



*Mgr Justyna Lema-Rumińska*

**Identyfikacja mutantów  
chryzantemy wielkokwiatowej  
(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)  
na poziomie komórkowym i molekularnym.**

*Rozprawa doktorska*

*przedstawiona Radzie Wydziału Rolniczego  
Akademii Techniczno – Rolniczej w Bydgoszczy*

*wykonana pod kierunkiem  
Dr hab. Małgorzaty Zalewskiej, prof. ATR  
w Pracowni Biotechnologii  
Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych*

Biblioteka Główna ATR w Bydgoszczy



00000088127

*Bydgoszcz, 2002*



*Pani Profesor  
Dr hab. Małgorzacie Zalewskiej  
za wszechstronną pomoc  
przy realizacji niniejszej rozprawy*

*serdecznie dziękuję*

*Panu  
Dr Zbigniewowi Sadochowi  
za umożliwienie wykonania  
badań molekularnych DNA  
w Pracowni Biotechnologii  
IHAR w Bydgoszczy*

*składam podziękowania*

## Spis treści:

<b>1.</b>	<b>Wstęp i cel pracy</b> .....	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Przegląd literatury</b> .....	<b>8</b>
2.1	Chromosomy u chryzantem.....	9
2.2	Barwniki w kwiatostanach chryzantem.....	11
2.3	Molekularne metody analizy DNA.....	17
<b>3</b>	<b>Materiał i metody</b> .....	<b>20</b>
3.1	Badania kariotypów.....	25
3.2	Badania składu jakościowego i ilościowego barwników .....	26
3.3	Badania DNA-fingerprinting metodą RAPD.....	28
3.3.1	Izolacja całkowitego DNA z badanych roślin.....	28
3.3.2	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).....	30
<b>4.</b>	<b>Wyniki badań</b> .....	<b>33</b>
4.1	Analiza kariotypów.....	34
4.2	Analiza składu jakościowego i ilościowego barwników.....	38
4.3	Analiza DNA-fingerprinting metodą RAPD.....	60
<b>5.</b>	<b>Dyskusja</b> .....	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Wnioski</b> .....	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Spis literatury</b> .....	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Streszczenie</b> .....	<b>99</b>

# *1. Wstęp i cel pracy*

Jedną z metod otrzymywania nowych odmian roślin uprawnych, rolniczych i ogrodniczych, jest hodowla mutacyjna. Polega ona na wywołaniu mutacji, czyli niekontrolowanej zmiany w materiale genetycznym rośliny poddanej działaniu dowolnego mutagenu.

Jeśli zmiana w nici DNA okaże się skuteczną, można ją utrwalić przy pomocy kultur *in vitro* poprzez regenerację pędów przybyszowych (Jerzy i Lubomski, 1991 a i b; 1992) i uzyskać całkowicie zmutowane organizmy – formy homohistonowe, o nowych cechach - różniące się od formy z której powstały. Oczywiście zmiany mutacyjne tego typu są całkowicie przypadkowe, jednak częstotliwość powstawania tą drogą mutantów u roślin jest duża, a efekty obiecujące. Wśród roślin ozdobnych można wyróżnić wiele nowych odmian, które powstały na drodze mutagenezy takich gatunków jak: róża (Chan, 1966), gerbera (Jerzy i in., 1994) i chryzantema (Broertjes i in., 1980; Stepczyńska in. 1980; Jerzy i in. 1993; Zalewska, 1995).

Z powstaniem nowych odmian wiąże się nierozzerwalnie problem ich identyfikacji oraz wykazania ich odrębności. Obiektywna ocena danej odmiany mogłaby służyć ochronie praw hodowcy oraz rozstrzygnięciu ewentualnych kwestii spornych dotyczących np. kradzieży odmian.

Dotychczas klasyfikowanie organizmów było zadaniem taksonomii. Dziś to zadanie należy również do szeroko pojętego rolnictwa i ogrodnictwa.

Nowe odmiany roślin uprawnych, sprawdzone pod względem odrębności, wyrównania i trwałości, mogą być chronione na mocy ustawy z dnia 24 listopada 1995 roku o nasiennictwie. Ustawa ta w części dotyczącej ochrony wyłącznego prawa do odmiany, przysługującego hodowcy, oparta jest na najnowszym akcie z 1991 roku Konwencji UPOV o Ochronie Nowych Odmian Roślin (Szurpicki, 2000).

Dzięki zastosowaniu hodowli mutacyjnej powstały również analizowane w niniejszej rozprawie mutanty chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) z grup Lady, Nero i Wonder, które różnią się nie tylko barwą kwiatostanu, ale i kształtem kwiatów języczkowatych, a nawet pokrojem całej rośliny.

Uzyskanie w Katedrze Roślin Ozdobnych i Warzywnych ATR w Bydgoszczy licznych radiomutantów tworzących grupy odmian o wspólnym



rodowodzie było inspiracją do podjęcia dalszych, bardziej wnikliwych badań nad nimi.

Celem niniejszej pracy było poznanie kierunku zmian jakie zaszły na skutek działania promieniowania jonizującego u mutantów z grup Lady, Nero i Wonder w stosunku do odmian wyjściowych. Badano czy i jakie zmiany nastąpiły w liczbie chromosomów na poziomie komórkowym. Analizowano również wtórne metabolity – barwniki roślinne występujące w kwiatach języczkowatych chryzantem oraz DNA przy pomocy nowoczesnej metody z zakresu biologii molekularnej.

Zadaniem badań było także wykazanie odrębności analizowanych mutantów i ich odmian wyjściowych oraz ich obiektywna identyfikacja.

## *2. Przegląd literatury*

## 2.1. Chromosomy u chryzantem.

Chryzantema wielkokwiatowa jest to gatunek doceniany przez hodowców od wielu stuleci. Jego hodowla zaczęła się jeszcze w czasach starożytnych ok. 2500 lat temu w Chinach (Datta, 1998). Jeszcze do niedawna wszystkie gatunki z rodzaju chryzantema (*Dendranthema*) nazywano złocieniami, a odmiany uprawiane pod osłonami zaliczano do gatunku *Chrysanthemum x hortorum* L. H. Bailey – złocien ogrodowy, syn. *Chrysanthemum indicum* L. – złocien japoński, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. – złocien chiński (Jerzy, 2000).

Podstawowa liczba chromosomów ( $x$ ), czyli genom chryzantem wynosi pięć (Dowrick, 1953; Watanabe, 1977). Jest to monoploidalny zespół chromosomów zawierający sumę wszystkich genów. Do rodzaju *Dendranthema* należą jednak również gatunki diploidalne i poliploidalne, które zawierają wielokrotność liczby pięć. Wśród odmian chryzantem należących do gatunku *Dendranthema grandiflora* Tzvelev, najwięcej jest heksaploidów o liczbie chromosomów  $2n = 6x = 54$ , a więc składające się z sześciu genomów (Darlington, 1957; Nazeer i Khoshoo, 1983). Dziedziczenie cech przebiega jednak według schematu obserwowanego u form tetraploidalnych a nie heksaploidalnych (Jordan i Reimann-Philipp, 1979).

Badania dotyczące liczby i morfologii chromosomów przeprowadza się w trakcie podziału jądra, gdy chromosomy układają się w jego płaszczyźnie równikowej – w metafazie. Najczęściej do tego celu wykorzystuje się szybko dzielące się komórki merystematyczne, znajdujące się w wierzchołkach wzrostu korzeni. Oprócz liczby chromosomów bada się także ich wielkość i kształt. Rozmiar chromosomów u heksaploidalnych chryzantem wynosi od 3,2 do 4,8 mikrometrów i zmniejsza się wraz ze wzrostem liczby chromosomów w komórce (Nazeer i Khoshoo, 1983). Często wykorzystywaną cechą struktury chromosomów jest położenie centromeru, który wyznacza stosunek długości ramion każdego chromosomu. Ze względu na położenie centromeru wyróżnia się chromosomy metacentryczne, które mają centromer zlokalizowany w środku lub akrocentryczne, gdy centromer leży blisko jednego z końców. U chryzantem dominują chromosomy metacentryczne i submetacentryczne (Nazeer i Khoshoo, 1983). Krańcowym położeniem charakteryzują się chromosomy telocentryczne, u których centromer leży terminalnie (Stace, 1993). Obserwacje satelitów, czyli krańcowych centromerów, na

chromosomach u *Chrysanthemum multicolor* L.<sup>1)</sup> przeprowadzili Noguchi i Fukui (1995), którzy jako pierwsi zasugerowali, że satelity są to pozostałości jąderka, które uległo fuzji z jądrem w czasie interfazy.

Zdarza się, że samorzutnie lub pod wpływem różnego rodzaju czynników mutagennych liczba chromosomów ulega zmianie. Powstają organizmy o zwiększonej lub zmniejszonej liczbie genomów zwane euploidami. Należą tu zarówno monoploidy, jak i diploidy i poliploidy. Zmiana może także dotyczyć pojedynczego chromosomu – taki organizm nazywa się aneuploidem – tu należą między innymi monosomiki i trisomiki.

---

1) gatunek z tego samego rodzaju, do którego jeszcze niedawno zaliczano także chryzantemę wielkokwiatową.

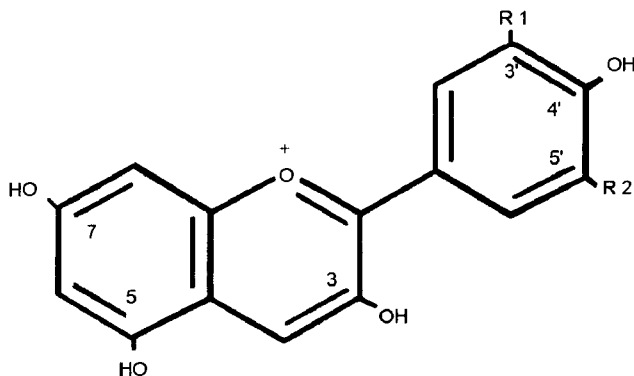
## 2.2. Barwniki w kwiatostanach chryzantem.

Znaczenie chryzantem jest dziś różnorodne – przede wszystkim jest to kwiat ozdobny, o rzadko spotykanej skali barw, odcieni i pokroju, co daje różnorodne możliwości układania z niego kompozycji oraz stwarza klientowi ogromne możliwości wyboru. Ze względu na swoje właściwości chryzantema ma swoje zasługi także w kosmetyce, domu, gastronomii, a nawet w medycynie. Niedawno odkryto w kwiatostanach chryzantem substancje flawonoidowe wykazujące właściwości wirusobójcze, także wobec wirusa HIV, co budzi duże nadzieje u osób chorych (Hu i in., 1994). Ponadto rośliny te pochłaniają duże ilości substancji szkodliwych m.in. formaldehydu, występujących w otoczeniu (Wolverton, 1996).

Gatunki z rodzaju *Dendranthema* należą do rodziny astrowatych (*Asteraceae*). Kwiaty chryzantem zebrane są w charakterystyczne koszyczki, tworząc kwiatostan złożony. Jego barwa jest determinowana przez barwniki zawarte głównie w żeńskich kwiatach języczkowatych, które mogą mieć różnorodny kształt i wielkość. Oprócz kwiatów języczkowatych w kwiatostanie występują też obupłciowe kwiaty rurkowane, które mogą być rozproszone na całej powierzchni koszyczka lub skupione są w jego środkowej części tworząc charakterystyczne „oczko” lub tarczę. Ważniejsze ze względu na barwę kwiatostanu są jednak kwiaty języczkowate. To w nich znajduje się całe bogactwo barwników świadczące o walorach dekoracyjnych danej odmiany (Jerzy, 2000).

Największą grupę barwników tworzą flawonoidy występujące w wakuolach, do których zalicza się zarówno antocyjany, jak i flawony i flawonole (Harborne, 1988; Kawase i in., 1970; Kawase i Tsukamoto, 1974; 1976; Hattori, 1992). Antocyjany odpowiadają za barwę czerwoną, niebieską i fioletową, w zależności od pH soku komórkowego oraz kopigmentów metali i flawonoidów (Jurd i Asen, 1966; Yokoi i Saito, 1973; Steward i in., 1975; Chen i Harazdina, 1981; Hoshino, 1986; Brouillard, 1988; Griesbach, 1992; Dangles i in., 1993; Takeda i in., 1994). Flawonoidy są to związki rozpuszczalne w wodzie i posiadające budowę trójpierścieniową z 15 atomami węgla, co przedstawia

