

## HODOWLA CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ NA DRODZE MUTAGENEZY INDUKOWANEJ PROMIENIOWANIEM X I GAMMA

Alicja Tymoszuik

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. i J. Śniadeckich w Bydgoszczy

**Streszczenie.** Chryzantema, obok róży i gerbery, jest jedną z najpopularniejszych roślin ozdobnych na świecie. Chłonny rynek zbytu podlegający prawom mody nieustannie wykazuje zapotrzebowanie na nowe odmiany. Hodowcy podejmują wiele starań, aby zaspokoić wyrafinowane i często zmieniające się gusta klientów. Odmiany popularne w jednym roku są szybko zastępowane. Stąd też największym zainteresowaniem hodowców cieszą się metody pozwalające łatwo i w krótkim czasie uzyskać zmienność pojedynczych cech, jak barwa czy typ kwiatostanu, decydujących w głównej mierze o atrakcyjności nowych odmian. W porównaniu do innych metod, wymagania te najlepiej spełnia indukowana mutagenesa. W pracy scharakteryzowano chryzantemę wielkokwiatową, opisano założenia i przebieg programów hodowlanych opartych na indukowaniu mutacji promieniowaniem X i gamma oraz przedstawiono najważniejsze osiągnięcia polskiej hodowli.

**Słowa kluczowe:** *Chrysanthemum* × *grandiflorum* /Ramat./ Kitam., hodowla mutacyjna, promieniowanie X i gamma, polskie odmiany

### WSTĘP

Nowoczesna hodowla ukierunkowana jest na wykorzystywanie zaawansowanych metod biotechnologicznych, w tym transformacji genetycznej, pozwalających na bezpośrednio uzyskiwanie założonych celów, wykraczanie poza pulę cech warunkowanych genotypem czy omijanie barier krzyżowalności. Metody te, ze względu na dużą kosztochłonność, potrzebę posiadania specjalistycznie wyposażonego laboratorium i zatrudnienia wysoce wykwalifikowanego personelu, nie znajdują rutynowego zastosowania

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Alicja Tymoszuik, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. i J. Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz, e-mail: alicja.tymoszuik@utp.edu.pl

w hodowli roślin ozdobnych [Schum 2003]. Decyduje o tym ich mniejsze znaczenie ekonomiczne w porównaniu do na przykład roślin spożywczych i stosunkowo krótki okres popytu na rynku wynikający z dynamicznych zmian potrzeb i gustów klientów co do fenotypów. Nieustannie od wielu lat podstawowe znaczenie w hodowli chryzantem mają trzy metody: krzyżowanie generatywne, selekcja oraz indukowanie mutacji [Jerzy 2000]. Krzyżowanie i selekcję utrudnia samonieźgodność, wysoki poziom ploidalności i heterozygotyczności [Schum 2003]. Ponadto nie wszystkie odmiany wykazują zdolność do wytwarzania żywotnego pyłku czy zawiązywania nasion [Miler 2013]. Krzyżowanie wymaga dużo pracy i czasu, specjalnych zabiegów, na przykład przycinania kwiatów języczkowatych w celu odsłonięcia słupków i ułatwienia zapylania. Długo trwa również uprawa, ocena i selekcja siewek. Niekiedy trzeba także przeprowadzać dalsze krzyżowania. Okres potrzebny do otrzymania nowej odmiany może wynieść nawet kilka – kilkanaście lat. Stąd też w hodowli chryzantem powszechnie wykorzystuje się indukowaną mutagenezę, która jest metodą pozwalającą uzyskać nowe odmiany nawet już w ciągu 2–3 lat. Ponadto, w porównaniu do krzyżowania, możliwa jest zmiana pojedynczych cech. U chryzantem pod wpływem promieniowania X lub gamma pojawiają się najczęściej mutacje barwy kwiatostanów [Jerzy 2000], co jest kluczowe z punktu widzenia hodowli. Indukowanie mutacji jest odpowiednią metodą hodowli dla roślin o wysokim poziomie heterozygotyczności i rozmnażanych wegetatywnie [Schum 2003], a do takich zalicza się chryzantemy. Celem pracy jest przedstawienie problematyki związanej z hodowlą chryzantemy wielkokwiatowej na drodze mutagenyzy indukowanej promieniowaniem X i gamma, a także przybliżenie osiągnięć polskiej hodowli.

## CHRYZANTEMA WIELKOKWIATOWA

Gatunek chryzantema wielkokwiatowa (*Chrysanthemum ×grandiflorum* /Ramat./ Kitam, syn. *Chrysanthemum ×hortorum* L.H. Bailey, *Chrysanthemum indicum* L., *Chrysanthemum morifolium* Ramat., *Dendranthema grandiflora* Tzvelev) należy do rodziny astrowatych (Asteraceae) i pochodzi z Dalekiego Wschodu. Jej uprawa i hodowla została zapoczątkowana w Chinach i trwa co najmniej od 500 roku p.n.e. Do Europy została sprowadzona z Japonii w XVII wieku przez Holendrów. W Polsce uprawą zajęto się dopiero w XIX wieku, a hodowlę rozpoczęto w latach 70. ubiegłego stulecia. Chryzantemy są bylinami lub podkrzewami o pojedynczych kwiatach zebranych w otoczone wielolistną okrywą koszyczki kwiatowe (kwiatostany) wyrastające na łodydze pojedynczo lub w baldachogronach. Żeńskie kwiaty języczkowate tworzą zwykle ozdobną część kwiatostanu i są bardziej okazałe od rurkowatych. Wypełniają cały koszyczek lub występują na jego obrzeżu. Obupłciowe kwiaty rurkowate znajdują się najczęściej w centralnej części kwiatostanu, chociaż mogą być umiejscowione wśród kwiatów języczkowatych na całej jego powierzchni [Jerzy 2000]. Większość uprawianych odmian chryzantem ma 54 chromosomy ( $2n = 6x = 54$ ) zebrane w dwóch zespołach – diploidalnym (18 chromosomów) i tetraploidalnym (36 chromosomów), przy czym po krzyżowaniu dziedziczenie cech przebiega w sposób typowy dla form tetraploidalnych. Maksymalna liczba chromosomów u poliploidów może wynosić 144. Istnieją również formy aneuploidalne o nieparzystej liczbie chromosomów, np. 71 [Dowrick 1953]. Tak wysoce skomplikowany i różnorod-

