

ZASTOSOWANIE KULTUR *in vitro* W ROZMNAŻANIU *Dipladenia sanderi* HEMSL.

Agnieszka Wojtania ¹, Eleonora Gabryszewska ¹, Piotr Woźniak ²

¹ Pracownia Kultur Tkanowych, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach

² Zakład Rolno-Ogrodniczy „Vitrocitrus” w Łodzi

Wstęp

Dipladenia sanderi HEMSL. syn. *Mandevilla sanderi* (rodzina *Apocynaceae*), czepne pnącze o zdrewniałych pędach, ciemno zielonych, błyszczących liściach i bardzo dekoracyjnych kwiatach, cieszy się ostatnio dużym zainteresowaniem na naszym rynku. Roślina ta jest sportem *Mandevilla xamabilis* i *M. sanderi* [ANONIM 2006]. W Brazylii, skąd pochodzi, może być uprawiana jako roślina ogrodowa. W naszej strefie klimatycznej zalecana jest jako roślina doniczkowa, z możliwością wystawiania w cieplejszych miesiącach na zewnątrz mieszkań [CZUCHAJ 2006]. Rozmnażana jest głównie wegetatywnie, poprzez sadzonki pędowe. Badania prowadzone w naszym laboratorium miały na celu ocenę zdolności regeneracyjnych w warunkach *in vitro*, które pozwolą na intensyfikację rozmnażania tej interesującej rośliny.

Materiał i metody

Kultury pędów *Dipladenia sanderi* zainicjowano z pąków kątowych izolowanych z fragmentem pędu. Po 4 tygodniach wzrostu na pożywce MS [MURASHIGE, SKOOG 1962] zawierającej 0,2 mg·dm⁻³ benzyloaminopuryny (BAP) i 0,01 mg·dm⁻³ kwasu indoliloctowego (IBA) uzyskano pojedyncze pędy z niewielką ilością kalusa u podstawy. Wstępne doświadczenia dotyczące wzrostu i rozwoju pędów w obecności różnych cytokinin (BAP, 2iP, kinetyny, *meta*-topoliny) wykazały dużą przydatność w tym procesie BAP. Z tego względu w dalszych doświadczeniach badano wpływ różnych stężeń BAP (0,5–2,0 mg·dm⁻³) oraz jej współdziałanie z innymi cytokininami – izopentyloadeniną (2iP), (1,0 mg·dm⁻³) lub tidiazuro-nem (TDZ), (0,015 mg·dm⁻³) w procesie mnożenia pędów. Stosowano 2 rodzaje eksplantatów: 2–3 węzłowe sadzonki wierzchołkowe (eksplantaty A) oraz 1-węzłowe podstawy pędu z rozwijającym się kalusem (eksplantaty B), które wykładano na pożywkę MS oddzielnie. Kontrolę stanowiły eksplantaty rosnące na pożywce bez regulatorów wzrostu. Materiał roślinny umieszczano na pożywce agarowej o pH 5,6. Kultury prowadzono w fitotronie w warunkach 16-godzinnego oświetlenia o natężeniu 39 μmol·m⁻²·s⁻¹ i temperaturze 23–25°C.

Po 6 tygodniach wzrostu kultur oceniano świeżą masę (mg) i liczbę powstałych pędów (przybyszowych i kątowych łącznie) oraz długość pędu głównego (mm). W każdej kombinacji było 5 powtórzeń, gdzie powtórczeniem był słoik z 5 eksplantatami. Przeprowadzono 2 serie doświadczeń. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Do oceny istotności różnic między średnimi użyto testu t-Duncana przy poziomie istotności 5%.

Wyniki i dyskusja

Dipladenia jako pnącze cechuje się intensywnym wzrostem wydłużeniowym. Podobnie w kulturach stwierdzono silną dominację pędu głównego oraz trudności z uzyskaniem krzewienia się pędów, obserwowane również u innych pnączy mnożonych *in vitro*: *Hedera canariensis* [AL-JUBOORY i in. 1991], *Vitis vinifera* [GRIBAUDDO, FRONDA 1991] i *Vitis rotundifolia* [SUDARSONO, GOLDY 1991]. W przypadku *Dipladenia*, spośród cytokinin adeninowych stosowanych pojedynczo, najlepszy wzrost pędów stwierdzono pod wpływem BAP. W obecności kinetyny pędy były silnie skrócone, posiadały duże, skórzaste liście i liczne korzenie. W obecności 2iP obserwowano natomiast pędy z długimi międzywęzłami i zredukowanymi blaszczkami liściowymi (dane niepublikowane). W przeprowadzonym doświadczeniu, na pożywce kontrolnej (bez regulatorów wzrostu) obserwowano zamieranie 48% pędów (dane niepublikowane), nieznaczny wzrost wydłużeniowy i brak uaktywniania się pąków kątowych (tab. 1), (fot. 1).