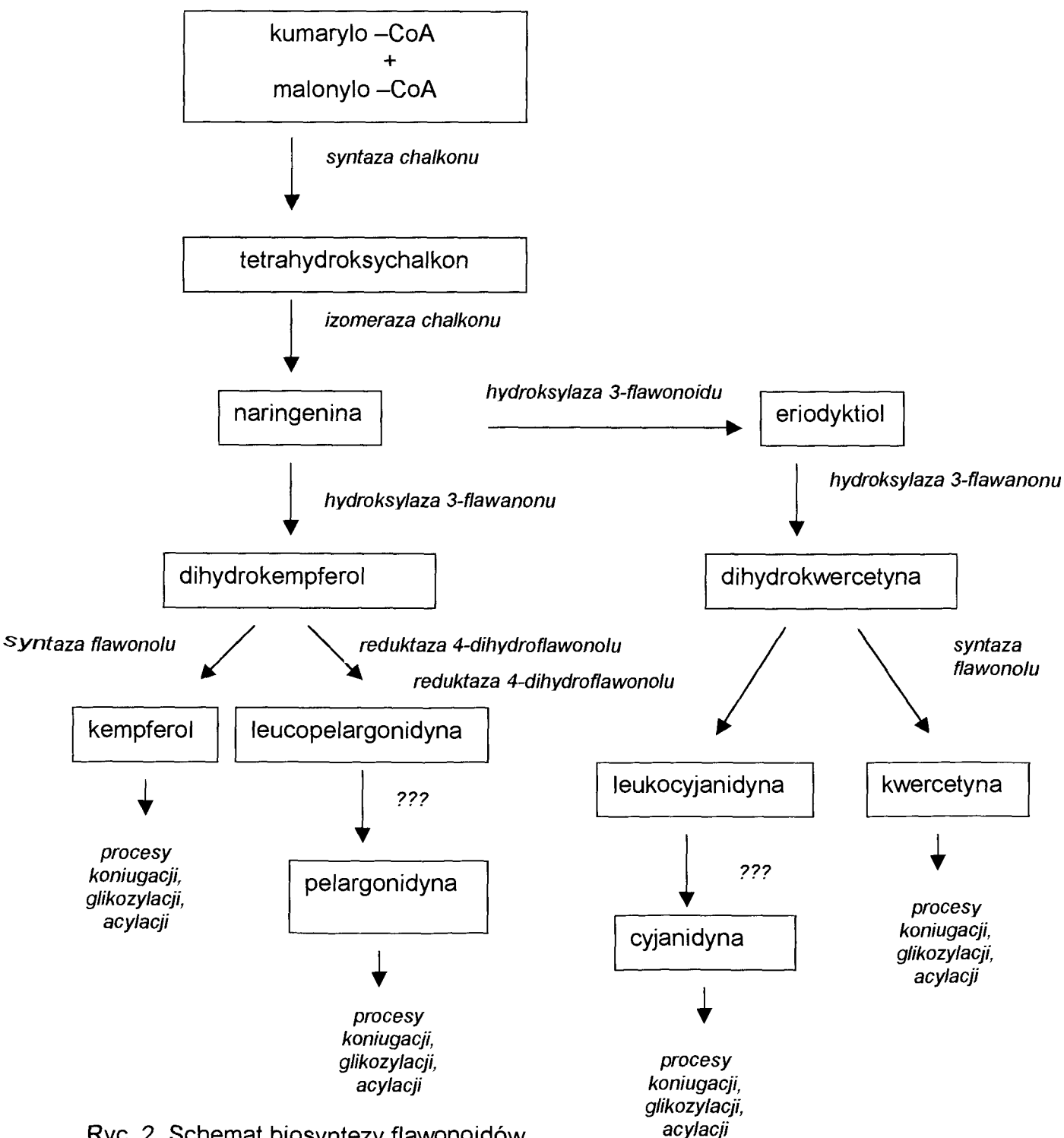
rycina 1 (Chen i Harazdina, 1981). Antocyjany występują w roślinach w postaci różnego typu glikozydów, gdzie cukry występują w pozycji 3, 5, 7 lub 3' i 4' (Timberlake, 1980; Harborne, 1986). Najczęściej występującą antocyjanidyną w kwiatach roślin ozdobnych jest cyjanidyna (Saito i Harborne, 1983; Sulyok i Laszlo-Bencsik, 1985; Terahara i in., 1986; Terahara i in., 1992; Saito i in., 1994; Saito i in., 1995 a; Saito i in., 1995 b; Bloor, 1998; Fossen i in., 1998; Pale i in., 1998; Huang i in., 2001). Często występują też inne antocyjanidyny, takie jak pelargonidyna (Takeda i in., 1986a; Lu i in., 1992a; Toki i in., 1995; Mitchell i in., 1998), delfinidyna (Takeda i in., 1986b; Brandt i in., 1993; Toki i in., 1998; Klyne i in., 2001), malwidyna (Andersen i in., 1995; Fukui i in., 1998; Norbak i Kondo, 1998), peonidyna (Chiriki i Harborne, 1983; Lu i in., 1992b) oraz petunidyna (Mitchell i in., 1998; Norbak i Kondo, 1998). Antocyjanidyny te różnią się między sobą ilością i położeniem grup funkcyjnych -OH, -H lub -OCH<sub>3</sub>, co ma odzwierciedlenie w położeniu maksimum absorpcji (Timberlake, 1980). Dla przykładu cyjanidyna – główny barwnik antocyjanidynowy dla chryzantem posiada maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda = 530$  nm i na tej podstawie może zostać zidentyfikowana (Kawase i in., 1970; Saito i in., 1988).



Ryc. 1. Budowa cząsteczki flawonoidu.

Flawony i flawonole odpowiadające za barwę kwiatów białą, kremową i żółtą również występują u roślin w postaci glikozydów (Williams i in., 1981). Ich obecność jest szczególnie istotna dla owadów, które widzą te barwniki w ultrafiolecie i dla których ich obecność oznacza źródło nektaru. Praktycznie nie ma w przyrodzie kwiatów pozbawionych całkowicie barwników, gdyż flawony i flawonole są obecne niemal we wszystkich kwiatach i w świetle UV takie

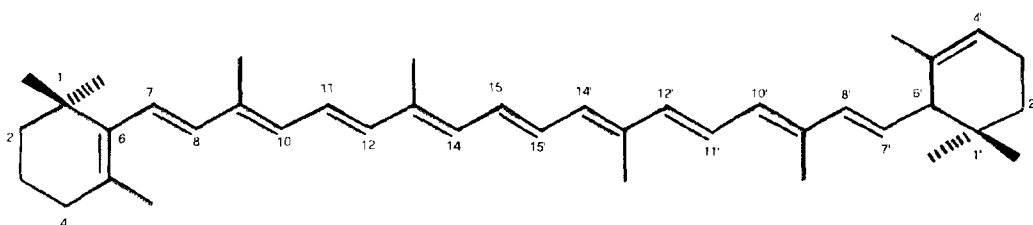
rośliny mają barwę fluoryzującą - przyciągającą owady (Kevan i in., 1996; Harborne, 1997). Najczęściej występującymi u roślin ozdobnych flawonolami są kempferol i kwercetyna, flawonem zaś – luteolina (Matławska, 1992; Matławska i in., 1992). Spośród flawonów i flawonoli u chryzantem występują najczęściej – apigenina, akacetyna, luteolina, diosmetyna i eriodyktiol (Hu i in., 1994; Schwinn i in., 1994). Przedstawiona na rycinie 2 biosynteza flawonoidów jest już dobrze poznana (Biolley i in., 1994).



Ryc. 2. Schemat biosyntezy flawonoidów.

Jednak dziedziczenie barwy jest dużo bardziej skomplikowane i nie do końca jeszcze poznane (Griesbach, 1998; Mol i in., 1998).

Obok flawonoidów dużą, bardzo ważną grupę związków barwnych tworzą karotenoidy. To właśnie te barwniki, występujące w plastydach, nadają roślinom barwę żółtą, pomarańczową, a nawet czerwoną. Są to barwniki o budowie terpenoidowej (ryc. 3) nie rozpuszczalne w wodzie, za to dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak aceton czy eter. Budowa karotenoidów jest skomplikowana, gdyż w skład cząsteczki wchodzi wiele wiązań podwójnych, pełniących rolę chromatoforów pochłaniających światło, często zakończonych z obu stron układem pierścieniowym. Bezbarwne są tylko te z nich, które posiadają mniej niż siedem wiązań podwójnych, np. fitofluen, który posiada pięć wiązań podwójnych. U roślin wyższych występują najczęściej dwie formy karotenoidu  $\alpha$  i  $\beta$ , które różnią się skręcalnością światła spolaryzowanego. Podstawowym barwnikiem z tej grupy, występującym u chryzantem jest 5,8-epoksy  $\alpha$ -karoten, zwany też chryzantemaksantyną. Wśród karotenoidów można wyróżnić związki składające się wyłącznie z dwóch pierwiastków – węgla i wodoru, należące do karotenoidów właściwych oraz zawierające jeszcze atomy tlenu – ksantofile, występujące np. w kwiatach języczkowatych słonecznika – luteinol i zeaksantol (Blaim, 1967).



Ryc. 3. Budowa cząsteczki karotenoidu.

Biosynteza karotenoidów została przedstawiona na rycinie 4 (Goodwin, 1980). W kwiatach występuje najczęściej całe bogactwo różnych karotenoidów np. u rzepaku wyizolowano z kwiatów aż 80 różnych naturalnych izomerów, przy czym zidentyfikowano tylko główne karotenoidy jako luteoksantynę, flawoksantynę, chryzantemaksantynę, teraksantynę i wiolaksantynę (Kull i Pfander, 1995). Na barwę, trwałość i rozpuszczalność karotenoidów mają ponadto wpływ białka, które tworzą z karotenoidami związki kompleksowe.

W ogrodnictwie często zachodzi potrzeba obiektywnego określenia barwy kwiatów. Do dziś używa się tradycyjnej metody porównywania ze



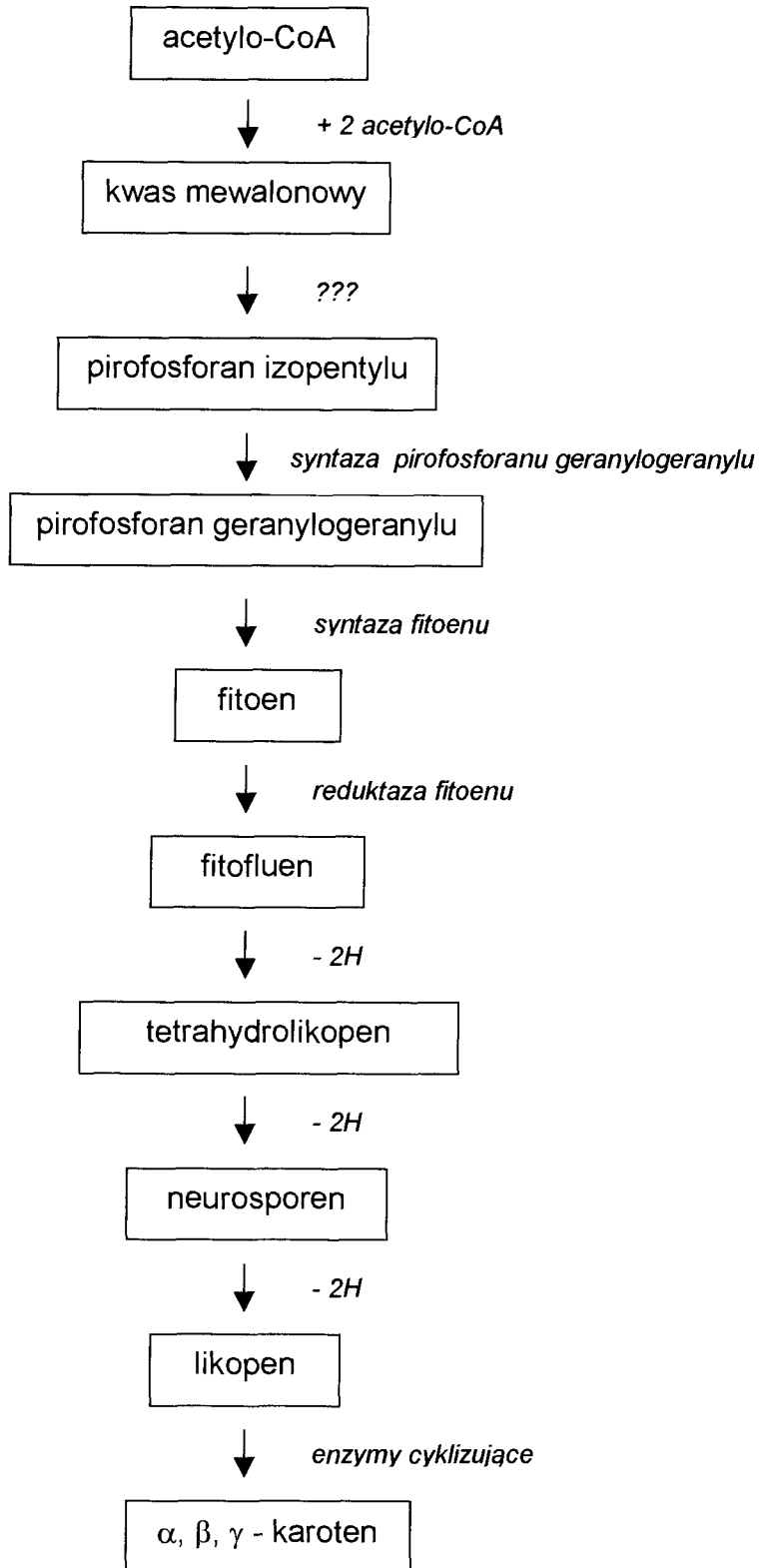
wzorcami barw (R.H.S. Colour Chart) opracowanymi przez Królewskie Towarzystwo Ogrodnicze w Londynie w 1966 roku. Ocena barwy tą metodą jest jednak wysoce subiektywna, gdyż zależy od sprawności optycznej obserwatora, jak i źródła światła oraz jego intensywności. Alternatywną metodą jest pomiar absorbancji barwników przy pomocy spektrofotometru. Metoda ta jest prosta, uniwersalna i tania, spełnia ponadto najważniejsze kryterium – obiektywność i dokładność pomiarów (Zgirski i Gondko, 1998). Metoda spektrofotometryczna była stosowana przez naukowców już od dawna, o czym świadczą liczne publikacje (Fuleki i Francis, 1968; Kawase i Tsukamoto, 1974; Hoshino, 1986; Solecka, 1987; Lin i in., 1992; Świdorski, 1998). Nie znalazła jednak dotychczas szerszego zastosowania w praktyce ogrodniczej do oceny barwy kwiatów.

Barwniki roślinne są zaliczane ponadto do wtórnych metabolitów, gdyż nie pełnią w roślinie podstawowych funkcji i ich występowanie jest często ograniczone do określonych organów czy tkanek. Jako takie zawdzięczają swoje znaczenie w chemotaksonomii do badania pokrewieństw i porównywania całych taksonów czy poszczególnych gatunków roślin (Stace, 1993), wykorzystywane są także w paleobotanice (Wcisło-Lauraniec, 1985).

We współczesnej hodowli nowych odmian szczególnie cenne są cechy związane ze zmianą barwy lub pokroju roślin. Cel ten można dziś osiągnąć stosując metody mutacyjne, które polegają na indukowaniu mutacji w genach i często doprowadzają do powstania oczekiwanych efektów (Broertjes i in., 1976). Alternatywna metoda, wykorzystuje nowoczesne osiągnięcia inżynierii genetycznej, umożliwiające wprowadzenie przy pomocy wektora określonego genu do genomu biorcy. Tym sposobem można uzyskać rośliny transgeniczne o zmienionych pożądanym cechach (Mol i in., 1998; 1999; Griesbach, 1998).

Hodowla chryzantem niesie za sobą pewne utrudnienia. Powszechnie uważa się bowiem, że rodzaj ten ma często budowę chimery, a więc składa się z tkanek niejednorodnych genetycznie (Stewart i Dermen, 1970). Kwiaty języczkoweate chryzantem zbudowane są z dwóch warstw komórek – L1 i L2, a więc informacja genetyczna zawarta w warstwie L3 występującej w liściach i korzeniach nie jest obecna w kwiatostanie. Dzięki kulturze *in vitro*, można uzyskać rośliny homohistonowe, składające się z jednorodnej genetycznie tkanki. Warunkiem powstania takich trwałych mutantów jest uzyskanie pędów

przybyszowych z jednej tylko zmutowanej komórki eksplantatu (Stewart i Dermen, 1970; Broertjes i Van Harten, 1985). W ten sposób z chimery peryklinalnej można uzyskać formę homohistonową, jednolicie zmienioną.



Ryc. 4. Szlak biosyntezy karotenoidów.

