

REGENERACJA KALUSA Z EKSPLANTATÓW KORZENIOWYCH U *CHRYSANTHEMUM* × *GRANDIFLORUM* (RAMAT.) KITAM.

Justyna Lema-Rumińska, Alicja Tymoszek, Natalia Miler,
Beata Durau

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

Streszczenie. Celem badań było opracowanie metody regeneracji kalusa oraz zarodków somatycznych z eksplantatów korzeniowych u chryzantem. Fragmenty korzeni inokulowano na pożywki MS zawierające $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 6-benzylaminopuryny (BAP) oraz od $0,0$ do $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Uzyskano regenerację kalusa oraz zarodków somatycznych u badanych odmian tylko na pożywkach zawierających jednocześnie auksynę i cytokininę. W drugim doświadczeniu kalus zregenerowany na pożywce zawierającej $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D i $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP przeniesiono na pożywki o zróżnicowanej zawartości regulatorów wzrostu, tiaminy i sacharozy. Określono przyrost świeżej masy kalusa oraz liczbę zarodków somatycznych. Przyrost świeżej masy kalusa najlepiej stymulowała pożywka z dodatkiem $0,6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu indolilo-3-octowego (IAA) oraz zawierająca $3,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ KIN (kinetynę) i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA, przy obniżonej zawartości sacharozy i podwyższonej zawartości tiaminy. W zależności od zastosowanej pożywki uzyskano do 0,92 zarodków somatycznych w przeliczeniu na eksplantat. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że eksplantaty korzeniowe mogą być przydatnym materiałem do regeneracji kalusa oraz zarodków somatycznych u chryzantem.

Słowa kluczowe: chryzantema, embriogeneza somatyczna, kalus, organogeneza z korzeni

WSTĘP

Chryzantemy, jako rośliny ozdobne będące w czołówce światowych rankingów sprzedaży i popularności, są od lat obiektem prac hodowlanych z wykorzystaniem nowoczesnych biotechnologicznych metod takich jak indukowana mutageneza. Wykorzystanie

mutacji jako źródła zmienności w procesie hodowlanym u chryzantem często prowadzi u tego gatunku do powstawania chimer peryklinalnych, czyli roślin o przynajmniej jednej warstwie histogenowej o genotypie odmiennym niż u pozostałych warstw [Tilney-Basset 1986, van Harten 1998]. Rozmnażanie wegetatywne *in vitro* odmian chryzantem będących chimerami peryklinalnymi może prowadzić do niepożądanego zjawiska separacji ich komponentów, co przejawia się w uzyskaniu roślin o innym od zamierzonego wyglądzie. Celowe jest zatem opracowanie metody pozwalającej na sprawdzenie, czy dana odmiana jest chimerą.

W doświadczeniu Zalewskiej i innych [2007] wykorzystywano regenerację *in vitro* pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych u 11 odmian chryzantem należących do jednej grupy. U pięciu z nich stwierdzono zmienność fenotypów u regenerantów w stosunku do roślin kontrolnych rozmnażanych *in vitro* z eksplantatów jednowęzłowych na pożywce bez regulatorów wzrostu. Stwierdzono, że uzyskana zmienność jest wynikiem separacji komponentów chimer peryklinalnych. Jednakże regeneracja z eksplantatów liściowych nie daje pewnej odpowiedzi, czy dana odmiana jest chimerą, ponieważ liść zbudowany jest z tkanek wywodzących się z wszystkich trzech warstw histogenowych [van Harten 1998]. Korzenie przybyszowe u chryzantem wywodzą się z histogenowej warstwy L3, zatem wykorzystanie ich jako eksplantatów, z których zregenerują rośliny, pozwoliłoby na uzyskanie wiarygodnej odpowiedzi na pytanie czy dana odmiana jest chimerą.

Badania nad organogenezą przybyszową u chryzantem prowadzono z użyciem wielu różnych eksplantatów, jednak nie opracowano protokołu wydajnej regeneracji z eksplantatów korzeniowych [Taixeira da Silva 2004]. Yamaguchi i inni [2009] wykorzystali regenerację z korzeni do zbadania pod kątem chimeryzmu mutantów uzyskanych w wyniku napromieniania promieniowaniem jonizującym gamma oraz ciężkimi jonami helu i węgla. Badacze nie podają jednak wyników efektywności regeneracji z eksplantatów korzeniowych.

