

REGENERACJA *IN VITRO* PĘDÓW I ZARODKÓW PRZYBYSZOWYCH Z KWIATÓW JĘZYCZKOWATYCH W HODOWLI CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ

Alicja Tymoszuik

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy

Streszczenie. Zjawisko chimeryzmu związane jest z hodowlą chryzantemy wielkokwiatowej na drodze mutagenezy. Chimery, zwłaszcza sektorialne i meryklinalne, u których zmiana barwy pojawia się tylko na niewielkim obszarze całego kwiatostanu, są interesującym źródłem dotychczas traconej zmienności. Ze względu na lokalizację mutacji i mały obszar tkanek objętych mutacją w kwiatostanie, nie można stosować znanych metod separacji genotypów składowych chimer. Jedyną możliwością wyizolowania zmienności jest regeneracja pędów lub zarodków przybyszowych z kwiatów języczkowatych lub ich fragmentów o zmienionej barwie pobieranych z kwiatostanów chimer. Praca przedstawia znaczenie kultur *in vitro* kwiatów języczkowatych w hodowli chryzantemy oraz opisuje czynniki wpływające na wydajność regeneracji pędów i zarodków przybyszowych.

Słowa kluczowe: *Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam., hodowla mutacyjna, separacja chimer, kwiaty języczkowate, pęd przybyszowy, zarodek przybyszowy

WSTĘP

Chryzantema wielkokwiatowa jest jedną z najczęściej uprawianych na świecie roślin ozdobnych. Duże znaczenie w jej hodowli ma spontaniczna oraz indukowana mutageneza [Zalewska i in. 2010]. Częstość pojawiania się mutacji spontanicznych jest jednak zbyt mała jak na oczekiwania hodowców [Jerzy 1997]. Z tego względu stosuje się powszechnie indukowaną mutagenezę. Materiał roślinny poddaje się zazwyczaj działaniu promieniowania jonizującego X lub gamma, a najczęstszą zmianą u mutantów jest nowa barwa kwiatostanu [Zalewska i in. 2010, Zalewska i in. 2011]. Mutagenem traktuje się *in vivo* sadzonki pędowe lub liściowe, a *in vitro* tkankę kalusową, pąki, liście, ogonki liścio-

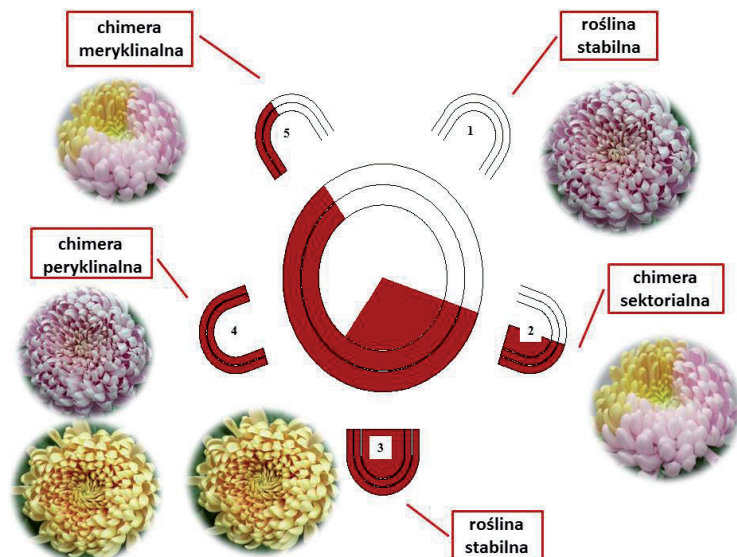
Adres do korespondencji – Corresponding author: Alicja Tymoszuik, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. i J. Śniadeckich w Bydgoszczy, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych, Pracownia Biotechnologii, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz, e-mail: alicja.tymoszuik@utp.edu.pl

we, odcinki międzywęźli, szypuły [Jerzy 2000]. Z hodowlanego punktu widzenia bardzo cenna jest możliwość regeneracji pędów przybyszowych z napromienionych fragmentów roślin niezawierających merystemu. Powstające rośliny są wówczas jednorodnymi genetycznie mutantami, ponieważ pochodzą z pojedynczych, dotkniętych mutacją komórek takiego eksplantatu. Nowa barwa obejmuje wówczas cały kwiatostan [Broertjes i van Harten 1988, Jerzy 1997]. Wykorzystanie w kulturach *in vitro* specyficznych eksplantatów, jakimi są kwiaty jęczyczkowate, jest nowatorską techniką pozwalającą wyizolować zmienność wynikającą z zajścia mutacji na niewielkim obszarze tkanek w całym kwiatostanie. Nową odmianę uzyskuje się wtedy poprzez regenerację pędów lub zarodków przybyszowych z całych kwiatów jęczyczkowatych lub tylko z ich fragmentów o zmienionej barwie pobieranych z kwiatostanów chimer. Technika ta ma duże znaczenie w utrwalaniu zmienności pojawiającej się w hodowli.

