



## Wpływ promieniowania gamma na regenerację pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)

Małgorzata Zalewska, Justyna Lema-Rumińska

Pracownia Biotechnologii, Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych  
Wydział Rolniczy, Akademia Techniczno-Rolnicza, Bydgoszcz

### Effect of gamma rays on regeneration of adventitious shoots from leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev

#### Summary

Microcuttings of chrysanthemum radiomutants were irradiated *in vitro* with gamma rays with a dose of 15 Gy. The adventitious shoots' regeneration on MS medium was applied. The medium used was supplemented with plant growth regulators:  $2 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$  IAA and  $0.6 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$  BAP. An effect of radiation on the numbers of adventitious shoots regenerated from irradiated leaf explants was determined. 'Lady Vitroflora' produced substantially more adventitious shoots per one explant than 'Lady Apricot'. The ionizing radiation clearly reduced leaf explants regeneration capacity. The rate of adventitious shoots regeneration depended on the cultivar and was always higher than that for non-irradiated explants.

#### Key words:

*Dendranthema grandiflora* Tzvelev, adventitious shoots, leaf explants, gamma radiation.

#### Adres do korespondencji

Małgorzata Zalewska,  
Pracownia Biotechnologii,  
Katedra Roślin Ozdobnych  
i Warzywnych,  
Wydział Rolniczy,  
Akademia  
Techniczno-Rolnicza,  
ul. Bernardyńska 6,  
85-028 Bydgoszcz;  
e-mail:  
zalewska@atr.bydgoszcz.pl

## 1. Wstęp

Technika *in vivo*, wykorzystująca zjawisko tworzenia pędów przybyszowych na ukorzenionych sadzonkach liściowych chryzantem, jest bardzo prosta, ale ma ograniczenia wynikające ze

specyfiki odmianowej (1,2). Istnieje bowiem wiele odmian niezdolnych do tworzenia pędów przybyszowych nawet po zastosowaniu regulatorów wzrostu (3). Warunki *in vitro* umożliwiają regenerację pędów przybyszowych z liści również tym odmianom, które ich nie tworzą *in vivo*.

Wykorzystanie eksplantatów nie zawierających merystemów w indukowaniu mutacji – na bazie bardzo dogodnego obiektu, jaki stanowią liście regenerujące pędy przybyszowe, izolowane z napromienionych *in vitro* mikrosadzonek, stanowić może skuteczną drogę w uzyskaniu nowych odmian chryzantem (4-6). Centra merystematyczne, dające początek pędom przybyszowym tworzą się zdaniem Broertjesa i Keena (7) zawsze tylko z jednej komórki eksplantatu liściowego, co daje gwarancję uzyskania po napromienieniu mutantów jednolitych, nie będących chimerami. Zalewska wykazała (8), że komórka inicjująca proces kaulogenezy może pochodzić z epidermy lub z głębszych warstw tkanek – subepidermy lub parenchymy.

Pierwszym etapem, poprzedzającym wykorzystanie techniki pędów przybyszowych w hodowli mutacyjnej musi być zawsze poznanie zdolności regeneracyjnych eksplantatów odmiany macierzystej, które stanowić będą obiekt działania czynnika mutagennego.

Celem pracy była ocena wpływu promieniowania gamma na regenerację pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) odmiany 'Lady Apricot' oraz 'Lady Vitroflora'. Poznanie zdolności regeneracyjnej liści tych odmian w warunkach *in vitro* ukierunkowane było na potrzeby hodowli radiomutacyjnej.

## 2. Materiał i metody

Badaniom poddano dwie odmiany chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) z grupy Lady: 'Lady Apricot' i 'Lady Vitroflora' – mutanty uzyskane z odmiany macierzystej 'Richmond' – w wyniku działania promieniowania gamma w dawce 15 Gy na eksplantaty liściowe (5).

