

**MIKROROZMNAŻANIE ODMIAN MIEJSCOWYCH SZALOTKI
(*ALLIUM CEPA* L. VAR. *AGGREGATUM* G. DON)
- BADANIA WSTĘPNE**

**MICROPROPAGATION OF LOCAL SHALLOT GENOTYPES
(*ALLIUM CEPA* L. VAR. *AGGREGATUM* G. DON)
- PRELIMINARY EXPERIMENTS**

Elżbieta Kapusta, Krystyna Górecka

Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach

WSTĘP

Wegetatywne rozmnażanie niektórych gatunków warzyw, poprzez używanie podziemnych części, zwiększa ryzyko przenoszenia chorób i szkodników. Zastosowanie kultur tkankowych umożliwia szybkie namnażanie wegetatywne i pozwala na otrzymanie zdrowych roślin (Lapitan i in. 1991).

Szalotka jest bliską krewną cebuli zwyczajnej (*Allium cepa* L.), ale różni się od niej tym, że wytwarza nie jedną lecz kilka cebul. Jest byliną, która osiąga wysokość 15-100 cm (Knaflowski i in. 1999). Szalotka odznacza się dużą wczesnością. Osiąga dojrzałość zbiorczą po 70-75 dniach od posadzenia, a szczypiar można zbierać już po około 30 dniach (Kotlińska 1995). Wśród wielu związków, które występują w cebulach i szczypiarze szalotki najbardziej wartościowe pod względem zdrowotnym są: kwercetyna, kwasy fenolowe, wielosiarczki allilopropylowe oraz magnez, żelazo, wapń, potas, fosfor (Horbowicz 2003). Spośród flawonoidów na szczególną uwagę zasługują flawonole, będące silnymi antyutleniaczami zdolnymi inaktywować wolne rodniki i nadtlenki (Rice-Evan i Miler 1996). Zwiększona zawartość flawonoidów w diecie może istotnie wpływać na obniżenie ryzyka wystąpienia różnych form nowotworów i niektórych chorób serca (Formica i Regelson 1995; Hertog i in. 1993a, 1993b, 1995; Horbowicz 2000, 2006).

Szalotka może być rozmnażana zarówno wegetatywnie, jak i generatywnie. Rozmnażanie wegetatywne pozwala na zachowanie cech odmianowych, ale w przypadku tej rośliny posiada wiele niedogodności, jak niska wydajność, wysokie koszty przechowywania wysadków (Bajer 2008). Ponadto wegetatywne rozmnażanie szalotki powoduje nasilenie występowania trudnych do zwalczania chorób wirusowych, dających objawy w postaci silnych deformacji i chlorotycznych przebarwień

szcypioru (Tendaj 2007). Zastosowanie kultur *in vitro* umożliwi efektywne i szybkie mnożenie szalotki.

Celem badań było opracowanie sposobu przygotowania eksplantatu wyjściowego, metody sterylizacji materiału roślinnego oraz składu pożywek do mikrorozmnażania szalotki.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w Instytucie Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach. Obiektem badań były dwie polskie odmiany miejscowe szalotki (E-2477 i BES-52), zebrane podczas ekspedycji Pracowni Zasobów Genowych Instytutu Warzywnictwa i włączone do kolekcji banku genów prowadzonej w tej pracowni (tab. 1).

Tabela 1. Badane obiekty szalotki
Table 1. Investigated shallot accessions

Lp. Order number	Nr kolekcyjny Collection number	Rok włączenia do kolekcji Acquisition year	Miejsce zebrania Collection site
1	E-2477	1993	Lisia Jama, Sierakowice Gdańsk
2	BES-52	1997	Goleszów, ul. Cieszyńska, Cieszyn

W doświadczeniu I przeprowadzono porównanie dwóch sposobów przygotowania eksplantatów wyjściowych, a w II badano wpływ składu pożywki na efektywność mikrorozmnażania szalotki. Przeprowadzono również próbę adaptacji roślin otrzymanych z *in vitro* do warunków zewnętrznych. Eksplantatami inicjalnymi do zakładania kultur *in vitro* były fragmenty mięsistych łusek z merystemem i częścią piętki wycinane z cebul tzw. „twin scales”. Materiał roślinny przygotowano dwoma sposobami:

- sterylizacja całych cebul obranych z suchych łusek, a następnie izolacja eksplantatów „twin scales”,
- sterylizacja wyizolowanych z cebul szalotki eksplantatów „twin scales”.

