

WYBRANE ZAGADNIENIA Z ZAKRESU BIOLOGII, HODOWLI I REPRODUKCJI CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ

Dariusz Kulus✉

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
w Bydgoszczy

Streszczenie. Chryzantema wielkokwiatowa zaliczana jest do najbardziej popularnych roślin ozdobnych na rynku ogrodniczym. Światowa produkcja tego gatunku rośnie z każdym rokiem. Skomplikowana biologia chryzantemy (wysoki poziom ploidalności, heterozygotyczność, poligeniczna kontrola kwitnienia, samoniezgodność oraz ograniczona żywotność pyłku) ogranicza jednak skuteczność tradycyjnych metod hodowlanych (krzyżowanie i selekcję). Dzisiaj, aby zaspokoić rosnące wymogi rynku w hodowli i rozmnażaniu tego gatunku, stosuje się nowoczesne osiągnięcia biotechnologii. W celu pozyskiwania nowych odmian wykorzystuje się hodowlę mutacyjną. W jej efekcie często uzyskuje się jednak chimery. Organizmy takie wymagają opracowania szczególnych warunków rozmnażania i przechowywania. Ostatnie dekady przyniosły jednak znaczący postęp w zakresie wykorzystania kultur tkankowych w reprodukcji chryzantemy. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wybranych zagadnień z zakresu biologii oraz nowoczesnych metod hodowli i reprodukcji chryzantemy wielkokwiatowej.

Słowa kluczowe: chimery, chryzantema, hodowla mutacyjna, *in vitro*, mikrorozmnażanie

WSTĘP

W szerokim wachlarzu dostępnych gatunków roślin ozdobnych istnieją takie, które spotykają się ze szczególnym zainteresowaniem producentów i konsumentów. Do tej grupy należy chryzantema (rodzina astrowate, Asteraceae Dum.), która zaliczana jest do najpopularniejszych roślin ozdobnych na świecie [Zhao i in. 2009]. Każdego roku tylko w Japonii sprzedaje się jej około 2 miliardy sztuk w formie ciętej lub doniczkowej, w Holandii 1,5 miliarda, a w Chile 900 milionów. W Polsce produkcja chryzantemy

✉dkulus@gmail.com

dochodzi do kilkudziesięciu milionów, czyli tyle, ile produkuje jej cały kontynent australijski, a także Korea i pięć razy więcej niż Nowa Zelandia [Teixeira da Silva i in. 2013]. Przeciętny Polak tylko w dniu Wszystkich Świętych przeznaczają na chryzantemy aż 15% całkowitej rocznej kwoty wydawanej na rośliny ozdobne [Jabłońska i Perzyńska 2009]. W produkcji chryzantemy na 1 i 2 listopada przeważają rośliny doniczkowe. Ich udział w całkowitej powierzchni uprawy wynosi 83%, a na 17% powierzchni są uprawiane cięte chryzantemy [Jabłońska i Sobczak 2011]. W okresie świąt w listopadzie Polacy zakupują kilkadziesiąt milionów doniczek.

Tak ogromna światowa podaż możliwa jest dzięki opracowaniu całorocznej, sterowanej produkcji, w której na tej samej powierzchni szklarni uzyskać można nawet cztery zbiory rocznie. Technologia ta opracowana została przez K. Posta (USA) w latach 30. XX wieku [Solecka 1978].

Chryzantema jest jedną z najdłużej uprawianych roślin ozdobnych. W Chinach znana była już 1000 lat p.n.e. Wierzono wówczas, że kwiat ten skrywa klucz do nieśmiertelności i wykorzystywano ją głównie w lecznictwie. W IV wieku trafiła do Korei, a następnie Japonii, stając się jej symbolem narodowym [Dowrick 1953]. Z Azji do Europy (Holandii) dotarła w 1688 roku. Pierwsze próby jej wprowadzenia na rynek europejski okazały się jednak nieskuteczne przez trwającą w Holandii w tym czasie „tulipomanię”. Stało się to możliwe dopiero w 1789 roku, kiedy do Francji (a rok później także do Anglii) sprowadzono chryzantemę ‘Old Purple’ [Dowrick 1953]. Do USA chryzantema trafiła w XIX wieku [Trigiano i in. 1998]. Sto lat później stała się jedną z najczęściej uprawianych roślin. Zachowanie lub udoskonalanie cech jakościowych roślin ozdobnych, takich jak: kształt liści, kolor i kształt kwiatów, długość życia w wazonie (pozbiorcza trwałość) oraz pokrój, są nadrzędnym celem współczesnych hodowców. Aby zrealizować te cele, konieczne jest wspieranie się nowoczesnymi osiągnięciami nauki.

CHRYZANTEMA WIELKOKWIATOWA – CHARAKTERYSTYKA GATUNKU

Rodzaj *Chrysanthemum* obejmuje około 50 kosmopolitycznych gatunków pochodzących ze wschodniej Azji (głównie umiarkowanego i górskiego klimatu Chin), zróżnicowanych pod względem morfologicznym, spokrewnionych blisko z przedstawicielami rodzaju *Ajania* Poljakov oraz *Arcanthemum* Tzvelev [Zhao i in. 2009].

Najpopularniejszym przedstawicielem rodzaju *Chrysanthemum* jest chryzantema wielkokwiatowa (*Chrysanthemum ×grandiflorum* /Ramat./Kitam.), będąca mrozoodporną byliną o wzniesionej łodydze (wysokości od 0,3 do 1 m) i naprzemianlegle ułożonych liściach [Wasem i in. 2009]. Nazwa gatunku pochodzi od greckich słów *krus anthemion*, co znaczy złoty kwiat [Barakat i in. 2010]. Chryzantema, zaliczana jest do RDK – roślin dnia krótkiego [Waseem i in. 2009]. Do wytworzenia pąków kwiatostanowych wymaga udziału fitohormonów (giberelin oraz antezyny, będących składowymi florigenu), których odpowiednio wysoki poziom regulowany jest przez fotoperiod. Chryzantema wchodzi w fazę generatywną przy dniu krótszym od krytycznej długości – około 10 h (może się jednak zdarzyć, że owa krytyczna długość jest większa niż dla roślin dnia długiego). Wielobarwne kwiatostany koszyczkowate (na które składają się centralnie ułożone, starsze ewolucyjnie, obupłciowe kwiaty promieniste/rurkowe, otoczone żeńskimi kwiatami

