

NW  
AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA  
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH  
W BYDGOSZCZY

Rozprawy  
nr 63

MAŁGORZATA ZALEWSKA

SOMATYCZNA MUTAGENEZA  
U CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ  
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)  
INDUKOWANA IN VIVO ORAZ IN VITRO  
PROMIENIOWANIEM X I GAMMA

32  
za, Małgorzata (1954  
czna mutageneza u ch

BYDGOSZCZ - 1995

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA  
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH  
W BYDGOSZCZY

**Rozprawy**  
**nr 63**

MAŁGORZATA ZALEWSKA

SOMATYCZNA MUTAGENEZA  
U CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ  
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)  
INDUKOWANA IN VIVO ORAZ IN VITRO  
PROMIENIOWANIEM X I GAMMA

Biblioteka Główna ATR w Bydgoszczy



00000008310

BYDGOSZCZ - 1995

**PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO**  
prof. dr hab. Ojcumiła Stefaniak

**OPINIODAWCY**  
prof. dr hab. Henryk Chmiel  
prof. dr hab. Kazimierz Mynett

**REDAKTOR NAUKOWY**  
prof. dr hab. Marek Jerzy

**OPRACOWANIE REDAKCYJNE I TECHNICZNE**  
mgr Halina Klupczyńska, Zbigniew Gackowski



Wydano za zgodą Rektora  
Akademii Techniczno-Rolniczej  
w Bydgoszczy

72742

ISSN 0209-0597

**WYDAWNICTWO UCZELNIANE AKADEMII TECHNICZNO-ROLNICZEJ  
W BYDGOSZCZY**

---

Wyd. I. Nakład 150 egz. Ark. aut. 4,65. Ark. druk. 5,25. Papier druk. Kymexcote 115 g/m<sup>2</sup>.  
Oddano do druku w lipcu 1995 r. Druk ukończono w lipcu 1995 r.

MEN

Zakład Poligraficzny Kubik & Krause, 85-184 Bydgoszcz, ul. Cmentarna 84, tel. 719-546

95 3. 89 / 12

## Spis treści

	str.
WSTĘP .....	5
PRZEGLĄD LITERATURY .....	6
MATERIAŁ I METODY .....	11
1. Indukowanie mutacji promieniowaniem X i gamma .....	11
1.1. Obiekt napromienienia .....	11
1.2. Napromienianie sadzonek i eksplantatów liściowych .....	11
2. Regeneracja roślin .....	12
2.1. In vivo .....	12
2.2. In vitro .....	12
3. Obserwacje anatomiczne .....	13
4. Selekcja roślin zmienionych w pokoleniu $vM_1$ i obserwacje mutantów w pokoleniach $vM_2$ i $vM_3$ .....	15
WYNIKI .....	17
1. Proces tworzenia się pędów przybyszowych in vivo .....	17
2. Proces tworzenia się pędów przybyszowych in vitro .....	25
3. Rezultaty napromieniania w ujęciu liczbowym .....	32
4. Warianty i wariacje w pokoleniu $vM_1$ .....	35
5. Mutanty i mutacje w pokoleniu $vM_2$ .....	60
6. Charakterystyka wymiernych cech mutantów w pokoleniach $vM_2$ i $vM_3$ .....	60
DYSKUSJA .....	68
WNIOSKI .....	76
LITERATURA .....	78
STRESZCZENIA .....	82



## WSTĘP

W ciągu ostatnich trzydziestu lat rozwinęła się nowa technika wegetatywnego rozmnażania roślin w kulturach *in vitro*.

Metoda ta pozwala z dużym powodzeniem wykorzystać potencjał regeneracyjny tkwiący w każdej komórce, tkance i organie roślinnym. Jednak ostateczne efekty mikrorozmnażania zależą od właściwego współdziałania wielu różnych czynników wpływających na regenerację roślin.

Mikrorozmnażanie wypiera tradycyjne metody rozmnażania roślin w warunkach *in vivo*, głównie ze względu na wiele zalet, które pociąga za sobą jego zastosowanie.

Od dłuższego już czasu na szeroką skalę wykorzystuje się mikrorozmnażanie w produkcji sadzonek chryzantem, a także w hodowli zachowawczej odmian uprawnych tego gatunku. Do inicjacji kultur stosuje się wówczas eksplantaty zawierające merystemy. Ten sposób rozmnażania ma jednak ograniczone możliwości zastosowania w hodowli radiomutacyjnej, gdyż niesie ze sobą duże ryzyko uzyskiwania zmutowanych form o charakterze chimer.

Zdecydowanie większe nadzieje wiąże się obecnie z metodą indukowania mutacji, polegającą na wykorzystaniu organów roślinnych nie zawierających merystemów, jako obiektów służących do napromieniania, np. izolowanych liści, zdolnych do regeneracji pędów przybyszowych. Tworzenie się niepożądanych w hodowli chimer sektorialnych i meryklinalnych jest wówczas żadne lub ograniczone do minimum. Zwiększa się natomiast frekwencja mutantów o jednolicie zmienionej barwie lub kształcie kwiatostanów. Dzieje się tak dlatego, ponieważ wyrastające z liści pędy przybyszowe tworzą się z jednej zmutowanej komórki ogonka liściowego. Zregenerowane z nich rośliny dają po napromienieniu początek nowym formom, które przy dalszych pracach selekcyjnych mogą stać się nowymi odmianami, zbudowanymi z tkanek genetycznie jednorodnych.

Rozmnażanie wegetatywne *in vitro* w powiązaniu z indukowaną mutagenizacją pozwala wydatnie przyspieszyć wszystkie etapy programów hodowlanych. Stanowi także jedną z ważniejszych i skuteczniejszych dróg podnoszenia atrakcyjności i poszerzania asortymentu odmian roślin ozdobnych.

Zasadniczym celem niniejszych badań było porównanie dwóch metod indukowania mutacji u chryzantemy wielkokwiatowej odmiany 'Red Nero' - *in vivo* i *in vitro*, obejmujących dwa rodzaje promieniowania - X i gamma - oraz różne dawki napromienienia 5 - 25 Gy. Badania zostały pogłębione obserwacjami mikroskopowymi procesu tworzenia się pędów przybyszowych na sadzonkach liściowych *ex vivo* i eksplantatach liściowych *ex vitro*.

## PRZEGLĄD LITERATURY

Po zastosowaniu czynników mutagennych na sadzonki pędowe główną przeszkodą ograniczającą efekt hodowlany jest tzw. selekcja wewnątrzsomaticzna, zwana także diplontową albo diplontyczną (Broertjes i in., 1968). Zjawisko to polega na eliminacji, podczas wzrostu i rozwoju roślin, komórek zmutowanych, które są z reguły osłabione, bądź uszkodzone i w związku z tym mniej zdolne do współzawodnictwa z komórkami nie zmutowanymi. Ostatecznym rezultatem selekcji diplontycznej jest mała liczba roślin zmutowanych i ograniczony zakres mutacji. Mutacja zdaniem autorów jest zdarzeniem jednokomórkowym. W momencie działania czynnika mutagennego wierzchołki wzrostu sadzonki pędowej są już zróżnicowane strukturalnie, co automatycznie rzutuje na tworzenie się chimer-organizmów zbudowanych z tkanek o różnym składzie genetycznym.

Broertjes (1966) poddawał działaniu promieni X ukorzone sadzonki pędowe chryzantem odmiany 'Hortensien Rose'. W rezultacie uzyskał wiele zmutowanych form o charakterze chimer. Jerzy i Nowaczyk (1980) badali wpływ promieniowania X w dawkach 1000 i 2000 radów<sup>1/</sup> na sadzonki pędowe chryzantem odmiany 'Bravo'. Wszystkie rośliny o odmiennie zabarwionych kwiatostanach miały charakter wyłącznie chimer.

Datta i inni (1985) a także Bancrji i Datta (1992) oraz Shukla i Datta (1993) poddając działaniu promieniowania gamma w dawkach 1500, 2000, 2500 radów ukorzone sadzonki kilku odmian chryzantem uzyskali zmiany barwy i kształtu kwiatów, które również okazały się chimerami.

Do uzyskania organizmu złożonego z tkanek genetycznie jednorodnych doprowadzić może kilkakrotne przycinanie wierzchołków napromienionych sadzonek, pobudzające rozwój dodatkowych pąków z sektorów zmutowanych. Ponowne ukorzenie pędów wyrosłych z pąków bocznych i doprowadzenie ich do kwitnienia zwiększa częstotliwość mutacji i prawdopodobieństwo ukształtowania się organizmów o jednakowym składzie genetycznym. Metodę tę z dużym sukcesem wykorzystali w swoich badaniach Broertjes (1966), Machin (1971) oraz Guzewski i Muszyński (1978).

Lepsze rezultaty daje podział sadzonek pędowych na jednowęzłowe odcinki z jednym liściem, które następnie ukorzenia się i dalej uprawia aż do kwitnienia. Pozwala to na szybsze uaktywnienie się merystemu kąowego i przyspieszony rozwój pędów bocznych (Jung-Heilliger, 1979a).

Zdaniem Broertjesa i Keena (1980) jednym ze sposobów, który ogranicza lub pozwala uniknąć tworzenia się chimer, jest ekspozycja wierzchołków pędów na napromienienie w bardzo młodym stadium rozwoju.

---

<sup>1/</sup> 100 radów = 1 Gy

Interesującym zagadnieniem w hodowli mutacyjnej chryzantem jest powtórne napromienienie ukorzenionych sadzonek pozyskanych z mutantów, dzięki czemu można uzyskać inne genotypy. Przykładem tego jest program, który w krótkim czasie umożliwił wyhodowanie serii odmian chryzantem 'Horim' i 'Miros' (Broertjes i in., 1980). Stanowiły one przez kilka lat w Holandii 30% ogólnej produkcji chryzantem. Również Datta i Banerji (1986) powtórnie napromieniowując ukorzenione sadzonki uzyskanego uprzednio mutantu 'Hiniani' otrzymali nową odmianę 'Sheela'.

Nowe możliwości udoskonalenia i radykalnego zwiększenia skuteczności metod hodowli radiacyjnej chryzantem wykazali Broertjes i inni (1976), wykorzystując po raz pierwszy sadzonki liściowe jako materiał poddany działaniu promieniowania jonizującego.

Wykorzystanie w hodowli mutacyjnej zdolności liści do restytucji nowej rośliny umożliwiło już wcześniej otrzymanie wielu oryginalnych odmian z rodzaju *Saintpaulia* (Broertjes, 1968), *Streptocarpus* (Broertjes, 1969), *Kalanchoë* (Broertjes i Leffring, 1972), *Achimenes* (Broertjes, 1972a) i *Begonia* (Doorenbos i Karper, 1975).

Zdaniem Muszyńskiego (1976b) w sadzonce liściowej rolę komórki inicjalnej podejmuje jedna z komórek epidermy, tym samym powstająca roślina, która rozwija się z jednej tylko komórki, składa się z tkanek jednorodnych genetycznie i nie może być chimerą. Unika się w ten sposób negatywnych skutków selekcji wewnątrzmatycznej i eliminacji komórek zmutowanych. Szansa, że ta właśnie komórka zmutowana będzie inicjalną jest mała, ale wobec niewielkich rozmiarów sadzonek liściowych istnieją duże możliwości zwiększenia liczebności próby podanej działaniu czynników mutagennych.

U chryzantem proces tworzenia się pędu przybyszowego z kalusa powstającego u nasady ogonka sadzonki liściowej przebiega w sposób bardziej złożony, ponieważ w jego inicjacji może brać udział więcej niż jedna komórka epidermy (Broertjes i in., 1976). Szansa uzyskania zmutowanych roślin, nie będących chimerami, jest w tej sytuacji ograniczona. Po potraktowaniu sadzonek liściowych chryzantem odmiany 'Bravo' promieniami X w dawce 500 radów autorzy ci uzyskali około 45% roślin o charakterze chimer. W świetle tego rezultatu stwierdzili, że metoda ta jest mało efektywna, a szansa uzyskania *in vivo* zmutowanych roślin, nie będących chimerami, jest niewielka. Przeczą jednak temu wyniki podobnych badań przeprowadzonych na tej samej odmianie, w których nie uzyskano chimer w ogóle (Stepczyńska i in., 1980). Po potraktowaniu nieukorzenionych sadzonek liściowych odmiany 'Bravo' promieniami X w dawce 1500 radów uzyskano 8 mutantów, z których 3 zarejestrowano w roku 1983 jako nowe, oryginalne odmiany pod nazwami 'Paloma', 'Poranek' i 'Promyk'. Zmianie uległa siła wzrostu roślin, wczesność kwitnienia oraz kształt i barwa kwiatostanów.

W kilku doświadczeniach przebadano łącznie 49 odmian chryzantem w celu określenia ich zdolności do regeneracji pędów przybyszowych *in vivo* z sadzonek liściowych (Jerzy i Stepczyńska, 1980; Zalewska, 1985; Jerzy i Zalewska, 1987).



Tylko 20 z testowanych odmian wykazało spontaniczną regenerację pędów przybyszowych z ukorzenionych sadzonek liściowych. Wynika z tego, że zdolność do restytucji z sadzonek liściowych jest w warunkach *in vivo* uwarunkowana genotypowo.

Wykorzystanie liści, jako obiektów służących do napromienienia i indukowania w ten sposób mutacji u wszystkich odmian chryzantem, stało się możliwe dopiero po wprowadzeniu techniki *in vitro*. Technika ta, zdaniem Roesta i Bokelmanna (1975), daje gwarancję uzyskiwania form złożonych z tkanek genetycznie jednorodnych. Broertjes i inni (1976) poddali działaniu promieni X w dawkach 400 - 1200 radów wegetatywne fragmenty roślin odmiany 'Bravo', takie jak pojedyncze kwiaty, odcinki osi kwiatostanowej i ogonków liściowych oraz małe listki. Najwięcej mutantów uzyskano stosując eksplantaty napromienione dawkami w zakresie 800 - 1000 radów. Poza jedną rośliną wszystkie mutanty okazały się organizmami jednorodnymi genetycznie. Okazało się później, że indukowanie mutacji *in vitro* bardzo istotnie poszerza zakres zmienności genetycznej u chryzantem. Wyrazem tego może być 21 mutacji barwy kwiatostanu, uzyskanych w wyniku działania promieniowania X i gamma w dawce 15 Gy na eksplantaty liściowe odmiany 'Richmond' (Jerzy i in., 1993). Wszystkie uzyskane zmiany powtarzały się wiernie przy wegetatywnym rozmnożeniu w trzech kolejnych pokoleniach mutacyjnych.

Odrębnym zagadnieniem pozostaje utrzymanie trwałości nowo wytworzonych odmian, wykluczające możliwość pojawienia się zmienności w potomstwie roślin rozmnożonych wegetatywnie. Ponowne użycie liści jako eksplantatów wyjściowych służących do mikrorozmnażania roślin należy wówczas wykluczyć. Gwarancję powtarzalności wszystkich cech dają jedynie eksplantaty zawierające merystemy, bądź same merystemy wyizolowane z wierzchołków pędów lub pąków bocznych. Przy rozmnażaniu wegetatywnym *in vivo* taką samą gwarancję dają sadzonki pędowe pozyskiwane z roślin matecznych chryzantem. Eksplantaty liściowe *ex vitro* nie nadają się zwłaszcza do rozmnażania mutantów będących chimerami peryklinalnymi, podobnie jak sadzonki liściowe *ex vivo*. Jeżeli bowiem w tworzeniu się pędu przybyszowego z liścia uczestniczy na początku tylko jedna komórka, to nie może ona odtworzyć charakteru chimery peryklinalnej, zbudowanej przynajmniej z dwóch genetycznie niejednorodnych warstw tkanek. To, że chimery nie są stabilne w kulturach *in vitro* stwierdzili wcześniej Bush i inni (1976). Odmiana 'Indianapolis' będąca prawdopodobnie właśnie chimera peryklinalną została przetestowana w kulturach *in vitro* przy zastosowaniu odcinków kwiatów jęczyczkowatych, epidermy oraz wierzchołków pędów. Okazało się, że znacznie więcej nietypowych morfologicznie form zaobserwowano u roślin zregenerowanych z kwiatów jęczyczkowatych, niż z wierzchołków wzrostu pędów.

Zdaniem Roesta i Bokelmanna (1975), w celu otrzymania w szybkim czasie dużej liczby pędów przybyszowych w kulturach *in vitro*, zalecana jest regeneracja z osi kwiatostanowej.

Badacze holenderscy (Broertjes i in., 1976) stwierdzili, że wyższe dawki promieniowania X ograniczają nie tylko regenerację pędów przybyszowych z liś-

ci, ale także z osi kwiatostanowej. Liczba tworzących się pędów przybyszowych maleje u odmiany 'Bravo' w miarę zwiększania dawki promieniowania do 12 Gy, począwszy od 4 Gy. Oczywiście nie bez znaczenia jest tutaj specyfika odmianowa. Badania Broertjesa i Locka (1985) wykazały, że napromienienie dawką 5 - 8 Gy eksplantatów odciętych od osi kwiatostanowej odmian 'Accent', 'Janancy', 'Parliament' i 'Regoltime' spowodowało zmniejszenie liczby tworzących się pędów przybyszowych, a u odmiany 'Clinstar' zwiększenie. Odmiana 'Super White' regeneruje pędy przybyszowe tylko po napromienieniu. Natomiast odmiany 'Refour' i 'Winter Westland' nie regenerują pędów przybyszowych ani przed, ani po napromienieniu. Według de Jonga i Custersa (1986) napromienienie fragmentów osi kwiatostanowej odmiany 'Super White' prowadzi do radykalnego obniżenia zdolności regeneracyjnej.

Zdaniem Barbier i Dulieu (1980) zmienność zwiększa także faza kalusa. Zostało to potwierdzone w badaniach de Jonga i Custersa (1986), którzy wykazali ponadto, że frekwencja mutacji jest związana z długością trwania fazy kalusa. Według Jerzego i Lubomskiego (1989) mutacje somatyczne pojawiają się najczęściej, gdy kultury kalusa utrzymywane są zbyt długo i jego dzielenie i pasażowanie przekracza 2 - 3 lata.

Malaure i inni (1991a) badając zmiany somaklonalne u 16 odmian chryzantem stwierdzili, że regeneracja roślin z eksplantatów pochodzących z pojedynczych kwiatów może być użyteczna w otrzymaniu materiału roślinnego o nowych cechach genetycznych, obejmujących m.in. barwę kwiatów.

Zdaniem wielu autorów (Bush i in., 1976; Khalid i in., 1989) rośliny zregenerowane z liści, chociaż różne, nie przedstawiają jednak tego samego zakresu zmienności w barwach i kształcie kwiatostanów, jak rośliny zregenerowane z pojedynczych kwiatów jęczyczkowatych. Zakres zmienności somaklonalnej zależy w dużym stopniu od odmiany (Malaure i in., 1991a). W przypadku ograniczonego zakresu zmian somaklonalnych efektywnym sposobem ich eliminacji może być fizyczne usuwanie niezmutowanej warstwy komórek i dalsze prowadzenie kultury tkankowej, celem zregenerowania trwałych mutantów (Malaure i in., 1991b).

Bush i inni (1976) stwierdzili, że barwa kwiatów wynika z obecności i ilości barwników w dwóch warstwach tkanek  $L_1$  i  $L_2$ , przy czym największy wpływ na barwę mają antocyjany występujące w warstwie  $L_1$  oraz karotenoidy i flawony, znajdujące się w obu warstwach  $L_1$  i  $L_2$ . Wyniki innych badań wykazały, że w rezultacie regeneracji zachodzącej z warstwy  $L_2$  tkanek kwiatów jęczyczkowatych otrzymano większą liczbę zregenerowanych roślin (Malaure i in., 1991a), niż w przypadku regeneracji z warstwy  $L_1$ .

Najnowszym trendem we współczesnej hodowli jest traktowanie czynnikami mutagennymi zawieszin komórkowych oraz transformacje genetyczne.

W przypadku rozluźnienia więzi komórkowej, jak ma to miejsce w kulturze zawieszinowej, regeneracja następuje z pojedynczych, luźno rozmieszczonych komórek, bądź małych agregatów komórkowych. Umożliwia ona uzyskanie większej liczby mutantów, niż regeneracja z większych agregatów komórkowych, a zwłaszcza

cza z tkanek i organów. W takim też przypadku selekcja wewnątrzsomaticzna nie zachodzi w ogóle lub odgrywa małą rolę (Jung-Heiliger, 1979b).

Huitema i inni (1989) zastosowali w hodowli chryzantem kultury zawieszono-  
we komórek uzyskanych z kalusa odmiany 'Parliament'. Miały one być wraz z promieniowaniem X, użytym w dawkach 15 i 20 Gy, oraz selekcją, narzędziem do uzyskania mutantów wcześniej kwitających, tolerujących względnie niską temperaturę oraz przydatnych do zimowej uprawy szklarniowej. Rezultaty okazały się na tyle obiecujące, że badania są kontynuowane.

Rademaker i de Jong (1990) stwierdzili, że otrzymywanie transgenicznych roślin chryzantem musi być poprzedzone zbadaniem wpływu genotypu, typu eksplantatu i składu pożywki na regenerację pędów przybyszowych. Wpływ tych głównych, ważnych czynników, decydujących o możliwościach regeneracyjnych roślin, przetestowano na 60 odmianach.

De Jong i inni (1990) zbadali możliwość przeniesienia informacji genetycznej zawartej w plazmidach *Agrobacterium tumefaciens* do komórek 11 odmian chryzantem i regeneracji z tych komórek przekształconych - transgenicznych roślin. Okazało się, że chryzantemy należą do roślin o stosunkowo dużej przydatności do genetycznej transformacji. Występuje u nich jednak niekorzystna zależność polegająca na tym, że odmiany podatne na transformację gorzej regenerują pędy przybyszowe i odwrotnie, te, które z trudem transformują, tworzą pędy stosunkowo łatwo. Lemieux i inni (1990) osiągnęli zamierzony cel uzyskania transgenicznych roślin chryzantem za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* po zastosowaniu regeneracji pędów przybyszowych z odcinków osi kwiatostanowej.

## MATERIAŁ I METODY

Badania zostały przeprowadzone w latach 1987 - 1992. Wykonano je w Zakładzie Roślin Ozdobnych Katedry Ogrodnictwa ATR w Bydgoszczy, w Laboratorium Kultur Tkankowych SZO "Vitroflora" w Łochowie k/Bydgoszczy oraz w Pracowni Embriologii i Nasiennictwa IHAR w Bydgoszczy.

### 1. Indukowanie mutacji promieniowaniem X i gamma

#### 1.1. Obiekt napromienienia

Do badań wybrano odmianę 'Red Nero', wyróżniającą się dużą zdolnością do regeneracji pędów przybyszowych na izolowanych liściach, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Jest to odmiana silnie rosnąca, drobnokwiatowa, o 9-tygodniowej reakcji fotoperiodycznej. Tworzy kwiatostany pólpełne, ciemnoczerwone z żółtym oczkiem kwiatów rurkowatych. Łodygi ma grube, sztywne i obficie ulistnione. Liście są długie, wąskie i elastyczne.

Obiektem napromienienia były sadzonki liściowe tej odmiany, pochodzące z roślin uprawianych *in vivo* oraz eksplantaty liściowe, pochodzące z roślin uprawianych *in vitro*. Sadzonki liściowe odrywano z roślin kwitnących jesienią, ze środkowej części łodygi, między 5 a 8 węzłem, licząc od wierzchołka pędu.

Eksplantaty liściowe pochodziły z roślin zregenerowanych uprzednio z wierzchołków wzrostu, pobranych z pędów roślin matecznych rosnących w szklarni. Wierzchołki wzrostu umieszczono na pożywce Murashigea i Skooga (1962), uzupełnionej 2 mg L<sup>-1</sup> kwasu 3-indoliloctowego (IAA) oraz 0,6 mg L<sup>-1</sup> benzyloadeniny (BA). Pożywkę zestalono 8 g L<sup>-1</sup> Bacto-agaru. Kwasowość podłoża ustalono na poziomie pH 5,6. Wyrastające pędy namnażano na pożywce o tym samym składzie, w kilku pasażach przeprowadzonych w odstępach 4 - 5 tygodniowych. Zregenerowane pędy przenoszono następnie na pożywkę ukorzeniającą o pH 5,6, zawierającą 0,02 mg L<sup>-1</sup> NAA. Po czterech tygodniach ukorzenione rośliny wytworzyły po 6 - 9 liści. Regenerację roślin *in vitro* przeprowadzono w temperaturze 24 ± 2 °C, przy 16 godzinnym dniu i natężeniu oświetlenia 3000 lx.

#### 1.2. Napromienianie sadzonek i eksplantatów liściowych

Do napromieniania przeznaczono 3300 sadzonek liściowych *ex vivo* i 4400 eksplantatów liściowych *ex vitro*. Powierzchnia blaszek liściowych *ex vitro* wynosiła 0,8 - 1,6 cm<sup>2</sup>, a długość ogonków liściowych 1 - 1,5 cm. Promieniowanie X pochodziło z aparatu THX-250 typu Medicor o parametrach 250 kV i 15 mA, filtr 1 mm Cu, a promieniowanie gamma ze źródła Co<sup>60</sup> typu Theratron 780.

Obydwa rodzaje promieniowania zastosowano w dawkach 5, 10, 15, 20 i 25 Gy. Moc każdej pochłoniętej dawki promieniowania X i gamma wynosiła odpowiednio  $0,92 \text{ Gy min}^{-1}$  i  $1,92 \text{ Gy min}^{-1}$ . Obydwa rodzaje promieniowania w każdej dawce zastosowano na 300 sadzonkach liściowych i 400 eksplantatach liściowych. Liczba sadzonek i eksplantatów liściowych nie napromienionych, stanowiących kontrolę, była identyczna. Sadzonki liściowe ex vivo ułożono tak, aby napromienieniu uległy przede wszystkim ogonki liściowe. Eksplantaty liściowe ex vitro umieszczono w sterylnych słojach, w liczbie odpowiadającej jednej kombinacji doświadczenia, i tak je napromieniono.