ny skład genetyczny jest źródłem niewyczerpanej jak dotąd zmienności objawiającej się w postaci szerokiej gamy barw, typów i wielkości kwiatostanów, siły wzrostu, ulistnienia, wczesności i obfitości kwitnienia u odmian [Jerzy 2000]. W Polsce chryzantemy najczęściej uprawia się pod osłonami – jako doniczkowe i na kwiat cięty oraz w gruncie. Są to rośliny dnia krótkiego, ale dzięki prowadzeniu uprawy sterowanej cieszą nas swym pięknem cały rok. Mogą także zdobić ogrody i domy. Wykorzystywane są do tworzenia form drzewkowych, kaskadowych, żywopłotów oraz jako rośliny okrywowe. Chryzantemy rosnące w pojemnikach nie tylko zdobią wnętrza, ale pochłaniają z powietrza szkodliwe substancje, takie jak formaldehyd, benzen, amoniak. O ich popularności decyduje prosty sposób rozmnażania (przez sadzonki pędowe pobierane z mateczników w szklarni lub pochodzące z kultury *in vitro*), a także nadzwyczaj długie i obfite kwitnienie [Jerzy i Lubomski 1991, Jerzy 2000, Zalewska 2005].

## INDUKOWANA MUTAGENEZA

Hodowla mutacyjna polega na indukowaniu w materiale genetycznym mutacji, czyli trwałych zmian podlegających dziedziczeniu. Jej początek sięga lat 20. ubiegłego stulecia, kiedy to H.J. Muller (laureat Nagrody Nobla w 1946 roku) udowodnił, że zastosowanie promieniowania X zwiększa częstość mutacji u muszki owocowej [Muller 1927]. Hodowla ta rozwinęła się na dużą skalę po II wojnie światowej, głównie w Szwecji, Związku Radzieckim, Japonii, Indiach i USA [Jassem 1999]. Organizacją prowadzącą bazę danych na temat mutagenów, rodzaju uzyskanych zmian i zarejestrowanych odmian jest FAO/IAEA (FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations, Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa; IAEA – International Atomic Energy Agency, Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej). Według zgromadzonych informacji, na świecie, drogą indukowanej mutageny, wyhodowano 3218 odmian różnych gatunków roślin rozmnażanych wegetatywnie lub generatywnie, z czego 709 odmian to rośliny ozdobne, w tym 279 chryzantem [www.mvgs.iaea.org]. Indukowana mutagenyza ma również duże znaczenie w hodowli storczyków, róż, pelargonii, pacioreczników, goździków [Jain 2006]. Chryzantemy charakteryzują się dużą łatwością tworzenia spontanicznych i indukowanych mutacji [Malaure i in. 1991a, Mynett i Orlikowska 1997]. Przyczyną mutacji spontanicznych w środowisku naturalnym jest promieniowanie ultrafioletowe słońca oraz promieniowanie kosmiczne. W rezultacie powstają tzw. sporty (mutanty), czyli nowe odmiany różniące się od rośliny wyjściowej pewną cechą, np. barwą kwiatostanu, kształtem liści [Wolff 1996], typem kwiatostanu [Malaure i in. 1991b] czy siłą wzrostu [Stewart i Dermen 1970]. Wyodrębnienie spontanicznych mutantów jest szybką i tanią metodą hodowlaną [Jerzy 2000]. Jednak częstość mutacji spontanicznych jest bardzo niska, rzędu  $10^{-6}$ – $10^{-9}$  na pokolenie [Jassem 1999]. Dlatego, w celu zwiększenia zmienności, materiał roślinny poddaje się działaniu mutagenów fizycznych lub chemicznych. Większość mutacji przebiega w kierunku od allelu dominującego do recesywnego [Jassem 1999], co prowadzi do ich ujawnienia się już w pierwszym pokoleniu mutacyjnym [Schum 2003] i umożliwia uzyskanie dużej liczby odmian w stosunkowo krótkim czasie [Muszyński 1976]. Indukowanie mutacji pozwala na zmianę pojedynczych cech, co jest nieosiągal-

ne w przypadku krzyżowania. W ten sposób otrzymuje się odmiany różniące się tylko np. barwą kwiatostanu, ale należące do jednej grupy odmianowej o takich samych wymaganiach uprawowych i reakcji fotoperiodycznej, co jest znacznym ułatwieniem dla producentów. Należy jednak pamiętać, że w przypadku hodowli mutacyjnej zmiany nie wykraczają nigdy poza pulę cech danego gatunku [Miler 2005]. U chryzantem poddanych działaniu mutagenu zmianie ulegają najczęściej barwa i typ kwiatostanu [Jerzy i Lubomski 1991, Zalewska 1995, Zalewska 2010, Zalewska i in. 2010, Zalewska i in. 2011]. Najsilniejszą reakcję radiomutacyjną wykazują chryzantemy o fioletowych i różowych kwiatostanach, a najsłabszą żółto kwitnące. Rzadziej obserwuje się zmianę pokroju rośliny, zmiany kształtu i wielkości liści oraz kwiatostanów czy liczby i kształtu kwiatów języczkowatych. Na drodze hodowli mutacyjnej otrzymano również odmiany o zielono-białych liściach oraz o zmienionej reakcji fotoperiodycznej, tolerujące niskie temperatury, wysokie zasolenie czy niskie natężenie światła [Schum 2003, Jain 2006].