grzbiecistymi/języczkowatymi) umieszczone są na talerzykowatym rozszerzeniu osi łodygi, zwanym osadnikiem, spełniając funkcję atraktantów dla zapylaczy – owadów i ptaków [Anderson 1988]. Chryzantemy pod względem kształtu tworzą 13 rodzajów kwiatostanów [Jerzy 2000]. Najstarsze kwiaty zlokalizowane są na obwodzie kwiatostanu [Chen i in. 2009]. W warunkach naturalnych, w ciągu jednego okresu wegetacji (którego długość zależy głównie od temperatury powietrza) chryzantema wielkokwiatowa tworzy trzy rodzaje pąków kwiatostanowych: pierwszy pąk koronowy (letni), drugi pąk koronowy (późnego lata) oraz rozwijający się najszybciej – pąk szczytowy (jesienny). Kwiatostany z nich uzyskane różnią się rozmiarem oraz intensywnością barwy [Jerzy 2000, Zalewska i in. 2002]. Najładniejsze (i typowe dla odmiany), a przy tym najbardziej pożądane są te rozwijające się z pąka szczytowego, dlatego w praktyce ogrodniczej stosuje się określony fotoperiod (10 h dnia w przedłużeniu dnia lub przerwie nocy), co pozwala uzyskać kwitnące rośliny w okresie 6–8 tygodni (wczesne), 9–11 tygodni (średnio wczesne) czy do 15 tygodni (późne) [Jerzy 2000]. Ze względów ekonomicznych producenci wybierają te o najkrótszym cyklu i zbierają nawet cztery plony kwiatów w roku z danej powierzchni. Ponadto w przypadku odmian doniczkowych w celu uzyskania kompaktowego, wyrównanego pokroju rośliny traktuje się retardantami wzrostu (np. fluroprimidolem) [Pobudkiewicz 2014].

Chryzantema wielkokwiatowa, jak wykazały badania przeprowadzone w Chinach w połowie lat 80. ubiegłego stulecia, jest hybrydą powstałą najprawdopodobniej wskutek przekrzyżowania *Chrysanthemum indicum* z *C. vestitum* [Zhao i in. 2009] – biało i żółto kwitnących gatunków spotykanych do dzisiaj na obszarze Chin i Japonii [Dowrick 1953]. Przedstawiciele rodzaju *Chrysanthemum* stanowią doskonały materiał do badań genetycznych, co związane jest z ich wysokim poziomem ploidalności sięgającym od $2x$ do $22x$, $x = 9$. Większość uprawianych odmian jest heksaploidami, zawierającymi 47–63 chromosomy (zwykle $2n = 6x = 54$). Pojawiająca się aneuploidia spowodowana jest niewłaściwą segregacją chromosomów w trakcie podziałów mejotycznych [Chen i in. 2009]. Chromosomy mogą różnić się wielkością (a tym samym zawartością DNA) nawet u gatunków o takiej samej ich liczbie. Liczba chromosomów jest pozytywnie skorelowana ze średnicą kwiatostanów [Dowrick 1953].

HODOWLA MUTACYJNA

Rynek ogrodniczy nieustannie domaga się nowych odmian chryzantemy. Jednakże jej wysoki poziom alloploidalności, heterozygotyczności i samoniezgodności sporofitycznej, a także ograniczona pula genowa oraz poligeniczna kontrola wzrostu i kwitnienia roślin zawężają możliwość stosowania tradycyjnych metod hodowli (krzyżowanie i selekcja), chociaż sporadycznie pojawiają się i takie doniesienia [Miler 2013]. Niektóre odmiany w ogóle nie tworzą żywotnego pyłku lub nie zawiązują owoców (niełupek). Ze względu na trudności w pozyskiwaniu (małych) nasion o niewielkiej zawartości substancji zapasowych, chryzantema wielkokwiatowa produkowana jest na drodze wegetatywnej (klonalnej) przez sadzonki pędowe [Zalewska i in. 2010], a w ostatnich latach także przez bardziej wydajne sadzonki liściowe [Singh i Chettri 2013] (w warunkach *in vitro* pozyskiwane są również pramateczniki). Gatunek ten przejawia przy tym naturalne tendencje

do tworzenia sportów – spontanicznych mutantów. Szacuje się, że aż $\frac{1}{3}$ komercyjnych odmian powstała na drodze spontanicznych mutacji [Dowrick i El-Bayoumi 1966]. Niektóre odmiany są szczególnie podatne na ciągle występowanie tego zjawiska, inne mogą być stabilne przez całe lata. Pierwsze sporty opisano już w 1832 roku [Dowrick 1953]. Wiele spontanicznych mutantów roślin ozdobnych (w tym chryzantemy) powstaje na skutek utraty lub nabycia dodatkowych chromosomów w efekcie nieregularnych mitoz obserwowanych przykładowo w korzeniach [Stewart i Dermen 1970]. Do najczęściej występujących zaburzeń można zaliczyć nondysjunkcję oraz zlepianie się końców chromosomów w trakcie anafazy. Może to prowadzić do zmiany ich liczby lub fragmentacji. Skutkuje to rozwojem chimery, której charakter zależeć będzie od lokalizacji zaburzeń [Dowrick i El-Bayoumi 1966]. Spontaniczne mutacje pozwoliły na uzyskanie wielu odmian różniących się wielkością, barwą i pokrojem kwiatostanów [Stewart i Dermen 1970] oraz stworzyły podwaliny dla nowoczesnych metod hodowli chryzantemy.

Zmienność mutacyjna jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za ewolucję, a przy tym umożliwia badanie mechanizmów genetycznych warunkujących powstanie danej właściwości (fenotypu) organizmu. Mutacja dotyczy zwykle jednej komórki, która dalej rywalizuje z „normalnymi”, tworząc najpierw grupę komórek, sektor, a następnie pąk i pełną roślinę [Broertjes 1966]. Wiele mutacji jest jednak eliminowanych podczas wzrostu i rozwoju przez mechanizm dryfu genetycznego oraz selekcję diplo- i haplontyczną.

