

**OCENA PLOIDALNOŚCI MUTANTÓW CHRYZANTEMY
WIELKOKWIATOWEJ (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)
UZYSKANYCH W WYNIKU MUTAGENEZY
INDUKOWANEJ *IN VITRO* I *IN VIVO*
PROMIENIOWANIEM JONIZUJĄCYM**

Justyna Lema-Rumińska, Małgorzata Zalewska

Streszczenie: Badano liczbę chromosomów w komórkach merystemów wierzchołkowych korzeni trzech odmian wyjściowych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) i odmian pochodnych, otrzymanych w wyniku radiomutacji. Wykazano, że tylko jedna odmiana mutacyjna – ‘Bronze Wonder’ miała inną liczbę chromosomów niż odmiana wyjściowa ‘Lilac Wonder’.

Słowa kluczowe: *Dendranthema grandiflora*, mutanty, chromosomy

WSTĘP

Jedną z metod otrzymywania nowych odmian roślin uprawnych, rolniczych i ogrodniczych, jest hodowla mutacyjna [Broertjes i in. 1976]. Polega ona na wywołaniu mutacji, czyli niekontrolowanej zmiany w materiale genetycznym rośliny poddanej działaniu dowolnego mutagenu. W wyniku zastosowania promieniowania jonizującego powstały analizowane tu mutanty chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) z grup Lady, Nero i Wonder [Jerzy i in. 1993, Zalewska 1995, Jerzy i Zalewska 1997], które różnią się nie tylko barwą kwiatostanu, ale i kształtem kwiatów języczkowatych, a nawet pokrojem całej rośliny. Uzyskanie licznych radiomutantów tworzących grupy odmian o wspólnym rodowodzie było inspiracją do podjęcia dalszych, bardziej wnikliwych badań nad nimi.

Celem niniejszej pracy była ocena ploidalności mutantów z grup Lady, Nero i Wonder i odmian wyjściowych. Badano, jakie zmiany zaszły w liczbie chromosomów.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były odmiany wyjściowe – macierzyste chryzantemy wielokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) oraz ich mutanty – odmiany pochodne (tab. 1). Badane mutanty tworzyły trzy grupy odmian: grupę Lady otrzymaną z odmiany ‘Richmond’, do której należały – ‘Lady Amber’, ‘Lady Apricot’, ‘Lady Bronze’, ‘Lady Orange’, ‘Lady Pink’, ‘Lady Rosy’, ‘Lady Salmon’, ‘Lady White’, ‘Lady Vitroflora’ oraz ‘Lady Yellow’. Drugą grupę stanowiły – odmiana wyjściowa ‘Red Nero’ oraz jej mutant – ‘Mini Nero’, zaś trzecią grupę tworzyły dwa mutanty – ‘Bronze Wonder’ i ‘Red Wonder’ otrzymane z odmiany wyjściowej ‘Lilac Wonder’. Grupa Lady i Wonder należą do odmian standardowych, zaś Nero do gałązkowych. Mutant ‘Mini Nero’ w odróżnieniu od odmiany silnie rosnącej, z której powstał – ‘Red Nero’ – jest

Tabela 1. Charakterystyka kwiatostanu odmian wyjściowych i mutantów oraz sposób ich powstania
Table 1. Characteristic of inflorescence of original cultivar and mutants and the way of their formation

Odmiana wyjściowa* Mutant Original cultivar* Mutant	Kwiatostan Inflorescence			Metoda indukowania mutacji Method of induction	Rodzaj promieniowania Kind of irradiation	Dawka napromienienia Irradiation dose Gy
	barwa colour	wielkość size	typ type			
‘Richmond’*	purpuroworóżowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	-	-	-
‘Lady Amber’	złocistobrazowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	X	15
‘Lady Apricot’	buraczkowozłota	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	gamma	15
‘Lady Bronze’	czerwonobrazowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	X	15
‘Lady Orange’	pomarańczowo-czerwona	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	X	15
‘Lady Pink’	różowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	X	15
‘Lady Rosy’	kremoworóżowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	X	15
‘Lady Salmon’	łososiowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	X	15
‘Lady White’	biała, z żółtozielonym środkiem	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	gamma	15
‘Lady Vitroflora’	wrzosoworóżowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty, igielkowy	in vitro	gamma	15
‘Lady Yellow’	żółta	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	gamma	15
‘Red Nero’*	ciemnoczerwona, z żółtym oczkiem kwiatów rurkowatych pomarańczowo-czerwona,	drobnokwiatowy	półpełny	-	-	-
‘Mini Nero’	z żółtym oczkiem kwiatów rurkowatych	drobnokwiatowy	półpełny	in vivo	X	25
‘Lilac Wonder’*	fioletoworóżowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	-	-	-
‘Bronze Wonder’	czerwonobrazowa	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	gamma	15
‘Red Wonder’	czerwona	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	in vitro	gamma	15

odmianą doniczkową. Wszystkie wyżej wymienione mutanty zostały otrzymane w latach 1988-1992 w wyniku działania promieniowania X lub gamma na eksplantaty liściowe odmian wyjściowych *in vitro* lub sadzonki *in vivo*.