Do napromieniania, przeznaczono eksplantaty liściowe roślin zregenerowanych wcześniej *in vitro* z wierzchołków wzrostu. Wierzchołki te pobrano z sadzonek pędowych uprawianych w szklarni. Po wyizolowaniu umieszczono je na pożywce stałej MS (9) bez regulatorów wzrostu o pH = 5,8. Wyrastające pędy namnażano na zmodyfikowanej pożywce MS, uzupełnionej 1 mg × l<sup>-1</sup> IAA i 0,3 mg × l<sup>-1</sup> BAP i o zwiększonej o połowę zawartości wapnia i żelaza – w kilku pasażach, przeprowadzonych w odstępach 6-tygodniowych.

Do napromienienia przeznaczono 180 ukorzenionych mikrosadzonek każdej odmiany, rosnących w 30 słoikach – po 6 w każdym, mających średnio 6-9 liści. Napromienienie przeprowadzono promieniami gamma w dawce 15 Gy, pochodzącymi ze źródła Co<sup>60</sup> aparatu Theratron 780 C. Moc dawki pochłoniętej wynosiła 2,14 Gy × min<sup>-1</sup>. Po napromienieniu, ze środkowej części każdej mikrosadzonki od-



cinano po dwa liście. Powierzchnia blaszek liściowych wynosiła od 0,8 do 1,4 cm<sup>2</sup>, a długość ogonków liściowych od 1 do 1,5 cm. Eksplantaty te umieszczono na pożywce MS z dodatkiem 2 mg × l<sup>-1</sup> IAA i 0,6 mg × l<sup>-1</sup> BAP, o pH 5,6 – po 6 sztuk w słoiku. Identycznie postępowano w stosunku do 180 mikrosadzonek nie poddanych działaniu promieniowaniu gamma, stanowiących kombinację kontrolną.

Wszystkie etapy, od inicjacji kultur do regeneracji pędów przybyszowych przebiegały w temperaturze 24 ± 2°C i wilgotności względnej powietrza 60% – przy 16-godzinnym dniu i natężeniu napromienienia kwantowego 60 μmol × m<sup>-2</sup> × s<sup>-1</sup>, którego źródłem były lampy fluorescencyjne Philips typu TLD 36 W/54.

Wpływ promieniowania gamma na regenerację pędów przybyszowych określono ilościowo. Porównano liczbę i procent eksplantatów liściowych tworzących pędy przybyszowe oraz liczbę wytworzonych pędów ogółem z jednego eksplantatu. Średnią liczbę pędów wytworzonych z jednego eksplantatu obliczono w stosunku do liczby eksplantatów niezakażonych. Uzyskane wartości opracowano statystycznie metodą analizy wariancji, a istotność różnic oceniano testem t-Studenta, przy α = 0,05. Określono także dynamikę tworzenia się pędów przybyszowych przez 3 miesiące od momentu wyłożenia eksplantatów na pożywkę.

### 3. Wyniki i dyskusja

W badaniach Broertjesa i in. (10) wskazuje się na wysoką skuteczność ponownego napromieniania liści mutantów w warunkach *in vivo* – w celu uzyskaniu nowych zmienności. Zdaniem Zalewskiej (11) indukowanie mutacji *in vitro* jest bardziej efektywne niż przeprowadzone w warunkach *in vivo*, podobnie jak promieniowanie gamma w stosunku do promieniowania X – co znajduje swój wyraz w liczbie mutacji i mutantów. Natomiast celowość zastosowania w badaniach dawki 15 Gy potwierdzili m.in. Jerzy in. (5) oraz Zalewska (11).

W doświadczeniu wstępnym wykazano, że promieniowanie gamma wyraźnie ograniczyło zdolność regeneracyjną eksplantatów liściowych analizowanych odmian chryzantem. Znalazło to także potwierdzenie w doświadczeniach Broertjesa i in. (4) oraz Jerzego i Lubomskiego (12), przeprowadzonych w oparciu na kilku innych odmianach tego gatunku, w których ponadto okazało się, że promieniowanie X w mniejszym stopniu ogranicza zdolności regeneracyjne eksplantatów liściowych niż promieniowanie gamma.