CHIMERYZM A KULTURY *IN VITRO* KWIATÓW JĘCZYKOWATYCH W HODOWLI CHRYZANTEM

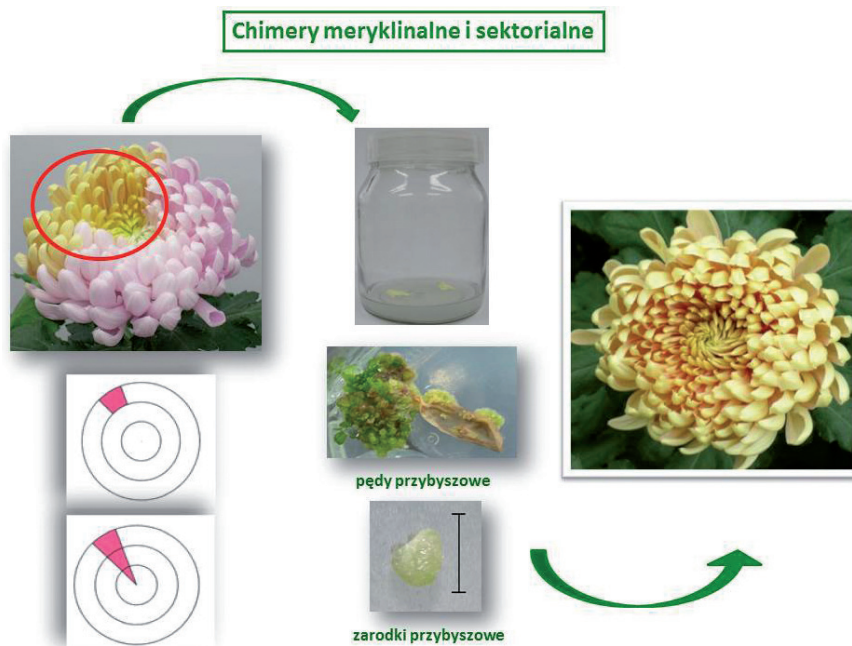
Chimery powstają w wyniku mutacji spontanicznych lub indukowanych w obrębie merystemu [Tilney-Bassett 1986], gdy czynniki mutagenne działają na sadzonki pędowe lub eksplantaty merystematyczne obejmujące wierzchołki wzrostu i pąki boczne, wyizolowane merystemy wierzchołkowe i kątowe. Mutacje zachodzą wówczas tylko w niektórych komórkach wielowarstwowego merystemu i są w stanie objąć jedynie część nowotworzącego się organizmu [Jerzy 1997]. Dodatkowo podczas rozwoju napromienionej rośliny, na drodze mechanizmu selekcji wewnątrzsomatycznej (diplontowej lub diplontycznej), dochodzi do eliminacji zmutowanych komórek w głębszych warstwach tkanek przez szybko dzielące się i żywotniejsze niezmutowane komórki [Broertjes i van Harten 1988, Jerzy 1997]. 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. Z tego względu mogą być rozpatrywane jako „częściowe” chimery peryklinalne. Wizualnie nie można rozróżnić chimery peryklinalnej od stabilnego mutantu, a chimery meryklinalnej od sektorialnej [Tilney-Bassett 1986] (rys. 1).

W merystemie wierzchołkowym może dojść do niestabilności polegającej na zajściu podziałów peryklinalnych w warstwie L1 lub L2. W rezultacie może to doprowadzić do zmiany fenotypu chimer na skutek penetracji warstwy L2 przez komórki z warstwy L1 lub na odwrót. Komórki warstwy L3 również mogą przedostawać się do położonej wyżej warstwy [Broertjes i van Harten 1988]. Zjawiska te mogą także prowadzić do pojawienia się sportów [Wolff 1996]. U chimer peryklinalnych w procesie tworzenia kwiatu jęczyczkowatego komórki warstwy L1 mogą zostać wyparte przez komórki warstwy L2. Rozmiar obszaru o zmienionej barwie odpowiada wtedy liczbie komórek warstwy L2 pojawiających się w warstwie L1 kwiatu jęczyczkowatego. Zmiana taka występuje jako smuga ciągnąca się od części dystalnej kwiatu jęczyczkowatego [Stewart i Dermen 1970]. Wiele mutacji spontanicznych lub indukowanych barwy kwiatostanu obejmuje tylko kilka całych kwiatów jęczyczkowatych, pojedynczy kwiat jęczyczkowaty, tylko jego pewną część albo pojawia się jedynie jako plamka lub pasek o rozmiarach od jednej do



Rys 1. Rodzaje chimer w przekroju poprzecznym (wewnątrz) i podłużnym (na zewnątrz): 1 – roślina stabilna, 2 – chimera sektorialna, 3 – roślina stabilna, 4 – chimera peryklinalna, 5 – chimera meryklinalna (według Kirka i Tilney-Bassetta [1978], cyt. Tilney-Basset [1986])

Fig 1. Types of chimeras shown in transverse section (inner circle) and longitudinal sections (outer ring): 1 – stable plant, 2 – sectorial chimera, 3 – stable plant, 4 – periclinal chimera, 5 – mericlinal chimera (according to Kirk and Tilney-Bassetta [1978], from Tilney-Basset [1986])



Rys 2. Schemat separacji komponentów chimer meryklinalnych i sektorialnych poprzez regenerację pędów lub zarodków przybyszowych z kwiatów języczkowatych

Fig 2. The diagram of mericlinal and sectorial chimeras components separation through the regeneration of adventitious shoots or embryos from ligulate florets

kilku tysięcy komórek [Stewart i Dermen 1970, Malaure i in. 1991b, Chakrabarty i Datta 2010]. Wówczas, ze względu na lokalizację mutacji i mały obszar tkanek nią objętych, nie można stosować znanych metod separacji genotypów składowych chimer, co znacznie ogranicza hodowlę [Stewart i Dermen 1970, Malaure i in. 1991b, Chakrabarty i in. 1999, Mandal i in. 2000b]. Jedyną możliwością wyizolowania zmienności jest w tym przypadku regeneracja pędów lub zarodków przybyszowych z całych kwiatów jęczyzkowatych lub tylko z ich fragmentów o zmienionej barwie pobieranych z kwiatostanów chimer. W kulturze *in vitro* powstające z pojedynczych komórek warstwy histogenowej L1 lub L2 kwiatu jęczyzkowatego pędy lub zarodki przybyszowe będą prezentowały odpowiednio genotyp warstwy L1 lub L2 i będą organizmami zbudowanymi wyłącznie z jednorodnych genetycznie tkanek [Malaure i in. 1991b, Chakrabarty i in. 1999, Mandal i in. 2000b]. Metoda ta stanowi przykład selekcji *in vivo-in vitro* polegającej na tym, że poszukiwana właściwość jest identyfikowana na roślinie (*in vivo*), np. jako obszar komórek, który przenosi się do kultury *in vitro* i regeneruje z niego rośliny [Malepszy i Śmiech 2007] (rys. 2).