Najczęściej stosowanym mutagenem fizycznym są promieniowanie jonizujące X i gamma [Broertjes i van Harten 1988]. Promieniowanie X pochodzi z aparatu rentgenowskiego. Źródłem promieni gamma jest radioaktywny izotop kobaltu  $^{60}\text{Co}$ , tzw. bomba kobaltowa lub izotop cezu  $^{137}\text{Cs}$ . Napromienianiu nie poddaje się całych roślin. Przy wegetatywnym rozmnażaniu *in vivo* stosuje się sadzonki pędowe i liściowe, a w przypadku rozmnażania *in vitro* niewielkie fragmenty wegetatywne, jak: pąki, liście, ogonki liściowe, odcinki łodyg, osi kwiatostanowej i kwiatu, tkankę kalusową, zawiesziny komórek, zarodki somatyczne, protoplasty [Jerzy 2000]. W kulturze *in vitro* na małej powierzchni, w otoczeniu wolnym od chorób i szkodników, można umieścić wiele napromienionych eksplantatów. Zapewnia to efektywniejszą regenerację niż w warunkach *in vivo*, zwiększa możliwość uzyskania zmutowanych roślin oraz pozwala znacznie przyspieszyć wszystkie etapy programu hodowlanego [Zalewska 1995, Zalewska i Jerzy 1997a]. Napromienianie może mieć charakter ciągły (w czasie całego okresu wegetacyjnego lub w wybranych fazach wzrostu i rozwoju roślin) lub uderzeniowy. Za najbardziej skuteczną uważa się jednorazową dawkę uderzeniową [Jerzy 2000], która jest jednocześnie subletalna i wywołuje efekt letalny u około 50% roślin [Jassem 1999]. Jednostką dawki pochłoniętej jest grej (Gy). 1 Gy odpowiada 1 dżulowi (J) energii promieniowania pochłoniętej przez ciało o masie 1 kilograma [Ahloowalia i Maluszynski 2001]. Wysokość optymalnej dawki zależy od gatunku, dla chryzantem jest to 10–20 Gy dla promieniowania X i gamma. Bardziej efektywne jest użycie promieniowania gamma, które daje większy zakres zmienności [Zalewska 1995, Zalewska i Jerzy 1997b]. Występuje zależność między wielkością dawki a rodzajem materiału roślinnego poddawanego napromienianiu. Sadzonki pędowe traktuje się większymi dawkami niż eksplantaty *in vitro* [Jerzy 2000]. Podczas uprawy i kwitnienia pierwszego wegetatywnego pokolenia mutacyjnego ( $vM_1$ ) prowadzi się obserwacje mające na celu wyodrębnienie tzw. wariantów (roślin o zmienionych cechach morfologicznych i fenologicznych) oraz wariacji odpowiadających zmienionym cechom. Pojęcia mutant i mutacja można wprowadzić dopiero w drugim pokoleniu wegetatywnym ( $vM_2$ ), gdyż trudno orzekać o ich występowaniu bez sprawdzenia powtarzalności cech [Zalewska 1995].

Mutageneza nie powoduje swoistych ani ukierunkowanych zmian w genotypie. Zmiany na poziomie DNA mogą przejawiać się w zmianie fenotypowego efektu działania genu lub doprowadzić do jego unieczynnienia. Molekularny mechanizm indukowanych

mutacji jest taki sam jak mutacji spontanicznych [Jassem 1999]. Powstają zmiany zarówno w sekwencji nukleotydów (mutacje punktowe – genowe), jak i zmiany w strukturze chromosomów (aberracje chromosomowe lub chromatydowe). Energia promieniowania jonizującego może zostać bezpośrednio zaabsorbowana przez szkielet cukrowo-fosforanowy i doprowadzić tym samym do pęknięcia nici DNA. Promienie jonizujące wykazują również zdolność do penetrowania w głąb tkanek i wzbudzania atomów napotykanymi cząsteczek. Dochodzi w ten sposób do uwolnienia elektronów i powstania pozytywnie naładowanych wolnych rodników reagujących dalej z innymi cząsteczkami, co skutkuje rozchwianiem równowagi energetycznej komórek i prowadzi do uszkodzenia DNA i chromosomów. W wyniku reakcji z rodnikami OH<sup>•</sup> powstaje glikol tyminy, który jest jednym z najczęstszych uszkodzeń radiacyjnych zasad. Jonizacja atomów wewnątrz komórek może prowadzić do pęknięcia cząsteczki DNA w jednej lub obu niciach nukleotydowych, tzw. teoria tarczy. Promienie X mogą spowodować usunięcie pirymidyn, co skutkuje rozerwaniem cząsteczki DNA w miejscu ich występowania. Jeżeli promienie jonizujące działają na komórki będące w fazie G1, to powstaną aberracje chromosomowe, w fazie G2 aberracje chromatydowe, a w stadium S aberracje mieszane chromosomowo-chromatydowe [Rogalska i in. 2005].

## NAPROMIENIANIE TKANEK ROŚLINNYCH

Ważnym aspektem hodowli mutacyjnej, mającym wpływ na pojawianie się i zakres mutacji, jest wybór tkanek roślinnych poddawanych działaniu mutagenu. Napromienianie tkanek niemerystematycznych zwiększa szansę na uzyskanie stabilnych, jednorodnie zmienionych mutantów. Natomiast w przypadku działania mutagenu na tkanki merystematyczne dochodzi najczęściej do powstawania niejednorodnych genetycznie chimer. Pęd zakończony jest merystemem wierzchołkowym (apikalnym), z którego bierze początek. Podział powierzchnią peryklinalną wydziela w merystemie część zewnętrzną i wewnętrzną (trzon). Tunika to zespół warstw (jednej lub więcej) w części zewnętrznej merystemu, a korpus stanowi jego trzon. W tunice zachodzą podziały antyklinalne pozwalające na wzrost powierzchniowy, a w korpusie zarówno antyklinalne, jak i peryklinalne, wskutek czego rozrasta się on objętościowo. Liczba pięter inicjalnych (warstw histogenowych), oznaczanych skrótem L (ang. *layer*) z dodatkiem numeru licząc od powierzchni, równa jest liczbie warstw tuniki plus jeden. U roślin okrytonasiennych występują zazwyczaj dwie warstwy tuniki (trzy piętra inicjalne – L1, L2 i L3). Wyjątek stanowią trawy o zwykle jednowarstwowej tunice. Każda warstwa histogenowa powstaje z małej grupy odrębnych komórek inicjalnych [Esau 1973, Tilney-Bassett 1986, Hejnowicz 2002]. U chryzantemy występują trzy warstwy histogenowe [Wolff 1996]. W powstawaniu liści biorą udział wszystkie trzy. Kwiaty języczkowate zbudowane są z warstw L1 oraz L2, a korzenie powstają z warstwy L3 [Stewart i Dermen 1970]. Komórki warstwy L1 tworzą epidermę. Z warstwy L2 powstaje tkanka subepidermalna, zewnętrzna część kory, gameity, a warstwa L3 tworzy rdzeń [Burge i in. 2002]. Warstwa L2 warunkuje typ kwiatostanu [Stewart i Dermen 1970, Bush i in. 1976, Malaure i in. 1991a]. Barwa kwiatostanów zależy od obecności i ilości antocyjanów występujących w warstwie L1 oraz karotenoidów, flawonów i flawonoli znajdujących się w warstwach L1 i L2 [Bush i in. 1976].

