



Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

Krzysztof Nowak

**Zastosowanie pożywek płynnych w kulturach *in vitro* lili złotogłów
(*Lilium martagon* L.)**

praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. inż. Anny Kapczyńskiej prof. URK
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej

Kraków, styczeń 2022 r.

mgr inż. Krzysztof Nowak

/ Imię i nazwisko autora pracy /

dr hab. inż. Anna Kapczyńska prof. URK

/ Imię i nazwisko promotora pracy /

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

/ Wydział - kierunek studiów /

Katedra Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej

/ Katedra / Instytut /

doktor w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

/ Nadawany tytuł /

Tytuł pracy w języku
polskim

Zastosowanie pożywek płynnych w kulturach *in vitro* lili złotogłów (*Lilium martagon* L.)

Słowa kluczowe
/maksymalnie 5 słów /

Lilium martagon, pożywka płynna, rozmnażanie

Streszczenie pracy
/ maksymalnie 1200 znaków /

Celem badań było opracowanie wydajnej metody rozmnażania lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) z wykorzystaniem techniki *in vitro* w pożywkach płynnych. Do zapoczątkowania kultur *in vitro* użyto nasion. Z otrzymanych siewek wyodrębniono cebule oraz korzenie, na których indukowano organogenezę przybyszową. Proces ten badano w 16 pożywkach płynnych różniących się zawartością sacharozy (3 i 6%), składników mineralnych (50 i 100% MS) oraz regulatorów wzrostu (0-0,54 μ M NAA, 0-5 μ M BA), w 16-to tygodniowym cyklu, z wymianą pożywek co 2 tygodnie. Formowanie cebul przybyszowych, korzeni i kalusa obserwowano na łuskach cebulowych, korzenie nie regenerowały. Zastosowanie pożywki płynnej czterokrotnie zwiększyło wydajność formowania cebul przybyszowych. Największą ich liczbę (48 sztuk z eksplantatu) otrzymano na pożywce płynnej 50% MS, z 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu. Dalszy wzrost cebul przebiegał intensywniej w pożywce płynnej (50% MS, 6% sacharozy). Uzyskane w doświadczeniu cebule zaaklimatyzowały się w 80%, rozwijając korzenie lub korzenie i liście. Cebule chłodzone przed aklimatyzacją w 3°C przez sześć tygodni częściej rozwijały liście w porównaniu do cebul niechłodzonych. Pożywka płynna stosowana w ostatnim etapie wzrostu *in vitro* ograniczała rozwój liści podczas aklimatyzacji. Uzyskane regeneranty lili nie wykazały zmian w zawartości DNA w jądrach komórkowych.

Tytuł pracy w języku
angielskim

The use of liquid media in *in vitro* cultures of martagon lily (*Lilium martagon* L.)

Słowa kluczowe
/maksymalnie 5 słów /

Lilium martagon, liquid medium, propagation

Streszczenie pracy
/ maksymalnie 1200 znaków /

The aim of the research was to develop an efficient propagation method of martagon lily (*Lilium martagon* L.) with the use of *in vitro* technique in liquid media. Seeds were used to initiate the cultures. From the obtained seedlings, bulbs and roots were isolated, on which adventitious organogenesis was induced. This process was tested in 16 liquid media differing in the content of sucrose (3 and 6%), minerals (50 and 100% MS) and growth regulators (0-0.54 μ M NAA, 0-5 μ M BA), in 16 weekly cycle, with replacement of the media every 2 weeks. The formation of adventitious bulbs, roots and callus was observed on the bulb scales, the roots did not regenerate. The application of the liquid medium increased the efficiency of forming adventitious bulbs four times. The greatest number of them (48 per the explant) was obtained on 50% MS liquid medium, with 3% sucrose, without growth regulators. The further growth of the bulbs was more intensive in the liquid media (50% MS, 6% sucrose). The bulbs obtained in the experiment acclimatized in 80%, developing the roots or roots and leaves. Bulbs chilled before acclimatization at 3°C for six weeks developed leaves more often than non-chilled bulbs. The liquid medium used in the last stage of *in vitro* growth limited the development of leaves during acclimatization. The obtained lily regenerants showed no changes in the nuclear DNA content.

/ Podpis promotora pracy /

Spis treści

1. Wstęp	5
2. Przegląd literatury	6
2.1. Systematyka rodzaju <i>Lilium</i>	6
2.2. Lilia złotogłów – występowanie, opis morfologiczny i cykl rozwojowy	6
2.3. Rozmnażanie lili metodami tradycyjnymi	9
2.4. Rozmnażanie lili z wykorzystaniem technik <i>in vitro</i>	11
2.4.1. Przygotowanie eksplantatu i dezynfekcja	11
2.4.2. Rodzaj eksplantatu i kierunek rozwoju	12
2.4.3. Pożywka	23
2.4.4. Warunki zewnętrzne kultur	28
2.4.5. Wydajność kultur	28
2.4.6. Kultury lili w pożywkach płynnych.....	32
2.4.7. Aklimatyzacja i dalszy wzrost lili	38
2.4.8. Ploidalność komórek lili w warunkach <i>in vitro</i>	39
3. Skrótly stosowane w pracy	39
4. Cel pracy	40
5. Materiał i metody.....	41
5.1. Materiał roślinny	41
5.2. Inicjacja kultur <i>in vitro</i> - wysiew nasion lili złotogłów	43
5.3. Indukcja organogenezy na fragmentach siewek	44
5.3.1. Obserwacje morfometryczne	45
5.3.2. Badania histologiczne.....	45
5.4. Wzrost cebul przybyszowych	46
5.4.1. Wzrost cebul w zależności od stanu skupienia pożywki	46
5.4.2. Wzrost cebul w zależności od składników pożywki płynnej.....	46

5.5. Aklimatyzacja cebul.....	47
5.5.1. Wpływ chłodzenia cebul na aklimatyzację.....	47
5.5.2. Wpływ stanu skupienia pożywki na aklimatyzację chłodzonych cebul	48
5.6. Analiza statystyczna.....	48
5.7. Ocena ploidalności regenerantów	48
6. Wyniki	49
6.1. Inicjacja kultur – wysiew nasion lili złotogłów	49
6.2. Organogeneza przybyszowa na fragmentach łusek cebulowych.....	50
6.2.1. Wpływ stanu skupienia pożywki oraz poziomu sacharozy w pożywce na formowanie organów przybyszowych.....	51
6.2.2. Wpływ pożywek płynnych na formowanie organów przybyszowych	53
6.3. Wzrost cebul.....	67
6.3.1. Wzrostu cebul na pożywce płynnej i zestalonej agarem.....	67
6.3.2. Wzrost cebul w wybranych pożywkach płynnych.....	77
6.4. Aklimatyzacja cebul lili złotogłów	81
6.4.1. Wpływ chłodzenia na aklimatyzację cebul lili złotogłów uzyskanych na czterech pożywkach płynnych	81
6.4.2. Aklimatyzacja chłodzonych cebul lili złotogłów uzyskanych z pożywek wzrostowych płynnych i zestalonych	84
6.5. Ocena ploidalności	86
7. Dyskusja.....	87
8. Wnioski.....	93
9. Spis literatury.....	96

1. Wstęp

Lilia złotogłów (*Lilium martagon* L.) w Polsce znana i wykorzystywana jest od bardzo dawna, jej kwiaty i cebule używane były w medycynie ludowej oraz ze względu na bardzo atrakcyjny wygląd do celów dekoracyjnych. Obecnie jest to jedno z zagrożeń dla tego gatunku. Kolejnym jest presja wywołana zmianami w środowisku będącymi efektem działalności człowieka, dlatego roślina ta została objęta całkowitą ochroną gatunkową [Piękoś-Mirkowa i Mirek 2003, Pindel 2002a, b]. Pomimo dużej atrakcyjności i niewątpliwych walorów dekoracyjnych oraz przystosowania do warunków klimatycznych naszego kraju nie jest rośliną oferowaną w handlu. Jednym z powodów jest niedopracowana technologia intensywnego rozmnażania tej rośliny. Metody tradycyjne, jak wysiew nasion (tania, wydajna metoda ale wymagająca 5-6 lat uprawy, a także powodująca duży rozrzut cech), czy sadzonki z łusek cebulowych (wymaga 3-4 lat uprawy, o niskiej wydajności 2-3 cebule przybyszowe z jednej łuski), wobec wymagań stawianych obecnie producentom roślin są mało efektywne. Dlatego istnieje potrzeba opracowania szybkiej i wydajnej metody rozmnażania zapewniającej jednocześnie wysoką jakość i powtarzalność cech uzyskanego materiału roślinnego. Wysoką wydajność rozmnażania wielu gatunków roślin uzyskano stosując mikrorozmnażanie *in vitro*. Nieliczne badania dotyczące mikrorozmnażania lilii złotogłów dotyczą kultur prowadzonych na pożywkach zestalonych agarem [Rybczyński i Gmolińska 1989, Kędra i Bach 2005, Skorić i in. 2012]. Dotychczas opublikowane wyniki badań wskazują, że do formowania organów przybyszowych u lilii lepiej nadają się pożywki stałe [Paek i in. 2005, Saifullah i in. 2010], a dalszy wzrost regenerantów może być efektywniejszy w kulturach płynnych [Paek i in. 2005, Lian i in. 2003a]. Oprócz znaczącego zwiększenia wydajności rozmnażania roślin w *in vitro* konieczne jest też ograniczenie kosztów produkcji roślin. Można to osiągnąć poprzez zwiększenie skali i automatyzację procesu produkcji. Taką możliwość dają pożywki płynne w połączeniu z systemami okresowo-zalewowymi oraz różnymi typami bioreaktorów. Obecnie lilie należą do najważniejszych roślin cebulowych produkowanych na skalę przemysłową dzięki wykorzystaniu techniki *in vitro*. Połączenie korzyści masowej produkcji i szybkiej regeneracji jednolitego materiału roślinnego w *in vitro* jest koniecznością wynikającą z potrzeby rozmnażania licznych nowych taksonów lilii, wprowadzanych każdego roku na rynek. Jednakże, aby kultury *in vitro* stały się komercyjnym systemem produkcyjnym, należy przebadać i ulepszyć protokoły rozmnażania przed wprowadzeniem automatyzacji i dobraniem odpowiednich typów bioreaktora [Ruffoni i in. 2011]. Wyniki badań z ostatnich lat potwierdzają, że rozmnażanie lilii w kulturach płynnych zapewnia skrócenie czasu namnażania i obniżenie kosztów produkcji roślin, szczególnie, gdy do procesu produkcyjnego wprowadzane są bioreaktory i procedury automatyzacji [Bakhshaie i in. 2016].

Celem podjętych badań było opracowanie wydajnej metody namnażania cebul przybyszowych lilii złotogłów w pożywkach płynnych w kulturze *in vitro*, z zamysłem zastosowania stworzonej procedury w przyszłości w kulturach bioreaktorowych. W efekcie badania przyczynią się do popularyzacji lilii złotogłów w ogrodnictwie ozdobnym oraz do ochrony tego zagrożonego gatunku.

2. Przegląd literatury

2.1. Systematyka rodzaju *Lilium*

Rodzaj lilia (*Lilium*) należy do klasy jednoliściennych (*Liliopsida* = *Monocotyledones*), podklasy liliowych (*Liliidae*), rzędu liliowców (*Liliales*) i rodziny liliowatych (*Liliaceae*) [Szweykowska i Szweykowski 1999].

Lilie są szeroko rozprzestrzenione na półkuli północnej [Grabowska i in. 1987] pomiędzy 11 a 68 stopniem szerokości geograficznej północnej [Mynett 1993b]. Rodzaj ten obejmuje od 100 [De Hertogh i Le Nard 1993] do około 120 gatunków [Mynett 1993b].

Ogromna liczba odmian lilii i potrzeba ich usystematyzowania doprowadziła do powstania klasyfikacji ogrodniczej umożliwiającej katalogowanie odmian, mieszańców i gatunków. Wyodrębniono dziewięć następujących grup lilii ogrodowych:

1. mieszańce azjatyckie
2. mieszańce martagon
3. mieszańce candidum
4. mieszańce amerykańskie
5. mieszańce longiflorum
6. mieszańce trąbkowe
7. mieszańce orientalne
8. mieszańce niezaszeregowane do żadnej z powyższych grup
9. gatunki i ich odmiany botaniczne niezaszeregowane do żadnej z powyższych grup [Mynett 1993b].

2.2. Lilia złotogłów – występowanie, opis morfologiczny i cykl rozwojowy

Lilia złotogłów występuje na stanowiskach naturalnych od Portugalii poprzez całą Europę, za wyjątkiem państw skandynawskich, do Mongolii i Jeziora Bajkał w Azji i Syberię. W Polsce spotyka się ją niemal na całym obszarze kraju za wyjątkiem północnego i północno-zachodniego rejonu oraz kilku miejsc w głębi kraju. Występuje w lasach, zaroślach kosówki, ziołoroślach i na zrębach. Rośnie na różnych typach gleb wapnicowych i brunatnoziemnych oraz na słabo zbielicowanych glebach należących do klasy gleb bielicoziemnych. Są to zazwyczaj gleby suche lub świeże (rzadziej wilgotne), o zróżnicowanym składzie granulometrycznym (od piasków luźnych po glinę ciężką) i odczynie pH od 4,3 do 7,7 oraz różnej zawartości składników pokarmowych [Hellwig 1975, Mynett 1993a, Piękoś-Mirkowa i Mirek 2003, Zajac i Zajac 2001]. Szeroki zasięg geograficznego występowania, a co za tym idzie bogactwo siedlisk, spowodowało dużą zmienność gatunku. Według Mynetta istnieje siedem odmian botanicznych, są to:

L. martagon var. *albiflorum* – o działkach okwiatu białych z jasnoczerwonym nakrapianiem;

L. martagon var. *album* – o kwiatach czysto białych;

L. martagon var. *cattaniae* (syn. *L. martagon* var. *dalmaticum*) - o kwiatach błyszczących, ciemnonilaróżowych bez nakrapiania, występuje głównie w Dalmacji;

L. martagon var. *flavidum* – o kwiatach żółtopomarańczowych lub brązowych z ciemniejszym nakrapianiem, 6-7 cm średnicy;

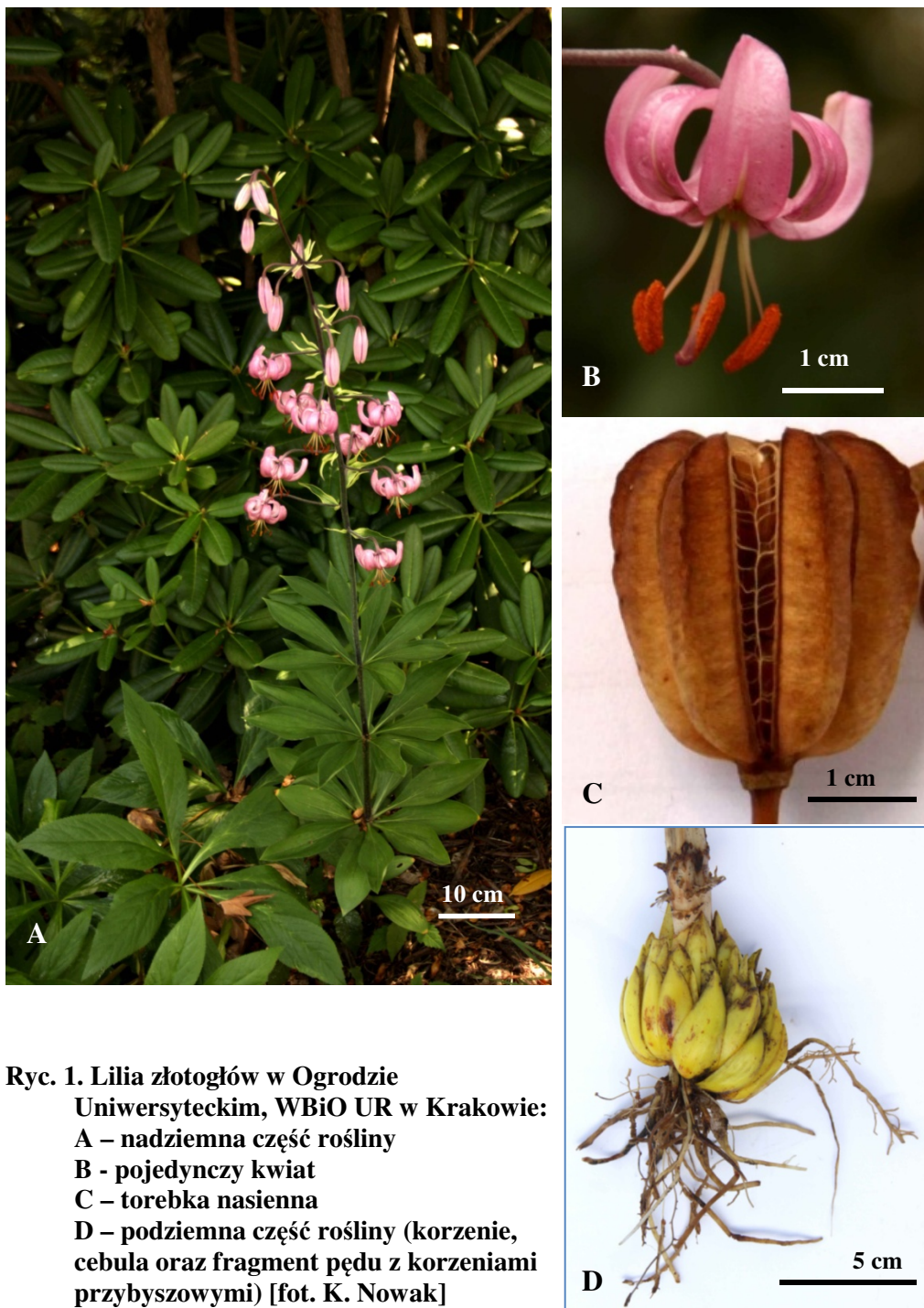
L. martagon var. *hirsutum* – z pędami, spodnią stroną liści i działek okwiatu wełnisto owłosionymi, występuje głównie w Południowych Alpach;

L. martagon var. *pilosiusculum* – całe rośliny silnie owłosione i wyraźnie wyższe, nawet do 2 m wysokości, występują na Uralu;

L. martagon var. *daugawa* – o kwiatach jasnopomarańczowo czerwonych z ciemniejszym kropkowaniem, rośliny silniejsze we wzroście, występują nad rzeką Dźwiną na Łotwie [Mynett 1993a].

W Polsce lilia złotogłów objęta jest całkowitą prawną ochroną gatunkową. Pomimo tego jej zasoby zmniejszają się z powodu redukcji zalesienia naszego kraju, nieodpowiedniej gospodarki leśnej (zmiana siedlisk spowodowana przez wprowadzanie drzewostanów szpilkowych w miejsce liściastych), zbierania kwiatów czy wykopywania całych roślin. Zanikaniu naturalnych stanowisk sprzyjają także naturalne zjawiska przyrodnicze np. podtapianie naturalnych siedlisk, zjadanie przez zwierzynę leśną. W celu zachowania zasobów gatunku prowadzone są prace monitorujące stan wybranych populacji tej lilii, ochroną prawną obejmowane są nowe siedliska [Kolon i in. 1994, Polakowski 1995, Pawlikowski 1999, Michalik i Michalik 2001, Pindel 2002a, Pindel 2002b, Piękoś-Mirkowa i Mirek 2003, Mencil 2003], a także prowadzone są prace nad zachowaniem gatunku i jego bioróżnorodności [Urbaniec-Kiepusa i Bach 2014].

W Polsce lilia złotogłów znana jest pod wieloma nazwami dawnymi i ludowymi: bociec, króllilia, lilia oranżeryjna, lilia polna, lilia zawojek, lilia maśleszka, maleszka, maslek, maszlosz, maśleska, maśleszka, maślosz, terk, turek, zawojec, zawojek, zawojek król lilija, zawojnik plamisty, złotogłów, złotogłów. Nazwa rodzajowa znana jest od czasów starożytnych: (gr. *leirion* = łac. *lilium* = lilia) gr *leirios* = delikatny; łac. *martagon* = 'rodzaj cebuli' lub w ujęciu alchemików 'roślina przypisana planecie Mars'. Liczba chromosomów u tego gatunku to $2n = 24$. Dawniej była stosowana w medycynie ludowej, roślina lecznicza, trująca. Wykorzystywana w medycynie między innymi do leczenia chorób wątroby, jako środek przeciwbólowy i uspokajający, przeciw rakowy, w kosmetyce do rozjaśniania cery, roślina jadalna [Moraczewski i in. 2000, Pieroni i in. 2006, Bokov i in. 2019].



Ryc. 1. Lilia złotogłów w Ogrodzie Uniwersyteckim, WBiO UR w Krakowie:
A – nadziemna część rośliny
B - pojedynczy kwiat
C – torebka nasienna
D – podziemna część rośliny (korzenie, cebula oraz fragment pędu z korzeniami przybyszowymi) [fot. K. Nowak]

Lilia złotogłów to okazała bylina cebulowa dorastająca do 150 cm wysokości. Łodygę ma sztywną, ulistnioną, liście podłużnie jajowate 8-12 cm długości, 2-5 cm szerokości, siedzące z 7-11 równoległe ułożonymi nerwami, które ułożone są skrętolegle na pędzie, a w jego środkowej części w okółkach. Kwiaty zebrane są w groniasty kwiatostan, zazwyczaj z 3-12 kwiatów (u odmian nawet do 50) (ryc. 1A). Pojedynczy kwiat, o intensywnym zapachu wydzielanym wieczorem, wyrasta na przegiętej łukowato ku dołowi szypułce, złożony jest z 6 mięsistych działek okwiatu

silnie odgiętych ku górze, najczęściej żółtobrunatnych lub różowych z ciemnymi plamkami, średnica kwiatu to 3-5 cm, pylniki brązowo-żółtej barwy, znamiona przeważnie ciemnoczerwone (ryc. 1B). Torebki nasienne kuliste do wydłużonych, trzykomorowe (ryc. 1C), pękające podłużnie, nasiona jasnobrązowe, oskrzydłone i silnie spłaszczone (ryc. 2). Cebula otwarta, wydłużona, złożona z licznych ostro zakończonych złocistożółtych łusek osadzonych na piętce w okółkach. Korzenie wyrastające z piętki są dwójakiego rodzaju: korzenie kurczliwe i właściwe. Dodatkowe korzenie wytwarzane są na podziemnej części pędu wyrastającego ze szczytu cebuli [Piękoś-Mirkowa i Mirek 2003, Mynett 1993a, Mynett 1993b, De Hertogh i Le Nard 1993, Mencil 2003, Polakowski 1995] (ryc. 1D).

W naszych warunkach klimatycznych lilia złotogłów rozpoczyna wegetację wkrótce po rozmarznięciu gleby w lutym lub marcu. Nad powierzchnię gleby wyrasta pęd i rozwijają się liście, na podziemnej części pędu wyrastającego ze szczytu cebuli rozwijają się dodatkowe korzenie. Wzrost części nadziemnej rośliny odbywa się kosztem materiałów zapasowych zgromadzonych w cebuli do momentu rozwinięcia się liści. Następnie rozwija się kwiatostan na szczycie pędu. Kwitnienie przypada na przełom czerwca i lipca. Kwiaty zapylane są przez owady – motyle nocne, głównie fruczaka gołąbka, a także przez gatunki z rodzajów *Pieris*, *Gonepteryx*, *Maniola*, *Pyronia*, *Sphinx*. Przy braku zapylenia przez owady może dojść do samozapylenia. Po zapyleniu następuje rozwój nasion, równocześnie w cebuli gromadzone są materiały zapasowe. Po dojrzaniu nasion z końcem sierpnia, początkiem września torebki pękają uwalniając nasiona, które są roznoszone przez wiatr. Zaczątki pędu, liści i kwiatów na rok następny tworzą się jesienią [Szafer 1969, De Hertogh i Le Nard 1993, Mencil 2003, Corbera i in. 2018].

Cykl życia rośliny obejmuje następujące stadia rozwojowe:

- dojrzałe nasiona w spoczynku;
- nasiona kiełkujące hipogeicznie (etap trwający około 3 miesięcy);
- stadium juwenilne, w którym młode rośliny jeszcze nie kwitną (trwa od 1 do 3 lat);
- stadium generatywne rozpoczynające się pierwszym kwitnieniem od 4 roku życia rośliny [Jańczyk-Węglarska i Węglarski 1992].

2.3. Rozmnażanie lili metodami tradycyjnymi

Wszystkie gatunki lili tworzące nasiona, a także odmiany ogrodowe mające w nazwie słowo strain można rozmnażać generatywnie [Grabowska i in. 1987]. Nasiona lili różnią się zarówno sposobem jak i szybkością kiełkowania. Takie gatunki jak *L. concolor*, *L. longiflorum*, *L. regale*, *L. tigrinum*, *L. davidii*, *L. amabile*, *L. pumilum*, charakteryzują się epigeicznym typem kiełkowania, co oznacza, że liście wyrasta nad powierzchnię ziemi. Nasiona tych lili kiełkują szybko, w ciągu 2-3 tygodni od wysiewu. Do tej samej grupy należy większość mieszańców azjatyckich i trąbkowych. Istnieje też nieduża grupa lili (*L. candidum*, *L. chalcedonicum*, *L. henryi*, *L. sargentii*

i ich mieszańce), które kiełkują nadziemnie, ale proces ten trwa u nich 4-5 miesięcy, niekiedy nawet do roku. Drugi typ kiełkowania nasion lili to kiełkowanie hipogeiczne. W tym sposobie kiełkowania z nasiona najpierw wyrasta korzeń zarodkowy, następnie na nim formuje się mała cebula, a z niej po jakimś czasie wyrasta na powierzchnię ziemi pierwszy prawdziwy liść. Również przy tym sposobie kiełkowania wyróżnia się gatunki i ich mieszańce, które kiełkują szybko, bo po 5-6 tygodniach (*L. dauricum*, *L. parryi*, *L. speciosum*) oraz gatunki i ich mieszańce, które kiełkują powoli. Ich pierwszy liść ukazuje się na powierzchni ziemi dopiero po kilku miesiącach. Do tej grupy należą: *L. auratum*, *L. bulbiferum*, *L. hansonii*, *L. japonicum*, *L. rubellum*, *L. martagon*. Dla przyspieszenia kiełkowania nasion tej grupy lili stosuje się metodę przedsewnego traktowania zmienną temperaturą. Nasiona miesza się z podłożem i wsypuje do worka foliowego, który umieszcza się na 3 miesiące w temperaturze 22-25°C następnie przenosi na kolejne 3 miesiące do temperatury 1-3°C. Na początku w wyższej temperaturze nasiona kiełkują i powstają małe cebule, w drugim etapie następuje jarowizacja tych cebul. Po okresie 6 miesięcznej inkubacji w worku uzyskane cebule wysiewa się wraz z podłożem do inspektu lub na parapet w szklarni. Lilia złotogłów rozmnażana tą metodą potrzebuje 3-5 lat uprawy do pierwszego kwitnienia. Gatunki niewytwarzające nasion, a także większość mieszańców i odmian, które nie przekazują przez nasiona swoich cech potomstwu, rozmnaża się wegetatywnie. Do tego celu wykorzystuje się na skalę amatorską cebule przybyszowe pozyskiwane z różnych części roślin – cebule przybyszowe (większość gatunków i odmian lili), cebule powstających na pędzie w kątach liści (*L. bulbiferum*, *L. tigrinum*), cebule powstające na podziemnej części pędu (większość odmian mieszańców azjatyckich i trąbkowych), oraz cebule tworzące się na podziemnych stolonach (większość gatunków amerykańskich i *L. nepalense*) [Grabowska, i in. 1987, Mynett 1990, De Hertogh i Le Nard 1993, Mynett 1993a, Bach i Sochacki 2012]. Oprócz tych naturalnych sposobów prostej reprodukcji lili, znanych jest jeszcze wiele metod ich wegetatywnego rozmnażania, stosowanych amatorsko. Do najbardziej znanych należą: kopczykowanie pędów na wysokość 20 cm, przyginanie pędów do ziemi, wrywanie pędów i układanie ich w płytkie bruzdy, w wilgotnym piasku. Na tak traktowanych pędach powstają cebule przybyszowe. Można również ukorzeniać odcinki pędów *L. longiflorum*, stymulować powstawanie cebul na pędzie poprzez usunięcie wszystkich pąków kwiatowych możliwie w jak najwcześniejszym stadium ich rozwoju. U niektórych lili można ukorzeniać liście, wtedy u nasady liścia powstaje mała cebula. Tą metodą można rozmnażać *L. auratum*, *L. japonicum*, *L. longiflorum* 'Nellie White'. Powszechnie stosowaną metodą rozmnażania wegetatywnego wszystkich gatunków i odmian lili jest otrzymywanie cebul przybyszowych z łusek cebulowych. Jest to stosunkowo prosty sposób reprodukcji. Z jednej łuski otrzymuje się przeciętnie 3 cebule potomne, a z jednej dużej cebuli matecznej można odłamać średnio 30 łusek. Najbardziej wartościowe są duże zewnętrzne łuski, na których powstaje więcej cebul przybyszowych, niż na mniejszych wewnętrznych łuskach. Odłamane łuski zabezpiecza się fungicydem, a następnie miesza z wilgotnym podłożem i umieszcza w plastikowym worku lub skrzynce. Tak przygotowane łuski przechowuje się przez 2-3 miesiące w temperaturze około 20°C. W tym czasie na łuskach formowane są cebule

przybyszowe. W ciągu pierwszych 5-6 dni od oddzielenia łuski następuje zabliznienie rany. Następnie między 5 a 10 dniem inicjowane są pąki przybyszowe. Od 7 do 14 dnia merystem przybyszowy odróżnicowuje zawiązek pierwszej łuski, od 12 dnia inicjowane są kolejne łuski i następuje rozwój cebuli przybyszowej. W dalszym etapie rozwija się system korzeniowy. Po zakończeniu rozwoju cebul przybyszowych na sadzonkach łuskowych pojemniki z materiałem roślinnym traktuje się temperaturą 2-4°C przez 2-3 miesiące. Proces ukorzeniania łusek najlepiej przeprowadzić w okresie jesienno-zimowym, tak, aby wiosną po okresie chłodzenia łuski cebulowe wraz z cebulami umieścić na zagonie przykrywając je około 5 cm warstwą podłoża. Po 2-3 tygodniach rozwijają się pierwsze liście [Grabowska i in. 1987, Mynett 1990, De Hertogh i Le Nard 1993, Marinangeli i in. 2003, Bach i Sochacki 2012].

2.4. Rozmnażanie lili z wykorzystaniem technik *in vitro*

2.4.1. Przygotowanie eksplantatu i dezynfekcja

Technika *in vitro* gwarantuje wysoką wydajność rozmnażanie roślin [Mehrotra i in. 2007]. Tym sposobem rośliny rozmnaża się z fragmentów rośliny matecznej. Pierwszym krokiem jest pobranie fragmentu rośliny, który będzie stanowił eksplantat pierwotny. Następnym jest przygotowanie tego eksplantatu do założenia kultury. Przygotowanie eksplantatu rozpoczyna się od pobrania fragmentu rośliny, jego oczyszczenia i poddania powierzchniowej dezynfekcji. Wykonuje się ją za pomocą roztworów różnych związków chemicznych [Skucińska 2001]. Skuteczność dezynfekcji eksplantatów lili zależy od rodzaju środka chemicznego, jego koncentracji w roztworze odkażającym, czasu oddziaływania oraz części rośliny, z której pobrano eksplantat. Najczęściej stosowane do dezynfekcji eksplantatów lili związki chemiczne to podchloryn sodu i chlorek rtęci. Stosowane bywają także chloramina i 2-fenoksyetanol. Stężenie substancji odkażającej w roztworze wynosiło dla: podchlorynu sodu od 0,5% [Yamagishi 1998] do 50% [Ault i Siqueira 2008], chlorku rtęci od 0,1% [Priyadarshi i Sen 1992, Aslam i in. 2013] do 1% [Lian i in. 2009], chloraminy od 3% [Rybczyński i Gmolińska 1989] do 7% [Kędra i Bach 2005], 2-fenoksyetanol 0,1% [Zhola i in. 1992]. Czas oddziaływania roztworem środka dezynfekcyjnego na eksplantaty lili wynosił od 2,5 minuty [Pandey i in. 2009] do 90 minut [Takayama i Misawa 1979]. Skuteczność dezynfekcji eksplantatów lili wyniosła od 50% [Langens-Gerrits i in. 1998] do 100% [Kędra i Bach 2005]. Zoptymalizowanie warunków dezynfekcji dla danego eksplantatu niejednokrotnie wymaga wprowadzenia modyfikacji do przyjętej metody. 30-minutowa dezynfekcja 1% roztworem podchlorynu sodu łusek cebulowych *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' pozwala uzyskać 50% efektywność dezynfekcji. Dodatkowa 1 godzinna kąpiel cebul przed dezynfekcją w wodzie o temperaturze 42-43°C zwiększa jej skuteczność do 90%. Kąpiel łusek w wodzie o temperaturze 45°C powodowała zmniejszenie współczynnika regeneracji [Langens-Gerrits i in. 1998]. Dezynfekując łuski cebulowe lili w 0,1% chlorku rtęci przez 7,5 minuty uzyskano dezynfekcję na poziomie 90,6%, z 97,3% przeżywalnością. Krótszy czas

dezynfekcji znacząco zmniejszył jej skuteczność a dłuższy, 10 minutowy, spowodował uszkodzenie 18,7% eksplantatów [Pandey i in. 2009]. Zastosowanie podwójnego odkażania nasion lili złotogłów w 7% roztworze chloraminy pozwoliło uzyskać 85-100% skuteczność dezynfekcji [Kędra i Bach 2005]. Na skuteczność dezynfekcji (12 minut w 0,1% chlorkiem rtęci) wpływa również umiejscowienie danej łuski w cebuli. U *L. regale* najmniej zakażeń (5,1%) uzyskano, gdy łuski pobrano z wewnętrznych części cebuli, a najwięcej (34,4%) z zewnętrznej części [Lian i in. 2009].

Po dezynfekcji eksplantaty umieszcza się w pożywce i rozpoczyna się kolejny etap - inicjacja. Na tym etapie eksplantaty ukierunkowywane są na jedną z dwóch dróg regeneracji: organogeneza bezpośrednia polegająca na pobudzeniu do regeneracji roślin potomnych (przybyszowych) bezpośrednio z eksplantatu pierwotnego lub pośrednia, w której eksplantat najpierw wytwarza kalus, a następnie z niego regenerowane są rośliny potomne. Ze względu na specyfikę mikrorozmnażania wybór fragmentu rośliny nadającego się do regeneracji w danych warunkach wymaga weryfikacji doświadczalnej [Skucińska 2001].

2.4.2. Rodzaj eksplantatu i kierunek rozwoju

Do inicjacji kultur tkankowych lili wykorzystywane są różne części roślin (tab. 1). Najczęściej są to łuski cebulowe posiadające naturalną zdolność do inicjacji i regeneracji roślin przybyszowych na drodze organogenezy bezpośredniej, korzysta się również z liści, pędów czy kwiatów. Badania porównawcze wykonane na różnych gatunkach i odmianach lili wykazały, że fragmenty łusek cebulowych regenerują większą liczbę cebul przybyszowych w porównaniu do fragmentów pędu, liści, załączni u *L. rhodopeum* [Stanilova i in. 1994], czy szypułki kwiatowej i działek okwiatu u *L. auratum* [Takayama i Misawa 1979]. Podobną liczbę cebul przybyszowych z łusek i pędów uzyskano u mieszańca orientального 'Casablanca', jednak uzyskane w ten sposób cebule różniły się wielkością. Zregenerowane na fragmentach pędów miały większą średnicę i wyższą świeżą masę [Han i in. 2004a]. Natomiast u odmian 'Alaska', 'Apeldoorn', 'Siberia' i 'Marco Polo' więcej cebul przybyszowych uzyskano z fragmentów korzeni w porównaniu do fragmentów łusek cebulowych, liści czy pędów (węzły i międzywęzła). Natomiast odmiana 'Beatrix' najliczniej regenerowała cebule przybyszowe z fragmentów pędów (międzywęzła) [Kapoor i in. 2008b]. Eksplantaty z fragmentów pędów zawierające węzły posłużyły do uzyskania cebul przybyszowych u odmiany 'Pollyanna' [Bacchetta i in. 2003]. Dobrym eksplantatem okazały się również wierzchołki pędów *L. japonicum* [Fukui i in. 1989]. Eksplantatów liściowych użyto do uzyskania cebul przybyszowych u *L. pumilum* [Jin i in. 2014]. Natomiast u *L. candidum* lepszym eksplantatem do inicjacji cebul okazały się łuski cebulowe regenerujące w 90% w porównaniu do liści (29,9%) czy kalusa (7,8%) [Saadon i Zaccai 2013].

Innym kierunkiem organogenezy bezpośredniej jest regeneracja pędów. Z fragmentów łusek cebulowych pędy regenerowano u *L. orientalis*, *L. longiflorum* 'White Fox' [Aslam i in. 2013], *L. longiflorum* [Le i in. 1999], 'Orange Pixie' [Misra i Datta 2001], *L. longiflorum* 'Georgia' [Han i in. 2004b], *L. michiganense* [Ault

i Siqueira 2008]. Regenerację pędów z eksplantatów liściowych jak i z łusek, uzyskano u *L. orientalis* (regenerowało odpowiednio 76% i 56,3% eksplantatów) [Liu i Yang 2012], *L. davidii* var. *unicolor*, *L. ×formolongi*, *L. longiflorum* × 'Triumphator' [Yin i in. 2013] 'Siberia', 'Elite', 'Pollyanna' [Bacchetta i in. 2003, Yin i in. 2013], 'Star Gazer' [Bacchetta i in. 2003], *L. longiflorum* 'Bright Tower' [Naing i in. 2014], *L. davidii* var. *unicolor* [LingFei i in. 2009]. Fragmentów pędów użyto u *L. regale* [Saifullah i in. 2010], *L. longiflorum* 'Bright Tower' [Naing i in. 2014]. Pędy przybyszowe uzyskano również z pąków kwiatowych (fragmentów zawierających dno kwiatowe) u *L. longiflorum* 'Nellie White' [Nhut i in. 2001a].

Inną drogą rozmnażania roślin w *in vitro* jest regeneracja pośrednia poprzez kalus, w kulturach lilii inicjowano go na różnych częściach roślin lilii. Zdolność do inicjacji kalusa z łusek cebulowych u różnych gatunków lilii testowali Godo i Mii [2001] uzyskując od 25% do 100% eksplantatów inicjujących kalus (tab. 1). Zróżnicowaną zdolność do inicjacji kalusa wykazano też porównując eksplantaty pobrane z różnych części jednej rośliny: *L. japonicum* – łuski cebulowe inicjowały kalus w 100%, liście w 43,6%, a siewki – w 6,7% [Morii i in. 2005], czy *L. leucanthum* u której łuski inicjowały kalus w 98,3%, liście w 79,6%, a ogonki liściowe w 80,0% [Tang i in. 2010].

Nie zawsze na wybranym fragmencie rośliny możliwe jest uzyskanie inicjacji pąków przybyszowych, np. u *L. longiflorum* 'Nellie White' nie uzyskano inicjacji z fragmentów pąka kwiatowego niezawierających dna kwiatowego [Nhut i in. 2001a]. Również na nitkach pręcików, pylnikach i liściach *L. auratum* [Takayama i Misawa 1979] oraz liściach *L. longiflorum* 'Snow Queen' [Bacchetta i in. 2003] nie udało się uzyskać inicjacji.

Inne cechy eksplantatów wpływające na ich przydatność do inicjacji i regeneracji to:

- **rodzaj pobranego fragmentu rośliny**

Zróżnicowaną zdolność do regeneracji w obrębie poszczególnych części roślin zaobserwowano badając mieszańce 'Gran Paradiso' i 'Sanciro' [Varshney i in. 2000] i *L. davidii* var. *unicolor* [Yang i In. 2021]. Najlepszą inicjację i regenerację uzyskano z fragmentu zawierającego podstawę łuski, a najmniejszą z jej części szczytowej.