Wiele programów hodowlanych chryzantem w ostatnich latach skupia się na napromienianiu *in vivo* ukorzenionych sadzonek, a następnie separacji komponentów chimer na drodze regeneracji pędów przybyszowych z kwiatów jęczyzkowatych [Chakrabarty i Datta 2010]. W ten sposób, po napromienieniu sadzonek fioletowoczerwonej odmiany 'Maghi', w celu rozdzielenia genotypów składowych powstałych chimer sektorialnych, prowadzono regenerację pędów przybyszowych z kilku kwiatów jęczyzkowatych o zmienionej barwie. Uzyskano stabilne mutanty o żółtej i białej barwie kwiatostanu [Chakrabarty i in. 1999]. Po napromienieniu sadzonek czerwonopurpurowej chryzantemy 'Puja' o łyżeczkowym kształcie kwiatów jęczyzkowatych uzyskano chimery sektorialne, u których część kwiatów jęczyzkowatych była żółtopomarańczowa. U jednej z nich kwiaty jęczyzkowate o nowej barwie były zrosnięte w rurki. Dzięki kulturze *in vitro* zmienionych kwiatów jęczyzkowatych udało się uzyskać stabilne mutanty zarówno pod względem samej barwy, jak i jednocześnie barwy i kształtu [Datta i in. 2001]. Kwiaty jęczyzkowate mogą także stanowić dogodny obiekt napromieniania w hodowli mutacyjnej. Prowadzona z nich następnie regeneracja *in vitro* pędów przybyszowych pozwala uzyskać stabilne mutanty [Mishra i Datta 2007, Matsumura i in. 2010]. Po potraktowaniu promieniowaniem gamma w dawce 0,5 lub 1 Gy kwiatów jęczyzkowatych o kształcie łyżeczkowym i barwie czerwonej odmiany 'Lalima' uzyskano dwa mutanty o żółtych kwiatostanach. Jeden z nich miał dodatkowo zmieniony kształt kwiatów jęczyzkowatych na rurkowy [Misra i in. 2003/2004]. Napromienianie kwiatów jęczyzkowatych promieniowaniem gamma w dawkach 5 i 10 Gy doprowadziło do zmian barwy z purpurowej na czerwoną i żółtą u odmiany 'Flirt' i z purpurowej na czerwoną u odmiany 'Puja'. U odmiany 'Maghi' o białym kwiatostanie pojawił się rurkowy kształt kwiatów jęczyzkowatych, a u czerwonopurpurowej odmiany 'Sunil' uzyskany mutant miał ciemniejszy odcień tej barwy oraz dodatkowo rurkowy kształt kwiatów jęczyzkowatych [Datta i in. 2005]. Szybkie i łatwo dostępne źródło nowych odmian może stanowić także pojawiająca się u regenerantów zmienność somaklonalna [Karp 1995, Zalewska i in. 2007]. Dotyczy ona cech fenotypowych lub biochemicznych i może mieć podłoże genetyczne lub epigenetyczne [Michalik 1996]. Czynnikiemmi wpływającymi na występowanie zmienności somaklonalnej są: genotyp [Malaure i in. 1991a, Mi-

ńano i in. 2009], regulatory wzrostu, pochodzenie eksplantatów ze starszych i bardziej wyspecjalizowanych tkanek [Karp 1995], regeneracja przez tkankę kalusową [de Jong i Custers 1986]. Zmienność somaklonalna pojawia się także wśród chryzantem uzyskanych na drodze regeneracji *in vitro* pędów przybyszowych z kwiatów języczkowatych. Obserwowano zmiany barwy, typu kwiatostanu [Khalid i in. 1989], siły wzrostu roślin [Malaure i in. 1991a], kształtu kwiatów języczkowatych, zwiększenia liczby kwiatów języczkowatych czy zmniejszenia długości rośliny i średnicy kwiatostanu [Kengkarj i in. 2008]. Powyższe możliwości i zalety, jakie daje w hodowli chryzantem regeneracja pędów przybyszowych, można uzyskać również poprzez embriogenezę somatyczną [Mandal i Datta 2005].

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WYDAJNOŚĆ REGENERACJI *IN VITRO* PĘDÓW I ZARODKÓW PRZYBYSZOWYCH Z KWIATÓW JĘZYZKOWATYCH