Celem badań było opracowanie metody regeneracji kalusa oraz zarodków somatycznych z wykorzystaniem eksplantatów korzeniowych pochodzących z kultur *in vitro* u trzech odmian chryzantemy wielkokwiatowej.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano trzy polskie odmiany chryzantemy wielkokwiatowej (*Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam. należące do grupy ‘Lady’ (‘Lady Apricot’, ‘Lady Orange’ i ‘Lady Salmon’). Odmiany te zostały uzyskane w wyniku hodowli mutacyjnej z zastosowaniem promieniowania X i gamma [Jerzy i in. 1991, Zalewska i in. 2010].

Uzyskanie eksplantatów korzeniowych

Mikrosadzonki badanych odmian namnożono metodą jednowęzłowych fragmentów pędów na zmodyfikowanej pożywce MS [Murashige i Skoog 1962], bez dodatku regulatorów wzrostu. Zastosowano standardową zawartość sacharozy (30 g·dm⁻³), glicyny

(2 mg·dm⁻³), D-mioinozytolu (100 mg·dm⁻³) oraz pozostałych witamin (tiaminy, pirydoksyny oraz kwasu nikotynowego, odpowiednio 0,1, 0,5, 0,5 mg·dm⁻³). Modyfikacja pożywki polegała na zwiększeniu o połowę zawartość żelaza i wapnia. Do jej zestalenia użyto agaru Plant Propagation (firmy Biocorp, Polska) w ilości 8,0 g·dm⁻³. Dla każdej odmiany pobrano po 18 jednowęzłowych fragmentów pędów i inokulowano je polarnie, po 6 w jednym naczyniu szklanym o pojemności 350 ml zawierającym 40 ml pożywki. Po trzech tygodniach wyrastające pędy boczne przeniesiono na zmodyfikowaną pożywkę MS (1962) z dodatkiem 2,0 mg·dm⁻³ kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w celu uzyskania korzeni przybyszowych. Ze zregenerowanych korzeni izolowano eksplantaty, odcinając wraz ze stożkami wzrostu fragmenty o średniej długości wynoszącej 7,5 mm.

Regeneracja kalusa i zarodków somatycznych z eksplantatów korzeniowych

Eksplantaty korzeniowe inokulowano w sposób horyzontalny na zmodyfikowaną pożywkę MS (1962) z dodatkiem regulatorów wzrostu. Przeprowadzono dwa doświadczenia. W pierwszym doświadczeniu zastosowano zmodyfikowaną pożywkę MS zawierającą 2,0 mg·dm⁻³ 6-benzyloaminopuryny (BAP) oraz kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) w stężeniu: 0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 lub 0,5 mg·dm⁻³. Regenerację prowadzono przez 10 tygodni, po tym czasie kalus zważono oraz policzono zregenerowane zarodki somatyczne. Weryfikacji zarodków dokonano pod mikroskopem stereoskopowym Nikon SMZ 1500 z kamerą cyfrową. Określono stadia rozwojowe zregenerowanych zarodków somatycznych oraz wykonano dokumentację fotograficzną.

Na podstawie uzyskanych wyników do drugiego doświadczenia wybrano pożywkę zawierającą 0,1 mg·dm⁻³ 2,4-D oraz 2,0 mg·dm⁻³ BAP, na którą inokulowano ponownie eksplantaty korzeniowe (jak w doświadczeniu 1). Po upływie 10 tygodni zregenerowany kalus zważono w sterylnych warunkach i następnie, w celu indukcji dalszej regeneracji, z każdej próby pobrano po 0,1 g kalusa i przeniesiono na okres kolejnych 12 tygodni na pożywkę (MS1, MS2, MS3) o składzie podanym w tabeli 1, które wybrano na podstawie badań wstępnych i literatury [Jerzy i Lubomski 1992, Zalewska i in. 2007]. Po tym czasie dokonano ponownego pomiaru świeżej masy tkanki kalusowej w celu obliczenia jej przyrostu oraz dokonano ponownej weryfikacji wytworzonych struktur pod mikroskopem stereoskopowym. Określono stadia rozwojowe zregenerowanych zarodków somatycznych oraz wykonano dokumentację fotograficzną.