### 2.3. Molekularne metody analizy DNA.

Kluczowe dla rozwoju metod biologii molekularnej było odkrycie przez Mullisa (Saiki i in., 1988; Mullis, 1990) reakcji łańcuchowej polimerazy – PCR (Polymerase Chain Reaction). Dzięki temu stało się możliwe amplifikowanie (zwielokrotnianie, namnażanie) *in vitro* DNA w milionach kopii. Potrzebna jest tylko mikroskopijnej wielkości matryca DNA, która pod wpływem wysokiej temperatury zostaje zdenaturowana i rozpada się na pojedyncze nici. Do nich przyłączają się komplementarne startery zapoczątkowujące reakcję PCR. Następnie termostabilna polimeraza DNA włącza kolejne nukleotydy przesuwając się wzdłuż jednoniciowej cząsteczki DNA. Wszystkie potrzebne substraty umieszczone są w jednej probówce w specjalnie dobranym środowisku reakcji i zmieniającej się cyklicznie temperaturze regulowanej przez termocykler. W każdym następnym cyklu nowo powstałe nici DNA same mogą służyć jako matryce, dlatego też liczba cząsteczek DNA o sekwencji odpowiadającej amplifikowanemu fragmentowi rośnie w postępie geometrycznym. Reakcja PCR jest obecnie wykorzystywana w wielu metodach analizy DNA. Jedną z nich jest RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) czyli losowo amplifikowany polimorficzny DNA. Metoda ta została po raz pierwszy zastosowana do badań nad genomem soi (*Glycine max*, *Glycine soja*) i kukurydzy (*Zea mays*) (Williams i in., 1990). Metoda ta oparta jest o amplifikację genomowego DNA przy użyciu jednego startera o przypadkowej sekwencji nukleotydów. Sekwencja każdego startera składa się z dziewięciu – dziesięciu nukleotydów, o zawartości 50 – 80 % zasad guaniny i cytozyny, bez sekwencji palindromowych. Nie wszystkie sekwencje amplifikowane tym sposobem są polimorficzne, ale te które są można łatwo zidentyfikować. Markery RAPD (znaczniki) są powszechnie używane w badaniach molekularnych roślin do konstruowania map genetycznych (Waugh i Powell, 1992; Newbury i Ford-Lloyd, 1993), do identyfikacji odmian różnych gatunków roślin uprawnych oraz analizy zróżnicowania genetycznego (Williams i in., 1990; Koller i in., 1993; Wolff i Peters-Van Rijn, 1993; Graham i in., 1994; Lanham i in., 1995; Wolff i in., 1995; Golembiewski i in., 1997; Wolko i Kruszka, 1997; Barański i Grzebelus, 1999; Wang i in., 1999; Sadoch i in., 2000), identyfikacji somatycznych hybryd (Newbury i Ford-Lloyd, 1993), dziedziczenia tkanek haplo- i diploidalnych (Lu i in., 1995), w segregacji podwojonych

haploidów (Guzy i in., 1997), do identyfikacji chorób roślinnych (Szafran i in., 1997a; Staniaszek i in., 2000), odporności na choroby (Staniszek i in., 2000) oraz badaniu chimeryzmu u chryzantem (Wolff i in., 1993). Metoda RAPD dostarcza bardzo dużej liczby markerów, które są łatwe do identyfikacji na agarozowym żelu elektroforetycznym w świetle UV. Małe cząsteczki DNA wędrują w żelu szybciej niż duże (Bushuk i Zillman, 1978) – tak powstaje charakterystyczny wzór prążków zwany DNA-fingerprinting, czyli „odcisk palca” cząsteczki DNA. Każdy z prążków w żelu jest związany z określonym miejscem, mierzonym ilością par zasad. Z tego względu, że markery RAPD są najczęściej dominujące – pozwalają badać cały genom (Grzebelus, 1996; Primrose, 1999).

Namnażanie DNA można uzyskać także inną metodą zwaną DAF (DNA Amplification Fingerprinting). Tu używa się znacznie krótszych starterów najwyżej pięcionukleotydowych, dzięki czemu uzyskuje się znacznie więcej produktów (Hoelzel i Green, 1998). Ich rozdział następuje w żelu poliakrylamidowym, pozwalającym uzyskać większą rozdzielczość, a wizualizacja prążków jest możliwa w wyniku barwienia srebrem (Caetano-Anolles i in., 1991). Metodę tę wykorzystano m. in. do identyfikacji mieszańców petunii (Caetano-Anolles, 1996).

Kolejną techniką wykorzystującą reakcję łańcuchową polimerazy jest AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism), czyli polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu. Pierwszym etapem po wyizolowaniu genomowego DNA jest tu trawienie enzymami restrykcyjnymi *EcoR1* i *MseI*. Następnie fragmenty restrykcyjne są amplifikowane za pomocą PCR i rozdzielane w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Strategia ta umożliwia amplifikację wielu fragmentów DNA, bez wcześniejszej znajomości sekwencji. Reakcja PCR jest prowadzona w dwóch następujących po sobie etapach. Najpierw w reakcji preamplifikacji fragmenty genomowe są namnażane przy użyciu dwóch starterów AFLP zawierających po jednym selektywnym nukleotydzie. Produkty po preamplifikacji są następnie rozcieńczane i stosowane do selektywnej amplifikacji przy użyciu dwóch nowych starterów, posiadających dwa lub trzy selektywne nukleotydy. Dodatkowo selektywny starter jest znakowany radioaktywnie. Po rozdzieleniu na żelu, produkty są wykrywane za pomocą autoradiografii (Jones i in., 1997). Technikę tę wykorzystano m. in. do oceny zróżnicowania genetycznego marchwi (Grzebelus

i in., 1999) oraz populacji tropikalnych drzew *Azadirachta indica* A. Juss. (Singh i in. 2002).

Kolejna metoda RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism), czyli polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych przypomina trochę metodę AFLP. Tu również genomowe DNA jest trawione przy pomocy enzymów restrykcyjnych na mniejsze fragmenty. Jednak podstawowa różnica polega na tym, że tu stosuje się do wykrywania tych fragmentów zamiast amplifikacji PCR – hybrydyzację z sondą najczęściej radioaktywną na membranach. Cząsteczki DNA są wymywane przez kapilarnie podsiąkający bufor z żelu na membranę. Jest to technika opracowana w latach siedemdziesiątych, tuż po odkryciu enzymów restrykcyjnych (Grodzicker i in., 1974). Do dziś jest jednak szeroko stosowana do konstruowania map genetycznych i identyfikacji roślin (Wolff i in., 1994), a także do identyfikowania chorób roślinnych (Śliwa i in., 2001) oraz analizy molekularnej cechy męskiej sterility (Szklarczyk, 1999).

Do bardziej wymagających metod analizy DNA należy niewątpliwie inter-SSR czyli sekwencje mikrosatelitarne. Są to dwu- lub trzynukleotydowe powtórzenia występujące w całym genomie. Liczba owych powtórzeń jest wysoce zmienna i różna nawet dla poszczególnych osobników. Konieczna jest tu jednak znajomość sekwencji nukleotydów otaczających fragment DNA, zawierający te powtórzenia. Konstruuje się w tym celu dwudziestojednonukleotydowe startery komplementarne do owych sekwencji. Różnice w ilości powtórzeń powodują, że namnożone fragmenty mają różną długość. Analizę polimorfizmu przeprowadza się za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Sekwencje mikrosatelitarne są szczególnie przydatne przy badaniu gatunków o niskim stopniu zróżnicowania na poziomie DNA, niewystarczającym do ich analizy przy pomocy innych typów markerów molekularnych, jak np. w gatunkach roślin samopylnych, takich jak soja (Morgante i Olivieri, 1993).

### *3. Materiał i metody*

Materiałem badawczym były odmiany wyjściowe - macierzyste chryzantemy wielokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) oraz ich mutanty tzw. odmiany pochodne (tab. 1).

Badane mutanty tworzyły trzy grupy odmian: grupę Lady otrzymaną z odmiany 'Richmond' (ryc. 5), do której należały - 'Lady Amber' (ryc. 6), 'Lady Apricot' (ryc. 7), 'Lady Bronze' (ryc. 8), 'Lady Orange' (ryc. 9), 'Lady Pink' (ryc. 10), 'Lady Rosy' (ryc. 11), 'Lady Salmon' (ryc. 12), 'Lady White' (ryc. 13), 'Lady Vitroflora' (ryc. 14) oraz 'Lady Yellow' (ryc. 15). Drugą grupę stanowiły - odmiana wyjściowa 'Red Nero' (ryc. 16) oraz jej mutant - 'Mini Nero' (ryc. 17), zaś trzecią grupę tworzyły dwa mutanty - 'Bronze Wonder' (ryc. 19) i 'Red Wonder' (ryc. 20) otrzymane z odmiany wyjściowej 'Lilac Wonder' (ryc. 18).

Wszystkie wyżej wymienione mutanty zostały otrzymane w latach 1988-1992 w Katedrze Roślin Ozdobnych i Warzywnych ATR w Bydgoszczy przez Jerzego i Zalewską, w wyniku działania promieniowania X lub gamma na eksplantaty liściowe odmian wyjściowych *in vitro*.

Tab. 1. Charakterystyka badanych mutantów i ich odmian wyjściowych.

Odmiana wyjściowa Mutant	Kwiatostan		
	Wielkość	Typ	Barwa
Richmond	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	purpuroworóżowa
Lady Amber <sup>1)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	złocistobrazowa
Lady Apricot	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	buraczkowozłota
Lady Bronze <sup>1)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	czerwonobrazowa
Lady Orange	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	pomarańczowoczerwona
Lady Pink <sup>1)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	różowa
Lady Rosy <sup>1)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	kremoworóżowa
Lady Salmon <sup>1)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	łososiowa
Lady White	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	biała, w środku żółtozielona
Lady Vitroflora	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	wrzosoworóżowa
Lady Yellow <sup>1)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	żółta
Red Nero	drobnokwiatowy	półpełny	ciemnoczerwona, z żółtym oczkiem kwiatów rurkowatych
Mini Nero <sup>2)</sup>	drobnokwiatowy	półpełny	pomarańczowoczerwona, z żółtym oczkiem kwiatów rurkowatych
Lilac Wonder	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	fioletoworóżowa
Bronze Wonder <sup>3)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	czerwonobrazowa
Red Wonder <sup>3)</sup>	średniokwiatowy	pełny, półkulisty	czerwona

<sup>1)</sup> wpisany do Polskiego Rejestru Odmian w 1992 roku

<sup>2)</sup> wpisany do Polskiego Rejestru Odmian w 1995 roku

<sup>3)</sup> wpisany do Polskiego Rejestru Odmian w 1996 roku



Ryc. 5. Odmiana 'Richmond' (wyjściowa).



Ryc. 6. Odmiana 'Lady Amber' (mutant).



Ryc. 7. Odmiana 'Lady Apricot' (mutant).



Ryc. 8. Odmiana 'Lady Bronze' (mutant).



Ryc. 9. Odmiana 'Lady Orange' (mutant).





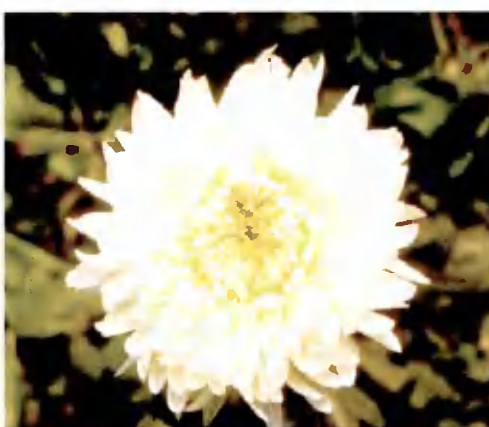
Ryc. 10. Odmiana 'Lady Pink' (mutant).



Ryc. 11. Odmiana 'Lady Rosy' (mutant).



Ryc. 12. Odmiana 'Lady Salmon' (mutant).



Ryc. 13. Odmiana 'Lady White' (mutant).



Ryc. 14. Odmiana 'Lady Vitroflora' (mutant).



Ryc. 15. Odmiana 'Lady Yellow' (mutant).



Ryc. 16. Odmiana 'Red Nero' (wyściowa).



Ryc. 17. Odmiana 'Mini Nero' (mutant).



Ryc. 18. Odmiana 'Lilac Wonder' (wyściowa).



Ryc. 19. Odmiana 'Bronze Wonder' (mutant).



Ryc. 20. Odmiana 'Red Wonder' (mutant).

### 3.1. Badania kariotypów.

Materiał doświadczalny stanowiły wierzchołki wzrostu korzeni badanych odmian wyjściowych i ich mutantów.

Doświadczenie przeprowadzono w Pracowni Biotechnologii Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych ATR w Bydgoszczy.

Z każdej odmiany i mutantu dnia 3. kwietnia 2001 pobrano po 10 sadzonek pędowych z roślin matecznych rosnących w szklarni i umieszczono w podłożu torfowym w paletach wielodoniczkowych. Sadzonki ukorzeniono w szklarni w warunkach naturalnego fotoperiodu. Wierzchołki korzeni pobierano w dniach od 19. do 30. kwietnia 2001 roku w godzinach od 9.00 do 10.00. Z każdej odmiany i mutantu pobrano po ok. 100 wierzchołków wzrostu o długości 5 mm i umieszczono w probówkach w wodzie destylowanej w chłodni na 24 godziny w temperaturze od 0 do +1°C. Następnie przenoszono materiał do utrwalacza, który stanowił płyn Carnoy'a (etanol absolutny/ kwas octowy lodowaty - 3:1 v/v). Utrwalanie materiału trwało 48 godzin w temperaturze pokojowej, po tym czasie wierzchołki wzrostu przenoszono do 70 % etanolu, w którym przechowywano je do czasu analizy.

Przed barwieniem macerowano tkanki 0,1 N HCl, ogrzewając próbki na łaźni wodnej w temp. 60 C<sup>0</sup> przez 7 minut. Następnie płukano tkanki przez 45 minut w wodzie destylowanej, po tym czasie przystąpiono do barwienia wierzchołków wzrostu metodą aceto-karminową (Broda, 1971; Gerlach, 1972). Barwienie wykonano w probówkach ogrzewając fragmenty korzeni w acetokarminie na łaźni wodnej w temperaturze 60 C<sup>0</sup> 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.

Chromosomy obserwowano przy pomocy mikroskopu typu Jenamed – 2 przy powiększeniu obiektywu 1000 razy. Fotografie wykonano dzięki zastosowaniu przystawki automatycznej do mikrofotografii mf-AKS 24 x 36 Automatic – 2 i filmu Kodak TMAX – 100.

### 3.2. Badania składu jakościowego i ilościowego barwników.

Doświadczenie przeprowadzono w Pracowni Biotechnologii Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych Akademii Techniczno - Rolniczej w Bydgoszczy.

Materiałem badawczym były świeże fragmenty kwiatów języczkowatych (ok. 2 cm od wierzchołka) o charakterystycznym, dla danej odmiany i mutantu, zabarwieniu.

Sadzonki pędowe badanych chryzantem zostały posadzone na miejsce stałe na stołach podwyższonych - w hali wegetacyjnej na zewnątrz szklarni dnia 21. maja 1999 roku, a w 2000 roku w szklarni 10. lipca. Uprawę prowadzono w warunkach naturalnego fotoperiodu metodą standardową tj. na jeden pęd i szczytowy kwiatostan. Wyjątek stanowiła grupa Nero, której odmiany jako drobnokwiatowe prowadzono sposobem gałązkowym.