Z hodowlanego punktu widzenia im więcej otrzymamy zregenerowanych pędów czy zarodków, tym większe są szanse na separację komponentów chimer i uzyskanie nowej stabilnej odmiany z niewielkiego obszaru tkanek kwiatów języczkowatych. Istotne jest zatem określenie wpływu różnych czynników na zwiększenie wydajności organogenezy przybyszowej. W kulturze *in vitro* wyróżnia się trzy kierunki morfogenezy przybyszowej: kaulogenezę (powstawanie pędów przybyszowych), ryzogenezę (powstawanie korzeni przybyszowych) oraz embriogenezę somatyczną (tworzenie zarodków bez zapłodnienia). Przybyszowa morfogeneza bezpośrednia polega na powstawaniu zawiązka organu przybyszowego bezpośrednio z komórek eksplantatu, z kolei w przybyszowej morfogenezie pośredniej najpierw powstaje kalus, a dopiero później jego komórki tworzą organ [de Klerk i in. 1997, Stefaniak 2004]. Zgodnie z modelem stochastycznym opracowanym przez Broertjesa i Keena [1980] merystem przybyszowy powstaje z jednej komórki. Chakrabarty i inni [2000b] zaobserwowali tworzenie merystemów przybyszowych w zewnętrznej warstwie komórek epidermy oraz subepidermy kwiatów języczkowatych. Na regenerację *in vitro* pędów przybyszowych wpływają m.in. takie czynniki, jak: regulatory wzrostu [Park i in. 2005, Park i in. 2007], genotyp [Zalewska i in. 2008], rodzaj eksplantatu [Lu i in. 1990], wiek eksplantatu [Chakrabarty i in. 1999], podział eksplantatu oraz sposób inokulacji [Tymoszuk i Zalewska 2014b], topofizyczna lokalizacja eksplantatu [Zalewska i Miler 2010], poziom endogennych regulatorów wzrostu [Kumar i Kanwar 2006], stężenie sacharozy w pożywce [Park i in. 2005], rodzaj substancji użytej do zestalenia pożywki [Zalewska 2010], czynnik mutageny [Zalewska i Lema-Rumińska 2004], fotoperiod [Park i in. 2005] oraz barwa i natężenie światła, a także pora roku [Nahid i in. 2007].

Regeneracja pędów u chryzantem w dużej mierze uzależniona jest od rodzaju i stężenia regulatorów wzrostu. Malaure i inni [1991a] donoszą, że na fragmentach płatków korony kwiatów języczkowatych 16 badanych odmian chryzantem, kaulogeneza zachodziła najlepiej pod wpływem BAP w kombinacji z NAA. Optymalne stężenie tych regulatorów wzrostu było odmienne w zależności od genotypu. Badane odmiany nie tworzyły pędów na pożywkach z dodatkiem KIN i IAA. U chryzantemy 'Colchi Bahar' najwięcej pędów w przeliczeniu na regenerujący kwiat języczkowaty (16,6) powstawało na pożywce z $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA. Regenerację podejmowało

79,2% wyłożonych kwiatów języczkowatych [Chakrabarty i in. 1999]. Chryzantema 'Puja' wykazywała zdolność do regeneracji pędów na wszystkich pożywkach z kombinacjami BAP (0,5; 1; 2 lub 5 mg·dm⁻³) i NAA (0,2 lub 0,5 mg·dm⁻³). Optymalny dodatek regulatorów wzrostu wynosił 1 mg·dm⁻³ BAP i 0,5 mg·dm⁻³ NAA. Na tej pożywce regenerację podejmowało 55,7% eksplantatów, tworząc średnio 6,5 pędów [Datta i in. 2001]. U odmiany 'Madam E Roger' najlepsze rezultaty (35% kwiatów języczkowatych podejmujących regenerację i tworzących średnio pięć pędów) uzyskano na pożywce z dodatkiem 2 mg·dm⁻³ BAP i 0,5 mg·dm⁻³ NAA [Misra i Datta 2007]. Najlepsza pożywka do regeneracji pędów z eksplantatów z kwiatów języczkowatych u odmian 'Biarizte', 'Yellow Biarizte', 'Storika', 'Pinkgin', 'Linker Pink', 'Dark Linker Salmon' i 'Bari' zawierała 1,5 mg·dm⁻³ BAP i 0,5 mg·dm⁻³ NAA [Kengkarj i in. 2008], u odmiany 'PKV Shubhra' 2 mg·dm⁻³ BAP i 1,5 mg·dm⁻³ IAA [Lakshmi i in. 2006], a u odmiany 'Shiroyamate' 3 mg·dm⁻³ BAP i 10 mg·dm⁻³ NAA [Matsumura i in. 2010]. Najwięcej kwiatów języczkowatych (60%) chryzantemy 'Purima' podejmowało regenerację na pożywce z 0,5 mg·dm⁻³ BAP i 0,2 mg·dm⁻³ NAA, tworząc średnio 15 pędów. W przypadku testowania KIN i NAA w różnych stężeniach organogeneza pędów zachodziła jedynie na pożywce zawierającej 1 mg·dm⁻³ KIN i 0,2 mg·dm⁻³ NAA [Mandal i in. 2000b]. Mandal i inni [2000a] dla odmiany 'Maghi' najlepszy wynik regeneracji (56,7% kwiatów języczkowatych podejmujących regenerację i tworzących średnio osiem pędów) uzyskali na pożywce uzupełnionej 5 mg·dm⁻³ KIN i 1 mg·dm⁻³ NAA. Dokładnie 82% kwiatów języczkowatych chimer odmiany 'Ajay' podejmowało regenerację na pożywce z 10 mg·dm⁻³ KIN i 0,5 mg·dm⁻³ NAA, tworząc średnio 34,4 pędów [Prasad i in. 2008]. Kwiaty języczkowe chryzantem 'Flirt', 'Puja', 'Maghi', 'Sunil' wykładano na pożywki z BAP lub TDZ w stężeniach 1; 2 lub 5 mg·dm⁻³ oraz 0,5 mg·dm⁻³ NAA. Odmiana 'Flirt' wykazywała zdolność do regeneracji pędów na wszystkich pożywkach. U odmiany 'Sunil' pędy nie powstawały jedynie na pożywce z 5 mg·dm⁻³ TDZ i 0,5 mg·dm⁻³ NAA. Z kolei odmiana 'Puja' nie regenerowała pędów na pożywkach z TDZ, a odmiana 'Maghi' na pożywkach z BAP. Najkorzystniejszy okazał się zawsze dodatek cytokininy w stężeniu 2 mg·dm⁻³. Powstawało wówczas u badanych odmian od 5 do 12 pędów na eksplantacie regenerującym, a udział eksplantatów podejmujących regenerację wynosił od 20 do 85% [Datta i in. 2005]. U chryzantem 'Orlando', 'Pink Pixie Time' i 'Klondike' najwięcej pędów uzyskano na pożywce z 10 mg·dm⁻³ BAP, 0,1 mg·dm⁻³ KIN i 10 mg·dm⁻³ IAA [Park i in. 2005, Park i in. 2007]. U odmiany 'Cool Time' regeneracja pędów zachodziła tylko wtedy, gdy w pożywce znajdowała się w odpowiednim stężeniu zarówno cytokinina BAP (lub KIN), jak i auksyna NAA. Zastosowanie BAP było bardziej efektywne niż zastosowanie KIN. Najwięcej pędów (ponad 38), w przeliczeniu na jeden wyłożony kwiat języczkowaty, regenerowało na pożywce uzupełnionej 2 mg·dm⁻³ BAP oraz 0,5 mg·dm⁻³ NAA. Kaulogenezę podejmowało wówczas niemal 42% eksplantatów [Tymoszuk i Zalewska 2014a]. Zdolność do regeneracji pędów u chryzantemy jest silnie uzależniona od odmiany [Park i in. 2005, Nahid i in. 2007, Park i in. 2007]. W celu uzyskania zadowalającego wyniku regeneracji pędów u danego genotypu, niezbędne jest określenie specyficznego dla niego składu i stężeń regulatorów wzrostu w pożywce. Wpływ ten może być tłumaczony różnicami genotypowymi w zdolności do pobierania z pożywki i następnie metabolizowania poszczególnych regulatorów wzrostu [Nahid i in. 2007].