Hodowla mutacyjna (polegająca na wywoływaniu mutacji będącej niekontrolowaną zmianą w materiale genetycznym roślin pod wpływem działania mutagenu) jest obecnie jedną z najczęściej wykorzystywanych metod pozyskiwania nowych genotypów. Zwykle wykorzystuje się mutageny fizyczne, na przykład promieniowania jonizującego X lub gamma w dawce 10–30 Gy przez około 15 min lub rzadziej promieniowanie elektromagnetyczne. Mutageny chemiczne, takie jak barwniki: oranż akrydynowy, zieleń malachitowa czy analogi zasad (bromouracyl, tiobromouracyl) lub związki interkalujące (bromek etydyny), są znacznie rzadziej wykorzystywane ze względu na ograniczoną penetrację tkanek. Dawniej działaniu mutagenu poddawano sadzonki pędowe, a następnie liściowe [Broertjes 1966]. Obecnie w tym celu wykorzystuje się mikrosadzonki lub ich części pochodzące z kultur *in vitro*. Indukowane mutanty stanowią ponad 50% wszystkich komercyjnych odmian [Zalewska i in. 2010]. Do 2008 roku zarejestrowano 267 odmian mutantów chryzantem, co stanowi aż 43% wszystkich odmian roślin ozdobnych uzyskanych na tej drodze [Lee i in. 2008]. Metoda ta pozwala w ciągu roku uzyskać całą grupę różnobarwnych odmian, co w warunkach naturalnych trwałoby nawet 20–30 lat. W wyniku działania mutagenu najczęściej uzyskuje się rośliny o zmienionej barwie kwiatostanu. Ze względu na wspomniany wcześniej wysoki poziom heterozygotyczności chryzantem, niemal wszystkie mutacje dotyczą zmiany genu dominującego na recesywny [Broertjes 1966]. Poza zmianą fenotypu roślin, mutacja może prowadzić także do nabycia nowych właściwości. Przykładowo Broertjes i inni [1983] uzyskali na tej drodze odmiany chryzantemy odporne na chłód, a nawet rosnące i kwitnące szybciej w obniżonej temperaturze (tzw. T-mutanty). Niestety zdarza się też, iż zmiana morfologii kwiatu towarzyszy obniżeniu potencjału wzrostowego i regeneracyjnego [Lamseejan i in. 2000]. Nie bez znaczenia na pojawianie się i zakres mutacji pozostaje wybór tkanek roślinnych poddawanych działaniu mutagenu. Napromienianie fragmentów niemerystatycznych daje

większe szanse na uzyskanie stabilnych, jednorodnie zmienionych mutantów. Podczas działania mutagenu na tkanki merystematyczne dochodzi najczęściej do powstawania chimer – organizmów składających się z różnych genetycznie komponentów [Tymoszuk 2015]. Wynika to z faktu, że mutacja ogranicza się zwykle do warstwy histogenowej (inicyjalnej), w której wystąpiła [Broertjes 1966]. W Polsce szczególne zasługi dla rozwoju hodowli mutacyjnej oraz uprawy chryzantemy ma prof. Marek Jerzy oraz jego współpracownicy z Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych w Bydgoszczy [Jerzy i in. 1991, Miler 2005].

CHIMERYZM CHRYZANTEM – STRUKTURA I POCHODZENIE CHIMER

Chimery są organizmami składającymi się z dwóch lub więcej genotypów, stąd nazywane są też mozaikami genetycznymi. Etymologia słowa nawiązuje do mitologii greckiej [Szymkowiak i Sussex 1996]. Organizmy takie występują zarówno u zwierząt, jak i roślin. Chimeralne rośliny biorą swój początek z niejednorodnych genetycznie merystemów wierzchołkowych. Mogą zatem powstawać w wyniku szczepienia (takie pochodzenie miały pierwsze opisywane mozaiki), spontanicznie przez działanie promieniowania ziemskiego/kosmicznego lub w efekcie stosowania w szklarniach lamp rtęciowych (skutkującymi endoreduplikacjami, endomitozami, fuzjami komórek lub zahamowania cytokinezy, które mogą prowadzić do utraty bądź nabycia dodatkowego chromosomu, zmiany jego wielkości lub fragmentacji), a także po indukcji czynnikiem chemicznym lub fizycznym, a nawet na skutek zmian epigenetycznych [Stewart i in. 1972, Marcotrigiano 1997]. Chimeryzm może objawić się zatem na każdym etapie ontogenezy osobnika [Szymkowiak i Sussex 1996]. Związane jest to ze strukturą anatomiczną merystemów roślin wyższych.

Aktywność merystemu apikalnego pędu determinuje rozwój roślin. Zakłada się on już w trakcie embriogenezy i to z niego rozwijają się następnie pozostałe organy. W merystemach wierzchołkowych i kątowych roślin okrytonasiennych występują trzy warstwy tkankowe (histogenowe/apikalne), ułożone kolejno po sobie: pierwsza warstwa tuniki – L1, druga warstwa tuniki – L2, oraz korpus – L3 [Marcotrigiano 1997]. Układ warstw histogenowych wynika z określonych płaszczyzn podziałów komórkowych zachodzących w merystemie. Badania nad chimerami pozwoliły na określenie funkcji poszczególnych warstw w trakcie rozwoju organów roślin. Komórki tuniki przechodzą podziały antyklinalne, dzięki czemu są wyraźnie oddzielone i nie przenikają się wzajemnie. Warstwa L1 tworzy epidermę (z chloroplastami występującymi jedynie w aparatach szparkowych), zaś L2 – mezodermę (mezofil/warstwę subepidermalną). W warstwie L3 natomiast komórki dzielą się zarówno antyklinalnie, jak i peryklinalnie, dając początek tkankom centralnym i przewodzącym roślin [Marcotrigiano 1997]. W rozwój łodygi, liści i pąków zaangażowane są wszystkie trzy warstwy histogenowe. Kwiatostany chryzantem pochodzą jedynie z dwóch zewnętrznych warstw: L1 i L2, przy czym warstwa L1 odpowiada za fioletową barwę kwiatów (lub jej pochodne – synteza flawonoidów i karotenoidów), a L2 za pomarańczową barwę (wyłącznie synteza karotenoidów), a także ich wigor, kształt i rozmiar. Gamety powstają natomiast (w 95%) z warstwy L2 [Stewart i Dermen 1970, Wolff i in. 1995]. Korzenie przybyszowe regenerują natomiast wyłącznie z warstwy L3 [Marcotri-

giano 1997]. Mutacje w obrębie komórek inicjalnych poszczególnych warstw prowadzą do powstania chimer. Rozmiar zmienionego obszaru może być bardzo zróżnicowany, objawiając się w postaci smugi na „płatkach” lub obejmując cały kwiatostan [Mandal i in. 2000]. Jeżeli mutacja obejmuje wszystkie warstwy danego sektora merystemu, tworzy się chimera sektorialna, jeżeli fragment jednej warstwy – meryklinalna [Marcotrigiano 1997]. W trakcie hodowli mutacyjnej, w wyniku napromienienia merystemu, często dochodzi też do powstania chimer peryklinalnych ze zmienionym (w stosunku do formy wyjściowej) genotypem jednej z warstw, która rozwija się z pojedynczej, zmutowanej komórki [Marcotrigiano 1997]. Rodzaj powstającej chimery zależy od czynnika sprawczego oraz położenia zmienionej komórki [Szymkowiak i Sussex 1996]. W roślinie posiadającej trzy warstwy apikalne dwa genotypy mogą występować w 8 (2^3) aranżacjach. W przypadku mutantów barwy kwiatów będących chimerami peryklinalnymi tylko genotyp warstwy L1 różni się genetycznie od warstw głębiej położonych, w których mutacja nie pojawia się. Niejednorodność ta nie może być więc stwierdzona wizualnie [Stewart i Dermen 1970]. Stan chimery peryklinalnej danego pędu jest natomiast przekazywany pędem bocznym, dzięki czemu istnienie owej chimery jest nieograniczone. Stabilność takiego organizmu zależy od zachowania dotychczasowego wzoru podziałów komórkowych [Szymkowiak i Sussex 1996]. W przypadku chryzantemy chimeryzm rzutuje zwykle na fenotyp kwiatostanów. Rzadziej spotyka się chimery, u których jeden komponent nie tworzy chloroplastów w liściach. Mogą one występować w dwóch postaciach. Formy o liściach białobrzegich to chimery peryklinalne z chlorotyczną drugą warstwą tuniki. Formy z białymi sektorami są na ogół chimerami peryklinalnymi z chlorotyczną powierzchniową warstwą tuniki [Hejnowicz 2002].