Antocyjany odpowiadają za powstawanie barwy czerwonej, niebieskiej i fioletowej, flawony i flawonole za barwę białą, kremową i żółtą, a karotenoidy za żółtą, pomarańczową i czerwoną [Lema-Rumińska i Zalewska 2005].

W przypadku zastosowania czynników mutagennych na sadzonki pędowe lub eksplantaty merystematyczne obejmujące wierzchołki wzrostu i pąki boczne z kątów liści oraz wyizolowane merystemy wierzchołkowe i kątowe, zachodzi zjawisko selekcji wewnątrzomiatycznej (diplontowej lub diplontycznej). Polega ona na eliminacji w czasie rozwoju napromienionej rośliny zmutowanych komórek rozmieszczonych w głębszych warstwach tkanek. Komórki, w których zaszła mutacja, są osłabione lub uszkodzone i nie są w stanie współzawodniczyć z szybko dzielącymi się niezmutowanymi komórkami [Jerzy 1997]. Zjawisko to ogranicza efekt hodowlany [Jerzy 2000], gdyż zmniejsza się zakres mutacji i powstaje mniej zmutowanych roślin [Zalewska 1995]. Komórki merystemów biorą udział w tworzeniu tkanek, a ich skład genetyczny decyduje o fenotypie nowej rośliny. Stosując mutagen, działamy na zróżnicowany już strukturalnie merystem. Mutacje zachodzą w jego pojedynczych komórkach i są w stanie objąć tylko część nowej rośliny [Muszyński 1976]. W ten sposób powstają chimery – rośliny zbudowane z tkanek o różnym składzie genetycznym [Broertjes i van Harten 1988]. Chimery nazywane są również mieszańcami wegetatywnymi [Jerzy 2000]. Aby otrzymać jednorodny genetycznie organizm, można kilkakrotnie przyciąć wierzchołki napromienionych sadzonek i pobudzić rozwój pąków bocznych ze zmutowanych obszarów. Uzyskane pędy boczne ukorzenia się i uprawia aż do kwitnienia. W ten sposób zwiększa się częstość mutacji i prawdopodobieństwo, że rośliny nie będą chimerami. Sadzonki pędowe można też podzielić na jednowęzłowe fragmenty z jednym liściem, które również ukorzenia się i doprowadza do kwitnienia. Metoda ta daje lepsze rezultaty, ponieważ szybciej następuje uaktywnienie się merystemów i wzrost pędów bocznych [Zalewska 1995, Jerzy 1997]. *In vitro* rezultat taki można osiągnąć przez podział mikrosadzonek na jednowęzłowe fragmenty pędu [Yamaguchi i in. 2009]. Jak podają Broertjes i Keen [1980], sposobem pozwalającym na ograniczenie lub uniknięcie powstawania chimer jest napromienianie wierzchołków pędów we wczesnym stadium rozwojowym.

Chimery sektorialne mają odmienny genetycznie sektor tkanek obejmujący wszystkie warstwy histogenowe. U chimer peryklinalnych odmienny genotyp prezentuje jedna lub dwie całe warstwy. Chimery meryklinalne mają odmienną genetycznie część jednej lub dwóch warstw. Chimery peryklinalne są najbardziej stabilnymi formami i wiele z nich jest cenionych przez hodowców ze względu na wyróżniające się fenotypy. Najczęściej są to rośliny o zmienionej barwie kwiatostanu [Broertjes i in. 1980, Zalewska i Jerzy 1997a]. Stepczyńska i Jerzy [1981] uzyskali chimery peryklinalne, u których tylko brzeżne kwiaty języczkowate zrosły się w rurki. W porównaniu ze stabilnym mutantem, u chimer peryklinalnych inne niekorzystne mutacje towarzyszące zmianie barwy lub typu kwiatostanu mogą się nie ujawnić [Broertjes i in. 1980]. Wizualnie nie można rozróżnić chimery peryklinalnej od stabilnego mutantu, a chimery meryklinalnej od sektorialnej [Tilney-Bassett 1986]. Z chimery meryklinalnej można wyprowadzić chimery peryklinalną poprzez sukcesywne pobudzanie do wzrostu pędów bocznych znajdujących się częściowo lub całkowicie w obszarze pędu objętego mutacją [Broertjes i van Harten 1988]. Chimeryzm wpływa na sposób rozmnażania chryzantem. Przy wegetatywnym rozmnażaniu odmian będących chimerami powtarzalność cech zapewnia użycie w warunkach

*in vivo* sadzonek pędowych, a w warunkach *in vitro* wierzchołków pędu lub wyizolowanych merystemów. Pąki kątowe powielają układ warstw histogenowych merystemu apikalnego. Dlatego też chimery zachowują swój fenotyp przy rozmnażaniu wegetatywnym przez pędy boczne [Burge i in. 2002, Lema-Rumińska 2005].

