnością auksyn w pożywce, głównie NAA, uwarunkowany był też rozwój cebul lili [Van Aartrijk i Blom-Barnhoorn 1981]. Z kolei inhibitory biosyntezy giberelin, takie jak ancymidol, paclobutrazol lub flurprimidol, stymulowały powstawanie organów spichrzowych u tulipana [Kuijpers i Langens-Gerrts 1997], mieczyka [Steinitz i Lilien-Kipnis 1981] i gloriozy [Kozak 2002]. Natomiast egzogenna giberelina GA₃ (1, 10 i 100 mg l⁻¹) dodawana do pożywki tuż przed lub zaraz po chłodzeniu całkowicie hamowała tworzenie się cebul [Podwyszyńska i Ross 2003].

Do wyjaśnienia uzyskanych pozytywnych efektów działania inhibitorów biosyntezy giberelin mogą służyć wyniki badań własnych, dotyczących analizy endogennego kwasu abscysynowego (ABA) [Podwyszyńska i in. 2004]. Dowiodły one, że uzyskiwanie odpowiedniego statusu fizjologicznego – wrażliwości na czynnik chłodu - wiązało się z wchodzeniem pędów w spoczynek. Wykazano, że po 14 tyg. ostatniego wydłużonego cyklu namnożeniowego w pędach wzrastała zawartość endogennego ABA, w porównaniu do zawartości tego hormonu analizowanego w 8 tygodniu. Przypuszczalnie retardanty wzrostu, poprzez obniżenie poziomu giberelin w pędach, mogły sprawiać, że stosunek ABA do giberelin wzrastał na korzyść ABA. Mogło to sprzyjać wchodzeniu pędów w spoczynek, a tym samym zwiększać ich zdolność do odpowiedzi na czynniki indukujące proces tuberyzacji.

W przypadku dwóch odmian, należących do grupy tulipanów papuzich – ‘Blue Parrot’ i ‘Black Parrot’, mimo iż pędy poddawano wyżej opisanym zabiegom, efektywność procesu tuberyzacji była niska i wynosiła 10-40% [Podwyszyńska 2001, 2006b]. Przypuszczano, że niska zdolność tworzenia cebul *in vitro*, obserwowana u odmian z grupy tulipanów papuzich, może wynikać z wysokiego poziomu endogennych cytokinin lub ABA. Powyższe przypuszczenie zostało częściowo potwierdzone wynikami wstępnej analizy endogennych hormonów [Podwyszyńska i Ross 2003]. Wykazano w niej, że pędy przed chłodzeniem, u odmiany ‘Blue Parrot’ zawierały znacznie więcej niż u ‘Prominence’ rybozydu *trans*-zeatyny (forma aktywna cytokininy) wykryto w nich także więcej endogennego ABA. Po chłodzeniu u ‘Blue Parrot’ zawartość ABA była wprawdzie niższa niż przed chłodzeniem, ale nadal wyższa niż u ‘Prominence’ przed chłodzeniem. W kolejnym doświadczeniu wykazano, że egzogenne ABA (25, 50, 100 mg l⁻¹) dodany do pożywki w 10-tym dniu po chłodzeniu także istotnie obniżał efektywność tworzenia cebul u tej odmiany [Podwyszyńska i Ross 2003]. Dalszych dowodów do tej hipotezy dostarczyły wyniki szczegółowej analizy endogennego ABA [Podwyszyńska i in. 2004]. Poziom tego hormonu zmieniał się w kolejnych fazach mikrorozmnażania u obu odmian - najniższe zawartości notowano tuż po chłodzeniu, a

najwyższe - przed chłodzeniem i 6 tyg. po chłodzeniu – w fazie powstawania cebul, uwidaczniającej się nabrzmiewaniem podstaw pędów i żółknięciem liści. U ‘Blue Parrot’ poziom ABA utrzymywał się na wyższym poziomie, niż u ‘Prominence’, we wszystkich terminach pomiarów. Z drugiej strony wiadomo, że zawartość ABA w cebulach tulipana *in vivo* spada wraz z ustępowaniem spoczynku podczas traktowania chłodem przez okres od 9 do 14 tyg., w zależności od genotypu [Le Nard i De Hertogh 1993]. Odpowiednio długi okres traktowania niską temperaturą warunkuje prawidłowy rozwój pędu kwiatowego oraz cebul potomnych. W świetle tych informacji, przypuszczano, że przyczyną słabego formowania cebul u ‘Blue Parrot’ może być zbyt krótki dla tego genotypu okres chłodzenia pędów. Poprawę efektywności tworzenia cebul uzyskano poprzez wydłużenie tego okresu do 14 lub 16 tyg. - wytworzyło się ponad dwukrotnie więcej cebul niż przy chłodzeniu 12-tygodniowym [Podwyszyńska i Ross 2003].

Pewną poprawę efektywności tworzenia cebul *in vitro* u odmian modelowych – u ‘Prominence’ z 62,7% do 96,0% oraz u ‘Blue Parrot’ z 20,7% do 39,3%, osiągnięto poprzez zastąpienie, w ostatnim cyklu namnożeniowym, standardowo używanego TDZ inną cytokininą – iP. [Podwyszyńska i in. 2014]. Szczegółowa analiza (oznaczano 45 związków cytokinin) wykazała, że wiązało się to z metabolizmem endogennych cytokinin. W pędach traktowanych iP całkowitą zawartością aktywnych form cytokinin w fazie nabrzmiewania podstaw pędów (6 tyg. po chłodzeniu) była niższa, w porównaniu do traktowanych TDZ. Generalnie, u obu odmian, całkowita zawartość endogennych cytokinin była najniższa pod koniec ostatniego wydłużonego cyklu namnożeniowego (przed chłodzeniem); po chłodzeniu bardzo wzrastała: u ‘Prominence’ była najwyższa 2 tyg. po chłodzeniu, po czym całkowity poziom cytokinin się obniżył, u ‘Blue Parrot’ najwyższą całkowitą zawartość notowano 6 tyg. po chłodzeniu. W pędach odmiany ‘Prominence’, we wszystkich etapach mikrorozmnażania, notowano wyższy poziom form aktywnych cytokinin - zasad i nukleotydów, z wyjątkiem ostatniej fazy - powstawania cebul, która rozpoczyna się w 6 tyg. po chłodzeniu. W tej fazie w pędach traktowanych iP zawartość zasad i rybozydów u ‘Prominence’ – odmiany łatwo formującej cebule, była dwukrotnie niższa w porównaniu do ‘Blue Parrot’. Zawartość form nieaktywnych – O-glukozydów (forma magazynowania cytokinin, rozkładająca się do form aktywnych) była wyższa u ‘Blue Parrot’ we wszystkich fazach mikrorozmnażania, najwyższa w 6 tyg. po zakończeniu chłodzenia. Wykazano też, że stosunek izomerów *cis* / *trans* związków zeatyny, we wszystkich etapach mikrorozmnażania był znacznie wyższy u ‘Blue Parrot’, niż u ‘Prominence’. Trzeba podkreślić, że izomery *cis* (uznawane za formy o znacznie niższej aktywności niż izomery *trans*) podlegają stopniowej przemianie do form

bardziej aktywnych – *trans* [Gajdošová i in. 2011]. Pośród nieaktywnych N-glukozydów, które nie ulegają przemianie do form aktywnych, wykryto tylko 9-glukozyd zeatyny w pędach obu odmian, po zakończeniu chłodzenia; w wyższym stężeniu u ‘Prominence’. Wyniki analizy endogennych cytokinin sugerowały, że niska zdolność pędów ‘Blue Parrot’ do tworzenia cebul *in vitro* mogła wynikać z gromadzenia się w fazie nabrzmiewania podstaw pędów O-glukozydów i izomerów *cis*, które ulegając stopniowej przemianie do form aktywnych, powodowały utrzymywanie się tych aktywnych związków na zbyt wysokim poziomie, hamując tuberyzację. Ta niższa zdolność u ‘Blue Parrot’ może być spowodowana słabszym mechanizmem degradacji (oksydacji) i/lub inaktywacji cytokinin do form nierozkładalnych. Wskazywała na to znacznie mniejsza dynamika zmian zawartości form aktywnych obserwowana u tej odmiany w porównaniu do ‘Prominence’ [Podwyszyńska i in. 2014].