Strukturę genetyczną roślin można zweryfikować, porównując barwę kwiatów rośliny macierzystej z kwiatami roślin uzyskanych z jej korzeni (albowiem zbudowane są one tylko z jednej warstwy – L3) lub przeprowadzając separację komponentów chimer z wykorzystaniem pędów/zarodków przybyszowych, które mogą regenerować z pojedynczej komórki, a więc z jednej warstwy, chociaż znane są przypadki, kiedy merystemoidy tworzyły się z większej liczby warstw, nie gwarantując stabilności [Stewart i Dermen 1970, Zalewska i in. 2007].

W badaniach szczególnie cenne są chimery, których jeden komponent jest diploidalny, a drugi poliploidalny (cytochimery). Taka różnica znajduje wyraz w wielkości komórek i jest łatwa do zidentyfikowania zarówno w merystemie wierzchołkowym, jak i w dojrzałych organach. Chimery mają duże znaczenie w produkcji ogrodniczej, będąc cennym źródłem nowych fenotypów, możliwych do odzyskania na drodze organogenezy przybyszowej, bez zmian wymagań uprawowych czy innych ważnych pod względem ogrodniczym cech. W tym celu wykorzystane zostały już na początku XIX wieku [Stewart i in. 1972]. Ponadto mają zastosowanie w badaniu interakcji między komórkami w trakcie rozwoju rośliny [Szymkowiak i Sussex 1996]. Są jednak problematyczne w rozmnażaniu i przechowywaniu. Rearanżacja warstw (na przykład skutek uszkodzenia tkanek warstwy L1 w trakcie niewłaściwego przechowywania i zastąpienia ich tkankami L2) skutkuje bowiem kolejną zmianą barwy i/lub pokroju kwiatów lub rzadziej liści [Marcotrigiano 1997].

Aby zachować stabilność, chimery namnaża się technikami wykorzystującymi eksplantaty merystematyczne, na przykład metodą jednowęzłowych fragmentów pędu.

Nowe pędy rosną wówczas bezpośrednio z pąków bocznych zlokalizowanych w kątach liści, co pozwala na wierne powtórzenie cech chimery peryklinalnej [Zalewska i in. 2012]. Mikrorozmnażanie drogą pąków przybyszowych oraz embriogenezy somatycznej nie gwarantuje stabilności, jeśli regeneracja ma charakter pośredni (przez kalus) lub jeżeli struktury te mają wielokomórkowe i wielowarstwowe pochodzenie. Chryzantemy są jednak ciekawym przykładem roślin, które nawet jeśli regenerują z kalusa (którego polimorfizm został potwierdzony badaniami genetycznymi), zdolne są do formowania pędów jednorodnych genetycznie, co wskazuje na pewien rodzaj selekcji zachodzącej w trakcie organogenezy [Miñano i in. 2014].

DETERMINACJA BARWY KWIATOSTANÓW CHRYZANTEM

Za barwę kwiatów odpowiadają trzy główne grupy barwników: betalainy (popularne u kaktusów), karotenoidy i antocyjany. Betalainy i antocyjany bardzo rzadko występują równocześnie. Antocyjany i karotenoidy mogą zaś pojawiać się razem [Grotewold 2006]. U większości chryzantem barwniki zlokalizowane są w kwiatach języczkowatych. Wyjątek stanowi anemonowy typu kwiatostanu, w przypadku którego obecne są one zarówno w kwiatach języczkowatych, jak i rurkowych. W konsekwencji odmiany takie cieszą się największym zainteresowaniem [Chen i in. 2009]. Barwniki zlokalizowane są głównie w komórkach górnej i dolnej epidermy kwiatów [Dowrick i El Bayoumi 1966]. Przy czym antocyjany występują w wakuolach warstwy L1, a żółte chromoplasty rozproszone są w cytoplazmie zarówno warstwy L1, jak i L2 [Stewart i Dermen 1970].

Wśród chryzantem wyróżnia się cztery podstawowe grupy kolorystyczne kwiatów: białe zawierające flawonole (apigeninę, akacetynę, kwercyтынę oraz luteolinę); żółte z karotenoidami (luteiną, ksantofilem, taraksantyną i flawoksantyną); różowe/fioletowe posiadające antocyjany (cyjanidynę i jej pochodne: malwidynę oraz ensatynę) i flawonole oraz brązowe (pomarańczowe do czerwonych) zawierające zarówno flawonoidy, jak i karotenoidy [Anderson i in. 1988]. Obecność barwników w kwiatach i ich rozwój warunkowane są genetycznie. Jeden gen odpowiada za syntezę pojedynczego barwnika [De Jong i Custers 1986]. Przykładowo za syntezę antocyjanów odpowiadają geny: CHS, CHI, F3H, F3'H, F3'5'H, DFR oraz LDOX [Lee i in. 2008]. Produkt genu CmCCD4a, CCD (ang. *carotenoid cleavage dioxygenase*) odpowiada natomiast za degradację karotenoidów, a tym samym biały kolor kwiatów. Ponadto poza genami strukturalnymi w determinacji barwy kwiatów biorą udział geny regulatorowe oraz transpozony (na przykład MELs – ang. *mobile element-like sequences*, DRs – ang. *direct repeats*) [Lee i in. 2008]. Zaburzenia podziałów komórkowych (nondysjunkcja chromatyd) lub pojawienie się mutacji w obrębie określonych odcinków DNA może jednak doprowadzić do zmiany ekspresji genów i syntezy barwników/enzymów, a w konsekwencji zmiany barwy kwiatów [Anderson i in. 1988]. Należy przy tym podkreślić, że niektóre z tych genów występują w większej liczbie kopii, co także przekłada się na ostateczny efekt mutacji [Lee i in. 2008]. Ponadto uzależniony jest on także od chwili, w której mutacja nastąpi. Zahamowanie syntezy antocyjanów we wczesnym etapie produkcji skutkuje uzyskaniem białych kwiatów. Jeśli jednak do inhibicji dochodzi

w późniejszym etapie, efekt może być różny w zależności od tego, jaki barwnik i ile barwnika zostało wcześniej zakumulowane. Warunki środowiskowe mogą także powodować zmiany zabarwienia organów. Przykładowo chłód stymuluje akumulację antocyjanów w liściach i kwiatach [Lee i in. 2008]. Podobny efekt wywołuje światło. Duże znaczenie ma także pH soku komórkowego, zwłaszcza w przypadku chlorofilu w liściach [Zalewska i in. 2002].