Rozmnażanie chryzantem przez sadzonki liściowe *in vivo* i eksplantaty liściowe *in vitro* nie jest powszechnie stosowane w praktyce produkcyjnej. Znalazło jednak ważne zastosowanie w hodowli radiacyjnej [Jerzy i Lubomski 1991] odkąd to Broertjes i inni [1976] wykazali, że pęd przybyszowy może powstawać ze zmutowanej komórki ogonka liściowego. Tym samym rozwijająca się z pojedynczej komórki roślina zbudowana jest z tkanek jednorodnych genetycznie i nie jest chimerą. W ten sposób unika się również negatywnych skutków selekcji wewnątrzsomaticznej. Szansa, że komórka inicjalna będzie równocześnie komórką zmutowaną, nie jest duża, ale przy niewielkich rozmiarach sadzonek liściowych można łatwo zwiększyć liczebność próby poddawanej działaniu mutagenu [Muszyński 1976]. Broertjes i inni [1976] zaobserwowali, że w powstawaniu merystemu przybyszowego bierze udział najczęściej pojedyncza komórka kalusa (wytworzonego u podstawy ogonka sadzonki liściowej) lub epidermy (na eksplantacie liściowym *in vitro*). Jak podaje Zalewska [2001], centra merystematyczne, z których powstają pędy przybyszowe, mogą również pochodzić z subepidermy lub parenchymy. Broertjes i Keen [1980] opracowali matematyczny model stochastyczny opisujący tworzenie merystemu przybyszowego. Wykazali, że powstaje on z jednej lub kilku wegetatywnych komórek siostrzanych biorących się z podziałów komórki inicjalnej. Zatem pęd przybyszowy pochodzi finalnie zawsze tylko z jednej komórki. Komórka inicjująca tworzenie pędu przybyszowego pochodzi zwykle z zewnętrznej warstwy L1 odpowiedzialnej za barwę kwiatostanu. Dlatego u chryzantem mutacje dotyczą najczęściej barwy kwiatostanu. Mutacje, które zaszły w warstwach L2 i L3, mają mniejsze szanse na ujawnienie się ze względu na silnej zaznaczający się w głębiej położonych tkankach mechanizm selekcji wewnątrzsomaticznej [van Harten 1998].

W hodowli mutacyjnej technika regeneracji przez pędy przybyszowe znajduje jedynie zastosowanie dla odmian będących formami jednorodnymi genetycznie. Sadzonki liściowe *in vivo* i eksplantaty liściowe *in vitro* nie są odpowiednie zwłaszcza dla rozmnażania roślin, które są chimerami peryklinalnymi. Nowy pęd przybyszowy może powstać z pojedynczej komórki zmutowanej warstwy L1 lub niezmutowanych warstw L2 lub L3 i w związku z tym niemożliwe jest odtworzenie charakteru chimery peryklinalnej, która zawiera przynajmniej dwie niejednorodne genetycznie warstwy tkanek [Zalewska 1995]. Regeneracja pędów przybyszowych w tym przypadku prowadzi do uzyskania mutantów jednorodnych (z warstwy L1) lub form niezmienionych w ogóle (z warstwy L2 lub L3), prezentujących fenotyp odmiany wyjściowej [Stepczyńska i Jerzy 1981, Jerzy i Zalewska 1997, Zalewska i in. 2007].

U chryzantem regeneracja pędów przybyszowych na sadzonkach liściowych *in vivo* jest cechą właściwą tylko niektórym odmianom [Zalewska 1985] w przeciwieństwie do warunków *in vitro* [Jerzy i Lubomski 1991]. Liście *in vitro* są bardzo dogodnym obiektem w hodowli radiacyjnej, a ich napromienianie powinno być przeprowadzone jeszcze przed wytworzeniem merystemu przybyszowego, czyli przed wyłożeniem na pożywkę, jednak nie później niż w trzecim dniu po inokulacji. Ponadto eksplantatami, na których również zachodzi regeneracja pędów przybyszowych u chryzantem, są na przykład: frag-