Regeneracja jest łatwiejsza, gdy eksplantaty pobiera się z młodych, zdrowych i intensywnie rosnących roślin matecznych [Adamus 1996]. Eksplantaty z organów młodych są bardziej podatne na zmianę kierunku rozwoju [Stefaniak 2004] i szybciej proliferują zdolną do organogenezy tkankę kalusową [Gahan i George 2008]. Datta i inni [2001] u chryzantemy 'Puja' i jej chimer uzyskanych po napromienieniu, a także Misra i inni [2003/2004] u odmiany 'Lalima' oraz Misra i Datta [2007] u odmiany 'Madam E Roger' zbierali kwiaty języczkowe z kwiatostanów w połowie rozkwitu. U chryzantemy 'Maghi' kwiaty języczkowe pobierano z kwiatostanów znajdujących się w stadium pełni kwitnienia [Mandal i in. 2000a]. W każdym z tych przypadków eksplantaty wykazywały zdolność do kaulogenezy. U chryzantem 'Orlando', 'Pink Pixie Time' oraz 'Klondike' fragmenty płatków korony kwiatów języczkowych pobrane z kwiatostanów na 2–3 dni przed pełnym otwarciem kwiatów języczkowych regenerowały znacznie więcej pędów niż te pobrane po 7–8 dniach od otwarcia kwiatów rurkowatych [Park i in. 2007]. U odmiany 'Cool Time' kwiaty języczkowe pobierano w następujących stadiach rozwoju kwiatostanu: kwiatostan niecałkowicie otwarty, widoczne częściowo oczko, kwiaty rurkowate nie pylą; kwiatostan niecałkowicie otwarty, widoczne całe oczko, kwiaty rurkowate nie pylą; kwiatostan całkowicie otwarty, dwa okółki kwiatów rurkowatych pylą; kwiatostan całkowicie otwarty, połowa okółków kwiatów rurkowatych pyli. Uzyskane wyniki pokazały, że wydajność kaulogenezy nie zależy od stadium rozwoju kwiatostanu [Tymoszuk i Zalewska 2014b].

Na zwiększenie liczby regenerujących pędów wpływa także podział eksplantatu [Zenkteler 1984]. Kaulogenezę obserwuje się wówczas najczęściej w miejscach cięcia, co związane jest ze wzmożonym napływem w te obszary endogennych regulatorów wzrostu, a także z intensywnym pobieraniem egzogennych regulatorów wzrostu oraz proliferacją tkanki kalusowej [Gahan i George 2008]. Na pożywkę eksplantat można inokulować polarnie (↓), apolarnie (↑) lub horyzontalnie (↔). Wpływ inokulacji na kaulogenezę wynika z zachowania lub też i nie naturalnej polarności, a także z zapewnienia dostępności składników odżywczych oraz regulatorów wzrostu z pożywki do tych części eksplantatu, w których znajdują się komórki kompetentne [Gahan i George 2008]. W literaturze przedmiotu znajdują się informacje o inicjowaniu kultur z całych kwiatów języczkowych chryzantem [Mandal i in. 2000a, Mandal i in. 2000b, Datta i in. 2005]. Malaure i inni [1991a] u 16 badanych odmian oraz Matsumura i inni [2010] u odmiany 'Shiroyamate' wykorzystali fragmenty płatków korony kwiatów języczkowych o wymiarach 0,5 × 0,5 cm. Chakrabarty i inni [2000a] wycinali fragmenty płatków korony o powierzchni 0,5 cm², podczas gdy Park i inni [2005] wykładali fragmenty płatków korony o długości 0,5–0,6 cm. W badaniach Kengkarj i inni [2008] kwiaty języczkowe cięto na trzy części: proksymalną, centralną i dystalną, o wymiarach ok. 0,4 × 0,4 cm i następnie inokulowano stroną zewnętrzną. Łatwym sposobem na znaczne zwiększenie wydajności regeneracji pędów z kwiatów języczkowych jest ich cięcie (poprzeczne lub podłużne na pół) lub nakłuwanie, a następnie wykładanie na pożywkę stroną zewnętrzną w pozycji horyzontalnej. Na kwiatach języczkowych odmiany 'Cool Time' przeciętych poprzecznie lub podłużnie na pół powstawało więcej pędów niż na całych kwiatach języczkowych inokulowanych horyzontalnie lub polarnie albo na kwiatach języczkowych, których część dystalną inokulowano polarnie, a część proksymalną apolarnie [Tymoszuk i Zalewska 2014b].