Liczbę chromosomów ustalono w wierzchołkach wzrostu korzeni. Z roślin mącznych rosnących w szklarni 3 kwietnia 2001 pobrano po 10 sadzonek pędowych i umieszczono je w podłożu torfowym w paletach wielodonniczkowych w celu ukorzenia. Z każdej odmiany w dniach od 19 do 30 kwietnia 2001 roku w godzinach od 9.00 do 10.00 pobrano po 100 wierzchołków wzrostu o długości 5 mm. Umieszczono je w probówkach w wodzie destylowanej w chłodni na 24 godziny w temperaturze od 0 do +1°C. Następnie przeniesiono materiał do utrwalcza, który stanowił płyn Carnoya (etanol absolutny/kwas octowy lodowaty – 3:1 v/v). Utrwalano materiał przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wierzchołki wzrostu przenoszono do 70% etanolu, w którym przechowywano je do czasu wykonania analizy.

Przed barwieniem macerowano tkanki 0,1 N HCl, ogrzewając próbki na łaźni wodnej w temperaturze 60°C przez 7 minut. Następnie płukano je przez 45 minut w wodzie destylowanej. Wierzchołki wzrostu korzeni barwiono metodą acetokarminową [Gerlach 1972] w probówkach, ogrzewając je w acetokarminie na łaźni wodnej w temperaturze 60°C przez 45 minut. Po osuszeniu przenoszono korzenie na szkiełko podstawowe, odcinano wierzchołek wzrostu (1–1,5 mm) i wykonano preparaty rozgniotowe w karminie. Przygotowano po 50 preparatów z każdej odmiany.

Liczbę chromosomów w metafazie ustalano pod mikroskopem typu Jenamed-2 przy powiększeniu 1000 razy. Fotografie wykonano z zastosowaniem przystawki automatycznej do mikrofotografii mf-AKS 24×36 Automatic-2. Analizowano szczegółowo po 10 płytek metafazowych dla każdej odmiany reprezentujących różne korzenie.

WYNIKI

Wyniki ustalania liczby chromosomów w komórkach merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni u badanych chryzantem przedstawiono w tabeli 2.

Grupa Lady wraz z odmianą wyjściową 'Richmond' miały $2n = 54$ chromosomy. Liczba chromosomów u mutantów Lady nie uległa zatem zmianie w wyniku działania promieniowania jonizującego.

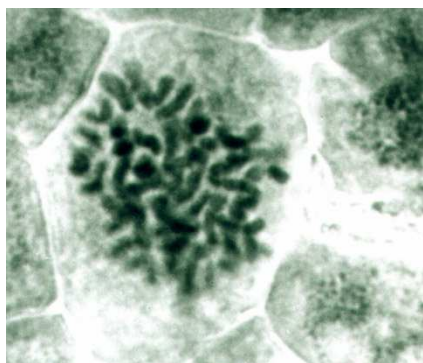
W grupie Nero zarówno odmiana wyjściowa, jak i jej mutant posiadały $2n = 45$ chromosomów. U jednego z mutantów grupy Wonder stwierdzono zwiększenie liczby chromosomów o dziewięć, tj. do 54. Odmiana wyjściowa 'Lilac Wonder' i druga odmiana 'Red Wonder' posiadały 45 chromosomów (rys. 1, 2).

DYSKUSJA

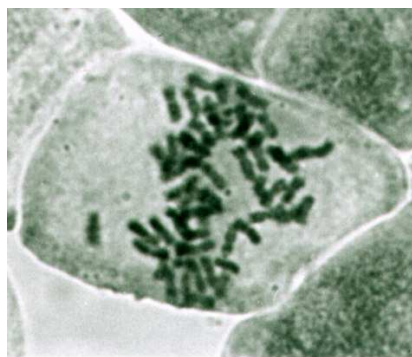
Liczba chromosomów u chryzantem jest różna dla poszczególnych gatunków i waha się od $2n = 36$ do $2n = 72$, a nawet $2n = 198$, jak u *Chrysanthemum lacustre* [Dowrick 1953]. U większości gatunków uprawnych występują jednak 54 chromosomy [Nazeer i Khoshoo 1983].