## 2. Regeneracja roślin

### 2.1. In vivo

Po napromienianiu sadzonki liściowe ukorzeniano w podłożu dwuwarstwowym, złożonym z ziemi kompostowej i umieszczonej na niej warstwy substratu torfowego STK-2. Ukorzenianie przebiegało w szklarni przy zastosowaniu doświetlania przedłużającego naturalny dzień do 16 godzin i natężeniu oświetlenia 5000 lx. Średnie temperatury powietrza i podłoża wynosiły odpowiednio  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $17 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ukorzenianie sadzonek liściowych trwało 2 tygodnie.

Po 3 miesiącach od umieszczenia sadzonek liściowych w podłożu i rozpoczęcia ich ukorzeniania zaczęły się pojawiać pierwsze pąki i pędy przybyszowe, które w miarę wyrastania i osiągania odpowiedniej długości odcinano na sadzonki pędowe. Sadzonki te ukorzeniano w podłożu torfowym STK-2. Ukorzenione sadzonki pędowe sadzono następnie na stołach w szklarni, w rozstawie  $10 \times 10 \text{ cm}$  w ziemię kompostową. Pobieranie sadzonek wytworzonych z pędów przybyszowych zakończono 6 lipca. Ścięto wówczas wierzchołki pędów długości 6 cm wszystkim rozkrzewionym roślinom rosnącym na stołach, przeznaczając je ponownie na sadzonki. Ukorzeniano je wszystkie w jednym terminie i posadzono na miejsce stałe w tunelu foliowym 25 lipca.

### 2.2. In vitro

Do regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych wykorzystano pożywkę o takim samym składzie, jak do inicjacji kultur z wierzchołków wzrostu.

Po upływie 6 tygodni, zregenerowane u nasady ogonków eksplantatów liściowych pędy przybyszowe przeniesiono na pożywkę ukorzeniającą z NAA w stężeniu  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  i pH 5,6. Ukorzenianie trwało 3 tygodnie. Ukorzenione mikrosadzonki przeniesiono następnie do szklarni - mnożarki i posadzono na stołach, w podłożu złożonym z substratu torfowego STK-2 i perlitu (1:1). W czasie sadzenia przycięto nad trzecim węzłem mikrosadzonki wiotkie i nadmiernie wyrośnięte.

Trzy tygodnie później - 6 lipca - przycięto wszystkie rozkrzewione rośliny raz jeszcze i ponownie ukorzeniono wierzchołki pędów długości 6 cm, wytworzone po wcześniejszym przycięciu.<sup>1/</sup> Ukorzenianie zakończono 25 lipca.

Dane liczbowe odnoszące się do regeneracji roślin *in vivo* i *in vitro*, z sadzonek i eksplantatów liściowych poddanych działaniu promieniowania X i gamma, przedstawiono w tabeli 1.

### 3. Obserwacje anatomiczne

Celem bliższego poznania zjawiska regeneracji chryzantem z sadzonek i eksplantatów liściowych, przeprowadzono obserwacje anatomiczne procesu tworzenia się pędów przybyszowych *in vivo* oraz *in vitro*. Objęto nimi izolowane liście nie napromienione zaraz po ich oderwaniu od łodyg.

Materiał do analiz stanowiły ogonki umieszczonych w podłożu sadzonek liściowych *ex vivo*, pobierane do obserwacji co tydzień, przez 21 tygodni, oraz eksplantatów liściowych *ex vitro* wyłożonych na pożywkę, pobieranych do obserwacji codziennie, przez 23 dni. W każdym terminie pobierano po 6 prób, z których każda stanowiła kilkumilimetrową część ogonka, najbliższą jego nasadzie. Fragmenty ogonków sadzonek liściowych, pobrane w dniu ich sadzonkowania przed ukorzeniem, oraz fragmenty ogonków liściowych, pobrane w dniu wyłożenia eksplantatów liściowych na pożywkę, stanowiły materiał kontrolny. Pobieranie prób zakończono, gdy pierwsze pędy przybyszowe zaczęły się pojawiać na sadzonkach i eksplantatach liściowych.

Preparaty trwale wykonano standardową metodą parafinową, stosując utrwalacz wg Guinarda w składzie: kwas octowy lodowaty, alkohol etylowy 96%, formalina i woda w stosunku 46 : 44 : 5 : 5 oraz barwienie hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina, przy wykorzystaniu metody barwienia wg Darlingtona. Grubość skrawków wynosiła 10  $\mu\text{m}$ . Preparaty analizowano za pomocą mikroskopu świetlnego Jenamed 2. Ogółem przebadano 276 ogonków liściowych.

<sup>1/</sup> Sadzonki chryzantem wyprodukowane *in vitro* i przeznaczone bezpośrednio do dalszej uprawy tworzą pędy rozetowate, niezdolne do wytworzenia kwiatów. Trzeba je najpierw przynajmniej dwa razy przyciąć i rozkrzewić, a nowo wyrosłe pędy boczne ściąć i ponownie ukorzenić. Dopiero z takich sadzonek wyrastają rośliny zdolne do kwitnienia.

Tabela I  
Table I

Regeneracja roślin in vivo i in vitro z izolowanych liści odmiany 'Red Nero' poddanych działaniu promieniowania X i gamma  
 In vivo and in vitro regeneration of plants of cultivar 'Red Nero' from isolated leaves treated with X- and gamma rays

Rodzaj promieniowania Kind of irradiation	Dawka napromienienia Irradiation dose (Gy)	Liczba liści tworzących pędy przybyszowe Number of leaves forming adventitious shoots		Liczba wytworzonych pędów przybyszowych Number of adventitious shoots formed		Liczba zregenerowanych roślin Number of regenerated plants		Liczba roślin doprowadzonych do kwitnienia Number of flowering plants	
		in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
kontrola control	0	268	112	965	668	884	656	45	45
X	5	266	60	1254	260	1254	312	1252	309
	10	252	37	1009	202	1008	304	1008	264
	15	182	45	904	212	904	328	904	269
	20	162	7	605	31	605	80	604	67
	25	52	0	205	0	205	0	205	0
gamma	5	29	66	215	371	215	868	215	793
	10	50	81	298	442	298	476	298	464
	15	56	24	312	42	312	56	312	48
	20	61	6	365	10	365	80	365	67
	25	54	0	255	0	0	0	254	0

#### 4. Selekcja roślin zmienionych w pokoleniu $vM_1$ i obserwacje mutantów w pokoleniach $vM_2$ i $vM_3$

Do dalszej uprawy roślin, począwszy od 25 lipca, przeznaczono wysoki, ogrzewany vegetacyjnie, tunel foliowy produkcji bułgarskiej. Podłoże stanowiła ziemia rodzima, wzbogacona torfem i nawozami mineralnymi. Sadzonki posadzono w rozstawie  $15 \times 15$  cm i uprawiano gałązkowo na jeden pęd wielokwiatowy w naturalnych warunkach fotoperiodycznych. Do kwitnienia doprowadzono łącznie z kontrolą 7788 roślin.

Obserwacje przeprowadzone w czasie trwania uprawy i kwitnienia roślin pierwszego vegetatywnego pokolenia mutacyjnego ( $vM_1$ ) zmierzały do wyodrębnienia tzw. wariantów, tj. roślin o zmienionych cechach morfologicznych i fenologicznych, wariacji odpowiadających cechom, które uległy zmianie oraz określeniu frekwencji wariantów i wariacji. Frekwencję wariantów i wariacji określano w stosunku do liczby roślin doprowadzonych do kwitnienia. Pojęcia - mutanty i mutacje - wprowadzono dopiero w pokoleniu  $vM_2$ , gdyż trudno orzekać o ich występowaniu bez sprawdzenia powtarzalności cech. Selekcji wariantów dokonano na podstawie oceny barwy kwiatostanów (wg. katalogu RHSCC, Londyn, 1966); kształtu, liczby, długości i szerokości kwiatów języczkowatych; liczby i średnicy kwiatostanów na pędzie; długości pędów i zmian w budowie morfologicznej liści. Ponieważ długość kwiatów języczkowatych miała bezpośredni wpływ na średnicę kwiatostanów roślin, za wariację uznano tylko jedną z tych zmienionych cech.

Notowano także datę pełni kwitnienia roślin. Pełnię kwitnienia określał moment całkowitego rozwinięcia się większości kwiatostanów na pędzie. Za całkowicie rozwinięty kwiatostan uznano taki, w którym zakończyło się rozkwitanie kwiatów języczkowatych, jednocześnie zewnętrzne okółki kwiatów rurkowatych zmieniały barwę z zielonej na żółtą. Długość pędów mierzono od podłoża do najwyżej położonego kwiatostanu na pędzie. Pomiaru średnicy kwiatostanów i określenia liczby kwiatów języczkowatych w kwiatostanie dokonano na wszystkich kwiatostanach na pędzie. Liczbę kwiatostanów na jednym pędzie ustalono licząc wszystkie te, które weszły w stadium początku lub pełni kwitnienia. Początek kwitnienia wyznaczał moment, w którym w rozwijającym się pąku kwiatostanowym widoczny był pierwszy wybarwiony kwiat języczkowaty. Z wszystkich kwiatostanów wybierano losowo 50 kwiatów języczkowatych w celu zmierzenia ich długości i szerokości.

Drugie vegetatywne pokolenie mutacyjne  $vM_2$  stanowiły rośliny otrzymane z rozmnożenia *in vivo* wyselekcjonowanych w pokoleniu  $vM_1$  wariantów. Kontrolę stanowiły rośliny nie napromienione. Sadzonki pędowe długości 6 cm pobierano z roślin matecznych od stycznia do czerwca. Rozmnożone rośliny po ukorzenieniu posadzono 25 lipca do szklarni w rozstawie  $15 \times 15$  cm. Podłożem była ziemia kompostowa. Każdy czynnik doświadczenia reprezentowany był przez 50 roślin.



Przeprowadzono te same obserwacje i pomiary roślin, które miały na celu stwierdzenie, czy zmiany zaobserwowane rok wcześniej - w pokoleniu  $vM_1$  - okazały się zmianami trwałymi, dziedzicznymi przy wegetatywnym rozmnożeniu roślin pokolenia  $vM_2$ . Pozwoliły one na wyodrębnienie z wariantów mutantów, tj. roślin powtarzających nowe cechy zaobserwowane w pokoleniu  $vM_1$ . Średnie pomiary długości pędów, liczby i średnicy kwiatostanów oraz długości i szerokości kwiatów języczkowatych u mutantów odniesiono do średnich wartości cech roślin kontrolnych. Opracowanie statystyczne wyników, w celu porównania cech mutantów z roślinami kontrolnymi za pomocą testów parametrycznych, okazało się niecelowe, gdyż test Bartletta wykazał niejednorodność prób. Niejednorodność ta wynikała z zasadniczych różnic w wartości średnich porównywanych prób, co zostało oznaczone gwiazdką (\*) w tabelach 7 i 8.

Średnią datę pełni kwitnienia roślin obliczono metodą średnich ważonych. Obliczono frekwencję mutantów i mutacji w stosunku do liczby roślin doprowadzonych do kwitnienia.

Trzecie wegetatywne pokolenie mutacyjne  $vM_3$  stanowiły rośliny rozmnożone z sadzonek pędowych pobranych bezpośrednio z roślin matecznych uprawianych w szklarni od jesieni ubiegłego roku, w warunkach *in vivo*. Rozmnożone rośliny, po ukorzenieniu, posadzono na miejsce stałe 25 lipca, w rozstawie  $15 \times 15$  cm. Mutanty reprezentowane były przez 50 roślin. Rośliny uprawiano w szklarni, podobnie jak w roku poprzednim, sposobem gałązkowym. Przeprowadzono również te same obserwacje i pomiary roślin.

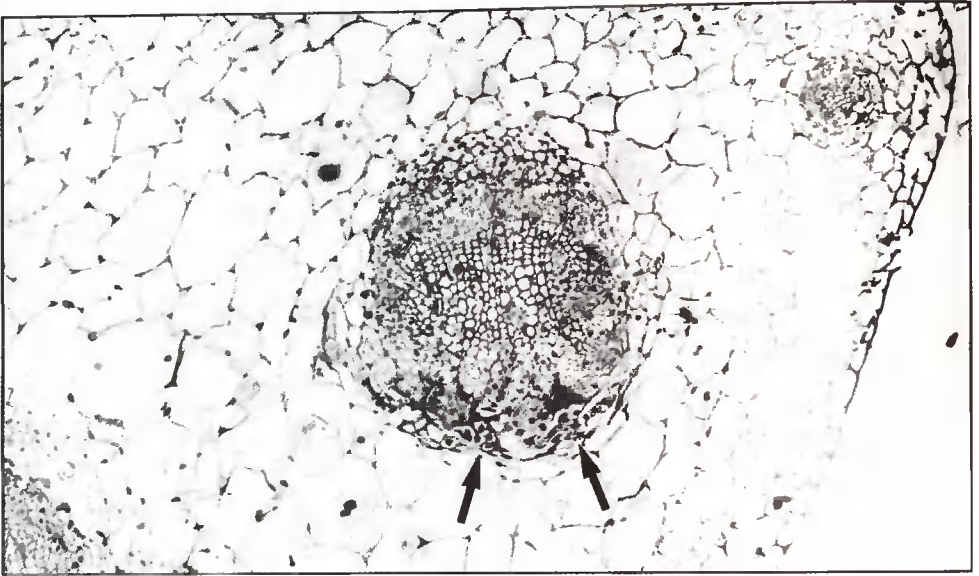
## WYNIKI

### 1. Proces tworzenia się pędów przybyszowych in vivo

Pierwsze zmiany, w typowym dla ogonka liściowego układzie tkanek, zaobserwowano na preparatach pochodzących z trzeciego tygodnia po umieszczeniu sadzonek liściowych w podłożu i rozpoczęciu ukorzeniania. Zauważono wówczas tworzenie się zarówno tkanki kalusowej, jak i centrów merystematycznych, dających początek przyszłym organom. Na przekrojach preparatów wykonanych w tym okresie zaobserwowano, że kalus powstawał wewnątrz wiązek przewodzących, z komórek floemu (rys. 1) i ksylemu (rys. 2). Podziały komórek, wskazujące na tworzenie się kalusa, zaobserwowane po raz pierwszy na preparatach wykonanych z ogonków liściowych po trzech tygodniach, trwały nieprzerwanie przez cały okres ukorzeniania sadzonek. W piątym tygodniu na przekrojach ogonków sadzonek liściowych zauważono tworzenie się tkanki kalusowej także z parenchymy międzywiązkowej (rys. 3).

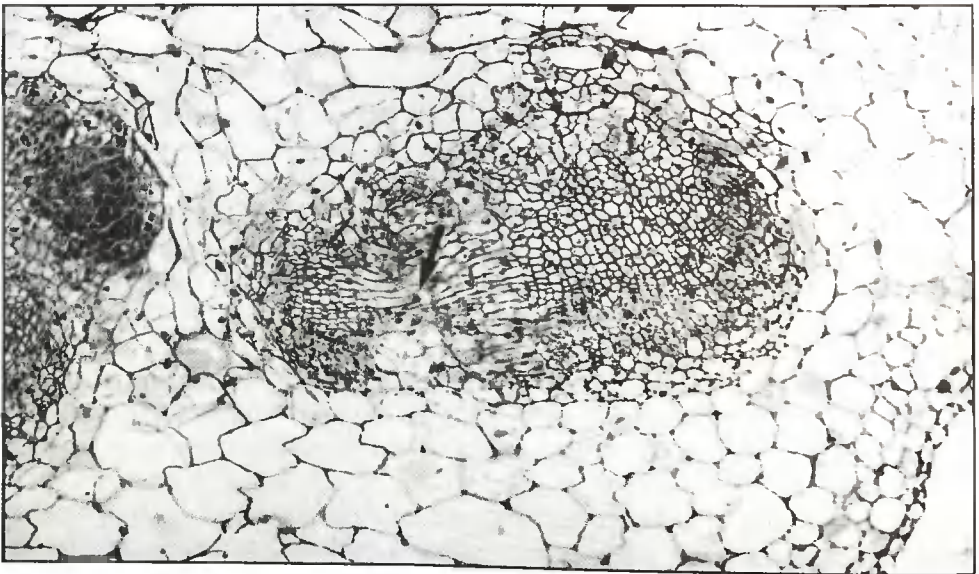
Zapoczątkowaniem procesu odróżnicowywania się tkanek w ogonkach sadzonek liściowych było również powstanie po upływie trzech tygodni zgrupowań drobnych, ciemno wybarwionych komórek tworzących pierwsze centra merystematyczne, w liczbie 2 - 3, we wiązkach przewodzących lub w ich pobliżu. Centra merystematyczne powstawały z parenchymatycznych komórek ksylemu (rys. 4), a także sporadycznie z floemu (rys. 5) i kambium (rys. 6). Na tym etapie badań mikroskopowych można było zaobserwować zawiązki przyszłych organów - głównie korzeni. W kilku przypadkach natrafiono także na obraz histologiczny, sugerujący z dużym prawdopodobieństwem powstanie zawiązków pędów przybyszowych z utworzonych centrów merystematycznych (rys. 7). Na preparatach czterotygodniowych zaobserwowano, że centra merystematyczne tworzyły się nie tylko z komórek parenchymatycznych ksylemu, ale także z parenchymy międzywiązkowej (rys. 8). Na preparatach pochodzących z tego okresu widoczne były pierwsze uformowane zawiązki pędów przybyszowych (rys. 9), a począwszy od szóstego tygodnia od umieszczenia sadzonek liściowych w podłożu, na preparatach można było jednoznacznie odróżnić pędy przybyszowe wyróżnicowane z tkanek stałych - parenchymatycznych, z widocznym merystemem wierzchołkowym i zawiązkami liści (rys. 10).

Na preparatach sześciotygodniowych zaobserwowano, że również tkanka kalusowa może różnicować się i dawać początek pędom przybyszowym i korzeniom. Na preparatach pochodzących z ogonków sadzonek liściowych, pobieranych począwszy od piętnastego tygodnia, obserwowano, że organogeneza - w tym kaulogeneza - zachodziły już tylko za pośrednictwem kalusa (rys. 11). W osiemnastym tygodniu obserwowano 5 - 6 wyraźnie ukształtowanych zawiązków przyszłych organów, w tym co najwyżej dwa pędy przybyszowe. Powstały one głównie z komórek leżących w środkowej części wytworzonego kalusa.



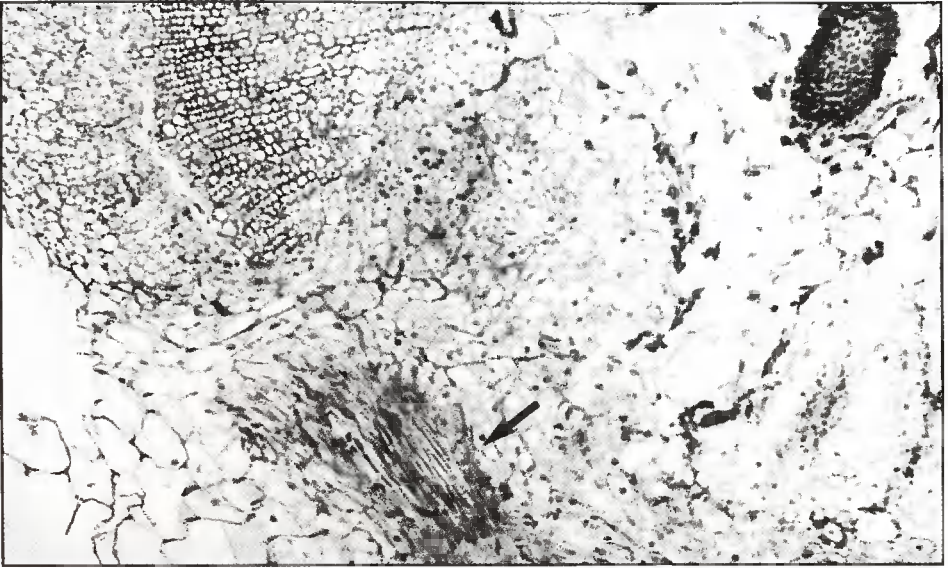
Rys.1. Tworzenie się kalusa z komórek floemu (in vivo - po 3 tygodniach)

Fig.1. Callus formation from phloem cells (in vivo - after 3 weeks)



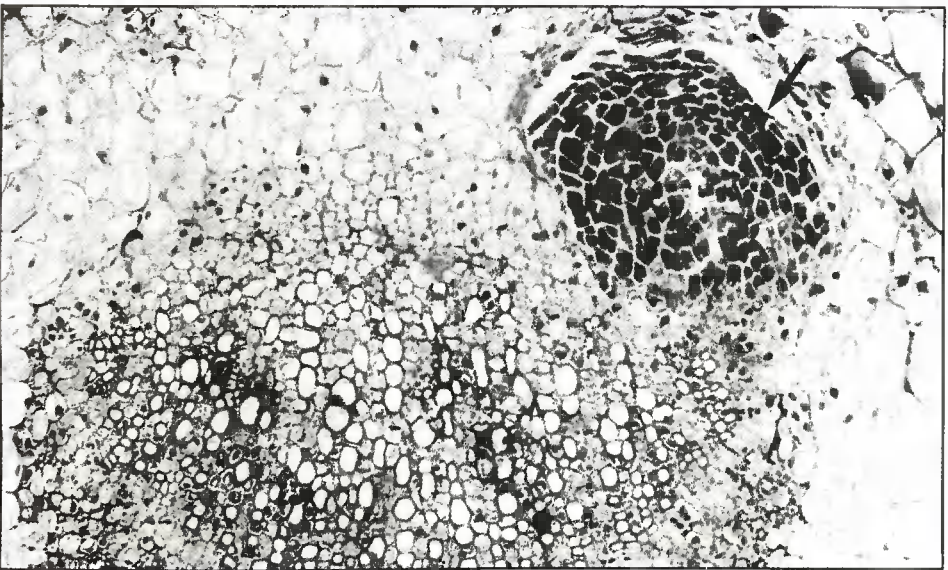
Rys.2. Tworzenie się kalusa z komórek ksylemu (in vivo - po 3 tygodniach)

Fig.2. Callus formation from xylem cells (in vivo - after 3 weeks)



Rys.3. Formowanie się kalusa w pasma z komórek parenchymy międzywiązkowej  
(in vivo - po 5 tygodniach)

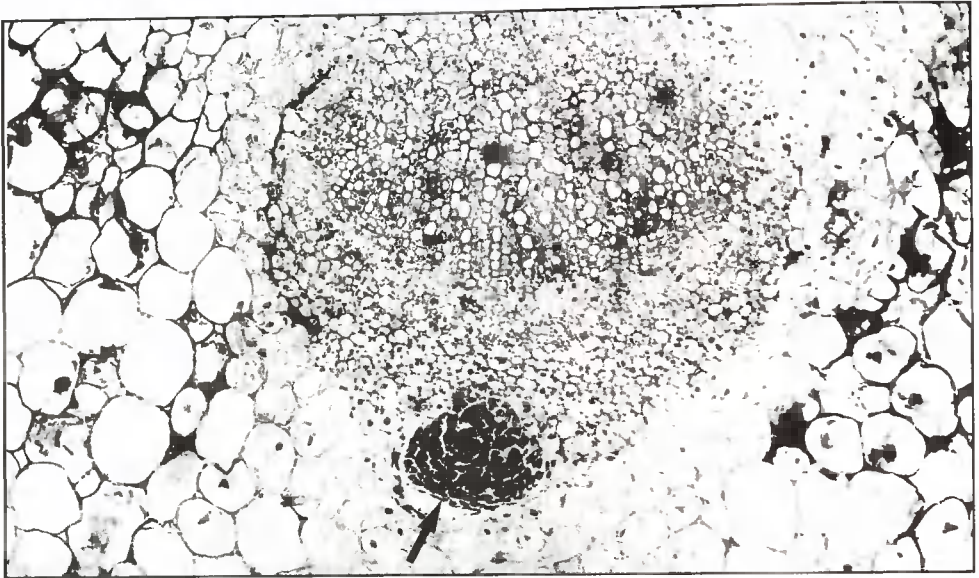
Fig.3. Callus forming into the strands from interbundle parenchyma cells  
(in vivo - after 5 weeks)



Rys.4. Centrum merystematyczne powstałe z komórek ksylemu  
(in vivo - po 3 tygodniach)

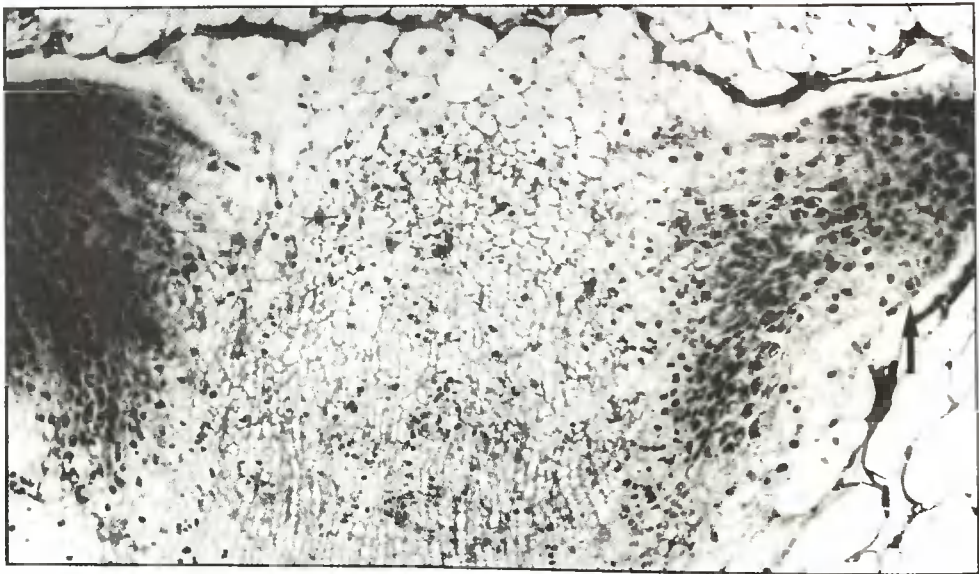
Fig.4. Meristem centre formed from xylem cells (in vivo - after 3 weeks)