Tabela 1. Eksplantat pierwotny oraz ukierunkowanie inicjacji u różnych gatunków i odmian lili

Genotyp	Eksplantat	Kierunek rozwoju		Literatura
		Organogeneza bezpośrednia oraz somatyczna embriogeneza	Kalus wydajność [%] w zależności od rodzaju eksplantatu	
<i>L. alexandrae</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. amabile</i>	łuski cebulowe		60	Godo i Mii [2001]
<i>L. auratum</i>	łuski cebulowe, liście		100 / 78,4	Mori i in. [2005]
	łuski cebulowe, wierzchołek pędu	cebule	- / 50	Takayama i Misawa [1979]
	łuski cebulowe	cebule, korzenie	-	Takayama i Misawa [1980]
	łuski cebulowe	cebule, korzenie	-	Takayama i Misawa [1983]
<i>L. auratum</i> var. <i>platyphyllum</i>	nasiona		6,7	Mori i in. [2005]
<i>L. bosniacum</i>	nasiona	cebule, korzenie		Karalija i in. [2013]
<i>L. canadense</i>	nasiona		0	Mori i in. [2005]
<i>L. candidum</i>	łuski cebulowe, liście, kalus	cebule		Saadon i Zaccai [2013]
<i>L. concolor</i>	nasiona		70,0	Mori i in. [2005]
<i>L. concolor</i> var. <i>coridion</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. concolor</i> var. <i>pulchellum</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. concolor</i> var. <i>sitricum</i>	łuski cebulowe		75	Godo i Mii [2001]
<i>L. dauricum</i>	nasiona		53,3	Mori i in. [2005]
<i>L. davidii</i>	łuski cebulowe		80	Godo i Mii [2001]
<i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
	liście	pędy	-	Yin i in. [2013]
	łuski cebulowe	pędy		LingFei i in. [2009]
	łuski cebulowe	pędy		Yang i in. [2021]
<i>L. davidii</i> var. <i>willmottiae</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. ×elegance</i> 'Beninomai'	merystem wierzchołkowy pędu	cebule, zarodki somatyczne	+	Sugiura i in. [2000]

<i>L. xelegance</i> 'Koshinobeni'	merystem wierzchołkowy pędu	cebule, zarodki somatyczne	+	Sugiura i in. [2000]
<i>L. xformolongi</i>	zawiesina komórkowa	pędy	-	Godo i in. [1998]
	liście	pędy	-	Yin i in. [2013]
<i>L. xformolongi</i> R13	merystem wierzchołkowy pędu		80	Godo i in. [1996]
<i>L. xformolongi</i> 'White Aga'	łuski cebulowe	cebule	-	Ishimori i in. [2007]
	łuski cebulowe, liście		100 / 88,3	Mori i in. [2005]
<i>L. formolongo</i>	nasiona		+	Saetiew i Umamanit [2015]
<i>L. formosanum</i>	łuski cebulowe, liście, nasiona		67,8 / 100 / 100	Mori i in. [2005]
<i>L. formosanum</i> var. <i>pricei</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. henryi</i>	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyt [1997]
	nasiona		53,3	Mori i in. [2005]
<i>L. japonicum</i>	merystem wierzchołkowy pędu	cebule	20,0	Fukui i in. [1989]
	nasiona		-	Fukui i in. [1989]
	zarodki z nasion	cebule	-	Fukui i in. [1989]
	łuski cebulowe, liście, nasiona		100 / 43,6 / 6,7	Mori i in. [2005]
<i>L. lancifolium</i>	łuski cebulowe		83	Mori i in. [2005]
	łuski cebulowe	cebule	15	Bahr i Compton [2004]
<i>L. lancifolium</i> 'Orange Star'	łuski cebulowe	cebule	34	Bahr i Compton [2004]
<i>L. lancifolium</i> var. <i>flaviflorum</i>	łuski cebulowe		88,9	Godo i Mii [2001]
<i>L. lankogense</i>	łuski cebulowe		66,7	Godo i Mii [2001]
<i>L. ledebourii</i>	łuski cebulowe	cebule	-	Azadi i Khosh-Khui [2007]
	łuski cebulowe	cebule	-	Bakhshaie i in. [2010a]
	łuski cebulowe		+	Bakhshaie i in. [2010b]
	łuski cebulowe	cebule	44,4	Mirmasoumi i in. [2013]
	łuski cebulowe		94	Mirmasoumi i Bakhshaie [2015]
<i>L. ledebourii</i>	cebule	cebule, korzenie	-	Ghanbari i in. [2017]
<i>L. leucanthum</i>	liście	cebule	łuski ¹ – 98,3; liście ¹ – 79,6; ogonki li. ¹ – 80,0	Tang i in. [2010]

<i>L. leucanthum</i> var. <i>centifolium</i>	łuski cebulowe	cebule, korzenie	100	Godó i Mii [2001]
<i>L. longiflorum</i>	cebule	pędy	-	Le i in. [1999]
	łuski cebulowe	cebule		Tanimoto i Matsubara [1995]
	merystem wierzchołkowy pędu	pędy, cebule	-	Nhut [1998]
	łuski cebulowe	cebule	+	Priyadarshi i Sen [1992]
	łuski cebulowe, liście	cebule	-	Khan i in. [2015]
<i>L. longiflorum</i> 'Ace'	łuski cebulowe	cebule		Higgins i Stimart [1990]
<i>L. longiflorum</i> 'Bright Tower'	liście, pędy	pędy	(pędy ¹)+	Naing i in. [2014]
<i>L. longiflorum</i> 'Easter Lily'	kalus	zarodki somatyczne	-	Nhut i in. [2006a]
<i>L. longiflorum</i> 'Gleria'	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
<i>L. longiflorum</i> 'Gleria'	pąki i części kwiatów	cebule	+	Tribulato i in. [1997a]
				Tribulato i in. [1997b]
<i>L. longiflorum</i> 'Gorgia'	łuski cebulowe	pędy	-	Han i in. [2004b]
	łuski cebulowe, liście, nitki pręcików		100 / 100 / 98,6	Mori i in. [2005]
<i>L. longiflorum</i> 'Nellie White'	pąki, części kwiatów	pędy, korzenie	-	Nhut i in. [2001a]
	pęd	pędy, cebule, korzenie, zarodki somatyczne	-	Nhut i in. [2001b]
	dno kwiatowe	pędy	-	Nhut [2003]
<i>L. longiflorum</i> 'Pollyanna'	cebule	cebule, korzenie, liście	-	Thakur i in. [2006]
<i>L. longiflorum</i> 'Snow Queen'	pęd		-	Bacchetta i in. [2003]
	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
	łuski cebulowe	cebule	-	Langens-Gerrits i in. [2003]
<i>L. longiflorum</i> 'Snow Queen'	łuski cebulowe	cebule	-	Jásik i De Klerk [2006]
	pąki, części kwiatów	cebule, korzenie	+	Tribulato i in. [1997a]
	pąki, części kwiatów	cebule, korzenie	+	Tribulato i in. [1997b]
<i>L. longiflorum</i> 'Wase Teppo Yuri'	nitki pręcików		91,6	Arzate-Fernández i in. [1997]

<i>L. longiflorum</i> 'White American'	pąki i części kwiatów	cebule, korzenie	+	Tribulato i in. [1997a]
	pąki i części kwiatów	cebule, korzenie	+	Tribulato i in. [1997b]
<i>L. longiflorum</i> 'White Fox'	łuski cebulowe	pędy, korzenie	-	Aslam i in. [2013]
<i>L. longiflorum</i> × 'Triumphator'	liście	pędy	-	Yin i in. [2013]
<i>L. maculatum</i>	łuski cebulowe		62,5	Godo i Mii [2001]
<i>L. maculatum</i> 'White Lancer'	łuski cebulowe, liście		100 / 83,2	Mori i in. [2005]
<i>L. mackliniae</i>	łuski cebulowe	pędy, liście	83,3	Sahoo i in. [2018]
<i>L. martagon</i>	nasiona		33,3	Mori i in. [2005]
	łuski cebulowe		25	Godo i Mii [2001]
	nasiona	cebule, korzenie	100	Kędra i Bach [2005]
	łuski cebulowe	cebule	-	Rybczyński i Gmolińska [1989]
<i>L. martagon</i> var. <i>cattaniae</i> (<i>L. cattaniae</i>)	nasiona	cebule, korzenie	-	Karalija i in. [2013]
	nasiona	cebule, korzenie	-	Skorić i in. [2012]
<i>L. maximowiczii</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. michiganense</i>	nasiona	pędy, korzenie	98	Ault i Siqueira [2008]
	nasiona		0	Mori i in. [2005]
<i>L. monadelphum</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
	nasiona		18,3	Mori i in. [2005]
<i>L. nepalense</i>	łuski cebulowe	pędy	-	Wawrosch i in. [2001]
<i>L. nobilissimum</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
	liście		58,6	Mori i in. [2005]
<i>L. orientalis</i>	łuski cebulowe	cebule	-	Liu i Yang [2012]
	łuski cebulowe, liście	cebule	-	Khan i in. [2015]
<i>L. oxypetalum</i>	łuski cebulowe, kalus	cebule	-	Joshi i Dhar [2009]
	łuski cebulowe	pędy, korzenie	-	Aslam i in. [2013]
<i>L. pardalinum</i> 'Red Sunset'	nasiona		6,7	Mori i in. [2005]
<i>L. philadelphicum</i> var. <i>andinum</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
<i>L. polyphyllum</i>	nasiona, łuski cebulowe	cebule	- / 69	Dhyani i in. [2014]

<i>L. pumilum</i>	łuski cebulowe	cebule	9	Bahr i Compton [2004]
	liście	pȩdy	60	Jin i in. [2014]
	nasiona		0	Mori i in. [2005]
<i>L. pumilum</i>	łuski cebulowe	pȩdy		Zhang i in. [2016]
	liście	-	30	
<i>L. regale</i>	łuski cebulowe	cebule	97,7	Lian i in.[2009]
	piętko z merystemem wierzchołkowym	pȩdy	+	Saifullah i in. [2010]
	łuski cebulowe	cebule, pȩdy, korzenie		Prokopiuk i in. 2018
<i>L. rhodopeum</i>	łuski cebulowe, pȩdy, liście, załaznie	cebule	-	Stanilova i in. [1994]
<i>L. rubellum</i>	łuski cebulowe	pȩdy, cebule	-	Ishimori i in. [2009]
	łuski cebulowe, liście; nasiona		91,5 / 78,5 / 49,0	Mori i in. [2005]
	cebule	cebule	-	Niimi i in. [1997]
<i>L. sargentiae</i>	łuski cebulowe		85,7	Godo i Mii [2001]
	nasiona		40,0	Mori i in. [2005]
<i>L. speciosum</i>	nasiona		70,4	Mori i in. [2005]
	łuski cebulowe, liście, kwiaty	cebule, korzenie	-	Takayama i Misawa [1979]
	łuski cebulowe	cebule	-	Langens-Gerrits i in. [2001]
<i>L. speciosum</i> 'Rubrum'	łuski cebulowe	cebule	-	Kim i in. [1994]
<i>L. speciosum</i> 'Rubrum no. 10'	łuski cebulowe	cebule	-	Aatrijk i Blom-Barnhoorn [1980]
	łuski cebulowe	cebule	-	Aguettaz i in. [1990]
	łuski cebulowe	cebule	-	Jásik i De Klerk [2006]
	łuski cebulowe	cebule	-	Delvallée i in. [1990]
	łuski cebulowe	cebule	-	Langens-Gerrits i in. [1997]
	łuski cebulowe	cebule	-	Langens-Gerrits i in. [1998]
	cebule	pȩdy	-	Langens-Gerrits i in. [2003]
	łuski cebulowe	cebule	-	Paffen i in. [1990]
<i>L. speciosum</i> var. <i>gloriosoides</i>	pa̧ki kwiatowe		+	Chang i in. [2000]
<i>L. speciosum</i> var. <i>rubrum</i>	łuski cebulowe	cebule	86	Bahr i Compton [2004]

<i>L. szovitsianum</i>	łuski cebulowe	cebule	100	Godo i Mii [2001]
<i>L. tsingtauense</i>	łuski cebulowe		13,3	Mori i in. [2005]
<i>L. wallichianum</i>	łuski cebulowe		100	Godo i Mii [2001]
	nasiona		60,3	Mori i in. [2005]
Lilium sp.	łuski cebulowe	pędy, cebule	-	Nhut i in [2006b]
	łuski cebulowe		-	Pandey i inni [2009]
<i>Lilium</i> sp. (ponad 80 odmian litewskich)	pąki, części kwiatów	pędy	+	Zhola i in. [1992]
<i>Lilium</i> 'Alaska'	korzenie	cebule	-	Kapoor i in. [2008a]
	łuski cebulowe, korzenie, pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008b]
	pęd	cebule	-	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Amarone'	liście, nitki pręcików		76,3 / 85,6	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Apeldoorn'	korzenie	cebule	-	Kapoor i in. [2008a]
	łuski cebulowe, korzenie, pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008b]
	pęd	cebule	-	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Avignon'	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
<i>Lilium</i> 'Beatrix'	korzenie	cebule	-	Kapoor i in. [2008a]
	łuski cebulowe, korzenie, pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008b]
	pęd	cebule	-	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Casablanca'	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
	łuski cebulowe, pędy	pędy, cebule	-	Han i in. [2004a]
	łuski cebulowe	pędy	-	Han i in. [2005]
	łuski cebulowe, liście, nitki pręcików		98,3 / 72,3 / 86,3	Mori i in. [2005]
	merystem wierzchołkowy pędu	cebule, zarodki somatyczne	+	Sugiura i in. [2000]
	łuski cebulowe	cebule	-	Lian i in. [2003b]

<i>Lilium</i> 'Chianti'	łuski cebulowe	pędy, cebule, liście, korzenie	-	Kapoor i in. [2016]
<i>Lilium</i> 'Citronella'	łuski cebulowe	cebule	21	Bahr i Compton [2004]
<i>Lilium</i> 'Connecticut King'	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
	łuski cebulowe	cebule	-	Jásik i De Klerk [2006]
	łuski cebulowe, liście, nitki pręcików		100 / 84,3 / 88,6	Mori i in. [2005]
	łuski cebulowe	cebule		Langens-Gerrits i in. [2001]
<i>Lilium</i> 'Elite'	pęd	pędy	-	Bacchetta i in. [2003]
	liście	pędy	-	Yin i in. [2013]
<i>Lilium</i> 'Enchantment'	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
<i>Lilium</i> 'Esther'	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
<i>Lilium</i> 'Golden Splendor'	łuski cebulowe, liście		100 / 78,6	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Gran Paradiso'	łuski cebulowe	cebule	-	Varshney i in. [2000]
<i>Lilium</i> 'La Lave'	merystem wierzchołkowy pędu	cebule, zarodki somatyczne	+	Sugiura i in. [2000]
<i>Lilium</i> 'Lovely Girl'	łuski cebulowe	cebule	95	Bahr i Compton [2004]
<i>Lilium</i> 'Marco Polo'	korzenie	cebule	-	Kapoor i in. [2008a]
	łuski cebulowe, korzenie, pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008b]
	pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008c]
	pęd	cebule	-	Kapoor i in. [2009]
	łuski cebulowe	cebule	-	Kumar i in. [2007]
<i>Lilium</i> 'Mezhare'	łuski cebulowe	cebule	-	Jakobsone i in. [2006]
<i>Lilium</i> 'Mirr'	łuski cebulowe	cebule	-	Goo i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Mona'	łuski cebulowe	cebule	-	MeiLan i in. [2003]
<i>Lilium</i> 'Mona Lisa'	łuski cebulowe, liście		100 / 63,0	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Mont Blanc'	łuski cebulowe		-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
<i>Lilium</i> 'Montenegro'	liście, nitki pręcików		77,6 / 82,1	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'NS-94'	łuski cebulowe	cebule	-	Jakobsone i in. [2006]

<i>Lilium</i> 'Orange Pixie'	łuski cebulowe	pędy	+	Misra i Datta [2001]
<i>Lilium</i> 'Pesaro'	łuski cebulowe	cebule	-	Lian i in. [2002b]
<i>Lilium</i> 'Pink Perfection'	łuski cebulowe, liście		100 / 83,2	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Pollyanna'	pęd	pędy	-	Bacchetta i in. [2003]
	liście	pędy	-	Yin i in. [2013]
<i>Lilium</i> 'Rosato'	łuski cebulowe	cebule	-	Kumar i in. [2007]
<i>Lilium</i> 'Rothorn'	łuski cebulowe, liście		100 / 76,3	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Royal Parade'	łuski cebulowe, liście		96,0 / 64,2	Mori i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Sanciro'	łuski cebulowe	cebule	-	Varshney i in. [2000]
<i>Lilium</i> 'Siberia'	korzenie	cebule	-	Kapoor i in. [2008a]
	łuski cebulowe, korzenie, pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008b]
	pęd, liście	cebule	-	Kapoor i in. [2008c]
	pęd	cebule	-	Kapoor i in. [2009]
	liście	pędy	-	Yin i in. [2013]
<i>Lilium</i> 'Sonnentiger'	łuski cebulowe	cebule	-	Dąbrowski i in. [1992]
<i>Lilium</i> 'Star Gazer'	pęd	pędy	-	Bacchetta i in. [2003]
	łuski cebulowe	cebule	76	Bahr i Compton [2004]
	łuski cebulowe	cebule	-	Bonnier i Van Tuyl [1997]
	łuski cebulowe	cebule	-	Langens-Gerrits i in. [1997]
	łuski cebulowe	cebule	-	Langens-Gerrits i in. [2003]
	łuski cebulowe	cebule	-	Kumar i in. [2005]
	merystem wierzchołkowy pędu	cebule, zarodki somatyczne	+	Sugiura i in. [2000]
pąki, części kwiatów	cebule	+	Tribulato i in. [1997a]	
			Tribulato i in. [1997b]	
<i>Lilium</i> 'Stones'	łuski cebulowe	cebule	8	Bahr i Compton [2004]
<i>Lilium</i> 'Sweet Memory'	łuski cebulowe; liście		89,3 / 64,2	Mori i in. [2005]

+ obserwowano inicjację kalusa nie określając ilości; - brak informacji o inicjacji kalusa; ¹ eksplantaty wtórne

Stwierdzono też, że inicjacja cebul przybyszowych zachodzi na górnej stronie łuski (u jej nasady) *L. speciosum* var. *gloriosoides* [Chang i in. 2000], 'Orange Pixy' [Misra i Datta 2001]. Inne badania wykazały, że u *L. longiflorum* 'Snow Queen' inicjacja cebul przybyszowych ma miejsce w części nasadowej łuski, blisko miejsca cięcia, w warstwie komórek znajdujących się pod skórką po górnej stronie. Tylko niewielka część, około 17% inicjowanych cebul, powstaje z głębiej położonych komórek [Marinangeli i in. 2003]. Również inicjacja pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych zachodzi w części nasadowej blaszki 'Star Gazer', 'Elite', 'Pollyanna' i 'Snow Queen' [Bacchetta i in. 2003], w warstwie komórek znajdujących się pod skórką po górnej stronie blaszki liściowej 'Siberia' [Yin i in. 2013] oraz w sąsiedztwie przeciętych wiązek przewodzących *L. davidii* var. *unicolor* [LingFei i in. 2009]. Inicjację pędów przybyszowych uzyskano zarówno ze środkowej jak i nasadowej części liścia *L. longiflorum* 'Bright Tower' [Naing i in. 2014]. Czynnikiem zwiększającym liczbę inicjowanych pąków przybyszowych jest mechaniczne uszkodzenie tkanek np. poprzez dodatkowe podłużne nacięcie eksplantatu, co wykazano u *L. nepalense* [Wawrosch i in. 2001].

- **wiek rośliny**

U młodych cebul *L. regale* najwyższą zdolność do regeneracji wykazały najstarsze łuski zewnętrzne, a najmniejszą młodsze wewnętrzne [Lian i in. 2009]. Podobnie u *L. auratum* zaobserwowano najintensywniejszą regenerację cebul przybyszowych z łusek zewnętrznych z młodych (3 tygodniowych) cebul. Natomiast łuski zewnętrzne ze starszych (7 miesięcznych) cebul wykazały zmniejszoną zdolność do regeneracji cebul przybyszowych, częściej regenerując tkankę kalusową. Z tych cebul najlepszymi eksplantatami okazały się łuski ze środkowej części [Takayama i Misawa 1980]. Również łuski ze środkowej części cebul *L. orientalis* oraz *L. longiflorum* wykazały się najlepszą zdolnością do regeneracji cebul [Khan i in. 2015]. Najmłodsze oraz najstarsze liście odmiany 'Siberia' wykazały się słabszą zdolnością do regeneracji pędów przybyszowych w porównaniu do liści pobranych ze środkowej części pędu [Yin i in. 2013]. Na zdolność do inicjacji i regeneracji oddziałuje również pora roku. Łuski *L. ledebourii* pobierane wiosną wykazały najmniejszą zdolność do inicjacji cebul przybyszowych, najlepszą inicjację uzyskano z łusek pobranych latem [Azadi i Khosh-Khui 2007].

- **wielkość eksplantatu**

Większe eksplantaty pierwotne *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' częściej regenerowały pędy [Langens-Gerrits i in. 2000], a eksplantaty łuskowe tej lili o wymiarach 3×12 mm wytworzyły cebule przybyszowe o zawartości suchej masy dwa razy większej od uzyskanych na eksplantatach o wymiarach 3×6 mm. Ponadto obecność eksplantatu pierwotnego przez cały okres kultury sprzyjała lepszemu wzrostowi cebul przybyszowych [Langens-Gerrits i in. 1997]. Za optymalną wielkość eksplantatów u odmiany 'Siberia' uznano fragmenty liści dłuższe niż 6 mm i krótsze niż 10 mm [Yin i in. 2013], natomiast fragmenty z dna kwiatowego *L. longiflorum* powinny mieć około 3 mm [Nhut i in. 2001a].

- **ułożenie eksplantatów na pożywce**

Ułożenie eksplantatu na pożywce zachowujące ich orientację przestrzenną korzystnie wpływa na ilość i jakość uzyskiwanych regenerantów. Ułożenie łusek *L. regale* zgodne z orientacją sprzyjało regeneracji cebul przybyszowych i lepszemu ich wzrostowi, odwrócenie eksplantatów górną stroną łuski do pożywki zwiększyło wytwarzanie kalusa [Lian i in. 2009].

2.4.3. Pożywka

Eksplantaty wraz z regenerującymi roślinami czy kalusem wymagają do prawidłowego wzrostu źródła wody, składników mineralnych, związków organicznych dostarczanych przez odpowiednio skomponowaną pożywkę [Skucińska 2001].

- **składniki mineralne**

Jeden z najczęściej używanych zestawów podstawowych składników mineralnych stosowanym do przygotowywania pożywek został opracowany przez Murashige i Skooga w 1962 roku. Ten zestaw składników mineralnych jest powszechnie stosowany w badaniach nad mikrorozmnażaniem lili, rzadziej używane są inne opracowane przez: Gamborga, White i Chu [Arzate-Fernandez i in. 1997], Nitsch i Nitsch [Saetiew i Umamanit 2015], Linsmaier i Skoog [Stanilova i in. 1994, Yamagishi 1998]. Eksperymenty ze zróżnicowaną zawartością MS wykazały, że zmiana podstawowej ilości MS w pożywce wpływa na reakcję eksplantatu. Zawartość od 0 do $\frac{1}{4}$ MS stymulowała inicjację cebul przybyszowych u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10', a wyższa niż $\frac{1}{4}$ poprawiła ich wzrost [Aartrijk i Blom-Barnhoorn 1980]. Lepszy wzrost cebul przybyszowych mieszańca orientального 'Star Gazer' uzyskano przy podstawowej i podwyższonej o połowę zawartości MS w porównaniu do obniżonej o połowę [Langens-Gerrits i in. 2000]. Ilość dostępnych składników mineralnych wpływa też na regenerację korzeni przez cebule. U *L. auratum*. wytwarzaniu licznych, krótkich korzeni sprzyjało dwukrotne zwiększenie ilości MS, a obniżenie do $\frac{1}{8}$ spowodowało wyrastanie mniej licznych, ale długich korzeni [Takayama i Misawa 1979]. Najlepszy rozwój korzeni u lili uzyskano przy podstawowej ilości MS [Pandey i in. 2009]. U *L. nepalense* przy tej zawartości MS nie obserwowano inicjacji korzeni na pędach, dopiero obniżenie o połowę ilości MS spowodowało ich regenerację [Wawrosch i in. 2001]. Podobnie cebule *L. leucantum* lepiej ukorzeniały się na pożywce z obniżoną o połowę zawartością MS [Tang i in. 2010].

Nie tylko zmiana całkowitej ilości składników wpływa na reakcję eksplantatów. Zmiana zawartości pojedynczych składników w stosunku do podstawowej również wpływa na reakcję eksplantatu. Zmniejszenie ilości azotu do 25% lub 50% w porównaniu do składu opracowanego przez Murashiga i Skooga u *L. martagon* var. *album* i mieszańca 'Robinia' spowodowało zmniejszenie liczby regenerowanych liści. Zmniejszyła się też świeża masa zarówno liści, jak i cebul przybyszowych [Gabryszewska i Sochacki 2013]. Szybkość wzrostu cebul odmiany 'Casablanca' uzależniona jest od dostępności jonów amonowych, azotanowych, siarczanowych i fosforanowych w całym okresie kultury. Są one bardzo szybko pobierane z pożywki w następstwie czego spowolnieniu ulega ich wzrost [Lian i in. 2002a]. Wykazano też, że proporcja formy amonowej azotu do formy azotanowej w pożywce wywiera wpływ na inicjację i wzrost cebul przybyszowych lili. Stosunek 3:1 ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3$) zwiększa liczbę inicjowanych cebul przybyszowych mieszańca orientального 'Casablanca' jednocześnie powodując osłabienie ich wzrostu na dalszym etapie rozwoju, taka proporcja zahamowała też inicjację liści i korzeni. Do intensywnej inicjacji liści lepszy okazał się stosunek 2:1, a korzeni 1:1 tych form azotu [Kim i in. 2001].

Źródłem energii jak i podstawowego budulca tkanek roślinnych w kulturach *in vitro* są **węglowodany**. Najczęściej stosowana jest sacharoza, której zawartość w pożywce wpływa na ilość, wielkość i jakość uzyskiwanych regenerantów.

Zawartość sacharozy w pożywce w zakresie 3-6% jest wystarczająca do inicjacji cebul przybyszowych u lili. Wynika to z obserwacji wskazujących, że jej zawartość mniejsza niż 3% ogranicza liczbę inicjowanych cebul przybyszowych oraz ogranicza ich wzrost u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' [Aartrijk i Blom-Barnhoorn 1980]. Dla mieszańców azjatyckich 'Gran Paradiso' i 'Sanciro' optymalną zawartością jest 3%, a większa ogranicza liczbę inicjowanych cebul [Varshney i in. 2000]. Do inicjacji i regeneracji roślin *L. oxypetalum* z fragmentów łusek, jak i z kalusa, najlepszą była 4,5% zawartość sacharozy [Joshi i Dhar 2009], natomiast 3% i 6% zawartość była odpowiednia dla eksplantatów *L. ledebourii* [Azadi i Khosh-Khui 2007]. Zaobserwowano też, że formowanie cebul na pędach mieszańca orientального 'Casablanca' w mniejszym stopniu zależy od zawartości sacharozy w pożywce. Jej większy wpływ stwierdzono analizując świeżą masę uzyskiwanych cebul. Wraz ze wzrostem stężenia sacharozy z 3% do 12% uzyskiwano coraz większe jej przyrosty, równocześnie zauważono formowanie kalusa na piętках cebul przy zawartości od 9% do 12% [Han i in. 2005].

Inicjowanie i rozwój korzeni również zależą od ilości węglowodanów w pożywce. U *L. auratum* zaobserwowano zwiększanie się liczby, masy i długości regenerowanych korzeni wraz ze wzrostem zawartości sacharozy w pożywce [Takayama i Misawa 1979].

Indukcja pędów przybyszowych u *L. longiflorum* najefektywniej przebiegała przy 1-3% zawartości sacharozy [Le i in. 1999]. Na dalszym etapie prawidłowy wzrost pędów *L. longiflorum* 'Nellie White' osiągnięto przy 2% zawartości sacharozy. 1% sacharozy lub jej brak w pożywce powodowały nekrotyczne uszkodzenia pędów, a przy wyższej 3% zawartości na pędach obserwowano indukcję kalusa [Nhut i in. 2001a].

Stymulację wytwarzania liści przez łuski cebul u *L. auratum* uzyskano przy 3% zawartości sacharozy, jej wyższa zawartość (9%) działała inhibująco na ten proces [Takayama i Misawa 1980]. Podobnie duża ilość sacharozy (9-12%) inhibowała inicjację liści u *L. speciosum* [Gerrits i De Klerk 1992], odmian 'Gran Paradiso' i 'Sanciro' [Varshney i in. 2000] oraz u *L. martagon* var. *album* i mieszańca 'Robinia' [Gabryszewska i Sochacki 2013].

Regeneracja pędów z kalusa *L. xformolongi* najlepiej przebiegała, gdy pożywka zawierała od 0,5 do 1% sacharozy, wyższa niż 2% ilość hamowała ten proces [Godo i in. 1998].

Zwiększenie zawartości sacharozy w pożywce sprzyja uzyskiwaniu większych roślin potomnych. Rośliny *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' o większej świeżej masie uzyskano, gdy pożywka zawierała od 3% do 9% sacharozy [De Klerk i in. 1992], podobną zależność zaobserwowano u *L. martagon* var. *album* i mieszańca 'Robinia' [Gabryszewska i Sochacki 2013] czy odmianie 'Casablanca' [Lian i in. 2003a]. 6% i 9% zawartość sacharozy w pożywce sprzyja zwiększonej akumulacji suchej masy i węglowodanów w cebulach, co wykazano u *L. speciosum* [Langens-Gerrits i in. 1997]. Jeszcze większa ilość sacharozy (12%) spowodowała ograniczenie przyrostu świeżej masy uzyskiwanych roślin *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' [De Klerk i in. 1992].

- **regulatory wzrostu**

Do ukierunkowania, przyspieszenia oraz zwiększenia wydajności indukcji i regeneracji roślin w kulturach *in vitro* lili używa się regulatorów wzrostu dodawanych do pożywki. Wybór określonego regulatora lub ich kombinacji oraz ilości uzależniona jest od wielu zmiennych jak: gatunek bądź odmiana, rodzaj eksplantatu, ukierunkowania na

organogenezę bezpośrednią, pośrednią lub somatyczną embriogenezę. Jak wynika z literatury dobór odpowiedniego regulatora lub ich kombinacji wymaga weryfikacji doświadczalnej. Naturalną zdolność łusek cebulowych lili do indukcji cebul przybyszowych na pożywkach pozbawionych regulatorów wzrostu potwierdzono między innymi u *L. martagon* [Rybczyński i Gmolińska 1989], *L. ledebourii* [Mirmasoumi i in. 2013], 'Star Gazer' [Kumar i in. 2005], *L. speciosum* 'Rubrum no. 10', *L. longiflorum* 'Snow Queen', mieszańca azjatyckiego 'Connecticut King' [Jásik i De Klerk 2006]. Zwiększenie wydajności inicjacji na fragmentach łusek cebulowych uzyskano stosując NAA oraz BA u *L. martagon* [Rybczyński i Gmolińska 1989], czy *L. orientalis* i *L. longiflorum* [Khan i in. 2015]. U *L. ledebourii* zastosowanie NAA w połączeniu z BA zwiększyło wydajność inicjacji cebul przybyszowych, ale spowodowało też zmniejszenie ich świeżej masy [Bakhshaie i in. 2010a]. Zastosowanie BAP u *L. orientalis* i *L. longiflorum* pobudziło łuski cebulowe do indukcji pędów w przeciwieństwie do NAA [Khan i in. 2015], również u *L. macklinae* BAP była bardziej efektywna od kinetyny i TDZ [Sahoo i in. 2018]. Lepszą efektywność NAA na etapie inicjacji uzyskano u lili 'Chanti' w porównaniu do BAP [Kapoor i in. 2016]. Natomiast połączenie BAP i NAA zwiększyło wydajność inicjacji pędów na łuskach *L. pumilum* [Zhang i in. 2016]. Niektóre retardanty wzrostu, jak Alar (substancja czynna kwas 4-(2,2-dimetylohydrazyn-1-ylo)-4-oksobutanowy), Cycoel (substancja czynna chlorek chloromekwatu) czy paclobutrazol, z powodzeniem użyto do inicjacji cebul przybyszowych na łuskach u odmiany 'Star Gazer' [Kumar i in. 2005].

Do uzyskania indukcji cebul przybyszowych na fragmentach pędów konieczne jest wzbogacenie pożywki o regulatory wzrostu. U mieszańców 'Alaska', 'Apeldoorn', 'Beatrix', 'Siberia' i 'Marco Polo' skuteczną okazała się kombinacja NAA z BA, brak regulatorów wzrostu uniemożliwił uzyskanie cebul przybyszowych z takich eksplantatów [Kapoor i in. 2009]. Mieszańce 'Gran Paradiso' i 'Sanciro' do inicjacji cebul przybyszowych na fragmentach pędów potrzebowały NAA w ilości 0,5 μM , wyższa zawartość tej auksyny oraz użycie innych, tj. IAA lub IBA, powodowało indukcję kalusa [Varshney i in. 2000]. Odmiany 'Siberia' i 'Marco Polo' do zainicjowania cebul przybyszowych na międzywęźlach oraz fragmentach liści potrzebowały obecności NAA w kombinacji z BA. Zastosowanie NAA lub BA oddzielnie, a także brak regulatorów, uniemożliwiały ich inicjację [Kapoor i in. 2008c]. Podobne wymagania miały eksplantaty z fragmentów korzeni odmian 'Alaska', 'Apeldoorn', 'Beatrix', 'Siberia' i 'Marco Polo' [Kapoor i in. 2008a]. Inhibujące inicjację cebul działanie BA i IAA na fragmentach pędów stwierdzono u *L. longiflorum* 'Georgia' [Han i in. 2004b] oraz BA u *L. auratum* [Takayama i Misawa 1980].

Do indukcji pędów przybyszowych na fragmentach łusek u lili konieczne jest użycie regulatorów wzrostu. U odmiany 'Georgia' najskuteczniejszą okazała się BA. Do dalszej proliferacji pędów przybyszowych najlepszą była kombinacja BA i IAA. W kontroli na pożywkach bez cytokininy nastąpiła regeneracja cebul [Han i in. 2004b]. Użycie takiego zestawu regulatorów było równie skuteczne u odmiany 'Casablanca' [Han i in. 2005]. Indukcję pędów przybyszowych u *L. longiflorum* uzyskano też stosując syntetyczną cytokininę CPPU [Le i in. 1999]. Inicjację pędów z fragmentów liści *L. longiflorum* 'Bright Tower' uzyskano z nasadowej ich części w obecności BA, na części środkowej skuteczny był zestaw BA w połączeniu z NAA [Naing i in. 2014], natomiast kombinacja TDZ z NAA skutecznie inicjowała pędy z fragmentów liści u *L. davidii* var. *unicolor* [LingFei i in. 2009].

Na fragmentach dna kwiatowego *L. longiflorum* 'Nellie White' najlepiej inicjacja pędów przybyszowych zachodziła w obecności IBA lub NAA, mniej skutecznymi okazały się IAA oraz BA [Nhut i in. 2001a]. U tej odmiany kombinacja gibereliny (GA_3) z BA także pobudziła inicjację pędów przybyszowych z fragmentów kwiatów, równocześnie ta kombinacja użyta do inicjacji z łusek cebulowych okazała się nieskuteczna [Nhut 2003].

Inicjacja korzeni u lilii zachodzi bez udziału egzogennych regulatorów wzrostu, co zaobserwowano u *L. michiganense* [Ault i Siqueira 2008] czy *L. longiflorum* 'Georgia' [Han i in. 2004b]. Stymulujące działanie na inicjację korzeni wykazała NAA u *L. michiganense* [Ault i Siqueira 2008], *L. longiflorum* 'Georgia' [Han i in. 2004b], 'Sonnentiger' [Dąbrowski i in. 1992], *L. longiflorum* 'Nellie White' [Nhut i in. 2001b], 'Snow Queen' i 'White American' [Tribulato i in. 1997a]. W obecności picloramu uzyskano stymulację rozwoju korzeni u *L. martagon* [Kędra i Bach 2005], a u *L. longiflorum* 'Nellie White' w obecności 2,4-D [Nhut i in. 2001b]. Inhibujące działanie na inicjację korzeni zaobserwowano po zastosowaniu picloramu, dicamba i 2,4-D u *L. michiganense* [Ault i Siqueira 2008], oraz BA, kinetyny i 2iP u odmiany 'Sonnentiger' [Dąbrowski i in. 1992]. Stwierdzono też inhibujące działanie BA i IAA na inicjację korzeni na pędach *L. longiflorum* 'Georgia' [Han i in. 2004b].

Poprawę jakości uzyskiwanych regenerantów uzyskano dodając węgiel aktywny do pożywki, co zaobserwowano u odmiany 'Casablanca'. Dodanie węgla aktywnego do pożywki poprawiło wzrost cebul przybyszowych tej odmiany nie wpływając na ich inicjację [Han i in. 2005], a zastosowanie filtra z węgla aktywnego w obiegu pożywki w bioreaktorze okresowo zalewowym zwiększyło wydajność kultury i poprawiło jakość cebul, uzyskały one większą świeżą masę oraz zregenerowały więcej korzeni w porównaniu do kontroli, wykazały też mniej uszkodzeń [Kim i in. 2001].

W trakcie kultury wrażliwość eksplantatów na zastosowane regulatory wzrostu może ulec zmianie, co zaobserwowano u *L. martagon*. Gatunek ten w początkowym okresie kultury (pierwsze 8 tygodni) liczniej inicjował cebule przybyszowe w obecności BA, jednak w dłuższym okresie czasu (15 tygodni) większą ich liczbę uzyskano stosując NAA. Wykazano również, że BA wyższą efektywność wykazuje przy niższych stężeniach 0,01 mg/l w porównaniu do 0,1 mg/l, natomiast odwrotną zależność zaobserwowano dla NAA, gdzie zawartość 0,1 mg/l okazała się bardziej efektywna od 0,01 mg/l [Rybczyński i Gmolińska 1989]. Podobną zmienność reakcji zaobserwowano u mieszańca orientального 'Sonnentiger'. Intensywność inicjacji i regeneracji cebul przybyszowych z fragmentów łusek w początkowym okresie kultury była większa gdy użyto kombinacji NAA (0,1 mg/l) z 2iP lub BA (0,1 mg/l). Po drugim i trzecim pasażu wydajniejsze okazały się kombinacje z wyższą zawartością 2iP (0,3 mg/l) lub kinetyny (3 mg/l) [Dąbrowski i in. 1992].

Innym czynnikiem modyfikującym oddziaływanie egzogennych regulatorów wzrostu jest pora roku, w której pobierane były eksplantaty. Inicjację cebul przybyszowych na łuskach *L. ledebourii* pobieranych w terminie wiosennym i letnim zwiększyło zastosowanie BA i NAA, tego wpływu nie zaobserwowano, gdy eksplantaty pobrano w terminie zimowym [Azadi i Khosh-Khui 2007].

Oprócz pożądanego zwiększania wydajności inicjacji regulatory mogą też negatywnie wpływać na jakość uzyskiwanych regenerantów. Nekrotyczne uszkodzenia zaobserwowano w obecności NAA u *L. martagon* [Rybczyński i Gmolińska 1989], a zaburzenia wyglądu

cebul stwierdzono u odmiany 'Casablanca', gdy inicjowano je w obecności NAA i BA, podczas gdy na pożywce bez regulatorów nie obserwowano zaburzeń [Lian i in. 2003b].

Inicjację kalusa u różnych taksonów lili z użyciem picloramu testowano na:

- łuskach cebulowych uzyskując od 13% do 100% eksplantatów inicjujących kalus (16 taksonów),
- liściach uzyskując od 13,6% do 100% eksplantatów inicjujących kalus (16 taksonów),
- nasionach uzyskując od 0 do 100% eksplantatów inicjujących kalus (15 taksonów),
- nitkach pręcików uzyskując od 82,1% do 98,6% eksplantatów inicjujących kalus (5 taksonów) [Mori i in. 2005].

W innym eksperymencie przeprowadzonym z użyciem fragmentów łusek cebulowych u 21 taksonów uzyskano od 25% do 100% eksplantatów inicjujących kalus stwierdzając też, że mniejsza ilość picloramu jest bardziej efektywna [Godo i Mii 2001] (tab. 1). U *L. mackliniae* większą efektywność w indukcji kalusa z łusek uzyskano w obecności 2,4-D w porównaniu do NAA [Sahoo i in. 2018], z kolei u *L. longiflorum* skuteczną była kombinacja 2,4-D i BA [Priyadarshi i Sen 1992]. Badanie indukcji kalusa na fragmentach łusek *L. ledebourii* z użyciem BA, picloramu, 2,4-D, IAA oraz kombinacji BA z picloramem; 2,4-D lub IAA wykazało, że w porównaniu do pożywki bez regulatorów lepszą skuteczność wykazuje tylko picloram użyty samodzielnie [Mirmasoumi i in. 2013]. Inicjację kalusa na łuskach cebulowych *L. leucanthum* uzyskano w obecności BA (0,5 mg/l) w połączeniu z 2,4-D (3 mg/l), natomiast na liściach i ogonkach liściowych skuteczniejszą okazała się kombinacja ze zwiększoną ilością BA (1 mg/l) i zmniejszoną zawartością 2,4-D (1 mg/l) [Tang i in. 2010]. Na siewkach *L. martagon* skutecznie kalus indukowały BA, jak i picloram [Kędra i Bach 2005].

Całkowitą inhibicję indukcji kalusa z łusek *L. ledebourii* wykazano na pożywkach wzbogaconych o 2,4-D przy zawartości równej lub większej niż 4,5 mg/l samodzielnie, oraz przy 6 mg/l (i więcej) w kombinacji z BA [Mirmasoumi i in 2013].

Skuteczną indukcję kalusa na różnych częściach kwiatów uzyskano z szypułki kwiatowej 'White American' w obecności 2,4-D, 'Star Gazer' - dicamba lub picloramu; pręcików 'Gleria' - NAA, dicamba lub picloramu; słupka 'Snow Queen' – NAA, dicamba, picloramu; słupka 'Gleria' - NAA; zalążni 'Gleria' 2,4-D [Tribulato i in. 1997b], na fragmentach kwiatostanów *L. speciosum* var. *gloriosoides* 2,4-D i BA [Chang i in. 2000].

Spontaniczną regenerację pędów z kalusa u 16 taksonów lili zaobserwowano po kultywacji przez rok (regenerowało od 0,7% do 100% eksplantatów) [Godo i Mii 2001]. Również u *L. leucanthum* w trakcie kultywacji kalusa zaobserwowano regenerację cebul [Tang i in. 2010]. Pobudzenie kalusa do regeneracji cebul i pędów uzyskano po przeniesieniu na pożywkę zawierającą NAA u *L. longiflorum*. Ponadto stwierdzono, że kalus ten zachował zdolność do regeneracji roślin przez 36 miesięcy, jednak w tym czasie wydajność regeneracji zmalała [Priyadarshi i Sen 1992]. Regenerację cebul przybyszowych i korzeni z kalusa *L. speciosum* var. *gloriosoides* obserwowano już na pożywce inicjalnej zawierającej 2,4-D w połączeniu BA, zwiększenie wydajności regeneracji roślin uzyskano przenosząc go na pożywkę zawierającą NAA i węgiel aktywny [Chang i in. 2000]. U *L. mackliniae* najlepszą regenerację pędów uzyskano po umieszczeniu kalusa na pożywce z BAP, zastosowanie kinetyny lub TDZ dało gorsze rezultaty [Sahoo i in. 2018]. Regenerację pędów z kalusa

L. ledebourii uzyskano po przeniesieniu go na pożywkę zawierającą NAA z TDZ, a gdy użyto pożywki z NAA+BA uzyskano zarodki somatyczne [Mirmasoumi i Bakhshaie 2015].

2.4.4. Warunki zewnętrzne kultur

Jednym z fizycznych czynników wywierającym wpływ na rozwój eksplantatów roślinnych jest **światło** lub jego brak. Oświetlanie kultur lili może zwiększać liczbę indukowanych pąków przybyszowych jak u *L. longiflorum* [Le i in. 1999] czy *L. speciosum*, równocześnie u tej lili w kulturze pozbawionej światła uzyskano cebule o 50% większej świeżej masie [Gerrits i De Klerk 1992]. Stymulujące oddziaływanie światła białego oraz połączenia czerwonego z niebieskim na inicjację cebul przybyszowych mieszańca orientального 'Pesaro' uzyskano przy 16 godzinnym doświetlaniu. Zaobserwowano również, że światło czerwone i niebieskie korzystnie wpływa na wzrost i jakość uzyskanych cebul, osiągają one większą masę, lepiej się też ukorzeniają [Lian i in. 2002b].

Indukcja kalusa u *L. longiflorum* wydajniej przebiega w ciemności [Arzate-Fernandez i in. 1997], natomiast regeneracja cebul i pędów z kalusa u tej lili lepiej przebiega przy 16 godzinne oświetleniu [Priyadarshi i Sen 1992].

Podjęto też próbę określenia wpływu promieni gama na regenerację cebul u *L. rhodopaeum*. Regenerację uzyskano przy najniższej badanej dawce promieniowania 5 Gy. Promieniowanie zmniejszyło zdolność regeneracyjną eksplantatów, równocześnie zwiększając wydajność z pojedynczego eksplantatu, oraz poprawiło wielkość uzyskanych cebul [Stanilova i in. 1994].

Kolejnym czynnikiem fizycznym oddziałującym na eksplantaty jest **temperatura** utrzymywana w trakcie kultury. Odpowiednio dobrana może zwiększać liczbę uzyskiwanych cebul przybyszowych, jak u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' - w 25°C uzyskano wyższy współczynnik rozmnożenia niż w 15°C [De Klerk i in. 1992]. Wpływa też ona na jakość uzyskiwanych cebul. Cebule *L. candidum* o większej świeżej masie uzyskano w temp 15°C, jednocześnie zaobserwowano zmniejszenie liczby uzyskiwanych cebul w porównaniu do 25°C [Saadon i Zaccai 2013]. Innym aspektem oddziaływania temperatury jest wzbudzanie stanu spoczynku u cebul przybyszowych. Temperatura kultury 20°C i 25°C powoduje wejście cebul przybyszowych *L. speciosum* w spoczynek. Utrzymanie kultury w 15°C zapobiega wchodzeniu cebul w spoczynek [Delvallée i in. 1990, Paffen i in. 1990].