W związku z powyższym u ‘Blue Parrot’ w kulturach pędów w indukowanych do tuberyzacji, rozważano użycie regulatorów wzrostu o działaniu przeciwnym do cytokinin, o których wiadomo, że działają korzystnie na proces tworzenia się organów spichrzowych. Do takich czynników, poza wspomnianymi wcześniej auksynami, zalicza się także etylen [Taeb i Alderson 1990c] oraz kwas jasmonowy (JA) i jego pochodną - ester metylowy kwasu jasmonowego (MeJA) [Koda 1997]. Dlatego też z udziałem ‘Blue Parrot’ badano wpływ kwasu indolilo-3-octowego (IAA), etylenu (ACC - kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy i CEPA - kwas 2-chloro-etylofosfonowy) i MeJA stosowanych w innych, niż dotychczas fazach powstawania cebul, a mianowicie w ostatniej fazie - nabrzmiewania podstaw pędów, czyli w 4. i 8. tyg. po zakończeniu chłodzenia (Podwyszyńska 2006a). W kontroli efektywność formowania wartościowych cebul wynosiła 25%, a w obecności IAA - 49%. Spośród traktowań ACC i CEPA, dwukrotne zastosowanie CEPA w stężeniu 1 mg l⁻¹ poprawiło efektywność do 42,5%. Najwięcej cebul wysokiej jakości - całkowicie okrytych tuniką i wąską szyjką - notowano w obecności MeJA (w stężeniu 25 i 50 ul l⁻¹), odpowiednio 55,5% i 61,0 %. Podsumowując można stwierdzić że u tulipana etylen raczej nie odgrywa kluczowej roli w formowaniu cebul. Natomiast wyraźny wpływ wykazuje MeJA. Działanie jasmonianów w formowaniu organów spichrzowych zostało szeroko omówione przez Koda [1997]. Autor wykazał, że JA i MeJA indukują powstawanie ww. organów poprzez rozrywanie mikrotubuli w cytoplazmie. Komórki szybko powiększają one swoje rozmiary, a kierunek ich wzrostu zmienia się na prostopadły do osi pędu. Ponadto Nojiri i in. [1992], analizując poziom endogennych JA i MeJA u *Allium cepa* L., wykazali, że związki te pojawiają się w tkankach dopiero w fazie nabrzmiewania pochwy

liściowej formującej cebule - w 4 tyg. od zastosowania długiego dnia, czynnika który u tego gatunku indukuje tworzenie cebul. Przypuszcza się ponadto, że jasmoniany mogą wpływać na tuberyzację poprzez oddziaływanie na poziom endogennych cytokinin. Dowiedziono, że w siewkach cukinii zawartość endogennych cytokinin, zwłaszcza form aktywnych, znacznie się obniżyła po traktowaniu MeJA [Ananieva i in. 2004].

W ostatnim cyklu badań dotyczących formowania cebul tulipana oceniano rolę poliamin w tym procesie. Związki te są uznawane za regulatory wzrostu oddziałujących na wiele procesów fizjologicznych i rozwojowych [Anvar i in. 2015]. Ostatnio dowiedziono, że odgrywają one pewną rolę w procesie formowania organów spichrzowych *in vitro* [Ondo Ovono i in. 2010, Podwyszynska 2012, Kumar i Palni 2013]. W badaniach własnych wykorzystano kultury pędów *in vitro* polskich odmian i klonów hodowlanych różniące się zdolnością do tuberyzacji [Podwyszyńska i in 2015]. Poliaminy – putrescynę (Put), spermidynę (Spd) i sperminę (Spm) (50 i 100 μM) oraz argininę i ornitynę (500 i 1000 μM) dodawano do pożywki tuż przed chłodzenia pędów, tuż po chłodzeniu oraz 6 tyg. po zakończeniu chłodzenia (w fazie zawiązywania cebulek). Korzystne działanie poliamin i aminokwasów wykazano u odmiany o niskich zdolnościach do formowania cebul, gdy związki te dodawano do pożywki przed rozpoczęciem chłodzenia pędów. U odmiany tej wszystkie związki spowodowały dwukrotny wzrost liczby cebul uzyskanych w porównaniu do kontroli. Analiza endogennych PA wykazała, że w miarę kolejnych faz rozwoju cebul w kulturach pędów malał poziom endogennej Put i Spm u wszystkich odmian z wyjątkiem odmiany słabo formującej cebule, u której poziom Spm w ostatniej fazie zawiązywania cebulek podniósł się znacząco. U tej odmiany stwierdzono też najwyższy poziom Put, zwłaszcza w etapie namnażania pędów. Poziom Spd wykazywał podobną dynamikę u wszystkich odmian; obserwowano dwa piki: w etapie namnażania pędów i tuż po zakończeniu ich chłodzenia (po ustąpieniu spoczynku). Przy czym najwięcej Spd notowano u odmiany o najwyższych zdolnościach do tuberyzacji. Można przypuszczać, że wysokiej efektywności wytwarzania cebul sprzyja przejściowy wzrost Spd w przedostatniej fazie tego procesu (tuż po chłodzeniu), niski poziom wszystkich poliamin i niski stosunek Put/Spd w ostatniej fazie formowania cebul.

Analizy uzyskanych wyników w odniesieniu do wiedzy z zakresu fizjologii wzrostu i rozwoju tulipana *in vivo* [Le Nard i De Hertogh 1993, Saniewski i wsp. 2000] wyraźnie wskazuje, że proces tworzenia cebul *in vitro* podlega temu samemu mechanizmowi regulacji, co proces formowania cebul potomnych w cebulach matecznych *in vivo*. Do jego prawidłowego przebiegu konieczna jest sekwencja zmieniających się warunków fizycznych i

chemicznych - temperatury, egzogennych regulatorów wzrostu i sacharozy, które indukują zmiany statusu fizjologicznego i następujące po nim zmiany morfologiczne. W związku z tym zaproponowano schemat przebieg tego procesu w warunkach *in vitro* (Podwyszyńska 2012). Można go podzielić na trzy fazy: 1) nabywanie przez pędy odpowiedniego statusu fizjologicznego - zdolności do odpowiedzi na czynniki indukujące proces zawiązywania cebul (niską temperaturę i wysoki poziom cukru w pożywce); ta faza procesu zachodzi w temperaturze 23°C (temperatura lata), podczas ostatnich tygodni wydłużonego cyklu namnożeniowego i jest związana ze wzrostem endogennego ABA i Spd w pędach oraz obniżeniem poziomu endogennych cytokinin; 2) ustępowanie spoczynku w pędach pod wpływem niskiej temperatury 5°C (zimowej) przez 12-14 tyg., towarzyszy temu spadek poziomu endogennego ABA, ale wzrost zawartości endogennych cytokinin i auksyn; 3) formowanie cebul - na pożywce o wysokiej zawartości cukru, w wyższej temperaturze 23°C (wiosennej), towarzyszy temu stopniowy wzrost zawartości endogennego ABA i spadek cytokinin (form aktywnych).

2. Embriogeneza somatyczna (ES)

Prowadzono także badania nad rozmnażaniem tulipana na drodze indukowania rozwoju zarodków somatycznych z embriogenego kalusa, namnażanego cyklicznie nawet do 5 lat [Podwyszyńska i Rojek 2000]. Formowanie kalusa indukowano na fragmentach pędu kwiatowego izolowanego z cebul chłodzonych w ciemności, na zmodyfikowanej pożywce MS, w obecności samych auksyn (pikloram, 2,4-D i NAA) lub w połączeniu z TDZ. Embriogeniczny kalus uzyskano tylko przy zastosowaniu 2,5 mg l⁻¹ 2,4-D w połączeniu z 0,1-0,5 mg l⁻¹ TDZ. Struktury podobne do zarodków rozwijały się na pożywce o niższej zawartości wymienionych regulatorów wzrostu. W naszych badaniach wydajność w etapie formowania zarodków była bardzo wysoka (90 zarodków ze 100 mg kalusa), jednak w trakcie dalszych etapów większość rozwijających się roślin zamierała i tylko 30% zarodków rozwijało się w pędy, a 4% wytwarzało cebule. W związku z tym nie kontynuowano prac nad mikrorozmnażaniem tulipana na drodze embriogenezy somatycznej. Kultury kalusa embriogenego wykorzystano tylko w pracy dotyczącej oceny możliwości wykorzystania kwasu fuzariowego lub filtratów z hodowli *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *tulipae* jako czynników selekcyjnych w hodowli odpornościowej tulipana [Podwyszyńska i in. 2001]. Natomiast o możliwości wykorzystania metody opartej na embriogenezie somatycznej do rozmnażania tulipana *in vitro* informowały Bach i Ptak (2001). Autorki obserwowały formowanie licznych zarodków na fragmentach załączni izolowanych z cebul kwiatowych

(ekspantatach inicjalnych) inkubowanych na pożywce MS z dodatkiem 25 μM picloramu i 0,5 μM BAP. Dalszy rozwój zarodków w rośliny przebiegał najlepiej, gdy stężenie cytokininy było 10-krotnie wyższe niż auksyny (5 μM BAP i 0,5 μM NAA). Rozwój cebulek uzyskano po przechłodzeniu zarodków na pożywce o podwyższonym stężeniu sacharozy do 6%. Ptaki i Bach [2007] uzyskały dalszy postęp efektywności mikrorozmnażania za pośrednictwem ES dzięki wykorzystaniu jako eksplantatów inicjalnych fragmentów pędu kwiatowego izolowanego z cebul chłodzonych i zastosowaniu podobnie jak we wcześniejszych badaniach pikloramu i BAP. Kolejne badania tego zespołu badawczego wykazały, że zastosowanie kwasu salicylowego (inhibitora biosyntezy etylenu) łącznie z etefonem stymulowało rozwój liści u zarodków w fazie liścieniowej [Maślanka i Bach 2010]. Natomiast ABA a także inhibitor jego biosyntezy – fluridon - hamowały dalszy rozwój zarodków (formowania liści). Wydaje się, że kontynuacja badań nad optymalizacją poszczególnych etapów rozmnażania tulipana *in vitro* za pośrednictwem ES pozwoli uzyskać wysoce efektywną metodę.