Embriogeneza somatyczna jest procesem, podczas którego z komórek wegetatywnych tworzą się zarodki morfologicznie i fizjologicznie podobne do zarodków zygocytynych [Kępczyński i Kępczyńska 2001, Stefaniak 2004, Kępczyńska 2006, Bach 2007]. Zarodek somatyczny jest identyczny pod względem genetycznym jak komórka, z której powstał [Lema-Rumińska i Śliwińska 2009], i nazywany jest także zarodkiem przybyszowym. Zarodki somatyczne są strukturami o wyraźnej biegunowości i nie wykazują waskularnego połączenia z tkanką macierzystą, z której regenerują. Na indukcję embriogenezy somatycznej wpływają m.in. takie czynniki, jak: regulatory wzrostu, rodzaj i stężenie makro- i mikroelementów [Kępczyńska 2006], genotyp [Pavingerová i in. 1994], pochodzenie eksplantatu [Orlikowska 1997], stężenie sacharozy i mioinozytolu [Mandal i Datta 2005], warunki kultury [Bach 2007], stan fizjologiczny rośliny donora, a także barwa i natężenie światła [Lema-Rumińska i Fijałkowska 2006]. Stymulatorami są także NH_4NO_3 , mleczko kokosowe, hydrolizat kazeiny, specyficzne aminokwasy [Zenkteler 1984, Kępczyński i Kępczyńska 2001, Doliński 2004].

Tanaka i inni [2000] indukowali embriogenezę u chryzantemy 'Aboukyu' na inokulowanych horyzontalnie stroną zewnętrzną fragmentach płatków korony kwiatów jęczyczkowatych o długości 1 cm. W pierwszym doświadczeniu zastosowano pożywki zawierające $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ KIN oraz IAA, IBA, 2,4-D lub NAA odpowiednio w stężeniu 10; 11,6; 12,6 i $10,6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Embriogenezę podjęły eksplantaty na pożywce z KIN i IAA (58%) oraz z KIN i NAA (17%). IBA oraz 2,4-D nie indukowały embriogenezy. W kolejnych badaniach użyto pożywki uzupełnione jedynie KIN lub IAA albo kombinacją KIN i IAA bez lub z BAP w różnych stężeniach. Zarodki nie powstawały na pożywkach bez regulatorów wzrostu lub uzupełnionych jedynie auksyną lub cytokininą. Najlepsze rezultaty uzyskano ponownie na pożywce z $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ KIN i $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IAA. Dodanie do niej BAP obniżało procentowy udział eksplantatów tworzących zarodki i sprzyjało powstawaniu pędów. W badaniach tych embrioidy powstawały na całej powierzchni eksplantatów, na pośredniej i bezpośredniej drodze. Mandal i Datta [2005] przecięte poprzecznie na pół kwiaty jęczyczkowate chryzantemy 'Purima' wykładali na pożywki uzupełnione BAP (w stężeniu 0; 0,2; 0,5; 1; 2 lub $4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) i 2,4-D (w stężeniu 0; 0,2; 0,5; 2; 4 lub $6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Regeneracja zachodziła bezpośrednio na pożywkach zawierających 1; 2 lub $4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP oraz 2; 4 lub $6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D. Największy procentowy udział eksplantatów podejmujących embriogenezę (30%) i największą liczbę embrioidów w przeliczeniu na eksplantat regenerujący ($15,8$) uzyskano na pożywce z $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP oraz $4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D. Pożywki zawierające 1; 2 lub $4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP oraz 2; 4 lub $6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D przeznaczono również do badań u odmian 'Birbal Sahani', 'Maghi', 'Colchi Bahar' oraz 'Kasturi Bi'. Stwierdzono wyraźną specyfikę odmianową. Testowane genotypy nie tworzyły embrioidów na pożywkach z 1; 2 lub $4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i $2 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D. Wydajność embriogenezy na pozostałych pożywkach różniła się dla poszczególnych odmian. Odmianę 'Birbal Sahani' wybrano do kolejnych badań, w których 2,4-D zastąpiono NAA (1; 2; 4 lub $6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) w połączeniu z BAP (0,5; 1; 2 lub $4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). Zarodki nie powstawały na pożywkach zawierających $0,5 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP lub $6 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ NAA. Zastąpienie 2,4-D przez NAA obniżało zdolność do indukcji embriogenezy. U chryzantemy 'Cool Time' embriogeneza zachodziła na pożywce zawierającej jedynie 2,4-D, a także tę auksynę w połączeniu z BAP (lub KIN). Użycie KIN było bardziej efektywne niż użycie

BAP. Najwięcej zarodków (5,4) tworzyło się na pożywce uzupełnionej $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ KIN i $4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D. Z przeciętych poprzecznie na pół kwiatów języczkowatych regenerowało więcej zarodków niż z całych kwiatów języczkowatych [Tymoszuk i in. 2014].