Do sterylizacji materiału roślinnego używano 70% etanolu przez 30 sek., a następnie 3% podchlorynu sodu z 2 kroplami Tweenu 20 przez 20 min., po czym 3-krotnie przepłukiwano wyjałowioną wodą destylowaną.

Wysterylizowane eksplantaty inicjalne wykładano do probówek zawierających po 10 ml pożywki MS Muraschige i Skoog (1962) z $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA (kwas naftylo-1-octowy) i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2iP (2-izopentylo-adenina) puryna, (po jednym eksplantacie w probówce). Wykładano po 20 eksplantatów z każdej odmiany szalotki. Kultury umieszczano w pomieszczeniu wzrostowym i prowadzono przy 16 godzinnym oświetleniu o intensywności $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ i temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$. Obserwacje czystości kultur przeprowadzano po czterech, dziesięciu i dwudziestu dniach licząc zdrowe i zakażone eksplantaty. Po upływie 6-ciu tygodni od wyłożenia eksplantatów na pożywkę wykonano pierwszy pasaż. Podczas pasażu wyróżniono następujące kategorie otrzymanego materiału roślinnego:

- kompletne rośliny,
- pędy,
- pędy i liście zniekształcone,
- martwe eksplantaty.

Wszystkie żywe, uzyskane podczas pasażu, eksplantaty wykorzystano do założenia II doświadczenia.

Stosowano 3 pożywki o różnej zawartości cytokinin:

- pożywka MS z $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2iP
- pożywka MS z $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA i $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ TDZ (tidiazuron)
- pożywka MS z $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA+ $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2iP

Każda z wyżej wymienionych pożywek zawierała 3% sacharozy oraz $6,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ agaru, pH ustalono na poziomie 5,8. Na każdą pożywkę wyłożono po około 60 eksplantatów. Obserwacje regeneracji oraz pasażę przeprowadzano co 6 tygodni, a podczas każdego pasażowania liczono powstające regeneranty i zaliczano je do poszczególnych kategorii. Wpływ zastosowanych pożywek na żywotność i rozwój eksplantatów określano poprzez liczbę regenerantów w wyżej wymienionych kategoriach (wyrażonych w procentach). Do adaptacji rośliny szalotki wysadzono do wielodoniczek w szklarni i umieszczono w namiociku foliowym w celu zapewnienia wysokiej wilgotności.

WYNIKI

Stwierdzono, że sposób przygotowanie eksplantatu inicjalnego miał wpływ na zdrowotność kultur *in vitro* i ich dalszy rozwój. Sterylizacja cebul, a następnie wycinanie z nich eksplantatów wyjściowych, okazała się bardziej efektywna niż bezpośrednia sterylizacja wyizolowanych eksplantatów (tab. 2).

Tabela 2. Wpływ sposobu sterylizacji materiału roślinnego na czystość kultur
 Table 2. Influence of sterilization methods of plant material on *in vitro* culture

Sposób sterylizacji Sterilisation method	Odmiana Variety	Liczba wyłożonych eksplantatów Number of explants	Liczba i procent eksplantatów; Number and percentage of explants											
			po 4 dniach after 4 days				po 10 dniach after 10 days				po 20 dniach after 20 days			
			zdrowych healthy		zakażonych infected		zdrowych healthy		zakażonych infected		zdrowych healthy		zakażonych infected	
			szl.	%	szl.	%	szl.	%	szl.	%	szl.	%	szl.	%
I. Sterylizacja cebulek; Sterilisation of bulbs	E-2477	20	100	0	0	20	100,0	0	0,0	15	75,0	5	25,0	
	BES-52	20	100	0	0	14	70,0	6	30,0	10	50,0	10	50,0	
II. Sterylizacja eksplantatów „twin scales” Sterilisation of explants ”twin scales”	E-2477	20	100	0	0	19	95,0	1	5,0	18	90,0	2	10,0	
	BES-52	20	100	0	0	10	50,0	10	50,0	8	40,0	12	60,0	