3. Skrócenie okresu uprawy potrzebnego do zakwitnięcia roślin pochodzących z mikrorozmnażania

Celem kolejnego etapu naszych badań prowadzonych w IO było skrócenie okresu uprawy potrzebnego do zakwitnięcia tulipanów pochodzących z mikrorozmnażania (Podwyszyńska i Nowak 2004). Umożliwiło by to szybszą ocenę roślin wyprodukowanych według nowo opracowanej metody. Pierwsze doniesienia na temat kwitnienia informowały, że tulipany rozmnożone *in vitro*, podobnie jak siewki, wymagały około 5 lat do wytworzenia cebuli odpowiedniej wielkości – zdolnej do wytworzenia kwiatu (Le Nard i wsp. 1987, Hulscher i wsp. 1992). Wymienieni badacze uprawiali cebule (uzyskane bezpośrednio z *in vitro*) w gruncie, w łagodnym klimacie Francji i Holandii. Obawiano się, że w bardziej surowym klimacie Polski, uprawa w polu małych mikrocebulek (o masie 100-200 mg) może spowodować ich wymarznąć. W związku z tym mikrocebule uprawiano w fitotronie lub w szklarni oraz dla porównania w gruncie. Spodziewano się też, że dzięki uprawie w sztucznych warunkach, będzie możliwe przeprowadzenie dwóch cykli uprawowych w ciągu jednego roku, co skróciłoby okres potrzebny do uzyskania roślin kwitnących.

Zarówno w fitotronie jak i w szklarni plony cebul były niskie (Podwyszyńska i Nowak 2004). Masy cebul potomnych były mniejsze od matecznych o 10-40%. Stwierdzono też, że pochodzące bezpośrednio z *in vitro* małe cebule (o masie poniżej 100 mg) w tych sztucznych warunkach przeżywały i produkowały cebule potomne w 30-65%, a cebule o masie powyżej

100 mg – w 90-100%. Podobną pozytywną korelację pomiędzy masą cebul a ich przeżywalnością w 1. cyklu uprawowym *ex vitro* stwierdzono we wcześniejszych badaniach własnych (Podwyszyńska 2001). Wyniki te były zgodne z doniesieniami innych badaczy (Le Nard i wsp. 1987, Hulscher i wsp. 1992).

W przeciwieństwie do uprawy fitotronowej czy szklarniowej, warunki polowe, z łagodnymi zimami w obu sezonach (2000/2001 i 2001/2002) wpłynęły bardzo korzystnie na wzrost cebul (Podwyszyńska i Nowak 2004). Cebule potomne były 2- a nawet 5-krotnie większe od matecznych. Średnia masa cebul 'Blue Parrot' po 1. cyklu uprawowym wynosiła około 600 mg, a po drugim - 2119 mg. Niektóre cebule po 2. cyklu uprawowym ważyły nawet 6000-9000 mg, co oznaczało, że osiągnęły one masę krytyczną, przy której cebula jest zdolna do wytworzenia kwiatu (Rees 1992). Zostało to potwierdzone kwitnieniem roślin następnej wiosny - w 2003 r., czyli w 3. cyklu uprawowym (Podwyszyńska 2005). Czynnikiem ograniczającym wzrost cebul w fitotronie była prawdopodobnie zbyt niska intensywność światła. Świetlny punkt kompensacyjny fotosyntezy tulipanów uprawianych w gruncie, w pełni wegetacji jest bardzo wysoki i wynosi aż $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Rees 1992), a punkt wysycenia światłem - $920 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Benschop 1980). Tymczasem w fitotronie, w świetle lamp sodowych PPFD wynosiła $80\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Była znacznie niższa niż w czasie wiosennej uprawy w warunkach polowych, gdzie w czasie słonecznego dnia PPFD dochodziła do $1000\text{-}1300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Intensywność światła była więc zbyt niska by zapewnić odpowiednio wysoką produkcję asymilatów rozwijającym się cebulom. W szklarni czynnikiem ograniczającym współczynnik reprodukcji była prawdopodobnie zbyt wysoka temperatura. Przeciętnie wynosiła $20\text{-}26^{\circ}\text{C}$, a w upalne dni dochodziła do 30°C . Tymczasem do uprawy reprodukcyjnej tulipanów, optymalna temperatura mieści się w zakresie $12\text{-}15^{\circ}\text{C}$ i nie powinna przekraczać 20°C (Le Nard i De Hertogh 1993). W badaniach własnych najbardziej zbliżone warunki do optymalnych panowały w uprawie polowej. Stosowano w niej regularne nawożenie, nawadnianie i ściółkowanie (zabezpieczające przed mrozami) polecane w uprawie tulipanów w warunkach klimatycznych naszego kraju.

W związku z uzyskanymi wynikami, na 1. cykl uprawowy postulowano dwa terminy sadzenia mikrocebul: 1) sadzenie jesienią do skrzynek, z uprawą w polu - w tunelu owadoszczelnym; 2) sadzenie zimą - na przełomie stycznia i lutego - do skrzynek umieszczanych w pomieszczeniu o temperaturze 9°C , w ciemności; w tych warunkach cebule ukorzeniają się do kwietnia, po czym skrzynki przenosi się do tunelu owadoszczelnego, gdzie dalsza uprawa przebiega w świetle dziennym; cebule wykopane latem sadi się jesienią tego samego roku na 2. cykl uprawowy. W ten sposób można skrócić okres uprawy o pół roku.

Ponadto dwa okresy sadzenia są pewnym udogodnieniem w organizacji produkcji *in vitro*, gdyż mikrocebule można w laboratorium przygotowywać na dwa terminy - do sadzenia jesienno i zimowego.

4. Uwalnianie tulipanów od wirusów.

Choroby wirusowe tulipanów wywołują poważne konsekwencje gospodarcze: prowadzą do obniżenia plonu cebul, obniżenia witalności roślin, w skrajnym wypadku do degeneracji roślin i całej partii cebul danej odmiany, a kwiaty wykazujące objawy zawirusowania stają się towarem niehandlowym. Ponieważ towarowa produkcja cebul opiera się na rozmnażaniu wegetatywnym, następuje przenoszenie wirusów z cebul matecznych porażonych wirusami do cebul przybyszowych i szybka akumulacja wirusów w klonie cebul. Stąd eliminacja roślin zawirusowanych na plantacji w wyniku selekcji negatywnej nabiera kluczowego znaczenia. Aktualnie stwierdzono występowanie na tulipanach 22 różnych wirusów [Mowat 1995], a do najważniejszych i najpowszechniej występujących należą: wirus pstrości tulipana (*Tobacco breaking virus*, TBV), wirus utajony lilii (*Lily symptomless carlavirus*, LSV), wirus mozaiki ogórka (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV), wirus nekrozy tytoniu (*Tobacco necrosis necrovirus*, TNV), wirus kędzierzawki tytoniu (*Tobacco rattle tobnavirus*, TRV). Materiał elitarny do zakładania plantacji oraz materiał nasadzeniowy do produkcji kwiaciarskiej powinien być wolny od wirusów. Najłatwiejszą i drogą do osiągnięcia tego celu, jest wyselekcjonowanie roślin zdrowych, testowanych na obecność wirusów choćby testem serologicznym ELISA, i ich szybkie rozmnożenie [Spiegel i Loebenstein 1995]. Najlepszą metodą produkcji zdrowych roślin jest rozmnażanie *in vitro*. Jest ono zalecane przez Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin (EPPO) do produkcji materiału kwalifikowanego wielu roślin ozdobnych, np. narcyzów [Anonim 2002a]. Bywa niestety tak, że cenne genotypy są porażone wirusami w dużym stopniu lub całkowicie. Wtedy można próbować uwolnić rośliny od wirusów metodą chemioterapii i/lub termoterapii w kulturach *in vitro* [Spiegel i Loebenstein 1995]. Wśród geofitów pozytywne wyniki przy zastosowaniu takiej procedury uzyskano między innymi dla mieczyków [Lilien-Kipnis i in. 1992], hiacyntów [Asjes i in. 1974], lilii [Blom-Barnhoorn i Aartrijk 1985] i narcyzów [Phillips 1990], ale eliminacja wirusów z roślin cebulowych jest bardzo trudna i często nieefektywna.