2.4.5. Wydajność kultur

Duża liczba czynników i ich kombinacji wpływających na wydajność rozmnażania lili technikami *in vitro* powoduje, że wybór optymalnego ich zestawu pozwalającego uzyskać satysfakcjonujący współczynnik rozmnożenia jest trudny i wymaga weryfikacji. Przykłady przedstawiono w tabeli 2.

Tabela. 2. Wydajność rozmnażania różnych gatunków i odmian lili w kulturach *in vitro* na pożywkach stałych

Genotyp	Eksplantat	Skład pożywki			Temperatura; fotoperiod [h] dzień/noc	Wydajność [szt./ eksplantat] z 1 cyklu namnażania	Literatura
		Składniki mineralne	Sacharoza [%]	Regulatory wzrostu			
<i>L. ×formolongi</i> R13	1 g kalus	1/2MS	5	BA 1 [mg/l]	25°C; 24/0	80 pędów	Godo i in. [1998]
<i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	fragment liścia	NN	3	TDZ 1 [mg/l] + NAA 1 [mg/l]	25°C; 15 dni 0/24 następnie 15/9	3,4 pędów	LingFei i in. [2009]
<i>L. leucanthum</i>	1 g kalusa	MS	3	BA 0,5 [mg/l] + NAA 0,2 [mg/l]	23°C; 14/10	23 cebule	Tang i in. [2010]
	łuska cebulowa	MS	3	BA 0,5 [mg/l] + NAA 0,1 [mg/l]	23°C; 14/10	3,1 cebul	Tang i in. [2010]
<i>L. longiflorum</i>	łuska cebulowa	MS	1	CPPU 1 [μM]	20°C; 16/8	16,8 pędów	Le i in. [1999]
	1 g kalusa	MS	brak danych	NAA 5,37 [μM]	16/8	19,3 cebul	Priyadarshi i Sen [1992]
	1 cm ² łuski	MS	brak danych	BA 1,1 [μM] +NAA 5,37 [μM] lub IAA 5,68 [μM]	16/8	6-8 cebul	Priyadarshi i Sen [1992]
<i>L. longiflorum</i> 'Bright Tower'	fragment pędu z węzłem	MS	3	BA 2 [mg/l] + NAA 1,5 [mg/l]	25°C; 30 dni 0/24 następnie 16/8	5,7 pędów	Naing i in. [2014]
	fragment pędu - międzywęźle	MS	3	BA 1 [mg/l] + NAA 2 [mg/l]	25°C; 30 dni 0/24 następnie 16/8	3,3 pędów	Naing i in. [2014]
	fragment liścia - część nasadowa	MS	3	BA 1 [mg/l]	25 °C 30 dni 0/24 następnie 16/8	3,3 pędów	Naing i in. [2014]
	fragment liścia - część wierzchołkowa	MS	3	BA 1 [mg/l] + NAA 1,5 [mg/l]	25 °C; 30 dni 0/24 następnie 16/8	5,8 pędów	Naing i in. [2014]
<i>L. longiflorum</i> 'Georgia'	fragment pędu	MS	9	BA 2,2 [μM]	25°C; 16/8	7,6 cebul	Han i in. [2004b]

<i>L. longiflorum</i> 'Georgia'	łuska cebulowa	MS	3	BA 2,2 [μM]	25°C; 16/8	7,6 pędów	Han i in. [2004b]
	fragment pędu (eksplantat wtórny)	MS	3	BA 2,2 [μM] + IAA 3,3 [μM]	25°C; 16/8	9,7 pędów	Han i in. [2004b]
<i>L. longiflorum</i> 'Nellie White'	pąki kwiatowe - fragment zawierający dno kwiatowe	½ MS	3	BA 2,2 [μM] + NAA 5,4 [μM]	25°C; 12/12	41,4 pędów	Nhut i in. [2001a]
<i>L. longiflorum</i> 'White Fox'	łuska cebulowa	MS	3	BA 0,1 [mg/l] + NAA 0,1 [mg/l]	22°C; 16/8	10 pędów	Aslam i in. [2013]
<i>L. mackliniae</i>	1 g kalus	MS	3	BAP 0,5 mg/l	16/8	16,2 pędów	Sahoo i in. [2018]
	łuska cebulowa	MS	3	BAP 0,5 mg/l	16/8	3,5 pędów	Sahoo i in. [2018]
<i>L. martagon</i>	łuska cebulowa	MS	3	BA 0,5 [μM]	20°C; 0/24	3 cebule	Kędra i Bach [2005]
<i>L. martagon</i>	łuska cebulowa	MS	3	NAA 0,1 [mg/l]	23 °C; 0/24	10,5 cebul	Rybczyński i Gmolińska [1989]
<i>L. martagon</i> var. <i>cattaniae</i>	łuska cebulowa	MS	brak danych	BA 0,2 [mg/l] + IAA 0,2 – 2 [mg/l]	25°C; 16/8	5,5 cebul	Skorić i in. [2012]
<i>L. michiganense</i>	łuska cebulowa	MS	3	dicamba 1 [μM] lub NAA 4 [μM]	20°C; 14/10	7,9 pędów	Ault i Siqueira [2008]
<i>L. orientalis</i>	łuska cebulowa	MS	3	BA 0,1 [mg/l] + NAA 0,1 [mg/l]	20°C; 16/8	10 pędów	Aslam i in. [2013]
	fragment liścia	MS	3	TDZ 0,54 [μM]+ NAA 0,54 [μM]	25°C; 30 dni 0/24 następnie 16/8	2,7 pędów	Liu i Yang [2012]
	łuska cebulowa	MS	3	TDZ 1 [μM] + NAA 0,54 [μM]	25 °C; 30 dni 0/24 następnie 16/8	4,4 pędów	Liu i Yang [2012]
<i>L. oxypetalum</i>	fragment kalusa 8×8 mm	MS	4,5	BA 2 [μM] + NAA 0,1 [μM]	25°C; 16/8	9 cebul	Joshi i Dhar [2009]
	łuska cebulowa	MS	4,5	BA 2 [μM] + NAA 0,1 [μM]	25°C; 16/8	5,4 cebul	Joshi i Dhar [2009]
<i>L. pumilum</i>	fragment liścia	MS	brak danych	BA 8,8 [μM] + NAA 2,69 [μM]	25°C; 16/8	4 cebule	Jin i in. [2014]

<i>L. regale</i>	łuska cebulowa	MS	3	BA 2 [mg/l] + IBA 1 [mg/l]	27°C; 16/8	8,4 pędów	Saifullah i in. [2010]
	fragment pędu	MS	6	BA 2 [mg/l] + IBA 1 [mg/l]	27°C; 16/8	12,1 pędów	Saifullah i in. [2010]
	fragment pędu*	MS	6	BA 2 [mg/l] + IBA 1 [mg/l]	27°C; 16/8	10,6 pędów	Saifullah i in. [2010]
<i>Lilium</i> 'Alaska'	fragment pędu	MS	3	BA 2 [mg/l] + NAA 2 [mg/l]	25°C; 16/8	4 cebul	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Apeldoorn'	fragment pędu	MS	3	BA 2 [mg/l] + NAA 2 [mg/l]	25°C; 16/8	2,8 cebul	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Beatrix'	fragment pędu	MS	3	BA 1mg/l + NAA 1,5 mg/l	25°C; 16/8	4 cebule	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Marco Polo'	fragment pędu	MS	3	BA 2 [mg/l] + NAA 2 [mg/l]	25°C; 16/8	3,7 cebul	Kapoor i in. [2009]
<i>Lilium</i> 'Orange Pixie'	łuska cebulowa	MS	brak danych	BA 0,5 [mg/l] + NAA 1 [mg/l]	26°C; 16/8	25 pędów	Misra i Datta [2001]
<i>Lilium</i> 'Siberia'	fragment pędu	MS	3	BA 1mg/l + NAA 1,5 mg/l	25°C; 16/8	3 cebule	Kapoor i in. [2009]

* pożywka płynna, eksplantaty stabilizowano watą

2.4.6. Kultury lili w pożywkach płynnych

Kultury roślinne prowadzone na pożywkach płynnych wykazują, w porównaniu do pożywek zestalonych agarem, wyższe tempo wzrostu i namnażania pędów, korzeni, cebul i zarodków somatycznych, co jest wynikiem lepszej dostępności eksplantatów do wody i składników odżywczych [Ascough i Fennell 2004, Hvoslef-Eide i Preil 2005]. Ponadto stosowanie pożywek płynnych przekłada się na większą zdolność roślin do aklimatyzacji oraz na obniżenie kosztów i zwiększenie skali produkcji [Malik 2016, Manuhara i in. 2017].

Dotychczas nie stosowano pożywek płynnych i kultur zawieszinowych do rozmnażania *Lilium martagon*, ale badano ich wpływ na regenerację innych genotypów z tego rodzaju, w tym lili z grupy mieszańców orientalnych [Simmonds i Cumming 1976, Paek i in. 2001, Horita i in. 2002, Horita i in. 2003, Qi i in. 2014], trąbkowych [Qi i in. 2014] oraz azjatyckich [Varshney i in. 2000]. Także *L. longiflorum* [Priyadarshi i Sen 1992, Tribulato i in. 1997a, b, Han i in. 2004b, Nhut i in. 2006a, Thakur i in. 2006, Vieira i in. 2015], *L. speciosum* i *L. auratum* [Takayama i Misawa 1983], *L. formosanum* [Nakano i in. 2000], *L. testaceum* [Wozniowski i in. 1991], *L. ×formolongi* [Mii i in. 1994, Godo i in. 1996, 1998, Horita i in. 2003, Ho i in. 2006, Ogaki i in. 2008], *L. ledebourii* i [Mirmasoumi i Bakhshaie 2015, Estaji i in. 2021], *L. regale* [Pelkonen i Kauppi 1999, Estaji i in. 2021] oraz *L. japonicum* [Komai i in. 2006] (tab. 3).

Han i in. [2004b] opisali metodę mieszaną polegającą na zalewaniu pożywką płynną czterotygodniowej kultury prowadzonej na pożywkach stałych u *Lilium longiflorum*. Uzyskano efekt zwiększenia wydajności i jakości uformowanych cebul przybyszowych. W doświadczeniach porównawczych badających wpływ stanu skupienia pożywek (stała, półpłynna i płynna) w kulturach lili orientalnej 'Star Gazer' i 'Casablanca' wykazano, że kultury płynne są wydajniejsze [Islam i in. 2020]. Uformowane na takiej pożywce cebule przybyszowe miały wyższą świeżą masę, było też ich więcej w porównaniu do pożywki półpłynnej i stałej. Wyniki pokazały również, że wzrost cebul w płynnej kulturze został podtrzymany przez regularną wymianę płynnej pożywki. Yang i in. [2021] osiągnęli wydajną i niezawodną regenerację, wykorzystując łuski cebulowe *Lilium davidii* var. *unicolour* jako eksplantaty do indukcji pąków przybyszowych. Po 4 tygodniach prowadzenia kultur otrzymano wydajniejsze tempo namnażania (9,8%), większą średnią liczbę pędów (3,4) i zwiększoną długość pędów (5,5 cm) stosując pożywkę płynną MS z dodatkiem tidiazuronu.

Badania nad rodzajem *Lilium* skupiają się głównie na bezpośredniej regeneracji organów przybyszowych na łuskach cebulowych (organogeneza) [Le i in. 1999, Saadon i Zaccai 2013, Mirmasoumi i Bakhshaie 2015]. Opublikowano również kilka prac na temat udanej regeneracji lili na drodze somatycznej embriogenezy w kulturach płynnych. Ho i in. [2006] analizowali przebieg tego procesu używając kultur zawieszinowych *Lilium ×formolongi*, uzyskując regenerację na poziomie 74%. Tribulato i in. [1997b] indukowali kalus na *L. longiflorum* na pożywce z dikambą lub pikloramem, uzyskując kalus embriogeny w płynnej pożywce z dikambą, a rośliny powstałe z zarodków somatycznych nie różniły się od tych, które uzyskano na drodze bezpośredniej organogenezy z łusek cebulowych. Pelkonen i Kauppi [1999] założyli kultury zawieszinowe komórek przy użyciu kalusa z *L. regale* - kalus w zawieszinie wykazywał dużą zdolność regeneracji, wykryto miejsca organogenne i embriogeniczne oraz zarodki somatyczne. Nakano i in. [2000] prowadzili kultury

zawieszinowe komórek embriogenicznych, otrzymane z kalusa *L. formosanum* uformowanego na łuskach cebulowych, które formowały zarodki somatyczne. Pożywka płynna wzbogacona TIBA była korzystna w długotrwałym utrzymywaniu kultur zawieszinowych komórek [Nakano i in. 2000]. Opisano także indukcję komórek embriogenicznych *L. longiflorum* z kalusa utrzymywanego na pożywce stałej lub płynnej z NAA i TDZ, gdzie stwierdzono, że początkowo proces ten przebiegał wydajniej na pożywce płynnej, ale dalszemu rozwojowi i proliferacji tych zarodków sprzyjała pożywka zestalona [Nhut i in. 2006a].

Doświadczenia z użyciem pożywek płynnych są zwykle etapem wstępnym dostarczającym danych do założenia i prowadzenia kultur bioreaktorowych lili, które są stosowane w celu wydajnego namnażania cebul przybyszowych oraz zarodków somatycznych [Ruffoni i in. 2011].

Godo i in. [1998] wykazali, że liczba komórek merystematycznych w kulturach bioreaktorowych *L. ×formolongi* wzrasta 2,5-krotnie co 2 tygodnie. Paek i in. [2001] wykorzystując „ballon-type bubble bioreaktor” (BTBB) wykazali, że stężenie sacharozy wpływa na wzrost cebul przybyszowych. Lian i in. [2003b] opracowali opłacalną metodę produkcji cebul przybyszowych lili 'Casablanca' z fragmentów łusek cebulowych. Porównywali różne rodzaje bioreaktorów, a największą liczbę cebul przybyszowych otrzymali w bioreaktorze przepływowym i zalewowym (zalewanie pożywką 4 razy dziennie przez 15 min), w porównaniu z systemem zanurzeniowym. Lian i in. [2002a] zaobserwowali również, że więcej cebul lili 'Casablanca' o masie powyżej 2 g, tworzyło się, gdy pożywkę wymieniano na nową po 2, 6 i 12 tygodniach kultywacji w bioreaktorze, w porównaniu z kulturami, w których po takim samym czasie pożywkę tylko uzupełniano.

W celu utrzymania czystych kultur bioreaktorowych wprowadza się w ostatnich latach ozonowanie pożywki [Guo i in. 2019]. Zastosowanie bioreaktorów do mikrorozmnażania lili w połączeniu z zabiegiem ozonowania jest wydajnym modelem automatyzacji i produkcji na dużą skalę wysokiej jakości pędów [Cardarelli i Suárez 2017]. Znane jest również dodawanie węgla aktywnego do płynnych kultur lili w celu zwiększenia wydajności procesu formowania cebul [Han i in. 2004a].

Tabela 3. Zastosowanie kultur płynnych w pracach badawczych rodzaju *Lilium*

Genotyp	Typ kultury płynnej naczynie	Eksplantat	Kierunek rozwoju lub rodzaj kultury	Literatura
<i>L. auratum</i>	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	łuski cebulowe	organogeneza, wzrost łusek	Takayama i Misawa [1983]
<i>L. davidii</i> var. <i>unicolour</i>	stacjonarna kolba Erlenmayer'a	pąki przybyszowe	prolifracja, wzrost pędów	Yang i in. [2021]
<i>L. ×formolongi</i>	wytrząsana słoik, kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa	Godo i in. [1996]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a, bioreaktor z separatorem i mieszadłem mechanicznym TBR-2	zawiesina komórkowa	zawiesina komórkowa	Godo i in. [1998]
<i>L. ×formolongi</i> 'Akasu'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa do transformacji	Ogaki i in. [2008]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa do transformacji	Azadi i in. [2010]
<i>L. ×formolongi</i> 'Azusa'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, protoplasty	Mii i in. [1994]
<i>L. ×formolongi</i> 'Hakucho'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, protoplasty do fuzji	Horita i in. [2003]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, protoplasty	Komai i in. [2006]

<i>L. xformolongi</i> : 'Notikula', 'RaiZen No. 1', 'RaiZen No. 3', 'RaiZen Early', 'Bailansa'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa	Ho i in. [2006]
	bioreaktor z mieszadłem mechanicznym; bioreaktor z mieszadłem mechanicznym i napowietrzaniem; bioreaktor air lift; bioreaktor; zmodyfikowany bioreaktor (poprawa napowietrzania)	zawiesina	somatyczna embriogeneza	
<i>L. formosanum</i>	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, organogeneza, somatyczna embriogeneza	Nakano i in. [2000]
<i>L. japonicum</i>	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, protoplasty	Komai i in. [2006]
<i>L. ledebourii</i>	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa	Estaji i in. [2021]
	statyczna kolba Erlenmayer'a, bioreaktor RITA	kalus	somatyczna embriogeneza, organogeneza	Mirmasoumi i Bakhshaie [2015]
<i>L. longiflorum</i>	statyczna kolba Erlenmayer'a	kalus	somatyczna embriogeneza	Nhut i in. [2006a]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	cebule przybyszowe	wzrost cebul	Priyadarshi i Sen [1992]
<i>L. longiflorum</i> var. <i>pollyanna</i>	statyczna słoik	klastry cebul	prolifracja cebul i wzrost	Thakur i in. [2006]
<i>L. longiflorum</i> 'Georgia'	kultura na pożywce stałej po 8 tygodniach zamiast pasażu dodano 1x pożywkę płynną	fragmenty pędów	organogeneza, wzrost pędów	Han i in. [2004b]

<i>L. longiflorum</i> 'Gleria'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, somatyczna embriogeneza	Tribulato i in. [1997b]
<i>L. longiflorum</i> 'Nellie White'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa do transformacji	Vieira i in. [2015]
<i>L. longiflorum</i> 'Snow Queen'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, somatyczna embriogeneza	Tribulato i in. [1997a, b]
<i>L. longiflorum</i> 'White American'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, somatyczna embriogeneza	Tribulato i in. [1997b]
<i>L. regale</i>	statyczna (immobilizowana) kolba Erlenmayer'a	fragment pędu	prolifracja pędów	Saifullah i in. [2010]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa	Estaji i in. [2021]
<i>L. rubellum</i>	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	cebule przybyszowe	wzrost cebul	Niimi i in. [1997]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	cebule przybyszowe	wzrost cebul	Niimi i in. [2000]
<i>L. tenuifolium</i> ×'Robina'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, somatyczna embriogeneza	Qi i in. [2014]
<i>L. testaceum</i>	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa	Wozniewski i in. [1991]
<i>Lilium</i> 'Acapulco'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, protoplasty do fuzji	Horita i in. [2003]
<i>Lilium</i> 'Brindisi'	bioreactor BTBB	cebule	wzrost cebul	Cardarelli i Suárez [2017]
<i>Lilium</i> 'Casablanca'	kultura na pożywce stałej po 2 miesiącach zamiast pasażu dodano 1× pożywkę płynną	fragmenty pędów	wzrost cebul	Han i in. [2004a]
	bioreaktor z napowietrzaniem (BTBB) bioreaktor okresowo zalewowy (EBB)	cebule przybyszowe	wzrost cebul	Lian i in. [2003a]

<i>Lilium</i> 'Casablanca'	bioreaktor z napowietrzaniem (BTBB)	cebule przybyszowe	wzrost cebul	Lian i in. [2002a]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	fragmenty łusek	organogeneza (przygotowanie materiału)	Lian i in. [2003b]
	bioreaktor z napowietrzaniem (BTBB), bioreaktor okresowo zalewowy (EBB)	fragmenty łusek	organogeneza	
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a (półpłynna, płynna i stała)	łuski cebulowe	organogeneza i wzrost cebul	Islam i in. [2020]
<i>Lilium</i> 'Chianti'	statyczna kolba Erlenmayer'a	pędy	wzrost cebul	Kapoor i in. [2016]
<i>Lilium</i> 'Gran Paradiso'	statyczna i wytrząsana kolba Erlenmayer'a	łuski cebulowe	organogeneza	Varshney i in. [2000]
	statyczna kolba Erlenmayer'a	łuski cebulowe	organogeneza i wzrost cebul	
<i>Lilium</i> 'Mirr'	statyczna kolba Erlenmayer'a bioreaktor okresowo zalewowy (EBB)	łuski cebulowe	organogeneza i wzrost cebul	Goo i in. [2005]
<i>Lilium</i> 'Sanciro'	statyczna i wytrząsana kolba Erlenmayer'a	łuski cebulowe	organogeneza	Varshney i in. [2000]
	statyczna kolba Erlenmayer'a	łuski cebulowe	organogeneza i wzrost cebul	
<i>Lilium</i> 'Shirotae'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa, protoplasty do fuzji	Horita i in. [2003]
<i>Lilium</i> 'Star Gazer'	wytrząsana kolba Erlenmayer'a	kalus	zawiesina komórkowa somatyczna embriogeneza	Tribulato i in. [1997b]
	wytrząsana kolba Erlenmayer'a (półpłynna, płynna i stała)	łuski cebulowe	organogeneza i wzrost cebul	Islam i in. [2020]

2.4.7. Aklimatyzacja i dalszy wzrost lili

Otrzymane technikami *in vitro* rośliny przeznaczone do dalszej uprawy w szklarni lub polowej muszą przejść proces aklimatyzacji do panujących warunków środowiska. Uzyskane młode rośliny oczyszczają się z pozostałości pożywki i sadzi do podłoża. W ciągu pierwszych kilkunastu dni uprawy stopniowo zwiększa się natężenie światła, obniża wilgotność oraz reguluje temperaturę otoczenia [Chandra i in. 2010, Hazarika 2003, Saifullach i in. 2010]. Aklimatyzację *L. regale* ze 100% wydajnością uzyskano w podłożu z czystego torfu, w temperaturze 15-18°C i stopniowym obniżaniu wilgotności względnej do 30% [Saifullah i in. 2010]. Inne lilie uzyskiwały nieco mniejszy procent zaaklimatyzowanych roślin: *L. martagon* var. *cattaniae* - 95% [Skorić i in. 2012], *L. davidii* var. *unicolor* - 92% [LingFei i in. 2009], *L. longiflorum* 'Bright Tower' - 95% [Naing i in. 2014], *L. ledebourii* - 70% [Mirmasoumi i Bakhshae 2015], *L. ledebourii* - 85% [Mirmasoumi i in. 2013], *L. polyphyllum* powyżej - 40% [Dhyani i in. 2014], 'Alaska', 'Apeldoorn', 'Beatrix', 'Siberia', 'Marco Polo' - 80-82% [Kapoor i in. 2009], *L. orientalis*, *L. longiflorum* 'White Fox' - 90% [Aslam i in. 2013], *L. mackliniae* - 96,8% [Sahoo i in. 2018].

Dalszy wzrost i rozwój dla większości uzyskanych roślin przebiega zgodnie z cyklem rozwojowym danego gatunku. W nielicznych przypadkach zaobserwowano uboczne skutki czynników oddziałujących w trakcie mikrorozmnażania. Rośliny odmiany 'Star Gazer' uzyskane na pożywce z obniżoną zawartością MS o połowę formowały więcej pędów w porównaniu do uzyskanych przy podstawowej lub podwyższonej zawartości MS. Również zawartość sacharozy w pożywce (3%, 6% lub 9%) wywarła wpływ na ich wzrost po aklimatyzacji. Rozmnażane na pożywce z 6% zawartością sacharozy wytwarzały więcej pędów po aklimatyzacji [Langens-Gerrits i in. 2000].

Innym czynnikiem manifestującym swoje działanie po aklimatyzacji są regulatory wzrostu. Zaobserwowano, że pod wpływem BA oraz kinetyny u zaaklimatyzowanych roślin może dochodzić do anomalii polegających na wytwarzaniu cebulek powietrznych w kątach liści roślin, które w naturze nie wytwarzają takich cebul [Zhola i in. 1992].

Znaczący wpływ na wzrost i rozwój lili po aklimatyzacji ma temperatura utrzymywana w trakcie kultury. Zbyt wysoka temperatura w trakcie mikrorozmnażania wywiera negatywny wpływ na późniejszy rozwój lili. Rośliny *L. longiflorum* 'Ace' rozmnażane w temperaturze 30°C zakwitły słabiej aniżeli uzyskane w 25°C [Higgins i Stimart 1990]. Również temperatura poniżej 15°C może mieć negatywny wpływ na wzrost lili. U *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' - rośliny uzyskane w 15°C skielkowały w 100% bez chłodzenia, ale ich sucha masa zmniejsza się po 16 tygodniach uprawy z 5 do 3 mg, natomiast rośliny poddane chłodzeniu przed lub po aklimatyzacji zwiększyły swoją suchą masę z 5 do 12 mg [De Klerk i in. 1992]. Zaobserwowano też, że rośliny mieszańca orientального 'Star Gazer' uzyskane w kulturze prowadzonej w stałej temperaturze (15°C lub 25°C) rzadziej formowały pęd po aklimatyzacji w porównaniu do roślin rozmnażanych w zmiennej temperaturze - pierwsze 12 tygodni w 25°C, a następnie 2-4 tygodni w 15°C [Langens-Gerrits i in. 2000].

Na tempo wzrostu i rozwoju roślin lili po mikrorozmnażaniu wpływa wielkość uzyskanych cebul przybyszowych. Cebule *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' o masie mniejszej niż 150 mg wytwarzały tylko 1-2 liście wyrastające z wierzchołków łusek, podczas gdy 70%

cebul o masie zbliżonej do 300 mg formowało pęd z 5-7 liśćmi, również ich dalszy wzrost był szybszy [Langens-Gerrits i in. 1997].

2.4.8. Ploidalność komórek lili w warunkach *in vitro*

Pod wpływem czynników oddziałujących na materiał roślinny w trakcie kultur *in vitro* może dochodzić do zmiany liczby chromosomów uzyskanych tą drogą roślin. Zmianę w ploidalności komórek kalusa trakcie 3 letniej kultury stwierdzono u *L. longiflorum*, ale zregenerowane z niego rośliny miały prawidłową liczbę chromosomów [Priyadarshi i Sen 1992]. W innym badaniu po ponad rocznej kultywacji nie zaobserwowano zmian liczby chromosomów w komórkach kalusa lili: *L. alexandrae*, *L. concolor* var. *coridion*, *L. concolor* var. *pulchellum*, *L. concolor* var. *sitricum*, *L. davidii*, *L. davidii* var. *unicolor*, *L. formosanum* var. *pricei*, *L. lancifolium* var. *flaviflorum*, *L. lankogense*, *L. leucanthum* var. *centifolium*, *L. maculatum*, *L. martagon*, *L. maximowiczii*, *L. monadelphum*, *L. nobilissimum*, *L. philadelphicum* var. *andinum*, *L. sargentiae*, *L. szovitsianum*, *L. wallichianum* [Godo i Mii 2001]. Po 4 latach kultury kalusa merystematycznego w bioreaktorze *L. ×formolongi* linii R13 również nie wykryto zmian w ploidalności komórek [Godo i in. 1998]. Nie stwierdzono też różnic w ilości DNA pomiędzy roślinami *L. martagon* uzyskanymi poprzez organogenezę bezpośrednią oraz pośrednią [Kędra i Bach 2005].

3. Skrótly stosowane w pracy

BA - benzyloadenina;

BAP - 6-benzylo(adenino)aminopuryna;

NAA - kwas naftylo-1-octowy;

IBA - kwas indolilo-3-masłowy;

IAA - kwas indolilo-3-octowy;

2iP - 6-izopentenyloadenina;

2,4-D - kwas 2,4 dichlorofenoksyoctowy;

TDZ - N-fenilo-N'-1,2,3-tiodiazylo-5-yl-mocznik;

CPPU - N-fenilo-N'-2-chloro-4-pirydylomocznik;

MS - pożywka podstawowa według Murashige i Skooga [1962]

4. Cel pracy

Po przeprowadzeniu analizy danych literaturowych postawiono hipotezę badawczą, że prowadzenie namnażania lili złotogłów w kulturze *in vitro* na pożywkach płynnych będzie skutkowało większą wydajnością formowania cebul przybyszowych.

Celem przeprowadzonych eksperymentów było opracowanie wydajnej metody rozmnażania lili złotogłów z wykorzystaniem techniki *in vitro* z użyciem pożywek płynnych na wytrząsarkach. Opracowana metoda przyczyni się do intensyfikacji procesu namnażania cebul przybyszowych oraz poszerzy wiedzę na temat reakcji roślin na warunki kultury płynnej, która w dalszej perspektywie może być wykorzystana w procesie automatyzacji i wdrożenia produkcji cebul w bioreaktorach.

Cele szczegółowe:

- Ocena intensywności formowania cebul, liści i korzeni przybyszowych w pożywkach płynnych o różnej zawartości regulatorów wzrostu w porównaniu do stałej pożywki kontrolnej, w cyklu 16 tygodniowym, z wymianą pożywki co 2 tygodnie. Uzyskane organy będą przeanalizowane histologicznie.
- Ocena wpływu stanu skupienia pożywki oraz następstwa pożywek (stan skupienia, regulatory wzrostu, stężenie sacharozy) na przyrost masy cebul z zachowaniem 16 tygodniowego cyklu uprawy i wymianą pożywki co 2 tygodnie.
- Zbadanie wpływu chłodzenia uformowanych cebul na aklimatyzację i wzrost roślin w warunkach *ex vitro*.
- Analiza cytometryczna ploidalności regenerantów.

5. Materiał i metody

5.1. Materiał roślinny

Do zapoczątkowania kultur *in vitro* użyto nasion zebranych z roślin lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) z trzech populacji rosnących na następujących stanowiskach:

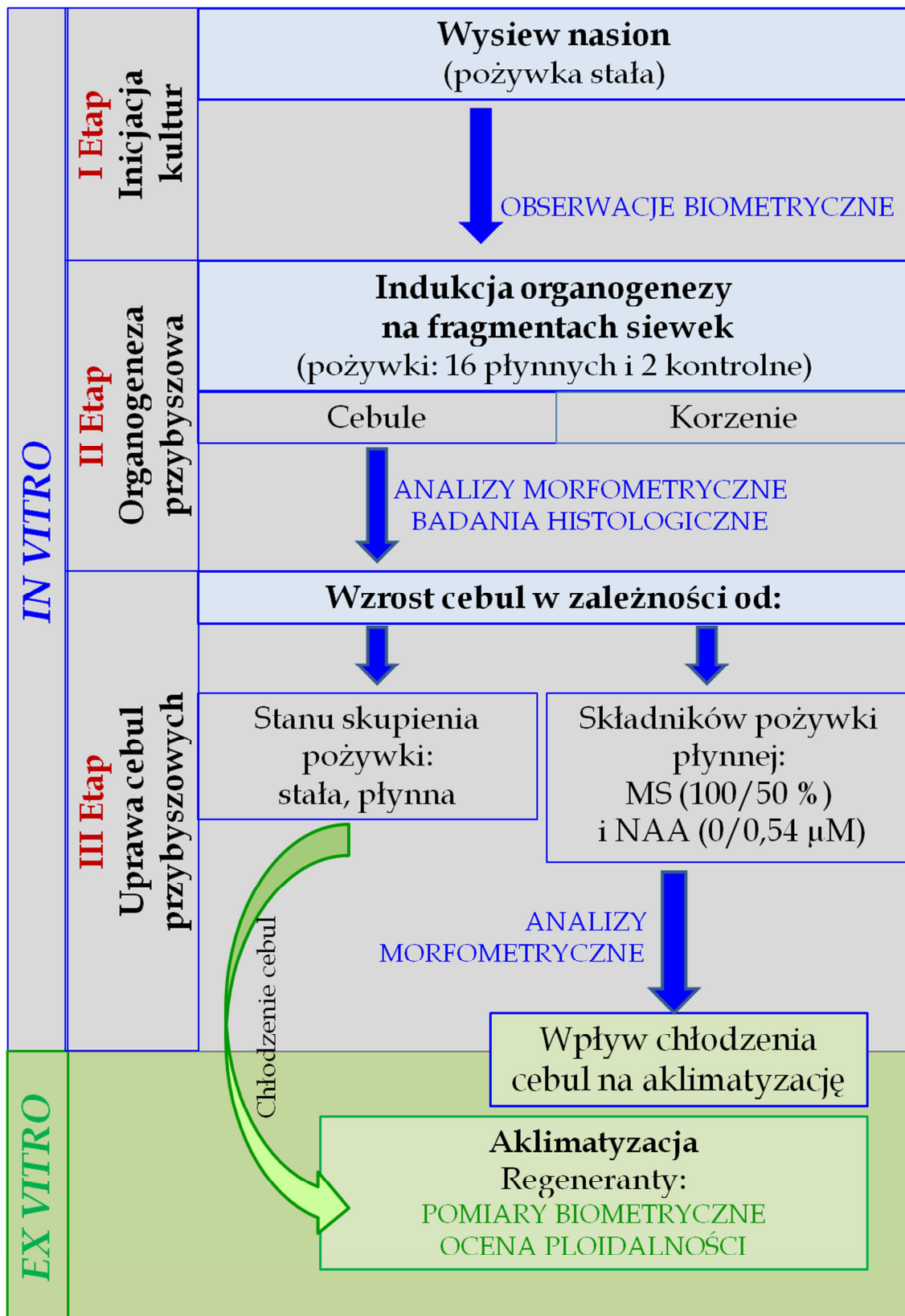
1. Kolekcja Roślin Ozdobnych w Tomaszkowicach na Pogórzu Wielickim (49°58'33.3"N 20°06'07.2"E),
2. Ogród prywatny w Tenczynku k. Krzeszowic, na górze Buczyna (50°07'29.9"N 19°36'54.9"E),
3. Kolekcja roślin gruntowych w Ogrodzie Uniwersyteckim Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa UR w Krakowie (ryc. 2) (50°05'03.6"N 19°57'05.2"E).

Nasiona zebrano w połowie września i do czasu wysiewu (przez pięć tygodni) przechowywano je w papierowych torebkach w temperaturze pokojowej.



Ryc. 2. Torebka nasienna i nasiona lili złotogłów do inicjacji kultur [fot. K. Nowak]

Doświadczenia z wykorzystaniem technik *in vitro*, a także badania histologiczne (sporządzanie preparatów mikroskopowych), wykonano w laboratorium Katedry Roślin Ozdobnych i Sztuki Ogrodowej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Uzyskane regeneranty aklimatyzowano w pokoju do aklimatyzacji przy fitotronie laboratorium *in vitro*. Ocenę stopnia ploidalności uzyskanych regenerantów wykonano w laboratorium Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego w Straszku. Schemat graficzny przedstawiający wykonane prace eksperymentalne i analizy ilustruje rycina 3.



Ryc. 3. Schemat przeprowadzonych prac eksperymentalnych, etapów badań oraz wykonanych analiz [opracowanie K. Nowak]

5.2. Inicjacja kultur *in vitro* - wysiew nasion lili złotogłów

Do inicjacji kultur (Etap I) wybrano z każdej populacji po 100 nasion. Nasiona ze wszystkich stanowisk były jednakowej wielkości, miały średnicę ok. 4 mm, zarodek był widoczny (ryc. 2). Nasiona poddano dezynfekcji powierzchniowej w 70% etanolu przez 60 sekund, następnie odkażano je przez 15 minut w 15% roztworze Domestosu (producent Unilever, substancja czynna podchloryn sodu 4,5 g w 100 g środka). Po odkażeniu trzykrotnie płukano je w sterylnej wodzie destylowanej. Zdezynfekowane nasiona wykładano pojedynczo do probówek (\varnothing 2 cm) na wyjałowioną w autoklawie (121°C; 0,1 MPa) pożywkę zawierającą 50% składników mineralnych wg Murashige i Skooga (1962) (MS), 3% sacharozy, zestaloną 0,7% agarem (Bacto producent Difco). Odczyn pożywki ustalono przed autoklawowaniem, pH 5,8. Probówki z nasionami umieszczono w fitotronie na okres 12 tygodni, w temperaturze 20°C, w ciemności, wilgotność względna powietrza wynosiła 80%.

Badania prowadzono w 3 powtórzeniach dla każdej populacji po 100 nasion (33-34 w powtórzeniu).

Skuteczność zastosowanej metody dezynfekcji powierzchniowej nasion oceniono wizualnie po 14 dniach od założenia kultury. Za zainfekowane uznano te z widocznymi objawami rozwoju grzybów i/lub bakterii.

W celu uchwycenia zmian w rozwoju kiełkujących nasion, od początku kultury, w odstępach trzydniowych, prowadzono szczegółowe obserwacje. Na ich podstawie wyrysowano schemat kiełkowania nasion lili złotogłów.

Zdolność kiełkowania nasion określono po 12 tygodniach kultury, procentowo określając liczbę/sumę skiełkowanych nasion. Za nasiono skiełkowane uznano takie, którego korzonek zarodkowy miał długość większą niż jego średnica [Dorywalski i in. 1964].

Dla wszystkich skiełkowanych nasion określono średni czas kiełkowania jednego nasiona. Obliczenia wykonano według wzoru Pipera [Dorywalski i in. 1964].

Średni czas kiełkowania jednego nasiona $a = \frac{(a \cdot x_1) + (a \cdot x_2) + \dots + (a \cdot x_n)}{L}$, gdzie

a – liczba skiełkowanych nasion (wytworzonych cebul/korzeni lub zaschniętych korzeni) na dzień obserwacji,

1, 2, ..., n – dzień odnotowania badanego stadium rozwojowego,

L – suma skiełkowanych nasion.

Na podstawie tych danych określono średni czas do:

- kiełkowania nasion,
- rozpoczęcia rozwoju cebuli (wyrastanie liści),
- wyrastania korzenia cebuli,
- zasychania hipokotyli.

Za początek formowania cebuli uznano dzień, w którym zaobserwowano podwojenie średnicy korzenia zarodkowego w części wierzchołkowej. Za początek wyrastania korzenia z cebuli uznano dzień, w którym korzeń był dłuższy od średnicy cebuli. Za początek zasychania hipokotyli uznano dzień, w którym zaobserwowano jego zasychanie na długości równej średnicy nasiona.

Po 12 tygodniach wykonano pomiar masy siewek na wadze elektronicznej Agrogen z dokładnością $\pm 0,1$ mg.

5.3. Indukcja organogenezy na fragmentach siewek

Do indukcji organogenezy (Etap II) wybrano 90 siewek uzyskanych z nasion ze stanowiska w Tomaszkowicach. Przy pomocy skalpela z każdej siewki wyodrębniono cebulę oraz korzeń i przygotowano eksplantaty (wtórne) do założenia doświadczenia. Każdą cebulę podzielono poprzecznie na 2 mm plastry (4-6 plastrów) i umieszczono w probówce (\varnothing 2 cm) wypełnionej 3 ml pożywki płynnej. Każdy korzeń podzielono na fragmenty 3-4 mm długości (6-9 fragmentów) i umieszczono w probówce o \varnothing 1 cm zawierającej 10 ml pożywki płynnej.

Tabela 4. Charakterystyka pożywek użytych do organogenezy przybyszowej na fragmentach siewek lilii złotogłów

Skład podstawowy pożywki MS [%]	Stężenie sacharozy w pożywce [%]	Rodzaj kultury	Stężenie regulatorów wzrostu [μ M]	
			NAA	BA
50	3	płynna	0	0
			0,54	0
			0	5,00
			0,54	5,00
	6		0	0
			0,54	0
			0	5,00
			0,54	5,00
100	3		0	0
			0,54	0
			0	5,00
			0,54	5,00
	6		0	0
			0,54	0
			0	5,00
			0,54	5,00
100	3	stała	0	0
	6	(kontrola)	0	0

W doświadczeniu testowano 16 kombinacji pożywki płynnej oraz 2 kombinacje pożywki stałej (kontrola) różniące się zawartością sacharozy, zawartością składników mineralnych, zastosowanymi regulatorami wzrostu (tab. 4). Odczyn wszystkich pożywek ustalono na poziomie 5,8 i wyjałowiono w autoklawie.

Probówki z eksplantatami umieszczano w fitotronie w ciemności, na wytrząsarce ELPAN typ 358S. Częstotliwość wytrząsania ustawiono na 200 obrotów na minutę z amplitudą 5. Temperatura wynosiła 20°C, wilgotność względna powietrza 80%. Co 2

tygodnie wymieniano pożywkę na świeżą o identycznym składzie i objętości, łącznie 7 pasaży.

Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach dla każdej z kombinacji, powtórzenie stanowiła jedna próbka.

5.3.1. Obserwacje morfometryczne

Na zakończenie doświadczenia, po 16 tygodniach kultury, przeprowadzono obserwacje morfometryczne i określono:

- liczbę uformowanych cebul przybyszowych na jednym eksplantacie,
- liczbę wytworzonych korzeni i liści na jednym eksplantacie,
- formowanie kalusa – ilość wytworzonego kalusa przedstawiono wg. skali umownej 1-5, gdzie 1=0-19,9%; 2=20-39,9%; 3=40-59,9%; 4=60-79,9%; 5=80-100% pokrycia eksplantatu kalusem
- wartość współczynnika przyrostu świeżej masy eksplantatu (GV)

$$GV = \frac{m_k - m_p}{m_p},$$

gdzie m_k - masa końcowa eksplantatu, m_p – masa początkowa eksplantatu;

- procentową zawartość suchej masy eksplantatu (susząco w temperaturze 62°C do stałej masy).

Dokonano obserwacji pod kątem anomalii we wzroście i rozwoju oraz określono % eksplantatów nadmiernie uwodnionych (zwitryfikowanych).

Sporządzono także dokumentację fotograficzną (mikroskop Leica MZ8 do obserwacji w świetle odbitym wyposażonym w zestaw do fotografii analogowej Leica MPS60).

5.3.2. Badania histologiczne

Na zakończenie doświadczenia do badań histologicznych wybrano różne rodzaje tkanek uformowanych na eksplantatach pochodzących z cebul, z każdej pożywki oddzielnie.

Do sporządzenia dokumentacji histologicznej wykonano preparaty mikroskopowe metodą parafinową. Po 12 tygodniach od założenia doświadczenia inicjacji organogenezy na fragmentach łusek cebulowych z każdej pożywki wyizolowano fragmenty eksplantatów i utrwalono w utrwalaczu Carnoya (kwas octowy lodowaty i alkohol etylowy 96% w stosunku 1:3). Utrwalacz wymyło alkoholem etylowym bezwodnym, a tkanki podbarwiono eozyną, odwodniono chloroformem i wysycono parafiną (temperatura topnienia 56°C). Zatopione w parafinie obiekty cięto na mikrotomie parafinowym Leica RM 2145 (grubość skrawków wynosiła 8-10 μm). Otrzymane wstążki parafinowe przyklejono na szkiełka przedmiotowe lepikiem Mayera. Po usunięciu parafiny ksylene preparaty barwiono hematoksyliną wg. Heidenheina [Gerlach 1972]. Dokumentację fotograficzną wykonano z użyciem mikroskopu świetlnego do obserwacji w świetle przechodzącym Zeiss Axio A1 z kamerą cyfrową AxioCam Mrc5.