Podczas pierwszych obserwacji kultur stwierdzono, że eksplantaty obydwu odmian wycięte ze sterylizowanych całych cebul były zdrowe i rozwijały się prawidłowo tworząc zaczątki zielonych liści. Natomiast, gdy sterylizowano „twin scales”, u obydwu odmian były one również zdrowe, ale zaczątki liści były wyraźnie mniejsze. W przypadku sterylizacji całych cebul po upływie 10 dni wśród eksplantatów szalotki BES-52 zaobserwowano 30% zainfekowanych kultur *in vitro*, a pozostałe wykazywały intensywny wzrost, niektóre nawet wytworzyły korzenie. Wśród eksplantatów szalotki odmiany E-2477 po 10 dniach nie obserwowano zakażeń, ale zdrowe eksplantaty rozwijały się mniej intensywnie. W przypadku sterylizacji wyizolowanych eksplantatów z cebul szalotki E-2477 tylko 1 eksplantat był zainfekowany, natomiast u odmiany BES-52 zaobserwowano aż 50% zakażonych (tab. 2).

Po 20 dniach kultury po zastosowaniu sterylizacji całych cebul u odmiany E-2477 zaobserwowano 25% eksplantatów zakażonych, natomiast u odmiany BES-52 było ich 50%. Przy bezpośredniej sterylizacji eksplantatów „twin scales” zaobserwowano tylko 10% zainfekowanych u odmiany E-2477, podczas gdy u odmiany BES-52 było 60% zakażonych. U obu odmian po sterylizacji wyciętych eksplantatów rozwijały się one słabiej w porównaniu z eksplantatami uzyskanymi ze sterylizacji całych cebul (tab.2).

Kiedy sterylizacji poddawano całe cebule, w trakcie pasażu, u odmiany E-2477 ze wszystkich eksplantatów otrzymano kompletne rośliny (100%), a u odmiany BES-52 kompletne rośliny stanowiły 60% i 40% nieukorzenione pędy (tab. 3). Nie obserwowano występowania roślin ze zniekształconymi pędami i liśćmi. W przypadku sterylizacji eksplantatów „twin scales” nie tworzyły się kompletne rośliny u żadnego z obiektów. Natomiast u obu odmian powstawały pędy oraz zniekształcone pędy i liście. U odmiany BES-52 było 75% eksplantatów tworzących prawidłowe pędy i 25% tworzących zniekształcone pędy i liście. U odmiany E-2477 u 77,8% eksplantatów wyrastały pędy, a u 22,2% zniekształcone pędy i liście (tab. 3).

Tabela 3. Obserwacje wzrostu i rozwoju eksplantatów podczas pasażu (doświadczenie I)

Table 3. Observation of growth and development of explants during passage (experiment I)

Sposób przygotowania eksplantatu Sterilisation method	Odmiana Variety	Liczba eksplantatów sterylnych Number of sterilized explants	Liczba eksplantatów tworzących Number of plantlets					
			Kompletne rośliny Complete plants		Pędy Shoots		Zniekształcone pędy i liście Deformed shoots and leaves	
			szt.	%	szt.	%	szt.	%
I. sterylizacja cebul; Sterilisation of bulbs	E-2477	15	15	100,0	0	0,0	0	0,0
	BES-52	10	6	60,0	4	40,0	0	0,0
II. sterylizacja „twin scales”; Sterilisation of explants „twin scales”	E-2477	18	0	0,0	14	77,8	4	22,2
	BES-52	8	0	0,0	6	75,0	2	25,0

W doświadczeniu II, dotyczącym porównania składu pożywek podczas pierwszego pasażu, największą ilość kompletnych roślin (52,9%) uzyskano u odmiany E-2477 na pożywce MS + 0.1 mg·l⁻¹ NAA + 5 mg·l⁻¹ 2iP, nieco mniej roślin (48,1%) uzyskano na tej pożywce u odmiany BES-52. Również na tej pożywce u obydwu odmian uzyskano podobne ilości pędów (około 11%)(tab. 4). Na pożywce MS + 0.1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP u odmiany E-2477 45,5% stanowiły kompletne rośliny, a 11,4% pędy. Natomiast u odmiany BES-52 kompletne rośliny stanowiły 40,5%, a pędy 10,8%. Na pożywce MS + 0.1 mg·l⁻¹ NAA + 1 mg·l⁻¹ TDZ więcej kompletnych roślin było u odmiany E-2477 (43,3%) w porównaniu do odmiany BES-52 (32%). Natomiast największą ilość martwych eksplantatów zaobserwowano u odmiany BES-52 na wszystkich rodzajach pożywek (tab. 4).