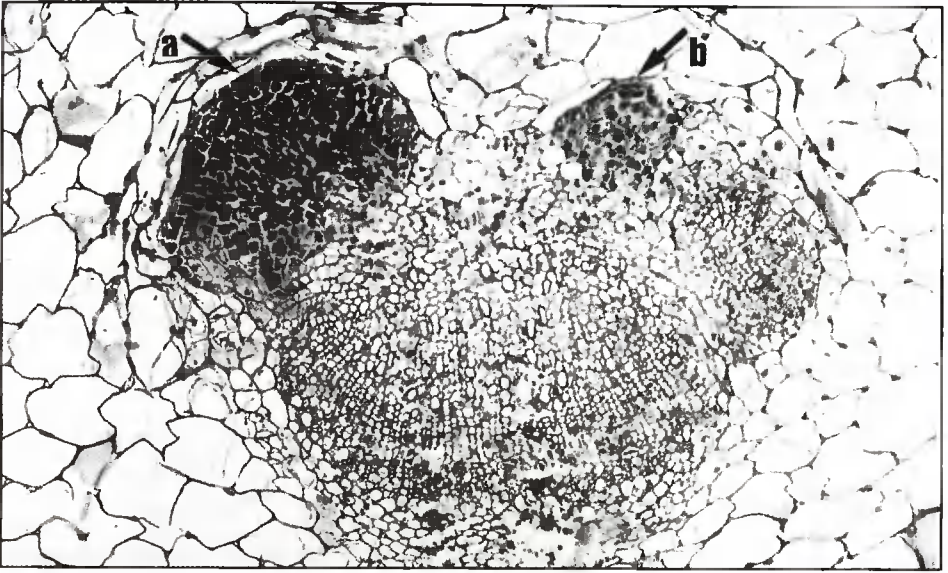
Rys.5. Centrum merystematyczne powstałe z komórek floemu  
(in vivo - po 3 tygodniach)

Fig.5. Meristem centre formed from phloem cells (in vivo - after 3 weeks)



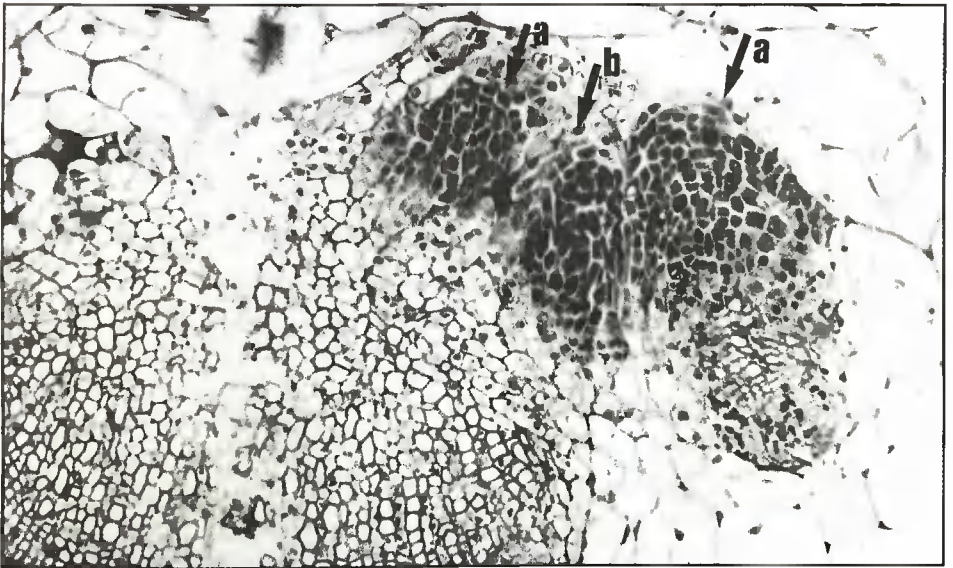
Rys 6. Centrum merystematyczne powstałe z komórek kambium  
(in vivo - po 5 tygodniach)

Fig.6. Meristem centre formed from cambium cells (in vivo - after 5 weeks)



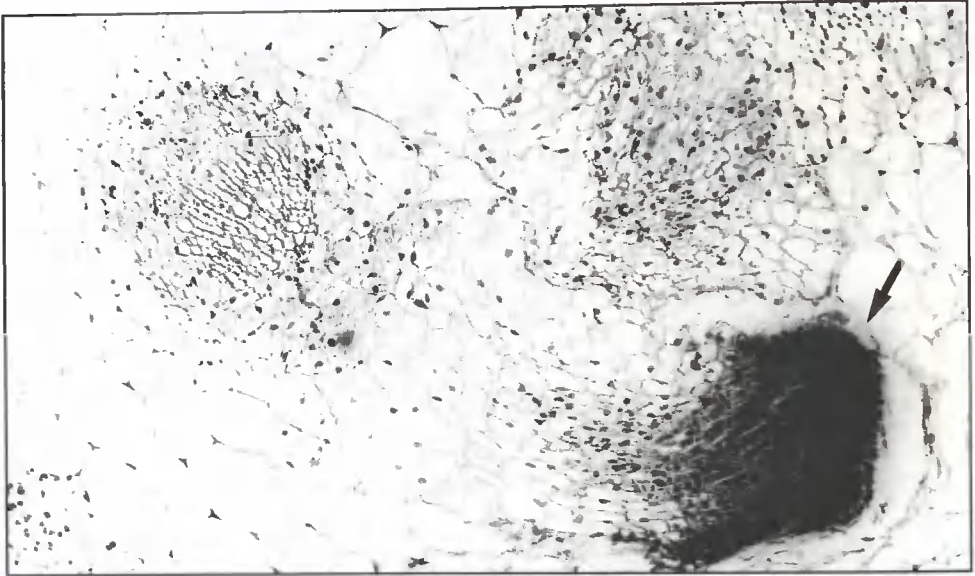
Rys.7. Centra merystematyczne powstałe z komórek ksylemu (a, b), a - zawiązek pędu przybyszowego (in vivo - po 3 tygodniach)

Fig.7. Meristem centres formed from parenchymal cells of xylem (a, b), a - primordium of adventitious shoot (in vivo - after 3 weeks)

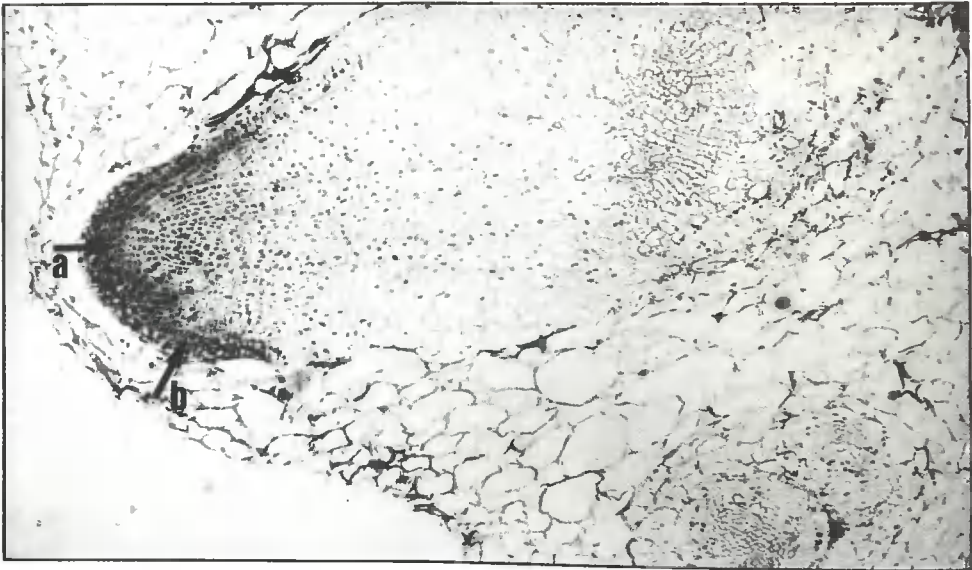


Rys.8. Centra merystematyczne powstałe z komórek parenchymatycznych ksylemu (a) i z parenchymy międzywiązkowej (b) (in vivo - po 4 tygodniach)

Fig.8. Meristem centres formed from parenchymal cells of xylem (a) and from interbundle parenchyma cells (b) (in vivo - after 4 weeks)

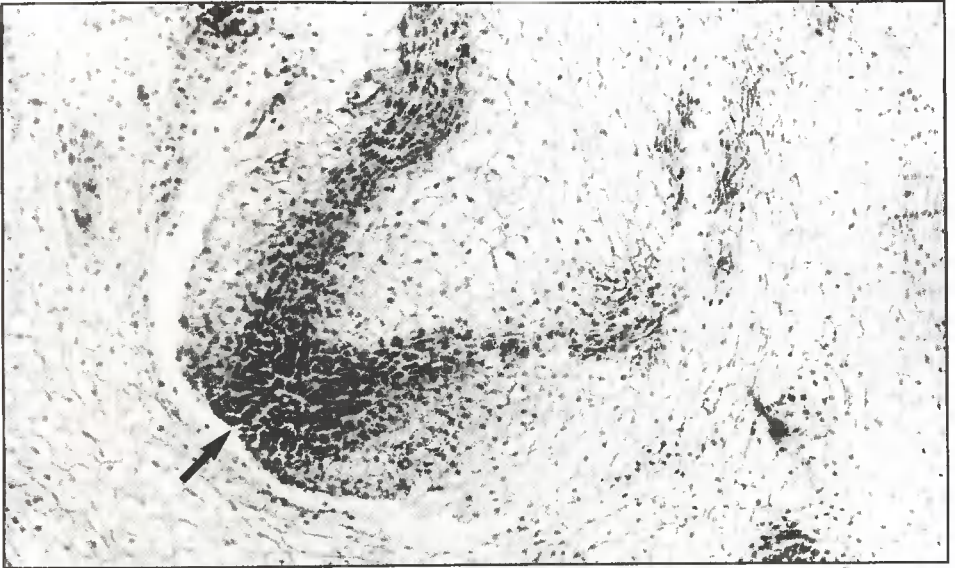


Rys.9. Uformowany zawiązek pędu przybyszowego (in vivo - po 4 tygodniach)  
 Fig.9. A formed primordium of adventitious shoot (in vivo - after 4 weeks)



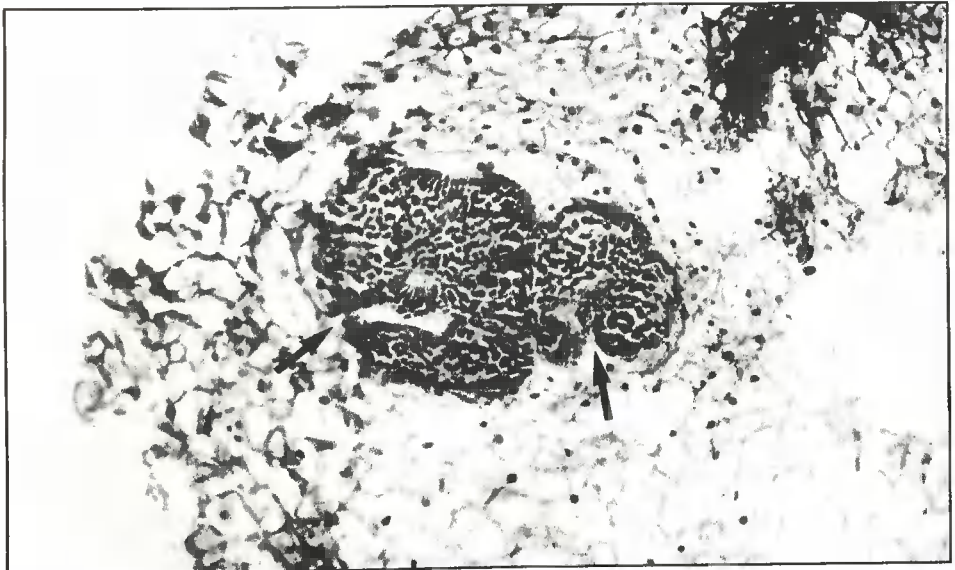
Rys.10. Pęd przybyszowy wyróżnicowany z komórek tkanek stałych; merystem wierzchołkowy (a) i zawiązek liścia (b) (in vivo - po 6 tygodniach)  
 Fig.10. Adventitious shoot differentiated from fixed tissue cells; apex meristem (a) and leaf germ (b) (in vivo - after 6 weeks)





Rys.11. Pęd przybyszowy wyróżnicowany z kalusa (in vivo - po 20 tygodniach)

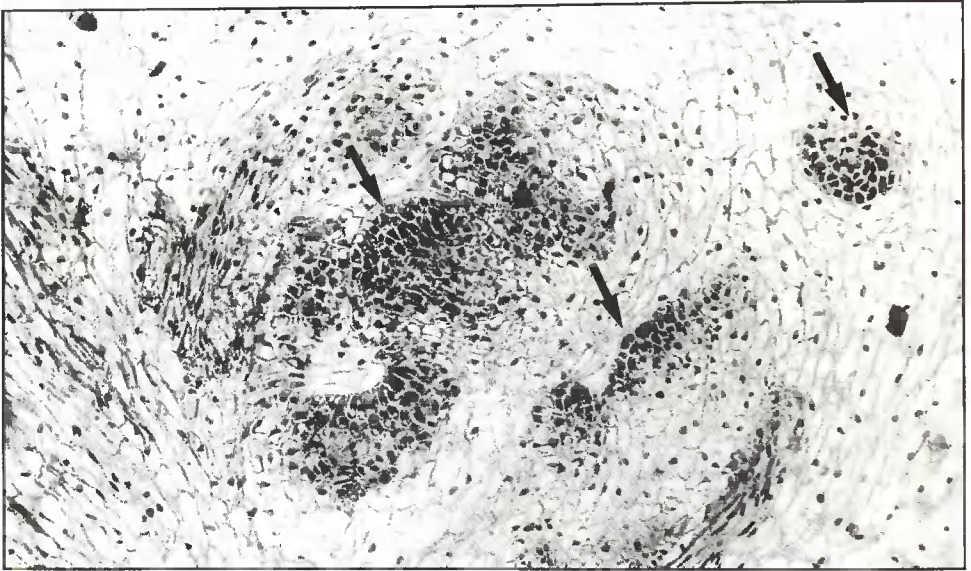
Fig.11. Adventitious shoot differentiated from callus (in vivo - after 20 weeks)



Rys.12. Dwa zawiązki pędów przybyszowych utworzone obok siebie w kalusie (in vivo - po 18 tygodniach)

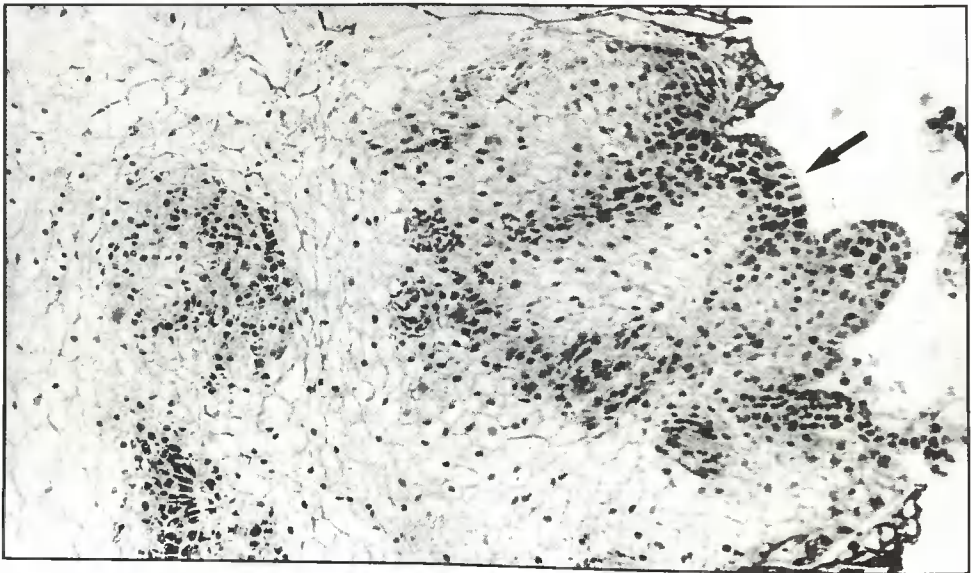
Fig.12. Two primordia of adventitious shoot, formed next to each other in callus (in vivo - after 18 weeks)





Rys. 13. Tworzenie się centrów merystematycznych w kalusie  
(in vivo - po 20 tygodniach)

Fig. 13. Formation of meristem centres in callus (in vivo - after 20 weeks)



Rys. 14. Wyróżnicowany pęd przybyszowy wychodzący na zewnątrz z kalusa  
(in vivo - po 20 tygodniach)

Fig. 14. Adventitious shoot differentiated getting out of callus  
(in vivo - after 20 weeks)

Zaobserwowano, że w bliskiej odległości w tkance kalusowej może tworzyć się kilka zawiązków pędów (rys. 12). Nasilenie tworzenia się pędów przybyszowych obserwowano na preparatach pochodzących dopiero z dziewiętnastego i dalszych tygodni. Na przekrojach ogonków sadzonek liściowych widoczne były w tym okresie różne stadia rozwojowe, począwszy od jeszcze mało zróżnicowanych centrów merystematycznych powstających w kalusie (rys. 13) do wyraźnie ukształtowanych przyszłych organów - głównie pędów przybyszowych w liczbie 3 - 4. Na preparatach dwudziesto- i dwudziestojednotygodniowych widoczne były wyróżnicowane zawiązki pędów przybyszowych z wyraźnie uformowanymi merystemami wierzchołkowymi i zawiązkami liści, przerastające komórki kalusowe i wydostające się na zewnątrz (rys. 14).

## 2. Proces tworzenia się pędów przybyszowych in vitro

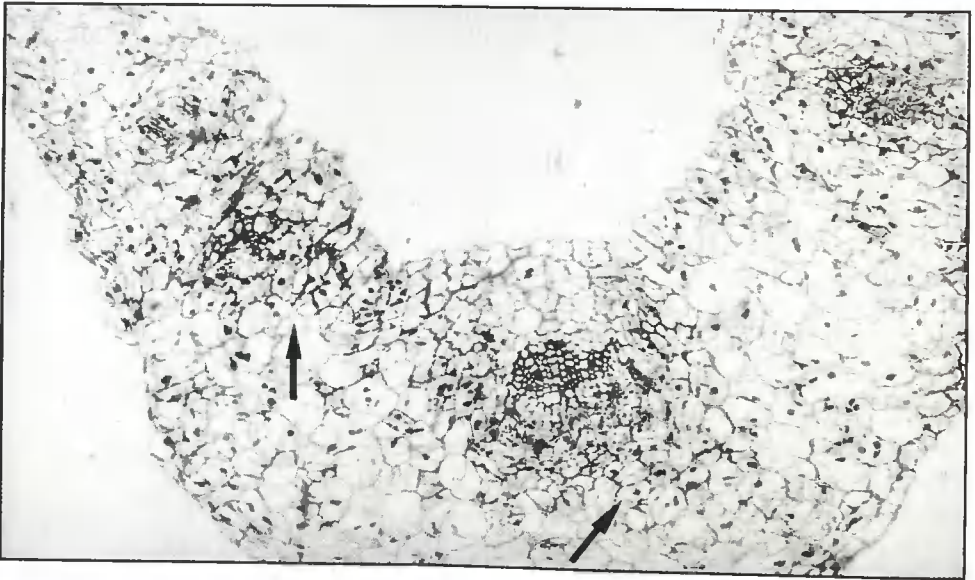
Pierwsze zmiany histologiczne zaobserwowano na preparatach wykonanych z eksplantatów sześciodniowych; były to zarówno początkowe, jak i bardziej zaawansowane stadia tworzenia się tkanki kalusowej (rys. 15). Różne stadia tworzenia się kalusa obserwowano także w eksplantatach liściowych pobranych później, gdyż zapoczątkowany w szóstym dniu proces tworzenia się tej tkanki trwał nieprzerwanie do końca obserwacji. Kalus różnicował się z komórek parenchymy ogonka eksplantatu liściowego, w tym też z komórek subepidermalnych leżących bezpośrednio pod skórą (rys. 16). W przypadku odróżnicowywania się i podziałów komórek subepidermalnych skórka była rozrywana i kalus wydostawał się na zewnątrz. Zaobserwowano to na preparatach pochodzących z materiału osiemnastodniowego i pobieranego później (rys. 17). Kalus formował się w różnych miejscach ogonka eksplantatu liściowego. Początkowo obserwowano tworzenie się kalusa przede wszystkim w górnej części, po bokach lub w dalszej części ogonka eksplantatu liściowego, później natomiast - w środkowej jego części (rys. 18 i 19).

Na kilku preparatach zaobserwowano zmiany w warstwie epidermalnej. Pierwsze z nich, którymi były podziały komórek skórki, zauważono na przekrojach eksplantatów liściowych sześciodniowych (rys. 20). Dzielącą się epidermę zaobserwowano również w trakcie obserwacji preparatów wykonanych z ogonków pochodzących z eksplantatów liściowych pobranych do badań później, po 21 dniach od wyłożenia ich na pożywkę (rys. 21). Ponadto w eksplantacie szesnastodniowym zaobserwowano powiększanie się komórek epidermy, co było pierwszym objawem ich odróżnicowywania się (rys. 22). Zaobserwowane odróżnicowywanie się i podziały komórek epidermy mogą sugerować możliwość bezpośredniej organogenezy lub tworzenia kalusa z komórek skórki. Na żadnym jednak preparacie nie zauważono dalszych, bardziej zaawansowanych etapów tworzenia się większych grup komórek czy struktur z dzielącej się skórki.

Na preparatach pochodzących z materiału pobranego jedenastego dnia zaobserwowano podziały komórek subepidermalnych parenchymy. Była to najwcześ-

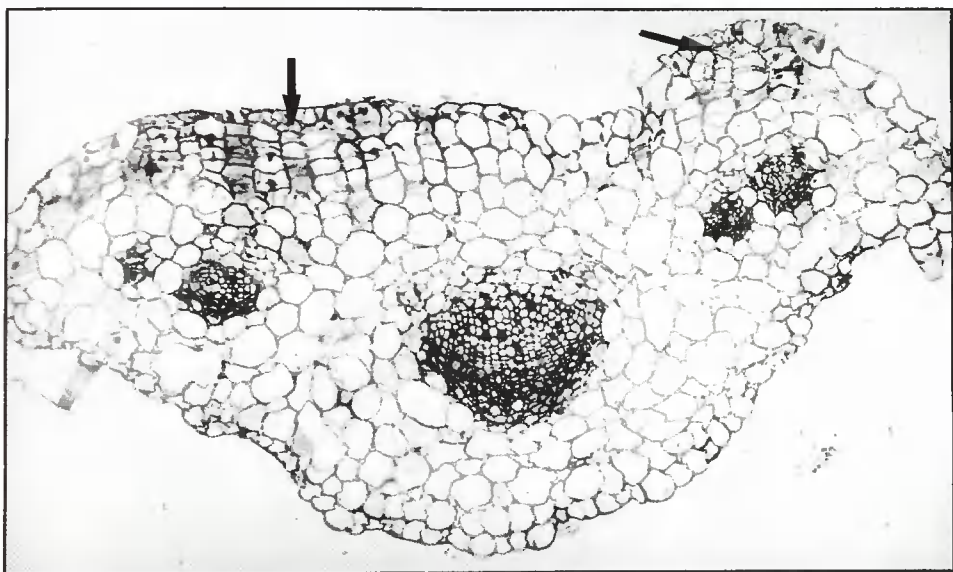
niejsza zmiana histologiczna z widocznymi, ukierunkowanymi podziałami komórek leżących pod skórą, które sugerowały tworzenie się centrów merystematycznych (rys. 23). Przepuszczalnie stanowiły one początek kaulogenezy. W trakcie obserwacji mikroskopowych wyróżnicowany korzeń dostrzeżono tylko w jednym przypadku, co wynikało z zastosowania pożywki sprzyjającej powstawaniu pędów przybyszowych a hamującej ryzogenezę. Również w eksplantatach liściowych trzynastodniowych (rys. 24) oraz dwudziestojedno- i dwudziestodwudniowych zaobserwowano zmiany sugerujące tworzenie się centrów merystematycznych przyszłych organów w warstwie subepidermalnej parenchymy. Liczniejsze, już nie sporadyczne pojawianie się centrów merystematycznych zaobserwowano na przekrojach ogonków czternastodniowych i pochodzących z dalszych dni. Na preparatach pobranych z ogonków, w których kalus już bardzo silnie przerastał tkankę parenchymatyczną zauważono, że centra merystematyczne inicjowały się głównie za jego pośrednictwem (rys. 25).