5.4. Wzrost cebul przybyszowych

5.4.1. Wzrost cebul w zależności od stanu skupienia pożywki

Doświadczenie (Etap III) założono z cebul przybyszowych uzyskanych na czterech pożywkach płynnych, na których otrzymano największą liczbę cebul przybyszowych:

- 50% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu,
- 50% MS, 3% sacharozy, z dodatkiem 0,54 μM NAA,
- 100% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu,
- 100% MS, 3% sacharozy, z dodatkiem 0,54 μM NAA.

Cebule uzyskane na tych pożywkach (z każdej kombinacji oddzielnie, w 5 powtórzeniach) pozbawiono korzeni i liści i podzielono na dwie części, a następnie umieszczono je w kolbach Erlenmayer'a o objętości 50 ml. Użyto pożywki zawierającej 50% MS, 6% sacharozy, bez regulatorów wzrostu, o pH 5,8. Jedną połowę cebul wyłożono na pożywkę stałą (zestaloną agarem 0,7%), drugą umieszczono w pożywce płynnej. Każdą kombinację założono w 5 powtórzeniach (każde powtórzenie stanowiło od 16 do 20 cebul przybyszowych o łącznej masie około 1 g). Ilość użytej pożywki płynnej ustalono w proporcji do masy cebul 40 ml/1 g świeżej masy cebul. Kolby z cebulami umieszczono w fitotronie w ciemności w 20°C. Pożywkę płynną wytrząsano z częstotliwością 100 obrotów/minutę z amplitudą 5 cm na wstrząsarce ELPAN typ 358S. Materiał roślinny pasażowano co 2 tygodnie na świeżą pożywkę, zachowując jej początkową objętość.

Po 16 tygodniach kultury (7 pasaży) przeprowadzono analizy morfometryczne, oceniając wpływ stanu skupienia pożywki, oraz następstwa pożywek (stan skupienia, regulatory wzrostu, stężenie sacharozy) na formowanie kalusa, korzeni, cebul. Szczegółowo określono:

- wartość współczynnika przyrostu świeżej masy eksplantatu (GV - jak w odczynie 5.3.1),
- wartość współczynnika przyrostu świeżej masy cebuli (GV_c)

$$GV_c = \frac{m_{kc} - m_{pc}}{m_{pc}},$$

gdzie m_{kc} – średnia masa końcowa cebuli, m_{pc} – średnia masa początkowa cebuli.

Ponadto szczegółowo scharakteryzowano cebule (średnicę i wysokość cebuli, liczbę łusek w cebuli).

W trakcie doświadczeń sporządzono dokumentację fotograficzną cyfrowym aparatem fotograficznym Nikon Coolpix 995.

5.4.2. Wzrost cebul w zależności od składników pożywki płynnej

Do doświadczenia (Etap III) wytypowano cebule uformowane na czterech pożywkach, na których uzyskano największą ich liczbę w doświadczeniu etapu II:

- 50% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu,
- 50% MS, 3% sacharozy, z dodatkiem 0,54 μM NAA,
- 100% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu,

- 100% MS, 3% sacharozy, z dodatkiem 0,54 μM NAA.

Na tym etapie eksperymentowania do obserwacji wzrostu cebul zastosowano identyczne pożywki na jakich cebule się uformowały. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach dla każdej pożywki (pojedyncze powtórzenia zawierały od 8 do 20 cebul przybyszowych o łącznej masie około 1 g). Cebule pozbawione liści i korzeni umieszczono w kolbach Erlenmayer'a o objętości 50 ml. Dodano wyjałowioną w autoklawie pożywkę płynną w ilości 40 ml na g świeżej masy cebul. Kolby z eksplantatami umieszczono w fitotronie w ciemności na wstrząsarce ELPAN typ 358S. Intensywność wytrząsania ustawiono na 100 obrotów na minutę z amplitudą 5 cm. Temperatura kultur wynosiła 20°C, wilgotność względna powietrza 90%. Materiał roślinny pasażowano na świeżą pożywkę, co 2 tygodnie, zachowując ustaloną objętość pożywki. Po 16 tygodniach (7 pasaży) przeprowadzono analizy morfometryczne, by ocenić wpływ poszczególnych składników pożywki na:

- wartość współczynnika przyrostu świeżej masy wyłożonych cebul (GV - jak w rozdziale 5.3.1),
- liczbę uformowanych korzeni i liści,
- formowanie kalusa (wg skali opisanej w rozdziale 5.3.1),
- wartość współczynnika przyrostu świeżej masy cebul (GVc - jak w rozdziale 5.4.1),
- witrifikację eksplantatu (jak w rozdziale 5.3.1).

W trakcie doświadczeń sporządzono także dokumentację fotograficzną cyfrowym aparatem fotograficznym Nikon Coolpix 995.

5.5. Aklimatyzacja cebul

5.5.1. Wpływ chłodzenia cebul na aklimatyzację

W tym doświadczeniu zbadano wpływ chłodzenia cebul na ich rozwój i adaptację do warunków *in vivo*. Do eksperymentu użyto cebul uzyskanych w doświadczeniu nad wzrostem cebul na czterech różnych pożywkach płynnych (5.4.2). Przeznaczono tu cebule o masie większej niż 0,01 g – 550 szt., dobrej jakości, bez uszkodzeń mechanicznych, objawów witrifikacji oraz przerostów kalusa. Pozbawione korzeni i liści cebule traktowano na dwa sposoby. Jedną grupę umieszczono w kolbach Erlenmayer'a na wilgotnej, sterylnej bibule i poddano chłodzeniu przez 6 tygodni w temperaturze 3°C, w ciemności, po czym sadzono je do wielodoniczek. Druga grupa to cebule niepoddane chłodzeniu, które sadzono od razu po pobraniu. Cebule z jednej i drugiej grupy sadzono do wielodoniczek (komórki 50×50×60 mm), a przed sadzeniem zaprawiono je 1% roztworem środka grzybobójczego (Topsin M70 WP). Wielodoniczki wypełniono substratem torfowym (producent HARTMAN Polska Sp. z o.o. zawierającym mielony torf wysoki ze złóż litewskich frakcja 0-20 mm, pH 5,5-6,5, z dodatkiem PG Mix N:P2O5:K2O 14:16:18).

Posadzone cebule (w każdej kombinacji 5 powtórzeń, a w każdym powtórzeniu 55 szt.) umieszczono w pokoju wzrostowym w temperaturze 20°C. Rośliny doświetlano 12 godzin/dobę lampą SON-T AGRO 400 (Philips). W trakcie okresu wegetacji rośliny

trzykrotnie nawieziono roztworem płynnego wieloskładnikowego nawozu ogrodniczego Florovit o stężeniu 0,025% (producent Inco Veritas) po 6, 12 i 18 tygodniach uprawy.

W tym doświadczeniu określono:

- liczbę cebul zaaklimatyzowanych i rozwijających liść,
- liczbę cebul zaaklimatyzowanych nierozwijających liścia ale tworzących korzenie,
- liczbę cebul obumarłych,
- liczbę dni od posadzenia cebuli do pojawienia się pierwszego liścia nad powierzchnią podłoża,
- okres wegetacji (liczba dni od wyrosnięcia nad powierzchnię podłoża pierwszego liścia do jego zaschnięcia),
- liczbę zaaklimatyzowanych cebul ogółem (tu zaliczono cebule, które wytworzyły liść oraz te, które go nie wytworzyły, ale przeżyły w podłożu i wytworzyły korzenie).

5.5.2. Wpływ stanu skupienia pożywki na aklimatyzację chłodzonych cebul

Do doświadczeń nad aklimatyzacją wykorzystano poddane chłodzeniu (warunki jak w 5.5.1) cebule z doświadczenia opisanego w rozdziale 5.4.2, na pożywkach płynnych (180 szt.) i stałych (141 szt.). Wszystkie cebule aklimatyzowano w takich samych warunkach (jak w doświadczeniu 5.5.1). Określono te same parametry, które opisano w rozdziale 5.5.1.

5.6. Analiza statystyczna

Dla wszystkich zebranych wyników pomiarów biometrycznych zastosowano metody statystyki opisowej zawarte w programie Statistica 12. Przeprowadzono analizę wariancji ANOVA. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem Duncana na poziomie istotności $p=0,05$.

5.7. Ocena ploidalności regenerantów

Spośród zaaklimatyzowanych roślin wybrano losowo po 2 rośliny z każdej pożywki. Kontrolę stanowiły liście lilii z kolekcji w Tomaszkowicach. Łącznie 10 prób. Do analiz pobrano najmłodsze liście, które rozwijały zaaklimatyzowane cebule, był to zwykle trzeci liść, który się pojawiał. Świeżo zebrane liście każdy oddzielnie umieszczono w pojemniku schłodzonym do 5°C i wyściełanym wilgotną bibułą, następnie tak przygotowane liście w dniu zbioru przetransportowano do Straszkowa. Próby do analizy cytometrycznej przygotowano zgodnie z zaleceniami Galbraith'a i in. [1983] z niewielkimi modyfikacjami. Pojedynczy liść rozdrabniano na płytce Petriego za pomocą żyłki w obecności 1 ml buforu lizującego i barwnika fluorochromowego (indolo-4,6-dwuamidyno-2-fenylidyny). Następnie dodawano 2 ml wody destylowanej, a zawartość filtrowano przez filtr nylonowy o średnicy oczek 50 µm. Przefiltrowana próba była analizowana za pomocą cytometru przepływowego PA II w laboratorium Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego w Straszku.

6. Wyniki

6.1. Inicjacja kultur – wysiew nasion lili złotogłów

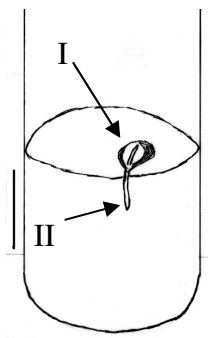
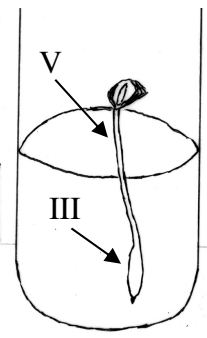
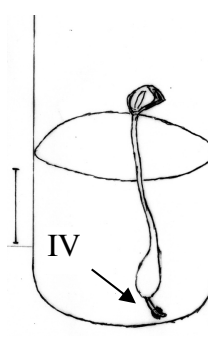
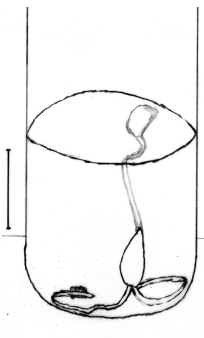
Zastosowana metoda dezynfekcji powierzchniowej nasion w 70% etanolu przez 60 sekund, następnie przez 15 minut w 15% roztworze Domestosu była skuteczna w 100% dla nasion pochodzących z Tomaszkowic oraz z Tenczynka. Mniejszą skuteczność dezynfekcji powierzchniowej (82%) uzyskano dla nasion pozyskanych z kolekcji w Krakowie (tab. 5). Wszystkie nasiona zebrane w Tomaszkowicach skiełkowały. Na podobnym poziomie statystycznym była zdolność kiełkowania nasion pochodzących z Tenczynka (80%). Zdolność kiełkowania nasion z krakowskiej kolekcji była na poziomie 57,8%. Okres kiełkowania nasion nie zależał od stanowiska, z którego je pozyskano i wyniósł średnio 35 dni.

Tabela 5. Wpływ pochodzenia nasion lili złotogłów na skuteczność dezynfekcji, kiełkowanie i rozwój siewek w warunkach *in vitro*

Pochodzenie nasion	Nasiona zdezynfekowane [%]	Zdolność kiełkowania nasion [%]	Okres kiełkowania nasion [dni]	Liczba dni od siewu do rozpoczęcia:		
				formowania cebuli	wyrastania korzenia z cebuli	zasychania hipokotyli
Tomaszkowice	100 b*	100,0 b	31,8 a	47,5 a	59,8 a	59,8 a
Tenczynek	100 b	80,0 ab	35,9 a	38,6 a	57,7 a	57,4 a
Kraków UR	82 a	57,8 a	36,2 a	43,5 a	47,5 a	60,7 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Proces kiełkowania nasion i rozwoju siewek lili złotogłów w warunkach *in vitro* podzielono na cztery etapy (ryc. 4). Pierwszy obejmował pęcznienie nasion i kiełkowanie (do momentu aż wyrastający korzeń zarodkowy osiągnął długość równą średnicy nasiona) - trwał on średnio 35 dni (ryc. 4A). W drugim etapie następował wzrost wydłużeniowy korzonka zarodkowego i początek formowania cebuli (wyznaczony podwojeniem się średnicy korzonka w części wierzchołkowej) rozpoczynający się średnio po upływie 44 dni od wysiewu nasion (ryc. 4B). W trzecim etapie, po 55 dniach od siewu, kończył się wzrost cebuli i rozpoczynał rozwój korzenia wyrastającego z piętki cebuli (ryc. 4C). Po 61 dniach od siewu nasion obserwowano zasychanie hipokotyli (ryc. 4D). Uzyskane wyniki z obserwacji kiełkowania i rozwoju siewek otrzymanych z nasion pochodzących z różnych stanowisk nie różniły się istotnie (tab. 5).

Schemat kiełkowania				
	A	B	C	D
	kiełkowanie	początek rozwoju cebuli	początek wyrastania korzenia z cebuli	początek zasychania hipokotyłu
Liczba dni od wysiewu	35	44	55	61

Ryc. 4. Etapy kiełkowania nasiona i rozwoju siewki lili złotogłów (podziałka = 1cm): I – nasiono; II- korzonek zarodkowy; III – cebula; IV – korzeń cebuli; V – hipokotyl [opracowanie K. Nowak]

Siewki o największej masie uzyskano z nasion zebranych z roślin rosnących w kolekcji w Tomaszkowicach (tab. 6). Masa korzeni i cebul siewek z tego stanowiska była większa w porównaniu do siewek uzyskanych z nasion zebranych z roślin rosnących na pozostałych dwóch stanowiskach.

Tabela 6. Wpływ pochodzenia nasion na masę uzyskanych siewek lili złotogłów

Pochodzenie nasion	Masa (po 12 tygodniach) [g]		
	siewka	cebula	korzeń
Tomaszkowice	0,1128 b*	0,0554 b	0,0225 b
Tenczynek	0,0594 a	0,0286 a	0,0137 a
Kraków UR	0,0555 a	0,0267 a	0,0104 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Do kolejnego etapu badań przeznaczono cebule uzyskane z nasion roślin rosnących w Tomaszkowicach.

6.2. Organogeneza przybyszowa na fragmentach łusek cebulowych

W tym etapie badań eksplantatami do indukcji organów przybyszowych były korzenie i łuski z cebuli uformowanej na siewkach. Na wyłożonych fragmentach korzeni nie obserwowano formowania organów przybyszowych, a korzenie w miarę trwania kultury zamierały, dlatego przedstawione w dalszej części pracy wyniki dotyczą indukcji

organogenezy na łuskach cebulowych, którą obserwowano z mniejszą lub większą intensywnością podczas testowania różnych pożywek. Zastosowano 12 pożywek płynnych oraz 2 pożywki kontrolne (nie zawierające regulatorów wzrostu, wzbogacone 3 lub 6% sacharozą, zestalone agarem). Ocenę parametrów biometrycznych uformowanych organów przeprowadzono po 16 tygodniach kultury (w tym okresie siedmiokrotnie wymieniano pożywkę na świeżą o identycznym składzie).

6.2.1. Wpływ stanu skupienia pożywki oraz poziomu sacharozy w pożywce na formowanie organów przybyszowych

Porównanie wpływu stanu skupienia pożywki i poziomu sacharozy na organogenezę analizowano z użyciem dwóch pożywek płynnych i zestalonych agarem zawierających 100% MS i 3% lub 6% sacharozy, nie zawierających regulatorów wzrostu. Analiza wykazała, że cebule przybyszowe, korzenie i liście oraz kalus formują się częściej i liczniej na pożywkach płynnych, niż zestalonych agarem (tab. 7). Niezależnie od stężenia sacharozy, na pożywce płynnej z jednego eksplantatu uzyskano 4-krotnie więcej cebul przybyszowych, 9-krotnie więcej korzeni, 13-krotnie więcej liści oraz prawie 3-krotnie więcej kalusa, w porównaniu do pożywki stałej. Na pożywkach płynnych u 1/3 eksplantatów wystąpiło zjawisko nadmiernego uwodnienia tkanek (witryfikacja), którego w ogóle nie obserwowano na pożywkach zestalonych agarem.

Tabela 7. Wpływ stanu skupienia pożywki na formowanie organów przybyszowych na łuskach cebulowych oraz na witryfikację (niezależnie od stężenia sacharozy)

Pożywka	Liczba				Witryfikacja eksplantatów [%]
	cebul przybyszowych [szt./eksplantat]	korzeni [szt./eksplantat]	liści [szt./eksplantat]	ilość kalusa [skala umowna]	
Płynna	14,8 b*	38,7 b	3,9 b	2,6 b	31,0 b
Stała	3,8 a	4,1 a	0,3 a	1,0 a	0,0 a

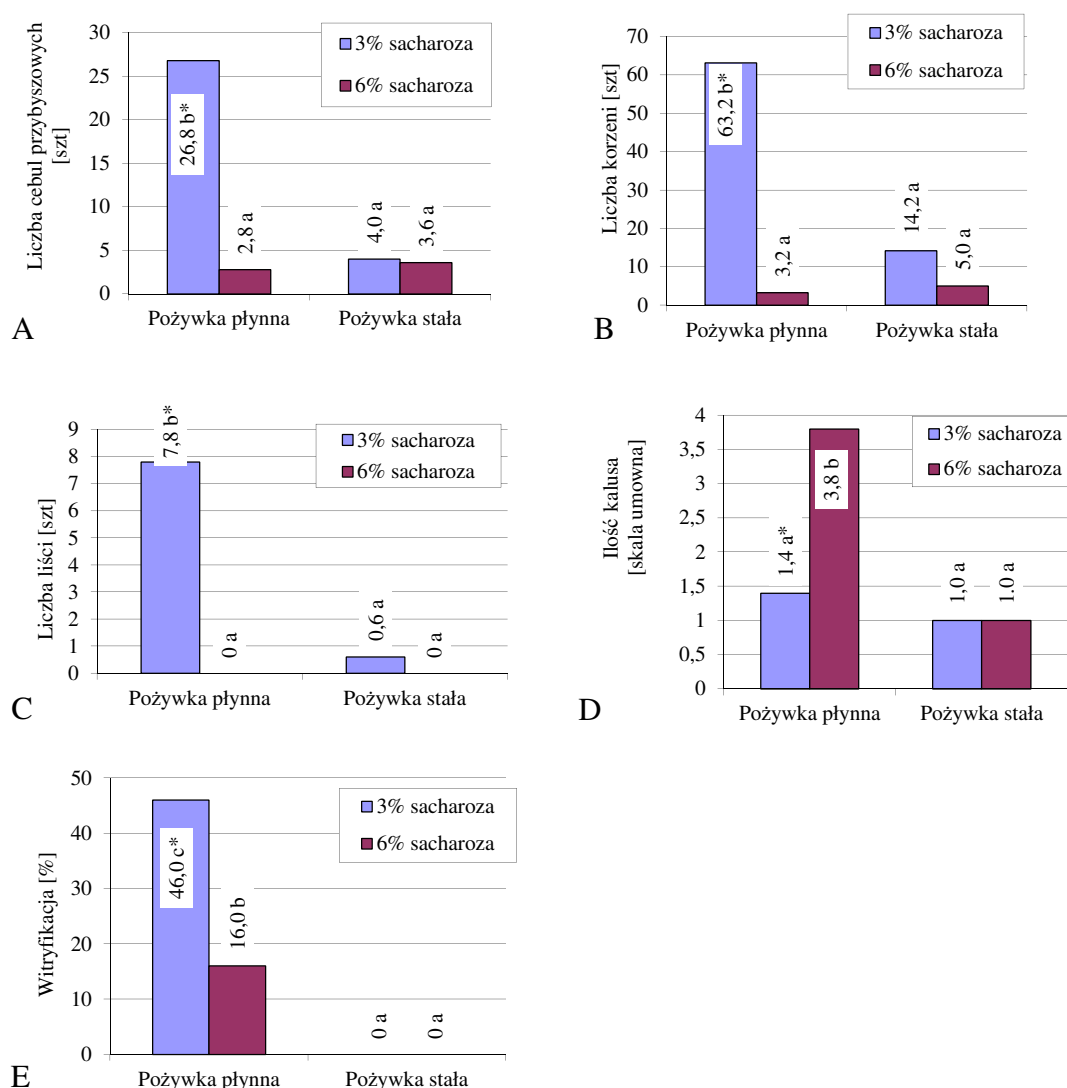
* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Tabela 8. Wpływ sacharozy w pożywce na formowanie organów przybyszowych na łuskach cebulowych oraz na witryfikację (niezależnie od stanu skupienia pożywki)

Stężenie sacharozy w pożywce [%]	Liczba				Witryfikacja eksplantatów [%]
	cebul przybyszowych [szt./eksplantat]	korzeni [szt./eksplantat]	liści [szt./eksplantat]	ilość kalusa [skala umowna]	
3	15,4 b*	33,2 b*	4,2 b*	1,2 a*	23,0 b*
6	3,2 a	9,6 a	0,0 a	2,4 b	8,0 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Analizując wpływ zawartości sacharozy w pożywce, niezależnie od stanu jej skupienia, stwierdzono, że niższy poziom tego cukru (3%) stymulował formowanie organów przybyszowych - uzyskano 5-krotnie więcej cebul przybyszowych, ponad 3-krotnie więcej korzeni i ponad 4-krotnie więcej liści, w porównaniu do pożywki zawierającej 6% sacharozy (tab. 8). Odmienną tendencję zanotowano obserwując ilość formowanego kalusa - 2-krotnie więcej kalusa uzyskano na pożywce zawierającej 6% sacharozy, niż na pożywce z 3% sacharozy. Zjawisko witrifikacji wystąpiło blisko 3-krotnie częściej na pożywce zawierającej mniej sacharozy w porównaniu do pożywki z wyższą zawartością tego cukru.



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 5. Wpływ stanu skupienia pożywki i zawartości sacharozy w pożywce na formowanie organów przybyszowych na fragmentach łusek cebulowych: A – liczba cebul przybyszowych, B - liczba korzeni C - liczba liści, D - ilość kalusa, E – witrifikacja

Analizując oddziaływanie obu badanych czynników (stanu skupienia pożywki i zawartości sacharozy) na przebieg organogenezy stwierdzono, że najwyższą indukcję cebul

przybyszowych, korzeni i liści uzyskano na pożywce płynnej zawierającej 3% sacharozy w porównaniu do pożywki płynnej z 6% sacharozą oraz pożywek zestalonych agarem z 3% i 6% sacharozą (ryc. 5A, B, C). Kalus powstawał najintensywniej na pożywce płynnej zawierającej 6% sacharozy (ryc. 5D). 3-4 krotnie mniej tej tkanki obserwowano na pożywce płynnej zawierającej 3% sacharozy oraz na pożywkach stałych zarówno z 3%, jak 6% sacharozy. Na pożywkach stałych nie zaobserwowano zjawiska witrifikacji (ryc. 5E). Natomiast na pożywkach płynnych wyższe stężenie sacharozy hamowało nadmierne uwodnienie tkanek.

6.2.2. Wpływ pożywek płynnych na formowanie organów przybyszowych

Oceniano przebieg organogenezy przybyszowej na fragmentach łusek cebulowych w pożywkach płynnych, badając wpływ składu mineralnego pożywki MS (50% i 100%), stężenia sacharozy (3% i 6%) oraz poziomu regulatorów wzrostu (12 pożywek płynnych, tabela 4).

Analiza wpływu składników podstawowych pożywki MS, niezależnie od poziomu regulatorów wzrostu i poziomu sacharozy w pożywce, wykazała, że obniżenie o połowę poziomu makro- i mikroelementów nie wpłynęło istotnie na liczbę formowanych cebul przybyszowych (uzyskano średnio 13 sztuk z jednego eksplantatu) oraz ilość kalusa, ale skutkowało powstawaniem blisko 2-krotnie mniejszej liczby korzeni oraz pięciokrotnie mniejszej liczby liści w porównaniu do pożywki 100% MS (tab. 9). Obniżenie do 50% zawartość MS w pożywce zmniejszyło witrifikację tkanek o połowę w porównaniu do podstawowej ilości MS.

Tabela 9. Wpływ MS w pożywkach płynnych na formowanie organów przybyszowych na łuskach cebulowych oraz na witrifikację (niezależnie od poziomu sacharozy i regulatorów wzrostu)

Stężenie pożywki MS [%]	Liczba				Witrifikacja [%]
	cebul przybyszowych [szt./eksplantat]	korzeni [szt./eksplantat]	liści [szt./eksplantat]	ilość kalusa [skala umowna]	
100	12,1 a*	16,3 b	6,7 b	3,4 a	32,4 b
50	13,6 a	9,2 a	1,4 a	3,3 a	16,5 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Analizując wpływ poziomu sacharozy w pożywce (niezależnie od pozostałych czynników) zaobserwowano efektywniejsze powstawanie cebul przybyszowych, korzeni oraz liści na pożywkach zawierających 3% sacharozy w porównaniu do pożywek z 6% sacharozą (tab. 10). Intensywniejszą inicjację kalusa uzyskano przy 6% sacharozy w porównaniu do 3% zawartości. Dwukrotnie częściej występowała witrifikacja tkanek uformowanych na pożywkach zawierających 3% sacharozy w porównaniu do pożywek z 6% sacharozą.

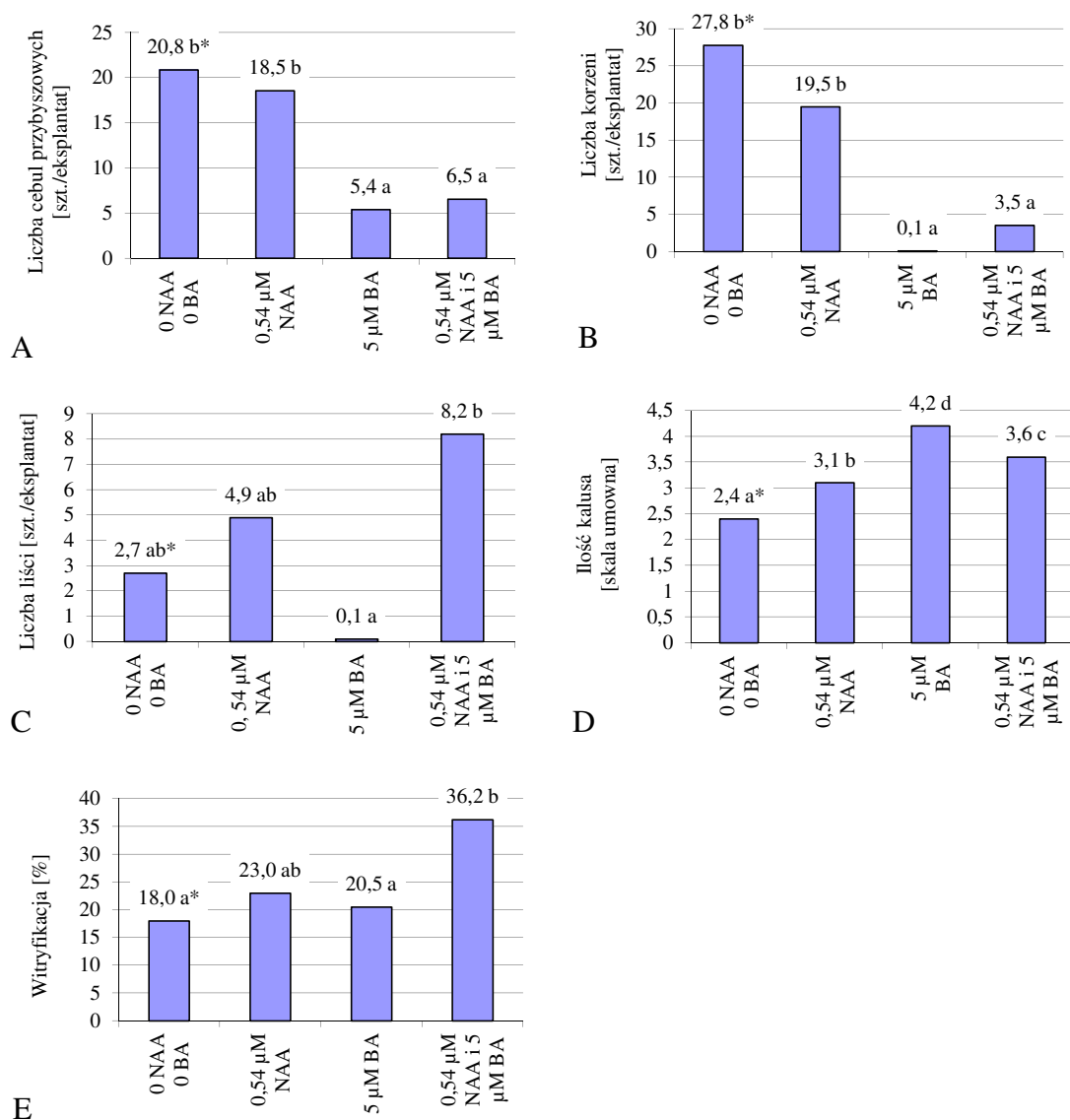
Tabela 10. Wpływ sacharozy na formowanie organów przybyszowych na łuskach cebulowych oraz na witrifikację (niezależnie od ilości MS i regulatorów wzrostu)

Stężenie sacharozy [%]	Liczba				Witrifikacja [%]
	cebul przybyszowych [szt./eksplantat]	korzeni [szt./eksplantat]	liści [szt./eksplantat]	ilość kalusa [skala umowna]	
3	22,2 b*	17,8 b	7,9 b	2,8 a	33,7 b
6	3,5 a	7,7 a	0,2 a	3,8 b	15,1 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Oceniając wpływ egzogennych regulatorów wzrostu (niezależnie od pozostałych czynników) wykazano, że największą liczbę cebul przybyszowych (średnio 20 sztuk na jeden eksplantat) i korzeni (średnio 24 sztuki jeden eksplantat) zanotowano na pożywkach bez regulatorów wzrostu oraz na pożywkach wzbogaconych w 0,54 μM NAA (ryc. 6A, B). Użycie cytokininy BA (5 μM) oraz tej cytokininy w kombinacji z 0,54 μM NAA zmniejszyło 4-krotnie liczbę powstałych cebul przybyszowych oraz 6-krotnie korzeni. Najwięcej liści (8,2 z eksplantatu) zanotowano na pożywkach: z dodatkiem BA + NAA, na średnim poziomie (średnio 4 z eksplantatu) na pożywce z NAA oraz bez regulatorów wzrostu, najmniej liści (0,1 z eksplantatu) obserwowano na pożywkach z dodatkiem BA (ryc. 6C). Najwięcej kalusa (4,2) formowało się na fragmentach łusek cebulowych na pożywce zawierającej BA, a najmniej (2,4) na pożywce bez regulatorów wzrostu (ryc. 6D). Obecność NAA oraz BA w pożywce sprzyjało powstawaniu niekorzystnego zjawiska witrifikacji (ryc. 6E). Na pozostałych pożywkach to zjawisko występowało średnio o połowę rzadziej.

Oceniając oddziaływanie dwóch czynników jednocześnie (ilość MS oraz zawartość sacharozy) na organogenezę stwierdzono, że cebule przybyszowe najliczniej formowały się, na pożywce z dodatkiem 3% sacharozy (ryc. 7A). Na eksplantacie powstawało około 25 cebul przybyszowych, gdy pożywka zawiera 50% MS, 20 sztuk przy 100% składzie mineralnym MS, przy czym pomiędzy tymi wartościami nie było różnicy statystycznej. Dla porównania przy 6% stężeniu sacharozy w pożywce cebule przybyszowe formowały się na poziomie 2,5–4,5 sztuk na eksplantat (odpowiednio). Korzenie również najliczniej inicjowane były na pożywkach zawierających 3% sacharozy w porównaniu do 6%, co szczególnie było widoczne na pożywce zawierającej 100% MS (ryc. 7B). Najwięcej liści (13 sztuk) zaobserwowano na pożywkach zawierających 3% sacharozy i 100% MS, liście nie rozwijały się na pożywce 50% MS z 6% sacharozą (ryc. 7C). Inicjację większej ilości kalusa obserwowano na pożywkach zawierających 6% sacharozy w porównaniu do pożywek z 3% jej zawartością na obu stężeniach pożywki MS (ryc. 7D). Witrifikacja występowała najczęściej na pożywkach zawierających 3% sacharozy i 100% MS (ryc. 7E).

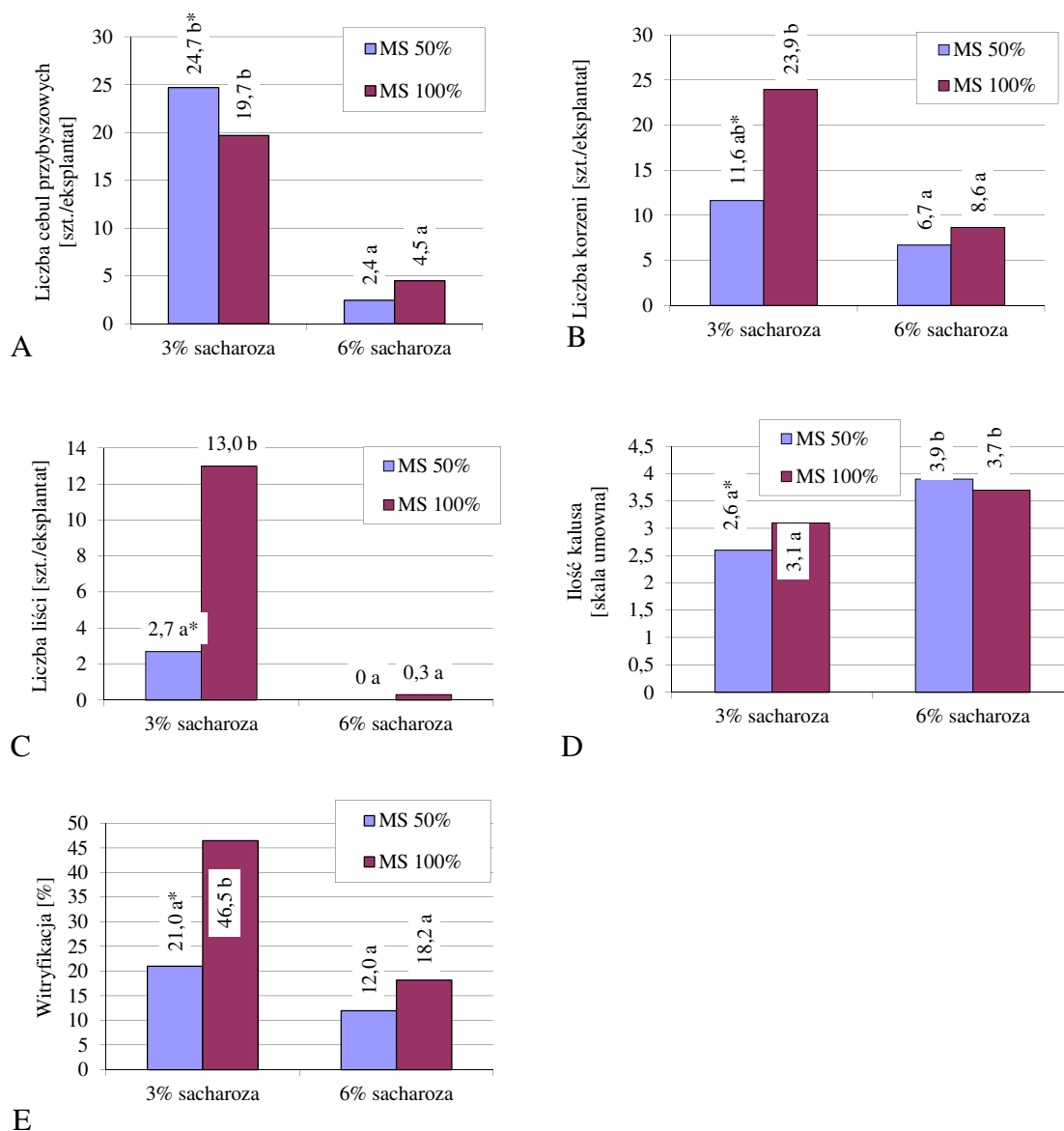


* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 6. Wpływ regulatorów wzrostu w pożywce (NAA, BA) na formowanie organów przybyszowych na łuskach cebulowych (niezależnie od ilości MS i poziomu sacharozy): A - liczba cebul przybyszowych, B - liczba korzeni, C - liczba liści, D - ilość kalusa, E - witrifikacja

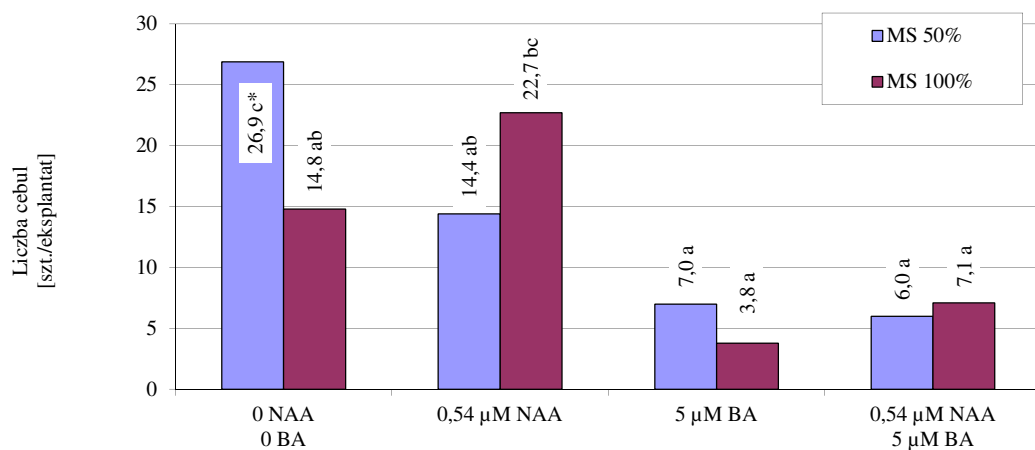
Oceniając wpływ regulatorów wzrostu (NAA i BA) oraz ilości składników MS (50% i 100%) na liczbę cebul przybyszowych (bez względu na zawartość sacharozy) stwierdzono, że pożywki zawierające 50% MS bez regulatorów lub 100% MS z dodatkiem NAA były najlepsze do inicjacji cebul przybyszowych - uzyskano na tych pożywkach odpowiednio około 27 oraz 23 cebul z eksplantatu (ryc. 8A). Najmniej cebul uzyskano na pożywkach zawierających w swym składzie tylko BA lub BA +NAA na obu poziomach MS. Najliczniej korzenie powstawały na pożywce 100% MS bez regulatorów wzrostu (około 39 korzeni z eksplantatu) (ryc. 8B). Podobny poziom istotności statystycznej (23 korzenie) zanotowano dla organogenezy przebiegającej na pożywce 100% MS z dodatkiem NAA. Podobnie jak w przypadku cebul, również najmniej korzeni zaobserwowano na pożywkach zawierających tylko BA lub BA w połączeniu z NAA na obu pożywkach MS. Najwięcej liści

zobserwowano na pożywce 100% MS z dodatkiem BA + NAA (13 liści na eksplantat) (ryc. 8C). Wartość ta była najwyższa, ale nie różniła się istotnie od tej jaką zanotowano dla eksplantatów formujących liście na pożywce 100% MS z NAA. Kalus powstawał we wszystkich analizowanych kombinacjach i w zależności od składu pożywki wystąpił w ilości 2,3-4,3 (ryc. 9A). Wykazano, że witrifikacja występuje częściej przy 100% składzie MS (z wyjątkiem pożywki z 5 μ M BA), niż gdy organogeneza przebiegała na pożywce z 50% MS (ryc. 9B).