Tabela 4. Wzrost i rozwój eksplantatów w pierwszym pasażu (doświadczenie II)
 Table 4. Growth and development of *in vitro* plants during first passage (experiment II)

Pożywka Medium (mg·l ⁻¹)	Odmiana Variety	Liczba wyłożonych eksplantatów Number of explants	Liczba eksplantatów tworzących Number of plantlets						Liczba martwych eksplantatów Number of dead explants	
			Kompletne rośliny Complete plants		Pędy Shoots		Zniekształ- cone pędy i liście Deformed shoots and leaves		szt.	%
			szt.	%	szt.	%	szt.	%		
MS 0,1 NAA + 0,5 2iP	E-2477	44	20	45,5	5	11,4	17	38,6	2	4,5
	BES-52	37	15	40,5	4	10,8	16	43,2	2	5,4
MS 0,1 NAA + 1 TDZ	E-2477	30	13	43,3	6	20,0	11	36,7	0	0,0
	BES-52	25	8	32,0	3	12,0	12	48,0	2	8,0
MS 0,1 NAA + 5 2iP	E-2477	34	18	52,9	4	11,8	12	35,3	0	0,0
	BES-52	27	13	48,1	3	11,1	7	25,9	2	7,4

Podczas drugiego pasażu w II doświadczeniu na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP u odmiany E-2477 uzyskano 43,2% kompletnych roślin, 4,5% stanowiły pędy i aż 52,3% zniekształcone pędy i liście. U genotypu BES-52 uzyskano 53,8% kompletnych roślin, 17,9% pędów i 28,2% zniekształconych pędów i liści. Na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 1 mg·l⁻¹ TDZ uzyskano: 31,8% kompletnych roślin u odmiany E-2477 i 26,7% u BES-52. Uzyskano także po ok. 30% prawidłowych pędów i po 40% zniekształconych pędów i liści. Natomiast na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 5 mg·l⁻¹ 2iP u odmiany E-2477 otrzymano 52% kompletnych roślin, podczas gdy u odmiany BES-52 tylko 37,5%. U odmiany E-2477 uzyskano także więcej prawidłowych pędów (32%) (tab. 5).

Największą ilość roślin, które przeznaczone zostały do adaptacji, uzyskano na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP, a najmniej na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 1 mg·l⁻¹ TDZ.

Tabela. 5. Wzrost i rozwój eksplantatów w drugim pasażu (doświadczenie II)
Table 5. Growth and development of *in vitro* plants during second passage (experiment II)

Pożywka Medium (mg·l ⁻¹)	Odmiana Variety	Liczba roślin uzyskanych po II pasażu Number of explants after second pas- sage	Liczba eksplantatów tworzących Number of plantlets					
			Kompletne rośliny Complete plants		Pędy Shoots		Zniekształ- cone pędy i liście Deformed shoots and leaves	
			szt.	%	szt.	%	szt.	%
MS 0,1NAA + 0,5 2iP	E-2477	44	19	43,2	2	4,5	23	52,3
	BES-52	39	21	53,8	7	17,9	11	28,2
MS 0,1NAA + 1 TDZ	E-2477	22	7	31,8	6	27,3	9	40,9
	BES-52	15	4	26,7	5	33,3	6	40,0
MS 0,1 NAA + 5 2iP	E-2477	25	13	52,0	8	32,0	5	20,0
	BES-52	8	3	37,5	2	25,0	3	37,5

Tabela 6. Wpływ pożywki i odmiany na adaptację roślin szalotki
Table 6. Influence of medium and variety on adaptation of shallot plants

Pożywka Medium (mg·l ⁻¹)	Odmiana Variety	Liczba roślin wysadzonych Number of planted plants	Liczba roślin Zaadaptowanych Number of adapted plants
MS 0,1 NAA+0,5 2iP	E-2477	19	14
	BES-52	21	17
MS 0,1 NAA+1TDZ	E-2477	7	4
	BES-52	4	0
MS 0,1 NAA+5 2iP	E-2477	13	9
	BES-52	3	2