PODSUMOWANIE

Wykorzystanie w hodowli regeneracji *in vitro* pędów czy zarodków przybyszowych z kwiatów języczkowatych ma duże znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne. Kultury kwiatów języczkowatych to nie tylko metoda separacji komponentów składowych chimer. Jako specyficzny eksplantat kwiaty języczkowe mogą również stanowić obiekt napromieniania. Aby osiągnąć zamierzony sukces hodowlany, jeszcze przed założeniem kultur warto wziąć pod uwagę wpływ czynników, jak np.: skład regulatorów wzrostu w pożywce, genotyp, wiek i sposób inokulacji eksplantatu, na zwiększenie wydajności regeneracji.

LITERATURA

- Adamus A., 1996. Podstawowe wiadomości o kulturach *in vitro*. W: Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Red. B. Michalik. Wydawnictwo i Drukarnia DRUKROL s.c., Kraków, 12–16.
- Bach A., 2007. Zastosowania praktyczne biotechnologii. W: Biotechnologia roślin. Red. S. Malepszy. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 261–272.
- Broertjes C., Keen A., 1980. Adventitious shoots: do they develop from one cell? *Euphytica* 29, 73–87.
- Broertjes C., van Harten A.M., 1988. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier, Amsterdam, 29–59.
- Chakrabarty D., Datta S.K., 2010. Management of chimera and *in vitro* mutagenesis for development of new flower colour/shape and chlorophyll variegated mutants in chrysanthemum. W: Floriculture. Role of tissue culture and molecular techniques. Red. S.K. Datta, D. Chakrabarty. Pointer Publishers, Jaipur, 157–164.
- 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.
- Chakrabarty D., Mandal A.K.A., Datta S.K., 2000a. Retrieval of new colour chrysanthemum through organogenesis from sectorial chimera. *Curr. Sci.* 78(9), 1060–1061.
- Chakrabarty D., Mandal A.K.A., Datta S.K., 2000b. SEM and light microscopic studies on direct shoot regeneration from ray florets of chrysanthemum. *Israel J. Plant Sci.* 48, 105–107.
- Datta S.K., Chakrabarty D., Mandal A.K.A., 2001. Gamma ray-induced genetic manipulations in flower colour and shape in *Dendranthema grandiflorum* and their management through tissue culture. *Plant Breeding* 120, 91–92.
- Datta S.K., Misra P., Mandal A.K.A., 2005. *In vitro* mutagenesis – a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum. *Curr. Sci.* 88(1), 155–158.
- Doliński R., 2004. Ocena polskich odmian koniczyzny czerwonej pod względem zdolności do somatycznej embriogenezy. *Biotechnologia* 2 (65), 123–130.

- Gahan P.B., George E.F., 2008. Adventitious Regeneration. W: Plant Propagation by Tissue Culture. Wyd. III. Tom I. The Background. Red. E.F. George, M.A. Hall, G-J. de Klerk. Springer, Dordrecht, 358–389.
- 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, 7–22.
- Jong J. de, Custers J.B.M., 1986. Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and *in vitro* culture of pedicels and petal epidermis. Euphytica 35, 137–148.
- Karp A., 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica 85, 295–302.
- Kengkarj P., Smitamana P., Fujime Y., 2008. Assessment of Somaclonal Variation in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Kitam.) using RAPD and Morphological Analysis. Plant Tissue Cult. Biotech. 18(2), 139–149.
- Kępczyńska E., 2006. Kielkowanie i konwersja somatycznych zarodków *in vitro*. Biotechnologia 4(75), 78–94.
- Kępczyński J., Kępczyńska E., 2001. Regulatory wzrostu w somatycznej embriogenezie *Medicago sativa* L. Biotechnologia 2(53), 16–25.
- Khalid N., Davey M.R., Power J.B., 1989. An Assessment of Somaclonal Variation in *Chrysanthemum morifolium*: the Generation of Plants of Potential Commercial Value. Sci. Hortic. 38, 287–294.
- Klerk G-J. de, Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R., Neumann K-H., 1997. Regeneration of roots, shoots, and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. Biol. Plantarum 39(1), 53–66.
- Kumar S., Kanwar J.K., 2006. Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. Folia Hortic. Ann. 18(2), 57–64.
- Lakshmi M.K., Patil S.R., Chakrapani K., Kalamkar V.B., Lende S.R., 2006. Studies on callus induction and differentiation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). J. Soils Crops 16(2), 324–330.
- Lema-Rumińska J., Śliwińska E., 2009. Ocena stabilności roślin uzyskanych z zarodków somatycznych u chryzantemy wielkokwiatowej [*Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam.]. ZPPNR 539, 425–432.
- Lema-Rumińska J., Fijałkowska A., 2006. Dynamika wzrostu kalusa oraz regeneracja struktur embrioidalnych u kaktusa z rodzaju *Gymnocalycium* w zależności od warunków świetlnych. ZPPNR 510, 325–331.
- 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.
- 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.
- Mandal A.K.A., Chakrabarty D., Datta S.K., 2000a. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60, 33–38.
- Mandal A.K.A., Chakrabarty D., Datta S.K., 2000b. *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. Euphytica 114, 9–12.