W wyniku działania promieniowania gamma procent eksplantatów liściowych odmiany 'Lady Apricot' i 'Lady Vitroflora' – tworzących pędy przybyszowe zmalał niemal dziesięciokrotnie w stosunku do eksplantatów nie napromienionych (tab. 1). Ujemny wpływ zastosowanego czynnika mutagennego znalazł także wyraźny swój wyraz w liczbie pędów przybyszowych, wytworzonych z jednego eksplantatu. Jeden regenerujący liść odmiany 'Lady Viroflora' i 'Lady Apricot' wytworzył odpowiednio ponad dwu- i czterokrotnie mniej pędów przybyszowych niż kontrolny, przy czym



więcej pędów tworzyły liście 'Lady Vitroflora'. Istotniejsze, z praktycznego punktu widzenia, jak się wydaje, jest jednak rozpatrywanie liczby pędów wytworzonych z jednego wyłożonego na pożywkę liścia niż liścia regenerującego. Liczba ta zależała także od odmiany oraz od tego, czy eksplantat był poddany działaniu promieniowania czy też nie. W przypadku rozpatrywanych odmian, więcej pędów przybyszowych – zarówno wśród liści kontrolnych jak i poddanych działaniu promieniowania gamma – wytworzyła odmiana 'Lady Vitroflora'. Zawsze jednak średnia liczba pędów wytworzonych z eksplantatów była drastycznie zmniejszona u traktowanych promieniowaniem jonizującym – u 'Lady Vitroflora' ponad 22-krotnie, a u 'Lady Apricot' 35-krotnie. Pięć standardowych odmian chryzantem ocenianych w badaniach Jerzego i Lubomskiego (12) w zależności od odmiany wytwarzało na jednym wyłożonym liściu przed jego napromienieniem od 0,13 do 2,66 pędów przybyszowych, a po zastosowaniu promieniowania gamma od 0,02 do 1,74. W badaniach własnych na jednym liściu, niezależnie od odmiany, powstało średnio od 0,35 do 1,37 pędów przybyszowych przed napromienieniem i od 0,01 do 0,06 po napromienieniu (tab.). Wynika z tego, że analizowane odmiany charakteryzują się niezbyt wysoką liczbą pędów przybyszowych zregenerowanych z jednego eksplantatu liściowego – co jest uwarunkowane genetycznie.

Tabela

## Regeneracja pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych badanych odmian chryzantem

Odmiana	Dawka promieni gamma (Gy)	Liczba i procent eksplantatów tworzących pędy przybyszowe		Liczba wytworzonych pędów przybyszowych		
				ogółem	z jednego wyłożonego eksplantatu	z jednego regenerującego eksplantatu
'Lady Apricot'	0 (kontrola)	48 a	13,33	126 a	0,35 a	2,63 a
	15	5 b	1,39	3 b	0,01 b	0,60 b
'Lady Vitroflora'	0 (kontrola)	78 a	21,67	492 a	1,37 a	6,31 a
	15	8 b	2,22	22 b	0,06 b	2,75 b

Średnie w kolumnach, dotyczące jednej odmiany, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy  $\alpha = 0,05$ .

Wyniki badań, określające wpływ czynnika mutagennego na regenerację eksplantatów liściowych okazały się bardzo istotne, gdyż pozwalają na dokonanie ostatecznego wyboru obiektów – odmian do indukowania mutacji, bądź nawet rezygnację z nich, a także mogą ewentualnie wskazać – na podstawie oceny przebiegu procesu regeneracji – na ewentualną konieczność użycia liczniejszego materiału.