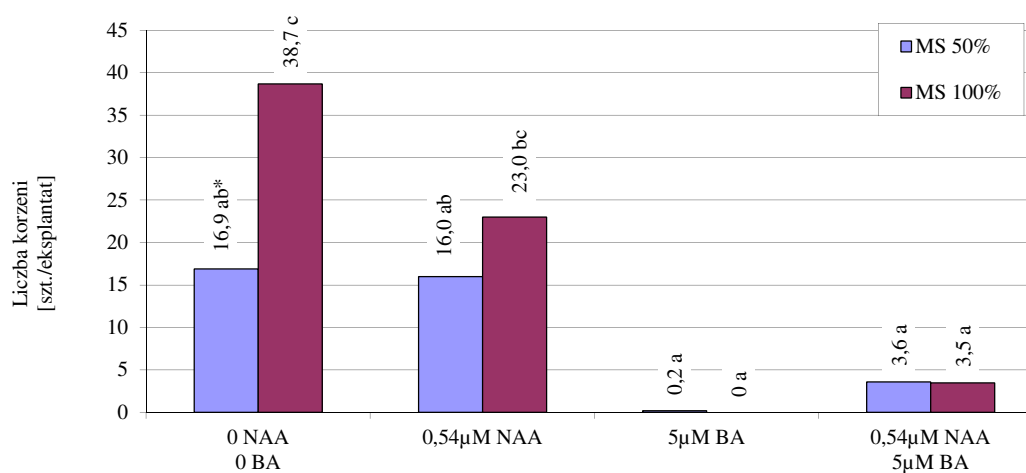


* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

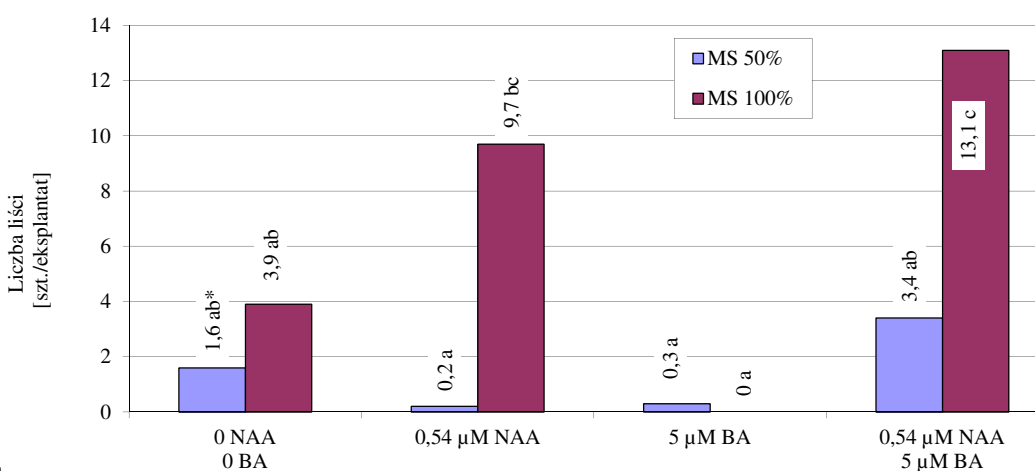
Ryc. 7. Wpływ ilości MS i sacharozy na formowanie organów przybyszowych na łuskach cebulowych (niezależnie od regulatorów wzrostu): A – liczba cebul przybyszowych, B - liczba korzeni, C - liczba liści, D – ilość kalusa, E – witrifikacja



A



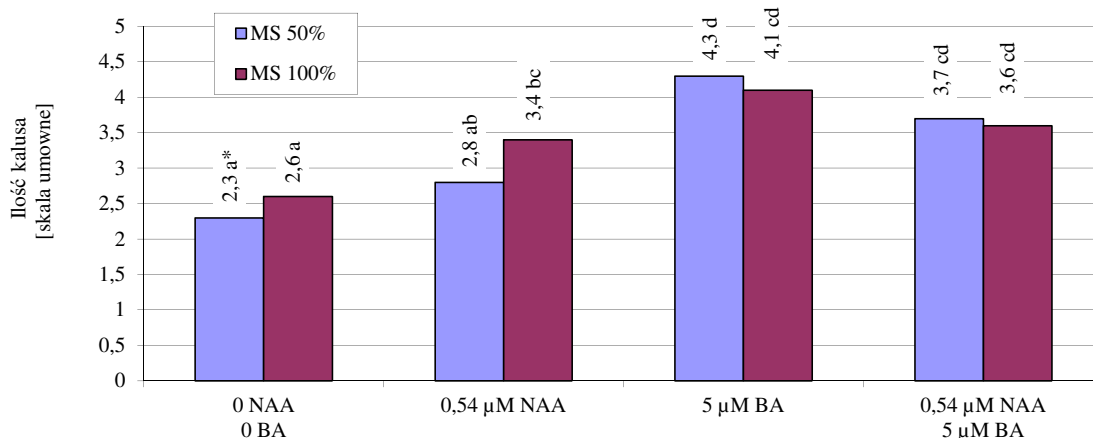
B



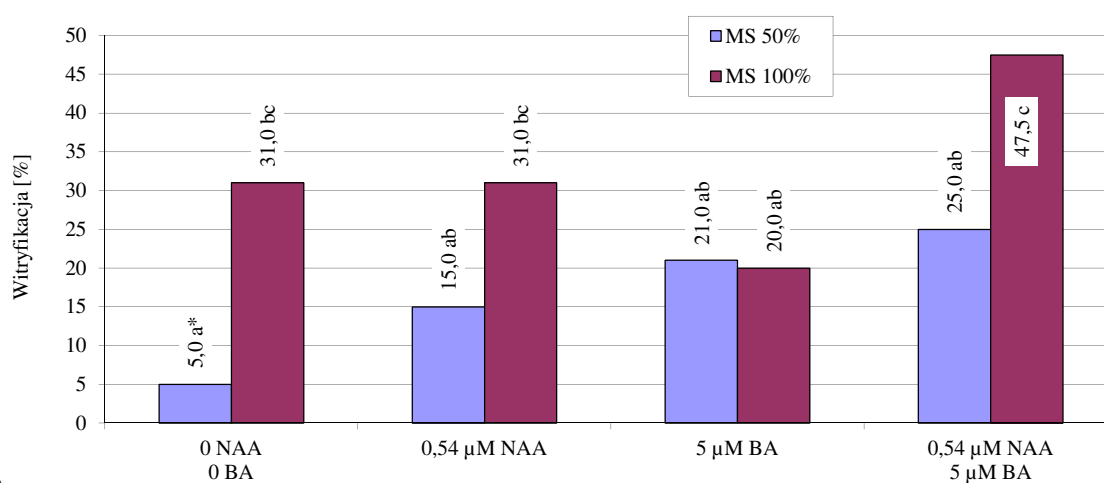
C

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 8. Wpływ MS i regulatorów wzrostu na formowanie organów przybyszowych (niezależnie od poziomu sacharozy w pożywce): A – liczba cebul przybyszowych; B – liczba korzeni, C - liczba liści



A

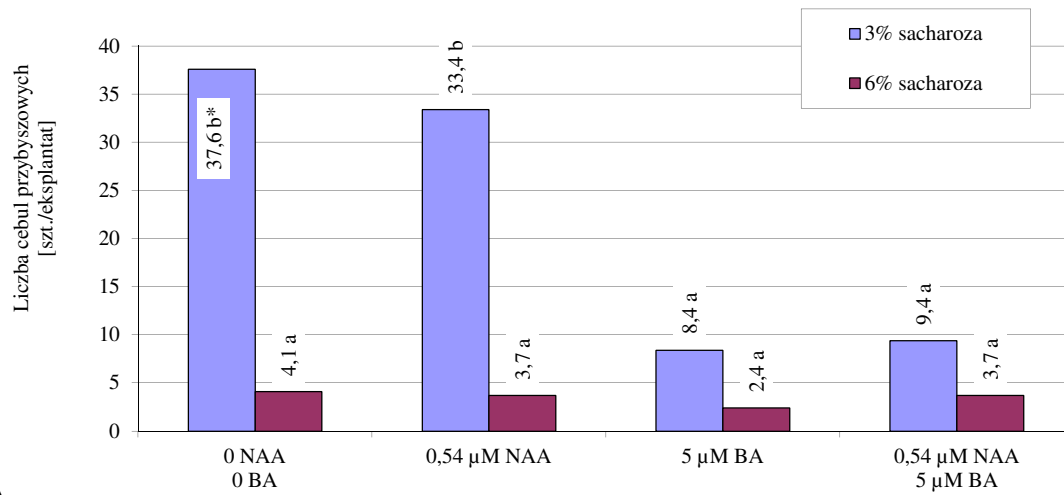


B

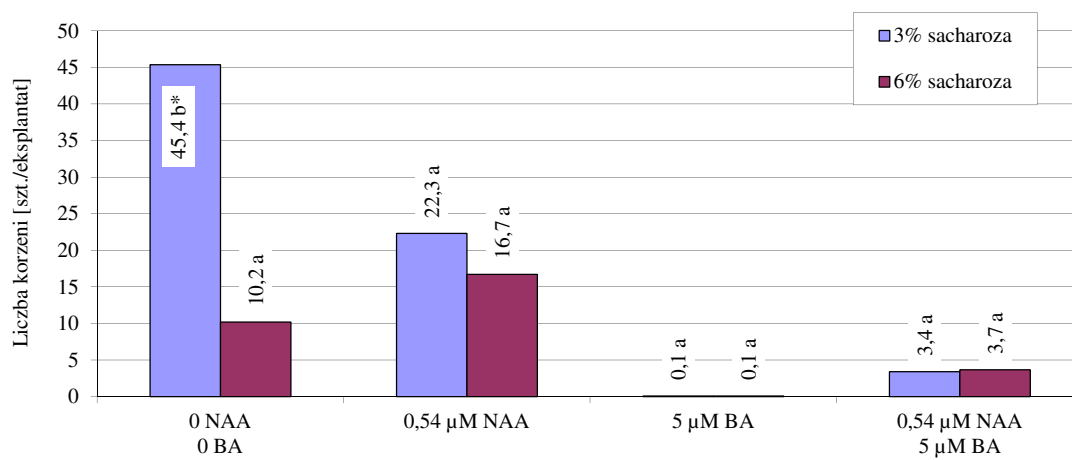
* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 9. Wpływ MS i regulatorów wzrostu na formowanie kalusa (A) i witryfikację (B) (niezależnie od poziomu sacharozy w pożywce)

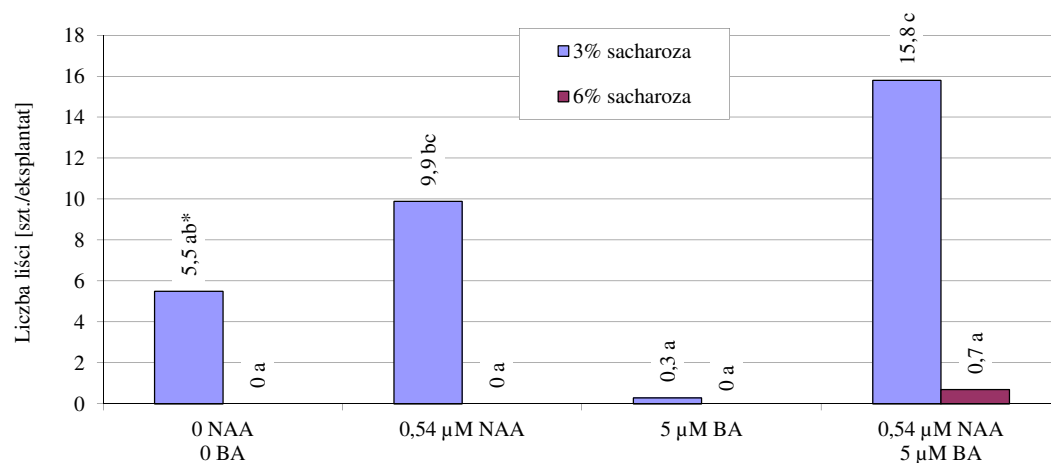
Analiza współdziałania różnych stężeń sacharozy oraz regulatorów wzrostu (niezależnie od zawartości składników MS) wykazała, że cebule przybyszowe najwydajniej tworzą się na pożywkach płynnych zawierających 3% sacharozy bez regulatorów wzrostu lub z dodatkiem NAA (średnio 33-38 cebul) (ryc. 10A). Najwięcej korzeni (45 sztuk) tworzyły eksplantaty w pożywkach zawierających 3% sacharozy bez regulatorów wzrostu (ryc. 10B). W przypadku pozostałych kombinacji pożywek uzyskano od około 3 do 22 korzeni z eksplantatu. Korzenie praktycznie nie formowały się, gdy pożywkę zawierającą 3 jak i 6% sacharozy uzupełniono 5 µM BA. Najwięcej liści (16 sztuk) obserwowano na eksplantatach uprawianych w pożywkach zawierających 3% sacharozy w połączeniu z NAA i BA (ryc. 10C). Wartość ta była najwyższa, ale nie różniła się istotnie od tej jaką uzyskano z eksplantatów uprawianych w pożywce z 3% sacharozy z dodatkiem NAA (około 10 liści). Nie zanotowano rozwoju liści na trzech pożywkach z 6% sacharozą: bez regulatorów wzrostu oraz z NAA i z BA.



A



B

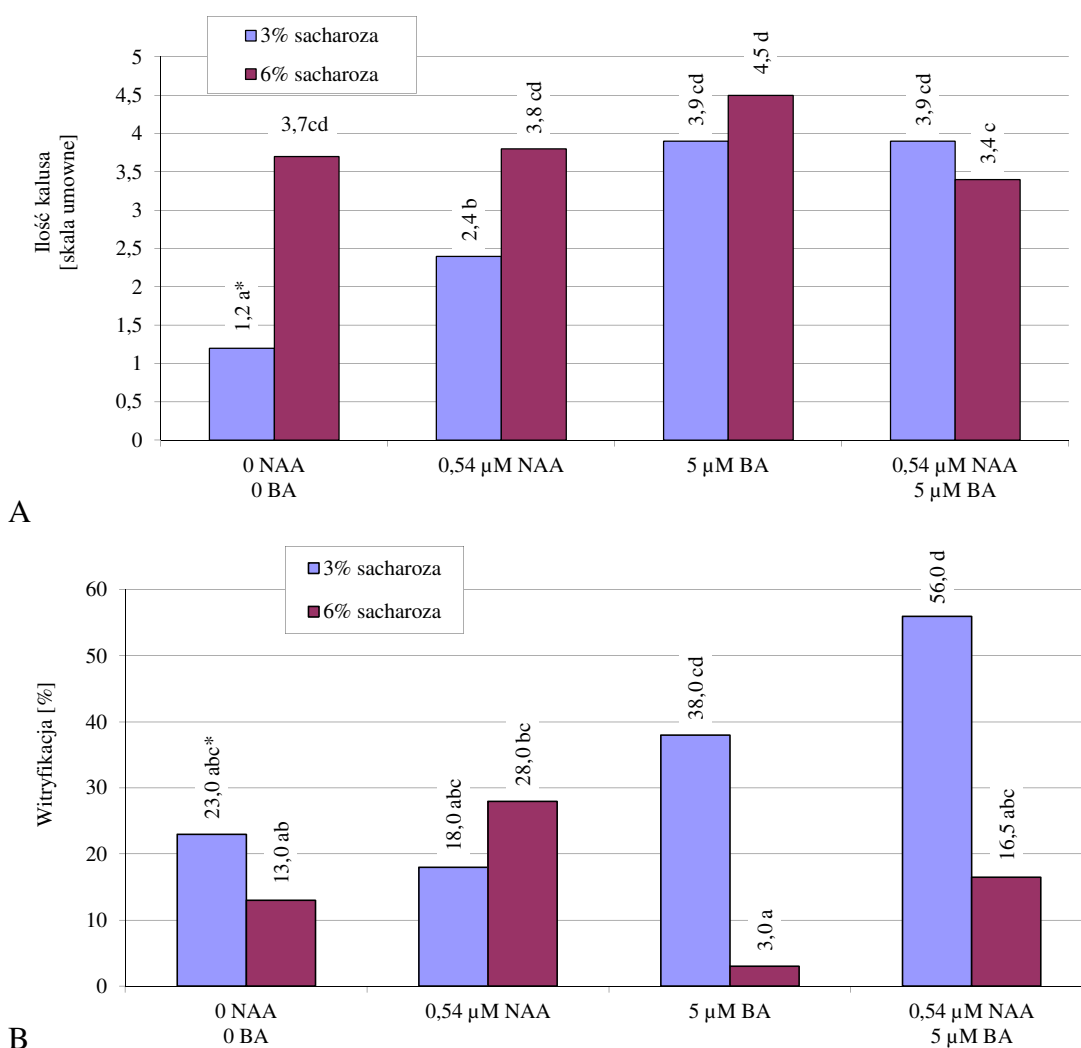


C

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 10. Wpływ sacharozy i regulatorów wzrostu na formowanie cebul, korzeni i liści (niezależnie od ilości MS w pożywce): A - liczba cebul przybyszowych, B - liczba korzeni, C - liczba liści

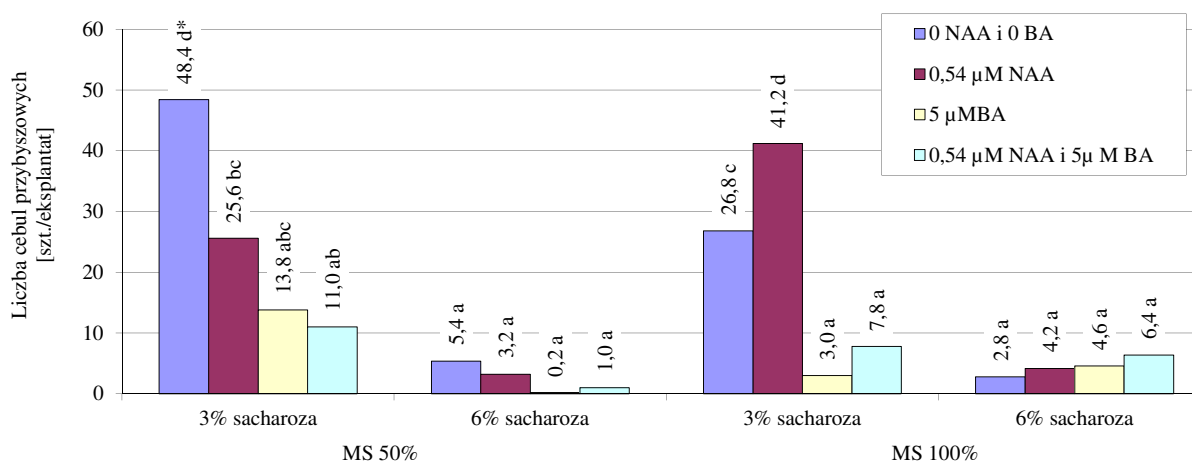
Najczęściej (oprócz kombinacji NAA + BA) więcej kalusa formowało się na pożywkach zawierających 6% sacharozy, w porównaniu do 3%, nie zawsze jednak różnice te były istotne statystycznie (ryc. 11A). Najmniej tej tkanki (1,2) zaobserwowano, gdy w pożywce z 3% sacharozą nie było regulatorów wzrostu. Najwięcej kultur (56%), w których obserwowano zjawisko witrifikacji, to eksplantaty uprawiane w pożywce zawierającej 3% sacharozy z dodatkiem NAA + BA (ryc. 11B). Na podobnym poziomie istotności pod względem tej cechy (38%) były kultury pochodzące z pożywki: 3% sacharoza + BA. W pozostałych kombinacjach zjawisko to zamykała się w przedziale 3,0-28%.



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

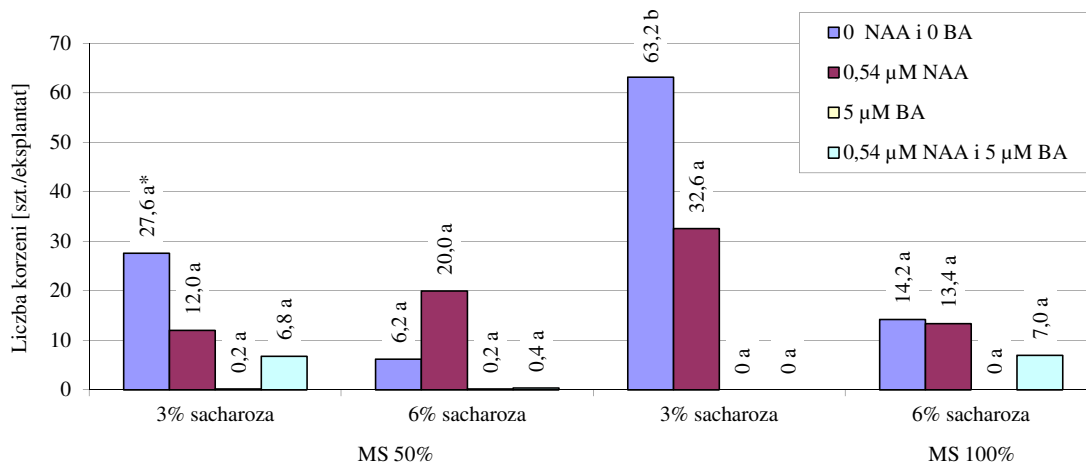
Ryc. 11. Wpływ sacharozy i regulatorów wzrostu (niezależnie od ilości MS w pożywce) na A - powstawanie kalusa oraz B - witrifikację kultur

Oceniając współdziałanie trzech badanych czynników (MS, sacharoza, regulatory wzrostu) wykazano, że największą liczbę cebul przybyszowych formowały eksplantaty uprawiane w pożywce zawierającej 50% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu (48 sztuk) (ryc. 12, 15A). Formowanie cebul na takim samym poziomie statystycznym (41 sztuk) obserwowano na pożywce 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 μ M NAA (ryc. 15B). Z danych przedstawionych na rycinie 12 wynika, że najslabiej proces formowania cebul przybyszowych przebiegał na pożywkach z 6% sacharozą, co potwierdziły wcześniej wykonane i przedstawione analizy jedno i dwuczynnikowe. Najwięcej korzeni (63 sztuki) zaobserwowano na pożywce 100% MS, 3% sacharozy bez regulatorów wzrostu (ryc. 13A). Obserwowano całkowity brak korzeni na cebulach uformowanych w pożywkach zawierających 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem BA lub BA + NAA oraz 100% MS, 6% sacharozy z BA. Liście najliczniej rozwijały się na pożywkach 100% MS, 3% sacharozy zawierających BA + NAA (25 sztuk) lub NAA (19 sztuk) (ryc. 13B). Na wszystkich pożywkach wzbogaconych 6% sacharozą nie obserwowano formowania się liści, z wyjątkiem pożywki 100% MS z BA + NAA, gdzie rozwinął się średnio 1 liść na eksplantacie. Rycina 13C pokazuje, że kalus formował się na wszystkich testowanych pożywkach płynnych (ryc. 15A-D), najslabiej na pożywce: 50% MS, 3% sacharozy, bez regulatorów wzrostu lub z NAA oraz na pożywce 100% MS, 3% sacharozy bez regulatorów wzrostu. Witryfikacji tkanek sprzyjały pożywki zawierające MS i 3% sacharozy we wszystkich kombinacjach regulatorów wzrostu (ryc. 14). Witryfikacji eksplantatów nie obserwowano lub wystąpiła ona w niewielkim nasileniu na pożywkach zawierających: 50% MS i 3% sacharozy bez regulatorów wzrostu lub z dodatkiem NAA; 50% MS, 6% sacharozy bez regulatorów wzrostu oraz wzbogaconych BA lub NAA + BA; MS, 6% niezależnie od obecności lub braku regulatorów wzrostu.

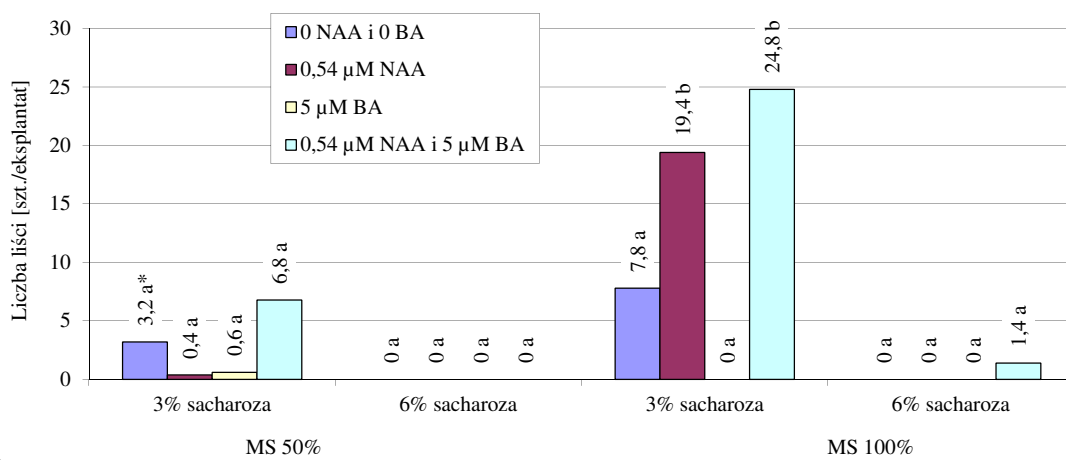


* średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

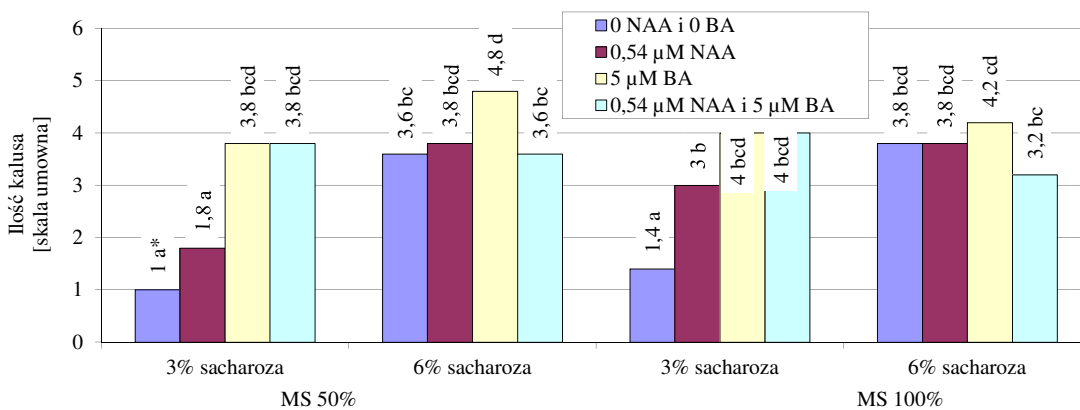
Ryc. 12. Wpływ ilości MS, sacharozy i regulatorów wzrostu na inicjację cebul przybyszowych z fragmentów łusek



A



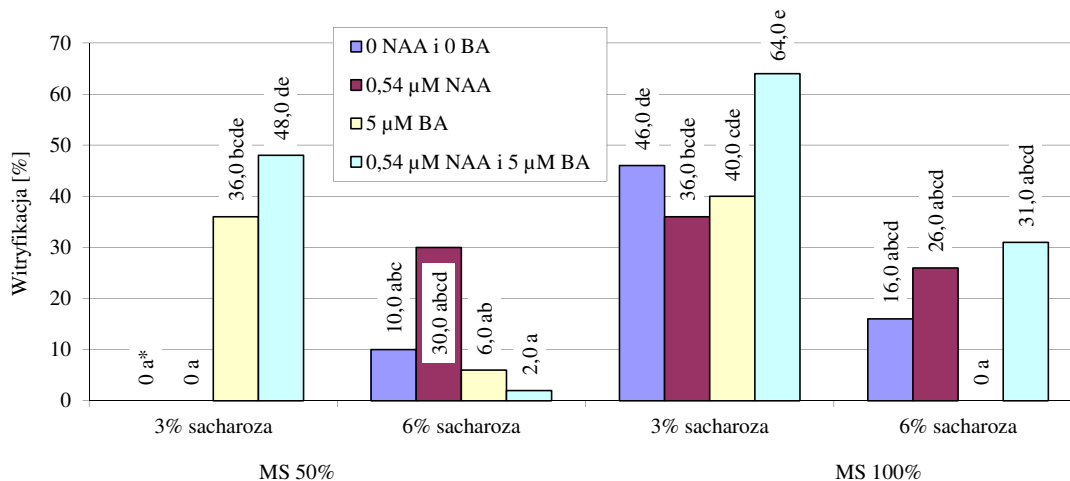
B



C

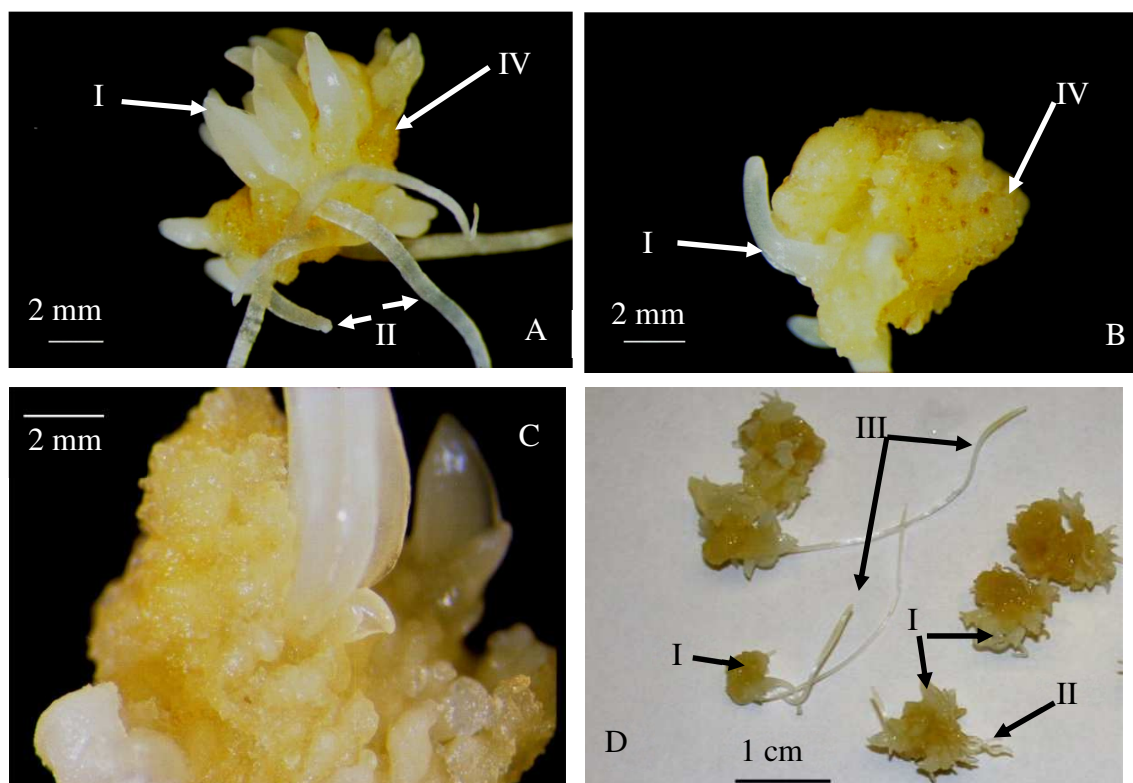
* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 13. Wpływ MS, sacharozy i regulatorów wzrostu na A - formowanie korzeni, B - rozwój liści, C - formowanie kalusa na łuskach cebulowych



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 14. Wpływ ilości MS, sacharozy i regulatorów wzrostu na witryfikację podczas organogenezy przybyszowej na fragmentach cebul uformowanych na siewkach lili



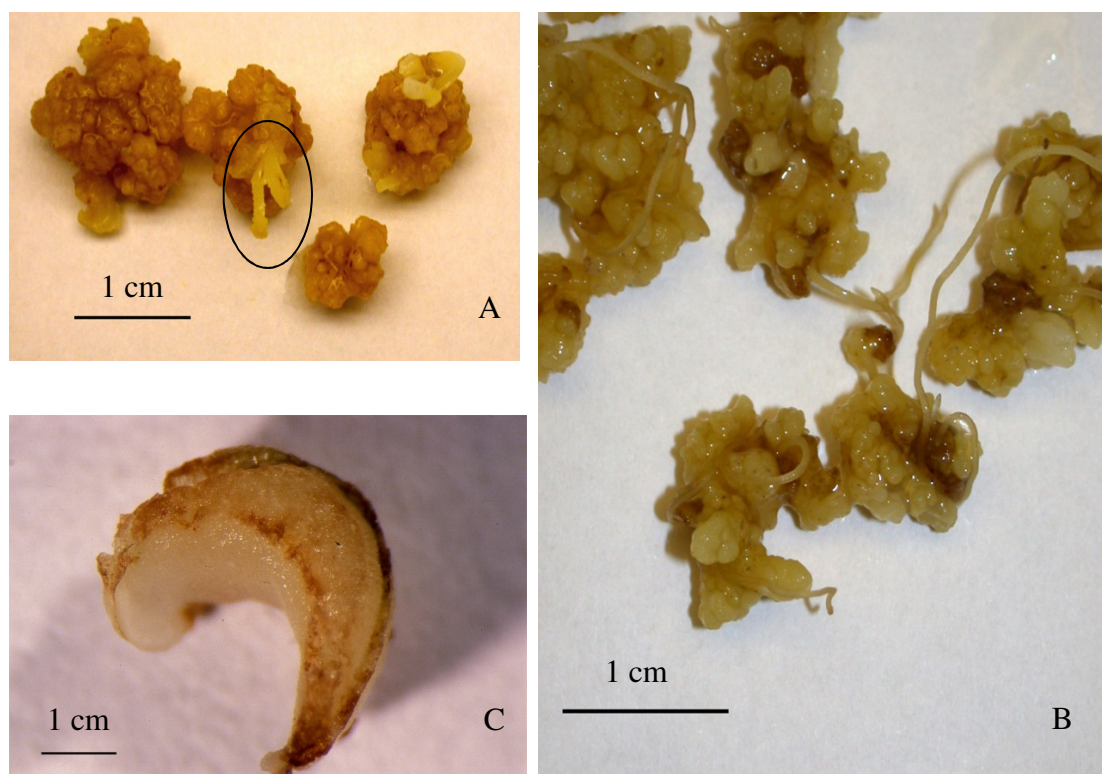
Ryc. 15. Regeneracja cebul przybyszowych, korzeni, liści i kalusa na fragmentach łusek cebulowych po 16 tygodniach kultury na pożywce zawierającej: A - 50% MS, 3% sacharozy; B - 50% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 µM NAA; C - MS i 3% sacharozy; D - MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 µM NAA. I – cebula przybyszowa; II – korzenie; III – liście; IV – kalus [fot. K. Nowak]

Wykonane w trakcie prowadzenia doświadczenia fotografie pozwoliły udokumentować nie tylko formowanie organów przybyszowych, ale także powstające nekrozy, deformacje oraz przerastanie kalusem cebul przybyszowych.

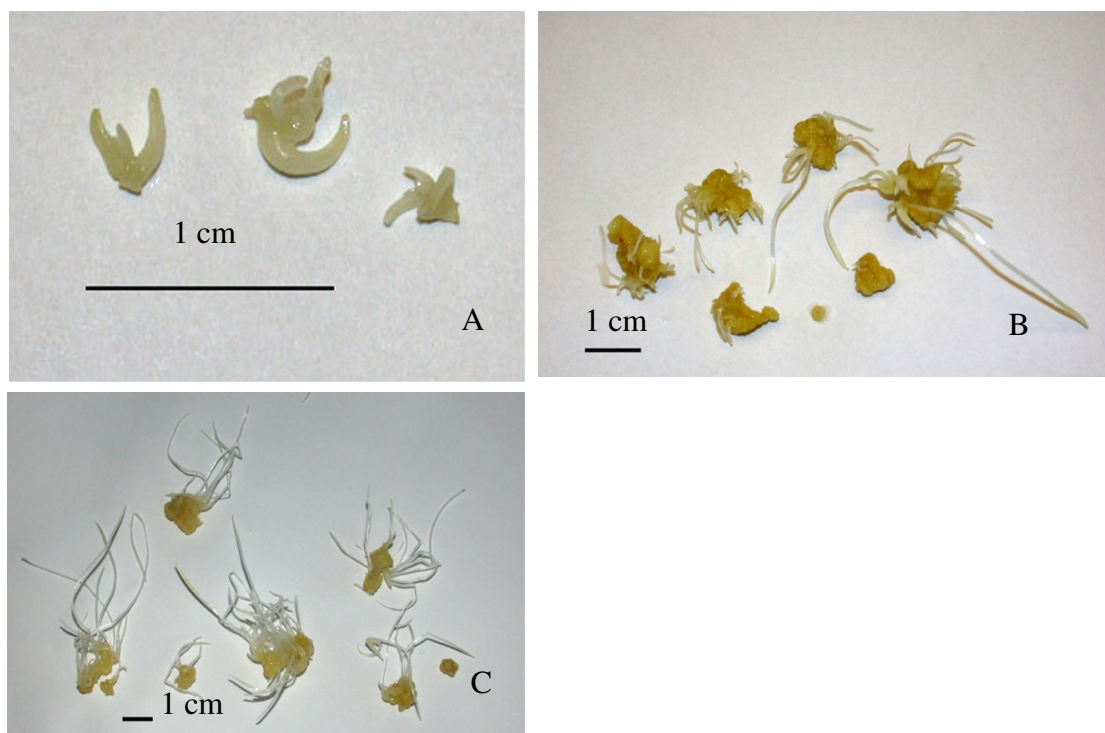
Wtórne formowanie kalusa na cebulach przybyszowych obserwowano na pożywkach: 50% MS, 6% sacharozy z dodatkiem BA (ryc. 16A); 100% MS, 6% sacharozy wzbogaconej NAA; oraz MS, 3% sacharozy z dodatkiem BA i NAA.

Nekrozy w postaci brązowych lub brunatnych plam pojawiały się na powierzchni eksplantatów kultywowanych w pożywkach płynnych: 50% MS, 6% sacharozy bez regulatora wzrostu; 100% MS, 6% sacharozy bez regulatora wzrostu (ryc. 16B) oraz pożywkach stałych 100% MS, 3% sacharozy oraz 100% MS, 6% sacharozy (ryc. 16C).

Deformacje cebul przybyszowych w postaci zwijania się łusek obserwowano na pożywce 50% MS, 6% sacharozy BA i NAA (ryc. 17A), regenerowanie cebul przybyszowych pozbawionych prawidłowo wykształconych łusek na pożywkach: 50% MS, 3% sacharozy wzbogaconej BA i NAA (ryc. 17B); MS, 6% sacharozy z dodatkiem BA i NAA (ryc. 17C) oraz 100% MS, 3% sacharozy wzbogaconej BA.



Ryc. 16. Anomalie we wzroście i rozwoju po 16 tygodniach kultury: A - formowanie kalusa na cebulach przybyszowych obserwowane na pożywce płynnej 50% MS, 6% sacharozy z dodatkiem BA; powstawanie nekroz na powierzchni eksplantatów: B - pożywka płynna MS, 6% sacharozy bez regulatora wzrostu; C – pożywka stała 100 % MS, 6% sacharozy [fot. K. Nowak]



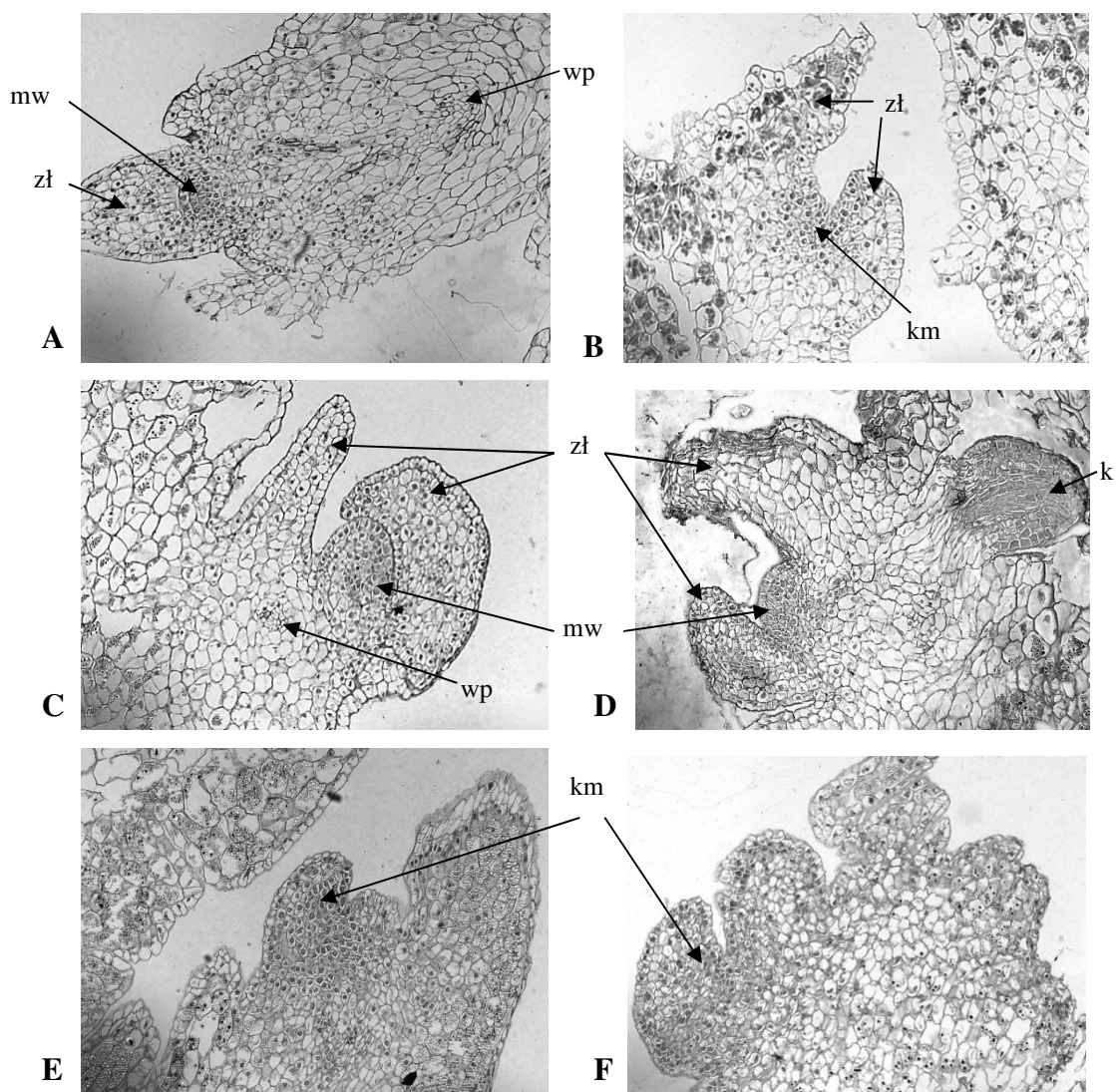
Ryc. 17. Deformacje cebul przybyszowych zaobserwowane w pożywkach płynnych po 16 tygodniach kultury: A - zwijanie łusek cebuli na pożywce 50% MS, 6% sacharozy BA i NAA; regenerowanie cebul przybyszowych bez wyraźnie wykształconych łusek na pożywkach: B - 50% MS, 3% sacharozy wzbogaconej BA i NAA; C - 100% MS, 6% sacharozy z dodatkiem BA i NAA [fot. K. Nowak]

Na preparatach wykonanych z fragmentów eksplantatów po 16 tygodniach kultury zaobserwowano formowanie nowych zawiązków cebul przybyszowych z zewnętrznych warstw komórek eksplantatów na pożywkach, których skład pobudzał do intensywnego inicjowania cebul przybyszowych (ryc. 12). Początkowy etap powstawania zawiązka cebuli uchwycono na fragmencie eksplantatu kultywowanym na pożywce płynnej 50% MS, 3% sacharozy z dodatkiem NAA. Widoczna jest tu grupa dzielących się komórek z dużymi jądrami, a po bokach tego zgrupowania formujące się zawiązki łusek (ryc. 18B). Bardziej zaawansowane w rozwoju zawiązki cebul z wykształconym merystemem wierzchołkowym, łuskami, wiązkami przewodzącymi i korzeniem uchwycono na pożywkach płynnych: 50% MS, 3% sacharozy (ryc. 18A), 100% MS, 3% sacharozy (ryc. 18C), 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem NAA (ryc. 18D).

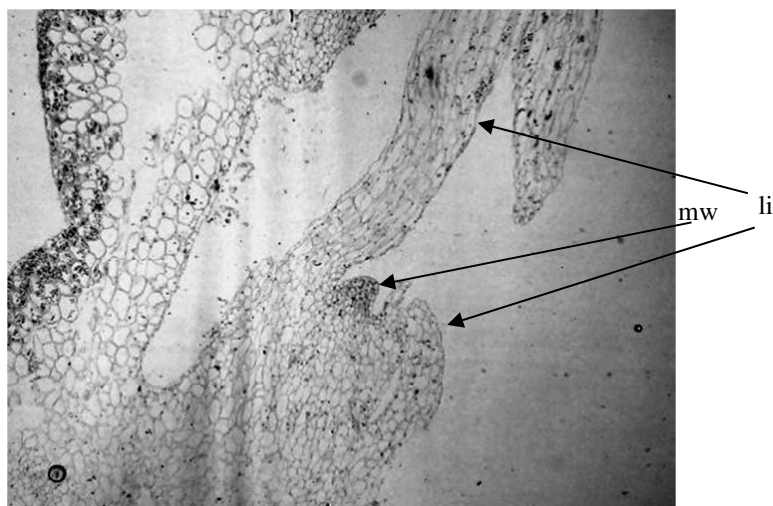
Kalus powstający intensywnie na pożywkach z 6% sacharozą (ryc. 13C) pokazano na rycinie 18E i F (pożywka 100% MS, 6% sacharoza, oraz 100% MS, 6% sacharoza z dodatkiem 0,54 μM NAA – odpowiednio). Widoczna jest tu gruzelkowata struktura powierzchni z grupami intensywnie dzielących się komórek merystematycznych w obrębie grudek.

Rycina 19 przedstawia przekrój podłużny przez zdeformowany zawiązek cebuli uzyskany na pożywce 100% MS, 6% sacharozy z dodatkiem BA i NAA. Widoczny zawiązek nie wykształcił łusek cebulowych z dużymi owalnymi komórkami miękiszu spichrzowego

(widoczne u zawiązków cebul ryc. 18A i D), zamiast nich zregenerował liść z wąskim ogonkiem zbudowanym z wydłużonych komórek.