W tym czasie na przekrojach ogonków zaobserwowano od 5 do 6 centrów merystematycznych, z których rozwijały się prawdopodobnie pędy przybyszowe. Wyraźnie wyróżnicowane pędy przybyszowe z widocznym merystemem wierzchołkowym i zawiązkami liści widoczne były na preparatach szesnastodniowych (rys. 26).



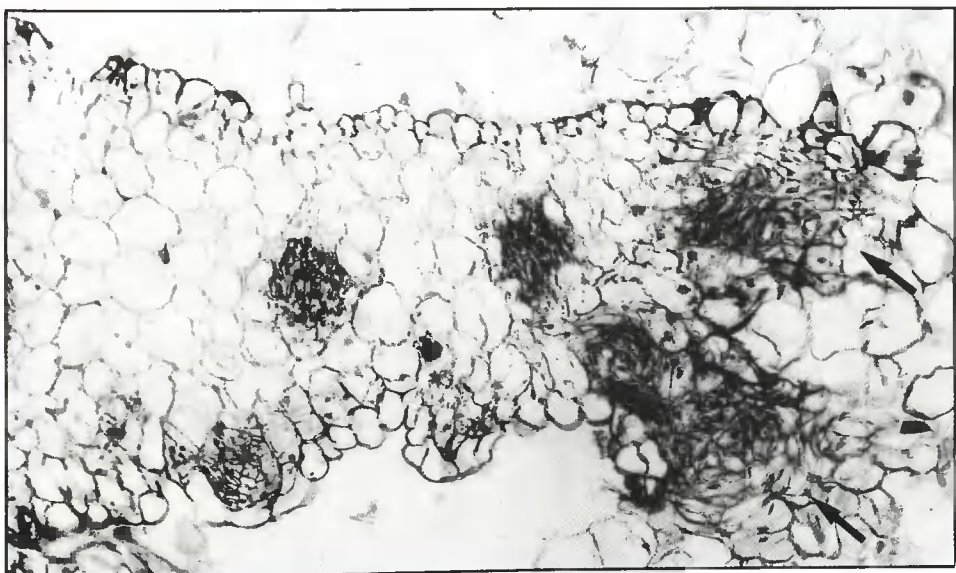
Rys. 15. Tworzenie się kalusa z komórek parenchymy (in vitro - po 6 dniach)

Fig. 15. Callus formation from parenchyma cells (in vitro - after 6 days)



Rys.16. Tworzenie się kalusa z komórek subepidermy (in vitro - po 6 dniach)

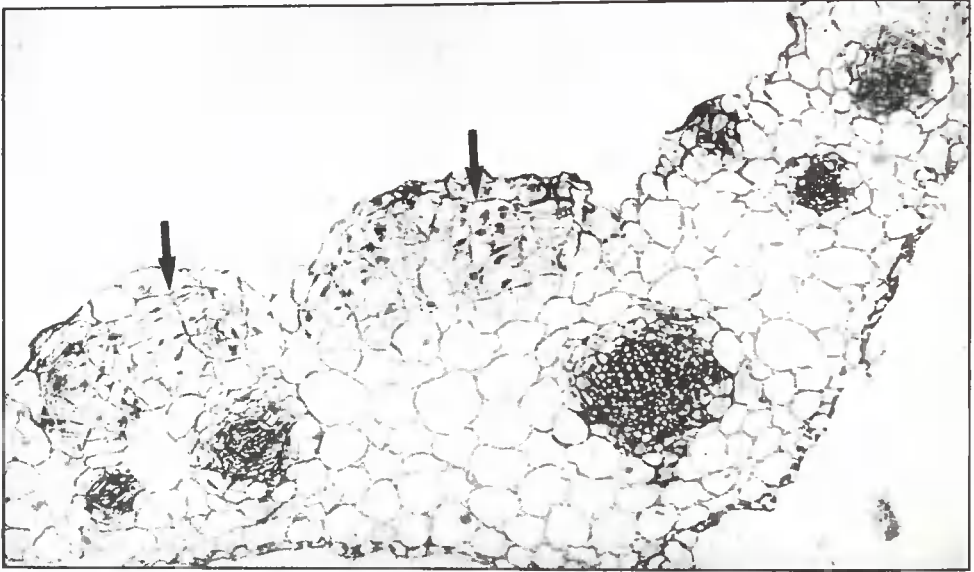
Fig.16. Callus formation from subepidermal cells (in vitro - after 6 days)



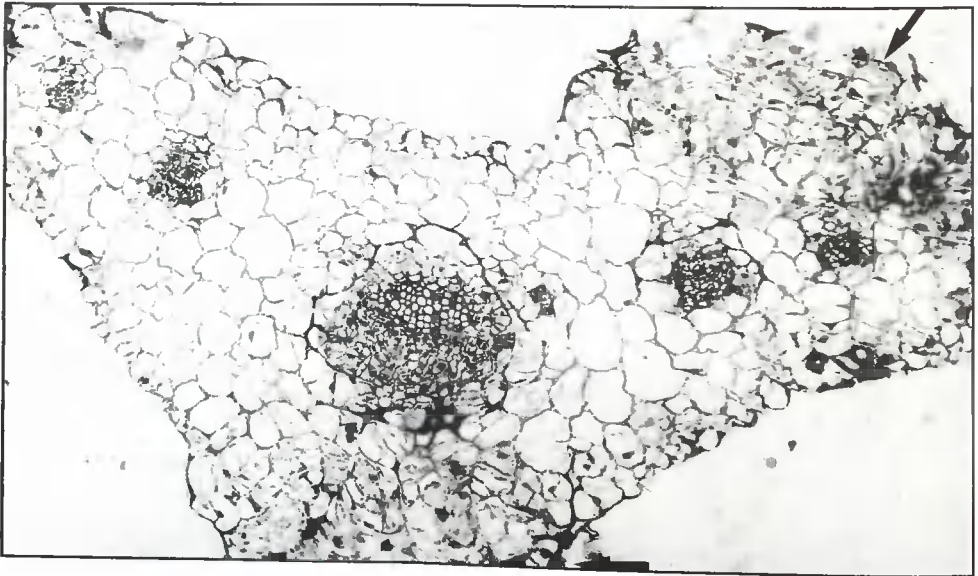
Rys.17. Kalus rozrywający skórę i wydostający się na zewnątrz  
(in vitro - po 22 dniach)

Fig.17. Callus destroying epiderma and getting out (in vitro - after 22 days)

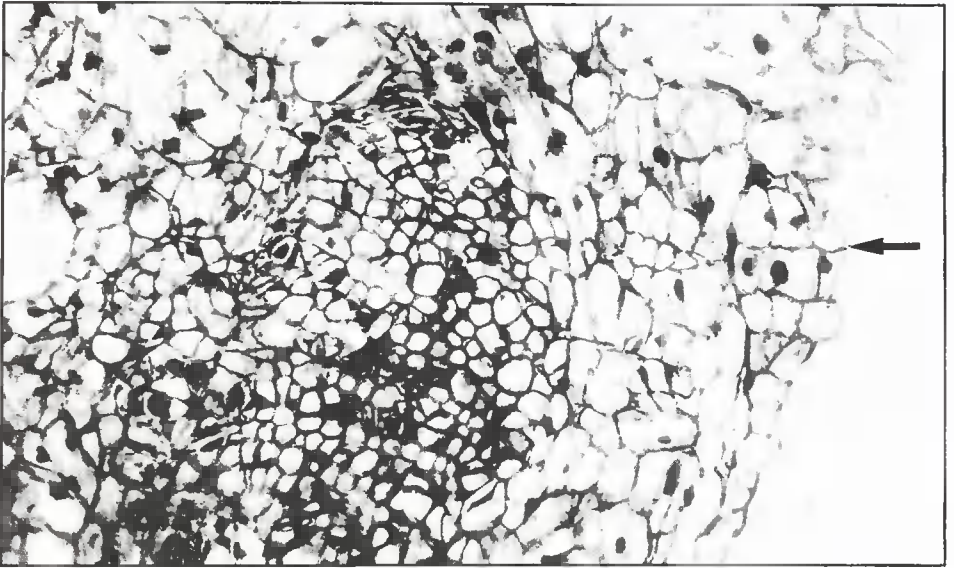




Rys.18. Tworzenie się kalusa w górnej części ogonka liściowego (in vitro - po 8 dniach)  
 Fig.18. Callus formation in the upper part of leaf petiole (in vitro - after 8 days)

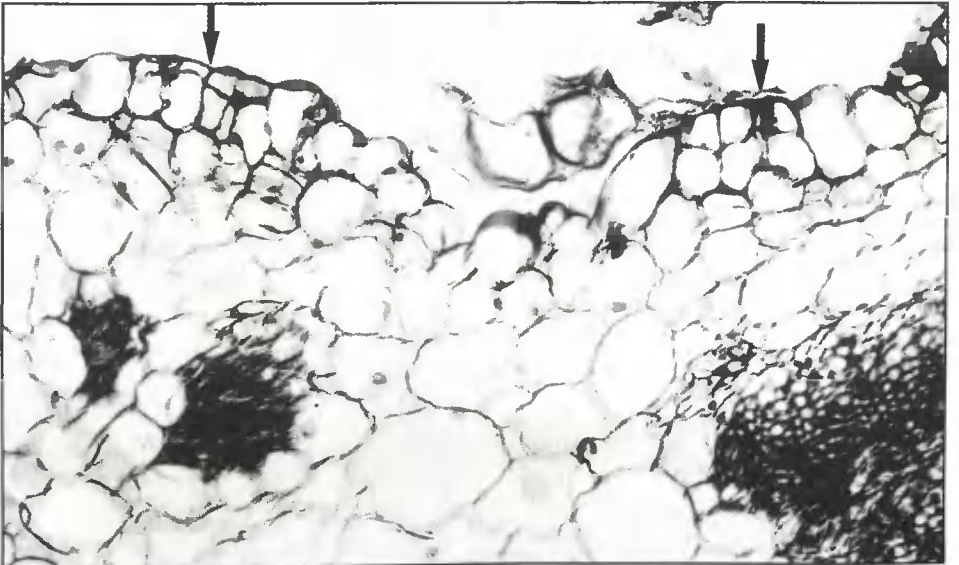


Rys.19. Tworzenie się kalusa po bokach i w dalszej części ogonka liściowego  
 (in vitro - po 11 dniach)  
 Fig.19. Callus formation at the sides and in the lower part of leaf petiole  
 (in vitro - after 11 days)



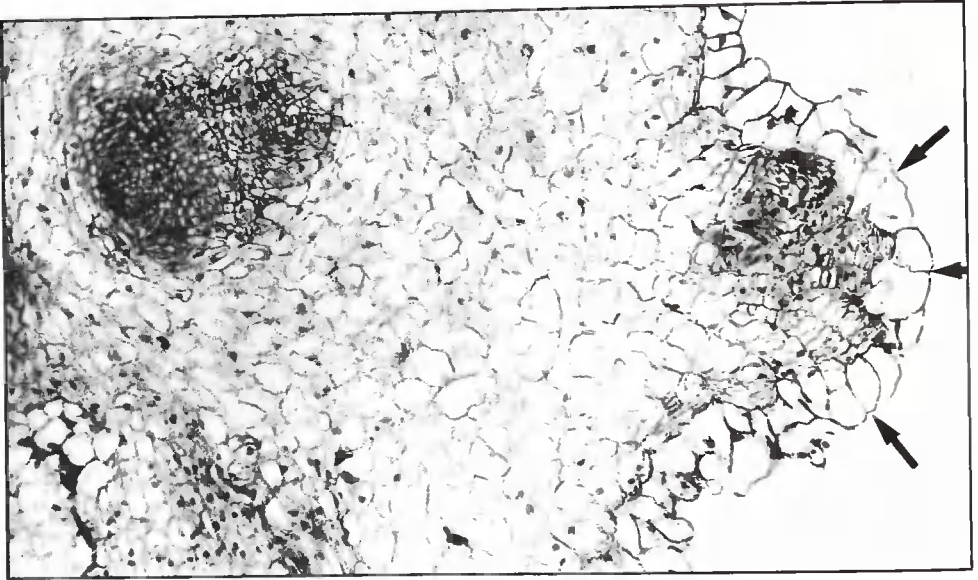
Rys.20. Dziela się epiderma (in vitro - po 6 dniach)

Fig.20. Dividing epiderma (in vitro - after 6 days)



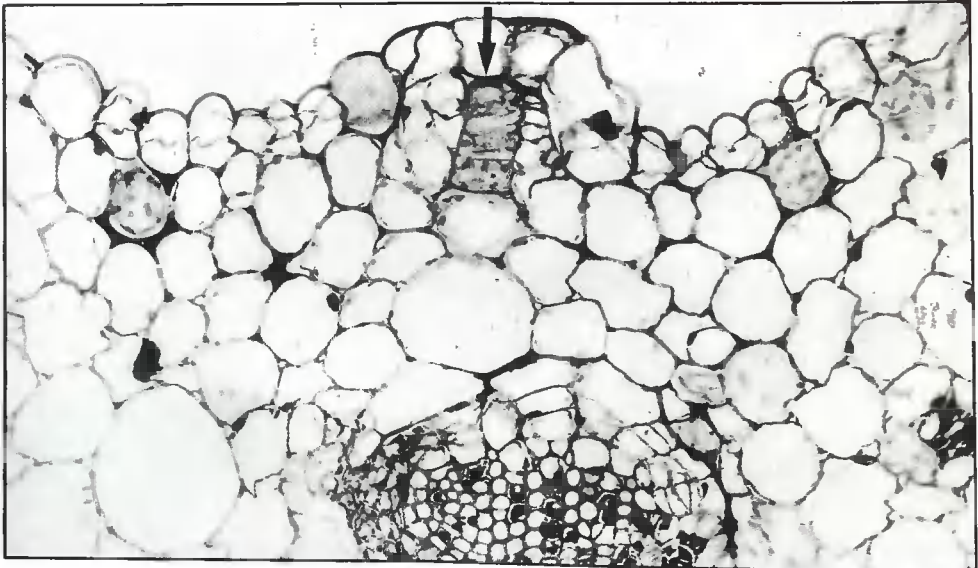
Rys.21. Podziały komórek epidermy (in vitro - po 21 dniach)

Fig.21. Divisions of epidermal cells (in vitro - after 21 days)



Rys.22. Odróżnicowywanie się komórek epidermy (in vitro - po 16 dniach)

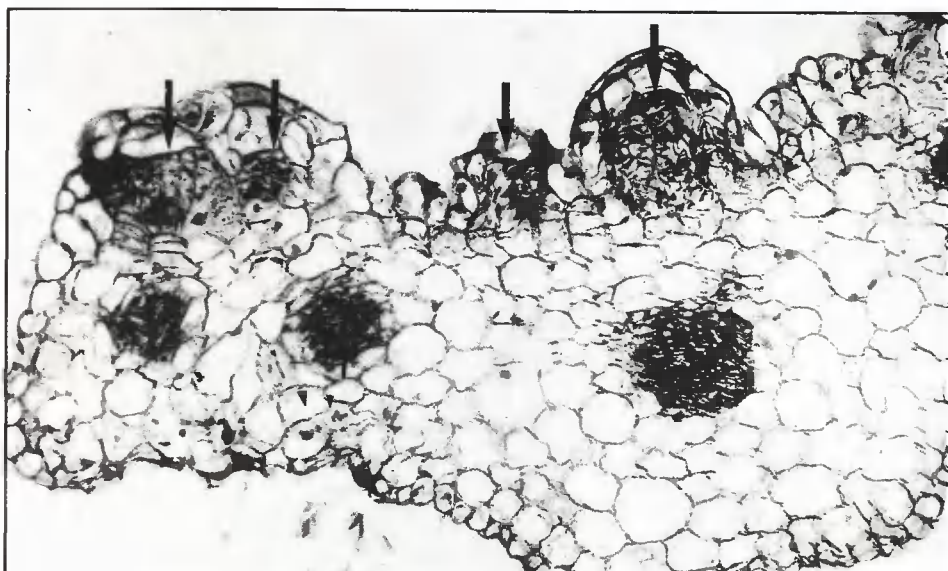
Fig.22. Dedifferentiation of epidermal cells (in vitro - after 16 days)



Rys.23. Podziały komórek subepidermalnych parenchymy, prowadzące przypuszczalnie do powstania centrum merystematycznego (in vitro - po 11 dniach)

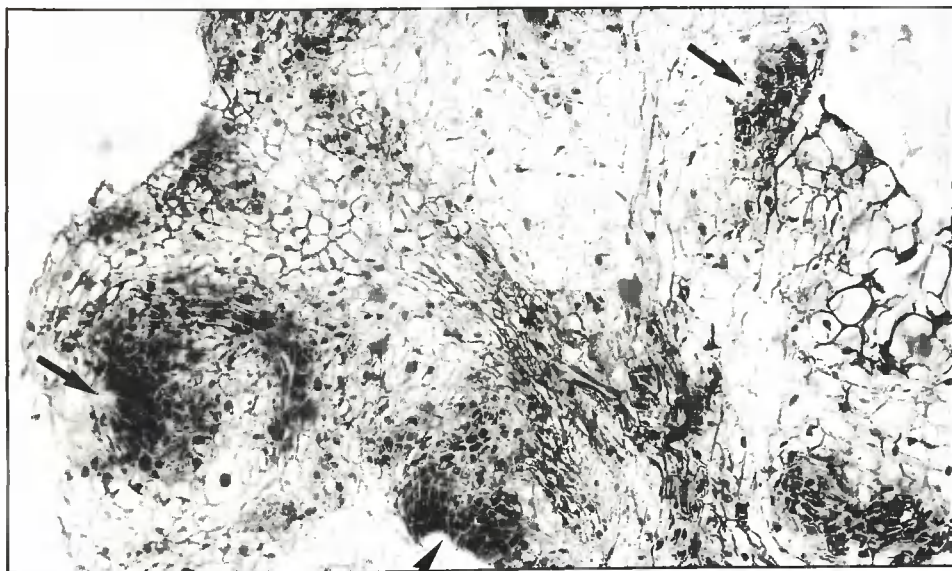
Fig.23. Divisions of subepidermal cells of parenchyma, probably resulting in meristem centre formation (in vitro - after 11 days)





Rys.24. Centra merystematyczne przyszłych organów w komórkach subepidermalnych parenchymy (in vitro - po 3 dniach)

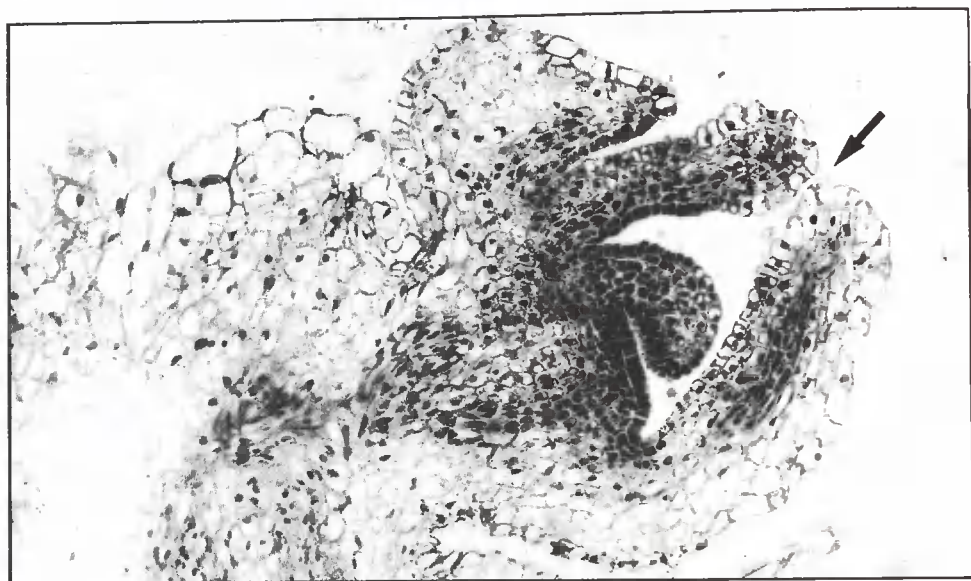
Fig.24. Meristem centres of future organs in subepidermal cells of parenchyma (in vitro - after 13 days)



Rys.25. Centra merystematyczne w kalusie (in vitro - po 21 dniach)

Fig.25. Meristem centres in callus (in vitro - after 21 days)





Rys.26. Pęd przybyszowy wyróżnicowany z kalusa (in vitro - po 16 dniach)

Fig.26. Adventitious shoot differentiated from callus (in vitro - after 16 days)

W trakcie obserwacji preparatów czternastodniowych zauważono różnicowanie się komórek znajdujących się w okolicach wiązek przewodzących, co może sugerować inicjację centrum merystematycznego również w tym miejscu. Jednak na podstawie tych obrazów histologicznych nie można było jednoznacznie stwierdzić jakiemu organowi centrum merystematyczne da początek. Zjawisko to obserwowano także w trakcie dalszych analiz na preparatach wykonanych z ogonków dwudziestotrzydniowych.

### 3. Rezultaty napromieniania w ujęciu liczbowym

U roślin pokolenia  $vM_1$  i  $vM_2$ , zregenerowanych z napromienionych eksplantatów liściowych ex vitro, zaobserwowano wyższą frekwencję wariantów i wariacji oraz mutantów i mutacji, niż u roślin pochodzących z napromienionych sadzonek liściowych ex vivo (tab. 2). Frekwencja wariacji i mutacji była odpowiednio prawie trzykrotnie i trzykrotnie wyższa, niż w przypadku wykorzystania sadzonek liściowych. Zaobserwowano jednak, że wzrost frekwencji wariantów w pokoleniu  $vM_1$  i mutantów w pokoleniu  $vM_2$  nie był tak znaczny, jak frekwencji wariacji i mutacji.

Gdy obiektem napromieniania były sadzonki liściowe ex vivo, jak i eksplantaty liściowe ex vitro, zarówno frekwencja wariantów i wariacji w pokoleniu  $vM_1$ , oraz frekwencja mutantów i mutacji w pokoleniu  $vM_2$  uzależniona była od rodzaju promieniowania (tab. 3).

Tabela 2  
Table 2

Mutageneza u chryzantemy odmiany 'Red Nero' w zależności od obiektu napromienienia  
Mutagenesis in chrysanthemum cultivar 'Red Nero' according to the object of irradiation

Obiekt napromienienia Irradiation object	Pokolenie vM <sub>1</sub> - vM <sub>1</sub> generation				Pokolenie vM <sub>2</sub> - vM <sub>2</sub> generation				
	Liczba roślin kwitających Number of flowering plants	Liczba wariantów <sup>1/</sup> Number of variants <sup>1/</sup>	Frekwencja wariantów Variant frequency (%)	Liczba wariantów <sup>2/</sup> Number of variances <sup>2/</sup>	Frekwencja wariantów Variance frequency (%)	Liczba mutantów Number of mutants	Frekwencja mutantów Mutant frequency (%)	Liczba mutacji Number of mutations	Frekwencja mutacji Mutation frequency (%)
ex vivo	5417	232	4,3	17	0,3	232	4,3	12	0,2
ex vitro	2281	123	5,4	19	0,8	123	5,4	14	0,6

<sup>1/</sup> Warianty - rośliny o zmienionych cechach morfologicznych w pokoleniu vM<sub>1</sub>  
Variants - plants with changed morphological traits in vM<sub>1</sub> generation

<sup>2/</sup> Wariacje - cechy zmienione w pokoleniu vM<sub>1</sub>  
Variances - changed traits in vM<sub>1</sub> generation

Tabela 3  
Table 3

Mutageniza u chryzantemy odmiany 'Red Nero' w zależności od obiektu napromienienia i rodzaju promieniowania  
Mutagenesis in chrysanthemum cultivar 'Red Nero' according to the object of irradiation and kind of irradiation

Obiekt napromienienia Irradiation object	Pokolenie vM <sub>1</sub> - vM <sub>1</sub> generation				Pokolenie vM <sub>2</sub> - vM <sub>2</sub> generation					
	Rodzaj promie- niowania Kind of irra- diation	Liczba roś- lin kwit- nących Number of flowering plants	Liczba wa- riantów <sup>1/</sup> Number of variants <sup>1/</sup>	Frekwen- cja wa- riantów Variant frequency (%)	Liczba wa- riacji <sup>2/</sup> Number of va- riances <sup>2/</sup>	Frekwen- cja wa- riacji Variance frequency (%)	Liczba mu- tantów Number of mu- tants	Frekwen- cja mu- tantów Mutant frequency (%)	Liczba mu- tacji Number of mu- tations	Frekwen- cja mu- tacji Mutation frequency (%)
ex vivo	X	3973	176	4,4	15	0,4	176	4,4	11	0,3
	gamma	1444	56	3,9	11	0,8	56	3,9	8	0,6
ex vitro	X	909	22	2,4	9	1,0	22	2,4	7	0,7
	gamma	1372	101	7,4	18	1,3	101	7,4	14	1,0

<sup>1/ 2/</sup> Objasnienia jak w tabeli 2

<sup>1/ 2/</sup> Explanations as in Table 2

Zastosowanie promieniowania gamma na sadzonki liściowe *ex vivo* dwukrotnie zwiększyło frekwencję wariacji i mutacji w porównaniu z promieniowaniem X. Natomiast frekwencja wariantów i mutantów była wyższa u tych roślin kwitnących, które uzyskano z sadzonek liściowych poddanych działaniu promieniowania X. Gdy obiektem napromienienia były eksplantaty liściowe *ex vitro* we wszystkich przypadkach lepsze rezultaty zaobserwowano, gdy zastosowano promieniowanie gamma. Frekwencja wariantów i mutantów uzyskanych u roślin kwitnących, zregenerowanych z eksplantatów liściowych *ex vitro* poddanych działaniu promieniowania gamma, była aż o 5 % wyższa niż u tych, które zregenerowano z eksplantatów poddanych działaniu promieniowania X. Jednak wzrost frekwencji wariacji i mutacji pod wpływem promieniowania gamma nie był aż tak znaczny, jak u roślin zregenerowanych *ex vivo*.