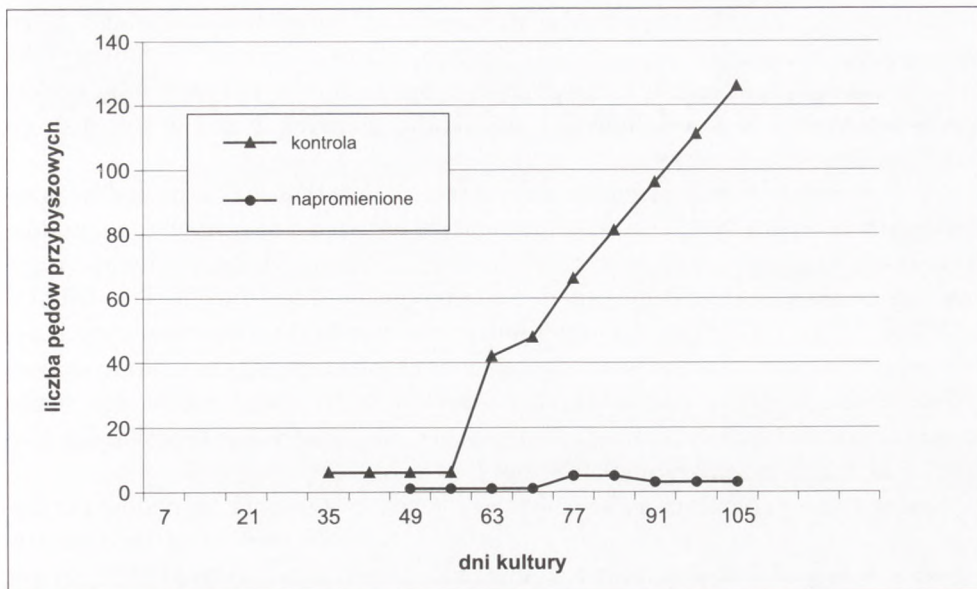
Nasuwa się tu także pytanie, czy badane odmiany – powtórnie napromienione mutanty charakteryzują się słabszą zdolnością regeneracyjną w stosunku do odmiany macierzystej, z której uprzednio powstały. Otóż dokonana wcześniej ocena liczby pędów przybyszowych, uzyskanych z jednego wyłożonego liścia odmiany 'Rich-



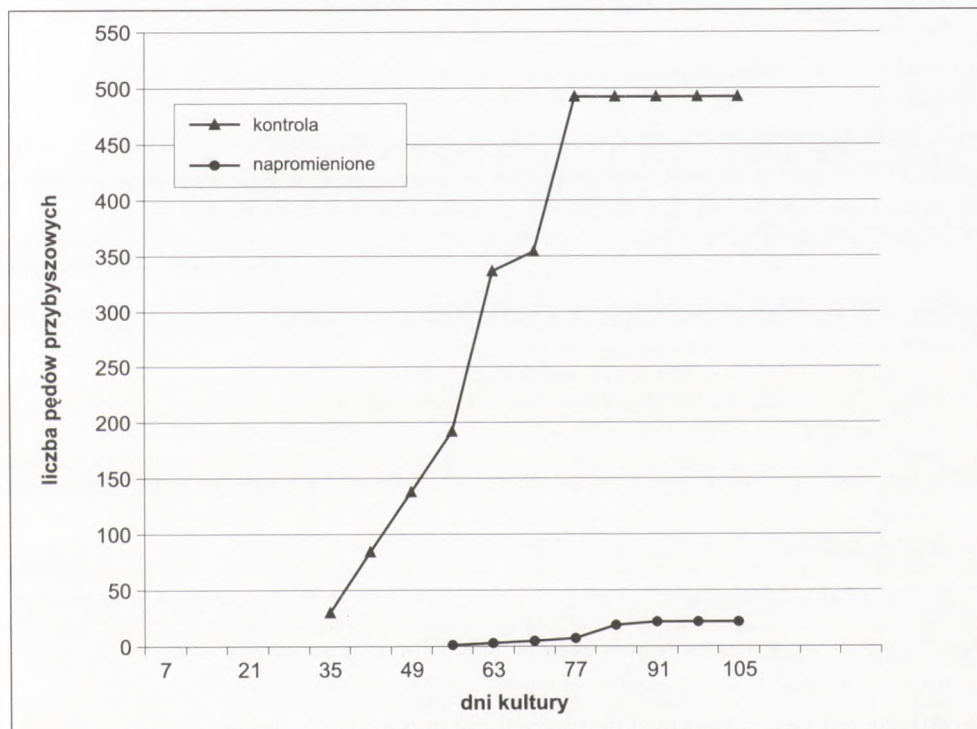
mond' (12) wskazuje, że była ona wyższa zarówno w stosunku do odmiany 'Lady Apricot' jak i 'Lady Vitroflora'. Osłabienie zdolności regeneracyjnej pędów przybyszowych u uzyskanych wcześniej mutantów (większe u 'Lady Apricot'), nie jest skorelowane z zakresem wywołanych mutacji. U odmiany 'Lady Apricot' nastąpiła bowiem tylko mutacja barwy kwiatostanów z purpuroworóżowej na buraczkowozłotą, co było związane z pojawieniem się karotenoidów, a zmniejszeniem się zawartości antocyjanów. Natomiast u 'Lady Vitroflora' barwa kwiatostanu uległa zmianie na purpuroworóżową – w wyniku obniżeniu poziomu antocyjanów (13), a w kwiatostanie pełnym płaskim – w odróżnieniu od odmiany macierzystej kwiaty jęczyczkowane zrosły się w rurki. Z jednego regenerującego eksplantatu odmiana 'Lady Apricot' wytworzyła mniej pędów przybyszowych niż 'Richmond', a 'Lady Vitroflora' niemal dwukrotnie więcej.