Kwiaty języczkowe pobierano począwszy od 27. października do 10. listopada 1999 roku oraz od 23. października do 17. listopada 2000 roku w stadium pełni kwitnienia roślin, które u odmian o kwiatostanach pełnych wyznaczał moment odchylenia się zewnętrznych kwiatów języczkowatych ku dołowi i całkowitego rozwinięcia się części środkowej. Jako stadium pełni kwitnienia u odmian o kwiatostanach półpełnych uznano moment zakończenia rozkwitania kwiatów języczkowatych połączony z jednoczesną zmianą barwy z zielonej na żółtą zewnętrznych okółków kwiatów rurkowatych. Do analiz wybierano po pięć kwiatostanów z każdej odmiany. Z kwiatów języczkowatych pobranego kwiatostanu sporządzono po 4 naważki. Dwie z nich o masie 100 mg przeznaczono do analiz karotenoidów, kolejne dwie o masie 200 mg do analiz antocyjanów. Łącznie z każdej odmiany pobrano po 10 prób równoległych o masie 100 mg i 10 prób o masie 200 mg. Materiał ważono na wadze analitycznej z dokładnością do 0,1 mg.

Homogenację tkanek przeprowadzono w moździerzu porcelanowym z dodatkiem kilkudziesięciu mg piasku kwarcowego. Ekstrakcję karotenoidów wykonano według metody Wettsteina (1957), w której użyto 100 % acetonu i dodano kilkadziesiąt mg  $\text{CaCO}_3$ , natomiast dla antocyjanów zastosowano metodę Harborne (1967), w której użyto 1% HCl w metanolu. Otrzymane ekstrakty

sączono przez lejek z filtrem bibułowym do kolbki miarowej o pojemności 10 ml. Pozostałości tkanek w mózdzierzu przemywano małymi porcjami rozpuszczalnika sącząc ekstrakt do tej samej kolbki, aż do uzyskania pożądanej objętości.

Ekstrakty karotenoidów były gwałtownie schładzane w ciekłym azocie, aby zapobiec ich polimeryzacji. Gotowe, klarowne ekstrakty przechowywano w szczelnie zamkniętych probówkach szklanych (ekstrakty karotenoidowe) i polipropylenowych (ekstrakty antocyjanidynowe) przez okres ok. miesiąca w zamrażarce w temperaturze  $-22^{\circ}\text{C}$ .

Analizę spektrofotometryczną ekstraktów przeprowadzono w dwuwiązkowym spektrofotometrze UV-VIS 1601-PC SHIMADZU. Pomiar absorpcji dokonano w kuwetach kwarcowych o szerokości 1 cm, w zakresie długości fal od 190 do 800 nm. Jako roztwory zerowe zastosowano odpowiednie rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji danej grupy barwników. Wyniki analizowano przy pomocy standardowego oprogramowania spektrofotometru do analizy widmowej.

Wyznaczono maksima absorpcji przy charakterystycznej dla danego barwnika długości fali ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Obliczono absorpcję średnią przy maksimum absorpcji i dokonano analizy statystycznej wyników wykorzystując test t-Studenta przy poziomie istotności  $p=0,05$  i liczbie stopni swobody  $(n_1+n_2 - 2) = 18$ .

Do ilościowego oznaczania antocyjanów zastosowano metodę algebraiczną wykorzystującą wzór:

$$c = A / h \times k \text{ [g dm}^{-3}\text{]}$$

gdzie:

A - absorpcja przy długości fali  $\lambda$  charakterystycznej  
dla danego antocyjanu

h - grubość warstwy [cm]

k - właściwy współczynnik absorpcji

Z obliczeń uzyskano stężenie dla sumy antocyjanów w przeliczeniu na glikozyd-3-cyjanidyny będący głównym barwnikiem antocyjanidynowym

występującym u chryzantem (Saito, 1967; Kawase i in., 1970; Schwinn i in., 1994). Do obliczenia właściwego współczynnika ekstynkcji  $k$  wykorzystano molowy współczynnik ekstynkcji  $\lambda = 26\ 900$  dla glikozydu-3-cyjanidyny posiadającego maksimum absorpcji przy długości fali  $\lambda_{\max} = 530$  nm (Jurd i Asen, 1966; Saito i Harborne, 1983).

Stężenia karotenoidów obliczono wykorzystując współczynnik z równania Wettsteina (1957):

$$c_{\text{kar.}} = 4,695 \times A_{440} \text{ [mg dm}^{-3}\text{]}$$

gdzie:

$c_{\text{kar.}}$  - stężenie karotenoidów

$A_{440}$  - absorbancja przy długości fali 440 nm

### 3.3. Badania DNA-fingerprinting metodą RAPD.

Doświadczenie przeprowadzono w roku 1999, w Pracowni Biotechnologii Zakładu Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Bydgoszczy oraz Pracowni Biotechnologii Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych Akademii Techniczno - Rolniczej w Bydgoszczy.

Materiał roślinny stanowiły liście i pąki liściowe pochodzące z młodych roślin matecznych rosnących w szklarni, z których dnia 29. czerwca 1999 roku sporządzono próbki po 5 g świeżej masy dla każdej odmiany.

#### 3.2.1. Izolacja całkowitego DNA z badanych roślin.

Przygotowane próbki zostały wysterylizowane w 4% podchlorynie sodu, drobno pocięte i utarte w moździerz porcelanowym w ciekłym azocie. Następnie dodano do nich ok. 10-15 ml buforu homogenizującego<sup>1)</sup> i 310  $\mu\text{l}$  10% SDS i podgrzano na łaźni wodnej w temp. 65 °C przez 45 min., aby uzyskać lizę komórek. Po wyjęciu z łaźni dodano po 700  $\mu\text{l}$  8 M octanu potasu i próby przeniesiono do łaźni lodowej na 60 minut. Następnie odwirowano osad w wirówce z chłodzeniem przy 4000 obr./ min. Supernatant przeniesiono do nowej próbówki i



dodano 1:1 (v:v) fenolu w celu oddzielenia DNA od związanych z nim białek histonowych. Ponownie odwirowano próby przez 10 minut przy 5000 obr./min., w celu usunięcia różnych frakcji komórkowych i przeniesiono górną warstwę do nowej probówki. Następnie dodano mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyłowego 24:1(v:v) i odwirowano osad. Górną warstwę przeniesiono pipetą do nowej probówki i dodano 1/10 (v:v) octanu sodu oraz trzykrotną objętość 96% etanolu i delikatnie wymieszano w celu wytrącenia cząsteczek DNA.

Tak przygotowane próby schłodzono do temperatury - 20 °C w zamrażarce przez 24 godziny, następnie osad odwirowano przy 10000 obr./ min., po czym zlano delikatnie etanol. W celu lepszego oczyszczenia DNA dodano 80% etanol i odwirowano, zaś osad osuszono pod próżnią. Suchy pelet rozpuszczono w 500  $\mu$ l buforu TE<sup>2)</sup>.

W następnym etapie pobrano po 350  $\mu$ l rozpuszczonego w buforze TE DNA i dodano jedną objętość podgrzanego do 65 °C buforu ekstrakcyjnego 2x E<sup>3)</sup>. Następnie dodano 1:1 (v:v) mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamyłowego i wytrząsano probówki do uzyskania emulsji. Ponownie odwirowano osad przy 12000 obr./ min. w wirówce z chłodzeniem i przeniesiono fazę górną do nowych probówek. Dodano 1/10 objętości podgrzanego do 65 °C 10 % roztworu CTAB/ 0,7M NaCl i wytrząsano przez 30 sekund. Następnie dodano jedną objętość buforu P<sup>4)</sup> w celu wytrącenia DNA. Po 24 godzinach wytrącony DNA odwirowano przy 14 000 obr./ min. i rozpuszczono w buforze TE.

Ocenę ilościową zawartości DNA dokonano przy pomocy spektrofotometru UV-VIS w kuwetach kwarcowych o szerokości 1 cm przy długości fali równej 260 nm, korzystając ze wzoru:  $1 A_{260} \text{ DNA} = 50 \mu\text{g DNA}$ .

Sporządzono matryce DNA zawierające po 4 ng/ $\mu$ l DNA, które wykorzystano w reakcji łańcuchowej polimerazy PCR.

---

1) bufor homogenizujący (na 200 ml): 7,26 g TRIS, 0,74 g EDTA, 1,13 g NaCl, 13,68 g sacharoza; pH 8,0

2) bufor TE: 10mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0

3) bufor 2x E: 2% CTAB, 100 mM TRIS-HCl , 20 mM EDTA, 1,4 mM NaCl, 1% PVP 360; pH 8,0

4) bufor P: 1% CTAB, 50 mM TRIS-HCl , 10 mM EDTA; pH 8,0

### 3.2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR).

W celu identyfikacji mutantów i wykazania ich odrębności na poziomie molekularnym została zastosowana metoda RAPD (Williams i in., 1990) wykorzystująca technikę PCR. Do reakcji użyto 20 dziesięcionukleotydowych starterów (wyjątek – RAD-12), których sekwencje podano w tabeli 2.

Tab. 2. Sekwencje nukleotydowe starterów zastosowanych w reakcjach PCR.

L.p.	Starter	Sekwencja nukleotydowa
1.	OPB-04	5'-GGA/CTG/GAG/T-3'
2	OPB-18	5'-CCA/CAG/CAG/T-3'
3	OPC-15	5'-GAC/GGA/TCA/G-3'
4	OPF-06	5'-GGG/AAT/TCG/G-3'
5	OPG-09	5'-CTG/ACG/TCA/C-3'
6	OPG-10	5'-AGG/GCC/GTC/T-3'
7	OPH-13	5'-GAC/GCC/ACA/C-3'
8	OPK-10	5'-GTG/CAA/CGT/G-3'
9	OPK-19	5'-CAC/AGG/CGG/A-3'
10	OPM-09	5'-GTC/TTG/CGG/A-3'
11	OPM-18	5'-CAC/CAT/CCG/T-3'
12	OPN-01	5'-CGG/GCG/ATA/T-3'
13	OPQ-06	5'-GAG/CGC/CTT/G-3'
14	OPAS-07	5'-GAC/GAG/CAG/G-3'
15	P-13	5'-CGA/GTG/CCT/A-3'
16	P-15	5'-GGA/AGC/CAA/C-3'
17	RAD-01	5'-TCC/TAC/GCA/C-3'
18	RAD-02	5'-ATG/GAT/CCG/C-3'
19	RAD-09	5'-GAC/CGC/TTG/T-3'
20	RAD-12	5'-GGG/CTC/ATA/-3'



Reakcję PCR prowadzono w objętości 25  $\mu$ l. Mieszanina reakcyjna zawierała: sterylną bidestylowaną wodę, PCR -bufor 2,5  $\mu$ l/ reakcję (MBI Fermentas), 3 mM  $MgCl_2$  (MBI Fermentas), 0,2 mM dNTP, będący mieszaniną wszystkich czterech nukleotydów: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI Fermentas), polimerazę Taq 0,5 u/ 25  $\mu$ l (MBI Fermentas), 1  $\mu$ M primera (Operon Technologies Inc.) oraz 4 ng/  $\mu$ l matrycy DNA. Do każdej mieszaniny reakcyjnej dodano kroplę oleju mineralnego zapobiegającego parowaniu.

Reakcję prowadzono w termocyklerze Biometra UNO-Thermoblock 2,73 zaprogramowanym, zgodnie z zaleceniem Wolffa i in. (1993), następująco: 94 $^{\circ}$ C- 4 min.(wstępna inkubacja), 45 cykli: 94 $^{\circ}$ C - 1 min. (denaturacja DNA), 36 $^{\circ}$ C - 1 min. (przyłączenie primera), 72 $^{\circ}$ C - 2 min. (synteza komplementarnej nici) i 72 $^{\circ}$ C - 4 min. (zakończenie syntezy DNA). Następnie, gdy reakcja PCR zakończyła się, mieszaninę schładzano do temperatury 4 $^{\circ}$ C.

Po amplifikacji, fragmenty DNA zostały poddane elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE<sup>1)</sup>.

Elektroforezę prowadzono przy napięciu prądu 135 V w komorze Agagel Maxi Biometra 020-300. Wizualizacja prążków w żelu była możliwa dzięki zastosowaniu bromku etydyny i systemowi komputerowemu do rejestracji prążków w żelu w świetle UV-Gel-Doc. Wielkość prążków została zidentyfikowana dzięki zastosowaniu markera molekularnego DNA Ladder-Mix (MBI Fermentas) oraz programowi komputerowemu Quantity One. Następnie dane zostały wprowadzone w systemie binarnym (0,1) do programu NTSys. Na tej podstawie została utworzona macierz danych umożliwiająca pełną identyfikację odmian.

---

1) bufor TBE: 1 M TRIS, 20 mM EDTA, 1M kwas borowy; pH = 8,0

Do oceny podobieństwa genetycznego obliczono także współczynnik zgodności Ney'a (Nei i Li, 1979), korzystając ze wzoru:

$$F = 2 \times N_{ab} / N_a + N_b$$

gdze:

$N_{ab}$  - liczba wspólnych produktów PCR dla  
porównywanych linii a i b,

$N_{a/b}$  - liczba produktów PCR dla linii a lub linii b.

## *4. Wyniki badań*

#### 4.1. Analiza kariotypów.

Dane dotyczące liczby chromosomów w komórkach merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni u badanych chryzantem przedstawiono w tabeli 3 oraz na rycinach 21 - 36.

Z danych wynika, że grupa Lady wraz z odmianą wyjściową 'Richmond' miały  $2n = 6x = 54$  chromosomy. Liczba chromosomów u mutantów Lady nie uległa zatem zmianie w wyniku działania promieniowania jonizującego.

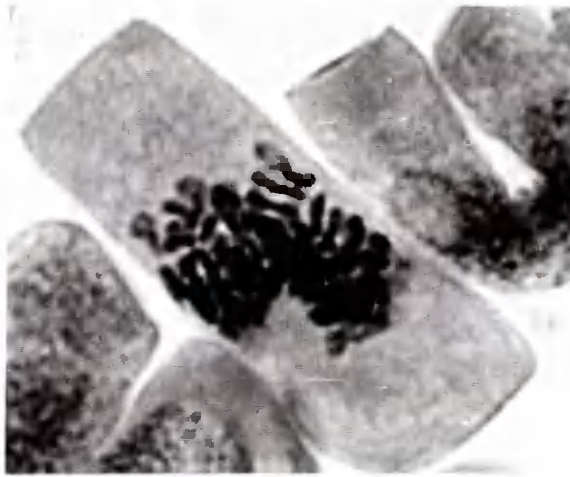
W grupie Nero, zarówno odmiana wyjściowa jak i jej mutant miały zespół chromosomowy składający się z  $2n = 5x = 45$  chromosomów.