Frekwencja wariantów i wariacji oraz mutantów i mutacji u roślin zregenerowanych z sadzonek i eksplantatów liściowych, traktowanych promieniowaniem pochodzącym z obu zastosowanych źródeł, uzależniona była od dawki napromienienia i rosła wraz z jej zwiększaniem (tab. 4). Wyjątek stanowiła jedynie frekwencja mutacji, gdy obiektem napromienienia były sadzonki liściowe *ex vivo*, poddane działaniu promieniowania gamma w dawce 10 Gy.

Najwyższą frekwencję wariantów i wariacji, a także mutantów i mutacji, zaobserwowano u roślin zregenerowanych techniką *in vitro* z eksplantatów liściowych, poddanych działaniu promieniowania gamma w dawce 20 Gy.

U roślin kwitnących, zregenerowanych z napromienionych eksplantatów liściowych *ex vitro*, przy zastosowaniu najniższej dawki promieniowania X, nie ujawniły się żadne zmiany. Natomiast przy dawce 25 Gy promieniowania X i gamma nie zaobserwowano w ogóle regeneracji roślin z eksplantatów liściowych.

#### 4. Warianty i wariacje w pokoleniu $vM_1$

Ogółem, w wyniku działania promieniowania X i gamma na sadzonki liściowe *ex vivo* i eksplantaty liściowe *ex vitro*, uzyskano 355 wariantów. Warianty zostały zestawione w ujęciu liczbowym, a wariacje w opisowym (tab. 5). Ze wszystkich wyodrębnionych w pokoleniu  $vM_1$  wariantów utworzono 30 grup, z których każda obejmowała warianty o identycznych wariacjach. Warianty te zostały oznaczone w tabeli 5 kolejnymi cyframi arabskimi. Średnie wartości wymiennych cech zmienionych odniesiono do średnich wartości cech roślin nie napromienionych przedstawionych w tabeli 6. Każdy wariant charakteryzował się jedną lub kilkoma, maksymalnie pięcioma, zmienionymi cechami. Wariacje zaobserwowane w pierwszym wegetatywnym pokoleniu roślin zregenerowanych z napromienianych sadzonek i eksplantatów liściowych dotyczyły barwy i innych cech kwiatostanów (rys. 27-30), długości pędu, a także zmian w budowie morfologicznej liści (rys. 31-34).

Mutageniza u chryzantemy odmiany 'Red Nero' w zależności od obiektu napromienienia, rodzaju promieniowania oraz dawki napromienienia

Mutagenesis in chrysanthemum cultivar 'Red Nero' according to the object of irradiation, kind of irradiation and doses of irradiation

Obiekt napromienienia Irradiation object	Pokolenie vM <sub>1</sub> - vM <sub>1</sub> generation					Pokolenie vM <sub>2</sub> - vM <sub>2</sub> generation					
	Rodzaj promieniowania Kind of irradiation	Dawka napromienienia Irradiation dose (Gy)	Liczba roślin kwitnących Number of flowering plants	Liczba wariantów <sup>1/2</sup> Number of variants <sup>1/2</sup>	Frekwencja wariantów Variant frequency (%)	Liczba wariacji <sup>1/2</sup> Number of variations <sup>1/2</sup>	Frekwencja wariacji Variance frequency (%)	Liczba mutantów Number of mutants	Frekwencja mutantów Mutant frequency (%)	Liczba mutacji Number of mutations	Frekwencja mutacji Mutation frequency (%)
ex vivo	X	5	1252	24	1,9	5	0,4	24	1,9	4	0,3
		10	1008	27	2,7	10	1,0	27	2,7	9	0,9
		15	904	52	5,8	12	1,3	52	5,8	10	1,1
		20	604	48	7,9	13	2,2	48	7,9	10	1,7
		25	205	25	12,2	12	5,9	25	12,2	8	3,9
	gamma	5	215	2	0,9	5	2,3	2	0,9	4	1,9
		10	298	6	2,0	8	2,7	6	2,0	5	1,7
		15	312	12	3,8	9	2,9	12	3,8	6	1,9
		20	365	22	6,0	11	3,0	22	6,0	8	2,2
		25	254	14	5,5	9	3,5	14	5,5	6	2,4
ex vitro	X	5	309	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
		10	264	5	1,9	4	1,5	5	1,9	3	1,1
		15	269	7	2,6	9	3,3	7	2,6	7	2,6
		20	67	10	14,9	4	6,0	10	14,9	3	4,5
		25	0	0	0,0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0
	gamma	5	793	20	2,5	9	1,1	20	2,5	7	0,9
		10	464	43	9,3	16	3,4	43	9,3	13	2,8
		15	48	12	25,0	8	16,7	12	25,0	7	14,6
		20	67	26	38,8	16	23,9	26	38,8	12	17,9
		25	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0

<sup>1/2</sup> Objaśnienia jak w tabeli 2

Explanations as in Table 2

Tabela 5  
Table 5Zestawienie wariantów i wariacji oraz mutantów i mutacji odmiany 'Red Nero'  
zaobserwowanych w pokoleniach  $vM_1$  i  $vM_2$ List of variants and variances as well as mutants and mutations of cultivar 'Red Nero'  
observed in  $vM_1$  and  $vM_2$  generations

Obiekt napromie- nienia Irradia- tion object	Rodzaj promie- niowa- nia Kind of irradia- tion	Dawka napromie- nienia Irradia- tion dose (Gy)	Liczba warian- tów Number of variants	Warian- ty (nr) Variants (No.)	Wariacje (cechy zmienione w $vM_1$ ) Variances (features changed in $vM_1$ )	Mutan- ty (nr) Mut- tants (No.)	Mutacje <sup>3/</sup> Mutations <sup>3/</sup>
1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	1	Kwiaty języczkowe jas- nozółte (14A <sup>1/</sup> , 10A <sup>2/</sup> ) Bright yellow ligulate florets (14A <sup>1/</sup> , 10A <sup>2/</sup> )	I	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
	gamma	5	0		Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (36,5) Smaller number of ligula- te florets (36,5)		
		10	0				
		15	0				
		20	1				
		25	0				
ex vitro	X	5	0	Kwiaty języczkowe zwi- nięte w rurki Ligulate florets scrolled into tubes		-	
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
	gamma	5	0				
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				

<sup>1/</sup> Barwa kwiatów języczkowatych od ich strony wewnętrznej  
The colour of ligulate florets from their inside<sup>2/</sup> Barwa kwiatów języczkowatych od ich strony zewnętrznej  
The colour of ligulate florets from their outside<sup>3/</sup> Cecha powtórzona (+) lub nie powtórzona (-) w pokoleniu  $vM_2$   
Traits repeated (+) or not repeated (-) in  $vM_2$  generation

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	2	Kwiaty języczkowe jasnożółte (14A, 10A) Bright yellow ligulate florets (14A, 10A)	I	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 1 1 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	3	Kwiaty języczkowe jasnożółte (14A, 10A) Bright yellow ligulate florets	I	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	3	Kwiaty języczkowe jasnożółte (14A, 10A) Bright yellow ligulate florets	I	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	4	Kwiaty języczkowe żółte (20A, 8B) Yellow ligulate florets (20A, 8B)	II	+
		10	1				
		15	7				
		20	3				
		25	0				
gamma	5	0	Mniejsza liczba kwiatów języczkowych (29,8) Smaller number of ligulate florets (29,8)	+			
	10	0					
	15	0					
	20	0					
	25	0					
ex vitro	X	5	0	5	Mniejsza liczba kwiatostanów na pędzie (5,1) Smaller number of inflorescences on the shoot (5,1)		+
		10	0				
		15	1				
		20	0				
		25	0				
gamma	5	5	Kwiaty języczkowe pomarańczowe (26A, 12A) Orange ligulate florets (26A, 12A)	III	+		
	10	6					
	15	1					
	20	0					
	25	0					
ex vivo	X	5	4	5	Kwiaty języczkowe pomarańczowe (26A, 12A) Orange ligulate florets (26A, 12A)	III	+
		10	2				
		15	2				
		20	2				
		25	3				
gamma	5	0	Mniejsza liczba kwiatostanów na pędzie (5,1) Smaller number of inflorescences on the shoot (5,1)		+		
	10	0					
	15	0					
	20	2					
	25	1					
ex vitro	X	5	0	5	Kwiaty języczkowe pomarańczowe (26A, 12A) Orange ligulate florets (26A, 12A)	III	+
		10	0				
		15	1				
		20	2				
		25	0				
gamma	5	5	Mniejsza liczba kwiatostanów na pędzie (5,1) Smaller number of inflorescences on the shoot (5,1)		+		
	10	4					
	15	1					
	20	3					
	25	0					



1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 2 2 5	6	Kwiaty języczkowe pomarańczowe (26A, 12A) Orange ligulate florets (26A, 12A)	IV	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	7	Zmiany w budowie morfologicznej liści (rys.32) Changes in morphological structure of leaves (Fig. 32)		+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	7	Kwiaty języczkowe żółtopomarańczowe (28A, 10B) Yellow orange ligulate florets (28A, 10B)	V	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	7	Kwiaty języczkowe zwinięte w rurki Ligulate florets scrolled into tubes		-
	gamma	5 10 15 20 25	0 1 0 3 0				

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	8	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
ex vivo	gamma	5	0	8	Większa liczba kwiatów języczkowatych (73,2) Greater number of ligulate florets (73,2)		-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
ex vitro	X	5	0	8	Większa średnica kwiatostanów (6,7 cm) - kwiaty języczkowe dłuższe (2,8 cm) Greater diameter of inflorescences (6,7 cm) - longer ligulate florets		-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
ex vitro	gamma	5	0	8	Większa średnica kwiatostanów (6,7 cm) - kwiaty języczkowe dłuższe (2,8 cm) Greater diameter of inflorescences (6,7 cm) - longer ligulate florets		-
		10	0				
		15	6				
		20	0				
ex vivo	X	5	3	9	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VII	+
		10	0				
		15	0				
		20	8				
ex vivo	gamma	5	0	9	Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (38,0). Smaller number of ligulate florets (38,0)		+
		10	1				
		15	0				
		20	1				
ex vitro	X	5	0	9	Większa średnica kwiatostanów (6,6 cm) - kwiaty języczkowe dłuższe (3,0 cm) Greater diameter of inflorescences (6,6 cm) - longer ligulate florets (3,0 cm)		-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
ex vitro	gamma	5	1	9	Większa średnica kwiatostanów (6,6 cm) - kwiaty języczkowe dłuższe (3,0 cm) Greater diameter of inflorescences (6,6 cm) - longer ligulate florets (3,0 cm)		-
		10	2				
		15	0				
		20	1				
ex vitro	gamma	5	1	9	Większa średnica kwiatostanów (6,6 cm) - kwiaty języczkowe dłuższe (3,0 cm) Greater diameter of inflorescences (6,6 cm) - longer ligulate florets (3,0 cm)		-
		10	2				
		15	0				
		20	1				
ex vitro	gamma	5	0	9	Większa średnica kwiatostanów (6,6 cm) - kwiaty języczkowe dłuższe (3,0 cm) Greater diameter of inflorescences (6,6 cm) - longer ligulate florets (3,0 cm)		-
		10	2				
		15	0				
		20	1				

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 2	10	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A) Mniejsza średnica kwiatostanów (3,1 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,1 cm) Smaller diameter of inflorescences (3,1 cm) - shorter ligulate florets (1,1 cm) Większa liczba kwiatostanów na pędzie (16,2) Greater number of inflorescences on the shoot (16,2) Krótsze pędy roślin (45,6 cm) Shorter plant shoots (45,6 cm)	VIII	+  +  +
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	11	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A) Mniejsza średnica kwiatostanów (3,8 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,6 cm); (rys. 28) Smaller diameter of inflorescences (3,8 cm) - shorter ligulate florets (1,6 cm); (Fig. 28) Większa liczba kwiatostanów na pędzie (17,5) Greater number of inflorescences on the shoot (17,5)	IX	+  +  +
	gamma	5 10 15 20 25	1 1 5 5 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	11	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A) Mniejsza średnica kwiatostanów (3,8 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,6 cm); (rys. 28) Smaller diameter of inflorescences (3,8 cm) - shorter ligulate florets (1,6 cm); (Fig. 28) Większa liczba kwiatostanów na pędzie (17,5) Greater number of inflorescences on the shoot (17,5)	IX	+  +  +
	gamma	5 10 15 20 25	0 9 0 0 0				

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 2 1 2 0	12	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	12	Mniejsza średnica kwiatostanów (4,2 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,7 cm) Smaller diameter of inflorescences (4,2 cm) - shorter ligulate florets (1,7 cm)		-
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vivo	X	5 10 15 20 25	17 8 20 14 4	13	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	X	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 1 6 2				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 2 2 0 0	13			
	gamma	5 10 15 20 25	2 5 1 1 0				

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	14	Kwiaty języczkowate pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	5	0	Większa liczba kwiatów języczkowatych (91,0) Greater number of ligulate florets (91,0)	-			
	10	0					
	15	0					
	20	0					
	25	1					
ex vitro	X	5	0	15	Kwiaty języczkowate zwinęte w rurki Ligulate florets scrolled into tubes	VI	-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	5	0	Część kwiatów języczkowatych w kwiatostanie różnorodnie lecz charakterystycznie powcinanych Inflorescences ligulate florets variously but characteristically cut in	-			
	10	0					
	15	0					
	20	0					
	25	0					
ex vivo	X	5	0	15	Kwiaty języczkowate pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	5	0	Większa liczba kwiatów języczkowatych (74,0) Greater number of ligulate florets (74,0)	-			
	10	0					
	15	0					
	20	0					
	25	0					
ex vitro	X	5	0	15	Część kwiatów języczkowatych w kwiatostanie różnorodnie lecz charakterystycznie powcinanych Inflorescences ligulate florets variously but characteristically cut in	VI	-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	5	1	Część kwiatów języczkowatych w kwiatostanie różnorodnie lecz charakterystycznie powcinanych Inflorescences ligulate florets variously but characteristically cut in	-			
	10	3					
	15	0					
	20	1					
	25	0					

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	16	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	gamma	5	0	Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (36,0) Smaller number of ligulate florets (36,0)			-
		10	3				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
ex vitro	X	5	0	16	Kwiaty języczkowe zwinięte w rozplaszczone na końcu rurki Ligulate florets scrolled into tubes with flat ends		-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	gamma	5	0	Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (33,3) Smaller number of ligulate florets (33,3)			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
ex vivo	X	5	0	17	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	2				
		20	1				
		25	1				
gamma	gamma	5	0	Kwiaty języczkowe zwinięte w rurki Ligulate florets scrolled into tubes			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
ex vitro	X	5	0	17	Kwiaty języczkowe zwinięte w rurki Ligulate florets scrolled into tubes		-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	gamma	5	0	Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (33,3) Smaller number of ligulate florets (33,3)			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	18	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	2				
		15	1				
		20	3				
		25	3				
gamma	gamma	5	0	Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (32,0) Smaller number of ligulate florets (32,0)			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
ex vitro	X	5	0	19	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	0				
		20	5				
		25	0				
gamma	gamma	5	0	Kwiaty języczkowe zwinięte w rozplaszczone na końcu rurki (rys. 30) Ligulate florets scrolled into tubes with flat ends (Fig. 30)			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
ex vitro	X	5	0	19	Kwiaty języczkowe pomarańczowoczerwone (32A, 16A) Orange red ligulate florets (32A, 16A)	VI	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
gamma	gamma	5	0	Kwiaty języczkowe zwinięte w rozplaszczone na końcu rurki (rys. 30) Ligulate florets scrolled into tubes with flat ends (Fig. 30)			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	20	Kwiaty języczkowe jasnoczerwone (44A, 20A) Bright red ligulate florets (44A, 20A) Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (32,8) Smaller number of ligulate florets (32,8) Mniejsza średnica kwiatostanów (4,2 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,7 cm) Smaller diameter of inflorescences (4,2 cm) - shorter ligulate florets (1,7 cm)	XI	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
		25	0				
ex vivo	gamma	5	0	21	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+
		10	0				
		15	0				
		20	1				
		25	0				
ex vivo	X	5	0	21	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+
		10	3				
		15	9				
		20	4				
		25	5				
ex vivo	gamma	5	0	21	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+
		10	0				
		15	0				
		20	1				
		25	3				
ex vitro	X	5	0	21	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+
		10	2				
		15	2				
		20	3				
		25	0				
ex vitro	gamma	5	6	21	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+
		10	6				
		15	3				
		20	5				
		25	0				



1	2	3	4	5	6	7	8			
ex vivo	X	5	0	22	Kwiaty języczkowate bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+			
		10	0							
		15	0							
		20	0							
		25	0							
gamma	gamma	5	0	Większa liczba kwiatów języczkowatych (86,0) Greater number of ligulate florets (86,0)	-					
		10	0							
		15	0							
		20	0							
		25	0							
ex vitro	X	5	0	23	Kwiaty języczkowate bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+			
		10	0							
		15	0							
		20	0							
		25	0							
	gamma	gamma	5					0	Mniejsza średnica kwiatostanów (4,0 cm) - kwiaty języczkowate krótsze (1,5 cm) Smaller diameter of inflorescences (4,0 cm) - shorter ligulate florets (1,5 cm)	-
			10					1		
			15					0		
			20					0		
			25					0		
ex vivo	X	5	0	23	Kwiaty języczkowate bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+			
		10	1							
		15	0							
		20	0							
		25	0							
	gamma	gamma	5					0	Większa liczba kwiatów języczkowatych (78,0) Greater number of ligulate florets (78,0)	-
			10					0		
			15					0		
			20					0		
			25					0		
ex vitro	X	5	0	23	Kwiaty języczkowate (0,9 cm) Wider ligulate florets (0,9 cm)	-	-			
		10	0							
		15	0							
		20	0							
		25	0							
	gamma	gamma	5					0	Szersze kwiaty języczkowate (0,9 cm) Wider ligulate florets (0,9 cm)	-
			10					0		
			15					0		
			20					0		
			25					0		

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	24	Kwiaty języczkowe bor- dowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)  Większa liczba kwiatów języczkowatych (82,3) Greater number of ligula- te florets (82,3)	XII	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	25	Kwiaty języczkowe bor- dowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)  Mniejsza średnica kwiatostanów (4,7 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,8 cm) Smaller diameter of inflorescences (4,7 cm) - shorter ligulate florets (1,8 cm)	XII	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 4 0				
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	25	Kwiaty języczkowe os- tro zakończone Ligulate florets with , sharp ends	XII	-
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 1 0 0	26	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)  Mniejsza średnica kwiatostanów (4,5 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,7 cm) Smaller diameter of inflorescences (4,5 cm) - - shorter ligulate florets (1,7 cm)	XII	+  -
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 1 0 0 0	27	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)  Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (28,6) Smaller number of ligulate florets (28,6)  Szersze kwiaty języczkowe (0,8 cm) Wider ligulate florets (0,8 cm)	XII	+  -  -
	gamma	5 10 15 20 25	0 1 0 1 0				
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 1	27	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)  Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (28,6) Smaller number of ligulate florets (28,6)  Szersze kwiaty języczkowe (0,8 cm) Wider ligulate florets (0,8 cm)	XII	+  -  -
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	27	Kwiaty języczkowe bordowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)  Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (28,6) Smaller number of ligulate florets (28,6)  Szersze kwiaty języczkowe (0,8 cm) Wider ligulate florets (0,8 cm)	XII	+  -  -
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 1 0				

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	28	Kwiaty języczkowe bor- dowe (46A, 26B) Crimson ligulate florets (46A, 26B)	XII	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 3 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vivo	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0	29	Kwiaty języczkowe ma- linowe (51A, 70A) Raspberry ligulate florets (51A, 70A)	XIII	+
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
ex vitro	X	5 10 15 20 25	0 0 0 0 0				
	gamma	5 10 15 20 25	0 0 0 2 0				

c.d. Tabeli 5

1	2	3	4	5	6	7	8
ex vivo	X	5	0	30	Kwiaty języczkowe wiśniowe (53A, 13B) Cherry ligulate florets (53A, 13B) Mniejsza liczba kwiatów języczkowatych (27,8) Smaller number of ligulate florets (27,8) Mniejsza średnica kwiatostanów (4,7 cm) - kwiaty języczkowe krótsze (1,7 cm) Smaller diameter of inflorescences (4,7 cm) - shorter ligulate florets (1,7 cm)	XIV	+
		10	0				
		15	0				
		20	0				
	gamma	25	0				-
		5	0				
		10	0				
		15	0				
ex vitro	X	5	0	Zmiany w budowie morfologicznej liści (rys. 34) Changes in morphological structure of leaves (Fig. 34)			-
		10	0				
		15	0				
		20	0				
	gamma	25	0				+
		5	0				
		10	1				
		15	0				
		20	3				
		25	0				

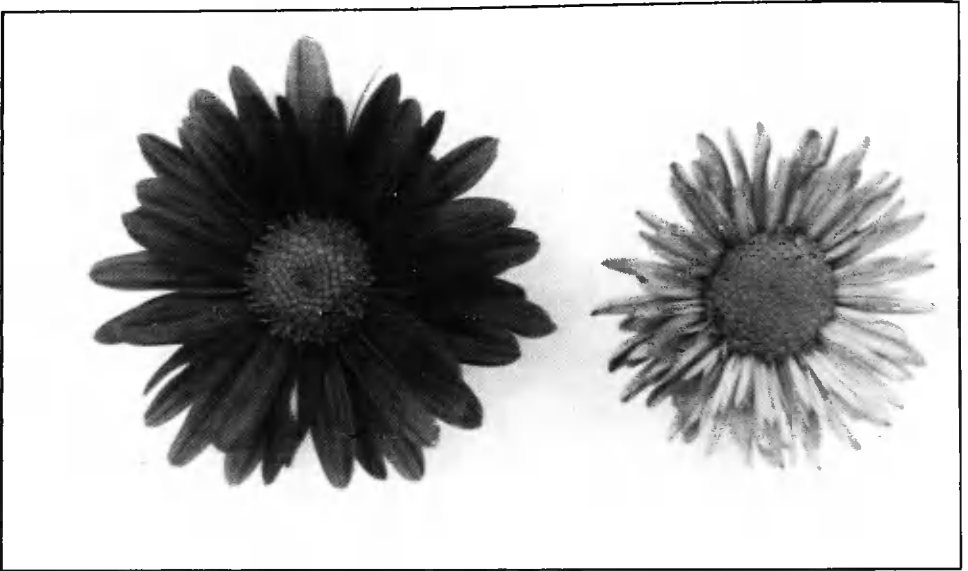
Średnie wartości cech roślin kontrolnych w pokoleniu  $vM_2$  przedstawiono w tabeli 6  
Average values of control plants traits in  $vM_2$  generation are presented in Table 6

Średnie wartości cech mutantów i roślin kontrolnych w pokoleniach  $vM_2$  i  $vM_3$  przedstawiono w tabelach 7 i 8  
Average values of mutants and control plants traits in  $vM_2$  and  $vM_3$  generations are presented in Tables 7 and 8

Tabela 6  
Table 6

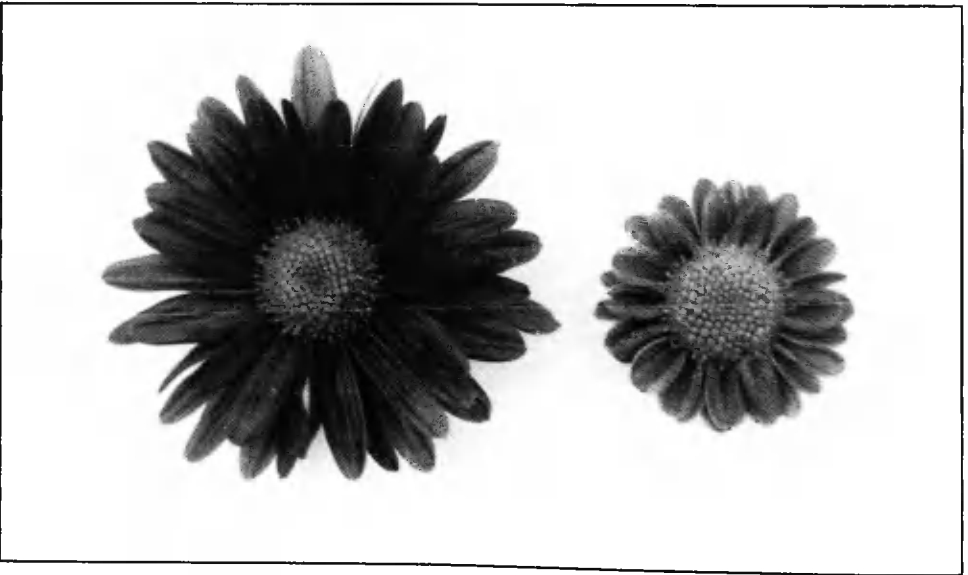
Średnie wartości cech roślin kontrolnych w pokoleniu vM<sub>2</sub>  
Average values of control plants traits in vM<sub>2</sub> generation

Sposób re- generacji roślin Method of plant re- generation	Pełnia kwit- nienia roślin Fullness of flowering plants	Długość pędu (cm) Length of stem (cm)	Kwiatostany Inflorescences		Kwiaty języczkowe Ligulate florets					
			liczba number	średnica diameter (cm)	liczba number	długość length (cm)	szerokość width (cm)	barwa - colour umowna descriptive		
in vivo	11.XI	95,1	11,3	5,2	53,3	2,1	0,6	ciemnoczerwona dark red	45A	13A
in vitro	12.XI	91,4	10,5	5,7	48,4	2,2	0,6	ciemnoczerwona dark red	45A	13A