- 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.
- Malepszy S., Śmiech M., 2007. Selekcja i testowanie cech w kulturze *in vitro*. W: *Biotechnologia roślin*. Red. S. Malepszy. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 139–140.
- Matsumura A., Nomizu T., Furutani N., Hayashi K., Minamiyama Y., Hase Y., 2010. Ray florets color and shape mutants induced by 12C5+ ion beam irradiation in chrysanthemum. *Sci. Hortic.* 123, 558–561.
- Michalik B., 1996. Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Wydawnictwo i Drukarnia DRUKROL s.c., Kraków, 23–25.
- Miñano H.S., González-Benito M.E., Martín C., 2009. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. *Sci. Hortic.* 122, 238–243.
- Misra P., Datta S.K., 2007. Standardization of *in vitro* protocol in *Chrysanthemum* cv. Madam E Roger for development of quality planting material and to induce genetic variability using γ -radiation. *Indian J. Biotechn.* 6, 121–124.
- Misra P., Datta S.K., Chakrabarty D., 2003/2004. Mutation in flower colour and shape of *Chrysanthemum morifolium* induced by γ -radiation. *Biol. Plantarum* 47(1), 153–156.
- Nahid J.S., Shyamali S., Kazumi H., 2007. High Frequency Shoot Regeneration from Petal Explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *in vitro*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 10(19), 3356–3361.
- Orlikowska T., 1997. Regulatory roślinne w kulturach *in vitro*. W: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*. Tom II. Zastosowanie w ogrodnictwie, rolnictwie, leśnictwie i w kulturach tkanek. Red. L.S. Jankiewicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 219–247.
- 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.
- Park S.H., Kim G.H., Jeong B.R., 2007. Adventitious Shoot Regeneration from Cultured Petal Explants of Chrysanthemum. *Horticult. Environ. Biotech.* 48(6), 387–392.
- Pavingerová D., Dostál J., Bisková R., Benetka V., 1994. Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Sci.* 97, 95–101.
- Prasad K.V., Kumar S., Kumar S., Raju D.V.S., Swarup K., Singh O., Patil M.T., 2008. *In vitro* Isolation, Purification, Rapid Bulking and Field Establishment of a Promising Radio-Mutant Pusa Anmol from Spray Chrysanthemum cv. Ajay. *FAO/IAEA International Symposium on Induced Mutations in Plants*. Vienna, Austria, 12–15 August. Abstracts, 114.
- Stefaniak B., 2004. Roślinne kultury *in vitro*. W: *Komórki roślinne w warunkach stresu*. Tom II. *Komórki in vitro*. Red. A. Woźny, K. Przybył. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 29–47, 72–92.
- 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.
- Tanaka K., Kanno Y., Kudo S., Suzuki M., 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Cell Rep.* 19, 946–953.
- Tilney-Bassett R.A.E., 1986. *Plant Chimeras*. Edward Arnold, London.
- Tymoszuk A., Zalewska M., 2014a. *In vitro* adventitious shoots regeneration from ligulate florets in the aspect of application in chrysanthemum breeding. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 13(2), 45–58.

- TymoszuK A., Zalewska M., 2014b. Biological factors affecting regeneration of adventitious shoots from *in vitro* isolated ligulate florets of chrysanthemum. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 13(3), 155–165.
- TymoszuK 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.
- Wolff K., 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. *Euphytica* 89, 159–164.
- 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. Red. S.K. Datta, D. Chakrabarty. Pointer Publishers, Jaipur, 196.
- Zalewska M., Lema-Rumińska J., 2004. Wpływ promieniowania gamma na regenerację pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Biotechnologia* 2(65), 86–92.
- 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., 2010. Zjawisko topofizy w regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* u chryzantemy wielkokwiatowej. *Biotechnologia* 2(89), 89–95.
- 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. *ZPPNR* 525, 511–517.
- 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.
- Zenkter E., 1984. Wegetatywne rozmnażanie roślin metodą hodowli tkanek. W: Hodowla komórek i tkanek roślinnych. Red. M. Zenkter. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 111–125.

IN VITRO REGENERATION OF ADVENTITIOUS SHOOTS AND EMBRYOS FROM LIGULATE FLORETS IN CHRYSANTHEMUM BREEDING

Summary. Chrysanthemum is one of the most popular ornamental plant worldwide. There is always demand for new cultivars, especially with new colour or inflorescence type. Very important breeding method of chrysanthemum is induced mutagenesis. Nevertheless this method is associated with a phenomenon of chimerism when mutation occurs within the meristem and plants with tissues of a varied genetic composition are formed. In chrysanthemum chimeras are also often formed as a result of spontaneous mutation during cultivation. In sectorial chimeras the genetically different tissue sector covers all the histogenic layers. In periclinal chimeras a different genotype is presented in one or two whole layers and in mericlinal chimeras only in a part of one or two layers. Chimerism is large limitation for mutation breeding focused mainly on obtaining new genetically stable cultivars. Chimeras, especially sectorial and mericlinal, in which the colour change occurs only on small area of the whole inflorescence, are very often an interesting source

of variability. Nevertheless in this case, due to the location of the mutation and a small area of the mutated tissue like one or few ligulate florets or only single spots or stripes on ligulate florets, known methods of chimeras components separation can not be applied and these mutations get lost. The only possibility to isolate the variability is the *in vitro* regeneration of adventitious shoots or embryos from ligulate florets collected from chimera inflorescences. Adventitious shoots or embryos regenerated *in vitro* from single cells of histogenic layer L1 or L2 of ligulate floret, will present, respectively, the genotype of layer L1 or L2 and will be built up only from genetically homogenous tissues. In the paper the importance of *in vitro* cultures of ligulate florets in chrysanthemum breeding is presented and the factors affecting the efficiency of the regeneration of adventitious shoots and embryos (type and concentration of plant growth regulators in the medium, explant age and type, position of explant inoculation on the medium) are described in details. Ligulate florets of chrysanthemums are not only useful explants for chimera components isolation but can be also used as a good source of explants for irradiation.

Key words: *Chrysanthemum ×grandiflorum* (Ramat.) Kitam., mutation breeding, chimera separation, ligulate florets, adventitious shoot, adventitious embryos