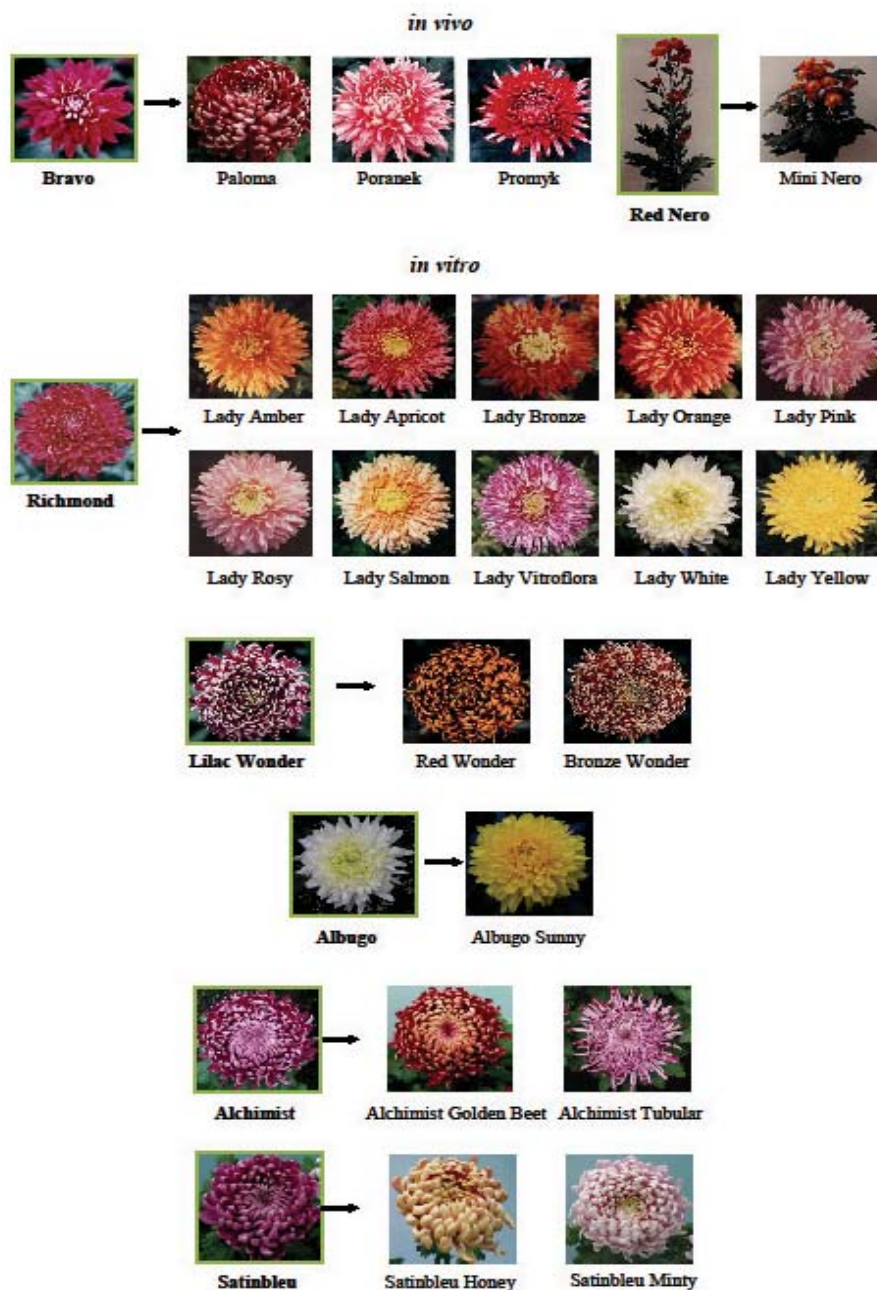
menty szypuł kwiatostanowych i międzywęźli, kwiaty języczkowe i rurkowe, epiderma kwiatów, fragmenty korzeni przybyszowych, kalus, zawiesina komórek, protoplasty [Jerzy 1997]. Jak podają Broertjes i van Harten [1988], część roślin uzyskanych z pędów przybyszowych może być także chimerami. Badacze tłumaczą to możliwością wystąpienia mutacji spontanicznych lub genetyczną niestabilnością podczas tworzenia merystemu przybyszowego. Również przy regeneracji pędu przybyszowego za pośrednictwem tkanki kalusowej w formowaniu merystemu może brać udział więcej niż jedna komórka [Broertjes i in. 1976]. Wykorzystuje się także metody separacji komponentów chimer poprzez organogenezę przybyszową. *In vivo* u chimer peryklinalnych można stymulować tworzenie pędów przybyszowych, przycinając wierzchołki pędów sadzonek i sukcesywnie usuwając pojawiające się pędy boczne [Stewart i Dermen 1970]. *In vitro* genotypy składowe chimery peryklinalnej można rozdzielić, prowadząc organogenezę przybyszową na eksplantatach liściowych, międzywęźlach [Miler i Zalewska 2014], kwiatach języczkowych [Chakrabarty i in. 1999].

Identyfikację i odrębność nowych odmian w porównaniu do roślin matecznych potwierdza się przez analizę składu jakościowego i ilościowego barwników w kwiatach języczkowych [Lema-Rumińska i Zalewska 2005], a także wykorzystując markery molekularne generowane w technice RAPD-PCR [Lema-Rumińska i in. 2004, Miler i Zalewska 2014].

## HODOWLA MUTACYJNA CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ W POLSCE

Pierwsze polskie odmiany 'Helena' i 'Władysław' zarejestrowano w 1976 roku. Były one mutantami spontanicznymi wyodrębnionymi w Katedrze Roślin Ozdobnych Akademii Rolniczej w Poznaniu [Jerzy 2000]. Od wielu lat wiodącą, polską jednostką naukową zajmującą się hodowlą mutacyjną chryzantemy, najpierw pod kierownictwem prof. Marka Jerzego, a następnie śp. prof. Małgorzaty Zalewskiej, jest Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych Wydziału Rolnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy (wcześniej Katedra Ogrodnictwa Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy) [Zalewska 2010, Zalewska i in. 2010]. W latach 1977–1978 w jednostce tej przeprowadzono doświadczenie z odmianą 'Bravo' o fioletowych kwiatostanach, działając na sadzonki liściowe promieniowaniem X w dawce 15 Gy. Otrzymano zmiany barwy kwiatostanu na fiołkową, różową, brązową i czerwoną oraz zmiany typu kwiatostanu z półkulistego na rurkowy, piwoniovaty, pomponowy i pojedynczy [Stepczyńska i in. 1980, Stepczyńska i Jerzy 1981]. Trzy uzyskane mutanty zarejestrowano w 1983 roku jako nowe odmiany 'Promyk', 'Paloma' i 'Poranek'. W kolejnych latach, przy współpracy z przedsiębiorstwem Vitroflora, działaniu promieni X i gamma w dawce 15 Gy poddano eksplantaty liściowe *in vitro* fioletoworóżowej odmiany 'Richmond'. Mutacjom barwy w dwóch przypadkach towarzyszyła także zmiana typu kwiatostanu polegająca na zrośnięciu kwiatów języczkowych. Sześć spośród dwunastu mutantów zostało wpisanych do rejestru odmian, tworząc grupę odmianową Lady, w skład której wchodzi: 'Lady Amber', 'Lady Bronze', 'Lady Pink', 'Lady Rosy', 'Lady Salamon', 'Lady Yellow', odpowiednio o złocistobrązowej, czerwonoróżowej, różowej, kremoworóżowej, łososiowej i żółtej barwie kwiatostanu [Jerzy i in. 1991, Jerzy i in. 1993].