Tabela 1. Skład pożywek użytych w doświadczeniu 2

Table 1. Media composition used in the experiment 2

Pożywka Medium	Regulatory wzrostu Growth regulators [mg·dm ⁻³]			Tiamina Thiamine [mg·dm ⁻³]	Sacharoza Sucrose [mg·dm ⁻³]
	BAP	KIN	IAA		
MS1	0,6	0,0	2,0	0,1	30
MS2	3,0	0,0	0,5	0,4	10
MS3	0,0	3,0	0,5	0,4	10

Wszystkie kultury *in vitro* prowadzono w pokoju wzrostowym, w kontrolowanych warunkach temperatury powietrza 24°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) oraz wilgotności względnej powietrza powyżej 60%. Zastosowano 24-godzinny fotoperiod (16 godzin światła, 8 godzin ciemności), używając lamp fluorescencyjnych Philips TLD 36W/54 emitujących światło dzienne. Średnie natężenie napromienienia kwantowego zmierzone fitofotometrem OPTEL FR-10 wynosiło 28,88 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Metody statystyczne

Założono doświadczenia dwuczynnikowe w układzie całkowicie losowym. W doświadczeniu 1 dla każdego obiektu doświadczalnego zastosowano 5 powtórzeń (5 naczyń szklanych o pojemności 350 ml i zawierających 40 ml pożywki i po 5 eksplantatów). W doświadczeniu 2 w każdej kombinacji znajdowało się po 10 eksplantatów (w 2 naczyniach szklanych o pojemności 350 ml i zawierających 40 ml pożywki po 5 eksplantatów) stanowiących jednocześnie 10 powtórzeń. Przeprowadzono obliczenia średniej liczby wytworzonych na eksplantatach zarodków somatycznych, a także obliczono średni przyrost świeżej masy kalusa i odchylenie standardowe. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Średnie obiektowe oceniano za pomocą testu t-Studenta przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I Dyskusja

W pierwszym doświadczeniu największą świeżą masę kalusa na eksplantatach korzeniowych uzyskano u odmiany 'Lady Apricot' na pożywkach zawierających 0,1, 0,2, 0,3 lub 0,4 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ auksyny 2,4-D i 2,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP, u 'Lady Salmon' na pożywkach uzupełnionych 2,4-D w stężeniu 0,2, 0,3 lub 0,4 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz 2,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP, natomiast u 'Lady Orange' na pożywkach z dodatkiem 0,1, 0,2 lub 0,3 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D oraz 2,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP (tab. 2). U wszystkich badanych odmian chryzantem mniejszą świeżą masę kalusa uzyskano na pożywce zawierającej 0,5 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D w stosunku do wcześniej wymienionych pożywek. Na pożywce bez dodatku auksyny 2,4-D lecz z zawartością wyłącznie BAP świeża masa kalusa była zdecydowanie najmniejsza i nie różniła się także pomiędzy badanymi odmianami. 'Lady Orange' charakteryzowała się najsłabszą regeneracją kalusa na eksplantatach korzeniowych na pożywkach z dodatkiem auksyny. Przeprowadzone doświadczenie potwierdziło zdolność i przydatność eksplantatów korzeniowych do indukcji kultur kalusowych. Dla porównania w badaniach Zalewskiej i innych [2008] świeża masa tkanki kalusowej wytworzonej na eksplantatach liściowych na pożywce z dodatkiem 0,6 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i 2,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA wynosiła u chryzantem 'Lady Amber', 'Lady Bronze' i 'Lady Salmon' odpowiednio 0,75, 0,56 i 0,94 g. Nie stwierdzono jednak, odwrotnie niż w doświadczeniu własnym, wpływu genotypu. U chryzantem na ogół lepszą regenerację kalusa uzyskuje się na pożywkach zawierających zarówno auksyny, jak i cytokininy [Kulpa i in. 2004], co również znajduje odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach własnych.