Ryc. 18. Zawiązki cebul przybyszowych uzyskane po 16 tygodniach kultury płynnej na pożywce:
A - 50% MS, 3% sacharozy, powiększenie 100×; B - 50% MS, 3% sacharozy
wzbogaconej 0,54 μM NAA, powiększenie 100×; C - MS, 3% sacharozy, powiększenie
100×; D - 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 μM NAA, powiększenie 100×, oraz
kalus; E - 100% MS, 6% sacharoza, powiększenie 100×; F - 100% MS, 6% sacharoza
z dodatkiem 0,54 μM NAA, powiększenie 100×. zł – zawiązki łusek, mw – merystem
wierzchołkowy, wp – wiązka przewodząca, k – korzeń, km – komórki merystematyczne
[fot. K. Nowak]



Ryc. 19. Zawiązek cebuli przybyszowej bez wykształconych łusek z pożywki 100% MS, 6% sacharoza, 0,54 μM NAA i 5 μM BA, powiększenie 25 \times , mw – merystem wierzchołkowy, li –liść [fot. K. Nowak]

6.3. Wzrost cebul

W tym etapie przeprowadzono dwa eksperymenty, a materiałem roślinnym były cebule uformowane w poprzednim cyklu.

6.3.1. Wzrostu cebul na pożywce płynnej i zestalonej agarem

W tym eksperymencie materiałem badawczym były cebule uzyskane na drodze organogenezy na fragmentach łusek cebulowych w czterech pożywkach płynnych: 50% MS, 3% sacharozy; 50% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 μM NAA; 100% MS, 3% sacharozy; 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 μM NAA. Pochodzące z tych pożywek cebule wyłożono na dwie pożywki zawierające 50% MS, 6% sacharozy, różniące się stanem skupienia (stała i płynna).

Tabela 11. Rozwój cebul lili złotogłów na pożywce wzrostowej stałej oraz płynnej (niezależnie od składu pożywki inicjalnej)

Pożywka	Współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu [GV]	Współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli [GVc]	Średnica cebuli [mm]	Wysokość cebuli [mm]	Liczba łusek [szt./1 ceb.]
Płynna	34,6 b*	16,3 b	3,5 b	11,3 b	5,0 b
Stała	11,2 a	4,5 a	2,4 a	8,2 a	3,3 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Po 16 tygodniach kultywacji zaobserwowano tworzenie się nowych cebul, powiększanie się wyjściowych, na powierzchni części cebul formował się kalus, formowały się również korzenie (ryc. 25, 26).

Biorąc pod uwagę stan skupienia pożywki, wykazano, że niezależnie od składu pożywki inicjalnej (na której cebule w poprzednim doświadczeniu uformowały się), w pożywce płynnej świeża masa całych rozrośniętych eksplantatów (cebule wraz z korzeniami, liśćmi i kalusem) oraz cebul zwiększyła się odpowiednio trzykrotnie oraz czterokrotnie w porównaniu do pożywki stałej (tab. 11). Cebule uprawiane w pożywce płynnej miały większą średnicę i wysokość oraz wytworzyły więcej łusek, niż te uprawiane na pożywce zestalonej agarem.

Ocena wpływu następstwa pożywek wykazała, że przyrost świeżej masy cebul inicjowanych na pożywkach zawierających 100% MS (niezależnie od zawartości regulatora wzrostu) na pożywce wzrostowej (niezależnie od jej stanu skupienia), był 1,5 razy większy w porównaniu do pożywki zawierającej 50% MS (tab. 12). Natomiast pożywka inicjalna z obniżoną o połowę ilością składników MS (niezależnie od zawartości regulatora wzrostu) pobudziła cebule do wzrostu, które w konsekwencji uzyskały większą wysokość na pożywce wzrostowej (niezależnie od jej stanu skupienia). Nie odnotowano istotnych różnic w przyroście świeżej masy samych cebul, ich średnicy oraz w liczbie łusek.

Tabela 12. Wpływ ilości MS w pożywce inicjalnej (niezależnie od NAA) na wzrost cebul lili złotogłów na pożywce wzrostowej (niezależnie od stanu jej skupienia)

Zawartość składników MS w pożywce inicjalnej [%]	Współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu [GV]	Współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli [GVc]	Średnica cebuli [mm]	Wysokość cebuli [mm]	Liczba łusek [szt./1 ceb.]
50	18,7 a*	11,2 a	2,9 a	10,5 b	4,3 a
100	27,0 b	9,6 a	3,0 a	9,1 a	3,9 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

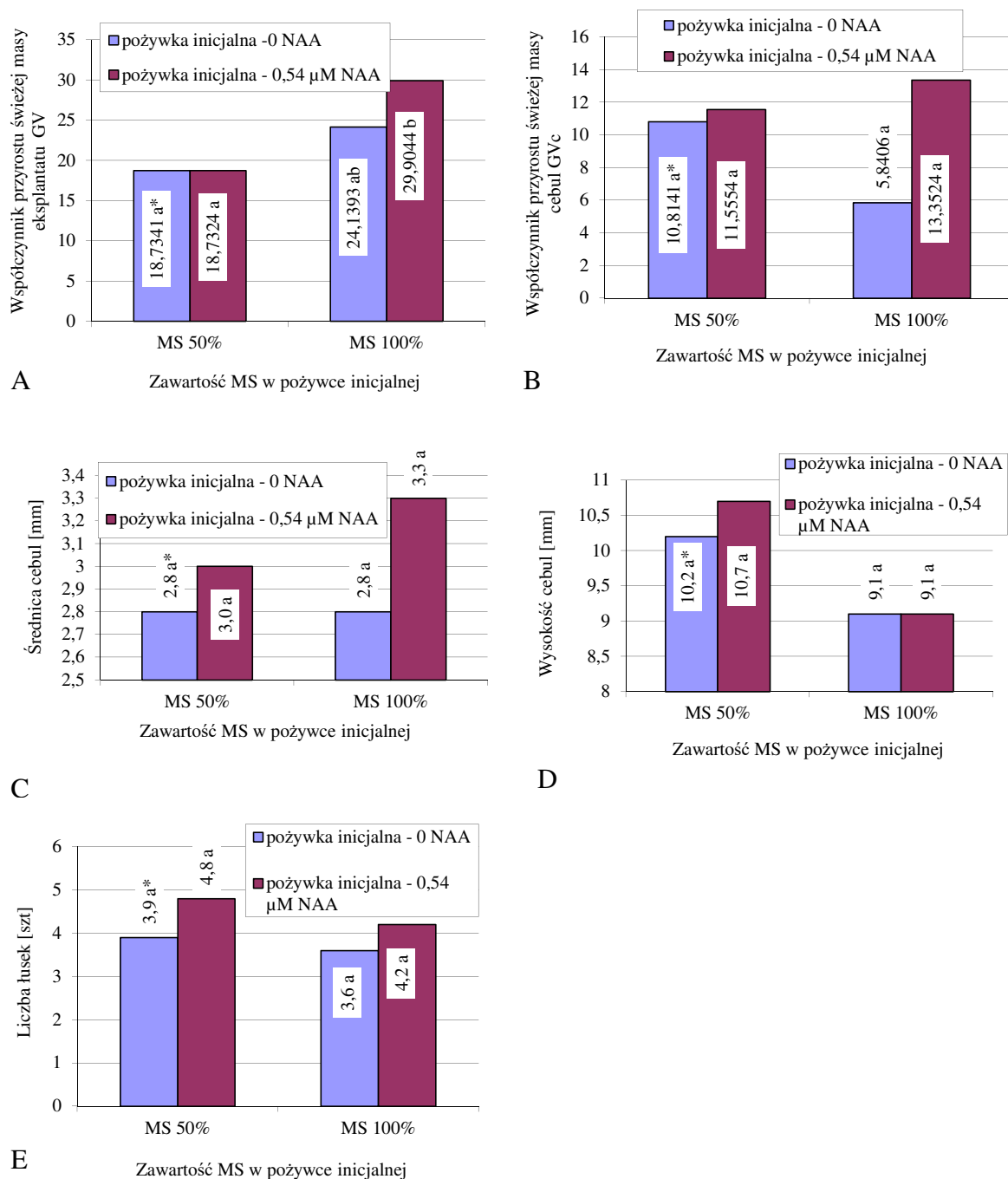
Tabela 13. Wpływ NAA w pożywce inicjalnej (niezależnie od ilości MS) na wzrost cebul lili złotogłów na pożywce wzrostowej (niezależnie od stanu jej skupienia)

Zawartość NAA w pożywce inicjalnej [μ M]	Współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu [GV]	Współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli [GVc]	Średnica cebuli [mm]	Wysokość cebuli [mm]	Liczba łusek [szt./1 ceb.]
0	21,4 a*	8,3 a	2,8 a	9,7 a	3,8 a
0,54	24,3 a	12,5 a	3,0 a	9,9 a	4,5 b

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ocena wpływu NAA dodanej do pożywki inicjalnej (niezależnie od zawartości MS) wykazała, że cebule inicjowane w obecności NAA wytworzyły średnio o ponad jedną łuskę więcej w czasie uprawy na pożywce wzrostowej (niezależnie od jej stanu skupienia)

w porównaniu do cebul inicjowanych na pożywce bez auksyny (tab. 13). Zastosowanie NAA do inicjacji nie wpłynęło istotnie na przyrost świeżej masy eksplantatów, świeżą masę cebuli, ich średnicę, oraz wysokość.



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 20. Wpływ ilości MS i NAA w pożywce inicjalnej na wzrost cebul lilii złotogłów na pożywce wzrostowej (niezależnie od stanu skupienia): A – współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu, B – współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli, C – średnica cebuli, D – wysokość cebuli, E - liczba łusek

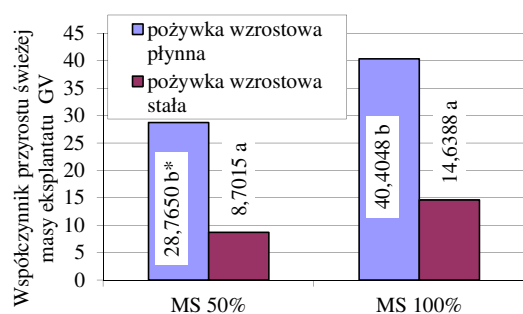
Zastosowanie do inicjacji pożywki zawierającej 100% MS, zarówno bez jak i z dodatkiem NAA, wpłynęło pozytywnie na przyrost świeżej masy eksplantatu (współczynnik przyrostu GV = 24,2 i 29,9 odpowiednio) na pożywce wzrostowej niezależnie od jej stanu skupienia w porównaniu do pożywki inicjalnej z 50% MS, bez jak i z dodatkiem NAA (GV = 18,7 i 18,7 odpowiednio) (ryc. 20A). Różnice w składzie pożywek inicjalnych nie wpłynęły istotnie na pozostałe cechy (średnica i wysokość cebuli, przyrost świeżej masy cebul, liczba łusek) oceniane na pożywce wzrostowej, zarówno płynnej, jak i zestalonej agarem (ryc. 20B-E).

Zawartość MS w pożywce inicjalnej (analizowana niezależnie od obecności auksyny) nie wpłynęła istotnie na: współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu (ryc. 21A), współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli (ryc. 21B), średnicę (ryc. 21C) oraz wysokość cebuli (ryc. 21D), a także na liczbę łusek uzyskanych w jednej cebuli (ryc. 21E). Natomiast w przypadku tych cech istotnym czynnikiem okazał się stan skupienia pożywki wzrostowej - wzrost cebul był wydajniejszy na pożywce płynnej (21A-E).

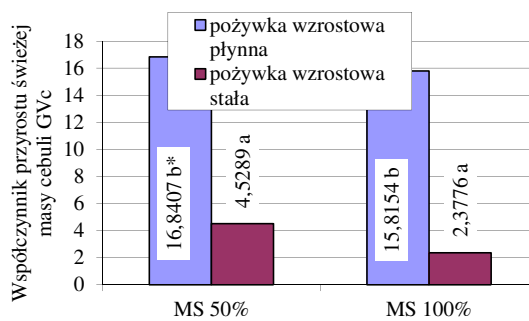
Wpływ obecności lub braku NAA w pożywce inicjalnej (analizowany niezależnie od ilości MS w tej pożywce) na dalszy wzrost cebul w pożywce wzrostowej płynnej lub stałej przedstawiono na rycinie 22. Trzykrotnie większy przyrost świeżej masy eksplantatu (ryc. 22A) oraz cebule o większej wysokości (ryc. 22D) uzyskano w pożywce wzrostowej płynnej. Największy przyrost świeżej masy cebuli (GVc=20,9) uzyskano, gdy indukowano je na pożywce zawierającej NAA, a następnie umieszczono w pożywce wzrostowej płynnej (ryc. 22B). Cebule o większej średnicy i liczbie łusek uzyskano po kultywacji w pożywce wzrostowej płynnej, po tym jak pozyskano je z pożywki inicjalnej wzbogaconej w NAA (ryc. 22C, E).

Analizując przebieg wzrostu cebul w zależności od składników z pożywki inicjalnej oraz od stanu skupienia pożywki wzrostowej stwierdzono, że największy przyrost świeżej masy eksplantatu był u cebul inicjowanych na pożywce zawierającej 100% MS, bez lub z dodatkiem 0,54 μ M NAA (45,0), a następnie umieszczonych w pożywce wzrostowej płynnej (ryc. 23A). Najmniejszy przyrost świeżej masy zanotowano dla cebul uzyskanych na pożywce inicjalnej zawierającej 50% lub 100% MS, a umieszczonych na pożywce wzrostowej stałej.

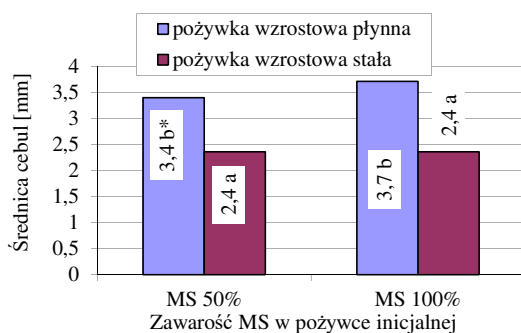
Najwyższy współczynnik świeżej masy cebuli (22,6) uzyskano w pożywce wzrostowej płynnej dla cebul inicjowanych na pożywce 100% MS z dodatkiem NAA (ryc. 23B). Wartość ta była najwyższa, ale nie różniła się ona istotnie od tych, które zanotowano dla kombinacji: pożywka inicjalna 50% MS bez NAA oraz z NAA - pożywka wzrostowa płynna. Bez względu na skład pożywki inicjalnej, wartość współczynnika przyrostu świeżej masy cebuli była za każdym razem wyższa dla cebul uprawianych na pożywce wzrostowej płynnej niż stałej, różnice te jednak nie zawsze były istotne. Największą średnicę (4,2 mm) osiągnęły cebule inicjowane na pożywce 100% MS wzbogaconej o NAA po umieszczeniu ich w pożywce wzrostowej płynnej (ryc. 23C). Wartość ta była najwyższa, ale nie różniła się istotnie od tej jaką zanotowano dla kombinacji: pożywka inicjalna 50% MS z dodatkiem NAA - pożywka wzrostowa płynna (3,6 mm). Bez względu na skład pożywki inicjalnej, średnica cebul była za każdym razem wyższa dla cebul uprawianych na pożywce wzrostowej płynnej w porównaniu do zestalonej agarem, różnice te jednak nie zawsze były istotne.



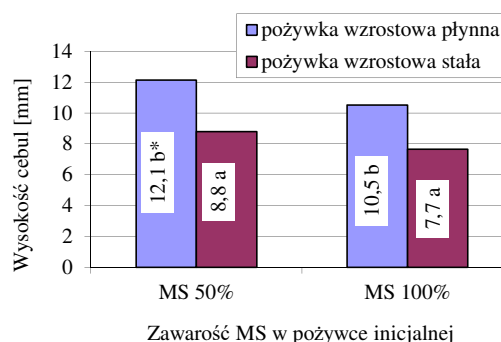
A Zawarość MS w pożywce inicjalnej



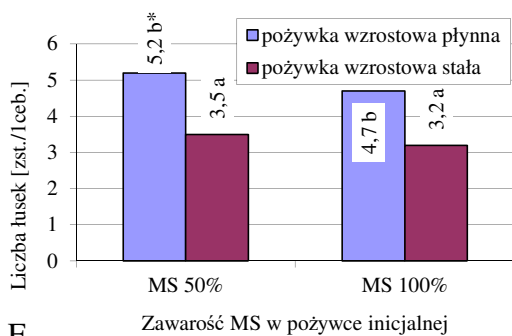
B Zawarość MS w pożywce inicjalnej



C



D



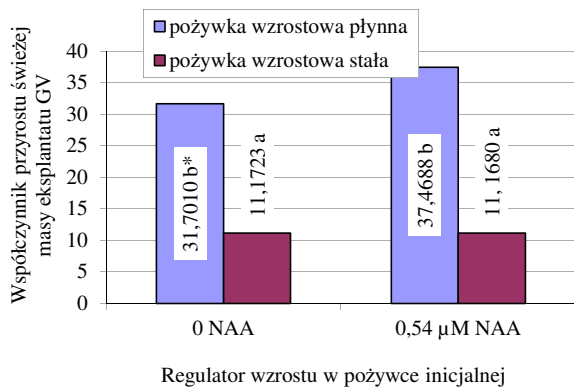
E

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

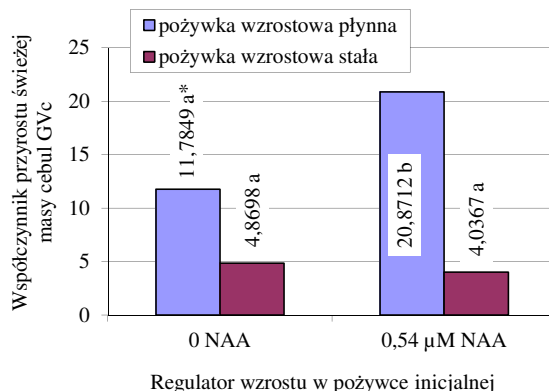
Ryc. 21. Wpływ ilości MS z pożywki inicjalnej (niezależnie od ilości NAA) na wzrost cebul lili złotogłów na pożywce wzrostowej stałej i płynnej: A - współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu; B - współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli; C - średnica cebuli; D - wysokość cebuli; E - liczba łusek

Analizując wpływ składników pożywki inicjalnej na dalszy rozwój cebul po umieszczeniu ich na pożywkach wzrostowych o różnym stanie skupienia stwierdzono, że wysokość uzyskanych cebul nie zależała od kombinacji składników w pożywce inicjalnej ale od rodzaju pożywki wzrostowej - wyższe cebule uzyskano na pożywce płynnej (średnio o 2,8-4,0 mm w zależności od kombinacji) w porównaniu do pożywki stałej (ryc. 24A). Największą liczbę łusek (6 łusek) wykształciły cebule na pożywce wzrostowej płynnej przeniesione z pożywki inicjalnej 50% MS z dodatkiem NAA (ryc. 24B). Wartość ta nie różniła się istotnie od tej jaką uzyskano dla kombinacji 100% MS z dodatkiem NAA - pożywka płynna (5 łusek). W przypadku każdej kombinacji pożywki inicjalnej, liczba uzyskanych łusek była zawsze

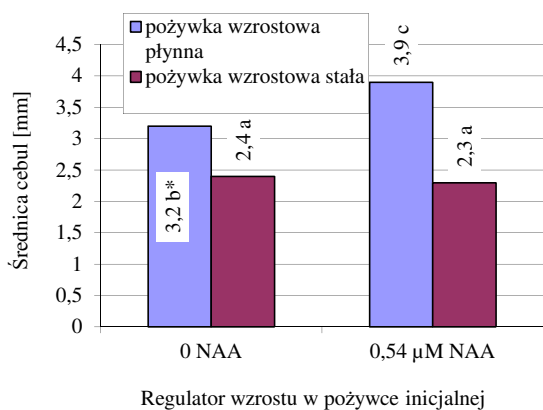
większa na pożywce wzrostowej płynnej, niż na stałej (czasami te różnice nie były jednak istotne statystycznie).



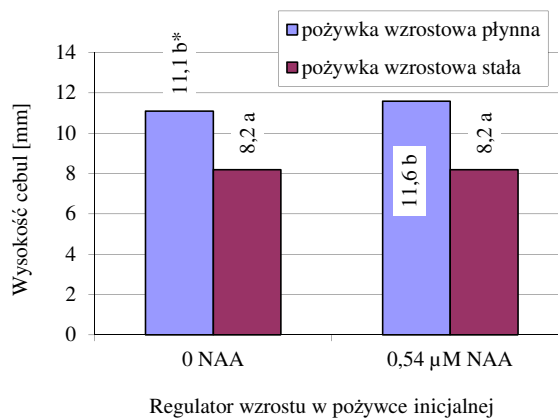
A



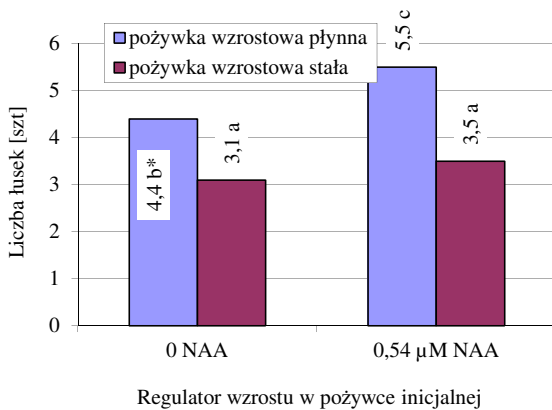
B



C



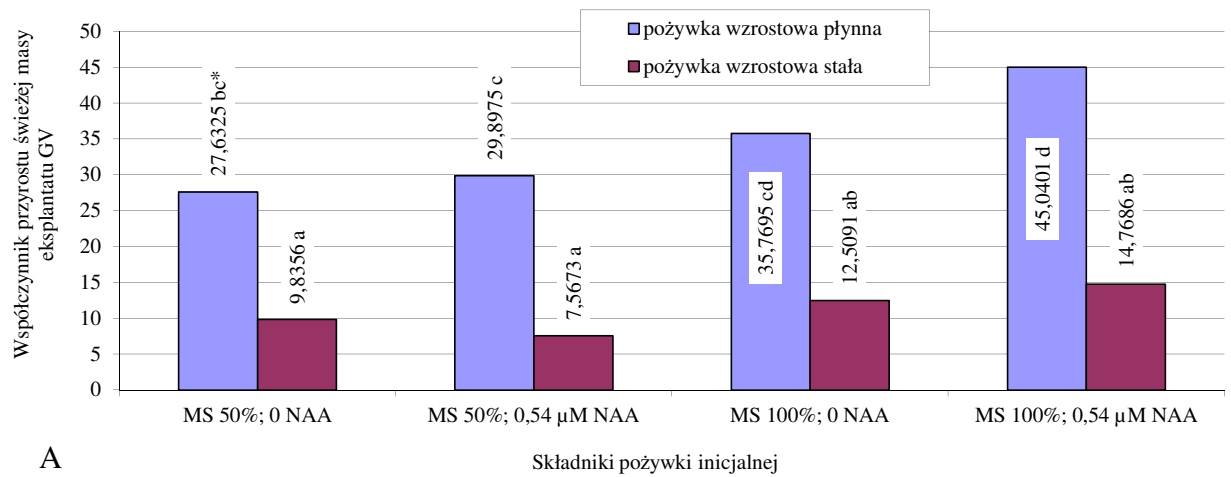
D



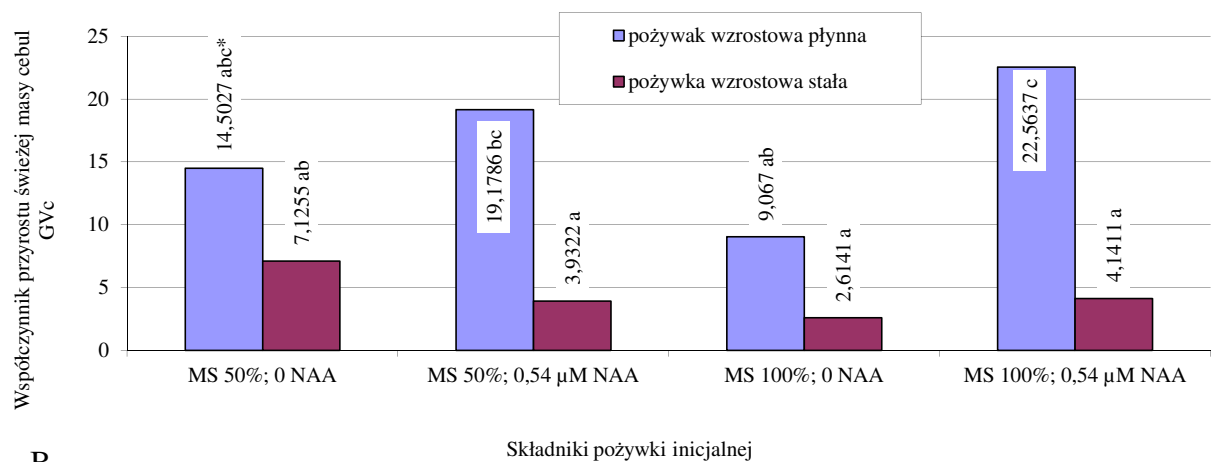
E

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

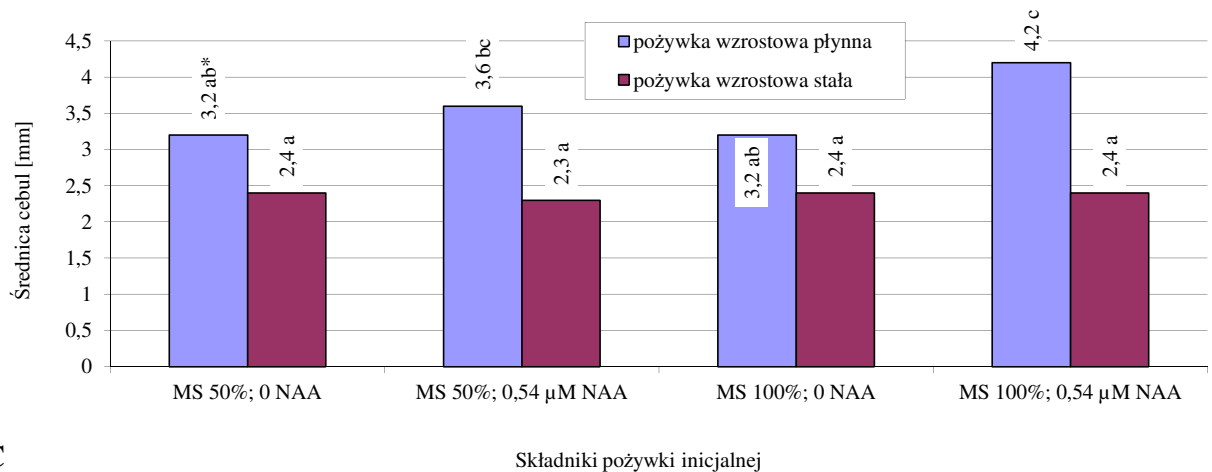
Ryc. 22. Wpływ NAA z pożywki inicjalnej (niezależnie od ilości MS) na wzrost cebul lili złotogłów na pożywce wzrostowej stałej i płynnej: A - współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu; B - współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli; C - średnica cebuli; D - wysokość cebuli; E - liczba łusek



A



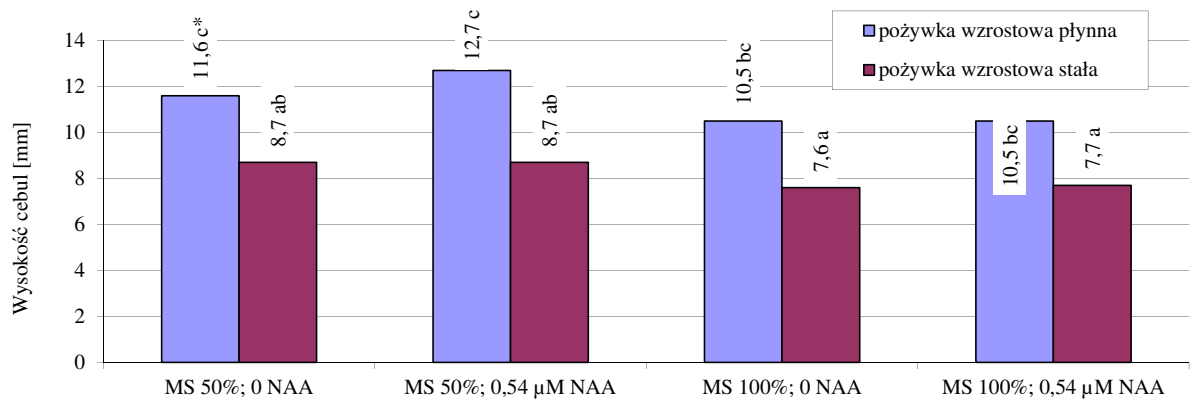
B



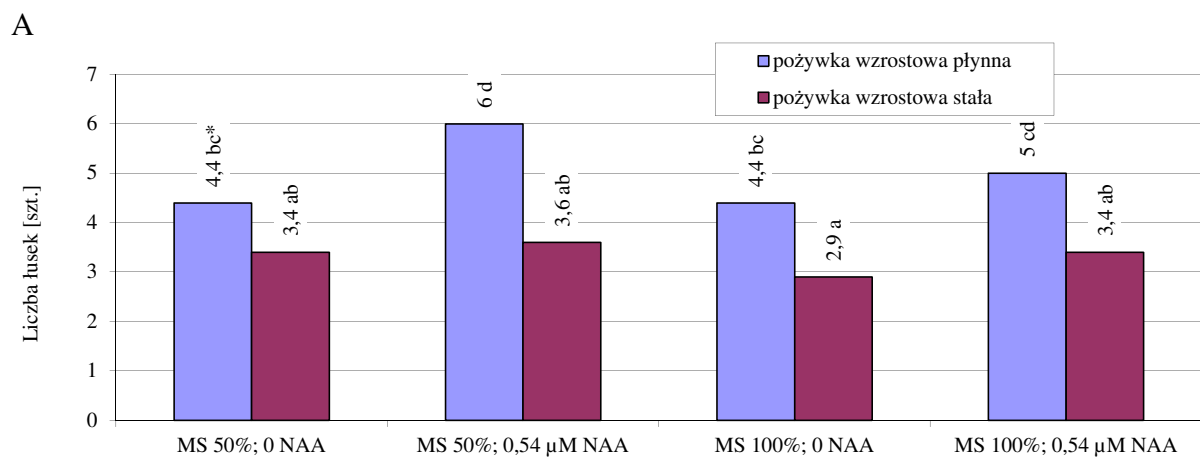
C

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 23. Wpływ składników z pożywki inicjalnej na wzrost cebul lilii złotogłów na pożywce wzrostowej stałej i płynnej: A - współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu; B - współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli, C – średnica cebuli



Składniki pożywki inicjalnej

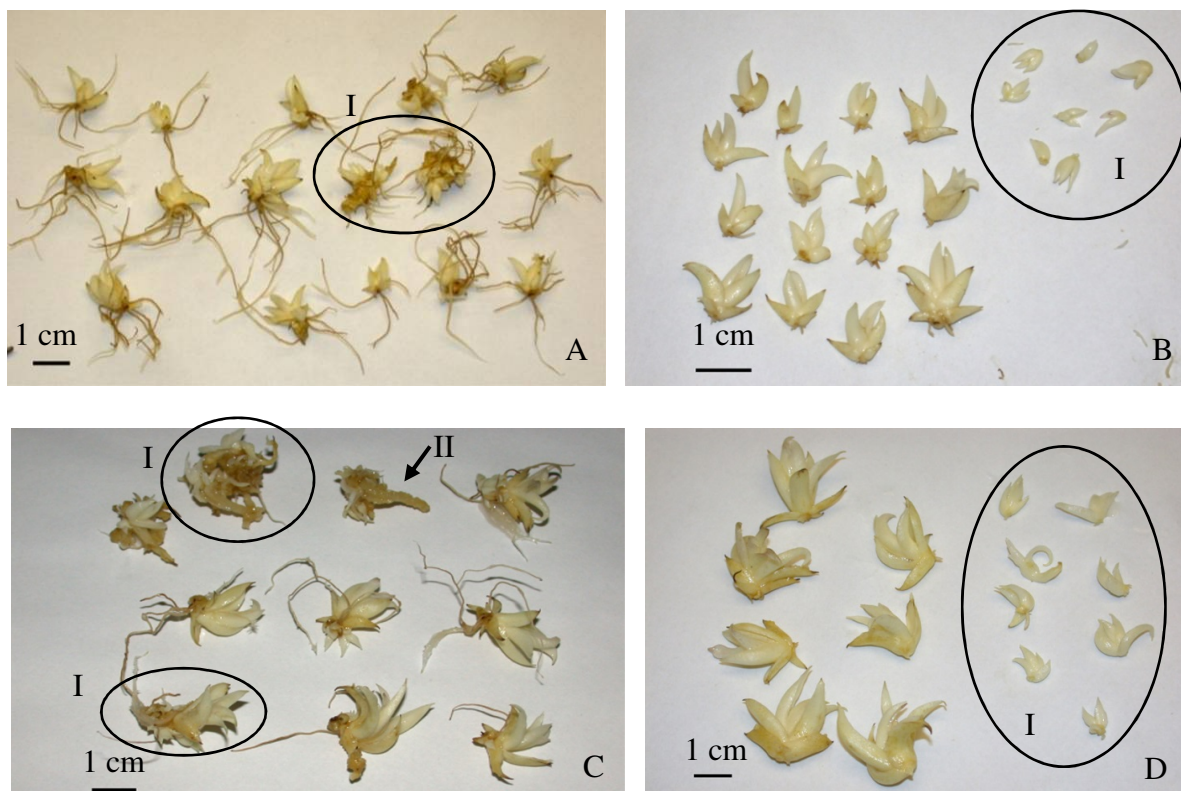


Składniki pożywki inicjalnej

B

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 24. Wpływ składników z pożywki inicjalnej na wzrost cebul lili złotogłów na pożywce wzrostowej stałej i płynnej: A - wysokość cebuli; B - liczba łusek



Ryc. 25. Cebule po 16 tygodniach w pożywce wzrostowej płynnej:
 - 50% MS, 3% sacharozy: A – po wyjęciu z kolby; B - po rozdzieleniu;
 - 50% MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 μ M NAA; C - po wyjęciu z kolby;
 D - po rozdzieleniu; I - cebule przybyszowe zregenerowane w trakcie kultury;
 II – cebula przerośnięta kalusem [fot. K. Nowak]



Ryc. 26. Cebule inicjowane na pożywce zawierającej:

- MS, 3% sacharozy po 16 tygodniach w pożywce wzrostowej płynnej: A - po wyjęciu z kolby; B - po rozdzielaniu, oraz zestalonej C - po wyjęciu z kolby; D - po rozdzielaniu;
- MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,54 μ M NAA: E - po wyjęciu z kolby; F - po rozdzielaniu, oraz zestalonej G - po wyjęciu z kolby; H - po rozdzielaniu; I - cebule przybyszowe zregenerowane w trakcie kultury; II – cebule przerośnięte kalusem [fot. K. Nowak]

6.3.2. Wzrost cebul w wybranych pożywkach płynnych

W tym doświadczeniu oceniano wzrost cebul na czterech wybranych pożywkach płynnych z 3% sacharozą: 50% MS, bez lub z dodatkiem 0,54 μM NAA; 100% MS, bez lub z dodatkiem 0,54 NAA, były to pożywki o identycznym składzie na jakich cebule uformowały się w poprzednim cyklu. Po 16 tygodniach oceniono wpływ poszczególnych składników pożywek oddzielnie, jak również współdziałanie badanych czynników. W tym doświadczeniu również zaobserwowano tworzenie się nowych cebul, powiększanie się wyjściowych, na powierzchni części cebul formował się kalus, formowały się również korzenie (ryc. 28).

Analiza wpływu ilości składników mineralnych MS, niezależnie od ilości NAA w pożywce, na wzrost cebul lilii złotogłów wykazała, że dwukrotnie większy przyrost świeżej masy eksplantatów uzyskano się na pożywce zawierającej 100% MS w porównaniu do pożywki z obniżoną o połowę ilością składników (tab. 14). Natomiast 50% MS zwiększa ponad trzykrotnie przyrost świeżej masy samych cebul. Różna ilość MS nie spowodowała powstania istotnych różnic w liczbie regenerowanych liści i korzeni przypadających na 1 cebulę. Na pożywce 100% MS obserwowano blisko 10 krotnie częściej zjawisko witrifikacji eksplantatów, niż na pożywce 50% MS.

Tabela 14. Wzrost cebul lilii złotogłów w pożywce płynnej z różną ilością MS (niezależnie od zawartości NAA)

Zawartość składników MS [%]	Współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu [GV]	Współczynnik przyrostu świeżej masy cebul [GVc]	Liczba liści [szt./ceb]	Liczba korzeni [szt./ceb]	Witrifikacja eksplantatów [%]
100	29,8 b*	2,1 a	0,2 a	3,2 a	38,0 b
50	15,8 a	6,9 b	3,2 a	3,9 a	4,0 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

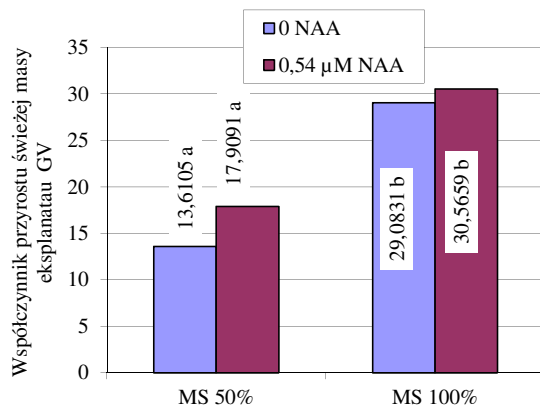
Tabela 15. Wzrost cebul lilii złotogłów w pożywce płynnej z bez lub z dodatkiem 0,54 μM NAA (niezależnie od ilości MS)

Zawartość NAA [μM]	Współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatu [GV]	Współczynnik przyrostu świeżej masy cebuli [GVc]	Liczba liści [szt./ceb]	Liczba korzeni [szt./ceb]	Witrifikacja eksplantatów [%]
0	21,4 a*	5,3 a	2,3 a	4,1 a	18,0 a
0,54	24,2 a	4,7 a	1,0 a	3,0 a	24,0 a

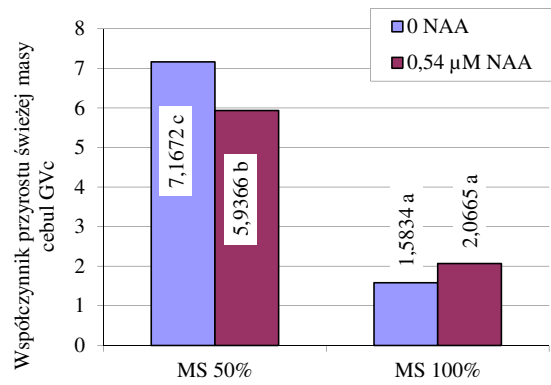
* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ocena wzrostu cebul w pożywkach z dodatkiem 0,54 μ M NAA, niezależnie od ilości MS, nie wykazała istotnych statystycznie różnic badanych cech w odniesieniu do pożywek bez tej auksyny (tab. 15). Potwierdziła się tendencja przedstawiona w tabeli 14 - obniżona o połowę ilość MS znacząco ograniczyła wystąpienie witrifikacji eksplantatów w porównaniu do 100% MS, wyniki te nie różnią się jednak istotnie.

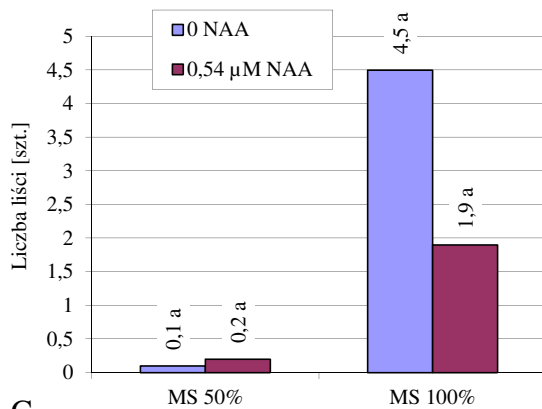
Analiza wyników łącząca oddziaływanie różnej ilości MS i auksyny na wzrost cebul wykazała, że większy przyrost świeżej masy eksplantaty uzyskały na pożywkach zawierających 100% MS bez względu na brak lub obecność NAA w pożywce (ryc. 27A). Największy przyrost świeżej masy cebul uzyskano, gdy cebule były kultywowane w pożywce zawierającej 50% MS bez regulatora wzrostu, a najmniejszy na pożywkach zawierających 100% MS bez lub z dodatkiem NAA (ryc. 27B). Liczba liści (ryc. 27C) oraz korzeni (ryc. 27D) formowanych przez pojedynczą cebulę nie różniła się istotnie w obrębie analizowanych obiektów i wyniosła odpowiednio 0,1-4,5 oraz 2,4-4,2 w zależności od kombinacji pożywki. Nie obserwowano witrifikacji na pożywce 50% MS bez regulatora wzrostu, a tylko kilku procentową, gdy do tej pożywki dodano NAA (ryc. 27E). Znacznie częściej to niekorzystne zjawisko, obejmujące 36-40% eksplantatów, zanotowano na pożywkach zawierających 100% MS w obecności NAA, a także wtedy gdy pożywka nie zawierała regulatorów wzrostu.