Rys. 1. Odmiany chryzantemy wyhodowane w Katedrze Roślin Ozdobnych i Warzywnych Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy

Fig. 1. Chrysanthemum cultivars bred in the Department of Ornamental Plants and Vegetable Crops in UTP University of Science and Technology in Bydgoszcz

U fioletowej odmiany 'Lilac Wonder', po zadziałaniu promieniowaniem gamma w dawce 15 Gy na eksplantaty liściowe *in vitro*, otrzymano i zarejestrowano dwie kolejne odmiany: 'Red Wonder' o kwiatostanie czerwonym oraz 'Bronze Wonder' o barwie brązowej [Jerzy i Zalewska 1996]. W doświadczeniu z odmianą 'Red Nero' o ciemnoczerwonym kwiatostanie zastosowano eksplantaty liściowe *in vitro* oraz sadzonki liściowe *in vivo* i poddano je działaniu promieniowania jonizującego X i gamma w dawkach 5–25 Gy. Owocem tej pracy było zarejestrowanie niskiej, przydatnej do uprawy doniczkowej odmiany 'Mini Nero'. Genotyp ten uzyskano w wyniku działania promieniowania X w dawce 25 Gy na sadzonki liściowe *in vivo* [Zalewska 1995]. W ostatnich latach działaniu promieniowania gamma w dawce 15 Gy poddano mikrosadzonki białej odmiany 'Albugo' i ciemnoróżowej 'Satinbleu'. U ciemnofioletowej odmiany 'Alchemist' napromieniano eksplantaty liściowe *in vitro* z kalusem zregenerowanym wcześniej na ogonkach. W rezultacie wytypowano pięć interesujących genotypów: 'Albugo Sunny', 'Alchemist Tubular', 'Alchemist Golden Beet', 'Satinbleu Minty', 'Satinbleu Honey' odpowiednio o żółtym, srebrzystofioletowym, buraczkowżółtym, jasnoróżowym i łosiosowym kwiatostanie [Zalewska i in. 2011] – rysunek 1. Szacuje się, że mutanty stanowią obecnie około połowy wszystkich zagranicznych odmian uprawianych w Polsce [Miler 2005]. Indukowana mutageneza niewątpliwie jest bardzo efektywną metodą hodowli chryzantemy. Rezultaty prowadzonych programów hodowlanych zachęcają do stosowania tej metody również w przyszłości, zarówno w Polsce, jak i na świecie.

## LITERATURA

- Ahloowalia B.S., Maluszynski M., 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118, 167–173.
- Broertjes C., Keen A., 1980. Adventitious shoots: do they develop from one cell? *Euphytica* 29, 73–87.
- Broertjes C., Koene P., van Harten J.W.H., 1980. A mutant of a mutant of a mutant of a...: Irradiation of progressive radion-induced mutants in a mutation-breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica* 29, 525–530.
- Broertjes C., Roest S., Bokelmann G.S., 1976. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. using *in vivo* and *in vitro* adventitious bud techniques. *Euphytica* 25, 11–19.
- Broertjes C., van Harten A., 1988. *Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops*. Elsevier, Amsterdam, 29–59.
- Burge G.K., Morgan E.R., Seelye J., 2002. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70, 13–21.
- Bush S.R., Earle E.D., Langhans R.W., 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Am. J. Bot.* 63(6), 729–737.
- Chakrabarty D., Mandal A.K.A., Datta S.K., 1999. Management of chimera through direct shoot regeneration from florets of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 74(3), 293–296.
- Dorwick G.J., 1953. The chromosomes of chrysanthemum. II. Garden varieties. *Heredity* 7, 59–72.
- Esau K., 1973. *Anatomia roślin*. PWRiL, Warszawa, 131–174.

- Hejnowicz Z., 2002. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Organy wegetatywne. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 48–49, 573.
- Jain S.M., 2006. Mutation-assisted breeding for improving ornamental plants. Proceedings of The XXII International Eucarpia Symposium, Selection Ornamentals, Breeding For Beauty. Acta Hort. 714, 85–98.
- Jassem M., 1999. Hodowla roślin. Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy, 63–70.
- Jerzy M., 1997. Rola eksplantatu w indukowaniu mutacji *in vitro* i tworzeniu roślin transgenicznych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Hodowla Roślin i Nasiennictwo 2, 27–32.
- Jerzy M., 2000. Chryzantemy. Odmiany i uprawa. PWRiL, Warszawa, 2–27.
- Jerzy M., Lubomski M., 1991. Tworzenie się pędów przybyszowych na izolowanych *in vitro* liściach chryzantem poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 2, 26–29.
- Jerzy M., Zalewska M., 1996. Polish cultivars of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev and *Gerbera jamesonii* Bolus bred *in vitro* by induced mutations. Mutation Breeding Newsletter 42, 19.
- Jerzy M., Zalewska M., 1997. Flower colour recurrence in chrysanthemum and gerbera mutants propagated *in vitro* from meristems and leaf explants. Acta Hort. 447, 611–614.
- Jerzy M., Zalewska M., Piszczek P., 1991. Mutageniza u chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) indukowana *in vitro* promieniowaniem X i gamma. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 3, 24–29.
- Jerzy M., Zalewska M., Piszczek P., 1993. Somatic mutagenesis in chrysanthemum induced *in vitro* by irradiation of leaf explants forming adventitious shoots. International Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops. Beijing, China, 1–10.
- Lema-Rumińska J., 2005. Czy chryzantemy są chimerami? OWK 9, 46–47.
- Lema-Rumińska J., Zalewska M., 2005. Changes in flower colour among Lady Group of *Chrysanthemum* × *grandiflorum* /Ramat./ Kitam. as a result of mutation breeding. Folia Hort. 17(1), 61–72.
- Lema-Rumińska J., Zalewska M., Sadoch Z., 2004. Radiomutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) of the Lady group: RAPD analysis of the genetic diversity. Plant Breeding 123, 290–293.
- Malaure R.S., Barclay G., Power J.B., Davey M.R., 1991a. The Production of Novel Plants from Florets of *Chrysanthemum morifolium* Using Tissue Culture 1. Shoot Regeneration from Ray Florets and Somaclonal Variation Exhibited by the Regenerated Plants. J. Plant Physiol. 139, 8–13.
- Malaure R.S., Barclay G., Power J.B., Davey M.R., 1991b. The Production of Novel Plants from Florets of *Chrysanthemum morifolium* Using Tissue Culture 2. Securing Natural Mutations (Sports). J. Plant Physiol. 139, 14–18.
- Miler N., 2005. Dlaczego warto stosować indukowaną mutagenzę w hodowli chryzantem? Biotechnologia 2(69), 196–205.
- Miler N., 2013. A może by tak wrócić do krzyżowania chryzantem? Materiały z sympozjum nt. „Co nowego w chryzantemach”, Poznań, 28–31.
- Miler N., Zalewska M., 2014. Somaclonal variation of chrysanthemum propagated *in vitro* from different explants types. Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus 13(2), 69–82.
- Muller H. J., 1927. Artificial transmutation of the gene. Science 46, 84–87.
- Muszyński S., 1976. Hodowla mutacyjna roślin ozdobnych. Hodowla Roślin 2, 37.
- Mynett K., Orlikowska T., 1997. Stan aktualny i problem przyszłości dla polskiej hodowli roślin ozdobnych. Materiały I Krajowej Konferencji „Hodowla Roślin”, Poznań, 27–32.