Grupa Wonder wyróżniła się spośród badanych odmian tym, iż u jednego z mutantów – 'Bronze Wonder' nastąpiło zwiększenie zespołu chromosomowego o 9. W wyniku poliploidyzacji z odmiany wyjściowej o  $2n = 5x = 45$  chromosomów powstał mutant o liczbie chromosomów równej  $2n = 6x = 54$ . U drugiego z otrzymanych mutantów było tylko 45 chromosomów – tyle ile u odmiany, z której powstał.

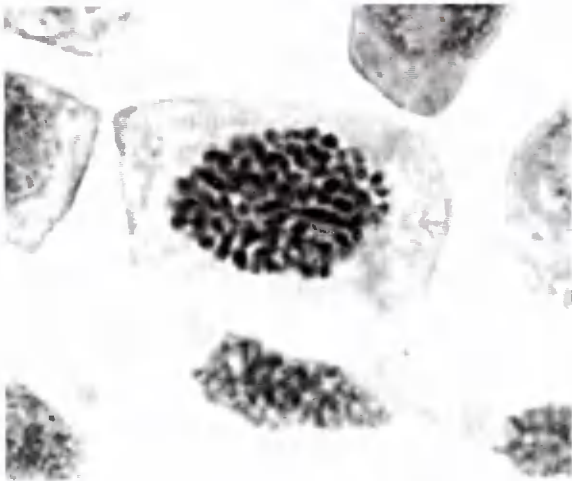
Tabela 3.

Liczba chromosomów w komórkach merystematycznych wierzchołków wzrostu korzeni badanych chryzantem.

Odmiana wyjściowa mutant	Liczba chromosomów [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



Ryc. 21. Chromosomy u odmiany wyjściowej 'Richmond'.



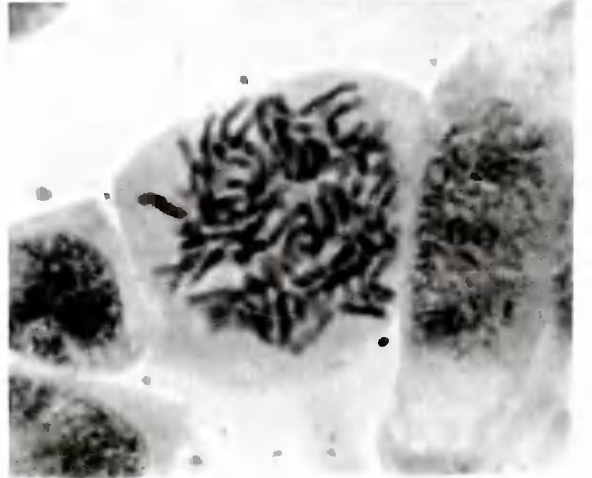
Ryc. 22. Chromosomy u mutantu 'Lady Amber'.



Ryc. 23. Chromosomy u mutantu 'Lady Apricot'.



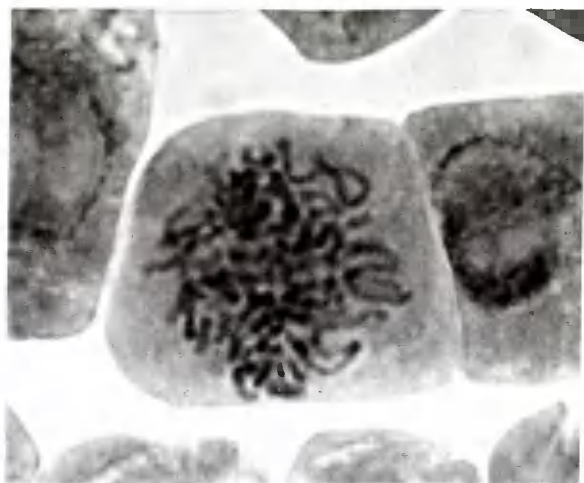
Ryc. 24. Chromosomy u mutantu 'Lady Bronze'.



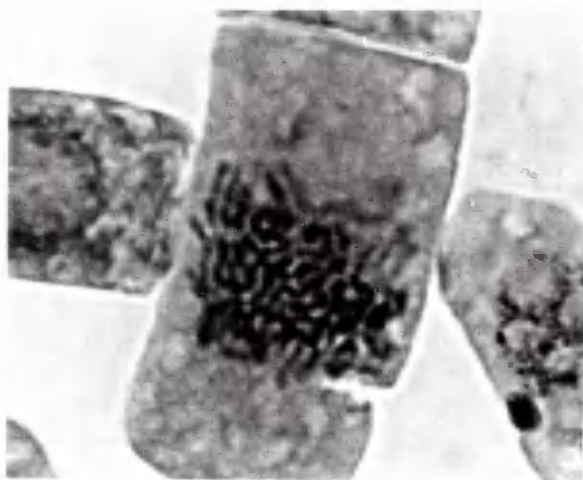
Ryc. 25. Chromosomy u mutantu 'Lady Orange'.



Ryc. 26. Chromosomy u mutanta  
'Lady Pink'.



Ryc. 27. Chromosomy u mutanta  
'Lady Rosy'.



Ryc. 28. Chromosomy u mutanta  
'Lady Salmon'.



Ryc. 29. Chromosomy u mutanta  
'Lady White'.

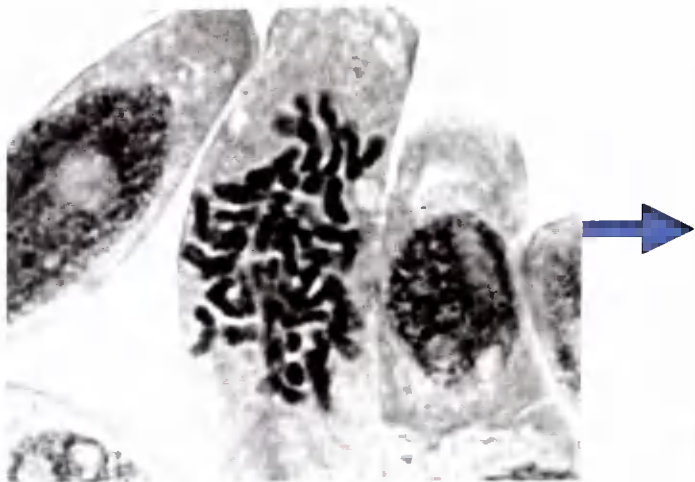


Ryc. 30. Chromosomy u mutanta  
'Lady Vitroflora'.

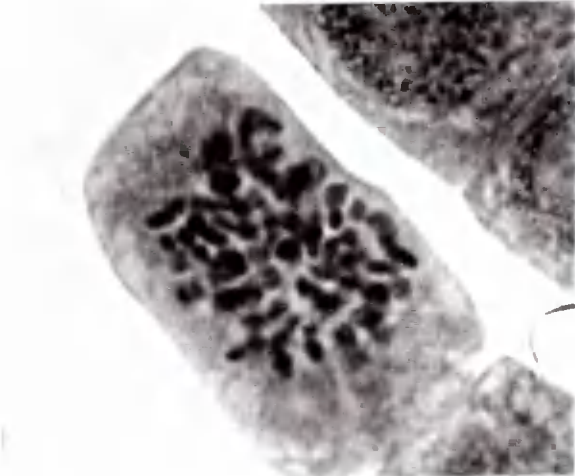


Ryc. 31. Chromosomy u mutanta  
'Lady Yellow'.

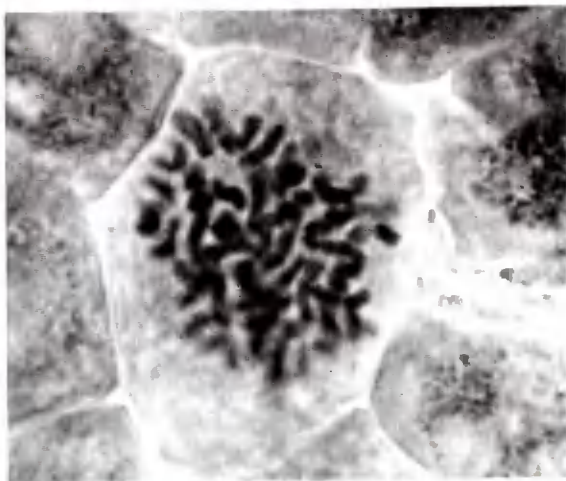




Ryc. 32. Chromosomy u odmiany wyjściowej 'Red Nero'.



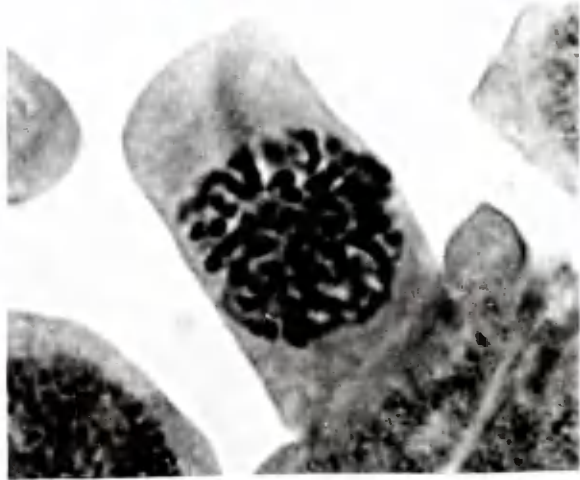
Ryc. 33. Chromosomy u mutantu 'Mini Nero'.



Ryc. 34. Chromosomy u odmiany wyjściowej 'Lilac Wonder'.



Ryc. 35. Chromosomy u mutantu 'Bronze Wonder'.



Ryc. 36. Chromosomy u mutantu 'Red Wonder'.

#### 4.2. Analiza składu jakościowego i ilościowego barwników.

Skład jakościowy barwników wyrażony w jednostkach absorbancji (określony w latach 1999 – 2000) przedstawiono w tabelach 4, 5 i 6. Natomiast widma absorpcyjne (z roku 1999) z charakterystycznymi maksimami absorpcji przedstawiono na rycinach 37 – 68. O obecności określonych barwników świadczyło maksimum absorpcji przy charakterystycznej długości fali  $\lambda_{\max}$ , oznaczone na rycinach strzałką.

Z tabel 4, 5 i 6 wynika, że w kwiatach języczkowatych badanych odmian chryzantemy wielkokwiatowej występują cztery rodzaje barwników: flawony, flawonole, karotenoidy i antocyjany.

Każda z badanych odmian chryzantem posiadała swój stały i powtarzalny profil występowania określonych barwników przy charakterystycznych długościach fali, co zostało potwierdzone w roku 2000. Zmianie uległ jedynie ogólny poziom wartości absorbancji – w roku 2000 był on generalnie niższy niż w roku 1999. Nawet jeśli u kilku odmian wystąpił ten sam zespół barwników to wartości absorbancji przy tych samych długościach fali różniły się statystycznie.

Rozpatrywane odmiany chryzantem tworzyły trzy grupy ze względu na swoje pochodzenie. Grupa mutantów Lady pochodzi od odmiany wyjściowej 'Richmond'. Odmiana ta posiadała tylko flawonole przy  $\lambda = 340$  nm oraz antocyjany przy  $\lambda = 530$  nm, nie miała zaś karotenoidów. U sześciu (z dziesięciu) powstałych z tej odmiany mutantów pojawiły się karotenoidy ('Lady Amber', 'Lady Apricot', 'Lady Bronze', 'Lady Orange', 'Lady Salmon' i 'Lady Yellow'). U sześciu innych mutantów odnotowano zanik antocyjanów ('Lady Amber', 'Lady Pink', 'Lady Rosy', 'Lady Salmon', 'Lady White' i 'Lady Yellow'). U pozostałych czterech, u których wystąpiły antocyjany, znacznie obniżyła się wartość absorbancji. Mutanty – 'Lady Apricot', 'Lady Bronze' i 'Lady Orange' nie różniły się pod względem wartości absorbancji dla antocyjanów.

Grupę Nero tworzyła odmiana wyjściowa 'Red Nero' oraz jej mutant 'Mini Nero'. U odmiany 'Red Nero' występowały flawony przy  $\lambda = 332$  nm, zaś u jej mutantu pojawiły się flawonole przy 340 nm, zaś flawony zanikły. Poziom absorbancji dla karotenoidów był identyczny u tych odmian, zaś zdecydowanie zmniejszyła się wartość absorbancji dla antocyjanów u 'Mini Nero'.



Tab. 4. Wartości absorpcji przy maksimum długości fali ( $\lambda_{max}$ ) charakterystycznym dla: flawonów, flawonoli, karotenoidów i antocyjanów w roku 1999.