W przypadku tulipanów nie stosowano dotychczas technik *in vitro* do rozmnażania roślin wolnych od wirusów. Toteż podjęto badania, które miały na celu określenie zasad selekcji zdrowych roślin w kulturach *in vitro*, w oparciu o wyniki testów ELISA wykrywających

obecność wirusów. We wstępnych badaniach skupiono się na ocenie występowania wirusów na tulipanach w Polsce, testując rośliny w kulturach *in vitro* założonych z roślin nie wykazujących objawów chorobowych [Podwyszyńska i in. 2005]. Testy wykazały jednak, że część roślin jest porażona wirusami. W największym stopniu rośliny były porażone przez TBV (20-80%), w mniejszym przez CMV (9-60%) i LSV (5-20%). Niezależnie, w latach 2006-2011 prowadzono screening na plantacjach tulipanów w Polsce [Sochacki 2013], który wykazał, że najczęściej wykrywanym wirusem był TBV. Inne wirusy występowały sporadycznie, przy czym z roku na rok wzrastała wykrywalność LSV i TRV. W 2011 roku wykryto wirus X tulipana (*Tulip virus X*, TVX) w kilku roślinach odmiany 'Strong Gold' i był to pierwszy przypadek wykrycia TVX w tulipanach w Polsce [Sochacki i Komorowska 2012]. W badaniach opublikowanych w 2005 roku [Podwyszyńska i in. 2005] wykazano, że sukcesywne testowanie roślin w kulturach *in vitro*, ich selekcja negatywne i ponowne testowanie na etapie uprawy *ex vitro* może być skuteczną metodą uzyskania roślin wolnych od wirusów. Doniesienia literaturowe mówią o możliwości uzyskiwania roślin cebulowych wolnych od wirusów stosując kultury *in vitro* bez termo- i/lub chemioterapii. Takie przypadki odnotowano dla mieczyków rozmnożonych *in vitro* z merystemów pobranych z roślin zainfekowanych wirusem żółtej mozaiki fasoli (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) [Lilien-Kipnis i in. 1992] oraz dla narcyzów zregenerowanych *in vitro* z fragmentów łusek cebulowych roślin porażonych potywirusami [Sochacki i Orlikowska 2005]. Tłumaczyć to można tym, że w szybko rozmnażających się kulturach mogło dojść do nierównej dystrybucji wirusa i część roślin zregenerowała z tkanek samoistnie uwolnionych od wirusów. W dalszej kolejności przeprowadzono szereg badań dotyczących eliminacji wirusów z roślin tulipana w kulturach *in vitro* stosując rybawirynę jako substancję antywirusową dodawaną do pożywek agarowych MS w stężeniach od 12,5, 25 i 50 mg l⁻¹. Badaniami objęto stare i nowe odmiany tulipanów oraz klony hodowlane. Nie prowadzono kultur merystemów, lecz działaniu rybawiryny poddawano większe eksplantaty, w tym kultury pędów. Rośliny przed założeniem doświadczeń i po pasażu na pożywcę zawierającą rybawirynę testowano metodą ELISA na kilka najważniejszych i najpowszechniej występujących wirusów (TBV, LSV, CMV, TNV, TRV, grupę potywirusów). Badania wykazały, że żadne z badanych stężeń rybawiryny nie było całkowicie fitotoksyczne [Sochacki i Podwyszyńska 2012]. Chemioterapia połączona z sukcesywnym testowaniem na obecność wirusów metodą ELISA i restrykcyjnym usuwaniem roślin zawirusowanych, spowodowała uzyskanie roślin niektórych nowych odmian tulipana o negatywnych wynikach testów wirusologicznych. Z drugiej strony, dla dwóch starych odmian oraz jednego z badanych klonów hodowlanych, których kultury pędów okazały się całkowicie

zawirusowane, chemioterapia okazała się nieskuteczna [Sochacki i Podwyszyńska 2012]. Z przeprowadzonych badań wynika, że proces rozmnażania *in vitro* poprzez regenerację pędów przybyszowych umożliwia uzyskanie roślin wolnych od wirusów lub o obniżonej koncentracji wirusów w tkankach [Podwyszyńska i in. 2005, Sochacki i Podwyszyńska 2006, Podwyszyńska i Sochacki 2010]. Ponadto wykazano skuteczność chemioterapii *in vitro* przy użyciu rybawiryny w eliminacji wirusów z całkowicie porażonych odmian [Sochacki i Podwyszyńska 2012]. Stwierdzono też, że konieczne jest kilkukrotne testowanie, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *ex vitro*, ze względu na możliwość nie wykrycia wirusów metodą ELISA w pierwszych terminach, z powodu zbyt niskiej ich koncentracji w tkankach.

5. Ocena zmienności somaklonalnej przy pomocy markerów morfologicznych i molekularnych

Celem mikrorozmnażania jest wyprodukowanie jak największej liczby identycznych roślin. Z tego punktu widzenia, pojawiające się niekiedy rozmnożone *in vitro* rośliny o odmiennym fenotypie (somaklony, najczęściej mutanty) w stosunku do rośliny macierzystej są zjawiskiem niepożądanym. Zmienność, która występuje podczas rozmnażania wegetatywnego, zwłaszcza w kulturach *in vitro*, została zdefiniowana przez Larkina i Scowcrofta [1981] i nazwana zmiennością somaklonalną. Zjawisko to, jego przyczyny i skutki, charakter zmian, mechanizm powstawania oraz możliwości wykorzystania opisano w kilku pracach przeglądowych [Borkowska 1995, Karp 1995, Jain i De Klerk 1998, Bairu i in. 2011]. Powszechnie uważa się, że zmienność somaklonalna jest wynikiem zmian genetycznych (mutacji) - dziedzicznych lub zmian przejściowych – epigenetycznych, niedziedzicznych [Smulders i de Klerk 2011]. Może też być spowodowana porażeniem roślin przez wirusy. Dlatego też by wykluczyć zmiany morfologiczne wywołane przez wirusy, w realizowanych w IO pracach wszystkie rośliny zmienione (somaklony) testowano metodą ELISA na obecność występujących w Polsce wirusów i nie stwierdzono obecności patogenów.

W literaturze nie znaleziono żadnych informacji na temat zmienności somaklonalnej tulipana występującej wśród roślin rozmnożonych *in vitro*. Pierwszym krokiem, zmierzającym do weryfikacji nowo opracowanej metody pod względem stabilności genetycznej uzyskiwanych w jej procesie roślin, jest ocena zgodności fenotypowej z odmianą macierzystą w fazie kwitnienia, przy pomocy markerów morfologicznych. Jak już wspomniano, oceny takiej można dokonać dopiero po 4-5 latach. Należy zaznaczyć, że zmiany genetyczne są szczególnie niebezpieczne, gdy pojawiają się we wczesnych fazach

mikrorozmnazania. Moze to pociagnac za soba wyprodukowanie duzej liczby bezwartosciowych, zmutowanych roslin. W ostatnim dwudziestoleciu, w licznych pracach udokumentowano przydatnosc markerow molekularnych do oceny stabilnosc genetycznej mikrorozmnazanych roslin (Bednarek i Chwedorzewska 2001, Aravanopoulos 2003, Bairu i in. 2011]. Metody te sa oparte na amplifikacji DNA w cyklicznej reakcji polimerazy (PCR). Spozrod opisanych metod przed dziesieciu laty, najwiecej prac dotyczylo uzycia markerow losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (random amplified polymorphic DNA - RAPD) i polimorfizmu odcinkow DNA wystepujacych pomiedzy mikrosatelitami (inter simple sequence repeat - ISSR) a takze polimorfizmu dlugosci amplifikowanego fragmentu (AFLP). Wymienione typy markerow uzyto w prezentowanej pracy do oceny zmiennosci tulipana.

5.1 Ocena fenotypu przy pomocy markerow morfologicznych.

W badaniach wykorzystano rosliny tulipanow 'Blue Parrot', 'Prominence' i 'Giewont' uzyskane z kultur pedow rozmnazanych *in vitro* przez okres od 1,5 roku do 6 lat [Podwyszyńska 2005, Podwyszyńska i in. 2010a]. Obserwacje fenotypu dotyczyly roslin uprawianych od 2 do 5 lat w tunelu owadoszczelnym. W przypadku roslin juwenilnych (nie kwitnacych, majacych zawsze tylko jeden liść) obserwowano pojawianie sie chimer typu *variegata*. Wykazano, ze pierwsze tulipany pochodzace z mikrorozmnazania zakwitly w 3. lub 4. sezonie uprawy (1,5-23,1%). W kolejnym 5. sezonie zakwitlo juz od 58,5 do 100% roslin. Wiarygodne obserwacje mozna bylo przeprowadzic po 4 latach uprawy, gdy zakwitlo ponad 30% roslin. U tulipanow odm. 'Blue Parrot' i 'Prominence' rozmnazanych *in vitro* przez 1,5-3 lata zmiennosć nie wystepowala lub byla sporadyczna, natomiast u odm. 'Giewont' wynosila 15,3%. Wysoki poziom zmiennosci – 100% u 'Blue Parrot' i okolo 50% u 'Prominence', stwierdzono wzrod roslin pochodzacych z 4-letnich kultur *in vitro*. U 'Blue Parrot' zmiany dotyczyly barwy kwiatow, a u 'Prominence' i 'Giewont' ich zmienionego ksztaltu, np. na liliokszaltny (wiekszosć somaklonow 'Prominence'), czy kwiatow silnie zdeformowanych z bialymi smugami na czerwonych platkach (kilka somaklonow). Wzrod roslin 'Blue Parrot' otrzymanych z dlugoterminowych kultur *in vitro*, cyklicznie namnazanych przez 4-6 lat, pojawily sie chimery typu *variegata* (1-1,7%). Sporadycznie wzrod roslin juwenilnych pojawialy sie rosliny o bardzo waskich liściach, podluznie zwinietych lub o zgrubialym uzyłkowaniu.