Najczęściej spotykaną zmianą u chryzantemy jest nabycie żółtych chromoplastów. Zmiana ta może pojawić się na każdym etapie rozwoju rośliny wskutek zaburzenia mitoz i związana jest z utratą chromosomu niosącego dominujący gen supresorowy żółtego barwnika [Stewart i Dermen 1970]. Bezpośrednia zmiana koloru kwiatów z różowego na żółty jest jednak bardzo rzadka, gdyż wymaga zarówno supresji syntezy antocyjaniny na drodze mutacji, jak i uaktywnienia genów odpowiedzialnych za żółtą barwę na drodze utraty chromosomu [Stewart i Dermen 1970]. Zmiana fenotypu staje się źródłem poważnych strat finansowych przedsiębiorstw branżowych, dlatego też jest niedopuszczalna w komercyjnej produkcji ogrodniczej. Poszukuje się więc wydajnych metod przechowywania i ochrony zasobów genowych chryzantemy.

ROLA KULTURY *IN VITRO* W NAMNAŻANIU I POPULARYZACJI CHRYZANTEMY

Aby zaspokoić rosnące wymogi rynku, konieczne jest wprowadzenie innowacyjnych rozwiązań pozyskiwania nowych odmian popularnych gatunków roślin ozdobnych [Zhao i in. 2009]. Z tych względów obecnie w produkcji ogrodniczej coraz większą rolę odgrywają nowoczesne metody bazujące na kulturach tkankowych.

Minęło 115 lat od czasu publikacji pierwszej koncepcji roślinnych kultur *in vitro* autorstwa Gottlieba Haberlandta. W tym czasie nastąpił ogromny postęp w biotechnologii roślin [Read i Preece 2007]. Od 40 lat (w Polsce od 30) produkcja gatunków roślin ozdobnych jest systematycznie przenoszona do laboratoriów i kultur w szkle. Kultury tkankowe bazujące na zjawisku totipotencji – unikatowej zdolności roślin do odtwarzania całego organizmu z pojedynczej komórki lub grupy komórek, bez fuzji gamet – stanowią podstawowe narzędzie w pracy biotechnologów. W technologii tej niewielkie fragmenty roślin, zwane eksplantatami, „uprawiane są” na syntetycznych pożywkach w sterylnych, ściśle kontrolowanych warunkach fizycznych. Najbardziej znaczącym zastosowaniem kultur tkankowych jest mikorozmnażanie (metoda wegetatywnego rozmnażania roślin w warunkach *in vitro*). Technologię tę opracowano w USA oraz Europie Zachodniej [Wróblewska i Rudzki 2012].

Światowa roczna produkcja roślin z wykorzystaniem kultur *in vitro* tylko w ciągu ostatnich 10 lat wrosła z 800 milionów do 2 miliardów, z czego 80% to gatunki ozdobne [Rout i in. 2006, Wróblewska i Rudzki 2012]. W przypadku chryzantem kultury *in vitro* wykorzystywane są też m.in. do uwalniania roślin od wirusów [Previati i in. 2008], produkcji sztucznych nasion [Pinker i Abdel-Rahman 2005], haploidów zarówno na drodze andro-, jak i gynogenezy [Watanabe 1977, Gao i in. 2011], indukowania zmienności [Miller i Zalewska 2014], pozyskiwania metabolitów wtórnych [Teixeira da Silva i in. 2013], separacji chimer i ratowania hybryd [Tymoszuik i Zalewska 2014], w poszukiwaniu

genetycznego pokrewieństwa wśród uzyskiwanych mutantów i elitarnych odmian [Mukherjee i in. 2013] oraz w badaniach podstawowych z wykorzystaniem transformacji genetycznej [Lee i in. 2013], a także krioprezerwacji [Kulus 2015].

Warunki kultury *in vitro* chryzantemy są dobrze poznane [Waseem i in. 2013]. Pierwsze prace z tego zakresu pochodzą z drugiej połowy ubiegłego wieku [Hill 1968]. W 1952 roku Morel i Martín wykorzystali kulturę merystemów do uzyskania wolnych od wirusów roślin. W 1974 roku Earle i Langhans uzyskali mikrosadzonki chryzantemy, wykorzystując 0,5 mm długości pąki wierzchołkowe. Pozwala to przypuszczać, że eksplantaty takie mogą być z powodzeniem wykorzystywane w krioprezerwacji. Kolejne prace dotyczyły wpływu różnych regulatorów wzrostu na zdolność regeneracyjną stożków wzrostu. Pierik [1987] wykazał, że w przypadku chryzantemy najważniejsza jest w pożywce obecność cytokinin. Należy jednak mieć na uwadze, iż w przypadku niestabilnych odmian będących chimerami obecność niektórych cytokinin może zaburzać ich strukturę histogenową. Z tego powodu wskazane jest stosowanie kinetyny (KIN) lub tidiazuronu (TDZ) zamiast popularnej benzyloadeniny (BA).

Kolejne dekady przyniosły ogromny postęp w dziedzinie mikrorozmnażania chryzantemy. W 1996 roku Grewal i inni opracowali wydajną metodę szybkiego namnażania wolnych od chorób chryzantem. Obecnie coraz częściej są one produkowane z wykorzystaniem technologii kultur tkankowych, dzięki czemu uzyskane w ten sposób rośliny cechują się lepszą jakością oraz szybszym rozwojem [Ilahi i in. 2007]. Wielu autorów dowiodło dużej efektywności namnażania chryzantem (różnych gatunków i odmian) w kulturach *in vitro*, uzyskując regenerację roślin z fragmentów pędów (węzłów i międzywęzli), pąków bocznych i wierzchołkowych, merystemów apikalnych, korzeni, liści, płatków, zalążni czy nawet protoplastów na pożywkach o różnorodnym składzie [Waseem i in. 2011, 2013, Teixeira da Silva 2014]. Mikrorozmnażanie odgrywa ważną rolę w produkcji chryzantemy wielkokwiatowej. Wiele komercyjnych laboratoriów wprowadziło ten gatunek do swojego asortymentu.