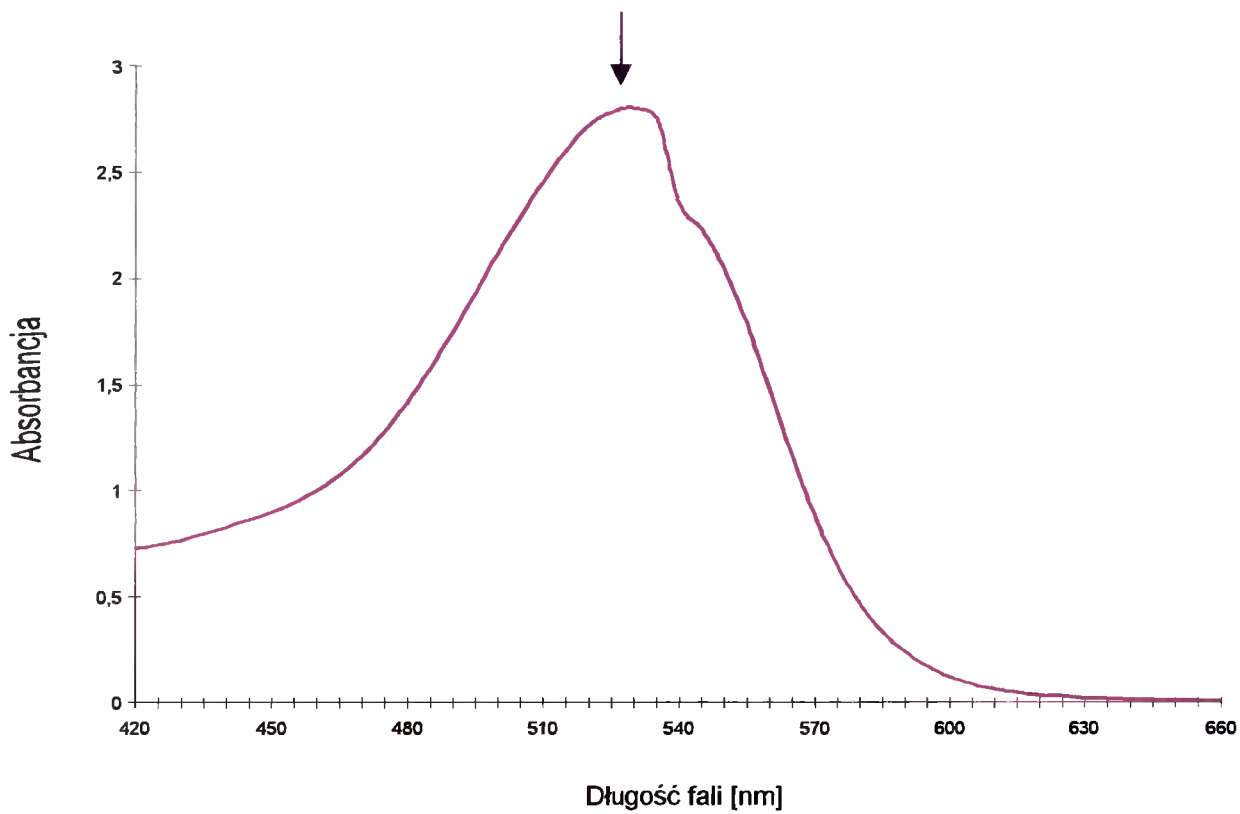
Grupa	Odmiana wyjściowa mutant	Maksimum absorpcji							
		$\lambda = 330$ nm	$\lambda = 332$ nm	$\lambda = 335$ nm	$\lambda = 340$ nm	$\lambda = 344$ nm	$\lambda = 440$ nm	$\lambda = 530$ nm	
	Richmond	-	-	-	0,4512 b	-	-	2,8038 c	
	Lady Amber	0,6397 a	-	-	-	-	0,7781 d	-	
	Lady Apricot	-	-	-	0,6194 c	-	0,3085 b	0,1529 b	
	Lady Bronze	-	-	-	0,9223 d	-	0,7610 d	0,1833 b	
	Lady Orange	-	-	1,1527 a	-	-	0,5336 c	0,1873 b	
Lady	Lady Pink	-	-	-	0,3119 a	-	-	-	
	Lady Rosy	-	-	-	0,4266 b	-	-	-	
	Lady Salmon	-	-	-	1,4112 d,e	-	0,2703 a	-	
	Lady White	-	-	1,3555 a	-	-	-	-	
	Lady Vitroflora	-	-	-	1,3958 e	-	-	0,0885 a	
	Lady Yellow	1,2793 b	-	-	-	-	0,7354 d	-	
Nero	Red Nero	-	1,2905 a	-	-	-	1,0737 a	3,3606 b	
	Mini Nero	-	-	-	1,0199 a	-	1,0673 a	0,7605 a	
Wonder	Lilac Wonder	-	-	-	-	0,9562 b	-	0,7766 b	
	Bronze Wonder	-	-	-	-	0,6881 a	0,8440 b	1,3484 c	
	Red Wonder	-	-	-	-	0,8721 b	0,3803 a	0,3499 a	

Srednie w kolumnach dla poszczególnych grup oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy  $\alpha = 0,05$ .

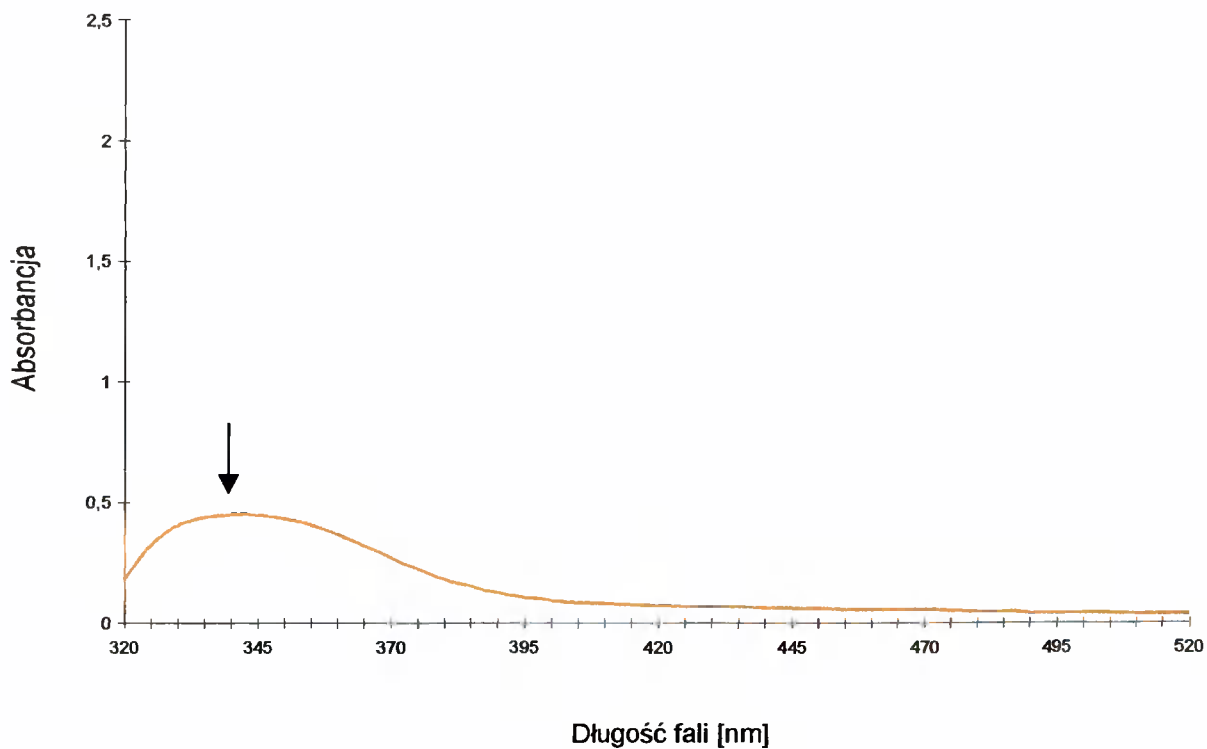
Tab. 5. Wartości absorpcji przy maksimum długości fali ( $\lambda_{max}$ ) charakterystycznym dla: flawonów, flawonoli, karotenoidów i antocyjanów w roku 2000.

Grupa	Odmiana wyjściowa mutant	Maksimum absorpcji							
		$\lambda = 330$ nm	$\lambda = 332$ nm	$\lambda = 335$ nm	$\lambda = 340$ nm	$\lambda = 344$ nm	$\lambda = 440$ nm	$\lambda = 530$ nm	
	Richmond	-	-	-	0,3682 a	-	-	-	0,5335 c
	Lady Amber	0,3682 a	-	-	-	-	0,5623 d	-	-
	Lady Apricot	-	-	-	0,5517 b	-	0,2349 b	0,0810 b	-
	Lady Bronze	-	-	-	0,5852 b	-	0,6342 e	0,0790 b	-
	Lady Orange	-	-	0,6070 a	-	-	0,4591 c	0,0698 b	-
	Lady Pink	-	-	-	0,3962 a, c	-	-	-	-
	Lady Rosy	-	-	-	0,6466 b	-	-	-	-
	Lady Salmon	-	-	-	0,5123 b, c	-	0,1820 a	-	-
	Lady White	-	-	0,5632 a	-	-	-	-	-
	Lady Vitroflora	-	-	-	1,1106 d	-	-	0,0552 a	-
	Lady Yellow	0,6273 b	-	-	-	-	0,5805 d	-	-
Nero	Red Nero	-	0,5199 a	-	-	-	0,8901 a	0,7723 b	-
	Mini Nero	-	-	-	0,5730 a	-	0,8235 a	0,2631 a	-
Wonder	Lilac Wonder	-	-	-	-	0,4244 b	-	0,2754 b	-
	Bronze Wonder	-	-	-	-	0,3561 a	0,6725 b	0,5689 c	-
	Red Wonder	-	-	-	-	0,4044 b	0,2338 a	0,1785 a	-

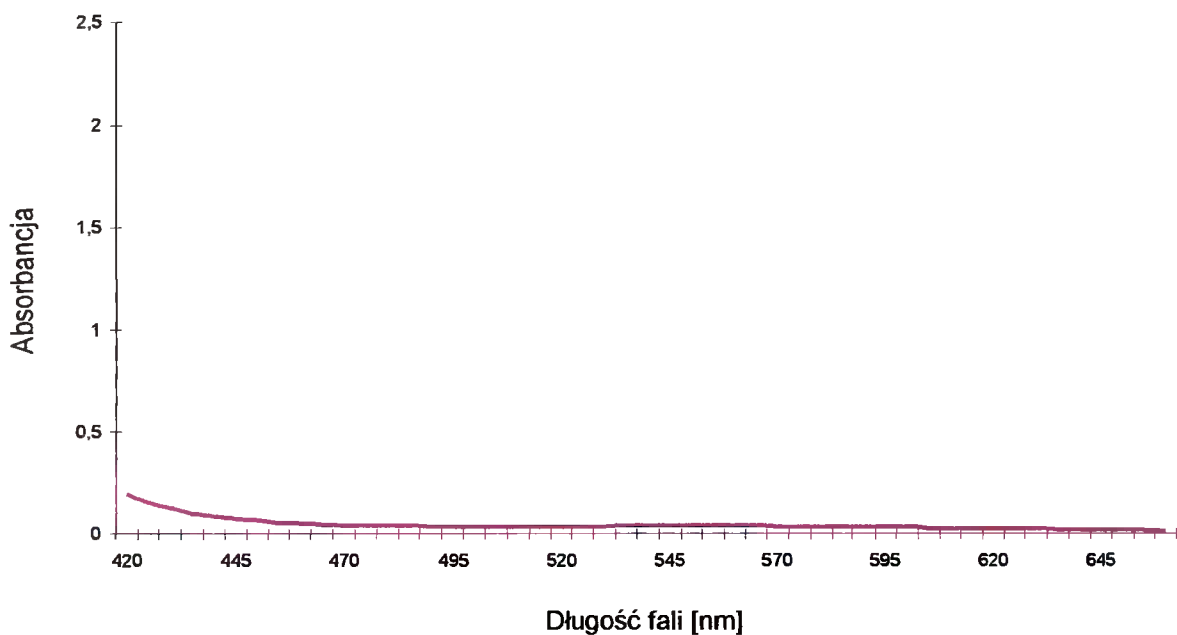
Średnie w kolumnach dla poszczególnych grup oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie przy  $\alpha = 0,05$ .



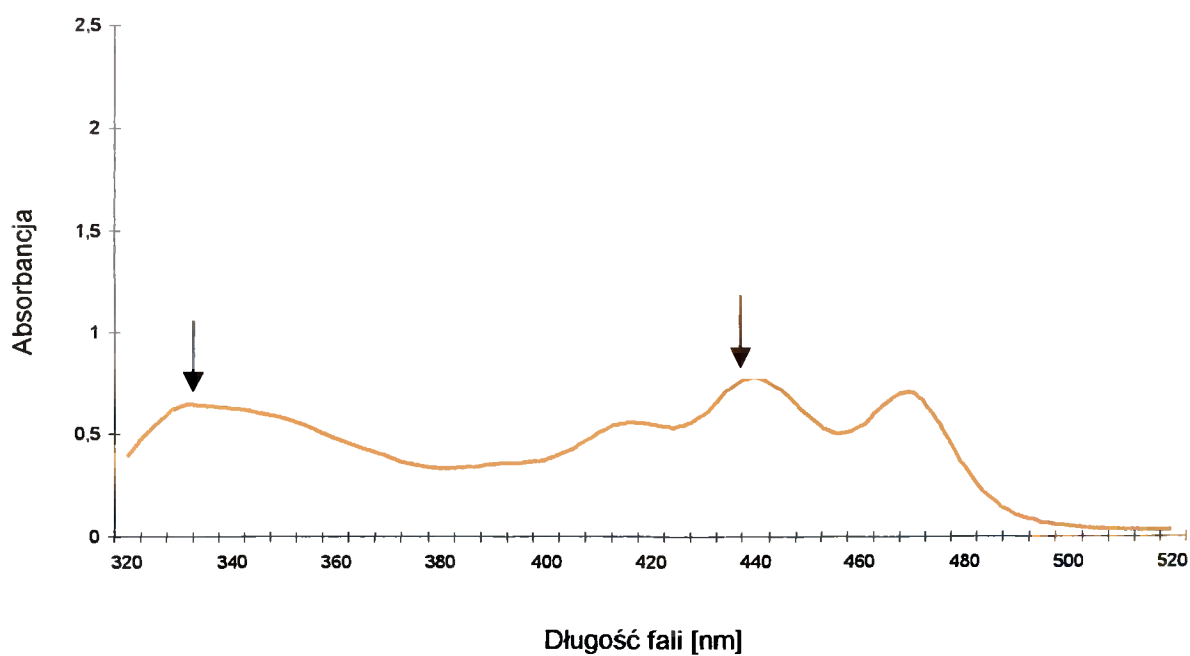
Ryc. 37. Widmo absorpcyjne antocyjanów odmiany wyjściowej 'Richmond'.



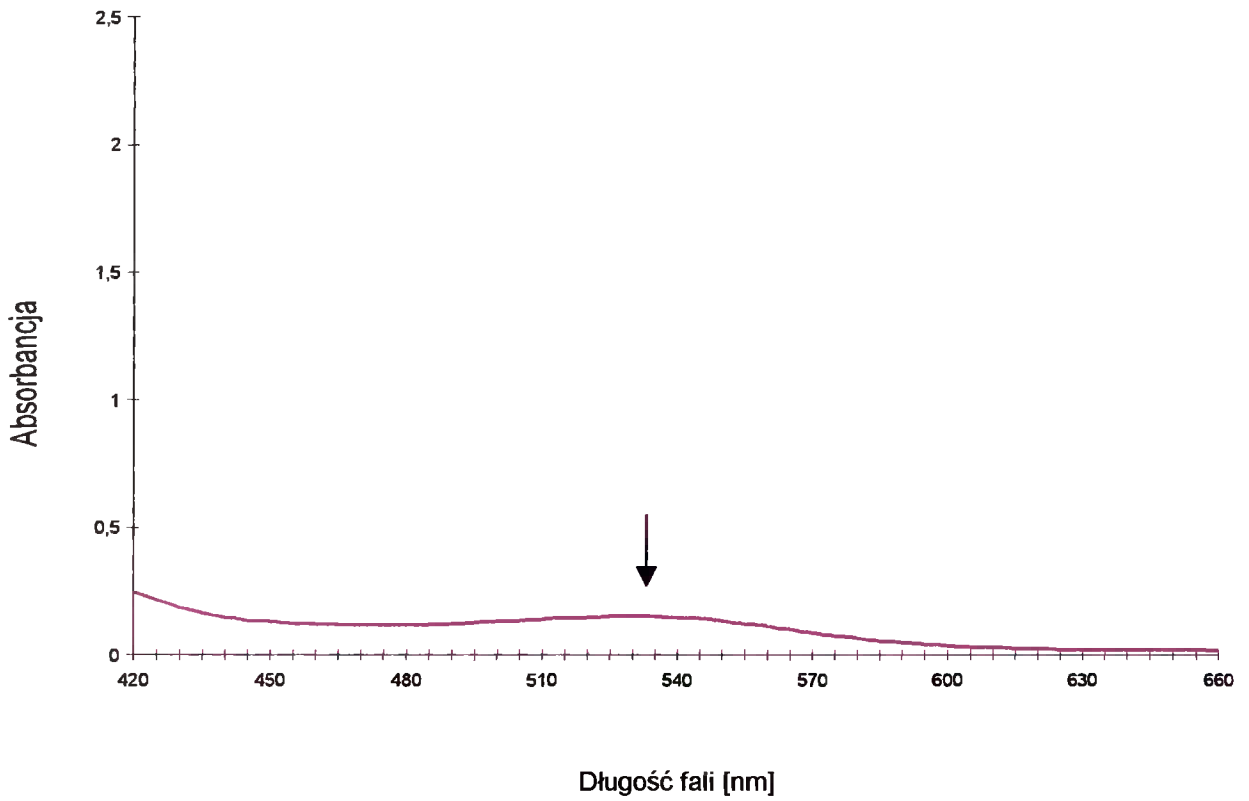
Ryc. 38. Widmo absorpcyjne flawonoli odmiany wyjściowej 'Richmond'.