Tabela 2. Liczba chromosomów odmian wyjściowych i mutantów
 Table 2. Number of chromosomes of original cultivars and mutants

Odmiana wyjściowa* Mutant Original cultivar* Mutant	Liczba chromosomów Number of chromosomes 2n
'Richmond'*	54
'Lady Amber'	54
'Lady Apricot'	54
'Lady Bronze'	54
'Lady Orange'	54
'Lady Pink'	54
'Lady Rosy'	54
'Lady Salmon'	54
'Lady White'	54
'Lady Vitroflora'	54
'Lady Yellow'	54
'Red Nero'*	45
'Mini Nero'	45
'Lilac Wonder'*	45
'Bronze Wonder'	54
'Red Wonder'	45



Rys. 1. Chromosomy u odmiany wyjściowej 'Lilac Wonder' ($2n = 45$)
 Fig. 1. Chromosomes in original cultivar 'Lilac Wonder' ($2n = 45$)



Rys. 2. Chromosomy u mutantu 'Bronze Wonder' ($2n = 54$)
 Fig. 2. Chromosomes in mutant 'Bronze Wonder' ($2n = 54$)

U badanych chryzantem z trzech grup odmianowych – 'Lady', 'Nero' i 'Wonder' stwierdzono 45 lub 54 chromosomy. Tylko u mutantu 'Bronze Wonder' nastąpiło zwiększenie liczby chromosomów o dziewięć w wyniku działania promieniowania jonizującego. Zwiększenie liczby chromosomów nie wiązało się ze zwiększeniem średnicy kwiatostanu czy zmianą pokroju rośliny, lecz tylko ze zmianą barwy kwiatów języczkowatych [Jerzy i Zalewska 1997]. To potwierdza hipotezę Nazeer i Khoshoo

[1983], że liczba chromosomów nie zawsze jest skorelowana z wielkością kwiatostanu, ponieważ $2n = 54$ jest typową liczbą chromosomów zarówno dla odmian o małych, jak i dużych kwiatostanach.

Spośród roślin zregenerowanych z napromienionych tkanek wyselekcjonowano osobniki o zmienionej barwie kwiatostanów, a w przypadku 'Mini Nero', gdzie dawka była najwyższa, także o zmienionym pokroju. Chociaż na podstawie tak szczupłego materiału trudno dyskutować o kierunku zmian wywołanych przez zastosowane mutageny, to można powiedzieć, że zastosowany rodzaj promieniowania jonizującego oraz wysokość dawki nie miały wpływu na zmianę liczby chromosomów u badanych mutantów. Według Ichikawy i in. [1970], większe zmiany w liczbie chromosomów powstają po działaniu wyższymi dawkami promieniowania gamma. Badania przeprowadzone przez Dattę i Gupta [1981] oraz Dattę i Banerji [1990] sugerują, że promieniowanie jonizujące najczęściej nie powoduje zmian w liczbie chromosomów u powstałych tą drogą mutantów. Autorzy ci obserwowali jednak liczne aberracje chromosomowe podczas podziałów mitotycznych w wierzchołkach wzrostu korzeni, takie jak: fragmenty chromosomów, wcześniejsze lub późniejsze oddzielanie się chromosomów, powstawanie tzw. mostków anafazowych i inne. Podobne zmiany obserwowali Datta K. i Datta S. [1998] u mutantów chryzantem powstałych w wyniku działania kolchicyną. Jednak Ichikawa i in. [1970] donoszą, że u sztucznie indukowanych mutantów dwóch odmian chryzantem 'Yellow Deleware' i 'Deleware' nastąpiły zmiany w liczbie chromosomów w stosunku do odmian wyjściowych. Autorzy ci zanotowali zarówno ubytek, jak i pojawienie się dodatkowych chromosomów.

Badania przeprowadzone przez Jerzego i Zalewską [1997] dotyczące separacji chimera grupy odmian Wonder dowodzą, że właśnie odmiana 'Bronze Wonder' składa się z tkanek jednorodnych genetycznie. Drugi mutant – 'Red Wonder' jest natomiast chimerą peryklinalną ze zmienioną tylko warstwą L1. Zmiana liczby chromosomów u mutantu 'Bronze Wonder' potwierdza zatem wystąpienie mutacji obejmującej wszystkie warstwy – L1, L2 i L3, gdyż analiza liczby chromosomów była przeprowadzona w wierzchołkach wzrostu korzeni zbudowanych z warstwy L3. Można przypuszczać, że w tym przypadku zmiana barwy mogła być związana ze zwiększeniem liczby chromosomów. Z kolei odmiana 'Lady Vitroflora' z grupy Lady, u której obserwowano zmianę kształtu kwiatów języczkowatych, może być przykładem braku korelacji zmian mutacyjnych z liczbą chromosomów.