Największa ilość zaadaptowanych roślin pochodziła z pożywki MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP, u odmiany E-2477 na wysadzone 19 - zaadaptowało się 14; natomiast u odmiany BES-52 na wysadzonych 21 roślin 17 było zaadaptowanych. Natomiast w przypadku pożywki MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 5 mg·l⁻¹ 2iP u odmiany E-2477 na wysadzonych 13 roślin zaadaptowało się 9, a u odmiany BES-52 na wysadzone 3 zaadaptowały się 2. Najmniej roślin, które zaadaptowały się do warunków *ex vitro* uzyskano spośród otrzymanych na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 1 mg·l⁻¹ TDZ – na wysadzonych 11 roślin zaadaptowały się tylko 4 (tab. 6).

DYSKUSJA

Rośliny cebulowe posiadają zdolność regeneracji pędów przybyszowych, cebul lub całych roślin na fragmentach łusek, które są często stosowane jako eksplantaty inicjalne w rozmnażaniu *in vitro* roślin cebulowych (Gabryszewska i Saniewski 1989). W przeprowadzonym doświadczeniu eksplantatami inicjalnymi do zakładania kultur *in vitro* szalotki były fragmenty mięsistych łusek z merystemem i częścią piętki wycinane z cebul, tzw. „twin scales”.

Stwierdzono, że najlepszym sposobem przygotowania eksplantatów okazała się sterylizacja całych cebul, a następnie wycinanie eksplantatów właściwych w sterylnych warunkach. Zastosowany sposób sterylizacji, czyli płukanie przez 30 sekund w 70% etanolu, następnie przez 20 minut w 3% podchlorynie sodu + 2 krople Tween i 3-krotne przepłukanie w wodzie destylowanej, okazał się odpowiednią metodą do uzyskania sterylnych eksplantatów. Lassociński i in. (1985) przygotowywali eksplantaty wyjściowe cebuli do zakładania kultury *in vitro* usuwając suche

łuski, niektóre mięsiste łuski i części piętki z cebuli. Pozostawiona część cebuli była cięta na 10-16 „twin scales”, które zawierały fragmenty świeżej łuski i część piętki. Eksplantaty były płukane trzy razy w sterylnej wodzie i wkładane na pożywkę. Natomiast Hidayat (2005) w badaniach nad mikrorozmnażaniem szalotki używał jako eksplantatów wyjściowych fragmentów pędów i fragmentów części piętkowej. Były one sterylizowane w 70% alkoholu przez kilka minut, następnie przez 15 minut w 1% Chloroxie i kilka razy przepłukiwane w destylowanej sterylnej wodzie, co okazało się odpowiednim sposobem sterylizacji. W pracy Makowskiej i Kotlińskiej (2001) nad mikrorozmnażaniem czosnku stwierdzono, że stożek wzrostu izolowany z cebulek powietrznych jest najodpowiedniejszym rodzajem eksplantatu wyjściowego. Cebulki po usunięciu uschniętych liści były sterylizowane przez 2 minuty w 70% etanolu, następnie przez 15 minut w podchlorynie sodu i wkładane na pożywki.

Stwierdzono najlepszy wzrost i rozwój kultur na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP. W dostępnych w literaturze opisach prowadzenia kultur *in vitro* roślin cebulowych w celu mikrorozmnażania przeważnie stosowana jest pożywka MS: Peffley i in. (1992) - mikrorozmnażanie cebuli siedmiolatki; Haque i in. (2003), Kim i in. (2003), Salam i in. (2008) - mikrorozmnażanie czosnku. Również Patena i in. (1991) stwierdzili, że użycie do założenia kultur *in vitro* szalotki i czosnku, pożywki MS zawierającej 4 mg·l⁻¹ BA spowodowało powstanie pełnych wigoru pędów.

W badaniu przeprowadzonym przez Hidayat (2005) eksplantaty pędowe szalotki na pożywce MS z 0,1 mg·l⁻¹ NAA i 1,0 mg·l⁻¹ 2iP wytworzyły najwięcej roślin długich; natomiast zwiększenie koncentracji NAA do 0,25 mg·l⁻¹ w kombinacji z 1,0 mg·l⁻¹ BA i zeatyną wpłynęło na wielkość roślin, ale nie była to znacząca różnica.