Tabela 1; Table 1

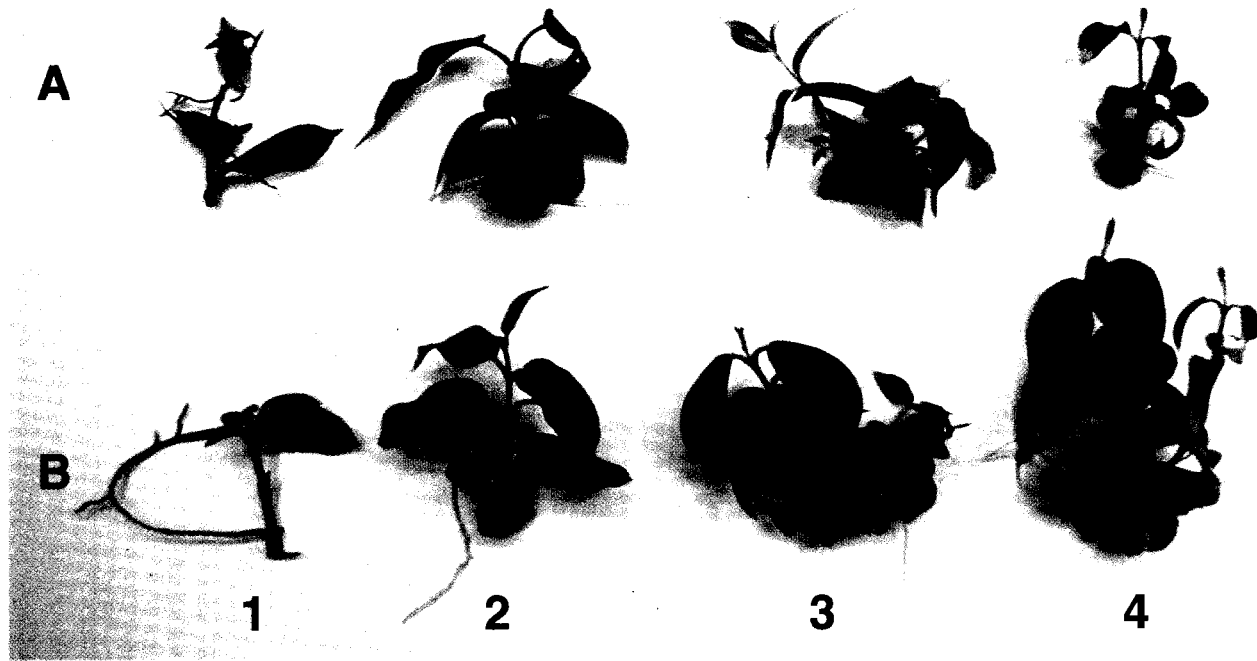
Wpływ różnych cytokinin na wzrost i rozwój pędów *Dipladenia sanderi* na wierzchołkowych fragmentach pędu (A) oraz z podstaw pędu (B)

Effect of different cytokinin on the growth and development of *Dipladenia* shoots stimulated from apical explants (A) and basal explants (B)

Regulator wzrostu Growth regulator (mg·dm ⁻³)	Liczba pędów kątowych i przybyszowych The number of axillary and adventitious shoots		Świeża masa zespołu pędów * Fresh weight of shoot clusters * (mg)		Długość pędu głównego Mean length of main shoot (mm)	
	A	B	A	B	A	B
Kontrola; Control	0,7a	0,5a	105,0a	141,0ab	25,0a	28,7ab
0,5 BAP	1,4b	1,9b-c	235abc	426,7cd	28,7ab	36,4a-d
1,0 BAP	1,7bc	2,6ef	427,8cd	547,5d	35,9a-d	42,3cde
2,0 BAP	2,3cde	1,9b-e	621,7d	562,8d	38,6bcd	35a-d
0,5 BAP + 0,015 TDZ	2,1b-e	2,0b-e	251,3abc	245,3abc	28,9ab	37,8bcd
1,0 BAP + 0,015 TDZ	2,4def	2,2cde	270,0abc	601,0d	34,4abc	38,0bcd
2,0 BAP + 0,015 TDZ	1,8bcd	2,2cde	263,0abc	902,0e	38,0bcd	50,2ef
1,0 BAP + 1,0 2iP	1,9b-e	2,6ef	399,0bcd	900,0e	32,4abc	53,1f
1,0 BAP + 1,0 2iP + 0,015 TDZ	2,5def	3,1f	460,0cd	857,0e	27,9ab	45,6def