Wyniki badan wlasnych wskazuja, ze czestotliwosc wystepowania zmiennosci rosla wraz z czasem rozmnazania *in vitro*. Najwiecej zmienionych fenotypow notowano w grupie

roślin pochodzących z 4-letnich kultur *in vitro*. Podobne spostrzeżenia zamieszczono w pracach nt. zmienności roślin pochodzących z kultur *in vitro* czosnku [Al.-Zahim i in. 1999], czy kamelii [Devarumath i in. 2002]. Côte i wsp. [2001] zaproponował nawet wzór funkcji matematycznej, pozwalającej obliczyć częstotliwość zmienności występującej w mikrorozmnażanym materiale roślinnym. Głównym parametrem w tej funkcji była liczba cykli namnożeńowych. Częstotliwość występowania zmienności somaklonalnej zależy także od systemu regeneracji i używanych regulatorów wzrostu. Zmienione rośliny pojawiają się znacznie częściej w kulturach protoplastów, komórek oraz zarodków i pędów przybyszowych [Karp 1995, Bairu i in. 2011]. Zmienność występuje najrzadziej, gdy stosuje się technikę opartą na rozmnażaniu pędów kątowych – najczęściej stosowaną w masowej produkcji. Natomiast metoda rozmnażania tulipanów *in vitro*, opracowana w IO, polega na cyklicznej regeneracji pędów przybyszowych, która jest indukowana przez TDZ. Tulipan jako roślina jednoliścienna wytwarza niewiele pąków kątowych *in vivo* - rocznie są to zazwyczaj 2-4 zawiązki cebul w kątach łusek. Jak do tej pory, nikomu nie udało się uzyskać wydajnej techniki stymulacji zawiązywania takich pąków *in vitro*.

Szukając odpowiedzi na pytanie o charakter zmian - czy spowodowały je mutacje genetyczne, czy też są to zmiany epigenetyczne - przeprowadzono badania, w których wykorzystano techniki markerów molekularnych.

4.2. Ocena przy pomocy markerów molekularnych oraz przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)

Pierwszy etap tej pracy poświęcony był identyfikacji genotypów [dane niepublikowane]. Dążono do znalezienia starterów, których użycie w analizie DNA pozwoliłyby na odróżnienie poszczególnych odmian, w tym sportów, a więc genotypów o minimalnych różnicach genetycznych. Przedmiotem badań była polska odmiana ‘Giewont’ oraz odmiany należące do dwóch rodzin sportów: 1) ‘Blue Parrot’, ‘Caprice’, ‘Muriel’ i ‘Bleu Aimable’ oraz 2) ‘Prominence’ ‘Beauty of Prominence’, ‘Winterberg’ i ‘Red Nowa’). Do badań użyto wyłącznie DNA wyizolowanego z roślin rozmnażanych tradycyjnie. W analizie DNA z 30 starterami RAPD i 17 starterami ISSR wykryte produkty polimorficzne pozwoliły odróżnić tylko odmiany o większych różnicach genetycznych: ‘Giewont’, ‘Prominence’ i ‘Blue Parrot’. Polimorfizm w obrębie „rodzin” sportów wykryto dopiero w późniejszych badaniach przy użyciu markerów AFLP [dane nie publikowane].

W drugiej fazie badań analizie genetycznej poddano rośliny odmian ‘Blue Parrot’, ‘Prominence’ i ‘Giewont’ które były przedmiotem obserwacji fenotypowych [Podwyszyńska

2005, Podwyszyńska i in. 2010a]. Były to rośliny o fenotypie typowym oraz somaklony, pochodziły z kultur pędów rozmnażanych *in vitro* przez 1,5-7 lat, uprawianych w gruncie przez okres od jednego roku do sześciu lat, wśród nich somaklon ‘Blue Parrot’ o różowo-malinowym kwiecie, chimery typu *variegata*, somaklony o liściu ze zgrubiałym użytkowaniem i rośliny o zmienionym kształcie kwiatu i białych smugach. W przypadku chimer, próby z liści pobrano oddzielnie z części białej i zielonej. Za wzorce (standardy) posłużyły rośliny rozmnażane tradycyjnie.

W przypadku ‘Blue Parrot’ i ‘Prominence’ u roślin typowo kwitnących, pochodzących z 2-letnich kultur pędów, nie wykryto polimorfizmu na poziomie DNA [Podwyszyńska i in. 2006, 2010a]. Natomiast u wielu pozostałe roślin, pochodzące z 4-letnich i starszych kultur, w tym wszystkie somaklony oraz rośliny nadal mnożone *in vitro* (przez 8 lat), przejawiały wzór DNA różniący się kilkoma prążkami od standardu. Wyniki te wskazują, że zmiany genetyczne pojawiły się w 3. lub 4. roku namnażania pędów i w procesie mikrorozmnażania u odm. zostały przeniesione do kolejnych „pokoleń” potomstwa klonalnego. Biorąc pod uwagę wyniki powyższej analizy genetycznej spodziewano się, że rośliny juwenilne pochodzące z kultur 4-letnich i starszych, o tym samym wzorze DNA co somaklon o różowo-malinowym kwiecie, przejawia ten sam fenotyp w następnych latach badań. I tak się w istocie stało. Wiosną 2006 r. zakwitło około 15% roślin otrzymanych z 6-letnich kultur i wszystkie posiadały identyczny fenotyp różowo-malinowego kwiatu [Podwyszyńska i in. 2010a]. W 2010 r. genotyp ten jako nowa odmiana tulipana pod nazwą ‘Agalia’ została wpisana do Księgi Ochrony Wyłącznego Prawa pod numerem: O 2232.

Ponadto somaklony tulipana ‘Prominence’ wyselekcjonowane we wcześniejszych badaniach [Podwyszyńska 2005] poddano analizie kariotypu przy użyciu metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sekwencjami 5S rDNA, 25S rDNA [Marasek-Ciołakowska i Podwyszyńska 2008] w odniesieniu do standardu (rośliny rozmnażanej tradycyjnie). Wykazano, że zasadniczo wzór markerów (znakowania sondami) 45S i 5S genów rRNA dla somaklonów i standardu był podobny. Jednakże, kariotypy somaklonów różniły się od standardu liczbą loci 45S i 5S rDNA i intensywnością sygnałów hybrydyzacji. Świadczyło to o niewielkich zmianach w strukturze chromosomów roślin długo rozmnażanych *in vitro*.

Wszystkie powyższe wyniki mogą świadczyć o tym, że zmienność obserwowana na poziomie fenotypu miała charakter mutacji. Ponadto wykazano, że możliwe jest wykorzystanie markerów molekularnych ISSR i RAPD zarówno do identyfikacji odmian jak i do wczesnego wykrywania zmienności somaklonalnej. Przydatność tych technik do ww.

celów potwierdzono w kolejnych badaniach, w których monitorowano stabilność genetyczną w elitarnym materiale nowych odmian tulipanów rozmnażanym *in vitro* we współpracy z dwoma hodowcami [Podwyszyńska 2010b]. Analiza ISSR wykazała, że już w ciągu pierwszego roku rozmnażania mogą wystąpić zmiany w strukturze DNA. Takie zmiany pojawiły u 4 z 10 badanych genotypów, co potwierdziło fakt, że stabilność genetyczna jest zależna od genotypu. Jedna z nadanych odmian była triploidem, a pozostałe diploidami. Uważa się, że poliploidy są mniej stabilne genetycznie [Karp 1989]. Opinia taka została potwierdzona w innych analizach genetycznych wykonanych w IO, w których triploidalna odmiana 'Giewont' charakteryzowała się wyższą zmiennością - 13,8%, stwierdzoną już w materiale rozmnażanym przez 2 lata, w porównaniu z 3% zmiennością obserwowaną u diploidalnych odmian rozmnażanych *in vitro* przez ten sam okres [Podwyszyńska 2005, Podwyszyńska 2010a]. Wykorzystanie markerów molekularnych do wykrywania zmienności w mikrorozmnażanym materiale różnych gatunków roślin udokumentowano w licznych pracach [Al.-Zahim i wsp. 1999, Devarumath i wsp. 2002, Bairu i in. 2011].

Rozpatrując nasze wyniki oraz uzyskane przez ww. badaczy należy podkreślić, że metoda RAPD nie jest wystarczająco czuła, by wykryć minimalne zmiany, które często są przyczyną zmienności. Nie zidentyfikowano bowiem różnic w obrębie rodzin sportów oraz różnic pomiędzy fenotypem białym i zielonym. Podobnie, zmienności wykrytej u mikrorozmnażanej begonii, na poziomie fenotypu, nie potwierdzono w analizie RAPD [Bouman i De Klerk 2001]. Wielu autorów postuluje, by do wykrywania zmienności somaklonalnej używać więcej niż jednej techniki molekularnej. Umożliwia to identyfikację zmian różnego typu, w różnych regionach DNA [Bednarek i Chwedorzewska 2001, Aravanopoulos 2003, Bairu i in. 2011]. Autorzy zauważają ponadto, że inne rodzaje markerów molekularnych, np. SSR (prostych sekwencji powtarzalnych) czy AFLP (polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów), także oparte na reakcji PCR, są z reguły bardziej wiarygodne, charakteryzują się większą rozdzielczością.