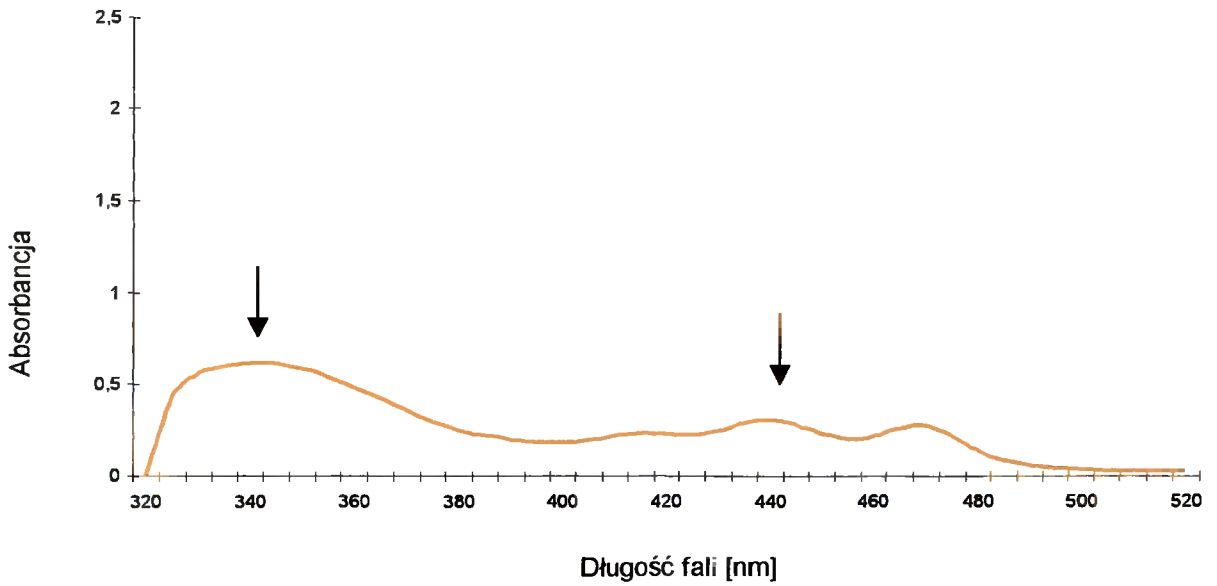
Ryc. 39. Widmo absorpcyjne wskazujące na brak antocyjanów u mutantu 'Lady Amber'.



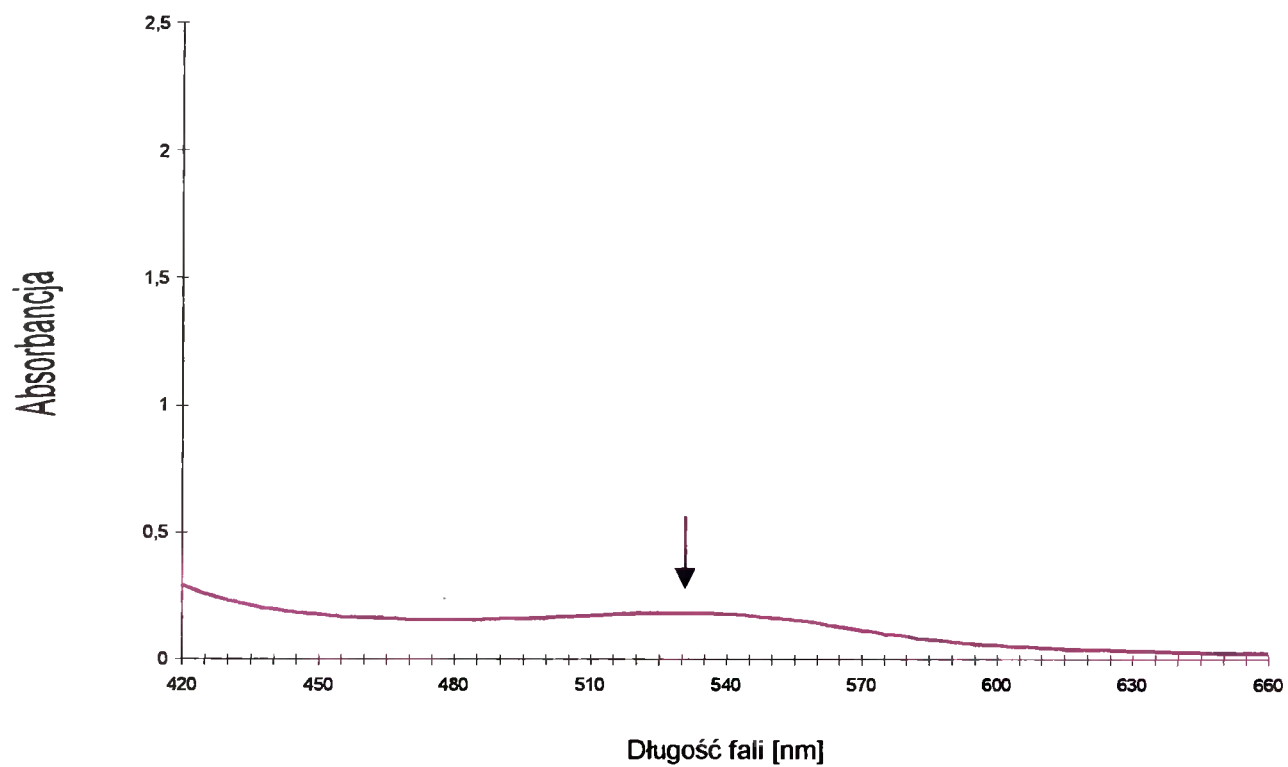
Ryc. 40. Widmo absorpcyjne flawonów i karotenoidów mutantu 'Lady Amber'.



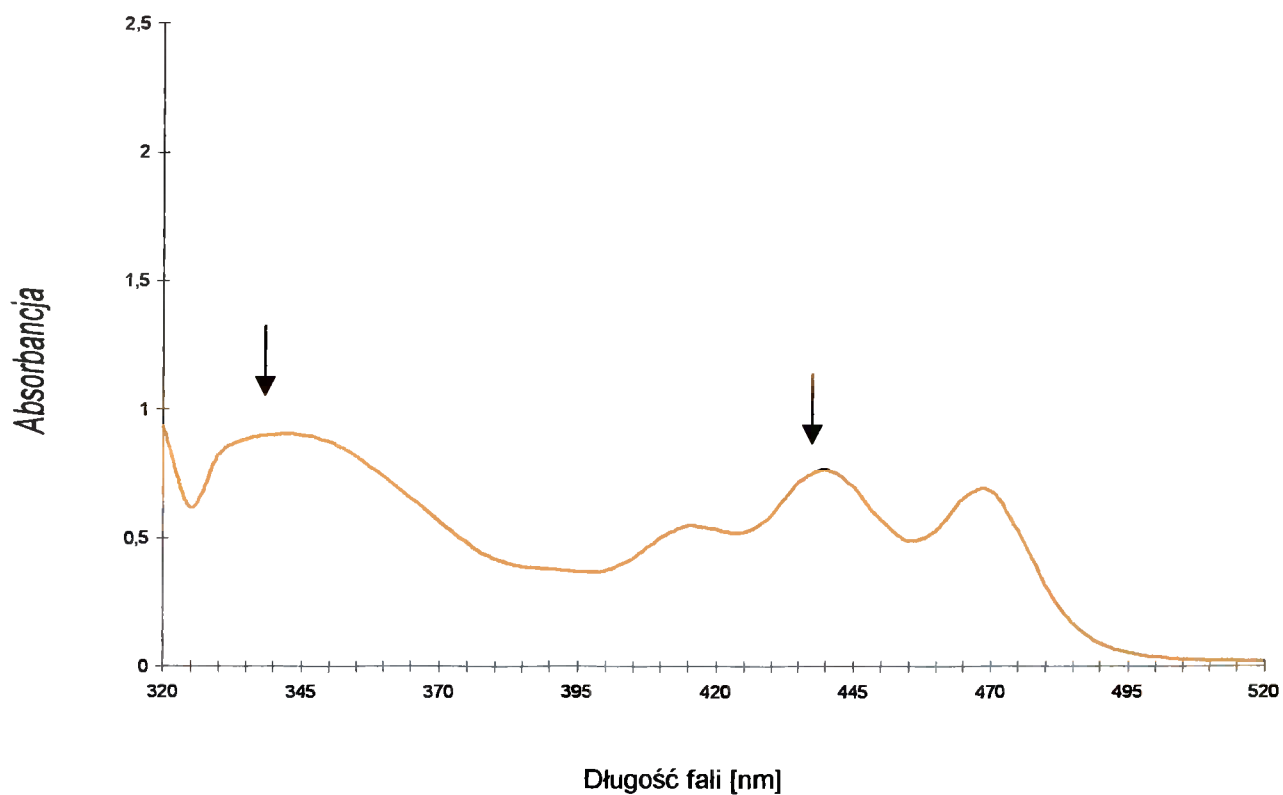
Ryc. 41. Widmo absorpcyjne antocyjanów mutantu 'Lady Apricot.'



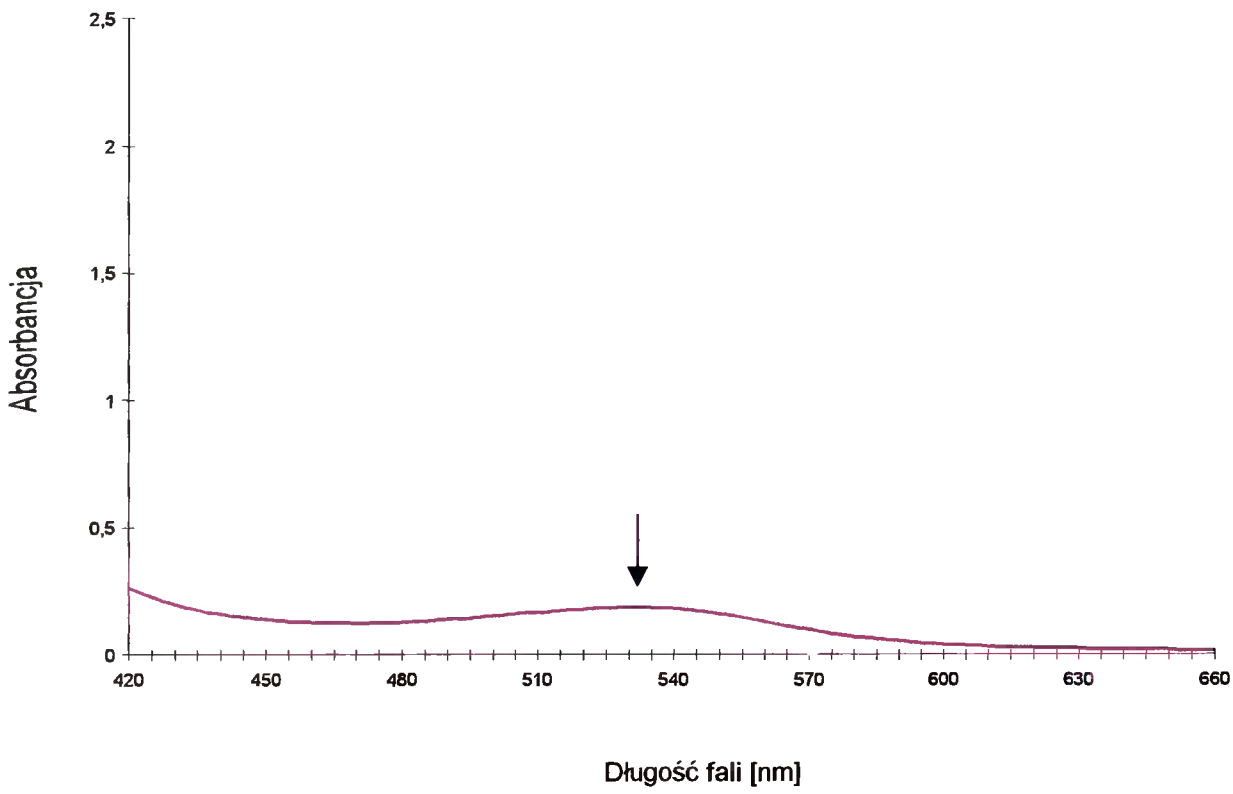
Ryc. 42. Widmo absorpcyjne flawonoli i karotenoidów mutantu 'Lady Apricot'.