* świeża masa obejmuje wytworzone pędy łącznie z tkanką kalusową u ich podstawy; the fresh weight included the formed shoots with the calus at their base

średnie oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie $\alpha = 0,05$; means followed by the same letters do not differ significantly at $\alpha = 0.05$



Fot. 1. Pędy *Dipladenia sanderi* HEMSL. uzyskane z eksplantatów wierzchołkowych (A) i bazalnych (B) po 6 tygodniach wzrostu na pożywkach MS uzupełnionych różnymi cytokininami ($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$): 1 – kontrola (bez regulatorów wzrostu), 2 – BAP (1,0), 3 – BAP (1,0) + TDZ (0,015), 4 – BAP (1,0) + 2iP (1,0) + TDZ (0,015)

Fig. 1. Shoots of *Dipladenia sanderi* HEMSL. obtained from apical explants (A) and basal explants (B) after a 6-week period of growing on the MS media containing different cytokinins ($\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$): 1 – control (without growth regulators), 2 – BAP (1.0), 3 – BAP (1.0) + TDZ (0.015), 4 – BAP (1.0) + 2iP (1.0) + TDZ (0.015)

Zastosowane cytokiny, w zależności od stężenia i stosowanych kombinacji, wpłynęły stymulująco na uaktywnianie pąków kątowych, tworzenie pędów przybyszowych, jak również wzrost wydłużeniowy pędu głównego (tab. 1), dający możliwość pozyskiwania sadzonek węzłowych. Zastosowanie BAP w stężeniu $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ wpłynęło stymulująco głównie na wzrost pędów głównych i sporadyczne uaktywnianie pąków kątowych. Przy najwyższym stężeniu ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) tej cytokiny następował wzrost intensywności mnożenia pędów u eksplantatów wierzchołkowych (tab. 1), jednak tworzące się pędy były gorszej jakości (deformacje liści). Stąd jako optymalne stężenie BAP wytypowano $1,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Dodanie TDZ do pożywki zawierającej samą BAP bądź BAP + 2iP wpłynęło stymulująco na uaktywnianie pąków kątowych w obydwu typach stosowanych eksplantatów. U eksplantatów bazalnych obserwowano ponadto wzrost tkanki kalusowej i tworzenie pojedynczych pędów przybyszowych (fot. 1). Wyjątek stanowiła kombinacja TDZ z BAP o najniższym stężeniu, gdzie następowało obumieranie kalusa. W przypadku eksplantatów wierzchołkowych, najbardziej efektywne tworzenie pędów (2,4–2,5 pędów/eksplantat) uzyskano w wyniku współdziałania BAP ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) z TDZ lub TDZ i 2iP. Natomiast u eksplantatów bazalnych wzrost współczynnika mnożenia pędów (3,1/eksplantat) następował po dodaniu TDZ do pożywki zawierającej BAP i 2iP (tab. 1). Wyrastanie pędów kątowych pod wpływem niskich stężeń tidiazuronu stwierdzono w kulturach roślin drzewiastych np. *Acer × freemanii* [KERNS, MEYER 1986], *Tilia cordata*, *Sorbus aucuparia*, *Robinia pseudoacacia*, *Quercus robur* [CHALUPA 1987, 1988]. Znane jest także korzystne współdziałanie różnych cytokinin, obserwowane podczas mnożenia pędów m.in. *Acer × freemanii* [KERNS, MEYER 1986], *Vitis rotundifolia* [SUDARSONO, GOLDY 1991], *Calathea ornata* [PODWYSZYŃSKA 1997], *Paeonia × hybrida* [GABRYSZEWSKA 1998]. W przypadku *Dipladenia* zastosowanie BAP łącznie z 2iP i TDZ pozwoliło na podwyższenie liczby pędów tworzących się głównie na eksplantatach bazalnych oraz poprawę ich jakości w porównaniu z kulturami rosnącymi na pożywce z samą BAP lub BAP+TDZ (fot. 1). Według HUETTEMAN i PREECE [1993] większa efektywność mieszaniny cytokinin na tworzenie pędów może wynikać z faktu lepszego ich „rozpoznawania” przez komórki roślinne lub odmiennego mechanizmu oddziaływania na eksplantaty.

Wstępne doświadczenia wykazały, iż zespoły namnożonych pędów z powodzeniem ukorzeniały się na pożywce bez regulatorów wzrostu a następnie aklimatyzowały w warunkach szklarniowych (dane niepublikowane).