Dotychczas do mikrorozmnażania chryzantemy wielkokwiatowej wykorzystano technikę jednowęzłowych fragmentów pędów [Miler i Zalewska 2014] oraz pąków przybyszowych [Kaul 1990], a także bezpośrednią i pośrednią embriogenezę somatyczną [Ilahi i in. 2007], w zależności od dostępnego materiału roślinnego oraz pożądanego celu. W przypadku stabilnych odmian chryzantemy najczęściej wykorzystywaną metodą ich mikrorozmnażania jest jednak metoda pędów przybyszowych. Dotychczasowe badania wykazały, że eksplantaty pędowe chryzantemy cechują się większym potencjałem regeneracyjnym niż liściowe, chociaż to na tych drugich częściej uzyskuje się bardziej pożądaną regenerację bezpośrednią [Kaul i in. 1990]. W przypadku odmian z grupy Lady bardzo dobre rezultaty uzyskuje się, stosując zmodyfikowaną pożywkę MS [Murashige i Skoog 1962] uzupełnioną 2,66 μM BA i 11,42 μM IAA [Zalewska i in. 2007]. Organogeneza przybyszowa ma ogromne znaczenie dla hodowli mutacyjnej oraz transgenicznej, gdyż pędy przybyszowe często regenerują z pojedynczej komórki. Nie ma więc wówczas ryzyka tworzenia się chimer [Zalewska 2010]. Ponadto zjawisko to może być wykorzystane w separacji chimer. Często zdarza się bowiem, że w efekcie hodowli mutacyjnej tworzą się chimery meryklinalne lub sektorialne, w których tylko pewien obszar merystemu ulega mutacji. Dzięki regeneracji roślin z tego niewielkiego fragmentu możliwe jest uratowanie cennego genotypu, którego nie można odseparować

w warunkach *in vivo*. Organogeneza może przebiegać przez kalus, więc może towarzyszyć jej wystąpienie zmienności somaklonalnej. Wynika to z faktu, że kalus jest niestabilną genetycznie tkanką, co powodują pojawiające się często aberracje chromosomów: ich zlepiania, pęknięcia, delacji, translokacji itp. W rezultacie możliwe jest uzyskanie wielu nowych odmian [Zalewska i in. 2007].

Obecnie uważa się, że najbardziej wydajną techniką mikrorozmnażania roślin jest embriogeneza somatyczna, zwłaszcza z wykorzystaniem bioreaktorów. Jak dowodzą Kereša i inni [2012], eksplantatem najbardziej podatnym na indukcję embriogenezy u chryzantemy są kolejno liście, płatki kwiatów, najmniej zaś fragmenty pędów (międzywęzła). Największy współczynnik konwersji zarodków w rośliny uzyskano jednakże z zarodków zregenerowanych z płatków (52%). Aby uaktywnić kompetencję komórek, eksplantaty należy wyłożyć na pożywkę uzupełnioną wysokim stężeniem auksyn i niższym cytokinin [Lema-Rumińska i in. 2015]. Jak donoszą Tanaka i inni [2000], najlepiej sprawdza się wysokie stężenie IAA (5,7 μM) z dodatkiem kinetyny (0,5 μM). Z kolei Kereša i inni [2012] najwięcej zarodków somatycznych uzyskali na drodze bezpośredniej, stosując pożywkę MS z 5,4 μM kwasu naftylooctowego (NAA) oraz 0,4 μM BA. Efektywność konwersji zarodków somatycznych chryzantem jest jednak ograniczona, co limituje wykorzystanie tej techniki mikrorozmnażania.

Badania przeprowadzone przez Kaul i innych [1990] oraz Barakata i innych [2010] dowiodły, iż wydajność kultur *in vitro* chryzantem jest silnie uzależniona od odmiany. Istotnym problemem pozostaje także kwestia sposobu przechowywania ogromnej liczby tworzonych genotypów, które z czasem przestają być obiektem bezpośredniego zainteresowania. Pinker i Abdel-Rahman [2005] opracowali metodę produkcji sztucznych nasion chryzantemy, która wykorzystuje proces zamykania pąków wierzchołkowych w alginianowej otoczce w celu ich krótkotrwałego przechowywania podczas transportu, które następnie można łatwo odtworzyć *in vitro* lub *ex vitro*. Metoda ta pozwala jednak na maksymalnie kilkumiesięczne zabezpieczenie materiału roślinnego. Także zastosowanie spowolnionego wzrostu w warunkach kultur *in vitro* wiąże się z ryzykiem wystąpienia zmienności somaklonalnej. Jevremović i inni [2006] po 10 latach prowadzenia kultury chryzantemy 'White Spider' uzyskali 10% roślin o zmienionym kolorze oraz morfologii kwiatostanów. Sutter i Langhans [1981] zaobserwowali liczne zmiany fenotypu chryzantem przechowywanych przez 9 lat *in vitro*. Cechowały się one mniejszymi, nieregularnymi kwiatostanami, a także opóźnionym kwitnieniem. Z tych powodów kwestia opracowania skutecznych metod długotrwałego przechowywania zasobów genowych chryzantem pozostaje otwarta, niewątpliwie jednak kultury tkankowe będą stanowiły integralny element systemów ochrony zasobów genowych.

PODSUMOWANIE

Chryzantema dzięki dużej trwałości i różnorodności kwiatostanów jest uprawiana i hodowana na całym świecie zarówno na kwiat cięty, jak i doniczkowy. W efekcie niesłabnącej popularności każdego roku powstają setki nowych odmian, głównie na drodze hodowli mutacyjnej (z wykorzystaniem promieniowania X lub gamma), które namnażane są m.in. z wykorzystaniem kultur *in vitro*. Chryzantemy są pod tym

względem jednak szczególnie „trudnym” materiałem. Wiele z nich to bowiem chime-ry o niejednorodnej strukturze genetycznej. Organizmy takie są szczególnie narażone na wystąpienie zmienności, jeśli rozmnażane lub przechowywane są w niewłaściwy sposób. Z tych względów w przypadku roślin chimeralnych najczęściej w reprodukcji *in vitro* wykorzystuje się technikę jednowęzłowych fragmentów pędu. Inne metody mikrorozmnażania mogą doprowadzić do separacji komponentów chimery, jeśli regeneracja zachodzi pośrednio – przez kalus. Metody te jednak mogą być bardzo cenne w hodowli na etapie regeneracji.