Tabela 2. Świeża masa kalusa z eksplantatem korzeniowym [g] na pożywkach z 2 mg·dm⁻³ BAP i różną zawartością 2,4-D (0,0–0,5 mg·dm⁻³) u badanych odmian po 10 tygodniach kulturyTable 2. The fresh weight of callus with root explant [g] on media with 2 mg·dm⁻³ BAP and different contents of 2,4-D (0.0–0.5 mg·dm⁻³) in tested cultivars after 10 weeks of culture

Odmiana Cultivar	Stężenie 2,4-D Concentration of 2,4-D [mg·dm ⁻³]					
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Lady Apricot	0,04 ±0,00 ^{cA}	0,63 ±0,24 ^{aA}	0,65 ±0,20 ^{aA}	0,38 ±0,16 ^{abB}	0,63 ±0,08 ^{aA}	0,28 ±0,08 ^{bB}
Lady Orange	0,08 ±0,05 ^{cA}	0,53 ±0,18 ^{aA}	0,40 ±0,18 ^{abB}	0,43 ±0,19 ^{aB}	0,26 ±0,06 ^{bB}	0,17 ±0,05 ^{cC}
Lady Salmon	0,05 ±0,01 ^{cA}	0,64 ±0,08 ^{bA}	0,87 ±0,03 ^{aA}	0,87 ±0,11 ^{aA}	0,76 ±0,13 ^{abA}	0,55 ±0,09 ^{bA}

A – średnie w kolumnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$; a – średnie w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$.

A – means in columns followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0,05$; a – means in lines followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0,05$

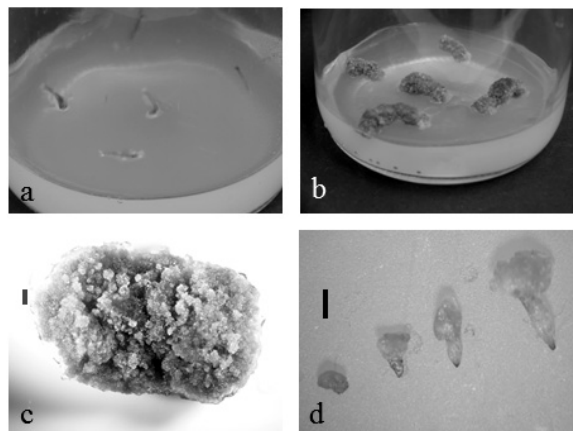
Na badanych pożywkach, z wyjątkiem tej niezawierającej auksyny 2,4-D, lecz tylko BAP stwierdzono regenerację zarodków somatycznych (tab. 3, rys. 1 c, d). Liczba zarodków somatycznych w przeliczeniu na jeden eksplantat wyłożony wyniosła maksymalnie u odmiany ‘Lady Orange’ 0,92, jednak nie różniła się istotnie od liczby zarodków zregenerowanych na pozostałych badanych pożywkach. Regenerację roślin z eksplantatów korzeniowych u chryzantemy ‘Taihei’ uzyskali również Yamaguchi i inni [2009], stosując w pierwszych 3 tygodniach kultury pożywkę uzupełnioną 0,2 mg·dm⁻³ 2,4-D oraz 2,0 mg·dm⁻³ BAP, a następnie wykonując pasażowanie na pożywkę z dodatkiem 0,1 mg·dm⁻³ 2,4-D oraz 2 mg·dm⁻³ BAP. U *Rosa hybrida* ‘Charming’ zadowalające wyniki regeneracji embriogennej tkanki kalusowej uzyskano, wykładając eksplantaty korzeniowe najpierw na pożywkę zawierającą 11 mg·dm⁻³ 2,4-D (na 6 tygodni), a następnie na pożywkę bez regulatorów wzrostu (na 6 tygodni). Pędy uzyskano po upływie kolejnych 4 tygodni po przełożeniu namnożonej tkanki na pożywkę z dodatkiem 0,5 mg·dm⁻³ BAP [Kim i in. 2009]. Proces somatycznej embriogenezy uzależniony jest od składu regulatorów wzrostu