Shibata i in. [1998] badali poszczególne warstwy pod względem liczby chromosomów. Dowodzą oni, że wiele odmian chryzantem różni się pod względem liczby chromosomów w poszczególnych warstwach, przy czym najczęściej dochodzi do utraty jednego lub pojawienia się dodatkowego chromosomu. Małuszyńska [2001] uważa, że zjawisko takie jest powszechne wśród roślin i może być wynikiem endoreduplikacji, endomitoz, fuzji komórek lub zahamowania cytokinezy. W wyniku tych procesów powstają organizmy składające się z różnych genetycznie tkanek – chimery.

Z przeprowadzonych badań wynika, że promieniowanie jonizujące najczęściej nie powoduje u chryzantem zmian ploidalności, które nie muszą być również skorelowane z mutacją barwy lub kształtu kwiatów języczkowatych oraz pokroju całej rośliny.

PIŚMIENNICTWO

- Broertjes C., Roest S., Bokelmann G. S., 1976. Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ram. using ex vivo and in vitro adventitious bud techniques. *Euphytica* 25, 11–19.
- Datta K., Datta S. K., 1998. Palynological interpretation of gamma ray and colchicine induced mutation in chrysanthemum cultivars. *Israel J. Plant Sci.* 46, 199–207.
- Datta S. K., Banerji B. K., 1990. 'Los Banos Variegata' – A New Double Bracted Chlorophyll Variegated Bougainvillea Induced by Gamma Rays. *J. Nuclear Agric. Biol.* 19, 134–136.
- Datta S. K., Gupta M. N., 1981. Cytomorphological, palynological and biochemical studies on control and gamma-induced mutants of chrysanthemum cultivar E-13. *Sabrao J.* 13 (2), 136–148.
- Dowrick G. J., 1953. The chromosomes of *Chrysanthemum*, I: The species. *Heredity* 7, 365–375.
- Gerlach D., 1972. Zarys mikrotechniki botanicznej. PWRiL, Warszawa.
- Ichikawa S., Yamakawa K., Sekiguchi F., Tatsuno T., 1970. Variation in somatic chromosome number found in radiation-induced mutants of *Chrysanthemum morifolium* Hemsl. cv. Yellow Delaware and Delaware. *Radiation Botany* 10, 557–562.
- Jerzy M., Zalewska M., 1997. Flower colour recurrence in Chrysanthemum and Gerbera mutants propagated *in vitro* from meristems and leaf explants. *Acta Hort.* 447, 611–614.
- Jerzy M., Zalewska M., Piszczek P., 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.* 1–10.
- Małuszyńska J., 2001. Cytogenetyczne badania struktury genomów poliploidalnych. *Biotechnologia* 1 (52), 35–41.
- Nazeer M. A., Khoshoo T. N., 1983. Variation in the chromosome complement of *Chrysanthemum morifolium* complex. *The Nucleus* 26 (1), 22–29.
- Shibata M., Kishimoto S., Hirai M., Aida R., Ikeda I., 1998. Analysis of the periclinal chimeric structure of chrysanthemum sports by random amplified polymorphic DNA. *Acta Hort.* 454, 347–353.
- 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, 5–83.

EVALUATION OF PLOIDY IN CHRYSANTHEMUM MUTANTS (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) OBTAINED IN MUTAGENESIS INDUCED *IN VITRO* AND *IN VIVO* BY IONIZING RADIATION

Abstract: The present research investigated the number of chromosomes in the cells of apical meristems of roots for three original *Dendranthema grandiflora* Tzvelev cultivars and the derivative cultivars obtained due to radiomutation. It was shown that only in one mutation cultivar, 'Bronze Wonder', the number of chromosomes differed from that of the original cultivar, 'Lilac Wonder'.

Key words: *Dendranthema grandiflora*, mutants, chromosomes

Justyna Lema-Rumińska, Małgorzata Zalewska, Katedra Roślin Ozdobnych i Warzywnych, Pracownia Biotechnologii, Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz, e-mail: ozdob@atr.bydgoszcz.pl