5. Wytwarzanie tetraploidów tulipana

U tulipana dominują diploidy, ale w ostatnich latach otrzymywaniem poliploidów bardzo zainteresowani są hodowcy [Okazaki i in. 2005, Barba Gonzales i in. 2006]. Poliploidy są szeroko wykorzystywane w programach hodowlanych wielu roślin użytkowych, gdyż charakteryzują się bujnym wzrostem, większymi rozmiarami organów, np. kwiatów czy owoców a często wyższy poziom odporności na choroby, suszę lub zmieniony termin kwitnienia. W hodowli, także tulipana, znane są dwie główne strategie uzyskiwania poliploidów: meiotyczna i mitotyczna [Dooghe i in. 2011]. W

meiotycznej indukuje się powstawanie niezredukowanych gamet, np. pyłku $2n$, wykorzystywanego następnie do zapylenia, w rezultacie uzyskuje się triploidy [Okazaki i in. 2005, Barba Gonzales i in. 2006]. Na drodze mitotycznej poliploidy powstają z komórek somatycznych, np. merystemu pędowego czy kalusa i charakteryzują się parzystą liczbą zwielokrotnionych genomów [Chauvin i in. 2005]. W tego typu poliploidyzacji używa się związków zaburzających mitozę – antymitotyki, najczęściej kolchicynę. Jednak ze względu na jej kancerogenność, coraz częściej stosuje się tzw. antymitotyki herbicydowe: oryzalinę, trifluralinę i amiprofos metylu (APM), uznawane za mniej szkodliwe dla ludzi [Dooghe i in. 2011]. Nowo otrzymane tetraploidy same w sobie rzadko stanowią nowe odmiany. Najczęściej używane są przez hodowców do krzyżowań, dlatego ważne jest by charakteryzowały się żywotnym pyłkiem. Należy zaznaczyć, że hodowla poliploidyzacyjna, w latach 90-tych trochę zapomniana, staje się ostatnio na świecie bardzo popularna, a techniki *in vitro* są standardowo wykorzystywane do podwajania liczby chromosomów u coraz większej liczby gatunków [Dooghe i in. 2011]. Tymczasem w kraju zastosowanie tych metod w hodowli roślin ozdobnych, sadowniczych i warzywnych wydaje się być niedoceniane.

W przypadku tulipana traktowaniu antymitotykami, poddawano kultury ustabilizowanych pędów przybyszowych *in vitro* a także eksplantaty inicjalne [Podwyszyńska 2011]. Materiał roślinny umieszczano na 5-7 dni na pożywce zawierającej jeden z antymitotyki: kolchicynę ($200-500 \text{ mg l}^{-1}$), oryzalinę ($5-15 \text{ mg l}^{-1}$), APM ($5-15 \text{ mg l}^{-1}$) i trifluralinę ($50-100 \text{ mg l}^{-1}$). Następnie kultury utrzymywano na pożywce do namnażania nie zawierającej już antymitotyków. Tetraploidy wykrywano po kilku miesiącach poprzez ocenę poziomu ploidalności w nowo powstających pędach przy użyciu cytometrii przepływowej. W wyniku badań uzyskano około 40 autotetraploidów dwóch odmian. Tetraploidy posadzono *ex vitro*. W kolejnych sezonach wegetacyjnych oceniano ich fenotyp. Wyselekcjonowane pod względem pożądanых cech poliploidy zostaną przekazane hodowcom z przeznaczeniem do dalszej hodowli, np. tetraploidy do krzyżowań z diploidami w celu uzyskania triploidów.

Podsumowanie

Opracowano metodę mikrorozmnażania tulipana polegającą na cyklicznym namnażaniu pędów przybyszowych, która może być zastosowana do rozmnażania materiału elitarnego nowych odmian tulipanów. Uzyskane wyniki dostarczyły też wielu nowych informacji na temat charakteru regeneracji struktur inicjalnych oraz fizjologii procesu formowania cebul *in vitro*.

W oparciu o analizę endogennych fitohormonów, optymalizowano warunki poszczególnych etapów mikrorozmnażania, zwiększając stopniowo ich efektywność. Poprzez

zastosowanie TDZ łącznie z paklobutrazolem znacznie zwiększono wydajność pierwszego etapu mikrorozmnażania. Analiza cytologiczna wykazała, że pierwotna regeneracja miała charakter embriogenezy somatycznej. Natomiast podczas wtórnej regeneracji, w trakcie cyklicznego namnażania, rozwijały się pędy przybyszowe. Problematyka badawcza skupiała się przede wszystkim nad optymalizacją etapu formowania cebul *in vitro* oraz warunków ukorzeniania i uprawy cebul *ex vitro*, gdyż u tulipana tylko pędy w formie cebul są zdolne do ukorzeniania i aklimatyzacji *ex vitro*. Dzięki specjalnemu traktowaniu pędów przed chłodzeniem (indukującym proces formowania cebul) znacznie zwiększono efektywność tego procesu. Polegało ono na wydłużeniu ostatniego cyklu namnożeniowego z 8 do 14 tyg. i jednocześnie w jego 6-mym tyg. dodaniu pożywki płynnej bez cytokinin, ale z dodatkiem retardantów wzrostu. Takie traktowanie pozwoliło uzyskać dobrze rozwinięte pędy, znajdujące się w odpowiedniej fazie fizjologicznej, w której były one zdolne do reakcji na czynnik chłodu. Słuszność takiego postępowania potwierdziły wyniki analizy endogennych hormonów – auksyny (IAA), ABA, cytokinin i poliamin, które dostarczyły nowych informacji na temat ich metabolizmu. Wykazano, iż we wszystkich fazach mikrorozmnażania u odmiany słabo tworzącej cebule poziom ABA jest znacznie wyższy, poziom auksyny niższy, a związki cytokinin występują w innych proporcjach niż u odmiany łatwo formującej cebule. Wydłużenie okresu chłodzenia z 12 do 14 tyg. oraz zamiana standardowo stosowanego TDZ na iP w pożywce przed chłodzeniem skutkowało dalszą poprawą efektywności tworzenia cebul. Wiązało się to z obniżeniem poziomu endogennego ABA tuż po chłodzeniu i endogennych cytokinin w fazie formowania cebul. Dodatkowy efekt, zwiększający liczbę i jakość cebul uzyskano poprzez traktowanie pędów estrem metylowym kwasu jasmonowego w 8 tyg. po chłodzeniu.

Skrócenie okresu potrzebnego do zakwitnięcia roślin pochodzących z mikrorozmnażania. Dzięki optymalizacji warunków uprawy (nawożenie, ściółkowanie) pierwsze tulipany z *in vitro* zakwitły już po 3-4 latach uprawy w polu.

Rezultatem badań było opracowanie stosunkowo wydajnej metody mikrorozmnażania tulipana pozwalającej uzyskać z pojedynczych cebul od 500 do 2000 roślin w ciągu 3 lat. Jednym z nowych zastosowań metody jest wykorzystanie jej do rozmnażania materiału elitarnego, wolnego od chorób wirusowych. Nowa metoda została również zweryfikowana pod względem stabilności genetycznej rozmnażanego materiału roślinnego. W przypadku tulipana były to pierwsze prace na ten temat. Unikalne badania zmienności występującej wśród rozmnożonych *in vitro* tulipanów wykonano poprzez ocenę fenotypu roślin kwitnących oraz przy użyciu markerów molekularnych RAPD, ISSR i AFLP. Wykazano, że metoda

opracowana w IO może być stosowana przy zachowaniu zasady, według której cykliczne namnażanie pędów nie powinno trwać dłużej niż 2-3 lata, a materiał roślinny powinien być systematycznie kontrolowany, także w procesie mikrorozmnażania, np. przy użyciu markerów molekularnych. Spośród kilkudziesięciu somaklonów wyselekcjonowałam kilka cennych mutantów. Wśród nich wyróżnia się jeden mutant odmiany modelowej 'Blue Parrot'. Jest to genotyp o zmienionym kształcie i kolorze i kwiatów (z fioletowego na malinowo-różowy) oraz o większym kwiecie i dłuższym pędzie kwiatowym wpisany do księgi ochrony wyłącznego prawa (KO) w 2010 roku.

Opracowana metoda regeneracji tulipana *in vitro* umożliwia szersze niż dotychczas wykorzystanie technik *in vitro* w hodowli twórczej, np. do uzyskiwania poliploidów. W ostatnich latach odmiany tetraploidalne są bardzo cenione w środowisku ogrodniczym.