Roksana i in. (2002) podają, że różne cytokininy (2iP, BAP, Kn) i różne auksyny (IBA, NAA) w kombinacjach są lepsze dla wczesnej inicjacji pędów (już po 3-4 dniach) niż użycie samych cytokinin. Zaobserwowano na pożywce MS z kombinacją 0,5 mg·l⁻¹ 2iP + 0,25 mg·l⁻¹ NAA, że rozwój zaczynał się już po 3-4 dniach. Natomiast na pożywce bez regulatorów wzrostu nie następowało rozmnażanie się pędów. Najwyższą częstotliwość (6,1%) formowania cebul obserwowano na pożywce MS z 0,5 mg·l⁻¹ 2iP + 0,25 mg·l⁻¹ NAA.

W badaniach przedstawionych w tej pracy najlepszą aklimatyzację roślin szalotki uzyskano w przypadku roślin otrzymanych na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP wysadzonych do podłoża torfowego. Matsubara i Chen (1989) wysadzili rośliny czosnku otrzymane *in*

in vitro w perlicie, w szklarni. Procent roślin zaaklimatyzowanych wahał się od 30% do 50%. Lapitana i Patena (1992) ukorzenione cebulki czosnku sadzili do doniczek w szklarni. Przed posadzeniem z korzeni roślin wymyto agar, a korzenie były moczone w roztworze fungicydu (0,1% Dithane) przez 1 minutę. Następnie posadzono je w sterylną mieszankę zawierającą obornik, piasek i ziemię w stosunku 1:1:1. Rasco i Patena (1997) uzyskane rosące rośliny z sukcesem aklimatyzowali w szklarni. Procent roślin, które przeżyły był wysoki i wynosił 82,14%.

WNIOSKI

1. Sposób przygotowania eksplantatów wyjściowych miał wpływ na zdrowotność i rozwój kultur. Sterylizacja całych cebul, a następnie wycinanie eksplantatów właściwych zastosowana w tych badaniach dała lepsze efekty od sterylizacji gotowego eksplantatu, tzw. „twin scale”.
2. Najlepszy wzrost i rozwój roślin szalotki stwierdzono na pożywce MS wzbogaconej 0,1 mg·l⁻¹ NAA i 0,5 mg·l⁻¹ 2iP.
3. Najlepiej zaadaptowały się rośliny uzyskane na pożywce MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP.

Literatura

- Bajer M. 2008. Szalotka krewna cebuli. *Owoce Warzywa Kwiaty*. 18: 22-23.
- Formica J.V., Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 33: 1061-1080.
- Gabryszewska E., Saniewski M. 1989. Czynniki regulujące wzrost i rozwój roślin ozdobnych z rodzin *Liliaceae*, *Amaryllidaceae* i *Iridaceae in vitro*. *Kosmos* 38: 485-503.
- Haque M.S., Wada T., Hattori K. 2003. Effects of sucrose, mannitol and KH₂PO₄ on proliferation of root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in garlic. *Asian Journal of Plant Sciences* 2: 903-908.
- Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollmann P.C.H., Katan M.B., Kromhout D., 1993a. Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 100-1011.
- Hertog M.G.L., Hollmann P.C.H., van de Putte B., 1993b. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 1241-1246.
- Hertog M.G.L., Kromhout D., Aravansis C., Blacburn H., Buzina R., Fidanza F., Gianpaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B.S., Toshinue M., Feskens E.J.M., Hollmann P.C.H., Katan M.B., 1995. Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and