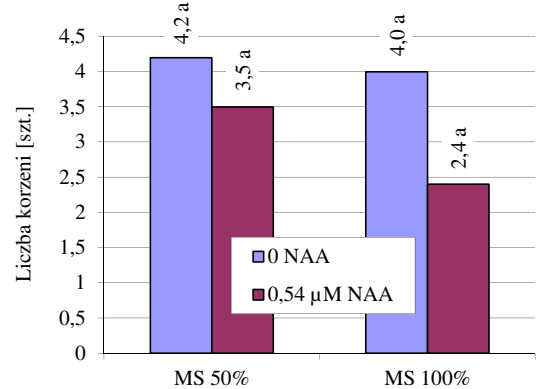
A



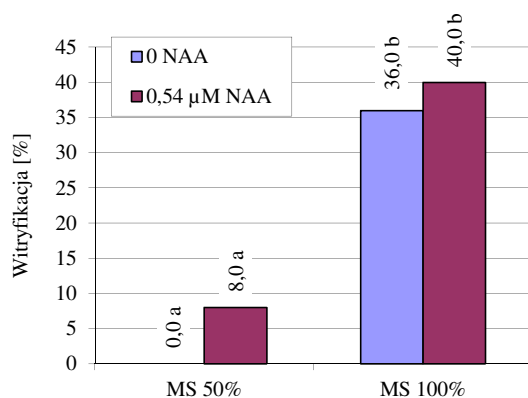
B



C



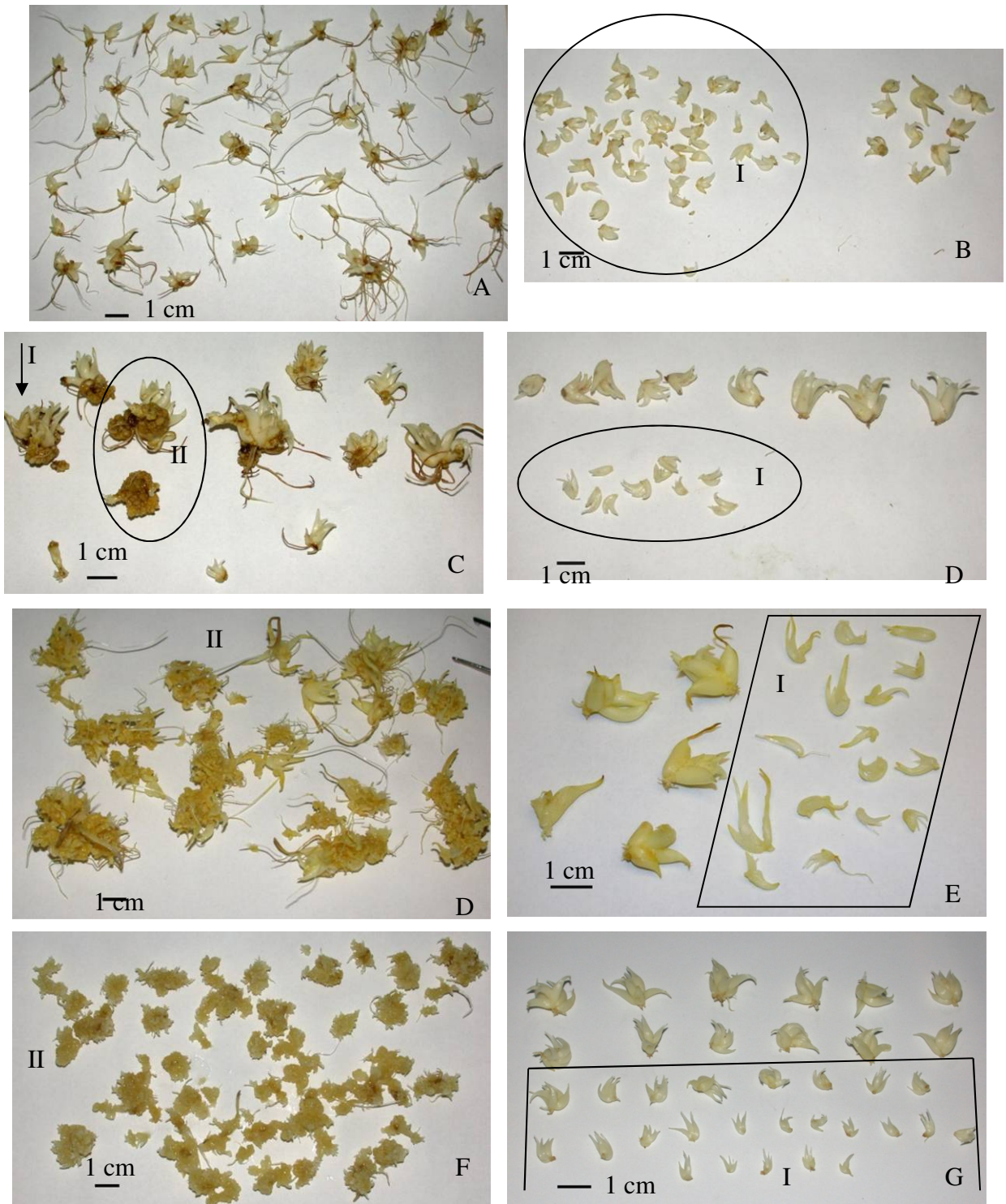
D



E

* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 27. Wpływ różnej ilości MS oraz NAA na wzrost cebul lili złotogłów na wybranych pożywkach płynnych: A – współczynnik przyrostu świeżej masy eksplantatów, B - współczynnik przyrostu świeżej masy cebul, C - liczba liści, D – liczba korzeni, E – witryfikacja



Ryc. 28. Cebule lilii złotogłów po 16 tygodniach wzrostu na pożywkach:

- 50% MS, 3% sacharozy: A - po wyjęciu z kolby, B – po rozdzielaniu,
 - 50% MS, 3% sacharozy z 0,54 μ M NAA: C - po wyjęciu z kolby, D – po rozdzielaniu,
 - 100% MS, 3% sacharozy: E - po wyjęciu z kolby, F – po rozdzielaniu,
 - 100% MS, 3% sacharozy z 0,54 μ M NAA: G - po wyjęciu z kolby, H – po rozdzielaniu,
- I - cebule przybyszowe zregenerowane w trakcie kultury, II – cebule przerosnięte kalusem
[fot. K. Nowak]

6.4. Aklimatyzacja cebul lili złotogłów

6.4.1. Wpływ chłodzenia na aklimatyzację cebul lili złotogłów uzyskanych na czterech pożywkach płynnych

Ocenę wpływu chłodzenia na aklimatyzację cebul lili złotogłów wykonano używając cebul uformowanych na czterech pożywkach płynnych z 3% sacharozą: 50% MS, bez lub z dodatkiem 0,54 μ M NAA; 100% MS, bez lub z dodatkiem 0,54 NAA.

Wykazano, że niezależnie od ilości MS i obecności NAA w pożywce, tylko 13,5% cebul niechłodzonych podjęło wzrost formując liście, podczas gdy 57,3% cebul chłodzonych wytworzyło liście (tab. 16, ryc. 29, 30). U cebul niechłodzonych po dwukrotnie dłuższym czasie (ponad 2,5 miesiąca) obserwowano pojawienie się liści, a po podjęciu wzrostu ich wegetacja trwała o miesiąc krócej w porównaniu do cebul chłodzonych (tab. 16). Nie przeżyło aklimatyzacji 16-20% cebul (ryc. 29). Pozostałe uznano za zaaklimatyzowane, wliczając tu te, które wytworzyły liście oraz te, które przeżyły, ale liści nie rozwijały, przy czym w jednym i drugim wypadku obserwowano formowanie korzeni, które wyrastały z piętki cebul (ryc. 31). Na procent cebul zaaklimatyzowanych nie miało wpływu chłodzenie, zaaklimatyzowało się średnio około 82% (ryc. 29).

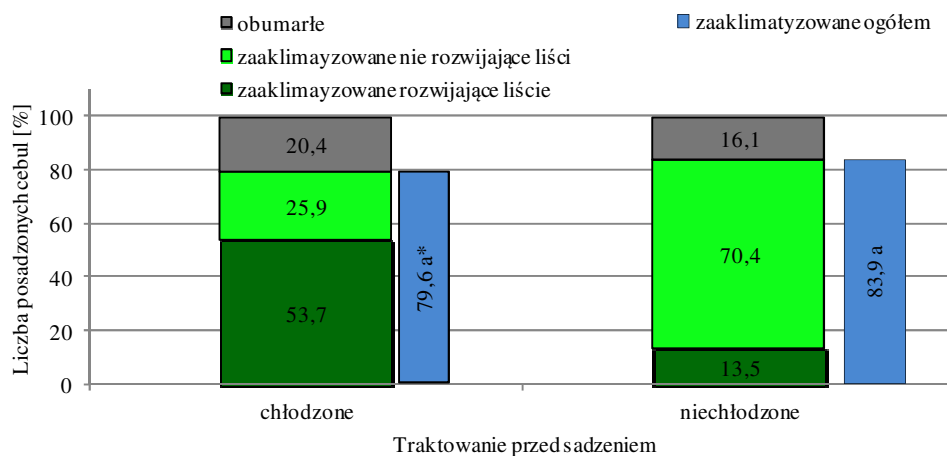
Tabela 16. Wzrost aklimatyzowanych chłodzonych i niechłodzonych cebul lili złotogłów niezależnie od składu pożywki wzrostowej

Cebule	Liczba cebul formujących pierwszy liść [%]	Okres od posadzenia do pojawienia się pierwszego liścia [dni]	Okres od pojawienia się pierwszego liścia do końca wegetacji [dni]
Chłodzone	57,3 b	31,9 a	96,6 b
Niechłodzone	13,5 a	78,7 b	63,8 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

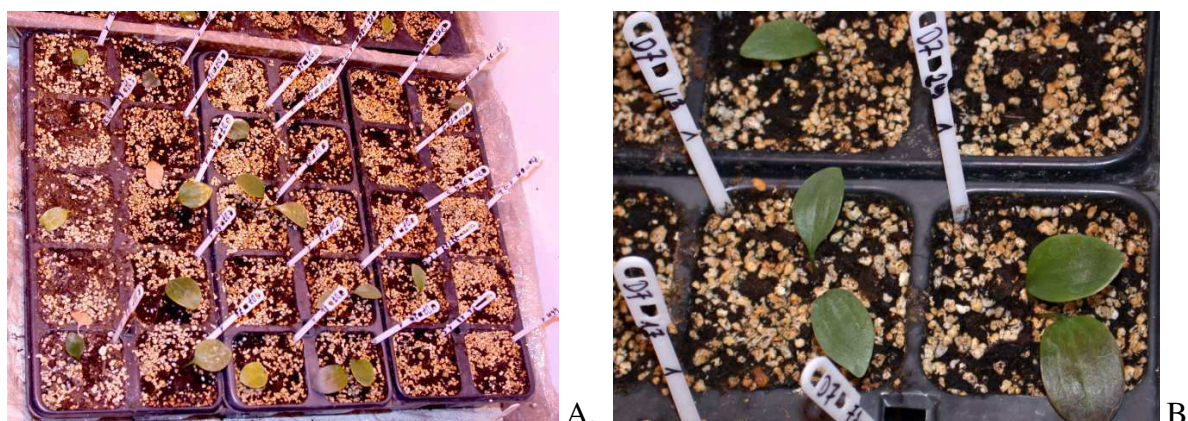
Analiza oddziaływania chłodzenia i składników pożywek pokazała, że najlepiej (97,9%) zaaklimatyzowały się cebule chłodzone uzyskane na pożywce 50% MS bez regulatora wzrostu, a najgorzej (58,4%) niechłodzone z pożywki 100% MS również bez regulatorów (ryc. 32). Bez względu na skład pożywki więcej cebul chłodzonych niż niechłodzonych tworzyło liście (ryc. 33A). Gdy dodatkowo cebule chłodzone uprawiano na pożywce 100% MS wówczas wytwarzały one częściej liście, niż cebule chłodzone, ale z pożywki 50% MS. Cebule niechłodzone i uprawiane na pożywce 50% MS z dodatkiem NAA formowały liście w najniższym procencie. Najkrótszy okres (około 15 dni) do pojawienia się pierwszych liści zanotowano u cebul chłodzonych uprawianych na 100% MS bez regulatorów wzrostu, a najdłuższy (około 109 dni) u cebul niechłodzonych z pożywki 50% MS z dodatkiem NAA (ryc. 33B). Czas ulistnienia cebul chłodzonych, w przypadku każdej kombinacji pożywki był dłuższy, niż ulistnienie cebul niechłodzonych (ryc. 33C). Najszybciej (po 36 dniach) zakończyły wegetację cebule niechłodzone pochodzące

z pożywki: 50% MS + NAA, a najpóźniej (po 122 dniach) cebule chłodzone pochodzące z pożywki: 100% MS, bez regulatorów wzrostu.



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

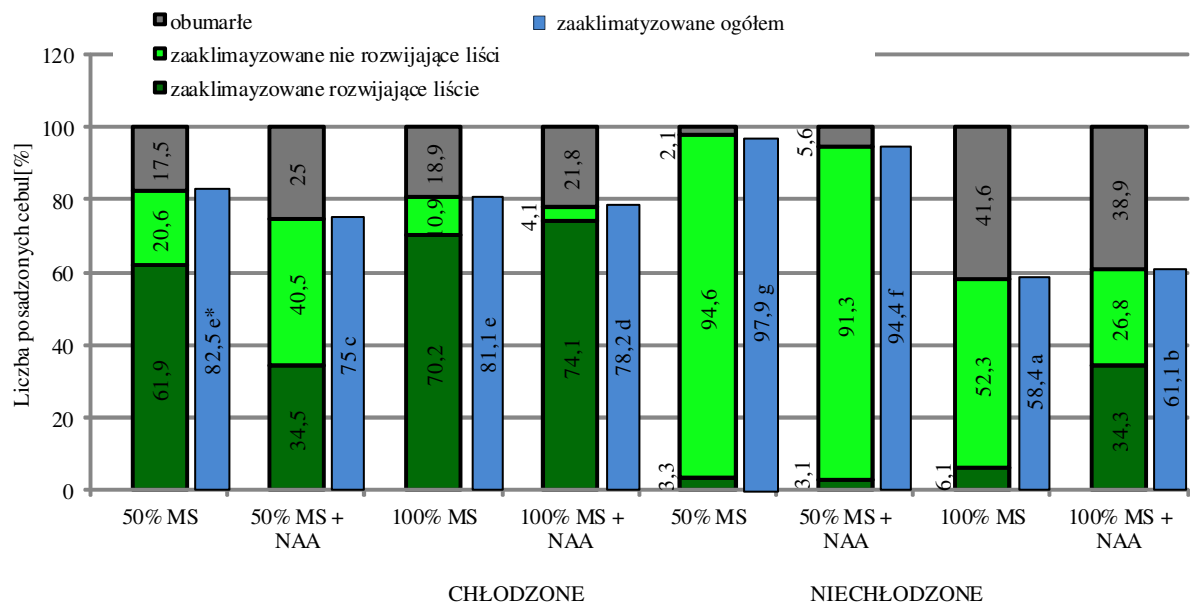
Ryc. 29. Aklimatyzacja chłodzonych i niechłodzonych cebul lilii złotogłów uzyskanych na wybranych pożywkach płynnych niezależnie od składu pożywki



Ryc. 30. Aklimatyzacja lilii złotogłów: A i B – cebule w wielodoniczkach po 50 dniach od posadzenia [fot. K. Nowak]

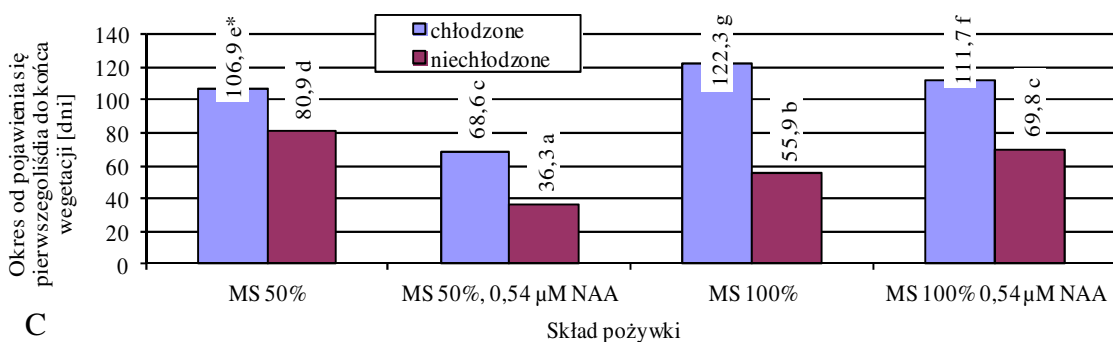
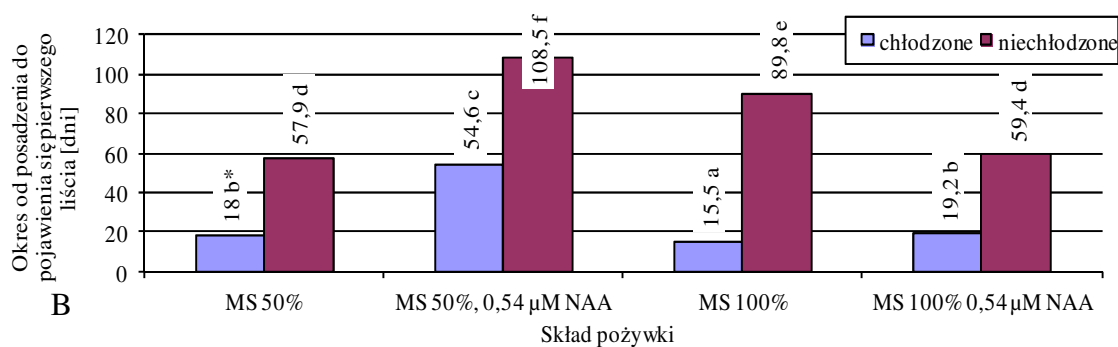
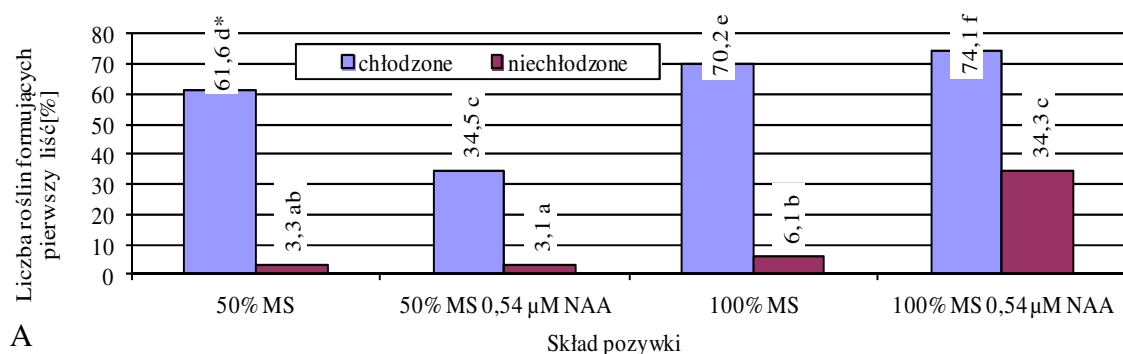


Ryc. 31. Cebule po zakończeniu wegetacji: I, II – cebule zaaklimatyzowane: I – cebula która rozwinęła liść i korzenie, II – cebula która rozwinęła tylko korzenie; III – cebule obumarłe [fot. K. Nowak]



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 32. Aklimatyzacja chłodzonych i niechłodzonych cebul lili złotogłów uzyskanych na wybranych pożywkach płynnych



* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

Ryc. 33. Wzrost aklimatyzowanych chłodzonych i niechłodzonych cebul lili złotogłów uzyskanych na wybranych pożywkach płynnych: A - liczba roślin rozwijających liście, B - okres od posadzenia do pojawienia się pierwszego liścia; C – okres od pojawienia się pierwszego liścia do końca wegetacji

6.4.2. Aklimatyzacja chłodzonych cebul lili złotogłów uzyskanych z pożywek wzrostowych płynnych i zestalonych

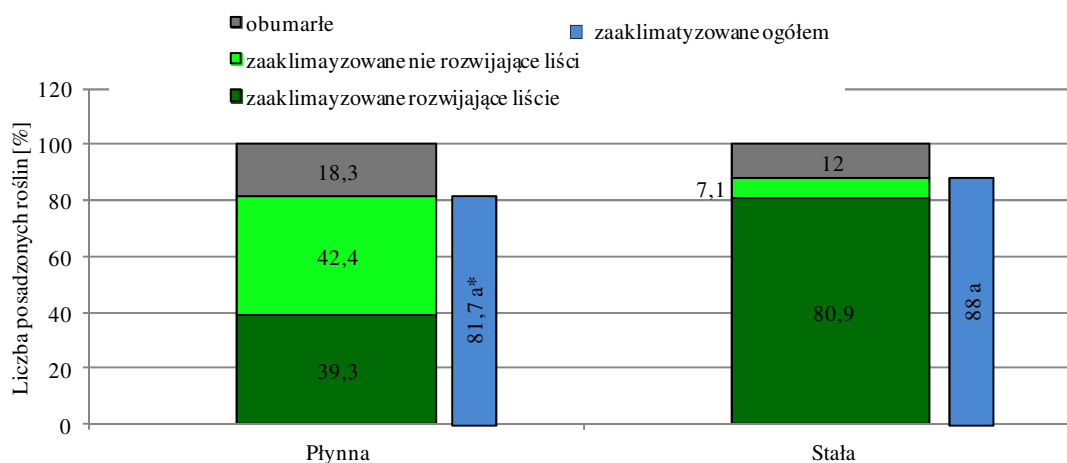
Analiza wyników aklimatyzacji chłodzonych cebul pochodzących ze stałej i płynnej pożywki wzrostowej wykazała, że rodzaj kultury nie wpłynął na poziom aklimatyzacji, który wyniósł średnio od 82 do 88% (pożywka płynna i stała odpowiednio) (ryc. 34). Dwukrotnie więcej cebul formowało pierwszy liść, gdy uprawiano je wcześniej na pożywce stałej niż na pożywce płynnej (tab. 17, ryc. 34). Okres jaki upłynął od posadzenia cebuli do pojawienia się

pierwszego liścia oraz do zaschnięcia tego liścia nie zależał od stanu skupienia pożywki i wyniósł odpowiednio 16 i 17 oraz 100 i 111 dni (tab. 17).

Tabela 17. Wzrost aklimatyzowanych chłodzonych cebul lili złotogłów uzyskanych na pożywce wzrostowej stałej i płynnej

Pożywka	Liczba cebul formujących pierwszy liść [%]	Okres od posadzenia do pojawienia się pierwszego liścia [dni]	Okres od pojawienia się pierwszego liścia do końca wegetacji [dni]
Płynna	39,3 a	16,7 a	99,6 a
Stała	80,9 b	15,7 a	111,2 a

* średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

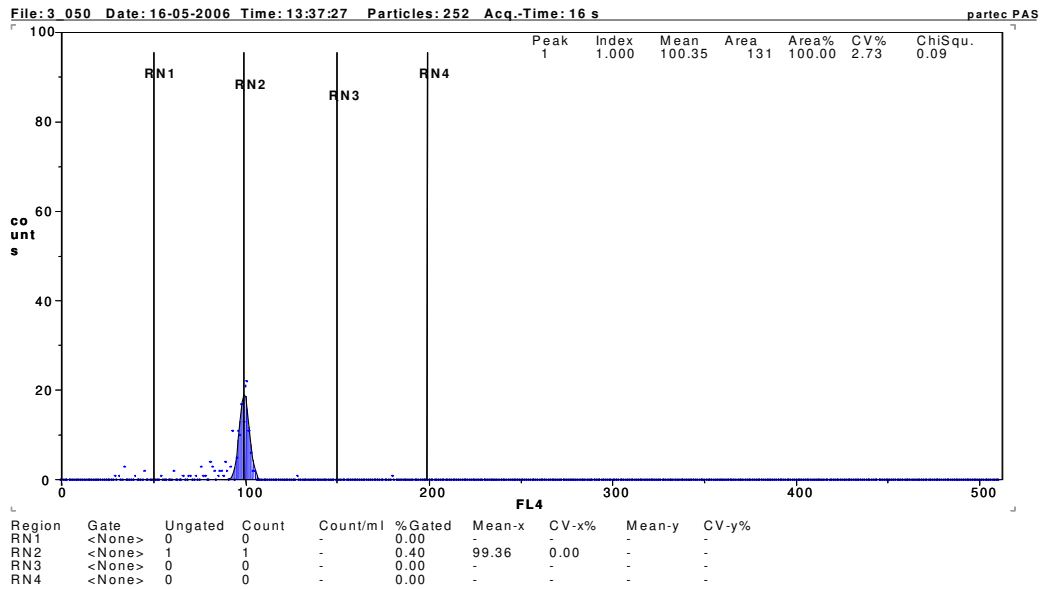


* średnie oznaczone tą samą literą na wykresie nie różnią się istotnie przy $\alpha=0,05$

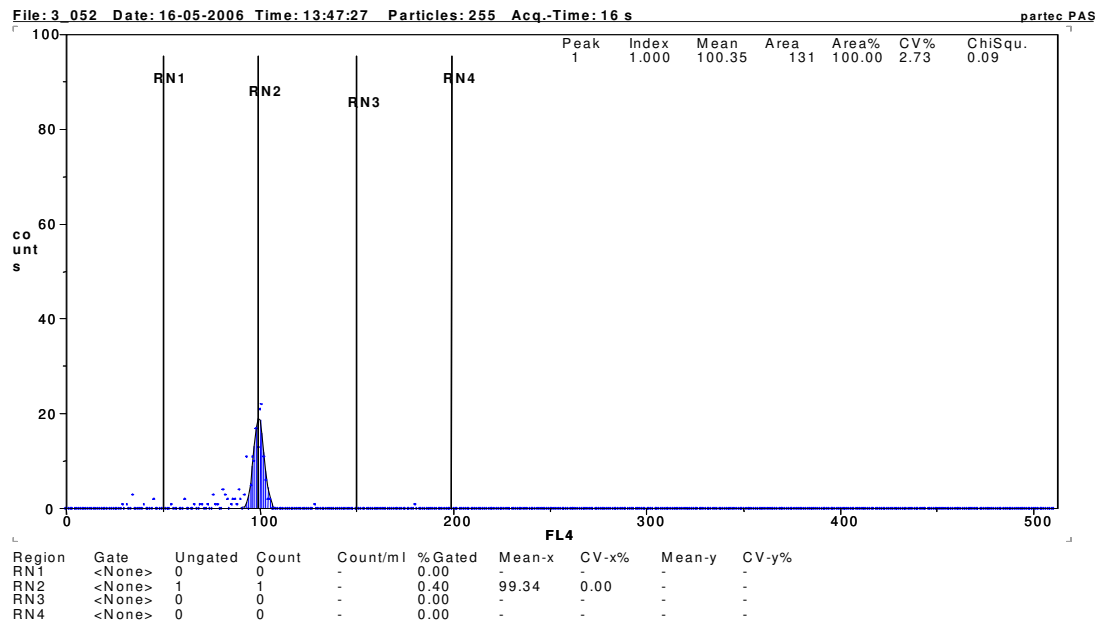
Ryc. 34. Aklimatyzacja cebul lili złotogłów w zależności od stanu skupienia pożywki wzrostowej

6.5. Ocena ploidalności

Wykonane na cytometrze przepływowym analizy stopnia ploidalności zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin nie wykazały zmian zawartości DNA w jądrach komórkowych badanych regenerantów lili złotogłów (ryc. 35, 36).



Ryc. 35. Zawartość DNA w komórkach rośliny kontrolnej lili złotogłów



Ryc. 36. Zawartość DNA w komórkach rośliny uzyskanej na pożywce 100% MS, 3% sacharozy z dodatkiem NAA

7. Dyskusja

Lilie należą do ważniejszych roślin cebulowych produkowanych na skalę przemysłową. Masową produkcję jednolitego materiału roślinnego umożliwia ich rozmnażanie w warunkach *in vitro* [Ruffoni i in. 2011]. Lilia złotogłów wykorzystywana jest od bardzo dawna, stosowana była w medycynie ludowej, a kwiaty ze względu na bardzo atrakcyjny wygląd do celów dekoracyjnych. Eksploatacja stanowisk naturalnych oraz ich degradacja spowodowała, że objęto ją całkowitą ochroną gatunkową [Piękoś-Mirkowa i Mirek 2003, Pindel 2002a, b]. Można ją rozmnażać generatywnie poprzez wysiew nasion [Grabowska i in. 1987] jak i wegetatywnie z łusek cebulowych [Mynett 1990, De Hertogh i Le Nard 1993]. Lilia złotogłów rozmnażana tymi metodami potrzebuje 3-5 lat uprawy do pierwszego kwitnienia [Grabowska i in. 1987, Mynett 1990]. Wysoką wydajność rozmnażania roślin można uzyskać stosując techniki *in vitro* [Mehrotra i in. 2007].

Do zainicjowania kultur *in vitro* lilii złotogłów użyto nasion pozyskanych z trzech lokalizacji. Ich dezynfekcję powierzchniową wykonano przez 15 minut w 15% roztworze Domestosu. Jego zastosowanie dało satysfakcjonującą skuteczność dezynfekcji nasion (82-100%), porównywalną do 7% roztworu chloraminy (80-100%) również stosowanego do dezynfekcji nasion tego gatunku [Kędra i Bach 2005], jak i do 0,1% roztworu chlorku rtęci zastosowanego do dezynfekcji fragmentów łusek cebulowych innych gatunków lilii [Pandey i in. 2009].

Kiełkowanie nasion lilii złotogłów trwa 3 miesiące i obejmuje pęcznienie nasiona, wytworzenia korzenia i formowanie cebuli; następnie młode rośliny przechodzą 2-3 miesięczny spoczynek zimowy, po którym ponad powierzchnię podłoża wyrasta pierwszy liść [Beattie i White 1993, Grabowska i in. 1987]. Pęcznienie nasion i wytworzenie części podziemnych siewki (cebula i korzeń) trwa w warunkach *ex vitro* u lilii złotogłów 65-77 dni [Pindel 2002a]. Podobny, bo wynoszący średnio 59 dni czas potrzebny od siewu do rozwinięcia się części podziemnych siewki, uzyskano w przeprowadzonym doświadczeniu. Ponadto przeprowadzone w trakcie kiełkowania obserwacje pozwalają na zaproponowanie bardziej szczegółowego opisu tego etapu cyklu życia lilii złotogłów. Pierwsza faza obejmująca pęcznienie nasion i inicjację kiełkowania trwa średnio 35 dni, druga faza to wzrost wydłużeniowy korzenia zarodkowego trwający średnio 9 dni. W trzeciej fazie, trwającej 11 dni, następuje formowanie cebuli na końcu korzenia zarodkowego. W czwartej fazie, trwającej 6 dni, wyrastają korzenie z piętki cebuli, a faza piąta obejmuje zasychanie hipokotyli, po którym następuje spoczynek. Uzyskany opis uszczegóławia II etap cyklu życiowego lilii złotogłów zaproponowany przez Jańczyk-Węglarska i Węglarski [1992], który obejmuje: I - nasiona spoczynkowe, II - nasiona kiełkujące hipogeicznie, III - stadium juwenilne trwające 2-3 lata, IV - stadium generatywne rozpoczynające się w 4-5 roku życia rośliny.

Zdolność do kiełkowania wysianych w doświadczeniu nasion zależała od stanowiska, z którego je zebrano (57,8% - Kraków UR; 80% - Tenczynek; 100% - Tomaszkowice). Powodem zróżnicowanej zdolności do kiełkowania nasion, jak i zróżnicowanej wielkości uzyskanych z tych nasion siewek, były prawdopodobnie odmienne warunki siedliskowe wzrostu roślin matecznych. Opisano wiele czynników oddziałujących na rośliny mateczne, a wywierających znaczący wpływ na jakość żywotność i zdolność do kiełkowania nasion

[Gutterman 2000, Penfield i MacGregor 2017]. Uzyskana w doświadczeniu liczba kiełkujących nasion była zbliżona do wyników uzyskanych dla tego gatunku lilii w warunkach *in vitro* (72%) [Kędra i Bach 2005] jak i *ex vitro* (72,2%) [Pindel 2002a]. Otrzymane siewki posłużyły do założenia głównego doświadczenia mającego na celu indukcję cebul przybyszowych na fragmentach cebul i korzeni.

Nie każdy fragment rośliny wykazuje kompetencje do zaindukowania organogenezy i formowania pąków przybyszowych, co stwierdzono używając do tego fragmentów pąków kwiatowych niezawierających dna kwiatowego u *L. longiflorum* 'Nellie White' [Nhut i in. 2001a], nitek pręcików, pylników i liści *L. auratum* [Takayama i Misawa 1979] oraz fragmentów liści *L. longiflorum* 'Snow Queen' [Bacchetta i in. 2003]. W przeprowadzonym doświadczeniu nie zaindukowano pąków przybyszowych ani kalusa na fragmentach korzeni z siewek lilii złotogłów, zarówno w pożywkach płynnych, jak i kontrolnej zestalonej agarem. W przeciwieństwie do korzeni, fragmenty łusek pozyskane z cebul siewek okazały się dobrym materiałem do indukcji organogenezy przybyszowej. Porównując powstawanie pąków przybyszowych i formowanie kalusa na pożywce zestalonej i w pożywce płynnej z fragmentów łusek uzyskano większą wydajność indukcji cebul przybyszowych, korzeni, liści i kalusa w pożywce płynnej. Potwierdza to doniesienia o większej efektywności pożywek płynnych w odniesieniu do pożywek zestalonych opisane dla *L. rubellum*, która formowała większą liczbę cebul przybyszowych na pożywce płynnej [Niimi i in. 1997], odmian 'Star Gazer' i 'Casablanca' [Islam i in. 2020], czy dla odmian funkcji 'Minuteman', 'Stiletto', 'Striptease' oraz *Alocasia macrorrhizos*, które intensywniej namnażały się i rosły w pożywce płynnej [Adelberg 2004], czy zwiększoną indukcją korzeni i liści w pożywkach płynnych stwierdzoną u *Typhonium flagelliforme* [Rezali i in. 2017].

W kolejnym doświadczeniu tego etapu badań analizowano organogenezę przybyszową w pożywkach płynnych różniących się zawartością MS (50% lub 100%), sacharozy (3% lub 6%) i regulatorów wzrostu (brak, lub z dodatkiem: 0,54 μ M NAA; 5 μ M BA; 0,54 μ M NAA + 5 μ M BA). Badany w doświadczeniu poziom MS nie wpłynął istotnie na liczbę inicjowanych cebul przybyszowych z fragmentów łusek cebulowych lilii złotogłów. Wynik ten wskazuje, że badany poziom MS mieści się w przedziale, który wydaje się być optymalnym dla tego procesu. Ten przedział można wyznaczyć dla lilii jako zakres od 50% MS do nawet 200% MS, na co wykazuje intensywność inicjacji cebul przybyszowych *L. auratum*, u której liczba inicjowanych cebul przybyszowych w zakresie od 50% MS do 200% MS nie różniła się istotnie, a poza tym zakresem była znacząco mniejsza [Takayama i Misawa 1979]. Podobny wyniki uzyskano też dla *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' [Aartrijk i Bloom-Barnhoorn 1980] oraz dla odmiany 'Casablanca' [Han i in. 2004a].

Drugi składnik pożywki, który miał wpływ na indukcję organogenezy to zawartość sacharozy. Wyniki badań oceniające wpływ jej ilości w pożywce na indukcję cebul u innych lilii wskazują, że jej odpowiednia ilość jest zbliżona do 3%, ale należy ją zweryfikować doświadczalnie, ponieważ jak wskazują dane z literatury, dla różnych lilii uzyskiwano najlepszą indukcję cebul przybyszowych przy różnych jej zawartościach. Dla *L. auratum* najlepszą jest 3% zawartość w pożywce (oceniało zakres od 0,5% do 5%) [Takayama i Misawa 1979], w technice TCL u *L. longiflorum* odpowiednią była zawartości od 1% do 3% [Le i in. 1999], a u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' najefektywniej indukcja cebul

przybyszowych zachodziła przy zawartości od 3% do 5% [Aartrijk i Blom-Barhoorn 1980]. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że 6% stężenie sacharozy ogranicza inicjację cebul przybyszowych z fragmentów łusek lili żłotogłów w porównaniu do 3% stężenia, co wskazuje, że ta ilość jest bardziej odpowiednia dla formowania cebul przybyszowych w kulturach płynnych lili żłotogłów prowadzonych na wytrząsarce.

Kolejnym analizowanym dodatkiem wzbogacającym skład pożywek, potencjalnie zwiększającym proces formowania pąków przybyszowych, są egzogenne regulatory wzrostu. W wielu badaniach wykazano korzystny wpływ NAA na indukcję cebul u lili, zarówno rozmnażanych tradycyjnie przez sadzonki łuskowe [Grabowska i in. 1987], jak i technikami *in vitro*, np. dla *L. japonicum* [Fukui i in. 1989], mieszańca azjatyckiego 'Sonnentiger' [Dąbrowski i in. 1992] czy lili żłotogłów [Rybczyński i Gmolińska 1989]. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że pożywka płynna bez regulatora wzrostu albo wzbogacona w NAA pozwala na indukcję podobnej liczby cebul przybyszowych u lili żłotogłów. Dopiero uwzględnienie pozostałych składników pożywki pokazało, że NAA zwiększa liczbę inicjowanych cebul przybyszowych w połączeniu z 100% MS, a właśnie takie działania tej auksyny wykazali u tej lili przy 100% MS Rybczyński i Gmolińska [1989]. W przeprowadzonym doświadczeniu równie efektywną inicjację cebul uzyskano po obniżeniu o połowę ilości MS w pożywce bez regulatorów wzrostu, co wskazuje, że można uzyskać równie wysoką wydajność indukcji cebul przybyszowych bez użycia regulatorów wzrostu. Wzbogacenie składu pożywki w cytokininę BA, samodzielnie jak i w kombinacji z NAA, wywarło inhibujący wpływ na indukcję cebul. Takie hamujące działanie BA na inicjację cebul wykazali u tej lili Rybczyński i Gmolińska [1989], a u *L. japonicum* Fukui i in. [1989].

Indukcja korzeni u lili żłotogłów znacznie lepiej przebiegała przy 100% ilości MS w pożywce, a obniżenie o połowę tej zawartości ograniczyło ich formowanie podobnie jak u *L. auratum*, która też zareagowała zmniejszeniem liczby inicjowanych korzeni po zmniejszeniu ilości MS w pożywce [Katayama i Migawa 1979]. Na indukcję korzeni wpływa też ilość sacharozy w pożywce. Jej zwiększona zawartość może pobudzać eksplantaty do inicjowania licznych korzeni, co obserwowano u *L. auratum*. Zwiększanie zawartości sacharozy od 0% do 9% powodowało regenerację coraz większej liczby korzeni z największą ich liczbą przy 9% [Takayama i Misawa 1979, Takayama i Misawa 1980], ale może też ograniczać ich liczbę jak u *L. speciosum* [Gerrits i De Klerk 1992]. W przeprowadzonym doświadczeniu 6% sacharozę hamowała formowanie korzeni przez eksplantaty lili żłotogłów. Inhibujące działanie BA na indukcję korzeni u lili wykazano u *L. longiflorum* 'Georgia' [Han i in. 2004b], *L. auratum* [Takayama i Misawa 1980] oraz u odmiany 'Sonnentiger' [Dąbrowski i in. 1992]. W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano inhibujące działanie BA dodawanej do pożywki samodzielnie lub w kombinacji z NAA, na indukcję korzeni u lili żłotogłów. Wzbogacenie składu pożywki tylko w NAA nie wpłynęło na zwiększenie liczby korzeni, w porównaniu do pożywki bez regulatorów wzrostu. Obserwowana tu reakcja jest odmienna od tej wykazanej u *L. longiflorum* 'Snow Queen', i 'White American' [Tribulato i in. 1997a], czy u odmiany 'Sonnentiger' [Dąbrowski i in. 1992], u których dodanie auksyny NAA do pożywki zwiększyło liczbę regenerowanych korzeni.

Ilość składników mineralnych w pożywce miała wpływ na rozwój liści przez uformowane w doświadczeniu cebule lili żłotogłów, obniżenie zawartości MS zmniejszyło o połowę liczbę liści. Podobną redukcję liczby rozwiniętych liści pod wpływem ograniczonej

dostępności składników mineralnych obserwowano u *Typhonium flagelliforme* [Reazli i in. 2017]. Ograniczenie liczby liści na eksplantatach lilií złotogłów obserwowano przy 6% zawartości sacharozy, co jest podobną reakcją do udokumentowanej przy tej ilości sacharozy u *L. auratum* [Takayama i Misawa 1980]. Natomiast intensyfikacja rozwoju liści wystąpiła na pożywkach wzbogaconych o NAA w kombinacji z BA, taki efekt działania kombinacji tych regulatorów wykazano też u *Rosa* 'Ceber' [Korabi i in. 2007].

U mieszańca orientalnego 'Casablanca' wskazano pożywkę z 6% sacharozą jako czynnik zwiększający formowanie kalusa [Hann i in. 2005]. Podobnie było w przeprowadzonym eksperymencie, na fragmentach łusek lilií złotogłów więcej kalusa powstawało przy 6% jej zawartości. Drugim składnikiem pożywki, który pobudzał do indukcji kalusa na fragmentach łusek tej lilií była BA, co potwierdziło wcześniejsze doniesienia o korzystnym wpływie BA na jego indukcję u tego gatunku [Kędra i Bach 2005] jak i u *L. japonicum* [Fuku i in. 1989].

Negatywnym zjawiskiem towarzyszącym kulturom płynnym jest występowanie nadmiernego uwodnienia tkanek. Zjawisko to zwane witrifikacją wystąpiło na eksplantatach lilií złotogłów w pożywkach płynnych, chociaż Lian i in. [2003a] nie obserwowali jej w kulturach płynnych mieszańca orientalnego 'Casablanca'. Pojawienie się witrifikacji tylko na pożywce płynnej może wynikać z obecności agaru w pożywce zestalanej, który hamuje to niekorzystne zjawisko. Jak podaje Casanova i in. [2008] u *Dianthus caryophyllus* 'White Sim' wystąpienie witrifikacji zależało od obecności oraz zawartości agaru w pożywce - przy 0% do 0,6% odnotowano wystąpienie witrifikacji, a przy większej niż 0,8% nie obserwowano nadmiernego uwodnienia. Witrifikacja może nasilać się przy 3% zawartości sacharozy w pożywce, co pokazano u *Rubus* 'Tupy' [Ayub i in. 2019], czy *Malus domestica* podkładka MM.106 [Bahmani i in. 2009]. Podobnie u lilií złotogłów większą witrifikację obserwowano przy 3% ilości sacharozy, zwiększenie zawartości sacharozy do 6% ograniczało witrifikację tkanek w kulturach płynnych tej lilií.

Najlepszą wydajność indukcji cebul przybyszowych lilií złotogłów wynoszącą 48,4 szt./eksplantat i 41,2 szt./eksplantat uzyskano na dwóch pożywkach płynnych: 50% MS, 3% sacharozy z bez regulatorów wzrostu oraz 100% MS, 3% sacharozy wzbogaconej 0,54 μM NAA, odpowiednio. Wydajność ta oceniana była po 16 tygodniach kultury, z wymianą pożywki na identyczną co 2 tygodnie. Jest to czterokrotnie większa wydajność, niż uzyskana dla tej lilií na pożywce zestalanej (MS, 3% sacharozy z dodatkiem 0,1 mg/l NAA, w czasie 15 tygodni), wynosząca 10,5 cebul przybyszowych z eksplantatu uzyskana przez Rybczyńskiego i Gmolińską [1989].

Następnym etapem przeprowadzonych eksperymentów było uzyskanie jak największego przyrostu masy cebul otrzymanych w pierwszym etapie badań w pożywkach płynnych. Oceniano wzrost cebul w pożywce wzrostowej płynnej i zestalanej agarem (kontrola), a w drugim doświadczeniu, w czterech wybranych pożywkach płynnych. Za zastosowaniem pożywek płynnych na etapie wzrostu przemawiają wyniki badań, które wskazują, że w tych pożywkach cebule lilií 'Star Gazer' i 'Casablanca' osiągnęły większe rozmiary i wyższą świeżą masę [Islam i in. 2020]. Również u *Cymbopogon citriatus* [Quiala i in. 2006], *Hosta* 'Minuteman', 'Stiletto' i 'Striptease', *Alocasia macrorrhizos* [Adelberg 2004], *Alocasia amazonia* [Jo i in. 2008] uzyskano roślinny o zwiększonej masie

w pożywkach płynnych. Przyspieszenie wzrostu cebul w kulturze płynnej - czas potrzebny do podwojenia świeżej masy cebul skrócił się z 25 dni na pożywce stałej do 5 dni w kulturze płynnej, wykazano u *L. auratum* [Takayama i Misawa 1983]. Również cebule *L. rubellum* w pożywce płynnej osiągnęły większą świeżą masę, niż w kulturze stałej [Niimi i in. 1997]. Zgodnie z przewidywaniem w przeprowadzonym doświadczeniu u lili żłotogłów w pożywkach płynnych uzyskano większy przyrosty świeżej masy eksplantatu, świeżej masy cebul, uzyskano też cebule o większej średnicy i wysokości, z większą liczbą łusek.