Wnioski

1. Kultury pędów *Dipladenia sanderi* zainicjowano z pąków kątowych na pożywce MS zawierającej $0,2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i $0,01 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IBA.
2. Najlepsze mnożenie pędów obserwowano w wyniku współdziałania BAP ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) z TDZ ($0,015 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) lub TDZ i 2iP ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$).
3. Wartość współczynnika mnożenia pędów była różna w zależności od eksplantatu, z którego inicjowano tworzenie pędów – 2,5 pędów uzyskano z wierzchołkowej części pędu i 3,1 z części bazalnej.

Literatura

- ANONIM 2006. <http://sd1new.net/GardenPages/dipladenia.htm>
- AL-JUBOORY K.H., WILLIAMS D.J., SKIRVIN R.M. 1991. *Growth regulators influence root and shoot development of micropropagated Algerian ivy*. HortScience 26(8): 1079–1080.
- CHALUPA V. 1987. *Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on in vitro shoot proliferation of Tilia cordata MILL., Sorbus aucuparia L. and Robinia pseudoacacia L.* Biol. Plant. 29(6): 425–429.
- CHALUPA V. 1988. *Large scale micropropagation of Quercus robur L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation.* Biol. Plant. 30(6): 414–421.
- CZUCHAJ P. 2006. *Mandewilla, cenne pnącze do mieszkań i ogrodów*. Rośliny Ozdobne 1 (w druku).
- GABRYSZEWSKA E. 1998. *The influence of cytokinins, thidiazuron, paclobutrazol and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. Jadwiga in vitro.* J. Fruit Orn. Plant Res. 6(3–4): 157–167.
- GRIBAUDO I., FRONDA A. 1991. *Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro.* HortScience 26(8): 1083.
- HUETTEMAN C.A., PREECE J.E. 1993. *Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture.* Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 33: 105–119.
- KERNS H.R., MEYER M.M. JR. 1986. *Tissue culture of Acer × freemanii using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation.* HortScience 21(5): 1209–1210.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* Physiol. Plant. 15: 473–497.
- PODWYSZYŃSKA M. 1997. *Micropropagation of Calathea ornata Koern.* Biol. Plant. 39(2): 179–186.
- SUDARSONO., GOLDY R. 1991. *Growth regulator and axillary bud position on in vitro establishment of Vitis rotundifolia.* HortScience 26(3): 304–307.

Słowa kluczowe: *Dipladenia*, *in vitro*, regulatory wzrostu, rozmnażanie

Streszczenie

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę zdolności regeneracyjnych *Dipladenia sanderi* HEMSL. w warunkach *in vitro*. Kultury pędów inicjowano z pąków kątowych na pożywce MS zawierającej 0,2 mg BAP·dm⁻³ i 0,01 mg IBA·dm⁻³. Najlepsze mnożenie pędów obserwowano w wyniku współdziałania BAP (1,0 mg·dm⁻³) z TDZ (0,015 mg·dm⁻³) lub TDZ i 2iP (1,0 mg·dm⁻³). Współczynnik mnożenia pędów wynosił 2,5 pędów/eksplantat wierzchołkowy i 3,1 pędów/eksplantat bazalny.

Zastosowane cytokininy wpłynęły stymulująco na uaktywnianie pąków kątowych, tworzenie pędów przybyszowych, jak również wzrost wydłużeniowy pędu głównego, dający możliwość pozyskiwania sadzonek węzłowych.

APPLICATION OF TISSUE CULTURES
IN PROPAGATION OF *Dipladenia sanderi* HEMSL.

Agnieszka Wojtania¹, Eleonora Gabryszewska¹, Piotr Woźniak²

¹ Plant Tissue Culture Laboratory,

Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

² Horticultural Company „Vitrocitrus”, Łódź

Key words: *Dipladenia*, growth regulators, propagation, *in vitro*

Summary

The study aimed at testing the possibility of *in vitro* propagation of *Dipladenia sanderi* Hemsl. Shoot cultures were obtained from axillary buds on the MS medium supplemented with BAP (0.2 mg·dm⁻³) and IBA (0.01 mg·dm⁻³). A comparison of cytokinin activity showed that the best shoot proliferation was obtained on the medium containing BAP (1.0 mg·dm⁻³) together with TDZ (0.015 mg·dm⁻³) or with TDZ (0.015 mg·dm⁻³) and 2iP (1.0 mg·dm⁻³). The multiplication rate was 2.5 shoots/ apical explant and 3.1 shoots/ basal explant. The cytokinins used stimulated the axillary and adventitious shoots formation as well as the elongation of shoots.

Mgr Agnieszka **Wojtania**
Pracownia Kultur Tkankowych
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: awojtan@insad.pl