Rys.27. Kwiatostany odmiany 'Red Nero' (z lewej) i wariantu nr 3 (z prawej)

Fig.27. Inflorescences of cultivar 'Red Nero' (left) and variant No. 3 (right)



Rys.28. Kwiatostany odmiany 'Red Nero' (z lewej) i wariantu nr 11 (z prawej)

Fig.28. Inflorescences of cultivar 'Red Nero' (left) and variant No. 11 (right)



Rys.29. Kwiatostany odmiany 'Red Nero' (z lewej) i warianta nr 13 (z prawej)

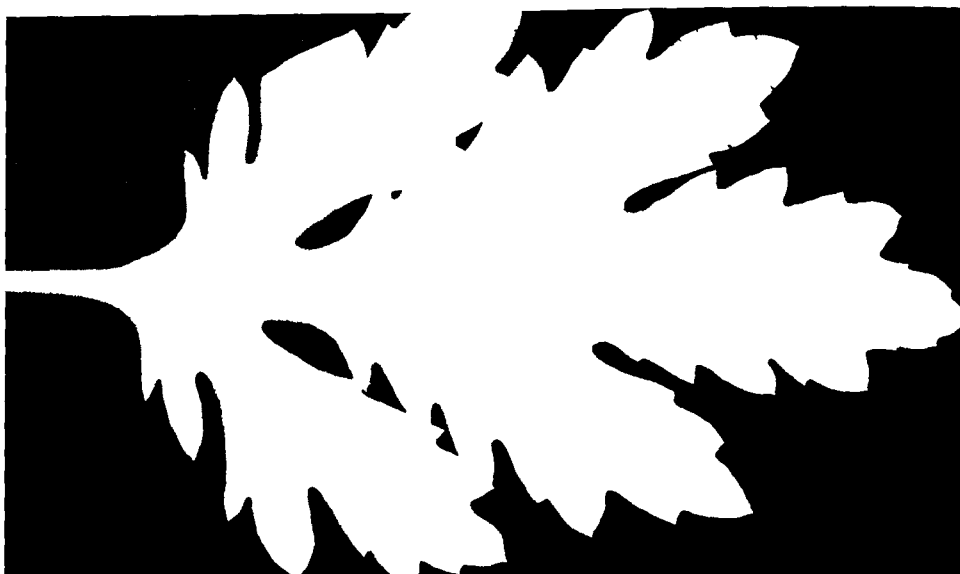
Fig.29. Inflorescences of cultivar 'Red Nero' (left) and variant No. 13 (right)



Rys.30. Kwiatostany odmiany 'Red Nero' (z lewej) i warianta nr 19 (z prawej)

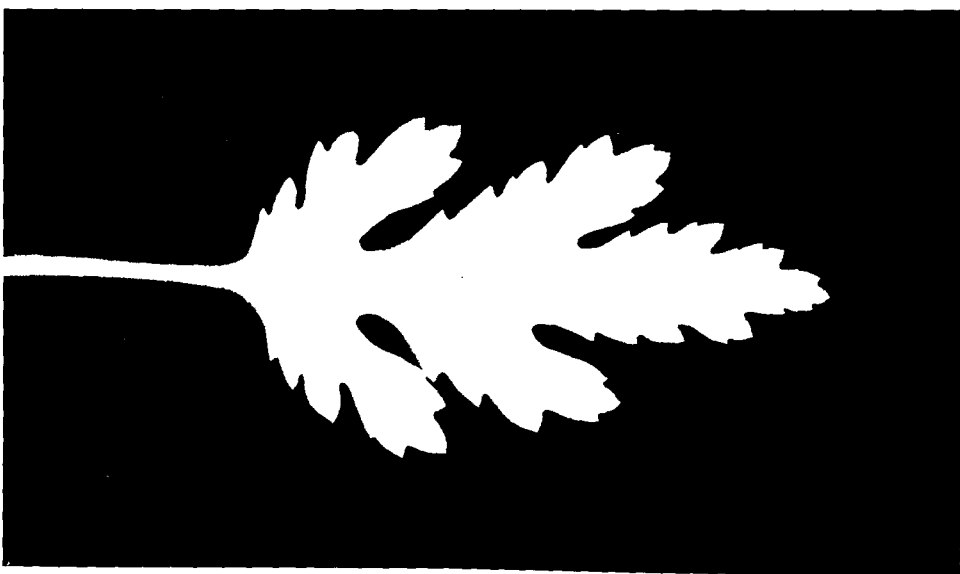
Fig.30. Inflorescences of cultivar 'Red Nero' (left) and variant No. 19 (right)





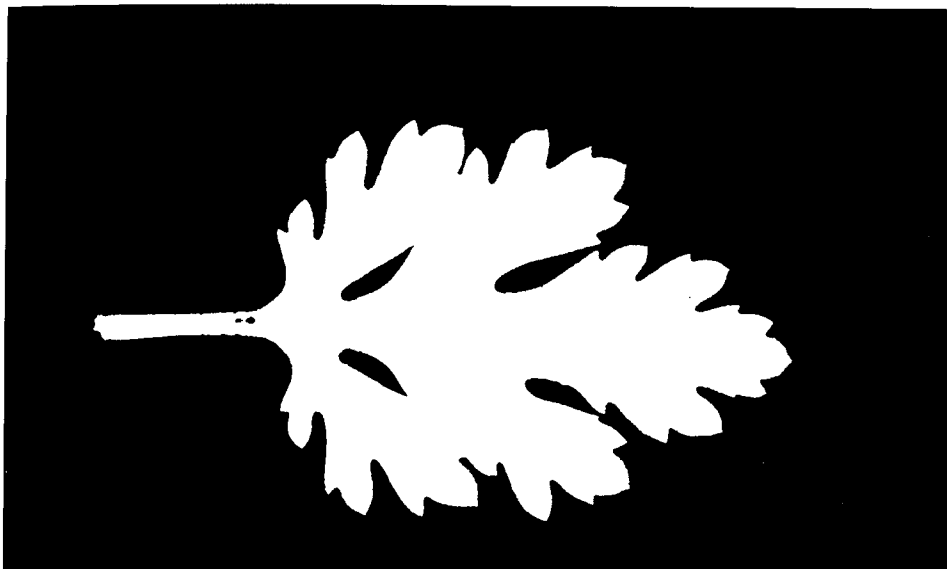
Rys.31. Liść odmiany 'Red Nero'

Fig.31. Leaf of cultivar 'Red Nero'



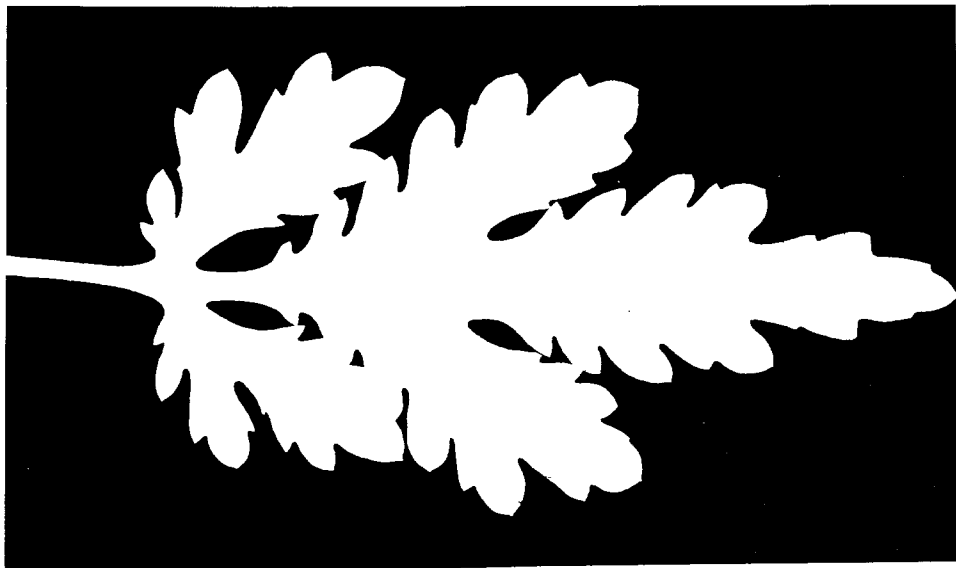
Rys.32. Liść wariantu nr 6

Fig.32. Leaf of variant No. 6



Rys.33. Liść wariantu nr 10

Fig.33. Leaf of variant No. 10



Rys. 34. Liść wariantu nr 30.

Fig. 34. Leaf of variant No. 30

Z ogólnej liczby 355 wariantów wyodrębnionych w pokoleniu vM<sub>1</sub> 279 stanowiło rezultat indukowania zmian, niezależnie od sposobu regeneracji roślin. Natomiast 21 wariantów zaobserwowano u roślin zregenerowanych *in vivo*, poddanych działaniu promieniowania X. Były to warianty oznaczone w tabeli 5 numerami 6, 10, 12, 17 i 23. U roślin zregenerowanych z sadzonek liściowych, poddanych działaniu promieniowania gamma, wyodrębniono 23 warianty, którym odpowiadały numery 1, 2, 3, 14, 16, 19 i 28.

Na szczególną uwagę zasługują dwa warianty nr 10, zaobserwowane tylko u roślin zregenerowanych z sadzonek liściowych *ex vivo*, poddanych działaniu promieniowania X w dawce 25 Gy. Rośliny te oprócz barwy zmienionej z ciemnoczerwonej na pomarańczowoczerwoną miały miniaturowe kwiatostany oraz słabą siłę wzrostu. Ponadto wyróżniały się większą liczbą kwiatostanów na pędzie oraz odmiennymi liśćmi.

Wariantem stanowiącym wyłącznie efekt indukowania mutacji techniką *in vitro* z wykorzystaniem promieniowania X okazał się wariant nr 25. Natomiast 31 wariantów, oznaczonych numerami 7, 8, 15, 20, 22, 24, 29 i 30, wyodrębniono jedynie u roślin uzyskanych w rezultacie działania promieniowania gamma na eksplantaty liściowe. Niektóre wyodrębnione warianty były charakterystyczne także dla jednej lub kilku określonych dawek promieniowania.

Ze wszystkich uzyskanych wariantów aż 248 powtórzyło wszystkie zmienione cechy roślin, na podstawie których zostały wyróżnione. Były to warianty nr 4, 5, 10, 11, 13, 20, 21 i 29.

U wszystkich wariantów zaobserwowane zmiany dotyczyły zawsze barwy kwiatów jęczyczkowatych. Łącznie zaobserwowano 9 różnych wariacji barwy. Ciemnoczerwona barwa kwiatostanu odmiany 'Red Nero' uległa zmianie na jasnożółtą, żółtą, pomarańczową, żółtopomarańczową, pomarańczowoczerwoną, jasnoczerwoną, bordową, malinową i wiśniową. We wszystkich przypadkach zmiana barwy objęła całą powierzchnię kwiatostanu. U większości z nich odmienna barwa powiązana była z równoczesną zmianą innych cech obejmujących zmniejszenie lub zwiększenie liczby kwiatów jęczyczkowatych w kwiatostanie, średnicy kwiatostanów; zmianę kształtu kwiatów jęczyczkowatych na szersze, ostro zakończone, powcinane, zwinięte w rurki nierozpłaszczone, jak i rozpłaszczone na końcu; zmniejszenie lub zwiększenie liczby kwiatostanów na pędzie, skrócenie pędów roślin oraz zmianę w budowie morfologicznej liści.

Niektóre wariacje były charakterystyczne dla sposobu regeneracji roślin jednego z zastosowanych źródeł promieniowania, bądź też dla określonej jego dawki. Trzy wariacje występowały tylko u roślin zregenerowanych *ex vivo*: jasnożółta barwa kwiatów jęczyczkowatych, kwiaty jęczyczkowate zwinięte w rozpłaszczone na końcu rurki oraz skrócone pędy roślin. Pierwszą z nich zaobserwowano u roślin otrzymanych ze zregenerowanych sadzonek liściowych *ex vivo*, potraktowanych promieniowaniem gamma we wszystkich zastosowanych dawkach. Kolejną wariację otrzymano także w przypadku promieniowania gamma, lecz użytego w dawce od 10 do 25 Gy. Natomiast pędy krótsze od roślin nie napromienionych

miały tylko rośliny zregenerowane z sadzonek liściowych, poddane działaniu promieniowania X w dawce 25 Gy.

Wariancjami stanowiącymi wyłącznie efekt indukowania mutacji *ex vitro* promieniami gamma okazały się żółtopomarańczowa, jasnoczerwona i wiśniowa barwa kwiatów jęczminkowatych - zaobserwowane po zastosowaniu dawek 10 i 20 Gy. Natomiast malinową barwę kwiatostanów wyodrębniono po zastosowaniu dawki 20 Gy, a charakterystycznie powcinane kwiaty jęczminkowate po zastosowaniu dawek 5, 10 i 20 Gy. Odmienną od roślin nie napromienionych budowę morfologiczną liści zaobserwowano zarówno u roślin zregenerowanych *in vivo* (warianty nr 6 i 10), jak i *in vitro* (warianty nr 30). W obu przypadkach wiancji tej towarzyszyły również inne zmienione cechy roślin.

Z wszystkich uzyskanych wiancji dotyczących barwy kwiatostanów tylko dwie - pomarańczowa i bordowa - wystąpiły również jako jedyne cechy wyodrębnionych wariantów. Tak więc na 22 wiancje, zaobserwowane u wariantów zregenerowanych *ex vivo* i *ex vitro*, 20 wiancji pojawiło się z co najmniej jedną, towarzyszącą barwie, inną zmienioną cechą.

## 5. Mutanty i mutacje w pokoleniu $vM_2$

Nie wszystkie wariacje zaobserwowane w pierwszym wegetatywnym pokoleniu mutacyjnym  $vM_1$  powtórzyły się w drugim wegetatywnym pokoleniu mutacyjnym  $vM_2$ . Zaobserwowano takie przypadki, w których wszystkie cechy zmienione u określonego wariantu dziedziczyły się przy wegetatywnym rozmnażaniu w pokoleniu  $vM_2$  oraz takie, gdzie w drugim pokoleniu powtórzyła się tylko jedna cecha (tab. 5). Takie warianty, u których choćby jedna z wariacji powtórzyła się w pokoleniu  $vM_2$ , uznano za mutanty, a wariacje ujawnione powtórnie w pokoleniu  $vM_2$ , uznano za mutacje. Mutanty oznaczono w tabeli 5 kolejnym i cyframi rzymskimi.

Wegetatywnie dziedziczyły się takie cechy, jak barwa kwiatów języczkowatych, mniejsza lub większa liczba kwiatostanów na pędzie, krótsze pędy roślin oraz odmienna budowa morfologiczna liści.

Zaobserwowane w pokoleniu  $vM_1$  interesujące wariacje, widoczne tylko u roślin zregenerowanych techniką *in vitro*, polegające na różnorodnym powcinaniu kwiatów języczkowatych w kwiatostanie, a także na zwinięciu ich w rurki, nie powtórzyły się. Przy wegetatywnym rozmnażaniu roślin nie dziedziczyły się także takie zmienione cechy, jak większa średnica kwiatostanów oraz szersze i ostro zakończone kwiaty języczkowate. Wariacja dotycząca zmniejszenia liczby kwiatów języczkowatych w kwiatostanie powtórzyła się w przypadku mutantów nr II, V, VII, XI i XIII, a nie powtórzyła się u wariantów nr 1, 16, 17, 18, 27, 28 i 30. Natomiast wariacja polegająca na zwiększeniu liczby kwiatów języczkowatych powtórzyła się jedynie w przypadku mutantów nr X. Zmniejszona w wyniku napromienienia średnica kwiatostanów powtórzyła się u mutantów nr VIII, IX, XI, a nie powtórzyła się u wariantów nr 12, 22, 25, 26 i 30. Na rycinach 35 - 38 przedstawiono mutanty nr III, VI, VIII i IX.

## 6. Charakterystyka wymiernych cech mutantów w pokoleniach $vM_2$ i $vM_3$

Charakterystykę morfologiczną wraz z terminami kwitnienia mutantów drugiego wegetatywnego pokolenia mutacyjnego, rozmnożonych *in vivo*, pochodzących ze zregenerowanych w pokoleniu  $vM_1$  roślin *ex vivo* i *ex vitro*, przedstawiono w tabeli 7. Ujęto tam tylko mutanty nr II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XIII - tzn. te, u których choćby jedna z wymienionych cech roślin różniła się zasadniczo od odmiany 'Red Nero'. Pominięto natomiast te, u których żadna z wymiernych cech nie różniła się znacząco od roślin nie napromienionych, lecz charakteryzowały się jedynie mutacją barwy kwiatostanu, czy też zmianą związaną z budową morfologiczną liści.

W drugim pokoleniu mutacyjnym zaobserwowano, że rośliny mutantów nr II o kwiatostanach żółtych, różniły się od roślin kontrolnych pod względem liczby kwiatostanów na pędzie oraz liczby kwiatów języczkowatych w kwiatostanie.



Rys.35. Odmiana 'Red Nero' (z prawej) i mutant nr III (z lewej)

Fig.35. Cultivar 'Red Nero' (right) and mutant No. III (left)



Rys.36. Odmiana 'Red Nero' (z prawej) i mutant nr VI (z lewej)

Fig.36. Cultivar 'Red Nero' (right) and mutant No. VI (left)



Rys.37. Odmiana 'Red Nero' (z prawej) i mutant nr VIII (z lewej)

Fig.37. Cultivar 'Red Nero' (right) and mutant No. VIII (left)



Rys.38. Odmiana 'Red Nero' (z prawej) i mutant nr IX (z lewej)

Fig.38. Cultivar 'Red Nero' (right) and mutant No. IX (left)

Tabela 7  
Table 7

Średnie wartości cech mutantów i roślin kontrolnych w pokoleniu vM<sub>2</sub>  
Average values of mutants and control plants traits in vM<sub>2</sub> generation

Mutanty (Nr) Mutants (No.)	Obiekt na- promieniowania Irradiation object	Rodzaj pro- mieniowania Kind of irradiation	Dawka napro- mieniowania Irradiation dose (Gy)	Pełnia kwitnienia Fullness of flowering	Długość pędu Length of stem (cm)	Kwiatostany Inflorescences		Kwiaty języczkowe Ligulate florets		
						Liczba Number	Średnica Diameter (cm)	Liczba Number	Długość Length (cm)	Szerokość Width (cm)
II	ex vivo	X	10	15.XI	79,8	7,8*	4,9	29,5*	2,3	0,6
			15	14.XI	80,2	7,7*	5,0	29,3*	2,2	0,5
			20	15.XI	80,3	7,9*	5,1	30,0*	2,3	0,6
V	ex vitro	X	15	16.XI	79,7	8,0*	5,0	29,0*	2,3	0,6
			5	14.XI	79,2	7,7*	5,0	29,9*	2,2	0,6
			10	15.XI	81,2	7,9*	5,0	29,8*	2,3	0,6
VII	ex vivo	gamma	15	17.XI	81,0	8,0*	5,0	30,0*	2,3	0,6
			10	14.XI	81,1	8,0*	5,1	29,6*	2,1	0,6
			20	14.XI	81,3	7,8*	4,8	29,6*	2,2	0,6
VIII	ex vivo	X	5	15.XI	78,8	11,0	4,9	33,2*	2,0	0,6
			10	15.XI	79,5	11,1	4,7	33,5*	2,0	0,6
			20	16.XI	79,2	11,8	4,9	34,0*	2,1	0,6
VIII	ex vitro	gamma	2,5	15.XI	80,5	11,4	5,2	33,8*	2,1	0,6
			5	16.XI	78,8	12,0	4,9	33,2*	2,0	0,6
			10	16.XI	78,5	11,0	5,1	34,0*	2,0	0,6
VIII	ex vivo	X	20	18.XI	79,2	11,3	4,6	33,7*	2,1	0,6
			25	15.XI	44,0*	14,8*	3,0*	47,9	1,1*	0,5



IX	ex vivo	X	10	14.XI	78,9	15,0*	3,3*	48,1	1,3*	0,5
			15	14.XI	80,0	15,8*	3,3*	48,3	1,3*	0,5
			20	15.XI	78,6	15,3*	3,2*	48,0	1,2*	0,5
			25	17.XI	79,4	16,0*	3,1*	48,3	1,2*	0,5
			gamma	17.XI	80,2	15,9*	3,4*	49,2	1,4*	0,5
	ex vitro	gamma	10	16.XI	79,3	15,1*	3,5*	48,7	1,3*	0,5
			15	17.XI	79,2	15,6*	3,5*	49,0	1,3*	0,5
			20	17.XI	78,5	16,1*	3,3*	48,9	1,4*	0,5
			10	18.XI	78,6	15,4*	3,3*	49,2	1,4*	0,5
			X	15.XI	79,7	11,6	5,3	89,7*	2,1	0,6
X	ex vivo	X	10	14.XI	80,4	11,2	5,1	91,1*	2,3	0,5
			15	12.XI	80,0	10,8	5,0	90,0*	2,4	0,6
			20	15.XI	79,2	11,8	5,1	91,0*	2,2	0,5
			25	16.XI	81,1	11,0	5,0	90,5*	2,1	0,6
			gamma	14.XI	79,5	11,5	5,4	91,1*	2,3	0,5
	ex vitro	X	10	16.XI	80,0	11,5	5,3	89,9*	2,2	0,6
			15	15.XI	79,4	11,0	5,2	89,9*	2,3	0,5
			gamma	16.XI	80,0	11,0	4,9	89,8*	2,3	0,5
			10	16.XI	81,0	10,7	4,8	90,7*	2,3	0,5
			15	16.XI	78,9	11,1	5,2	91,0*	2,3	0,5
XI	ex vitro	gamma	20	15.XI	80,1	11,4	5,3	97,9*	2,3	0,5
			10	17.XI	79,1	7,8*	3,6*	33,3*	1,5*	0,5
XIII	ex vitro	gamma	25	16.XI	81,0	7,9*	3,5*	33,7*	1,4*	0,5
			20	13.XI	79,6	11,0	5,1	27,8*	2,2	0,5
		Kontrola 'Red Nero' - Control 'Red Nero'		15.XI	79,3	11,3	5,1	48,4	2,2	0,5

\* Objašnjenje jak na str. 16 Explanation as on the page 16

Liczba kwiatostanów na pędzie była średnio o 30,1% mniejsza, a liczba kwiatów języczkowatych uległa zmniejszeniu o 38,8%.

U mutantów nr V o żółtopomarańczowych kwiatach języczkowatych oprócz wyraźnego zmniejszenia liczby kwiatostanów na pędzie, średnio o 30,1%, zaobserwowano także zmniejszoną liczbę kwiatów języczkowatych, średnio o 38,8%.

Rośliny mutantów nr VII o pomarańczowoczerwonych kwiatostanach miały mniejszą od roślin nie napromienionych liczbę kwiatów języczkowatych, średnio o 30,6%, zależną od obiektu i dawki napromienienia.

Najbardziej efektywne mutanty nr VIII, o pomarańczowoczerwonych kwiatostanach, najwyraźniej wyróżniały się wśród pozostałych mutantów charakteryzując się wyraźnym, bo aż o 44,5% zredukowaniem długości pędów, zwiększeniem o 31,0% liczby kwiatostanów na pędzie, zmniejszeniem o 41,2% średnicy kwiatostanów i związanym z tym skróceniem o połowę długości kwiatów języczkowatych.

Podobnymi cechami, jednak przy zachowaniu wzrostu zbliżonego do odmiany wyjściowej 'Red Nero', charakteryzowały się mutanty nr IX. Rośliny wyróżniały się stosunkowo wysoką liczbą kwiatostanów na pędzie, zwiększoną o 38,1% oraz zmniejszoną o 35,3% średnicą kwiatostanów związaną ze skróconą o 40,9% długością kwiatów języczkowatych.

Rośliny mutantów nr X, także o pomarańczowoczerwonych kwiatostanach, miały zdecydowanie więcej kwiatów języczkowatych w kwiatostanie. Ich liczba uległa zwiększeniu o 90,1%. U roślin otrzymanych po zastosowaniu promieni gamma w dawce 20 Gy, zregenerowanych ex vivo i ex vitro, liczba kwiatów języczkowatych zwiększyła się o ponad 100%.

Mutanty jasnoczerwone oznaczone w tabeli 5 numerem XI, wyróżniały się kilkoma jednocześnie zmienionymi cechami roślin. Rośliny miały mniej kwiatostanów na pędzie - średnio o 30,1%, mniejsze kwiatostany - o 29,4% oraz mniej kwiatów języczkowatych - średnio o 30,8%.

Mutanty nr XIII o malinowych kwiatostanach, podobnie jak mutanty nr VII, miały mniejszą liczbę kwiatów języczkowatych w kwiatostanie. W porównaniu z roślinami nie napromienionymi liczba ich uległa zmniejszeniu o 42,6%.

U prawie wszystkich zestawionych w tabeli 7 mutantów widoczna była zależność wymiernych cech morfologicznych, wyraźnie różniących je od odmiany 'Red Nero' od obiektu napromienienia, rodzaju promieniowania oraz zastosowanej dawki. Żaden z zaobserwowanych mutantów nie wyróżniał się wczesnością ani też opóźnieniem kwitnienia w porównaniu z roślinami nie napromienionymi.

W trzecim pokoleniu mutacyjnym -  $vM_3$  nie zmieniły się znacząco wymierne cechy morfologiczne żadnego z mutantów (tab. 8). Zmiany, na podstawie których je wyodrębniono, okazały się mutacjami dziedzicznymi przy wegetatywnym rozmnażaniu przez wszystkie rośliny pokolenia  $vM_3$ . Utrzymywały się one na zbliżonym do roku poprzedniego poziomie.