W drugim doświadczeniu tego etapu badań oceniono wzrost cebul w czterech wybranych pożywkach płynnych o takim samym składzie jak pożywki inicjalne. Jak pokazują badania większy przyrost świeżej masy eksplantatów lili uzyskiwany jest przy 100% i większej zawartości MS jak u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' [Aartrijk i Blom-Barnhorn 1980], *L. auratum* [Takayama i Misawa 1979]. Zmniejszenie ilości MS natomiast powoduje ograniczenie jej przyrostu jak u odmian 'Avignon', 'Connecticut King', 'Enchantment', 'Esther', 'Mont Blanc', 'Casablanca', 'Star Gazer', 'Gleria', 'Snow Queen' i *L. henryi* [Bonier i Tuyl 1997]. W przeprowadzonych badaniach u lili żłotogłów, większy przyrost świeżej masy całych eksplantatów uzyskano na pożywce z 100% ilością MS (niezależnie od obecności regulatora wzrostu NAA), natomiast odwrotnie niż u innych lili, cebule największy przyrost świeżej masy osiągnęły przy obniżonej o połowę ilości MS.

Ostatnim krokiem przy rozmnażaniu w *in vitro* jest aklimatyzacja uzyskanych roślin do której przeznaczono cebule po etapie wzrostu oceniając liczbę zaaklimatyzowanych roślin oraz wpływ chłodzenia na ich rozwój.

Liczba zaaklimatyzowanych roślin lili rozmnażanych technikami *in vitro* jest wysoka i wynosi u *L. oxypetalum* 66,7% [Joshi i Dhar 2009], 100% u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' [De Klerk i in. 1992], *L. speciosum* var. *gloriosoides* - 98% [Chang i in. 2000], czy *Lilium* sp. - 97% [Nhut i in 2006b]. Zbliżony rezultat uzyskano u lili żłotogłów zarówno, gdy aklimatyzowano chłodzone cebule z pożywki płynnej (81,7%) i zestalonej (88%), jak i cebule chłodzone (79,6%) i niechłodzone (83,9%) z pożywki płynnej.

Jak wynika z danych literaturowych w kulturach utrzymywanych w temperaturze 20°C od 6 tygodnia cebule przybyszowe wchodzi w spoczynek, co wykazano u *L. speciosum* 'Rubrum no. 10' [Delvallée i in. 1990, Paffen i in. 1990]. U lili stan spoczynku wiąże się zatrzymaniem rozwoju liści z zawiązków (primordiów) obecnych w cebuli z zachowaniem możliwości ciągłego rozwoju nowych łusek z tych zawiązków [De Klerk 2012]. Większość uzyskanych w pożywce płynnej cebul przybyszowych lili żłotogłów weszła w spoczynek, na co wskazuje niewielka liczba cebul zdolnych do rozwoju liści bez chłodzenia (13,5%) w porównaniu do cebul chłodzonych (57%). Natomiast porównanie wpływu chłodzenia na rozwój cebul lili żłotogłów, które rosły w pożywce płynnej lub zestalonej pokazało, że 6 tygodniowy czas chłodzenia jest wystarczający do przerwania spoczynku większości cebul rosnących na pożywce stałej (80,9%), podobnie do roślin *L. speciosum* 'Rubrum' [Kim i in. 1994]. Taki czas chłodzenia wydaje się być zbyt krótki dla cebul lili żłotogłów rosnących w pożywce płynnej, dlatego sugeruje się jego wydłużenie. Dłuższego, bo 8 tygodniowego chłodzenia do przerwania spoczynku wymagają np. cebule *L. ledebourii* [Azadi i Khosh-Khui 2007].

Na koniec prowadzonych eksperymentów sprawdzono czy w trakcie rozmnażania w warunkach *in vitro* nie doszło w zregenerowanych roślinach do zmian w ilości DNA. Tak jak u *L. longiflorum* 'Wase Teppo Yuri' [Arzate-Fernández i in. 1997], 19 lili [Godo i Mii 2001] oraz wcześniejszych badaniach zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin lili złotogłów [Kędra i Bach 2005] - wśród uzyskanych w trakcie niniejszych doświadczeń roślin też nie stwierdzono zmian w ilości DNA.

Na podstawie uzyskanych wyników można zaproponować procedurę przydatną do rozmnażania lili złotogłów w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem pożywek płynnych, w 16-tygodniowych cyklach kultur, z automatyczną wymianą pożywki co 2 tygodnie. Została ona przedstawiona w kolejnym rozdziale, w ostatnim wniosku. Zaproponowany schemat namnażania pozwoli w ciągu pół roku uzyskać z jednej siewki, a dokładniej z cebuli pobranej z siewki, około 50 nowych roślin.

8. Wnioski

INICJACJA KULTUR

1. Dezynfekcja powierzchniowa nasion lili złotogłów w 70% etanolu przez 60 sekund i kolejno w 15% roztworze Domestosu przez 15 minut jest skuteczna w 82-100%. Zdolność kiełkowania nasion w kulturach *in vitro* zależy od populacji, z której pochodzą. Najlepiej kiełkują nasiona z kolekcji w Tomaszkowicach (100%) i z ogrodu w Tenczynku (80%), najslabiej z kolekcji roślin gruntowych WBiO UR w Krakowie (58%).
2. Pochodzenie nasion nie wpływa na czas kiełkowania, nasiona w 35 dniu od siewu rozwijają korzeń zarodkowy, w 44 rozpoczyna się formowanie cebuli, 11 dni później wyrasta z cebuli korzeń, a po dwóch miesiącach od siewu zasycha hipokotyl.
3. Pochodzenie nasion wpływa na masę cebul uformowanych podczas kiełkowania, największe cebule powstają podczas kiełkowania nasion zebranych w kolekcji w Tomaszkowicach.

ORGANOGENEZA PRZYBYSZOWA

na siewkach po 16 tygodniowym cyklu kultury płynnej:

4. Na korzeniach cebul nie formują się organy przybyszowe.
5. Cebule przybyszowe, korzenie i liście oraz kalus powstają na łuskach cebulowych siewek, a wydajność tego procesu zależy od stanu skupienia pożywki i jej składu.
6. Najwięcej cebul przybyszowych (48 sztuk na 1 eksplantat) różnicują łuski cebulowe w pożywce płynnej 50% MS, z 3% sacharozy, nie zawierającej regulatorów wzrostu. Pożywki z 6% sacharozą hamują formowanie cebul przybyszowych.
7. Najwięcej korzeni (63 sztuki na 1 eksplantat) wyrasta z piętki cebul uformowanych na pożywce 100% MS, z 3% sacharozy, nie zawierającej regulatorów wzrostu. Wyrastanie korzeni przybyszowych jest hamowane przez dodatek do pożywki cytokininy BA.
8. W pożywkach płynnych często wstępuje nadmierne uwodnienie tkanek, którego nie wykazują organy uformowane na pożywkach zestalonych agarem. Wyższy poziom sacharozy w pożywkach płynnych (6%) zmniejsza to zjawisko. Obniżenie MS do 50% także zmniejsza nadmierne uwodnienie tkanek.
9. Kalus powstaje na wszystkich łuskach cebulowych w pożywkach płynnych, a pożywka z 6% sacharozą stymuluje jego formowanie.
10. Cebule przybyszowe uzyskane na pożywkach płynnych wzbogaconych 6% sacharozą nie formują liści.

WZROST CEBUL UFORMOWANYCH NA POŻYWKACH PŁYNNYCH w 16 tygodniowym cyklu uprawy w pożywce płynnej

11. Na zakończenie cyklu kultury płynnej zwiększa się świeża masa cebul wyjściowych oraz formują się nowe cebule, dodatkowo obserwowane jest powstawanie kalusa i rozwój korzeni przybyszowych.
12. Kultywacja cebul na pożywce płynnej wpływa na 3-4-krotne zwiększenie świeżej masy cebul przybyszowych, cebule mają większą średnicę i wysokość oraz więcej łusek w porównaniu do cebul pochodzących z kultur prowadzonych na pożywce stałej.
13. Kultywacja cebul na pożywce MS z obniżonym o połowę poziomem składników mineralnych skutkuje 2,5-krotnym zwiększeniem współczynnika świeżej masy cebul, około 20-krotnym zmniejszeniem liczby liści wyrastających z cebuli oraz około 10-krotnym zmniejszeniem niekorzystnego zjawiska nadmiernego uwodnienia tkanek, w porównaniu do pożywki o pełnym składzie makro- i mikroelementów MS. Natomiast zawartość NAA w pożywce najczęściej nie ma wpływu na te cechy.

AKLIMATYZACJA CEBUL

14. Spośród posadzonych *ex vitro* cebul zamiera około 16-20%, pozostałe ukorzeniają się, a część z tych ukorzenionych rozwija liście.
15. Chłodzenie cebul przez 6 tygodni w temperaturze 3°C przed posadzeniem do wielodoniczek, sprawia, że podczas aklimatyzacji cztery razy więcej cebul rozwija liście, które pojawiają się ponad dwukrotnie szybciej, w porównaniu do cebul niepoddanych chłodzeniu.

BADANIA CYTOMETRYCZNE

16. Badania liści regenerantów lili na cytometrze przepływowym nie wykazują zmian zawartości DNA w jądrach komórkowych regenerantów.

PROCEDURA rozmnażania lili złotogłów w pożywkach płynnych

17. Przeprowadzone badania potwierdziły postawioną hipotezę badawczą i na podstawie otrzymanych wyników proponuje się wydajną metodę rozmnażania lili złotogłów w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem pożywek płynnych, w 16-tygodniowych cyklach kultur, z automatyczną wymianą pożywki co 2 tygodnie. Schemat proponowanej procedury przedstawiono poniżej.

- **Dezynfekcja nasion:** 70% etanol przez 60 sekund, następnie 15% roztwór Domestosu przez 15 minut

- **Wysiew nasion** – pożywka 50% MS, 3% sacharozy, 0,7 % agar, pH = 5,8
kiełkowanie nasion i rozwój siewek – około 60 dni

- **Pozyskanie eksplantatów cebulowych z siewek**

- **Indukcja cebul przybyszowych**, pożywka płynna wytrząsana (próbówka płaskodenna Ø 2 cm, wytrząsarka 200 obr./min.):
50% MS, 3% sacharozy, pH = 5,8; 20°C, ciemność
7 pasaży na świeżą pożywkę co 14 dni (16 tygodni)

- **Pobranie cebul przybyszowych i przeniesienie na nową pożywkę**

- **Wzrost cebul** pożywka płynna wytrząsana (kolba stożkowa, wytrząsarka 100 obr./min.): 50% MS, 6% sacharozy, pH = 5,8; 20°C, ciemność
7 pasaży na świeżą pożywkę co 14 dni (16 tygodni)

- **Chłodzenie cebul** w 3°C (zamknięte pojemniki, na dnie wilgotna bibuła, ciemność)
6 tygodni

- **Aklimatyzacja** (substrat torfowy pH = 5,5-6,5, 20°C, fotoperiod 12/12, źródło światła lampa SON-T AGRO 400)

9. Spis literatury

- Aartrijk van J., Blom-Barnhoorn G. J.** 1980. Effects of sucrose, mineral salts, and some organic substances on the adventitious regeneration *in vitro* of plantlets from bulb-scale tissue of *Lilium speciosum* 'Rubrum'. *Acta Horticulturae* 109: 297-302.
- Adelberg J.** 2004. SIVB 2003 Congress Symposium Proceeding: Plant growth and sugar utilization in an agitated, thin-film liquid system for micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40: 245-250.
- Arzate-Fernández A.M., Nakazaki T., Okumoto Y.** 1997. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Plant Cell Reports* 16: 836-840.
- Ascough G.D., Fennell C.W.** 2004. The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany*. 70(2): 181-19.
- Aslam F., Nay S., Tario A., Ilzas S., Shahyadi K.** 2013. Rapid multiplication of ornamental bulbous plants of *Lilium orientalis* and *Lilium longiflorum*. *Pakistan Journal of Botany* 45(6): 2051-2055.
- Augettaz P., Paffen A., Devallée I., van der Linde P., de Klerk G.J.** 1990. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22: 167-172.
- Ault J.R., Siqueira S.S.** 2008. Morphogenetic response of *Lilium michiganense* to four auxin-type plant growth regulators *in vitro*. *Horticultural Science* 43(6): 1922-1924.
- Ayub R.A., dos Santos J.N., Zanlorensi Junior L.A., Mendes da Silva D., de Carvalho T.C., Grimaldi F.** 2019. Sucrose concentration and volume of liquid medium on the *in vitro* growth and development of blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. *Ciência e Agrotecnologia* 48: 1-8. doi. 10.1590/1413-7054201943007219.
- Azadi P., Khosh-Khui M.** 2007. Micro propagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(4): 582-591.
- Azadi P., Otang N.V., Chin D.P., Nakamura I., Fujisawa M., Harada H., Misawa N., Mii M.** 2010. Metabolic engineering of *Lilium xformolongi* using multiple genes of the carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Biotechnology Reports* 4: 269-280.
- Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., Saccardo F.** 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 37-44.
- Bach A., Sochacki D.** 2012. Propagation of ornamental geophytes. *Physiology and management systems*. [W:] *Ornamental geophytes from basic science to sustainable production*. Kamenetsky R., Okubo H. CRS Press Boca Raton, London, New York: 261-286.
- Bahmani R., Karami O., Gholami M.** 2009. Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106. *World Applied Sciences Journal* 6(11): 1513-1517.
- Bahr L.R., Compton M.E.** 2004. Competence for *in vitro* bulblet regeneration among eight *Lilium* genotypes. *Horticultural Science* 39(1): 127-129.
- Bakhshaie M., Babalar M., Mirmasoumi M., Khalighi A.** 2010a. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102: 229-235.
- Bakhshaie M., Babalar M., Mirmasoumi M., Khalighi A.** 2010b. Effect of light, sucrose, and cytokinins on somatic embryogenesis in *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss. *Via*

- transverse thin cell-layer cultures of bulblet microscales. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 85(6): 491-496.
- Bakhsaie M., Khosravi S., Azadi P., Bagheri H. 2016.** Biotechnological advances in *Lilium*. *Plant Cell Reports* 35: 1799-1826.
- Beattie D.J., White J.W. 1993.** *Lilium*-hybrids and species. [W:] *The physiology of flower bulbs*. De Hertogh A., Le Nard M. Elsevier Amsterdam: 423-454.
- Bokov D.O., Lufarov A.N., Krasnyuk (Jrr) I.I., Bessonov V.V. 2019.** Ethnopharmacological review on the wild edible medicinal plant *Lilium martagon* L. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 18(7): 1559-1564.
- Bonnier F.J.M., Van Tuyl J.M. 1997.** Long term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 81-87.
- Chandra S., Bandopadhyay R., Kumar V., Chandra R. 2010.** Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199-1205.
- Chang C., Chen T.C., C., Tsai Y.C., Chang W.C. 2000.** A tissue culture protocol for propagation of rare plant, *Lilium speciosum* Thunb, var. *gloriosoides* Baker. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 139-142.
- Casanova E., Moysset L., Trillas M.I. 2008.** Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biologia Plantarum* 52(1): 1-8.
- Cardarelli M., Suárez C.M.C. 2017.** Influence of ozone treatments on *in vitro* propagation of *Lilium* in bioreactor. *Acta Horticulturae* 1155: 381-386.
- Corbera J., Alvarez-Cros C., Stefanescu C. 2018.** Evidence of butterfly wing pollination in the martagon lily *Lilium martagon* L. *Butlleti de la Institució Catalana d'Història Natural* 82: 117-120.
- Dąbrowski J., Dąbski M., Kozak D. 1992.** The influence of some growth regulators on regeneration of lily bulbs *in vitro*. *Acta Horticulturae* 325: 537-541.
- De Hertogh A., Le Nard M. 1993.** Botanical aspects of flower bulbs [W:] *The physiology of flower bulbs*. De Hertogh A., Le Nard M. Elsevier Amsterdam: 14-17.
- De Klerk G.J. 2012.** Micropropagation of bulbous crops: Technology and present state. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1): 1-8.
- De Klerk G.J., Kim K.S., van Schadewijk M., Gerrtis M. 1992.** Growth of bulblets of *Lilium speciosum* *in vitro* and in soil. *Acta Horticulturae* 325: 513-520.
- Delvallée I., Paffen A., De Klerk G.J. 1990.** The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. II. The effect of temperature. *Physiologia Plantarum* 80: 431-436.
- Dhyani A., Sharma G., Nautiyal B.P., Nautiyal M.C. 2014.** Propagation and conservation of *Lilium polyphyllum* D. Don ex Royle. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 1: 144-147.
- Dorywalski J., Wojciechowicz M., Bartz J., 1964.** *Metodyka oceny nasion*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa: 66-68.
- Estaji A., Chamani E., Khazaei Z. 2021.** Influence of plant growth regulators on callogenesis and on the biomass of cell suspension in lily (*Lilium ledebourii* and *Lilium regal*). *Journal of Applied Biotechnology Reports* 8(1): 63-70.
- Fukui H., Adachi N., Hara T., Nakamura M. 1989.** *In vitro* growth and rapid multiplication of *Lilium japonicum* Thunb. *Plant Tissue Culture Letters* 6(3): 119-124.
- Gabryszewska E., Sochacki D. 2013.** Effect of various levels of sucrose and nitrogen salts on the growth and development of lily bulblets *in vitro*. *Acta Horticulturae* 1002: 139-145.

- Gallbright D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Firoozabady E.** 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Gerlach D.** 1972. *Zarys mikrotechniki botanicznej*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa.
- Gerrits M.M., De Klerk G.J.** 1992. Dry-matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica* 41(4): 461-468.
- Ghanbari S., Fakheri B.A., Naghavi M.R., Mazhidezhad N.** 2017. Investigation of direct regeneration in *Lilium ledebourii* Bioss through bulblet explants. *Journal of New Biological Reports* 6(2): 71-76.
- Godo T., Matsui K., Kida T., Mii M.** 1996. Effect of sugar type on the efficiency of plant regeneration from protoplast isolated from shoot tip-derived meristematic nodular clumps of *Lilium ×formolongi* Hort. *Plant Cell Reports* 15: 401-404.
- Godo T., Kobayashi K., Tagami T., Matsui K., Kida T.** 1998. *In vitro* propagation utilizing suspension cultures of meristematic nodular cell clumps and chromosome stability of *Lilium ×formolongi* hort. *Scientia Horticulturae* 72: 193-202.
- Godo T., Mii M.** 2001. *In vitro* germplasm preservation of lily species utilizing callus cultures at low temperature. *Acta Horticulturae* 560: 153-155.
- Goo D.H., Lim J.H., Cho H.R., Kim Y.J., Kim K.W.** 2005. Rapid enlargement of lily bulblet by bioreactor culture. *Acta Horticulturae* 673: 633-637.
- Grabowska B., Krause J., Mynett K.** 1987. *Uprawa cebulowych i bulwiastych roślin ozdobnych*. PWRiL Warszawa: 142-163.
- Guo Z., Wang Z., Li Y., Wang Q.** 2019. Effect of different concentrations of ozone on *in vitro* plant pathogens development, tomato yield and quality, photosynthetic activity and enzymatic activities. *Ozone: Science & Engineering* 41(6): 531-540.
- Guterman Y.** 2000. Maternal effects on seed during development. [W:] *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. CABI International: 59-84.
- Han B.H., Suh E.J., Choi S.L., Yae B.W., Yu H.J., Goo D.H.** 2004a. Stimulation of *in vitro* bulblet growth by the addition of liquid medium in *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca'. *Journal of Plant Biotechnology* 6(4): 241-246.
- Han B.H., Yu H.J., Yae B.W., Peak K.Y.** 2004b. *In vitro* micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Gorgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. *Scientia Horticulturae* 103: 39-49.
- Han B.H., Yae B.W., Hee Ju Yu, Peak K.Y.** 2005. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. *Scientia Horticulturae* 103: 351-359.
- Hellwig Z.** 1975. *Byliny w parku i ogrodzie*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa: 148-156.
- Higgins W.S., Stimart D.P.** 1990. Influence of *in vitro* generation temperature and post-*in vitro* cold storage duration on growth response of *Lilium longiflorum* bulblets. *Journal of the American Society for Horticulturae Science* 115(6): 930-933.
- Hazarika B.N.** 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85(12): 1704-1712.
- Ho C., Jian W., Lai H.** 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis from suspension cell cultures of *Lilium ×formolongi* Hort. Using a bioreactor system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42: 240-246.
- Horita M., Morohashi H., Komai F.** 2002. Regeneration of flowering plants difficile lily protoplast by means of nurse culture. *Planta* 215: 880-884.

- Horita M., Morohashi H., Komai F.** 2003. Production of fertile somatic hybrid plant between oriental hybrid lily and *Lilium ×formolongi*. *Planta* 217: 597-601
- Hvoslef-Eide, K. A. & Preil, W.** 2005. Liquid culture system for *in vitro* plant propagation. Springer, Netherlands: 1-18.
- Ishimori T., Niimi Y., Han D.S.** 2007. Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium ×formolongi* 'White Aga' cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 313-318.
- Ishimori T., Niimi Y., Han D.S.** 2009. *In vitro* flowering of *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Horticulturae* 120(2): 246-249.
- Islam S., Roni Md.Z.K., Shimasaki K.** 2020. Factors affecting *in vitro* bulblet growth of *Lilium orientalis* 'Star Gazer' and 'Casablanca'. *Acta Horticulturae* 1285: 81-87.
- Jakobsone G., Megre D., Ieviensch G.** 2006. Effect of cultivation conditions on morphological and biochemical characteristics of lily explants *in vitro*. *Acta Universitatis Latviensis* 71: 29-40.
- Jańczyk-Węglarska J., Węglarski K.** 1992. Ekologiczna i morfologiczna charakterystyka *Lilium martagon* L. na obszarze Wielkopolskiego Parku Narodowego. *Biuletyn Ogrodów Botanicznych, Muzeów i Zbiorów* 1: 31-45.
- Jásik J., De Klerk G.J.** 2006. Effect of methyl jasmonate on morphology and dormancy development in lily bulblets regenerated *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 25: 45-51.
- Jin S., Wand J., Wang X., Sun D., Li G., Genovesi A.D., Liu S.** 2014. Direct and indirect shoot and bulblet regeneration from cultured leaf explants of *Lilium pumilum*, an endangered species. *In Vitro Cell Developmental Biology - Plant* 50: 69-75.
- Jo U.A., Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y.** 2008. Micropropagation of *Alocasia amasonica* using semisolid and liquid cultures. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant* 44: 26-32.
- Joshi S.K., Dhar U.** 2009. *In vitro* propagation from axenic explants of *Lilium oxypetalum* (D. Don) Baker, an endemic bulbous plant of high altitude Himalaya. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 836-838.
- Kapoor R., Kumar S., Kanwar J.K.** 2008a. Bulblet regeneration from *ex vitro* root explant in lily hybrids. *Horticultural Science* 35: 107-112.
- Kapoor R., Kumar S., Kanwar J.K., Mahajan P.K.** 2008b. *In vitro* bulblet productivity in different explants of hybrid Liliies. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 16: 345-352.
- Kapoor R., Kumar S., Kanwar J.K.** 2008c. Bulblet rgeneration from leaf and internode explants of oriental hybrid lilies. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 2(2): 49-51.
- Kapoor R., Kumar S., Kanwar J.K.** 2009. Bulblet production from node explant grown *in vitro* in hybrids lilies. *International Journal of Plant Production* 3(4): 1-6.
- Kapoor M., Grewal H.S., Singh K.** 2016. *In vitro* morphogenesis in Asiatic *Lilium* cv. Chianti. *Journal of Ornamental Horticulture* 19: 38-42.
- Karalija E., Parić A., Muratović E.** 2013. Biochemical status of *in vitro* regenerated *Lilium bosniacum* and *Lilium cattaniae* plantlets. *Central European Journal of Biology* 8(9): 912-920.
- Kędra M., Bach A.** 2005. Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. *Acta Biologica Cracoviensia* 47(1): 65-73.
- Khan S., Jaskani M.J., Iqbal M.Z., Rafiq A.** 2015. Rapid multiplication of ornamental bulbous plants of *Lilium orientalis* and *Lilium longiflorum*. *International Journal of Modern Agriculture* 4(4): 57-61.

- Khosravi P., Kermani M.J., Nematzadeh G.A., Bihanta M.R.** 2007. A protocol for mass production of *Rosa hybrid* cv. Iceberg through *in vitro* propagation. Iranian Journal of Biotechnology 5(2): 100-104.
- Kim K.S., Davelaar E., De Klerk G.J.** 1994. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 90: 59-64.
- Kim Y.S., Han E.J., Paek K.Y.** 2001. A large scale production of lily bulblets through bioreactor culture. Acta Horticulturae 560: 383-386.
- Kolon K., Krawczyk A., Szczyrek B.** 1994. Dynamika populacji lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) w Karkonoszach. Geologiczne Problemy Karkonoszy. Materiały z sesji naukowej w Borowicach 13-15 X 1994: 237-240.
- Komai F., Morohashi H., Horita M.** 2006. Application of nurse culture for plant regeneration from protoplast of *Lilium japonicum* Thunb. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 42: 252-255.
- Kumar S., Kashyap M., Sharma D.R.** 2005. *In vitro* regeneration and bulblet growth from lily bulb scale explants as affected by retardants, sucrose and irradiance. Biologia Plantarum 49(4): 629-632.
- Kumar S., Awasthi V., Kanwar J.K.** 2007. Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on *in vitro* bulblet formation and growth in oriental lily. Horticultural Science 34: 77-83.
- Langens-Gerrits M., Lilien-Kipnis H., Croes A., Miller W., Kollöffel C., de Klerk G.J.** 1997. Bulb growth in lily regenerated *in vitro*. Acta Horticulturae 430: 267-273.
- Langens-Gerrits M., Alberts M., De Klerk G.J.** 1998. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 75-77.
- Langens-Gerrits M., De Klerk G., Croes A.** 2000. How to produce lily bulblets *in vitro* that perform optimally after planting. Acta Horticulturae 530: 289-295.
- Langens-Gerrits M.M., Nashimoto S., Croes A.F., De Klerk G.J.** 2001. Development of dormancy in different lily genotypes regenerated *in vitro*. Plant Growth Regulation 34: 2015-222.
- Langens-Gerrits M., De Klerk G., Croes A.** 2003. Phase change in lily bulblets regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 119: 590-597.
- Le B.V., Nhut D.T., Van T.T.T.** 1999. Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum* *in vitro*. Life Sciences 322: 303-310.
- Lian M., Chakrabarty D., Paek K.Y.** 2002a. Growth and uptake of sucrose and mineral ions by bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' during bioreactor culture. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 77: 253-257.
- Lian M.L., Muthy H.N., Paek K.Y.** 2002b. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. Scientia Horticulturae 94: 365-370.
- Lian M.L., Chakrabarty D., Paek K.Y.**, 2003a. Growth of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. Scientia Horticulturae 97: 41-48.
- Lian M.L., Chakrabarty D., Paek K.Y.**, 2003b. Bulblet formation from bulb scale segments of *Lilium* using bioreactor system. Biologia Plantarum 46(2): 199-203.
- Lian T., Qun-Xian D., Young-Qing W., Lu L., Shi-Feng L., Qing-Chun Z., Jian-Xin L., Xiu-Lan L.V.** 2009. Studies on the technique of tissue culture and rapid propagation of bulbils from *Lilium regale*. Plant Science Research 2(2): 14-19.
- LingFei X., FengWang M., Dong L.** 2009. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. *unicolor*). Scientia Horticulturae 119: 485-461.

- Liu X., Yang G.** 2012. Adventitious shoot regeneration of oriental lily (*Lilium orientalis*) and genetic stability evaluation based in ISSR marker variation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant* 48(2): 172-179.
- Malik M.** 2016. Rozmnażanie *in vitro* róż (*Rosa L.*) w kulturach płynnych stacjonarnych, wytrząsanych i bioreaktorowych. [W:] Współczesne kierunki badań nad roślinami ozdobnymi w Polsce . red. Bach A., Kapczyńska A., Malik M., Maślanka M. Wydawnictwo Uniwersytetu Rolniczego, Kraków: 239-251.
- Manuhara Y.S.W, Kusuma D.Y., Sari R.L.K, Kristanti A.N.** 2017. Biomass production of *Gynura procumbens* adventitious roots in different type of liquid culture. *Biosaintifika* 9(3): 523-529.
- Marinangeli P.A., Hernández L.F., Pellegrini C.P., Curvetto N.R.** 2003. Bulblet differentiation after scale propagation of *Lilium longiflorum*. *Horticultural Science* 128(3): 324-329.
- Mehrotra S., Goel M.K., Kukreja A.K., Mishra B.N.** 2007. Efficiency of liquid culture system over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*. 6(13): 1484-1492.
- MeiLan L., Musthy H.N., KeeYoeup P.** 2003. Photoautotrophic culture conditions and photosynthetic photon flux influence growth of *Lilium* bulblet *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39: 532-535.
- Mencel R.** 2003. Lilia złotogłów. *Las Polski* 13-14: 25.
- Michalik S., Michalik R.** 2001. Szata roślinna użytku ekologicznego Stanowisko Lili Złotogłów na Garbie Tenczyńskim. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* 4: 5-15.
- Mii M., Yuzawa Y., Motegi T., Dodo T.** 1994. Fertile plant regeneration from protoplast of a seed-propagated cultivar of *Lilium xformolongi* by utilizing meristematic nodular cell clumps. *Plant Science* 100(2): 221-226.
- Mirmasoumi M., Azadi P., Sharafi A., Otang Ntui V., Mii M.** 2013. Simple protocol for plant regeneration of *Lilium ledebourii* using transverse thin cell layer. *Progress in Biological Science* 3(2): 117-122.
- Mirmasoumi M., Bakhshaie M.** 2015. Effects of liquid, temporary immersion bioreactor and solid culture systems on micropropagation of *Lilium ledebourii* via bulblet microscales - An endangered valuable plant with ornamental potential. *Progress in Biological Sciences* 5(2): 169-180.
- Misra P., Datta S.K.** 2001. Acclimatization of Asiatic hybrid lilies under stress conditions after propagation through tissue culture. *Scientific correspondence. Current Science* 81(12): 1530-1533.
- Moraczewski I.R., Studnik-Wójcikowska B., Dubielecka B., Rutkowski L., Nowak K.A., Borkowski W., Galera H.** 2000. *Flora Ojczysta. Rośliny pospolite, chronione, ciekawe...* . Program multimedialny, wersja 2000 PL. Stigma s.c. Warszawa.
- Mori S., Adachi Y., Horimoto S., Suzuki S., Nakano M.** 2005. Callus formation and plantlet regeneration in various *Lilium* species and cultivars. *In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant* 41: 783-788.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Mynett K.** 1990. Kwiaty z mojego ogródka. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa: 183-187.
- Mynett K.** 1993a. Przypatrzmy się liliom. Hortrade – Łódź.
- Mynett K.**, 1993b. Lilie. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa.
- Naing A.H., Yun H., Lucidos J., Hwang Y.J., Kim C.K., Ahn B.J., Lim K.B.** 2014. Plant regeneration through various explants of *Lilium longiflorum* hybrid 'Bright Tower' and determination of ploidy level of regenerated plant. *Plant Biosystems* 148(2): 191-199.

- Nakano M., Sakakibara T., Suzuki S., Saito H.** 2000. Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lilium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor, 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Science* 158: 129-137.
- Nhut D.T.** 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Reports* 17: 913-916.
- Nhut D.T.** 2003. The control of *in vitro* direct main stem formation of *Lilium longiflorum* derived from receptacle culture, and rapid propagation by using *in vitro* stem nodes. *Plant Growth Regulation* 40: 179-184.
- Nhut D.T., Van Le B., Tanaka M., Tran Thanh Van K.** 2001a. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissue of *Lilium longiflorum*. *Scientia Horticulturae* 87: 131-138.
- Nhut D.T., Van Le B., Tran Thanh Van K.** 2001b. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37: 44-49.
- Nhut D.T., Hanh N.T.M., Tuan P.Q., Nguyet L.T.M., Tram N.T.H., Chinh N.C., Nguyen N.H., Vinh D.N.** 2006a. Liquid culture as positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum*. *Scientia Horticulturae* 110: 93-97.
- Nhut D.T., Tam N.T.D., Luan V.Q., Thien N.Q., Minth N.T., Du T.X., Le B.V.** 2006b. Standardization of *in vitro* lily (*Lilium* spp.) plantlets for propagation and bulb formation. *Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture*. Nong Lam University Ho Chi Minh City, October 20-21, 2006: 134-137.
- Niimi Y., Nakano M., Saito S.** 1997. Production of commercial *Lilium rubellum* Baker bulbs: Effects of volume and renewal of liquid medium on *in vitro* growth, bulb root infection during cold treatment, and post-*in-vitro* growth of bulblets. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 66: 113-119.
- Niimi Y., Misaki Y., Nakano M.** 2000. Production of commercial bulbs of *Lilium rubellum* Baker: Changes in carbohydrates in bulblets and sugar of liquid medium during their culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 69(2):161-165.
- Ogaki M., Furuichi Y., Kuroda K., Chin D.P., Ogawa Y., Mii M.** 2008. Importance of co-cultivation medium pH for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium ×formolongi*. *Plant Cell Report* 27: 699-705.
- Paek K.Y., Hahn E.J., Son S.H.** 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation system of plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37: 149-157.
- Paek K.Y., Chakraabarty D., Hahn E.J.** 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 287-300.
- Paffen A.M.G., Aguetz P., Delvallée I., Klerk de G.J., Bogers R.J.** 1990. The development of dormancy in lily bulblets generated *in vitro*. *Acta Horticulturae* 266: 51-58.
- Pandey R.K., Singh A.K., Mamata S.** 2009. *In vitro* propagation of *Lilium*. *Biological Forum – An International Journal* 1(2): 26-28.
- Penfield S., MacGregor D.R.** 2017. Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 68(4): 819-825.
- Pawlikowski P.** 1999. Nowe stanowiska rzadkich i chronionych gatunków roślin naczyniowych w południowej części Mazowieckiego Parku Krajobrazowego. *Chrońmy Przyrodę Ojczyzn* 5: 106-109.

- Pelkonen V.P., Kauppi A.** 1999. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Will.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. *International Journal of Plant Science* 160(3): 483-490.
- Piękoś-Mirkowa M., Mirek Z.** 2003. *Flora Polski. Atlas roślin chronionych.* Oficyna Wydawnicza Multico Warszawa: 202-203.
- Pieroni A., Giusti M.E., de Pasquale C., Lenzarini C., Censorii E., Gonzáles-Tejero M.R., Sánchez-Rojas C.P., Ramiro-Gutiérrez J.M., Skoula M., Johnson C., Sarpaki A., Della A., Paraskeva-Hadijchambi D., Hadijchambis A., Hmamouchi M., El-Jorhi S., El-Demerdash M., El-Zayat M., Al-Shahaby O., Houmani Z., Scherazed M.** 2006. Circum-Mediterranean cultural heritage and medicinal plant uses in traditional animal healthcare: a field survey in eight selected areas within the RUBIA project. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2:16.
- Pindel Z.** 2002a. Optymalizacja warunków kiełkowania nasion lili złotogłów (*Lilium martagon* L.) oraz wpływ chłodzenia siewek na wielkość cebul. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 483: 161-166.
- Pindel Z.** 2002b. Wpływ zmian warunków środowiska na populację i wzrost lili złotogłów (*Lilium martagon* L.). *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 483: 167-172.
- Polakowski B.** 1995. *Rośliny chronione. Atlas.* Państwowe Wydawnictwo Naukowe Warszawa: 109.
- Priyadarshi S., Sen S.** 1992. A revised scheme for mass propagation of Easter Lily. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 193-197.
- Prokopiuk B., Cioć M., Maślanka M., Pawowska B.** 2018. Effects of light spectra and benzyladenine on *in vitro* adventitious bulb and shoot formation of *Lilium regale* E.H. Wilson. *Propagation of Ornamental Plants* 18: 12-18.
- Qi Y., Du L., Quan Y., Tian F., Liu Y., Wang Y.** 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspension cultures and plant regeneration in *Lilium tenuifolium* oriental trumpet 'Robina'. *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 2047-2057.
- Quiala E., Barbón R., Jiménez E., De Feria M., Chávez M., Capote A., Pérez N.** 2006. Biomass production of *Cymbopogon citriatus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42: 298-300.
- Rezali N.I., Sidik N.J., Saleh A., Osman N.I., Adam N.A.M.** 2017. The effects of different strength of MS media in solid and liquid media on *in vitro* growth of *Typhonium flagelliforme*. *Asiaic Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 7(2): 151-156.
- Ruffoni B., Mascarello C., Savona M.** 2011. Strategies for *Lilium* propagation: Tradition vs. Biotech. *Acta Horticulturae* 900: 347-355.
- Rybczyński J.J., Gmolińska H.** 1989. 6-benzyladenine control of the initial bulblets formation of wild lily *Lilium martagon* L. *Acta Horticulturae* 251: 183-189.
- Saadon S., Zaccai M.** 2013. *Lilium candidum* bulblet and meristem development 49(3): 313-319.
- Saetiew K., Umamani T.** 2015. Micropropagation of *Lilium formolongo* via leaf explants. *Journal of Agricultural Technology* 11(4): 855-862.
- Sahoo M.R., Devi M.P., Dasgupta M., Prakash N., Ngachan S.V.** 2018. An efficient protocol for *in vitro* regeneration and conservation of Shirui lily (*Lilium mackliniae* Sealy): a lab-to-land approach to save the rare endangered Asiatic lily species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 54: 701-710.
- Saifullah K., Sheeba N., Mariam R., Naheed K., Asma N., Bushra S.** 2010. Cultivation of lilies (*Lilium regale*) for commercialization in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 42(2): 1103-1113.

- Simmonds J.A., Cumming B.G.** 1976. Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates. *Scientia Horticulturae* 5(2): 161-170.
- Skorić M., Živković S., Savić J., Šiler B., Sabovljević A., Todorović S., Grubišić D.** 2012. Efficient one-step tissue culture protocol for propagation of endemic plant, *Lilium martagon* var. *cattaniae* Vis. *African Journal of Biotechnology* 11(8): 1862-1867.
- Skucińska B.** 2001. Kultura komórek i tkanek. [W:] *Biotechnologia roślin*. Red. Malepszy S. Państwowe Wydawnictwo Naukowe Warszawa: 23-26.
- Stanilova M.I., Ilcheva V.P., Zagorska N.A.** 1994. Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Reports* 13: 451-453.
- Sugiura H., Agong S.G., Enami A., Kaneko H., Honma T.** 2000. Comparison between embryoid and shoot primordia methods of plantlet production for 'Asiatic Hybrid Lily' and 'Oriental Hybrid Lily'. *African Crop Science Journal* 8(2): 117-127.
- Szafer W.** 1969. Kwiaty i zwierzęta. *Zarys ekologii kwiatów*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe Warszawa: 217-218.
- Szweykowska A., Szweykowski J.** 1999. Botanika. Tom II Systematyka. Państwowe Wydawnictwo Naukowe Warszawa: 426-434.
- Takayama S., Misawa M.** 1979. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiologia Plantarum* 46: 184-190.
- Takayama S., Misawa M.** 1980. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 48: 121-125.
- Takayama S., Misawa M.** 1983. The mass propagation of *Lilium in vitro* by stimulation of multiple adventitious bulb-scale formation and shake culture. *Canadian Journal of Botany* 61: 224-228.
- Tang Y.P., Liu X.Q., Whaiti Giituru R., Chen L.Q.** 2010. Callus induction and plant regeneration from *in vitro* cultured leaves, petioles and scales of *Lilium leucanthemum* (Baker) Baker. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 24(4): 2071-2076.
- Tanimoto S., Matsubara Y.** 1995. Stimulating effect of spermine on bulblet formation in bulb-scale segments of *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Reports* 15: 297-300.
- Thakur R., Sood A., Nagar P.K., Pandey S., Sobti R.C., Ahuja P.S.** 2006. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application of pacrobutrazol or ancymidol, for its amenability in bioreactor system: growth parameters. *Plant Cell Reports* 25: 382-391.
- Tribulato A., Remotti P.C., Löffler H.J.M., van Tuyl J.M.** 1997a. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Cell Reports* 17: 113-118.
- Tribulato A., Remotti P.C., Löffler H.J.M.** 1997b. Lily regenerative callus and cell cultures for transformation. *Acta Horticulturae* 430: 299-306.
- Urbaniec-Kiepur M., Bach A.** 2014. Effect of pre-storage on *Lilium martagon* L. seed longevity following cryopreservation. *Cryoletters* 35(6): 462-472.
- Varshney A., Dhawan V., Srivastava P.S.** 2000. A protocol for *in vitro* mass propagation of hybrids of lily through liquid stationary culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 36: 383-391.
- Vieira P., Wantoch S., Lilley C.J., Chitwood D.J., Atkinson H.J., Kamo K.** 2015. Expression of cystatin transgene can confer resistance to root lesion nematodes in *Lilium longiflorum* cv. 'Nellie White'. *Transgenic Research* 24: 421-432.
- Wawrosch C., Malla P.R., Kopp B.** 2001. Clonal propagation of *Lilium nepalense* D.Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Reports* 20: 285-288.

- Wozniewski T., Blaschek W., Franz G.** 1991. *In vitro* propagation of *Lilium testaceum* and structural investigation of the storage β -1,4-glucomannan. *Plant Cell Reports* 10: 457-460.
- Yamagishi M.** 1998. Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *Scientia Horticulturae* 73: 239-247.
- Yang L., Chao L., Su X., Wang C., Dong C., Chen S.** 2021. High-frequency *in vitro* plantlet regeneration in *Lilium davidii* var. *unicolour* Salisb, an important edible and medicinal plant, and confirmation of genetic fidelity of regeneration plantlets using ISSR markers. *Plant Biotechnology Reports* 15: 435-446.
- Yin Z.F., Zhao B., Bi W.L., Chen L., Wang Q.C.** 2013. Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 49: 333-342.
- Zajac A., Zajac M.** 2001. Atlas rozmieszczenia roślin naczyniowych w Polsce. Pracownia Chronologii Komputerowej Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego Kraków: 332.
- Zhang J., Gai M., Li X., Li T., Sun H.** 2016. Somatic embryogenesis and direct as well as indirect organogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fish., an endangered ornamental and medicinal plant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80: 1898-1906.
- Zhola I., Ushkaura A., Ignashs J.** 1992. Propagation of healthy latvian-bred lily cultivars by means of flower-buds. *Acta Horticulturae* 325: 529-535.