Eksplantaty liściowe *ex vitro*, jak się wydaje, są bardziej wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego niż liście *ex vivo*. Stepczyńska i in. (14) podają, że po zastosowaniu promieniowania X w dawce 15 Gy, na liście *ex vivo* liczba pędów przybyszowych odmiany 'Bravo' nie ulega zmniejszeniu, a ponad 90% liści jest zdolnych do tworzenia pędów przybyszowych – zarówno przed jak i po napromienieniu. Natomiast promieniowanie w dawkach niższych, tj. 4-10 Gy na eksplantaty liściowe *in vitro* tej samej odmiany chryzantem ogranicza liczbę pędów przybyszowych o połowę (4). Wyższe dawki promieniowania jeszcze bardziej ograniczają możliwości regeneracyjne pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych. Przy dawce 20 Gy u odmiany 'Red Nero' obserwuje się drastyczne zahamowanie tego procesu, a całkowite – po napromienieniu ich dawką 25 Gy, zarówno w przypadku promieniowania X jak i gamma (11). Również liczba pędów przybyszowych regenerujących w warunkach *in vitro* z fragmentów osi kwiatostanowej odmiany 'Bravo' poddanych promieniowaniu X w dawce 4-12 Gy maleje w miarę zwiększania dawki promieniowania. W przypadku użycia jako eksplantatów osi kwiatostanowych Broertjes i Lock (15) oraz de Jong i Custers (16) zauważają także bardzo wyraźną specyfikę odmianową w zakresie zdolności regeneracyjnej pędów przybyszowych.

Działanie czynnika mutagennego znajduje swój wyraz również w czasie potrzebnym na formowanie się pędów przybyszowych na izolowanych *in vitro* liściach. W przeprowadzonych badaniach, zawsze wcześniejsze formowanie się pędów przybyszowych obserwowano na eksplantatów kontrolnych – u odmiany 'Lady Apricot' i 'Lady Vitroflora' w 35 dniu trwania kultury (rys. 1-2). Na eksplantatach poddanych działaniu promieniowania gamma opóźnienie w regeneracji pędów w stosunku do kontroli było wyraźne i wynosiło odpowiednio dwa i trzy tygodnie. Broertjes i in. (4) zaobserwowali zależność procesu tworzenia się pędów przybyszowych od rodzaju użytego eksplantatu. Fragmenty osi kwiatostanowej odmiany 'Bravo' regenerują największą liczbę pędów przybyszowych, ale później w porównaniu z eksplantatami takimi jak płatki, koszyczki kwiatostanowe czy liście. Na wszystkich eksplantatach, z wyjątkiem osi kwiatostanowej pierwsze pędy przybyszowe pojawiają się po trzech tygodniach inkubacji. Autorzy jednak nie odnoszą się ściśle do dynamiki regeneracji



Rys. 1. Dynamika regeneracji pędów przybyszowych z eksplantów liściowych odmiany 'Lady Apricot'.