Średnie wartości cech mutantów i roślin kontrolnych w pokoleniu vM<sub>3</sub>  
Average values of mutants and control plants traits in vM<sub>3</sub> generation

Mutanty (Nr) Mutants (No.)	Obiekt na- promienienia Irradiation object	Rodzaj pro- mieniowania Kind of irradiation	Dawka napro- mieniowania Irradiation dose (Gy)	Pełnia kwitnienia Fullness of flowering	Długość pędu Length of stem (cm)	Kwiatostany Inflorescences		Kwiaty języczkowe Ligulate florets		
						Liczba Number	Średnica Diameter (cm)	Liczba Number	Długość Length (cm)	Szerokość Width (cm)
II	ex vivo	X	10	12.XI	73,0	7,1*	4,9	30,5*	2,4	0,6
			15	13.XI	74,0	7,0*	4,9	30,1*	2,3	0,6
			20	13.XI	73,5	6,8*	5,0	29,0*	2,3	0,6
V	ex vitro	X	15	15.XI	74,0	7,2*	5,1	29,9*	2,2	0,5
			5	14.XI	73,2	7,3*	5,0	30,1*	2,3	0,6
			10	14.XI	74,0	6,5*	5,1	28,9*	2,2	0,6
VII	ex vivo	gamma	15	15.XI	73,6	6,9*	4,9	29,0*	2,2	0,5
			10	15.XI	72,9	7,6*	4,9	29,5*	2,4	0,5
			20	15.XI	73,9	7,0*	4,8	29,0*	2,4	0,5
VIII	ex vivo	X	5	12.XI	73,5	10,4	4,8	33,3*	2,0	0,6
			10	12.XI	73,5	10,8	4,6	32,6*	2,1	0,6
			20	11.XI	72,8	11,0	4,8	33,2*	1,9	0,5
VIII	ex vitro	gamma	25	13.XI	74,0	11,3	4,9	32,6*	2,2	0,5
			5	15.XI	72,9	11,0	4,8	32,8*	1,9	0,5
			10	15.XI	73,0	10,9	5,0	33,0*	2,0	0,6
VIII	ex vivo	X	20	17.XI	73,4	11,3	4,7	33,0*	2,0	0,6
			25	12.XI	34,8*	14,8*	2,9*	46,8	1,1*	0,5

c.d. Tabeli 8

IX	ex vivo	X	10	12.XI	73,9	14,8*	3,6*	48,1	1,3*	0,5
			15	13.XI	73,1	15,1*	3,5*	48,4	1,4*	0,5
			20	15.XI	74,0	15,0*	3,5*	48,0	1,2*	0,5
			25	15.XI	73,2	14,8*	3,5*	48,0	1,2*	0,5
			gamma	15.XI	74,0	14,9*	3,4*	49,1	1,3*	0,5
	ex vitro	gamma	10	14.XI	73,0	15,0*	3,5*	48,9	1,3*	0,5
			15	14.XI	73,4	14,9*	3,5*	49,0	1,3*	0,5
			20	13.XI	73,8	14,9*	3,5*	47,7	1,4*	0,6
			10	16.XI	73,5	14,7*	3,3*	48,0	1,2*	0,5
			X	13.XI	73,2	10,5	4,7	79,5*	2,1	0,5
X	ex vivo	X	10	12.XI	74,1	11,6	4,8	80,0*	2,1	0,5
			15	11.XI	74,0	11,0	5,0	82,3*	2,1	0,6
			20	13.XI	72,9	10,0	5,1	88,3*	2,2	0,5
			25	14.XI	73,0	11,1	4,9	88,1*	2,4	0,6
			gamma	12.XI	74,1	10,9	4,9	79,0*	2,3	0,5
	ex vitro	X	10	13.XI	74,0	11,0	5,1	89,4*	2,1	0,5
			15	14.XI	73,8	11,3	4,8	86,5*	2,3	0,5
			10	15.XI	74,1	11,0	5,1	80,0*	2,3	0,6
			15	15.XI	73,6	10,9	5,1	86,0*	2,3	0,6
			gamma	15.XI	75,0	11,0	5,1	86,0*	2,2	0,5
XI	ex vitro	gamma	10	15.XI	73,7	11,5	5,1	85,0*	2,2	0,5
			15	14.XI	75,0	11,1	5,1	80,5*	2,2	0,5
			20	15.XI	75,0	11,0	5,0	89,9*	2,2	0,5
			10	14.XI	73,9	7,8*	3,9*	33,4*	1,4*	0,5
			25	15.XI	73,8	7,8*	3,8*	33,0*	1,5*	0,6
XIII	ex vitro	gamma	20	11.XI	73,5	11,1	4,6	29,5*	2,1	0,5
			Kontrola 'Red Nero' Control 'Red Nero'	13.XI	73,6	10,9	5,0	47,8	2,1	0,5

\* Objasnenia jak na str. 16

Explanation as on the page 16

## DYSKUSJA

Regeneracja roślin w warunkach *in vivo* przebiegała znacznie wolniej niż w warunkach *in vitro*. Pierwsze pędy przybyszowe, zdolne do odizolowania i ukorzenienia, tworzyły się *in vivo* dopiero po 15 tygodniach od umieszczenia sadzonek liściowych w podłożu, pomimo, że kaulogenezę obserwowano na preparatach znacznie wcześniej, już po 4 tygodniach. Można przypuszczać, że tworzenie i rozwój pędów przybyszowych we wcześniejszych etapach były hamowane przez silnie rozwijającą się w tym czasie tkankę kalusową. Ponadto, być może jesienią, liście roślin dojrziałych, kwitnących, przeznaczonych na sadzonki zgromadziły już abscysynę, która mogła utrudnić tworzenie pędów. Należy jednak podkreślić, że z chwilą oderwania liści od rośliny macierzystej, przez cały okres deficytu osłonecznienia, rośliny doświetlano. To jednak, jak się wydaje, nie przerwało rozpoczętego już wcześniej procesu starzenia się liści. Pobieranie młodszych sadzonek liściowych wydawało się jednak nie wskazane z powodu szybkiej utraty turgoru i więdnienia ich po zerwaniu. Wątpliwości budzić może wiek liści i termin ich pobrania z przeznaczeniem na sadzonki liściowe. W niniejszym doświadczeniu na sadzonkę wybierano liść zgodnie ze wskazaniem Custersa (1986).

W badaniach mikroskopowych nie udało się potwierdzić zaobserwowanego przez badaczy holenderskich (Broertjes i in., 1976) tworzenia się pędów przybyszowych *in vitro* z tkanki epidermalnej. W warunkach *in vivo* było podobnie, także nie zaobserwowano tworzenia się pędów z epidermy. Obraz histologiczny preparatów wykonanych z ogonków sadzonek liściowych *ex vivo* nie pozwolił stwierdzić, co dzieje się z epidermą ogonka liściowego w momencie, gdy pędy przybyszowe zaczynają się tworzyć, bo po prostu tkanki tej już wówczas nie było. Można przypuszczać, że w wyniku kontaktu ogonka sadzonki liściowej z podłożem zachodzi uszkodzenie mechaniczne komórek skórki. Zarówno na preparatach *ex vivo* jak i *ex vitro* centra merystematyczne, dające początek pędowi przybyszowemu, pochodziły z subepidermy i parenchymy lub też organogeneza występowała za pośrednictwem tkanki kalusowej. Tylko w eksplantatach liściowych *ex vitro* zaobserwowano niewielkie zmiany w warstwie epidermalnej. Powiększanie się komórek epidermy, stanowiące pierwszy objaw ich odróżnicowywania i podziały komórek, jednak bez widocznych dalszych bardziej zaawansowanych etapów tego procesu, mogą ale nie muszą wyłącznie sugerować możliwość bezpośredniej organogenezy ze skórki. Z epidermy, choć rzadziej, może również powstawać tkanka kalusowa.

Zdaniem Zenktelera i Zenktelera (1987) fragmenty liści w kulturach *in vitro* stanowią dogodny obiekt badań nad przywracaniem aktywności mitotycznej komórkom epidermy, subepidermy i parenchymy, które zaprzestały podziałów, a pod wpływem regulatorów wzrostu odzyskują tę zdolność. Organogeneza może przebiegać także samoistnie w efekcie oderwania liścia lub zranienia blaszki liściowej bez stymulacji regulatorami wzrostu. Obserwacje własne pozwalają jednak przypuszczać, że samoistna aktywność epidermy ogonków liściowych u chryzan-

tem występuje bardzo rzadko. Można także domniemywać, że skład pożywki użytej do inicjacji kultury *in vitro* nie sprzyjał tego typu procesom. Wpływ różnych regulatorów wzrostu i ich kombinacji w pożywce na regenerację pędów przybyszowych u chryzantem przedstawiają wyniki prac kilku autorów (Miyazaki i in., 1979; Jerzy i Lubomski, 1989).

Inną przyczyną sporadycznej regeneracji pędów przybyszowych bezpośrednio ze skórki może być także specyfika odmianowa.

Histologiczne badania przeprowadzone w 1937 r. przez Naylora i Johnsona nad wegetatywnym rozmnażaniem sępolii przyczyniły się, zdaniem Broertjesa i Keena (1980), do spopularyzowania sugestii, że pędy przybyszowe, regenerujące z liści, rozwijają się w rezultacie podziału pojedynczej komórki epidermalnej. Pogląd ten jest do dzisiaj dyskutowany. Naylor i Johnson (1937) stwierdzili bowiem, że (cyt.) "choć pędy przybyszowe tworzą się z jednej komórki epidermy, to do jego końcowego uformowania przyczyniają się również przyległe - epidermalne komórki i komórki parenchymy ogonka liściowego". Stwierdzono także (Broertjes i in., 1976), że pędy przybyszowe tworzą się zwykle z jednej tylko komórki ogonka liściowego, pochodzącej z kalusa (*in vivo*) lub epidermy (*in vitro*). Dają one w konsekwencji początek roślinom zbudowanym z tkanek genetycznie jednorodnych. Po napromienieniu liści, lub po zastosowaniu innego czynnika mutagennego, regeneracja roślin zachodzi podobnie. Tak więc rozwijające się z jednej zmutowanej komórki rośliny nie tworzą chimer będących formami niejednorodnymi genetycznie, ale dają początek roślinom zbudowanym z tkanek genetycznie jednorodnych. W czasie niniejszych badań histologicznych nie udało się ustalić, czy merystem wierzchołkowy pędu różnicuje się z jednej, czy też wielu komórek. Można przypuszczać, że zwiększenie częstotliwości pobierania prób do obserwacji, dwukrotnie lub częściej w ciągu tego samego dnia, pozwoliłoby na zaobserwowanie oczekiwanego stadium. Być może inna aparatura, metoda czy technika wykonania badań histologicznych mogły by częściowo pomóc w rozwiązaniu tej wątpliwości. Hipoteza Broertjesa i Keena (1980) opracowana w oparciu o model matematyczny, mówiąca, że (cyt.) "merystem wierzchołkowy pędu przybyszowego powstaje finalnie zawsze z jednej tylko komórki, niezależnie od tego czy w inicjacji pędu przybyszowego uczestniczy jedna czy więcej komórek" wydaje się być najbardziej przekonująca.

Nasuwa się jeszcze pytanie, czy i na ile wyniki własnych badań histologicznych mogą być przydatne do dokładniejszego ustalenia optymalnego momentu zastosowania czynników mutagennych w celu zwiększenia frekwencji mutacji. Można jedynie przypuszczać, że zastosowanie napromienienia w momencie inicjacji tkanki kalusowej lub tworzenia się w kalusie centrów merystematycznych dałoby lepsze efekty.

Wyniki niniejszych badań pozwalają przypuszczać, że technika *in vitro* jest skuteczniejszą drogą indukowania zmienności genetycznej u chryzantem, niż metoda *in vivo*. Zachętą do poparcia tej sugestii i wprowadzenia jej do praktyki hodowlanej są bez wątpienia także wyniki innych prac badawczych podkreślające zalety stosowania techniki *in vitro* w hodowli roślin (Roest i Bokelmann, 1975;

Broertjes i in., 1976; Jerzy i Lubomski, 1989; Jerzy i in., 1993; Orlikowska i Jerzy, 1994). Jednak brak wyników badań porównawczych dotyczących rezultatów indukowania mutacji *in vivo* i *in vitro* na innych odmianach chryzantem utrudniał do tej pory zajęcie jednoznacznego stanowiska w tej sprawie.

Zmienność spontaniczna obserwowana u roślin rozmnażanych wegetatywnie *in vitro* jest sprzymierzeńcem w pracach hodowlanych i selekcyjnych (Malaure i in., 1991a,b; Borkowska, 1994). Może być także zjawiskiem niepożądanym. Czynniki szczególnie aktywnymi, wywołującymi destabilizację cech mogą być m.in. regulatory wzrostu w nieodpowiednim stężeniu w pożywce, zbyt duża liczba pasażowań, czy też zróżnicowany pod względem genotypowym materiał wyjściowy. Brak zmian fenotypowych u roślin kontrolnych - nie napromienionych - pozwala przypuszczać, że wyższa frekwencja wariantów i wariacji u roślin zregenerowanych z napromienionych eksplantatów liściowych w pokoleniu  $vM_1$  była jedynie efektem działania czynnika mutagennego, a nie zmienności wynikającej z zastosowania techniki mikrorozmnażania. Nie można jednak bezwzględnie wykluczyć wystąpienia zmienności somaklonalnej u roślin napromienionych, jak również wpływu warunków uprawy, np. temperatury czy fotoperiodu.

Mimo, że nie wszystkie zmiany zaobserwowane w pokoleniu  $vM_1$ , zarówno u roślin zregenerowanych *in vivo* i *in vitro*, okazały się zmianami mutacyjnymi, dziedziczonymi wegetatywnie przez rośliny pokolenia  $vM_2$ , to jednak trzykrotnie wyższa frekwencja mutacji pozwala ponownie podkreślić większą celowość zastosowania techniki *in vitro* w hodowli nowych odmian. Świadczy o tym także wyższa u tych roślin frekwencja mutantów. W rezultacie napromienienia sadzonek liściowych odmiany 'Bravo' dawką 15 Gy promieni X zmiany zaobserwowano u 11,3% roślin napromienionych (Stepczyńska i in., 1980). Jeszcze większą frekwencję zmian uzyskał Broertjes i inni (1976) po potraktowaniu sadzonek liściowych odmiany 'Bravo' dawką 15 Gy promieni X. Rośliny o zmiennej barwie kwiatostanu stanowiły aż 21,3% ogółu roślin nie napromienionych. Nie obserwowali oni jednak roślin pokolenia  $vM_2$ .

W kontekście wyników własnych zastanawiająca jest tak wysoka frekwencja zmian we wspomnianych wyżej badaniach. Można sądzić, że wynikała ona z tego, że Broertjes i inni (1976) doprowadzili do kwitnienia nie tylko wierzchołkowe części pędów wyrosłych z sadzonek liściowych, ale również sadzonki odcięte z pędów bocznych, wyrosłych po rozkrzewieniu się pozostałej części pędu głównego. W doświadczeniu własnym, jak również w innych badaniach (Stepczyńska i in., 1980), do kwitnienia doprowadzano rośliny uzyskane wyłącznie z wierzchołkowych części pędów przybyszowych wytworzonych na sadzonkach liściowych.

Zapewne nie bez znaczenia jest także bardzo precyzyjne określenie liczby mutantów i mutacji, rzutujące na ich frekwencję. Tylko bowiem jednakowo ujęte badania umożliwiłyby dokładniejszą syntezę porównawczą wyników własnych z innymi.

Badania nad mutagenezą u chryzantemy wielkokwiatowej odmiany 'Richmond' indukowanej *in vitro* promieniowaniem X i gamma wykazały, że frekwencja mutantów nie była uzależniona od rodzaju promieniowania, jedynie frekwen-

cja mutacji (Jerzy i in., 1993). Była ona przy tym zdecydowanie wyższa u roślin poddanych działaniu promieniowania gamma. Na wybór promieniowania gamma, jako bardziej skutecznego czynnika mutagennego, wskazują także rezultaty badań własnych. Jedyny wyjątek stanowiły rośliny zregenerowane *in vivo*, u których wyższą frekwencję mutantów zaobserwowano w przypadku zastosowania promieniowania X.

Wyniki własne podkreślają istnienie zależności między frekwencją mutantów i mutacji, a dawką napromienienia. W większości przypadków wraz ze zwiększaniem dawki od 5 do 25 Gy wzrastała frekwencja mutantów i mutacji. Najmniejsza frekwencja mutantów była u roślin zregenerowanych *in vivo*, traktowanych promieniami gamma w dawce 5 Gy, a największa u roślin pochodzących z eksplantatów liściowych *ex vitro*, napromienionych dawką 20 Gy promieni gamma. Natomiast najmniejszą frekwencję mutacji zaobserwowano u roślin zregenerowanych *in vivo*, traktowanych promieniowaniem X w dawce 5 Gy, a największą u roślin zregenerowanych *in vitro*, poddanych działaniu promieniowania gamma w dawce 20 Gy. Ponadto najniższa dawka promieniowania X dla roślin zregenerowanych *in vitro* okazała się zbyt niska i w ogóle nie wywołała zmian. Natomiast zbyt wysoką, wywołującą efekt letalny była dawka 25 Gy promieni X i gamma. Jest to zgodne ze stwierdzeniem Broertjesa i van Hartena (1988), że niskie dawki powodują przeżycie w 100%, ale za to ich efektem jest niewielka frekwencja mutacji, natomiast duże dawki na odwrót dają roślinom niewielką szansę przeżycia, ale wywołują wysoką frekwencję mutacji.

Zastosowanie promieniowania jonizującego na roślinę może mieć charakter uderzeniowy lub ciągły, przy czym dawka jednorazowa jest najskuteczniejsza i najczęściej stosowana. Według Broertjesa i van Hartena (1988) optymalną dla ukorzenionych *in vivo* sadzonek chryzantem jest dawka 15 Gy promieniowania X lub gamma. Banerji i Datta (1990) za optymalną dawkę promieniowania gamma dla badań mutacyjnych na chryzantemach przyjmują 15 - 20 Gy. Dla napromieniania eksplantatów *in vitro* autorzy ci zalecają dawkę około 8 Gy promieni X i gamma.

Broertjes i inni (1976) wykazali, że promieniowanie X zastosowane w dawkach 4 - 10 Gy na liście odmiany 'Bravo' izolowane *in vitro* ogranicza o połowę liczbę tworzących się pędów przybyszowych. Wyższe dawki promieniowania jeszcze bardziej ograniczają regenerację pędów przybyszowych z liści, aż do zupełnego zahamowania tego procesu przy dawce wynoszącej 20 Gy. Tworzenie się pędów przybyszowych na izolowanych *in vitro* liściach 5 odmian chryzantem, obserwowane przez Jerzego i Lubomskiego (1991), uzależnione było od rodzaju promieniowania jonizującego i odmiany. U wszystkich odmian promieniowanie jonizujące ograniczało zdolności regeneracyjne eksplantatów liściowych: w mniejszym stopniu promieniowanie X, w większym promieniowanie gamma. W badaniach własnych tworzenie się pędów przybyszowych u odmiany 'Red Nero' uzależnione było bardziej od wysokości dawki promieniowania X i gamma niż jego rodzaju. Drastyczne zahamowanie rozwoju pędów przybyszowych zaobserwowano po napromienieniu eksplantatów liściowych dawką 20 Gy, a całkowite - po



napromienieniu ich dawką 25 Gy. Promieniowanie zwiększyło liczbę pędów przybyszowych tworzących się średnio z jednej napromienionej sadzonki liściowej *in vivo*, a zmniejszyło regenerację w warunkach *in vitro*. Wyniki badań Jerzego i Stepczyńskiej (1980) wykazały, że z jednej sadzonki liściowej odmiany 'Bravo', 'Luyona' i 'Pink Champagne' można uzyskać *in vivo* odpowiednio 3; 2,5 i 2,9 pędów przybyszowych. Z jednej nie napromienionej sadzonki liściowej odmiany 'Red Nero' otrzymano *in vivo* średnio 3,6 pędów przybyszowych.

Na specyfikę odmianową przy regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych *ex vitro* zwracają uwagę wyniki badań Jerzego i Lubomskiego (1991), gdzie w zależności od odmiany tworzyło się od 0,1 do 2,7 pędów przybyszowych, a po napromienieniu, podobnie jak w badaniach własnych, liczba ta w większości przypadków ulegała zmniejszeniu. Umożliwia to zwrócenie uwagi na stosunkowo wysoki współczynnik regeneracji pędów przybyszowych w warunkach *in vivo* i *in vitro* wybranej do obserwacji odmiany 'Red Nero'. Można domniemywać, że istotny wpływ na formowanie się pędów mogą mieć również inne czynniki: wiek liścia, jego położenie na łodydze, obecność lub brak ogonka liściowego, podłoże ukorzeniające i jego zasobność w składniki mineralne, regulatory wzrostu oraz czynniki otoczenia (Broertjes i Leffring, 1972; Roest i Bokelmann, 1975).

Efekty mutacyjne uzyskiwane przez napromienienie sadzonek liściowych *in vivo* lub eksplantatów liściowych *in vitro* są różnorodne i często trudne do przewidzenia. Zmienność popromienna u odmiany 'Red Nero' dotyczyła przeważnie kilku cech razem. Zjawisko indukowania kilku cech równocześnie było już obserwowane u roślin ozdobnych (Broertjes, 1967; 1972a; Wosińska, 1982; Gaj i Gaj, 1994), w tym także u chryzantem (Broertjes, 1966; Stepczyńska i in., 1980; Jerzy i in., 1993). Wydaje się jednak, że nie było ono tak częste, jak u chryzantem odmiany 'Red Nero'. Wśród 355 wariantów tylko 84 miały jedną zmienioną cechę o charakterze wariacji, a pozostałe miały od 2 do 5 zmienionych cech. W drugim wegetatywnym pokoleniu mutacyjnym wśród 355 mutantów zaobserwowano 154 z jedną mutacją, a pozostałe podobnie: z 2 - 5 mutacjami. Może to wskazywać bez wątpienia na trafność wyboru odmiany do badań nad mutagenezą, a także świadczyć o potencjalnych możliwościach do ujawnienia się szerszego spektrum zmienności tkwiących w wysoce heterozygotycznym gatunku jakim jest *Dendranthema grandiflora*. Opinię tą podziela wielu autorów (Broertjes, 1966; Broertjes i Leffring, 1972; Broertjes i van Harten, 1988), którzy twierdzą, że spektrum indukowanych mutacji i częstość ich występowania zależy w znacznym stopniu od potencjału genetycznego badanego obiektu.

W niniejszym doświadczeniu wariacja barwy zawsze towarzyszyła innym zmienionym cechom roślin. Wszystkie obserwowane w pokoleniu  $vM_1$  barwy dziedziczyły się wegetatywnie w pokoleniu  $vM_2$ , co podkreśla dużą mutabilność tej cechy u badanej odmiany.

Liczne badania potwierdzają, że chryzantemy o różowych i fioletowych kwiatostanach mutują najczęściej (Broertjes, 1966; Dowrick i El Bayoumi, 1966; Chan, 1966; Broertjes i in., 1976; Stepczyńska i in., 1980; Jerzy i in., 1993). Wy-

daje się jednak, że ciemnoczerwona barwa odmiany 'Red Nero' jest również obiecująca pod względem możliwości zmiany barwy. Odmiana ta dała bowiem 9 różnych mutacji barwy kwiatostanów - jasnożółtą, żółtą, pomarańczową, żółtopomarańczową, pomarańczowoczerwoną, jasnoczerwoną, bordową, malinową i wiśniową. Rezultaty te pozwalają sądzić, że również barwa odmiany wyjściowej może być złożona ze znacznej liczby barwników, warunkujących ujawnienie się innej barwy. We wszystkich przypadkach zmiana barwy objęła całą powierzchnię kwiatostanu. Wyklucza to możliwość przypisania jakiegokolwiek mutacji barwy charakteru chimery sektorialnej bądź meryklinalnej. Określenie barwy z uwzględnieniem wszystkich możliwych odcieni i różnic w intensywności zabarwienia nie jest łatwe. Jak podaje Muszyński (1976a), różnice barwy mogą być spowodowane nie tylko wpływem czynników mutagennych, ale także wieloma innymi cechami. Do najważniejszych z nich należą: stopień wykształcenia poszczególnych kwiatów, temperatura i światło. Istotny wpływ warunków świetlnych i termicznych na pokrój chryzantem, a zwłaszcza na kształt i barwę koszyczków kwiatostanowych, podkreślają także Oszkiniśowa i inni (1968). Powszechnie wiadomo, że kwiatostany chryzantem rozwinięte wcześniej z pąków koronowych - zawiązanych przy wysokiej intensywności światła, mają barwę znacznie jaśniejszą, niż kwiatostany rozwinięte później - z pąków szczytowych zawiązanych przy niskiej intensywności światła.