Literatura

- Alderson P.G., Taeb A.G. 1990. Effect of bulb storage on shoot regeneration from floral stems of tulip *in vitro*. J. Hort. Sci., 65, 71-74.
- Al-Zahim, M.A., Ford-Lloyd, B.V., Newbury H.J. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Rep., 18, 473-477.
- Ananieva K., Malbeck J., Kaminek M., Van Staden J. 2004. Methyl jasmonate down-regulates endogenous cytokinin levels in cotyledons of *Cucurbita pepo* (zucchini) seedlings. Biol. Plant., 122, 496-503.
- Anonim 2002a. Classification scheme for tulip. Bulletin OEPP/EPPO, 32, 115-121.
- Anonim. 2002b. Certification scheme for narcissus. Bulletin OEPP/EPPO, 32, 91-104.
- Anwar R., Mattoo A.K., Handa A.K. 2015. Polyamine interactions with plant hormones: Crosstalk at several levels. In: Kusano T, Suzuki H (eds) Polyamines: universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. Springer, Japan, 267-302.
- Aravanopoulos, F.A. 2003. Molecular identification of micropropagated plants. Acta Hort., 616, 25-47.
- Asjes C.J., Bunt M.H., Van Slogteren D.H.M. 1974. Production of hyacinth mosaic virus-free hyacinth and lily symptomless virus-free lilies by meristem tip culture. Acta Hort., 36, 223-228.
- Bach A. 2000. Wpływ jakości światła na przebieg somatycznej embriogenezy u ozdobnych roślin cebulowych. IX Ogólnopol. Konf. Kultur *in vitro* i Biotechnologii Roślin „Modyfikowanie genomu roślin, Gdańsk – Sobieszewo, 10-13.09.2000, streszczenie: 104.
- Bach A. i Ptak A. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from ovaries of *Tulipa gesneriana* L. *in vitro* cultures. Acta Hort., 560, 391-394.
- Bach A., Malik A., Ptak A., Kędra M. 2000. Light effects on ornamental microplant shoots and bulbs quality. Acta Hort., 530, 173-179.
- Bach A., Pawłowska B., Pułczyńska K. 1992. Utilization of soluble carbohydrates in shoot and bulb regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. *in vitro*. Acta Hort., 325, 487-492.
- Bach A., Ptak A. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from ovaries of *Tulipa gesneriana* L. in *in vitro* cultures. Acta Hort., 560, 391-394.

- Bairu M.W., Aremu A.O., Van Staden, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul.*, 63, 147-173.
- Baker C.M., Wilkins H.F., Asher P.D. 1990. Comparisons of precultural treatments and cultural conditions on *in vitro* response of tulip. *Acta Hort.*, 266, 83-90.
- Barba-Gonzales, R., Miller, C.T., Ramanna, M.S., Van Tuyl, J.M. 2006. Nitrous oxide N₂O induces 2n gametes in sterile F1 hybrids of Oriental Asiatic lilies (*Lilium*) and leads to intergenomic recombination. *Euphytica*, 148, 303-309.
- Bednarek P.T., Chwedorzewska K. 2001. Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia* 1, 9-34.
- Benschop M. 1980. Photosynthesis and respiration of *Tulipa* sp. cultivar 'Apeldoorn'. *Sci. Hort.*, 12, 361-375.
- Blom-Barnhoorn G.J., Van Aartrijk J. 1985. The regeneration of LSV and TBV from infected *Lilium* bulb-scale explants in the presence of virasole. *Acta Hort.* 164, 163-168.
- Borkowska B. 1995. Zmienność w kulturach *in vitro*. *Wiad. Bot.*, 39, 53-57.
- Borkowska B., Szczerba J., Kubik M. 1995. Gospodarka cukrami w kulturach pędowych wiśni odm. Lutówka. (W:) Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin. F. Dubert i A. Skoczowski (ed.), PAN, Kraków, 11-18.
- Bouman, H., De Klerk, G.-J. 2001. Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 111-117.
- Chauvin J.E., Label A., Kermarrec M.P. 2005. *In vitro* chromosome doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *J. Hort. Sc. Biotechnol.*, 83, 179-186.
- Côte F.X., Teisson C., Perrier X. 2001. Somaclonal variation rate evaluation in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 37, 539-542.
- Devarumath, R.M., Nandy, S., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N., Raina, S.N. 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camelia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Rep.*, 21, 166-173.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 104, 359-373.
- Gabryszewska E. i Marasek A. 1997. Wpływ tidiazuronu na wzrost i regenerację pędów peonii (*Paeonia x hybryda*) *in vitro*. *Zesz. Nauk. AR Kraków, Sesja Naukowa*, 50, 177-181.
- Gabryszewska E., Wojtania A. 2005. Metody rozmnażania liliowca (*Hemerocallis* spp.) *in vitro*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 504, 575-583.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P.I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová E., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. 2011. Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J. Exp. Bot.*, 62, 2827-2840.
- Hulscher M., Krijkseld H.T. 1995. Micropropagation of tulip. *Acta Hort.*, 420, 104-105.
- Hulscher M., Krijkseld H.T., Van der Linde P.C.G. 1992. Propagation of shoots and bulb growth of tulip *in vitro*. *Acta Hort.*, 325, 441-446.
- Hutchinson M.J., Saxena .K. 1996. Role of purine metabolism in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. *Physiol. Plant.*, 98, 517-522.

- Jabłońska L. 2005. Rozwój polskiego kwiaciarstwa w minionym 15-leciu. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 504, 21-32.
- Jain S.M., De Klerk G-J. 1998. Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4, 63-75.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Koda Y. 1997. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol. Plant*, 100, 639-646.
- Kozak D. 2002. The effect of growth retardants on induction and development of *Gloriosa rothschildiana* O'Brien tubers *in vitro*. *Acta Hort.*, 570, 345-349.
- Kuijpers A.M., Langens-Gerrits M. 1997. Propagation of tulip *in vitro*. *Acta Hort.*, 430, 321-324.
- Kumar A., Palni L.M.S. 2013. Changes in endogenous polyamines during *in vitro* cormlet formation in *Gladiolus hybridus* Hort. *Sci. Hortic.*, 162, 260-264.
- Langens M.M. 2001. Progress in tissue culture techniques for propagation of tulips. *FlowerTECH*, 4, 22-24.
- Larkin P.J., Scowcroft W.R. 1981. Somaclonal variation – novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
- Le Nard M., De Hertogh A.A. 1993. *Tulipa*. W: The physiology of flower bulbs. A.A. De Hertogh, M. Le Nard (eds.), Elsevier Science Publisher B.V., The Netherlands, 617-682.
- Le Nard M., Ducommun C., Weber G., Dorion N., Bigot C. 1987. Observations sur la multiplication *in vitro* de la tulipe (*Tulipa gesneriana* L.) à partir de hampes florales prélevées chez des bulbes en cours de conservation. *Agronomie*, 7, 321-329.
- Lilien-Kipnis H., Stein A., Levy S. 1992. The course of bean yellow mosaic virus elimination from *Gladiolus* by meristem tip culture. *Acta Hort.*, 325, 709-714.
- Marasek-Ciolakowska A., Podwyszyńska, M. 2008. Somaclonal variation in long-term micropropagated tulips (*Tulipa gesneriana* L.) determined by FISH analysis. *Floricultural and Ornamental Biotechnology*, (Global Science Books), 2, 65-72.
- Maślanka M., Bach A. 2007. Wpływ kwasu abscysynowego oraz światła na wzrost i rozwój zarodków somatycznych tulipana (*Tulipa gesneriana* L.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 23, 155-161.
- Maślanka, M., Bach, A. 2014. Induction of bulb organogenesis in *in vitro* cultures of Tarda tulip (*Tulipa tarda* Stapf.) from seed-derived explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 50, 712-721.
- Mowat W.P. 1995. Tulip. W: Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops (Loebenstein G., Lawson R.H., Brunt A.A. eds.). John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 352-383.
- Niimi Y. 1978. Influence of low and high temperatures on the initiation and the development of a bulb primordium in isolated tulip embryos. *Sci. Hort.*, 9, 61-69.
- Niimi Y. 1980. Histological observations on the initiation of the vegetative apex in tulip seeds cultured under low temperatures. *Sci. Hort.*, 13, 161-171.
- Nishiuchi Y. 1980. Studies on vegetative propagation of tulip. 4. Regeneration of bulblets in bulb scale segments cultured *in vitro*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 49, 235-239.
- Nojiri H., Yamane H., Seto H., Yamaguchi I., Murofushi N., Yoshihara T., Shibaoka H. 1992. Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. *Plant Cell Physiol.*, 33, 1225-1231.
- Okazaki K., Kurimoto K., Miyajima I., Enami A., Mizuochi H., Matsumoto Y., Ohya H. 2005. Induction of 2n pollen in tulips by arresting meiotic process with nitrous oxide gas. *Euphytica*, 143, 101-114.