Rys. 2. Dynamika regeneracji pędów przybyszowych z eksplantów liściowych odmiany 'Lady Vitroflora'.



pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych, poddanych napromienieniu – co uniemożliwia ustosunkowanie się do tej kwestii. Warto nadmienić, że Stepczyńska i in. (14) obserwowali około dwutygodniowe opóźnienie w tworzeniu się pędów przybyszowych na napromienionych sadzonkach liściowych *in vivo* w stosunku do liści kontrolnych.

Na kontrolnych liściach odmiany 'Lady Apricot' – maksymalną liczbę pędów przybyszowych zaobserwowano po 105 dniach od ich wyłożenia na pożywkę, a u poddanych działaniu promieniowania wcześniej – po 77 dniach. Szczyt możliwości regeneracyjnych eksplantatów nie napromienionych odmiany 'Lady Vitroflora' – widoczny był po 77 dniach od rozpoczęcia kultury, po czym liczba zregenerowanych pędów utrzymywała się na tym samym poziomie. Eksplantaty napromienione wytworzyły największą liczbę pędów przybyszowych – w 91 dniu kultury. Ich liczba w okresie trwania dalszej kultury nie uległa zmianie. Obserwacje te wskazują również na wyraźną specyfikę odmianową w tym zakresie.

Można także przypuszczać, że istotny wpływ na formowanie się pędów przybyszowych *in vitro* mogą mieć również inne czynniki takie jak wiek liścia, jego położenie na łodydze, obecność lub brak ogonka liściowego, skład pożywki (17), czy też termin przebiegu regeneracji. Sugeruje to konieczność zapewnienia w procesie indukowania mutacji takich samych warunków jak przy wstępnej ocenie zdolności regeneracyjnej eksplantatów przed ich napromienieniem.

## Literatura

1. Jerzy M., Stepczyńska K., (1980), Pr. Inst. Sad. i Kwiac., Ser. B, 7-16.
2. Custers J. B. M., (1986), Agricultural University, Wageningen, Publication, 528, 1-128.
3. Zalewska M., (1985), Materiały Sympozjum „Rozmnażanie złocieni”, Poznań, 1-7.
4. Broertjes C., Roest S., Bokelmann S., (1976), Euphytica, 25, 11-19.
5. Jerzy M., Zalewska M., Piszczek P., (1993), Int. Symp. On Cultivar Improvement of Horticultural Crops, Beijing, 1-10.
6. Zalewska M., Jerzy M., (1997), Acta Hort., 447, 615-618.
7. Broertjes C., Keen A., (1980), Euphytica, 29, 73-87.
8. Zalewska M., (2001), Tzvelev, Acta Hort., 560, 225-228.
9. Murashige T., Skoog F., (1962), Physiol. Plant., 15, 473-497.
10. Broertjes C., Koene P., van Veen J. W. H., (1980), Euphytica, 29, 525-530.
11. Zalewska M., (1995), *Somatyczna mutageneza u chryzantemy wielkokwiatowej (Dendranthema grandiflora Tzvelev) indukowana in vivo oraz in vitro promieniowaniem X i gamma*, Wyd. Uczeln. ATR w Bydgoszczy, Rozprawy, 63.
12. Jerzy M., Lubomski M., (1991), Hodowla Roślin i Nasiennictwo, 2, 26-29.
13. Lema-Rumińska J., (2002), *Identyfikacja mutantów chryzantemy wielkokwiatowej (Dendranthema grandiflora Tzvelev) na poziomie komórkowym i molekularnym*, rozprawa doktorska, Biblioteka ATR w Bydgoszczy.
14. Stepczyńska K., Jerzy M., Widacka M., (1980), Pr. Inst. Sad. i Kwiac. Ser. B, 5, 17-30.
15. Broertjes C., Lock C. A. M., (1985), Euphytica, 34, 97-103.
16. de Jong J., Custers J. B. M., (1986), Euphytica, 35, 137-148.
17. Roest S., Bokelmann S., (1975), Sci. Hortic., 3, 317-330.