Tabela 3. Liczba zarodków somatycznych w przeliczeniu na jeden eksplantat wyłożony na pożywkę z 2 mg·dm⁻³ BAP i różną zawartością 2,4-D (0,0–0,5 mg·dm⁻³) u badanych odmian po 10 tygodniach kulturyTable 3. Number of somatic embryos per one explant inoculated on media with 2 mg·dm⁻³ BAP and different contents of 2,4-D (0.0–0.5 mg·dm⁻³) in tested cultivars after 10 weeks of culture

Odmiana Cultivar	Stężenie 2,4-D Concentration of 2,4-D [mg·dm ⁻³]					
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Lady Apricot	0,00 ^{aA}	0,24 ^{aA}	0,24 ^{aA}	0,28 ^{aA}	0,08 ^{aA}	0,28 ^{aA}
Lady Orange	0,00 ^{aA}	0,92 ^{aA}	0,24 ^{aA}	0,16 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,00 ^{aA}
Lady Salmon	0,00 ^{aA}	0,08 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,0 ^{aA}	0,56 ^{aA}

A – średnie w kolumnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$; a – średnie w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$.

A – means in columns followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0,05$; a – means in lines followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0,05$.



Rys. 1. Regeneracja z eksplantatów korzeniowych u chryzantemy wielokwiatowej: a – eksplantaty korzeniowe na pożywce; b, c – regeneracja kalusa, d – zarodki somatyczne zregenerowane drogą pośredniej embriogenezy somatycznej (bar = 1 mm)

Fig. 1. Regeneration from root explants of chrysanthemum: a – root explants in the medium; b, c – regeneration of callus, d – somatic embryos regenerated via indirect somatic embryogenesis (bar = 1 mm)

w pożywce, zwłaszcza od dodatku auksyny 2,4-D. W niniejszym doświadczeniu nie uzyskano embrioidów na pożywce zawierającej jedynie cytokininę BAP, co potwierdza, że u chryzantem regeneracji zarodków somatycznych sprzyjają pożywki zawierające jednocześnie auksynę 2,4-D i cytokininę [Mandal i Datta 2005, Tymoszuik i in. 2014].

W drugim doświadczeniu największy przyrost świeżej masy kalusa u wszystkich badanych odmian stymulowała pożywka MS1 zawierająca $0,6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA przy standardowym stężeniu sacharozy ($30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) i tiaminy ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) oraz pożywka MS3 zawierająca dodatek $3,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ KIN i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA przy obniżonej zawartości sacharozy ($10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) oraz podwyższonej zawartości tiaminy ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Stwierdzono, że przyrost świeżej masy kalusa był najmniejszy na pożywce MS2 zawierającej $3 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA przy obniżonym stężeniu sacharozy ($10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) i podwyższonym stężeniu tiaminy ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Można to wytłumaczyć zbyt wysokim, w porównaniu do pozostałych pożywek, stężeniem cytokiny BAP. Wartości badanej cechy nie różniły się również między odmianami (tab. 4). Sposób prowadzenia kultury nie zagwarantował uzyskania wydajnej organogenezy przybyszowej. Na badanych pożywkach (MS1, MS2 i MS3) obserwowano regenerację pojedynczych zarodków somatycznych u dwóch badanych odmian (5 u ‘Lady Orange’, 3 u ‘Lady Salmon’), lecz nie stwierdzono regeneracji pędów przybyszowych. Pojawienie się embrioidów najprawdopodobniej związane jest z indukcją somatycznej embriogenezy w pierwszym etapie doświadczenia 2, kiedy to eksplantaty wyłożone zostały na pożywkę zawierającą $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D oraz $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP. Zadowalające rezultaty z wykorzystaniem pożywki MS2 do stymulacji kaulogenezy przybyszowej na eksplantatach liściowych u 16 odmian *Gerbera jamesonii* Bolus uzyskali Jerzy i Lubomski [1992]. Na pożywce tej zachodziła również regeneracja tkanki kalusowej i pędów przybyszowych na kwiatach jęczyczkowatych chryzantem ‘Capitola’ i ‘Breeze White’ [Jerzy i in. 2013]. Przydatność