Podziękowania

Autor pragnie podziękować Pani dr hab. inż. Annie Mikule, prof. PAN za cenne wskazówki w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.

LITERATURA

- Anderson N.O., Ascher P.D., Widmer R.E., 1988. Thin-layer chromatographic analysis of flower color phenotypes in *Dendranthema grandiflorum* Ramatuelle inbreds and clonal cultivars. *Euphytica* 37, 229–239.
- Barakat M.N., Abdel Fattah R.S., Badr M., El-Torky M.G., 2010. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. *Afr. J. Biotech.* 9(8), 1151–1158.
- Broertjes C., 1966. Mutation breeding of chrysanthemums. *Euphytica* 15, 156–162.
- Broertjes C., Koene P., Pronk T.H., 1983. Radiation-induced low-temperature tolerant cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica* 32, 97–101.
- Chen F-D., Li F-T., Chen S-M., Guan Z-Y., Fang W-M., 2009. Meiosis and pollen germability in small-flowered anemone type chrysanthemum cultivars. *Plant Syst. Evol.* 280, 143–151.
- De Jong J., 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.
- Dowrick G.J., 1953. The chromosomes of chrysanthemum II. *Heredity* 7, 59–72.
- Dowrick G.J., El-Bayoumi A., 1966. The induction of mutations in chrysanthemum using X and gamma radiation. *Euphytica* 15, 204–210.
- Earle E.D., Langhans R.W., 1974. Propagation of chrysanthemum *in vitro* I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 99, 128–131.
- Gao Y., Chen B., Zhang J., 2011. Anther culture of garden chrysanthemum. *Acta Hortic.* 923, 103–110.
- Grewal H.S., Gosal S.S., Arora J.S., Singh K., 1996. Propagation of ornamental plants through tissue culture. W: A.S. Islam (red.), *Plant Tissue Culture*. Oxford & IBH Publishing, New Delhi, 37–41.
- Grotewold E., 2006. The genetics and biochemistry of floral pigments. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 761–780.
- Hejnowicz Z., 2002. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Hill G.P., 1968. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* ‘Bronze Pride’. *Physiol. Plant.* 21(2), 386–389.
- Ilahi I., Jabeen M., Sadaf N., 2007. Rapid clonal propagation of *Chrysanthemum* through embryonic callus formation. *Pak. J. Bot.* 39(6), 1945–1952.

- Jabłońska L., Perzyńska K., 2009. The level of demand for ornamental plants in Warsaw in 2007 and its determinants. Zesz. Nauk. Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa 17, 119–132.
- Jabłońska L., Sobczak W., 2011. Rynek chryzantemy w Polsce w okresie Święta Wszystkich Świętych. Roczniki N. Rol. S. G. 98(4), 66–76.
- Jerzy M., 2000. Chryzantemy. PWRiL, Warszawa.
- 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.
- Jevremović S., Trifunović M., Nikolić M., Subotić A., Radojević L., 2006. Clonal fidelity of chrysanthemum regenerated from long term cultures. Genetika 38(3), 243–249.
- Kaul V., Miller R.M., Hutchinson J.F., Richards D., 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21, 21–30.
- Kereša S., Mihovilović A., Barić M., Židovec V., Skelin M. 2012. The micropropagation of chrysanthemums via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis. Afr. J. Biotech. 11(22), 6027–6033.
- Kulus D., 2015. Application of cryopreservation for chrysanthemum genetic resources conservation. ISHS Acta Horticulturae 1087, 225–232.
- Lamseejan S., Jompuk P., Wongpiyasatid A., Deeseapan S., Kwanthammachart P., 2000. Gamma-rays induced morphological changes in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Kasetsart J. Nat. Sci. 34, 417–422.
- Lee G.-J., Chung S.-J., Park I.-S., Lee J.-S., Kim J.-B., Kim D.-S., Kang S.-Y., 2008. Variation in the phenotypic features and transcripts of color mutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) derived from gamma ray mutagenesis. J. Plant Biol. 51(6), 418–423.
- Lee S.-Y., Kim J.H., Cheon K.S., Lee E.K., Kim W.H., Kwon O.H., Lee H.J., 2013. Phenotypic and molecular characteristics of second clone (TOV2) plants of the LeLs-antisense gene-transgenic chrysanthemum line exhibiting non-branching. J. Plant Biotech. 40, 192–197.
- Lema-Rumińska J., Tymoszuik A., Miler N., Durau B., 2015. Regeneracja kalusa z eksplantatów korzeniowych u *Chrysanthemum ×grandiflorum* (Ramat.) Kitam. ZPPNR 580, 53–61.
- Mandal A.K.A., Chakrabarty D., Datta S.K., 2000. *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum. Euphytica 114, 9–12.
- Marcotrigiano M., 1997. Chimeras and variegation, patterns and deceit. Hort. Sci. 32, 773–784.
- Miler N., 2005. Dlaczego warto stosować mutagenzę indukowaną w hodowli chryzantem? Biotechnologia 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 type. Acta Sci. Pol., Hort. Cult. 13(2), 69–82.
- Miñano H.S., Ibáñez M., González-Benito M., Martín C., 2014. Sequential study of the genetic stability of callus and regenerated shoots in chrysanthemum. Prop. Orn. Plants 14, 57–67.
- Morel G., Martin S., 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 235, 1324–1325.
- Mukherjee A.K., Dey A., Acharya L., Palai S.K., Panda P.C., 2013. Studies on genetic diversity in varieties of *Chrysanthemum* using RAPD and ISSR markers. Indian J. Biotech. 12, 161–169.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473–497.