- Rogalska S., Małuszyńska J., Olszewska M.J., 2005. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 143–150.
- Schum A., 2003. Mutation Breeding in Ornamentals: An efficient breeding method? *Acta Hort.* 612, 47–60.
- Stepczyńska K., Jerzy M., 1981. Mutagenesis in *Chrysanthemum* cv. Bravo propagated from the X-ray influenced leaf cuttings. Part II. MV2 generation. *Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa*, s. B, t. 6, 55–60.
- Stepczyńska K., Jerzy M., Widacka M., 1980. Mutagenesis in *Chrysanthemum* cv. Bravo propagated from the X-ray influenced leaf cuttings. Part I. MV1 generation. *Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa*, s. B, t. 5, 17–30.
- Stewart R.N., Dermen H., 1970. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in chrysanthemum by experimental production of adventitious shoots. *Am. J. Bot.* 57(9), 1061–1071.
- Tilney-Bassett R.A.E., 1986. *Plant Chimeras*. Edward Arnold, London, 19–62.
- Van Harten A.M., 1998. *Mutation breeding. Theory and practical applications*. Cambridge University Press, 257–269.
- Wolff K., 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. *Euphytica* 89, 159–164.
- [www.mvgs.iaea.org](http://www.mvgs.iaea.org)
- 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., 1985. Rozmnażanie złoćieni z sadzonek liściowych. *Materiały Sympozjum „Rozmnażanie złoćieni”*, Poznań, 1–8.
- Zalewska M., 1995. Somaticzna mutageneza u chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) indukowana *in vivo* oraz *in vitro* promieniowaniem gamma. *Wydawnictwo Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy, Rozprawy* 63, 1–83.
- Zalewska M., 2001. *In vitro* formation of adventitious meristem and its significance for mutation breeding of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev. *Acta Hort.* 560, 225–227.
- Zalewska M., 2005. Chryzantemy w ogrodzie i ich bliscy krewni. *Wydawnictwo „Działkowiec” Sp. z o.o.*, Warszawa, 4–15, 30–35.
- Zalewska M., 2010. *In vitro* adventitious bud techniques as a tool in creation of new chrysanthemum cultivars. W: *Floriculture. Role of tissue culture and molecular techniques* Datta S.K., Chakrabarty D. (red.). Pointer Publishers, Jaipur, 189–215.
- Zalewska M., Jerzy M., 1997a. Flower colour recurrence in *Chrysanthemum* and *Gerbera* mutants propagated *in vitro* from meristems and leaf explants. *Acta Hort.* 447, 611–614.
- Zalewska M., Jerzy M., 1997b. Mutation spectrum in *Dendranthema grandiflora* Tzvelev after *in vivo* and *in vitro* regeneration of plants from irradiated leaves. *Acta Hort.* 447, 615–618.
- Zalewska M., Lema-Rumińska J., Miler N., 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Sci. Hort.* 113, 70–73.
- Zalewska M., Miler N., TymoszuK A., Drzewiecka B., Winiecki J., 2010. Results of mutation breeding activity on *Chrysanthemum ×grandiflorum* (Ramat.) Kitam. in Poland. *EJPAU* 13(4), 27.
- Zalewska M., TymoszuK 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.

## BREEDING OF CHRYSANTHEMUM BY X AND GAMMA RAYS INDUCED MUTAGENESIS

**Summary.** Chrysanthemum is one of the most popular ornamental plants in the world. On the market, ruled by the laws of fashion, there is the large demand for new cultivars. The breeders make a lot of effort to satisfy the sophisticated and frequently changing customer tastes. Popular cultivars in one year are quickly replaced by new creations. In this situation, the breeders need methods allowing for easy and fast change of individual traits such as color or type of the inflorescence, deciding mostly about the attractiveness of new cultivars of ornamental plants. A high level of ploidy and heterozygosity as well as the phenomenon of self-incompatibility in chrysanthemum make it difficult to use the traditional breeding methods as crossing, selection and techniques of genetic transformation. Induced mutagenesis is one of the most important breeding method in chrysanthemum allowing to obtain in relatively short time new cultivars with changed colour or shape and size of inflorescence. The X and gamma rays at the dose of 10–20 Gy are the most often used physical mutagens. Gamma radiation is more effective than X radiation. Whole plants or their fragments like e.g. leaves, internodes, ligulate florets *in vivo* and/or *in vitro* can be irradiated. In many mutation breeding programs non-meristematic plant tissues and the technique of adventitious shoots regeneration are used. Adventitious meristem can regenerate from individual mutated cell and in this way new cultivar (genetically stable mutant with new, desired trait) can be obtained. When meristematic tissue is irradiated the formation of genetic unstable chimeras is very possible. Next the chimera components separation methods must be applied to obtain stable mutant. The aim of this review article was to characterize scientific assumptions and conduction of breeding programs based on the induction of mutations by X and gamma radiation in chrysanthemum. The most important achievements of Polish breeding in the years 1976–2011 were presented. On the basis of the results described in scientific articles it can be concluded that mutation induction is very useful and important breeding method in chrysanthemum, especially successful when it is combined with *in vitro* regeneration of adventitious shoots. Besides it is relatively inexpensive, fast and easy method of obtaining new cultivars.

**Key words:** *Chrysanthemum ×grandiflorum* /Ramat./ Kitam., mutation breeding, X and gamma radiation, Polish cultivars