pożywki MS1 zawierająca $0,6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IAA przy standardowym stężeniu sacharozy ($30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) i tiaminy ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) do regeneracji tkanki kalusowej i pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych czy międzywęzła u różnych odmian chryzantem, w tym ‘Lady Apricot’, ‘Lady Orange’ i ‘Lady Salmon’, została niejednokrotnie potwierdzona w innych doświadczeniach [Zalewska i in. 2007, Zalewska i in. 2008, Zalewska i in. 2011]. Niewątpliwie ważnym czynnikiem wpływającym, oprócz regulatorów wzrostu [Park i in. 2005] czy genotypu [Zalewska i in. 2008], na zdolność chryzantemy do podejmowania regeneracji jest rodzaj eksplantatu [Lu i in. 1990]. Opracowanie dla chryzantem wydajnego protokołu regeneracji z wykorzystaniem specyficznych eksplantatów, jakimi są korzenie, wymaga dalszych badań optymalizacji składu i stężeń regulatorów wzrostu, w szczególności auksyny 2,4 D zastosowanej na etapie indukcji kalusa embriogenego, co mogłoby w istotny sposób zwiększyć wydajność embriogenezy somatycznej. Zagadnienie to ma duże znaczenie z punktu widzenia hodowli mutacyjnej i analizy towarzyszącego jej zjawiska chimeryzmu czy opracowania techniki separacji komponentów składowych chimer.

Tabela 4. Przyrost świeżej masy kalusa [g] po 12 tygodniach kultury w zależności od odmiany i pożywki

Table 4. Increase of the fresh weight of callus [g] after 12 weeks of culture, depending on the cultivar and the medium

Odmiana Cultivar	Pożywka – Medium		
	MS1	MS2	MS3
Lady Apricot	$0,92 \pm 0,6^{aA}$	$0,57 \pm 0,6^{bA}$	$0,94 \pm 0,5^{aA}$
Lady Orange	$0,85 \pm 0,4^{aA}$	$0,50 \pm 0,2^{bA}$	$0,82 \pm 0,2^{aA}$
Lady Salmon	$1,03 \pm 0,4^{aA}$	$0,69 \pm 0,3^{bA}$	$0,75 \pm 0,2^{abA}$

A – średnie w kolumnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$; a – średnie w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$.

A – means in columns followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0,05$; a – means in lines followed by the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0,05$.

WNIOSKI

1. Dodatek do zmodyfikowanej pożywki MS (1962) auksyny 2,4-D w stężeniu od 0,1 do $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w obecności cytokininy BAP ($2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stymulował regenerację kalusa oraz zarodków somatycznych na eksplantatach korzeniowych u trzech badanych odmian chryzantemy wielokwiatowej – ‘Lady Apricot’, ‘Lady Orange’ i ‘Lady Salmon’.

2. Największy przyrost świeżej masy kalusa zregenerowanego na pożywce $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D oraz $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP uzyskano po przepasazowaniu go na zmodyfikowaną pożywkę MS zawierającą $0,6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IAA oraz pożywkę zawierającą $3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ KIN, $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IAA, 10 g sacharozy i $0,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ tiaminy.

3. Eksplantaty korzeniowe u chryzantem mogą być przydatnym materiałem roślinnym do regeneracji kalusa oraz zarodków somatycznych u badanych odmian.