Wydaje się jednak, że przy omawianiu wyników badań własnych wpływ tych czynników należy wykluczyć. Właśnie rozpoczęcie uprawy na miejscu stałym, w terminie jednakowym dla wszystkich badanych roślin, zarówno zregenerowanych *in vivo* jak i *in vitro*, podyktowane było koniecznością zapewnienia im dla wzrostu i kwitnienia identycznych warunków świetlnych i termicznych. Można by zatem polemizować z autorami (Broertjes i in., 1976), którzy doprowadzili do kwitnienia rośliny pozyskiwane z sadzonek ukorzenianych w różnych terminach, co mogło w znacznym stopniu zaważyć na frekwencji wariantów barwy. Ponadto w omawianym doświadczeniu rośliny o zmienionej barwie kwiatostanów osiągnęły pełnię kwitnienia w prawie jednakowym terminie, takim samym jak pozostałe rośliny: napromienione i nie napromienione. Rozwijały się one więc w podobnych warunkach termicznych i świetlnych. Zachowane zostały także prawidłowe i stałe warunki jednakowego podłoża, a ponadto ocena barwy kwiatów dokonywana była w jednakowej fazie rozwoju roślin. Powyższe fakty przemawiają za tym, że wystąpienie mutacji barwy tłumaczyć należy jedynie zmianami powstałymi pod wpływem działania czynnika mutagennego. Zdaniem Soleckiej (1987) obiektywną oceną barwy, pozwalającą na ustalenie odrębności odmianowej, jest ocena spektrofotometryczna. Analiza zawartości barwników antocjanowych w kwiatach dostarcza informacji o dziedziczeniu oraz możliwości zmian barwy i barwników w wyniku mutacji. Powinna więc stanowić cenną informację dla hodowcy. W niniejszych badaniach nie wydawało się jednak konieczne ustalenie składu barwników, gdyż wyodrębnienie roślin o zmienionej barwie nie było wizualnie zbyt trudne.

Oprócz zmienionej barwy kwiatostanów zaobserwowano także odmienne cechy dotyczące liczby, długości, szerokości i kształtu kwiatów języczkowatych, liczby kwiatostanów na gałązkach, długości pędów roślin oraz kształtu liści. Niektóre z nich, bądź podobne, spotykano już u chryzantem wcześniej. Zrośnięcie kwiatów języczkowatych w rurki zaobserwowano w pracach kilku autorów (Stepczyńska i in., 1980; Jerzy i in., 1993). Różne zmiany kształtu kwiatostanów pod wpływem promieniowania jonizującego były także rezultatem wielu prac (Ichikawa, 1970; Datta i in., 1985; Datta i Banerji, 1986). Widacka i Jerzy (1981) zaobserwowali w wyniku działania pola elektromagnetycznego na sadzonki liściowe odmiany 'Bravo' liczne, charakterystycznie powcinane kwiaty języczkowane, zbliżone wyglądem do otrzymanych w badaniach własnych. Zmiana kształtu liści okazała się jednym z rezultatów działania promieniowania X i gamma na eksplantaty liściowe odmiany 'Richmond' (Jerzy i in., 1993). Zastosowanie promieni gamma na ukorzone sadzonki pędowe kilku odmian chryzantem spowodowało także m.in. zmiany w budowie morfologicznej liści (Datta i in., 1985; Banerji i Datta, 1992; Datta, 1992; Shukla i Datta, 1993).

Większość nietrwałych zmian obserwowanych w niniejszej pracy była związana z odmiennym kształtem kwiatów języczkowatych. Można przypuszczać, że nie powtarzające się w pokoleniu  $vM_2$  fenotypowe zmiany były wynikiem zanikających stosunkowo szybko rezultatów zmienności epigenetycznej, czy też modyfikacyjnej. Zmiany uwarunkowane bliżej nieokreślonymi czynnikami środowiska, a nie mutacji miały zapewne w pokoleniu  $vM_1$  charakter wariacji.

U odmiany 'Red Nero' objętej badaniami w tej pracy nie zaobserwowano pojawienia się chimer. Rośliny wykazywały w drugim wegetatywnym pokoleniu  $vM_2$  cechy mutantów jednolitych. Jednak bez uzupełniających badań histologicznych nie można przesądzać o charakterze uzyskanych mutacji. W przypadku odmiennej barwy kwiatostanów można z pewnością wykluczyć jedynie powstanie chimer meryklinalnych i sektorialnych. Można jednak przypuszczać, że niektóre spośród zmutowanych form mogły być chimerami peryklinalnymi, czyli zmienionymi tylko w zewnętrznej warstwie tkanek organizmu niejednorodnego genetycznie, których nie sposób odróżnić wizualnie od form złożonych z tkanek jednorodnych genetycznie.

Większość zaobserwowanych wariacji, a zwłaszcza mutacji, u roślin zregenerowanych z napromienionych sadzonek liściowych *ex vivo*, powtórzyła się także u roślin zregenerowanych *in vitro*. Świadczyć to może o tym, że metoda rozmnażania użyta do indukowania mutacji nie decyduje w dużej mierze o zakresie uzyskanej zmienności. Obie zatem metody regeneracji roślin, wykorzystane do indukowania zmienności, pozwalają w podobny sposób wykorzystać potencjał możliwości mutacyjnych tkwiących w określonym genotypie. Biorąc jednak pod uwagę frekwencję uzyskanych zmian należy zdecydowanie podkreślić większą sensowność wyboru techniki *in vitro* do indukowania mutacji u chryzantem.

Nie można przy tym pominąć tego, że niektóre mutacje były jednak typowe tylko dla określonego sposobu regeneracji roślin, rodzaju i dawki napromienienia. Nie należy więc całkowicie przekreślić możliwości istnienia pewnego wybiórcze-

go, czy też specyficznego oddziaływania również tych czynników doświadczenia. Także wielokrotne występowanie tych samych "identycznych" mutantów świadczą może o pewnych określonych kierunkach zmienności.

Na szczególną uwagę zasługuje mutant o karłowatym wzroście i licznych miniaturowych kwiatostanach, uzyskany w rezultacie działania promieniowania X w dawce 25 Gy na sadzonki liściowe *ex vivo*. Walory ozdobne tego interesującego mutantu wskazały na celowość kontynuowania badań nad dalszą oceną jego przydatności, przede wszystkim do uprawy doniczkowej (Zalewska, 1994). Doświadczenia te zakończone zostały wpisaniem w 1995 r. tego mutantu do Rejestru Odmian pod nazwą 'Mini Nero'.

Przeprowadzone badania wskazują z całą pewnością na celowość wykorzystania kultur *in vitro* dla potrzeb hodowli mutacyjnej chryzantem. Technika ta wydaje się być przy tym szczególnie korzystna dla roślin nie regenerujących pędów przybyszowych w warunkach *in vivo*. Badania bowiem wykazały, że samorzutne tworzenie się pędów przybyszowych *in vivo*, bez indukowania tego procesu, jest cechą właściwą tylko niektórym odmianom chryzantem (Jerzy i Stepczyńska, 1980; Zalewska, 1985; Custers, 1986; Jerzy i Zalewska, 1987). Custers (1986) podaje wprawdzie, że sadzonki liściowe można pobudzać do tworzenia pędów przybyszowych *in vivo* przez zastosowanie substancji wzrostowych, ale tego wyniku nie udało się niestety powtórzyć (Zalewska, 1985). Technika *in vitro* pozwala na wykorzystanie eksplantatów liściowych jako obiektów służących do napromienienia i indukowania w ten sposób mutacji u wszystkich odmian.



## WNIOSKI

Badania nad somatyczną mutagenezą u chryzantemy wielokwiatowej odmiany 'Red Nero' indukowaną *in vivo* oraz *in vitro* promieniowaniem X i gamma umożliwiły wyciągnięcie następujących wniosków.

1. Tworzenie się pędów przybyszowych na izolowanych liściach i związana z tym regeneracja roślin przebiega szybciej w warunkach *in vitro*, bo już po 3-6 tygodniach od zainicjowania kultur. W warunkach *in vivo* proces ten przebiega znacznie wolniej - dopiero po 15-30 tygodniach od umieszczenia sadzonek liściowych w podłożu i rozpoczęciu ich ukorzeniania. Wyraźnie uformowane związki przyszłych pędów przybyszowych w eksplantatach liściowych *ex vitro* obserwuje się na preparatach mikroskopowych dwutygodniowych, a w sadzonkach liściowych *ex vivo* dopiero na preparatach czterotygodniowych. Z eksplantatów liściowych tworzy się więcej pędów przybyszowych niż z sadzonek liściowych.

2. Centra merystematyczne, dające początek pędom przybyszowym, pochodzą przede wszystkim z subepidermalnych lub głębiej położonych komórek parenchymy albo też organogeneza następuje za pośrednictwem kalusa. W warunkach *ex vitro* sporadycznie obserwuje się również odróżnicowywanie się i ukierunkowane podziały epidermy, co może sugerować możliwość bezpośredniej organogenezy także z komórek skórki.

3. Zastosowanie eksplantatów liściowych *ex vitro* jako obiektu napromieniania i indukowania zmienności genetycznej u roślin jest skuteczniejsze niż napromienianie sadzonek liściowych *ex vivo*, czego wyrazem jest wyższa frekwencja mutantów i mutacji w drugim wegetatywnym pokoleniu mutacyjnym ( $vM_2$ ).

4. Mutagenne działanie promieniowania gamma jest efektywniejsze, niż promieniowania X. U roślin zregenerowanych *in vitro* daje ono ponad trzykrotnie wyższą frekwencję wariantów i mutantów oraz wyższą frekwencję wariacji i mutacji. Natomiast efekt zastosowania promieniowania gamma na sadzonki liściowe *ex vivo* wyraża się dwukrotnie wyższą frekwencją wariacji i mutacji.

5. Frekwencja mutantów i mutacji u roślin zregenerowanych z sadzonek liściowych *ex vivo* uzależniona jest od dawki napromienienia i rośnie wraz z jej zwiększaniem od 5 do 25 Gy. U roślin zregenerowanych z eksplantatów liściowych *ex vitro*, po zastosowaniu promieniowania X, zależność ta ujawnia się tylko w zakresie 10 - 20 Gy, a po zastosowaniu promieniowania gamma - w zakresie od 5 do 20 Gy. Promieniowanie X w dawce 5 Gy nie wywołuje żadnego efektu mutagennego, a promieniowanie X i gamma w dawce 25 Gy hamuje całkowicie regenerację roślin *in vitro*.

6. Wariacje uzyskane w pokoleniu  $vM_1$  roślin zregenerowanych z napromienionych sadzonek i eksplantatów liściowych dotyczą barwy kwiatostanów, liczby i kształtu kwiatów języczkowatych, liczby i wielkości kwiatostanów, długości pędów roślin i zmian w budowie morfologicznej liści. Przy wegetatywnym rozmnażaniu roślin pokoleń  $vM_1$  i  $vM_2$  powtarzają się zawsze wszystkie zmiany związane z barwą i liczbą kwiatostanów, długością pędów oraz odmienną budowę morfologiczną liści.

## LITERATURA

- Banerji, B.K., Datta, S.K., 1990. Induction of Somatic Mutation in *Chrysanthemum* Cultivar 'Anupam'. *J.Nuclear Agric.Biol.*, 19: 252-256.
- Banerji, B.K., Datta, S.K., 1992. Gamma Ray Induced Flower Shape Mutation in *Chrysanthemum* cv. 'Jaya'. *J.Nuclear Agric.Biol.*, 21(2): 73-79.
- Barbier, M., Dulieu, H.L., 1980. Effets génétiques observés sur des plantules de Tabac régénérées à partir de cotylédons par culture in vitro. *Ann. Amélior.Plant.*, 30: 321-344.
- Borkowska, B., 1994. Występowanie zmienności w mikrorozmnażaniu. *Ogrodnictwo*, 1: 12-13.
- Broertjes, C., 1966. Mutation breeding of chrysanthemums. *Euphytica*, 15: 156-162.
- Broertjes, C., 1967. Progrès dans la mutagénèse appliquée. Application of atomic energy in agriculture. Annual Report, Euroatom, 6: 45-51.
- Broertjes, C., 1968. Dose rate effects in Saintpaulia. *Mutations in Plant Breeding II. IAEA, Vienna*, ss. 63-71.
- Broertjes, C., 1969. Mutation breeding of *Streptocarpus*. *Euphytica*, 18: 333-339.
- Broertjes, C., 1972a. Use in Plant Breeding of Acute, Chronic or Fractionated Doses of X-rays or Fast Neutrons as Illustrated with Leaves of Saintpaulia. *Agric.Res.Rep.*, 776, ss. 74.
- Broertjes, C., 1972b. Mutation breeding of *Achimenes*. *Euphytica*, 21: 48-63.
- Broertjes, C., Haccius, B., Weidlich, S., 1968. Adventitious bud formation on isolated leaves and its significance for mutation breeding. *Euphytica*, 17: 321-344.
- Broertjes, C., Keen, A., 1980. Adventitious shoots: do they develop from one cell? *Euphytica*, 29: 73-87.
- Broertjes, C., Koene, P., van Veen, J.W.H., 1980. A mutant of a mutant of a mutant of a ...: irradiation of progressive radiation - induced mutants in a mutation - breeding programme with *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica*, 29: 525-530.
- Broertjes, C., Leffring, L., 1972. Mutation breeding of *Kalanchoë*. *Euphytica*, 21: 415-423.
- Broertjes, C., Lock, C.A.M., 1985. Radiation-induced low-temperature tolerant solid mutants of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica*, 34: 97-103.
- 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.A., 1988. Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops. Elsevier, Amsterdam, ss. 345.
- Bush, S.R., Earle, E.D., Langhans, R.W., 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis and shoot tips of the peryclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer.J.Bot.*, 63: 729-737.

- Chan, A.P., 1966. Chrysanthemum and rose Mutations induced by X Rays. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 88: 613-620.
- Custers, J.B.M., 1986. Adventitious shoot formation on leaf cuttings in vivo, a tool in horticulture. Agricultural University, Wageningen. Publication, 528, ss. 128.
- Datta, S.K., 1992. Gamma Irradiation Studies on *Dendranthema grandiflora* Tzvelev. J. Nuclear Agric. Biol., 21(2): 80-83.
- Datta, S.K., Banerji, B.K., 1986. 'Shella' - A new chrysanthemum mutant of a mutant 'Himani'. Science and Culture, 52: 129-130.
- Datta, S.K., Banerji, B.K., Gupta, M.N., 1985. 'Tulika' - A new Chrysanthemum cultivar Evolved by Gamma Irradiation. J. Nuclear Agric. Biol., 14: 160.
- Doorenbos, J., Karper, J.J., 1975. X-ray induced mutations in *Begonia x hiemalis*. Euphytica, 24: 13-19.
- Dowrick, G.J., El Bayoumi, A., 1966. The induction of mutations in *Chrysanthemum* using X- and gamma radiation. Euphytica, 15: 204-210.
- Gaj, M., Gaj, M.D., 1994. Uzyskiwanie mutantów *Saintpaulia ionantha* Wendl. z wykorzystaniem mutagenyzy w kulturach in vitro. Materiały VII Ogólnopolskiej Konferencji Kultur In Vitro "Potencjalne zastosowania kultur in vitro w nowoczesnej hodowli roślin". Katowice - Ustroń :75.
- Guzewski, W., Muszyński, S., 1978. Mutation induction in chrysanthemums by gamma - rays treatment of rooted cuttings. Acta Agrobot., 1/2: 117-120.
- Huitema, J.B.M., Preil, W., Gussenhoven, C., Schneidereit, M., 1989. Methods for the Selection of Low - Temperature Tolerant Mutants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. by using Irradiated Cell Suspension Cultures. I. Selection of Regenerants in vivo under Suboptimal Temperature Conditions. Plant Breeding, 102: 140-147.
- Ichikawa, S., 1970. Variation in somatic chromosome number found in radiation-induced mutants of *Chrysanthemum morifolium* Hemsl. cv. Yellow Deleware and Deleware. Radiation Botany, 10: 557-562.
- Jerzy, M., Lubomski, M., 1989. Rozmnażanie złoćieni in vitro. Ogródnictwo, 5: 24-26.
- Jerzy, M., Lubomski, M., 1991. Tworzenie się pędów przybyszowych na izolowanych in vitro liściach chryzantem poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Hod. Rośl. i Nas., 2: 26-29.
- Jerzy, M., Nowaczyk, P., 1980. Wpływ promieniowania X oraz warunków uprawy na złoćień ogrodowy (*Chrysanthemum x hortorum* Bailey) cv. Bravo rozmnażany przez sadzonki pędowe. Zesz. Nauk. ATR w Bydgoszczy, Rolnictwo, 11: 73-80.
- Jerzy, M., Stepczyńska, K., 1980. Tworzenie się korzeni i pędów przybyszowych na izolowanych liściach złoćienia ogrodowego (*Chrysanthemum x hortorum* Bailey) w kulturze in vivo. Pr. Inst. Sad. i Kwic., Seria B, 5: 7-16.



- Jerzy, M., Zalewska, M., 1987. In vivo propagation of chrysanthemum from leaves. Int. Symp. on Propagation of Ornamental Plants, Geisenheim. Book of Abstracts, : 87.
- Jerzy, M., Zalewska, M., Piszczek, P., 1993. Somatic mutagenesis in chrysanthemum induced in vitro by irradiation of leaf explants forming adventitious shoots. Int. Symposium on Cultivar Improvement of Horticultural Crops, Beijing, ss. 1-10.
- 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 epiderms. *Euphytica*, 35: 137-148.
- Jong, J. de, van Wordragen, M.F., Rademaker, W., 1990. Early transformations events in *Dendranthema grandiflora*. Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding. Proceedings of Eucarpia Symposium. Wageningen, ss. 156-161.
- Jung-Heiliger, H., 1979a. Mutanten wirkungsvoller isolieren. I. Gb + Gw., 23: 542-545.
- Jung-Heiliger, H., 1979b. Mutanten wirkungsvoller isolieren. II. Gb + Gw., 43: 1008-1009.
- Khalid, N., Davey, M.R., Power, J.B., 1989. An assessment of somaklonal variation in *Chrysanthemum morifolium*. The generation of plants of potential commercial value. *Scientia Hort.*, 38: 287-294.
- Lemieux, C.S., Firrozabady, E., Robinson, K.E.P., 1990. Agrobacterium - mediated Transformation of *Chrysanthemum*. Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding. Proceedings of Eucarpia symposium. Wageningen, ss. 150-155.
- Machin, B.J., 1971. The importance of mutation breeding in the year-round chrysanthemum industry. *Eucarpia Meeting on Ornamentals*, ss. 25-31.
- 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.
- Miyazaki, S., Kishida, E., Tashiro, Y., Kanazawa, K., 1979. Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. V. Histological studies on the callus and shoot formation in stem segments cultured in vitro. *Agricultural Bulletin of Saga University*, 46: 43-65.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant.*, 15: 473-497.
- Muszyński, S., 1976a. Hodowla roślin ozdobnych o zmienionej barwie kwiatów - genetyka barwy. *Ogrodnictwo*, 2: 40.

- Muszyński, S., 1976b. Hodowla mutacyjna roślin ozdobnych. Hodowla roślin, 2: 37.
- Naylor, E.H., Johnson, B., 1937. A histological study of vegetative reproduction in *Saintpaulia ionantha*. *Am.J.Bot.*, 24: 673-678.
- Orlikowska, T., Jerzy, M., 1994. Metody biotechnologiczne w nauce i produkcji kwaciarskiej. *Biotechnologia*, 3(26): 30-36.
- Oszkinisowa, K., Jerzy, M., Janicka, E., 1968. Wzrost i rozwój 15 odmian złocieni wielkokwiatowych (*Chrysanthemum indicum* L.) w zależności od rodzaju pąka kwiatostanowego. *Biuletyn IHAR*, 3-4: 151-164.
- Rademaker, W., de Jong, J., 1990. Genetic variation in adventitious shoot formation in *Dendranthema grandiflora* (*Chrysanthemum morifolium*) explants. Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding. *Proceedings of Eucarpia Symposium*. Wageningen, ss. 34-38.
- Roest, S., Bokelmann, G.S., 1975. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. *Scientia Hortic.*, 3: 317-330.
- Shukla, R., Datta, S.K., 1993. Mutation Studies on Early and Late Varieties of Garden *Chrysanthemum*. *J.Nuclear Agric.Biol.*, 22(3-4): 138-142.
- Solecka, M., 1987. Zastosowanie chromatografii i spektrofotometrii do oceny barwy kwiatów i pokrewieństwa roślin ozdobnych. *Rozprawy Naukowe i Monografie, SGGW-AR, Warszawa*, ss. 44.
- Stepczyńska, K., Jerzy, M., Widacka, M., 1980. Mutagenesis in *Chrysanthemum* cv. Bravo propagated from the X-ray influenced leaf cuttings. Part I.  $MV_1$  generation. *Pr.Inst.Sad.i Kwiac., Seria B*, 5: 17-30.
- Widacka, M., Jerzy, M., 1981. Response of chrysanthemum to electro-magnetic field. *Acta Hortic.*, 125: 87-91.
- Wosińska, A., 1982. V. Indukowanie promieniami gamma  $^{60}Co$  zmienności modyfikacyjnej i mutacji u astra chińskiego (*Callistephus chinensis* Nees). *Acta Agrobot.*, 35(2): 285-301.
- Zalewska, M., 1985. Rozmnażanie złocieni z sadzonek liściowych. *Materiały Sympozjum "Rozmnażanie złocieni"*. Poznań, ss. 1-8.
- Zalewska, M., 1994. Kształtowanie pokroju miniaturowej odmiany chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) 'Mini Nero' w uprawie doniczkowej. *Zesz.Probl.Post.Nauk Roln.*, 414: 353-362.
- Zenktele, M., Zenktele, E., 1987. Rozmnażanie *Eustoma grandiflorum* za pomocą kultur in vitro. *Ogrodnictwo*, 12: 19-21.

SOMATYCZNA MUTAGENEZA U CHRYZANTEMY WIELKOKWIATOWEJ  
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)  
INDUKOWANA IN VIVO I IN VITRO PROMIENIOWANIEM X I GAMMA

Streszczenie

Obiektem badań była chryzantema wielkokwiatowa (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) cv. Red Nero.

Do indukowania mutacji in vivo przeznaczono sadzonki liściowe pochodzące z roślin kwitnących jesienią, a do indukowania mutacji in vitro - eksplantaty liściowe pobrane ze zregenerowanych uprzednio wierzchołków wzrostu. Zastosowano dwa rodzaje promieniowania X i gamma w dawkach 5, 10, 15, 20 i 25 Gy.

Celem bliższego poznania zjawiska regeneracji chryzantem z izolowanych liści, przeprowadzono obserwacje anatomiczne procesu tworzenia się pędów przybyszowych in vivo i in vitro, którymi objęto sadzonki i eksplantaty liściowe nie napromienione.

Centra merystematyczne, dające początek pędom przybyszowym, tworzyły się głównie z subepidermalnych lub głębiej leżących komórek parenchymy albo za pośrednictwem kalusa. Początek kaulogenezy in vivo obserwowano na mikroskopowych preparatach czterotygodniowych, a in vitro już na preparatach dwutygodniowych. Tylko w eksplantatach liściowych ex vitro sporadycznie obserwowano odróżnicowywanie się i ukierunkowane podziały epidermy, co może sugerować możliwość bezpośredniej organogenezy z komórek skórki.

Indukowanie mutacji in vitro okazało się bardziej efektywne, niż indukowanie mutacji in vivo. Wyrazem tego była wyższa frekwencja wariantów i wariacji w pokoleniu  $vM_1$  oraz mutantów i mutacji w pokoleniu  $vM_2$ . Efekt indukowania mutacji promieniowaniem gamma był większy, niż promieniowaniem X.

Frekwencja mutantów i mutacji u roślin zregenerowanych z sadzonek i eksplantatów liściowych uzależniona była od dawki napromienienia i rosła wraz z jej zwiększaniem. U roślin zregenerowanych z eksplantatów liściowych ex vitro promieniowanie X w dawce 5 Gy nie wywołało żadnego efektu mutagennego, a promieniowanie X i gamma w dawce 25 Gy zahamowało całkowicie regenerację pędów.

Mutacje objęły barwę i liczbę kwiatostanów, długość pędów oraz kształt liści.

W pokoleniu  $vM_3$  powtórzyły się wiernie wszystkie zmienione cechy roślin.

SOMATIC MUTAGENESIS IN CHRYSANTHEMUM  
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)  
INDUCED IN VIVO AND IN VITRO BY X AND GAMMA RADIATION

Summary

The object of investigation was *Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Red Nero.

Leaf cuttings derived from plants flowering in autumn were used to induce mutation in vivo, while to induce mutation in vitro leaf explants derived from previously regenerated shoot tips were used. Two different kinds of radiation were applied, that is, X and gamma rays in doses of 5, 10, 15, 20 and 25 Gy.

Some anatomical experiments were conducted to explore the phenomenon of chrysanthemum regeneration from isolated leaves. It was the process of adventitious shoot formation in vivo and in vitro. The cuttings and leaf explants which were observed had not been irradiated.

Meristem centres giving the origin to adventitious shoots were observed to have been developing from subepidermal or deeper located parenchyma cells or via callus. The beginning of caulogenesis in vivo was observed on the four-week old microscopical section while in vitro on the two-week old section. Leaf explants ex vitro only occasionally manifested some dedifferentiation and directional divisions of epidermis. That could suggest the possibility of the direct organogenesis epidermis cells.

Inducing mutation in vitro has proved to be more effective than inducing mutation in vivo. The outcome amounted in a higher frequency of variants and variances in generation  $vM_1$ , as well as of the mutants and mutations in generation  $vM_2$ .

Mutation induced by means of the gamma rays was thus more effective than the mutation induced by means of the X radiation.

The plants regenerated from cuttings and leaf explants had a great frequency of mutants and mutations, which depended on the dose of radiation and increased when the dose was extended. No mutagenesis effect was observed when plants regenerated from leaf explants ex vitro were treated with a X rays in a dose of a 5 Gy, while X and gamma rays in a dose of 25 Gy totally broke the regeneration of shoots.

The objects of mutation were: colour and number of inflorescences, the length of shoots and a shape of leaves.

In the  $vM_3$  generation all the changed traits of plants recurred exactly.

78712

ISSN 0209-0597