- Pierik R.L.M., 1987. *In vitro* propagation of higher plants. Martinus Nizhoof Publishers, Boston.
- Pinker I., Abdel-Rahman S.S.A., 2005. Artificial seeds for propagation of *Dendranthema ×grandiflora* (Ramat.). Prop. Orn. Plants 5(4), 186–191.
- Pobudkiewicz A., 2014. Effect of growth retardant on some morphological and physiological traits of chrysanthemum. Pol. J. Nat. Sci. 29(4), 291–306.
- Previati A., Banelli C., Da Re F., Giannini M., 2008. *In vitro* production of virus-free chrysanthemum stock plants for cut flowers. Prop. Orn. Plants 8(3), 167–169.
- Read P., Preece J., 2007. Micropropagation of ornamentals: the wave of the future? Prop. Orn. Plants 7(3), 150–159.
- Rout G.R., Mohapatra A., Jain S.M., 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnol. Adv. 24, 531–560.
- Singh P., Chettri R., 2013. A new propagation method for rapid multiplication of chrysanthemum under *in vivo* conditions. Int. J. Conserv. Sci. 4(1), 95–100.
- Solecka M., 1978. Chryzantemy. PWRiL, Warszawa.
- Stewart R.N., Dermen H., 1970. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in chrysanthemum by production of adventitious shoots. Am. J. Bot. 57(9), 1061–1071.
- Stewart R.N., Meyer F.G., Dermen H., 1972. *Camellia* + 'Daisy Eagleson' a graft chimera of *Camellia sasanqua* and *C. japonica*. Am. J. Bot. 59(5), 515–524.
- Sutter E., Langhans R.W., 1981. Abnormalities in chrysanthemum regenerated from long term cultures. Ann. Bot. 48(4), 559–568.
- Szymkowiaki E.J., Sussex I.M., 1996. What chimeras can tell us about plant development. Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 47, 351–376.
- Tanaka K., Kanno Y., Kudos S., Suzuki M., 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). Plant Cell Rep. 19, 946–953.
- Teixeira da Silva J.A., 2014. Novel factors affecting shoot culture of chrysanthemum (*Dendranthema ×grandiflora*). Botanica Lithuanica 20(1), 27–40.
- Teixeira da Silva J.A., Shinoyama H., Aida R., Matsushita Y., Raj S.K., Chen F., 2013. Chrysanthemum Biotechnology, *Quo vadis?* Critical Rev. Plant Sci. 32, 21–52.
- Trigiano R.N., Scott M.C., Caetano-Anollés G., 1998. Genetic signatures from amplification profiles characterize DNA mutation in somatic and radiation-induced sports of *Chrysanthemum*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 123(4), 642–646.
- Tymoszek A., 2015. Hodowla chryzantemy wielkokwiatowej na drodze mutagenyzy indukowanej promieniowaniem X i gamma. ZPPNR 582, 101–113.
- Tymoszek A., Zalewska M., 2014. *In vitro* adventitious shoots regeneration from ligulate florets in the aspects of application in chrysanthemum breeding. Acta Sci. Pol., Hort. Cult. 13(2), 45–58.
- Waseem K., Jilani M.S., Jaskani M.J., Khan M.S., Kiran M., Khan G., 2011. Significance of different plant growth regulators on the regeneration of chrysanthemum plantlets (*Dendranthema morifolium* L.) through shoot tip culture. Pak. J. Bot. 43(4), 1843–1848.
- Waseem K., Jilani M.S., Khan M.S., Kiran M., Khan G. 2013. Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments. Afr. J. Biotech. 10(8), 1477–1484.
- Waseem K., Khan M.Q., Jaskani J., Jilani M.S., Khan M.S., 2009. Effect of different auxins on the regeneration capability of chrysanthemum leaf discs. Int. J. Agric. Biol. 11, 468–472.
- Watanabe G., 1977. Successful ovary culture and production of F1-hybrids and androgenic haploids in Japanese *Chrysanthemum* species. J. Heredity 68(5), 317–320.

- Wolff K., Zietkiewicz E., Hofstra H., 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91(3), 439–447.
- Wróblewska W., Rudzki P., 2012. The production tendency of ornamental plants by tissue culture in Poland and the world. *Ann. Univerisitatis Mariae Curie-Skłodowska* 22(4), 18–27.
- Zalewska M., Antkowiak M., Tymoszek A., 2012. Micropropagation of *Ajania pacifica* (Nakai) Bremer et Humphries with single-node method. *Nauka Przyroda Technologie* 6, 1–6.
- 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., Lema-Rumińska J., Woźny A., 2002. Występowanie barwników w kwiatach języczkowatych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) w zależności od rodzaju pąka kwiatostanowego. *ZPPNR* 483, 291–297.
- Zalewska M., Miler N., Tymoszek A., Drzewiecka B., Winiecki J., 2010. Results of mutation breeding activity on *Chrysanthemum ×grandiflorum* /Ramat./ Kitam. in Poland. *Electron. J. Polish Agric. Univ.* 13(4) #27.
- Zhao E.H., Liu Z.H., Hu X., Yin J.L., Li W., Rao G.Y., Zhang X.H., Huang C.L., Anderson N., Zhang Q.X., Chen J.Y., 2009. Chrysanthemum genetic resources and related genera of *Chrysanthemum* collected in China. *Genet. Res. Crop Evol.* 56, 937–946.

SELECTED ASPECTS OF BIOLOGY, BREEDING AND REPRODUCTION OF CHRYSANTHEMUM

Summary. Due to a great variety of flower shapes and colours, chrysanthemum is one of the most popular ornamental plants. It is expected that in the future chrysanthemum may become the number one product on the market. However, a complicated biology of the species; high ploidy and heterozygosity, polygenic control of flowering, self-incompatibility and limited pollen viability, reduces the efficiency of traditional breeding methods (selection and crossing), popular in the 19th century when they allowed for the production of dozens of cultivars. Today, in order to meet the growing demands of the market, modern biotechnology tools are applied. Mutation breeding (with the use of physical agents: 5–30 Gy X or gamma irradiation mainly) are commonly used since the 1960s. The technique facilitates a fast and low-cost production of new cultivars; with changed flower colour, leaf shape or the entire plant architecture being altered. The most efficient cultivars used as a source of explants for mutation breeding are those of purple flowers, while the least – the yellow-blooming ones. As a result of induced or spontaneous mutations, however, genetically unstable chimeras are often regenerated, if the mutation is present only in the part of the meristem. Such organisms require particular consideration while developing protocols for their storage and propagation, since they are vulnerable for the separation of chimerical components. The recent decades have brought a significant progress in the application of tissue culture in chrysanthemum reproduction and breeding. *In vitro* cultivation of chrysanthemum was first developed in the 20th century and used for eliminating viruses and other pathogens. For this purpose meristem cultures have been still applied. The most popular application of tissue cultures, however, is micropropagation. As for chrysanthemum, various explant types were used for multiplication; roots, leaves, nodes, internodes and flowers. In general, stem explants are more efficient than leaves in terms of the multiplication rate, while flowers are more susceptible to the occurrence of somaclonal variation. Explants with meristems, usually single-node fragments, are used for vegetative multiplications of periclinal chimeras since only then can

their stability be maintained. Other techniques; adventitious organogenesis and somatic embryogenesis, are more efficient, as based on the concept of plant totipotency, however, they are more threatened with somaclonal variation occurrence and have a limited use with commercial propagation of chimeras. Still they are very useful in both mutation and transgenic breeding at the stage of regeneration. To stimulate regeneration cytokinins, usually benzyladenine, and various auxins, in lower concentrations, are applied. The aim of this paper is to present selected aspects of biology and modern methods of breeding and reproduction in chrysanthemum.

Key words: chimeras, chrysanthemum, mutation breeding, *in vitro* culture, micropropagation