Pamięci Prof. dr hab. Małgorzaty Zalewskiej

LITERATURA

- Jerzy M., Zalewska M., Piszczek P., 1991. Mutagenesis in *Dendranthema grandiflora* Tzvelev induced *in vitro* by X – and gamma rays. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 3, 24–29.
- Jerzy M., Lubomski M., 1992. *In vitro* adventitious bud techniques for mutation breeding of *Gerbera jamesonii*. *Acta Hort.* 314, 269–274.
- Jerzy M., Zalewska M., Tymoszuik A., 2013. Effect of kinetin on the elongation of adventitious shoots regenerated *in vitro* from ligulate florets in *Chrysanthemum* × *grandiflorum* /Ramat./ Kitam. Book of Abstracts. 8th IVCHB International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. June 2-7, University of Coimbra, Portugal, 89.
- Harten A.M. van, 1998. Mutation Breeding. Theory and Practical Applications. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Kim S.W., Oh M.J., Liu J.R., 2009. Plant regeneration from the root-derived embryonic tissues of *Rosa hybrida* L. cv. Charming via a combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Biotechnol. Rep.* 3, 334–345.
- Kulpa D., Rzepka-Plevneš D., Kurek J., 2004. Inicjacja kultur kalusowych chryzantemy (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Biotechnologia* 2 (65), 231–236.
- Lu Ch.-Y., Nugent G., Wardley T., 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). *Plant Cell Rep.* 8, 733–736.
- Mandal A.K.A., Datta S.K., 2005. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum. *Biol. Plantarum* 49 (1), 29–33.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Park S.H., Kim G.H., Jeong B.R., 2005. Adventitious Shoot Regeneration in Chrysanthemum as Affected by Plant Growth Regulators, Sucrose, and Dark Period. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 46 (5), 335–340.
- Taixeira da Silva J.A., 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 79, 1–18.
- Tilney-Bassett R.A.E., 1986. *Plant Chimeras*. Edward Arnold, London, 19–62.
- Tymoszuik A., Zalewska M., Lema-Rumińska J., 2014. Regeneration of somatic embryos from *in vitro* isolated ligulate florets of chrysanthemum. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 13 (4), 13–22.
- Yamaguchi H., Shimizu A., Hase Y., Degi K., Tanaka A., Morishita T. 2009. Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. *Euphytica* 165, 97–103.
- Zalewska M., Lema-Rumińska J., Miler N., 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Sci. Hortic.* 113, 70–73.
- Zalewska M., Miler N., Dąbrowska D., 2008. Wpływ barwy światła na organogenezę przybyszową u chryzantemy wielkokwiatowej [*Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam.] w kulturach *in vitro*. Część I. Regeneracja pędów przybyszowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln.* 525, 511–517.
- Zalewska M., Miler N., Tymoszuik A., Drzewiecka B., Winiecki J., 2010. Results of mutation breeding activity on *Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam. in Poland. *EJ-PAU* 13 (4), 27.

Zalewska M., Tymoszuik A., Miler N., 2011. New chrysanthemum cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explant types. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 10 (2), 109–123.

REGENERATION OF CALLUS FROM ROOT EXPLANTS OF *CHRYSANTHEMUM* × *GRANDIFLORUM* (RAMAT.) KITAM.

Summary. Chrysanthemums are often the object of breeding using mutation as a source of variability. This method often results in the formation of periclinal chimeras, which propagated *in vitro* may be subjected to the separation of components. Therefore it is important to describe effective procedures to determine whether the cultivar is a chimera. The aim of experiments was to describe the method for regeneration of callus and somatic embryos from the root explants of the three chrysanthemum cultivars. In order to investigate the impact of the medium for the callus and somatic embryos formation, in the first experiment root explants included apex were collected and cultured horizontally on the media containing $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 6-benzylaminopurine (BAP) and a $0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$ and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). After 10 weeks weight of callus and number of somatic embryos were determined. In the second experiment, callus were cultured on medium with 0.1 and $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP, next after 10 weeks callus was transferred on the three media, which differed content of BAP ($0.6, 3.0$ and $0.0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), kinetin (KIN) (0.0 or $3.0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) and 3-indoleacetic acid (IAA) (2.0 or $0.5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), as well as thiamin (0.1 or $0.4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) and sucrose (30 or $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$). After 12 weeks the increase of the fresh weight of callus and number of somatic embryos were determined. In the first experiment callus and somatic embryos regeneration was obtained only on media containing auxin and cytokinin. In the second experiment the callus formation was stimulated the best on the medium containing $0.6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA with a standard concentration of sucrose and thiamine, and on the medium enriched with $3.0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ KIN and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA at a reduced sucrose and increased thiamine content. Also a single somatic embryos were regenerated, however, any formation of adventitious shoots was observed. Experiments have demonstrated that induction of the regeneration of the callus and somatic embryos on the root explants of the examined chrysanthemum cultivars was conditioned by the presence the auxin 2,4-D and cytokinin BAP in the medium. Depending on the medium used was obtained to 0.92 somatic embryos per explant. Chrysanthemum root explants can be useful material for the callus and somatic embryos regeneration, however, the description of efficient procedures requires further research.

Key words: chrysanthemum, somatic embryogenesis, callus, rootorganogenesis