- cancer in the Seven Country Study. Archives of Internal Medicine 155: 381-391.
- Hidayat I. 2005. *In vitro* plant regeneration and bulblet formation of shallots (*Allium ascalonicum* L.) 'Sumensep'. Acta Horticulture 688: 251-257.
- Horbowicz M. 2000. Występowanie, biosynteza i właściwości biologiczne flawonoli. Postępy Nauk Rolniczych 2: 3-18.
- Horbowicz M. 2003. Warzywa przeciwdziałające chorobom cywilizacyjnym. Hasło Ogrodnicze. Nr.9.
- Horbowicz M. 2006. Wpływ przechowywania na zawartość kwercetyny w suszonej i mrożonej szalotce. Acta Agrobotanica. Vol. 59: 175-182.
- Kim E.K., Hahn E.J., Murthy H.N., Paek K.Y. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 231-236.
- Knaflewski M., Krzesiński W., Małachowski A. 1999. Warzywa cebulowe. Biologia i odmianoznawstwo roślin warzywnych. Poznań. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego: 13-14.
- Kotlińska T. 1995 Variability of some features in shallot landraces (*A. cepa* var. *aggregatum* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Report of Working Group on Allium. Fifth meeting, Skierniewice, Poland. May 25-27: 73-78.
- Lapitan V., Patena L. 1992. Bulblet formation *in vitro*, a new approach to garlic (*Allium sativum* L.) "Basic seed" production. Philippines Journal Crop Science 17: 89-94.
- Lapitan V., Patena L., Rosario T. 1991. *In vitro* system of producing shallot (*Allium cepa* var. group *aggregatum*) planting materials. Crop Science Society of the Philippines 16: 95-101.
- Lassociński W., Górecka K., Górecki R. 1985. Preliminary report on onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) propagation *in vitro*. Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences. Vol.33: 1-6.
- Makowska Ż., Kotlińska T. 2001. Elaboration of optimal conditions for micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum*). Vegetable Crops Research Bulletin 54: 19-23.
- Matsubara S., Chen D. 1989. *In vitro* production of garlic plants and field acclimatization. HortScience. Vol. 24: 677-679.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, Vol. 15: 473-497.
- Patena L., Rosa B., Rosario T. 1991. *In vitro* response of garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*Allium ascalonicum* L.) to 6-benzyloaminopurine, kinetin, 2-isopentenyladenine, 1-naphthaleneacetic acid and mannitol. Crop Science Society of the Philippines 6: 25-28.
- Peffley E.B. 1992. Micropropagation of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) and its hybrid (*A. fistulosum* x *A. cepa*) derivatives. Biotechnology in Agriculture and Forestry 19. High-Tech and Micropropagation

- III. Praca zbiorowa pod redakcją Y.P.S. Bajaj. Berlin Heidelberg. Springer - Verlag: 58-70, 244-261.
- Rasco S.M., Patena L.F. 1997. Control of hyperhydricity in shallot (*Allium cepa* var. group *aggregatum*) micropropagation. Philippines Journal Crop Science 22: 106-111.
- Rice-Evans C.A., Miler N.J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochemical Society Transactions 24: 790-795.
- Roksana R., Alam M.F., Islam R., Hossain M.M. 2002. *In vitro* bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). Plant Tissue Culture 12: 11-17.
- Salam M.A., Ali M.R., Ali Md E., Alam K.A., Reza M.S.H., Islam S., Rahman S.M.M. 2008. Callus induction and regeneration of indigenous garlic (*Allium sativum* L.). American Journal of Plant Physiology 3: 33-39.
- Tendaj M. 2007. Metody uprawy szalotki. Owoce Warzywa Kwiaty 8:19-20.

Elżbieta Kapusta, Krystyna Górecka

MICROPROPAGATION OF LOCAL SHALLOT GENOTYPES
(*ALLIUM CEPA* L. VAR. *AGGREGATUM* G. DON)
- PRELIMINARY EXPERIMENTS

Summary

Virus diseases are the main factor limiting the efficiency of vegetatively propagated plants. The technique of meristem culture and micropropagation of *in vitro* plants is one of the best method to obtain virus free plants. The aim of the experiments was elaboration of methods: of explants sterilization, of explants preparation and medium composition for micropropagation of two accessions of shallot. In the first experiment there were compared two methods of explants preparation. In the second experiment 3 media were tested for micropropagation efficiency and also adaptation plants for *ex vitro* conditions was conducted. Explants of shallots were twin scales cut from bulbs. The results showed that the best method of *in vitro* culture initiation was sterilization of all bulbs and cut from them twin scales. The best medium for growth plants was MS supplemented with 0,5 mg·l⁻¹ 2iP and 0,1 mg·l⁻¹ NAA. The most plants obtained on medium MS + 0,1 mg·l⁻¹ NAA + 0,5 mg·l⁻¹ 2iP were adapted to external conditions.