- Ondo Ovono P., Kevers C., Dommes J. 2010. Tuber formation and development of *Dioscorea cayenensis*–*Dioscorea rotundata* complex in vitro effect of polyamines. In *Vitro Cel Dev Biol-Plant*, 46, 81-88.
- Philips S. 1990. The efficacy of four antiviral compounds in the elimination of *Narcissus* viruses during meristem tip culture. *Acta Hort.*, 226, 351-538.
- Podwyszyńska M. 2001. Effect of carbohydrates on shoot multiplication and bulb formation *in vitro*. *Rocz. AR Poznań, CCCXXXII Ogrodn.*, 33, 119-126.
- Podwyszyńska M. 2005. Samoclinal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, 13, 109-122.
- Podwyszyńska M. 2006a. Wpływ auksyn, etylenu i estru metylowego kwasu jasmonowego na formowanie cebul w kulturach pędów tulipana *in vitro*. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 510, 461-469.
- Podwyszyńska M. 2006b. Improvement of bulb formation in micropropagated tulips by treatment with NAA and paclobutrazol or ancymidol. *Acta Hort.*, 725, 679-684.
- Podwyszyńska M. 2011. *In vitro* tetraploid induction in tulip. *Acta Hort.*, 961, 391-396.
- Podwyszyńska M. 2012. The mechanisms of *in vitro* storage organ formation in ornamental geophytes. *Flor. Ornament. Biotechnol.*, 6, 9-23.
- Podwyszyńska M., Kosson R., Treder J. 2015. Polyamines and methyl jasmonate in bulb formation of *in vitro* propagated tulips. *Plant Cell, Tiss. Organ Cultures*, 123, 591-605.
- Podwyszyńska M., Kuras A., Korbin M. 2010a. Somaclonal variation in micropropagated tulips as a source of novel genotypes – field and molecular characteristic. *Acta Hort.*, 855, 225-231.
- Podwyszyńska M., Kuras A., Korbin M. 2010b. Ocena stabilności genetycznej rozmnażanych *In vitro* polskich odmian tulipanów przy użyciu markerów molekularnych ISSR. *Biotechnologia* 2, 105-113.
- Podwyszyńska M., Marasek A. 2003. Effect of thidiazuron and paclobutrazol on regeneration potential of flower stalk explants *in vitro* and subsequent shoot multiplication. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 72, 181-190.
- Podwyszyńska M., Michalczyk L., Miszczak A. 2004. Content of endogenous abscisic acid in tulip shoots cultured *in vitro* depending on micropropagation stage and genotype. Abstracts of IX International Symposium on Flower Bulbs, Niigata, Japonia, 19-22.04.2004, 122.
- Podwyszyńska M., Niedoba K., Korbin M., Marasek A. 2006. Somaclonal variation in micropropagated tulips determined by phenotype and DNA markers. *Acta Hort.*, 714, 211-219.
- Podwyszyńska M., Novák O., Doležal, K., Strnad M. 2014. Endogenous cytokinin dynamics in micropropagated tulips during bulb formation process influenced by TDZ and iP pre-treatment. *Plant Cell Tiss., Organ Cult.*, 119, 331-346.
- Podwyszyńska M., Nowak J.S. 2004. The effect of the growing conditions on the growth and reproduction of tulip bulbs produced *in vitro*. *Folia Hort.*, 16/1, 133-145.
- Podwyszyńska M., Rojek A. 2000. Wpływ jakości światła i ciemności na regenerację tulipana (*Tulipa gesneriana* L.) *in vitro*. *Zesz. Nauk. Inst. Sadow. Kwiat.*, 7, 129-137.
- Podwyszyńska M., Rojek A., 2000. Somatyczna embriogeneza u tulipana. IX Ogólnopolska. Konf. Kultur *in vitro* i Biotechnologii Roślin „Modyfikowanie genomu roślin, Gdańsk – Sobieszewo, 10-13.09.2000, streszczenie: 107.
- Podwyszyńska M., Ross H. 2003. Formation of tulip bulbs *in vitro*. *Acta Hort.*, 616, 413-419.
- Podwyszyńska M., Skrzypczak Cz., Fatel K., Michalczyk L. 2001. Study on usability of *Fusarium oxysporum* Schlecht. f.sp. *tulipae* Apt. metabolites for screening for basal rot resistance in tulip. *Acta Agrobot.*, 54, 71-82.

- Podwyszyńska M., Sochacki D. 2010. Micropropagation of tulip: production of virus-free stock plants. In: Jain S.M., Ochatt S.J. (eds). *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology* (Springer Protocols), 589, Humana Press/Springer, New York, US, 243–256.
- Podwyszyńska M., Sochacki D., Kamińska M. 2005. Wykorzystanie metody kultur *in vitro* do rozmnażania tulipanów wolnych od wirusów. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 504: 667-674
- Preece J.E., Imel M.R. 1991. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P.J.M. Hybrids'. *Scientia Hort.*, 48, 159-170.
- Ptak A., Bach A. 2007. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 43, 35-39.
- Rees A.R. 1992. Ornamental bulbs, corms and tubers. C.A.B. International, Wallingford, UK, 61-92.
- Rice R.D., Alderson P.G., Wright N.A. 1983. Induction of bulbing of tulip shoots *in vitro*. *Scientia Hort.*, 20, 377-390.
- Rival A., Jagilot E., Beule T., Verdeil J.-L., Tregear J. 2000. DNA methylation and somaclonal variation in oil palm. *Acta Hort.*, 530, 447-454.
- Riviere S., Muller J.F. 1976. La multiplication végétative de la *Tulipa gesneriana* L. cultivar 'Paul Richter', par la culture *in vitro* des bourgeons axillaires des écailles. *CR Séances Acad. Sci. Paris*, 282 (Série D), 533-536.
- Saniewski M., Kawa-Miszczak L., Węgrzynowicz-Lesiak E., Okubo H. 2000. Role of ABA, gibberellins and auxins in dormancy and dormancy release of tulip bulbs. W: Viémont J.D., Crabbé J. (ed), *Dormancy in plants*, CABI Publishing, Cambridge, UK, 227-243.
- Smulders M.J.M., de Klerk G.J. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.*, 63, 137-146.
- Sochacki D. 2013. The occurrence of the viruses in tulip crops in Poland. *J. Hort. Res.*, 21, 5-9.
- Sochacki D., Komorowska B. 2012. First report of Tulip virus X on tulip in Poland. *Plant Disease*, 96, 594.
- Sochacki D., Orlikowska T. 2005. The obtaining of narcissus plants free from potyviruses via adventitious shoot regeneration *in vitro* from infected bulbs. *Sci. Hort.*, 103, 219-225.
- Sochacki D., Podwyszyńska M. 2006a. Wykrywanie wirusa pstrości tulipana (TBV) w tulipanach metodą ELISA. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 510: 593-599.
- Sochacki D., Podwyszyńska M. 2012. Virus eradication in narcissus and tulip by chemotherapy. W: *Floriculture and Ornamental Biotechnology 6. Special issue Bulbous Ornamentals*, 2 (Van Tuyl J., Arens P., guest eds.). Global Science Book, 114-121.
- Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T. 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, *CRE1/AHK4* and *AHK3*, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell. Physiol.*, 45, 1299-1305.
- Spiegel S., Loebestein G. 1995. Control of virus diseases. W: *Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops*. (Loebenstein G., Lawson R.H., Brunt A.A. red.) Willey and Sons, Chichester, N. York, Brisbane, Toronto, Singapore, 203-218.
- Steinitz B., Lilien-Kipnis H. 1989. Control of precocious gladiolus corm and cormel formation in tissue culture. *J. Plant Physiol.*, 135, 495-500.
- Taeb A.G., Alderson P.G. 1990a. Effect of photoperiod and quality of light on bulbing of tulip shoots regenerated *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 65, 71-74.
- Taeb A.G., Alderson P.G. 1990c. Shoot production and bulbing of tulip *in vitro* related to ethylene. *J. Hort. Sci.*, 65, 199-204.

- Taeb A.G., Alderson, P.G. 1990b. Effect of low temperature and sucrose on bulb development and on the carbohydrate status of bulbing shoots of tulip *in vitro*. J. Hort. Sci., 65, 193-197.
- Van Aartrijk, J., 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. Scientia Hort., 14, 261-268.
- Van Rossum M.W.P.C., Alberda A M., Van der Plas L.H.W. 1997. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. Plant Sci., 130, 207-216.
- Zatloukal M., Gemrotov M., Doležal K., Havlíček L., Spíchal L., Strnad M. 2008. Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. Bioorg. Med. Chem., 16, 9268-9275.

Application of *in vitro* techniques for tulip micropropagation, virus eradication and tetraploid induction

In Poland, there are many valuable varieties of tulip deserve wider dissemination due to high decorative qualities and adaptability to our climate. Improvement of biotechnological methods such as *in vitro* propagation can speed up breeding and provides new genotypes for the market. Therefore, 15 years ago, studies were undertaken on the improvement of micropropagation method of tulip. As a result of our research the cyclic multiplication of adventitious shoots of this geophyte was obtain by using thidiazuron (TDZ) in combination with cytokinin iP. Moreover, the last micropropagation stage, formation of microbulbs was also significantly improved, that is very important because only bulbs are capable of rooting and further growth in soil. It was found that modification (by replacement of TDZ with iP in a medium) and prolongation to 12 weeks of the last multiplication subculture, prior to cooling combined with the application of growth retardant enhanced shoot's bulbing capacity. Bulbing efficiency was markedly increased by treatment with MeJA at the last phase of this process, 6 weeks after the end of cooling shoots. Due to the sever virus infection of several tulip cultivars, one of the aim of our research was to develop the *in vitro* method of virus eradication from plant material. Virus elimination from the totally infected tulip genotypes was possible due to application of ribavirin for *in vitro* chemotherapy. Currently in tulip, the polypoid cultivars are in high demand. Therefore, during our study we developed *in vitro* method of tetraploid induction using herbicidal antimitotic agents such as oryzalin, amiprofos methyl (APM) and trifluralin as alternative to colchicine.

Key words: *Tulipa*, micropropagation, virus-free plants, ribavirin, tetraploids