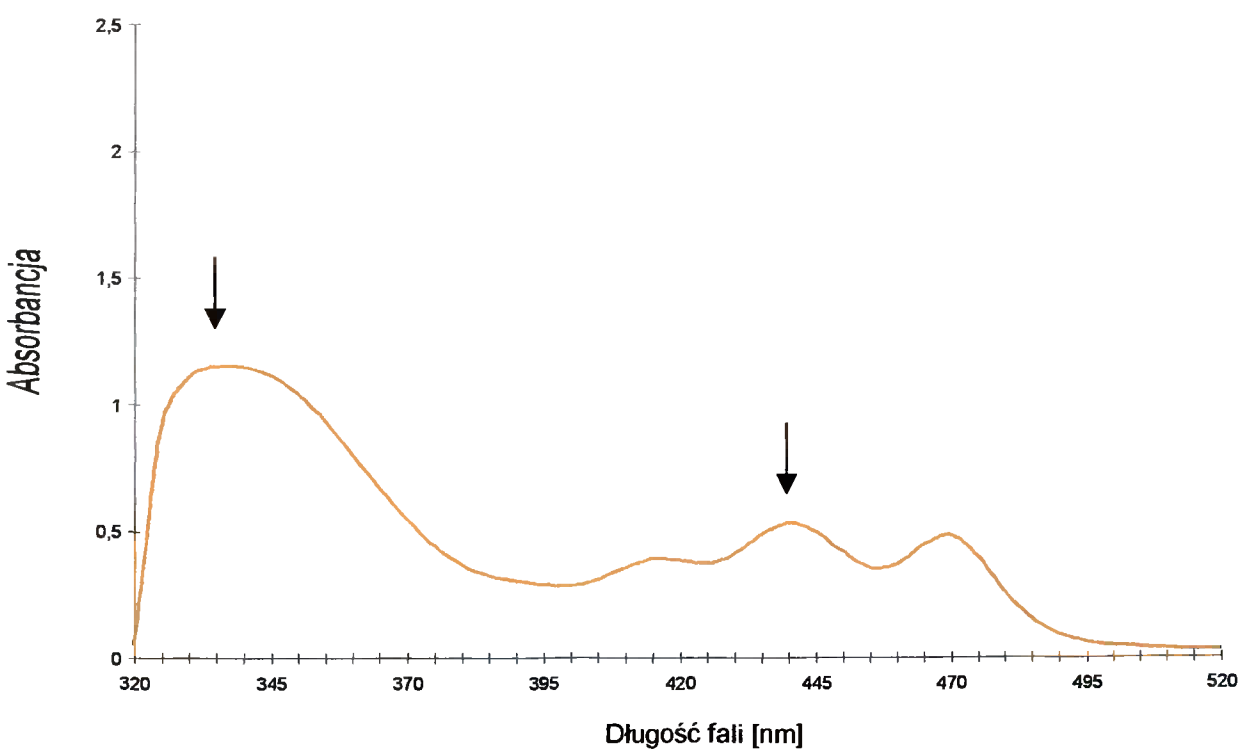
Ryc. 43. Widmo absorpcyjne antocyjanów mutantu 'Lady Bronze'.



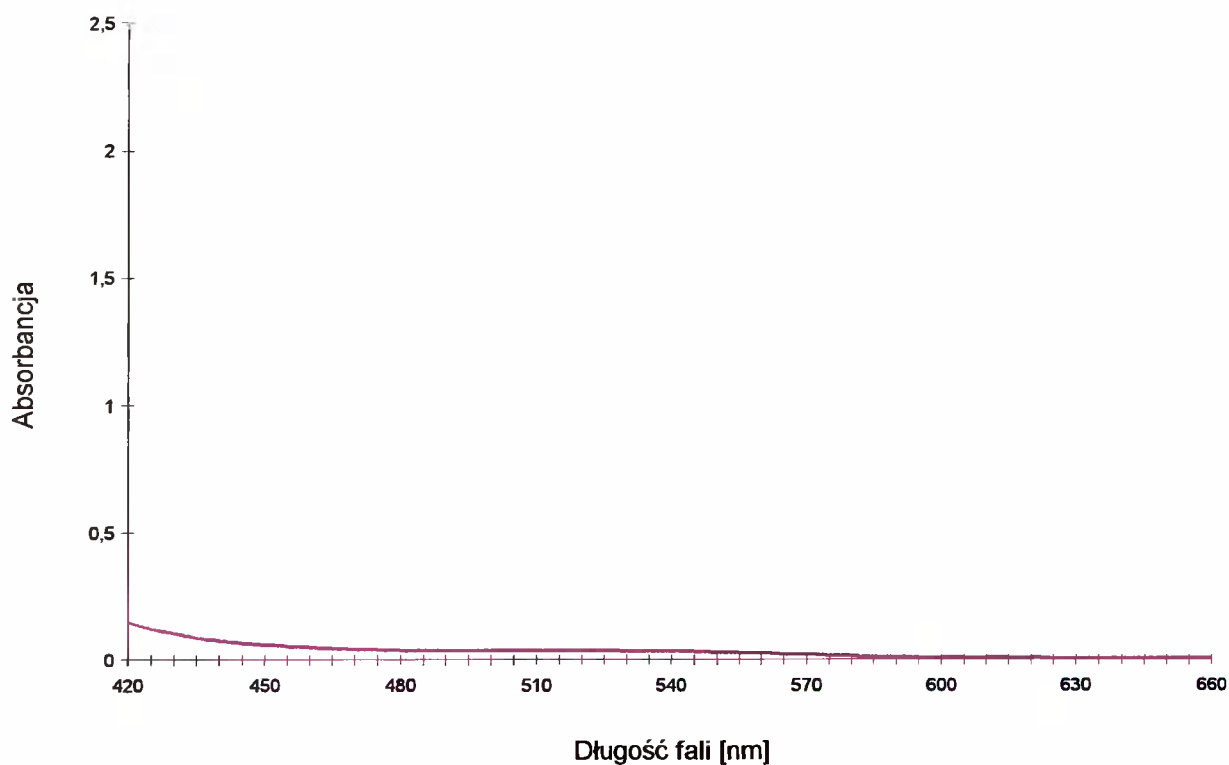
Ryc. 44. Widmo absorpcyjne flawonoli i karotenoidów mutantu 'Lady Bronze'.



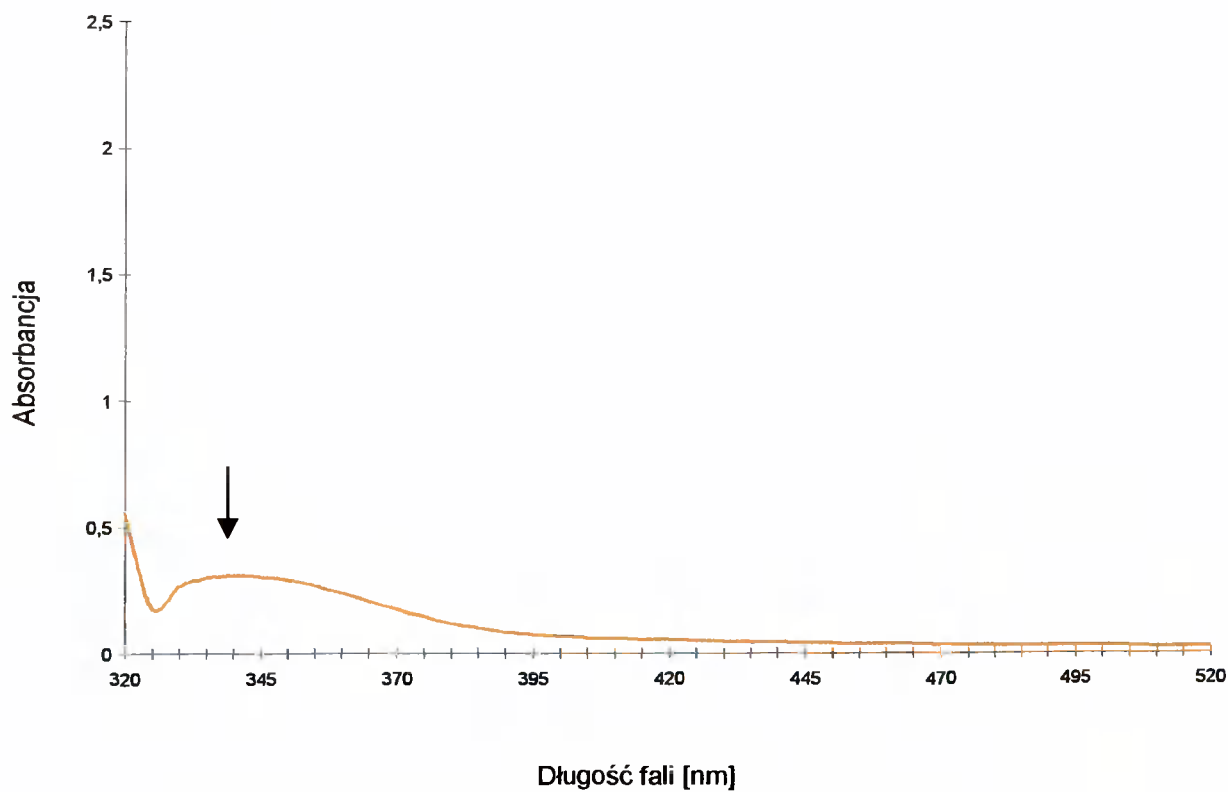
Ryc. 45. Widmo absorpcyjne antocyjanów mutantu 'Lady Orange'.



Ryc. 46. Widmo absorpcyjne flawonów i karotenoidów mutantu 'Lady Orange'.

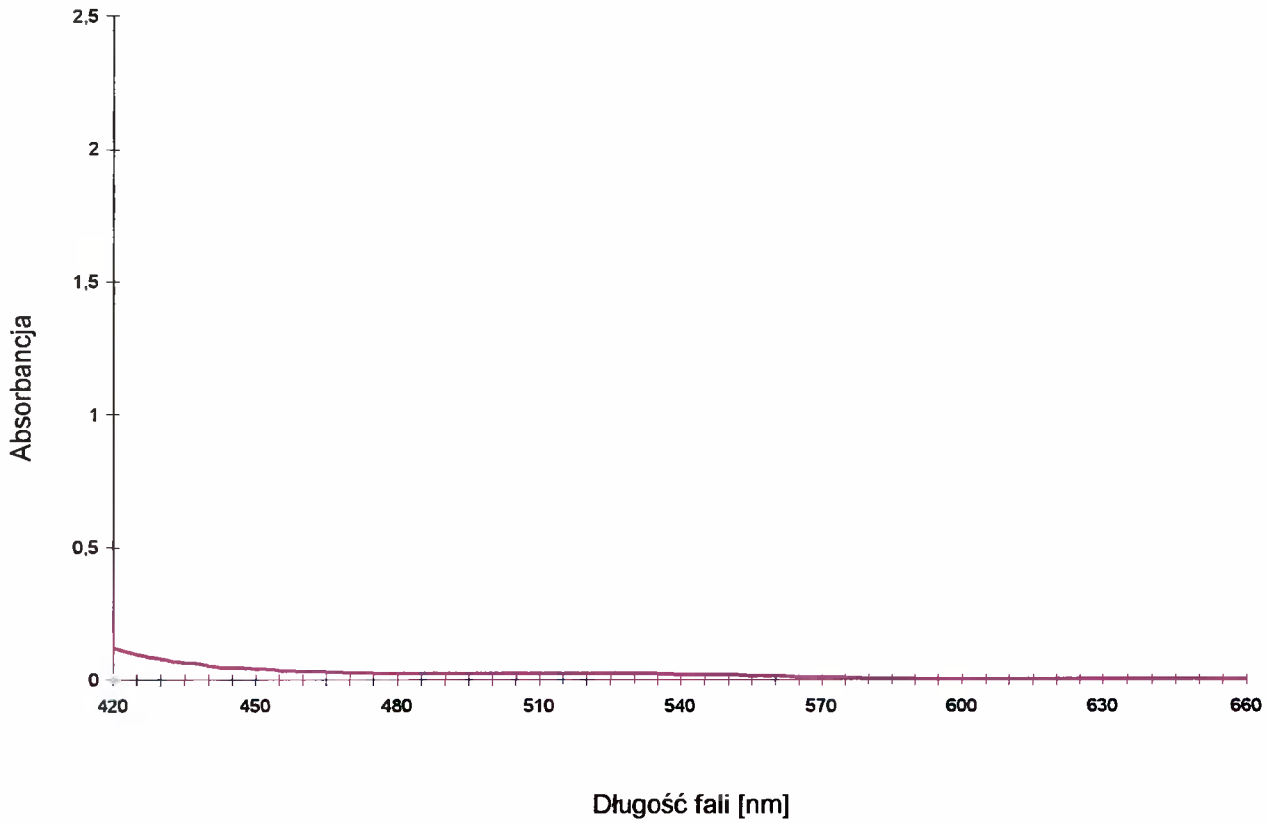


Ryc. 47. Widmo absorpcyjne wskazujące na brak antocyjanów u mutantu 'Lady Pink'.

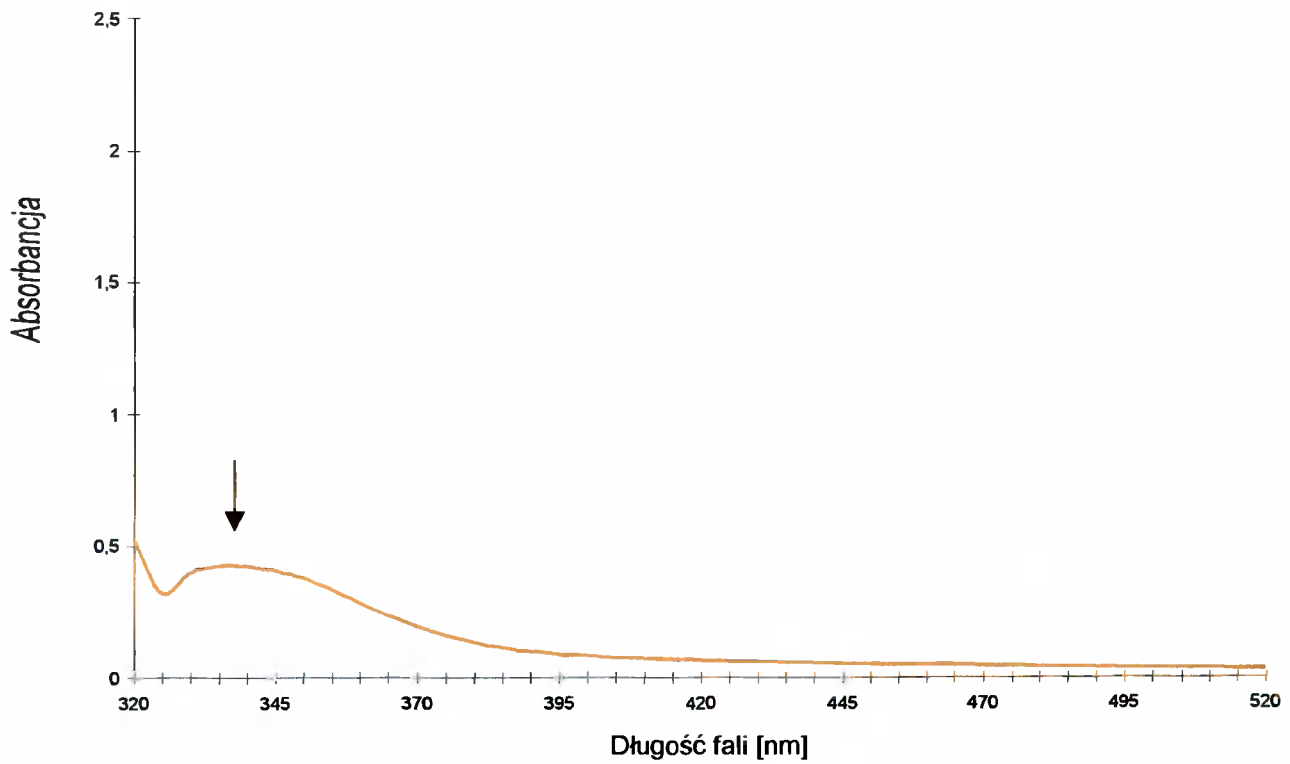


Ryc. 48. Widmo absorpcyjne flawonoli mutantu 'Lady Pink'.

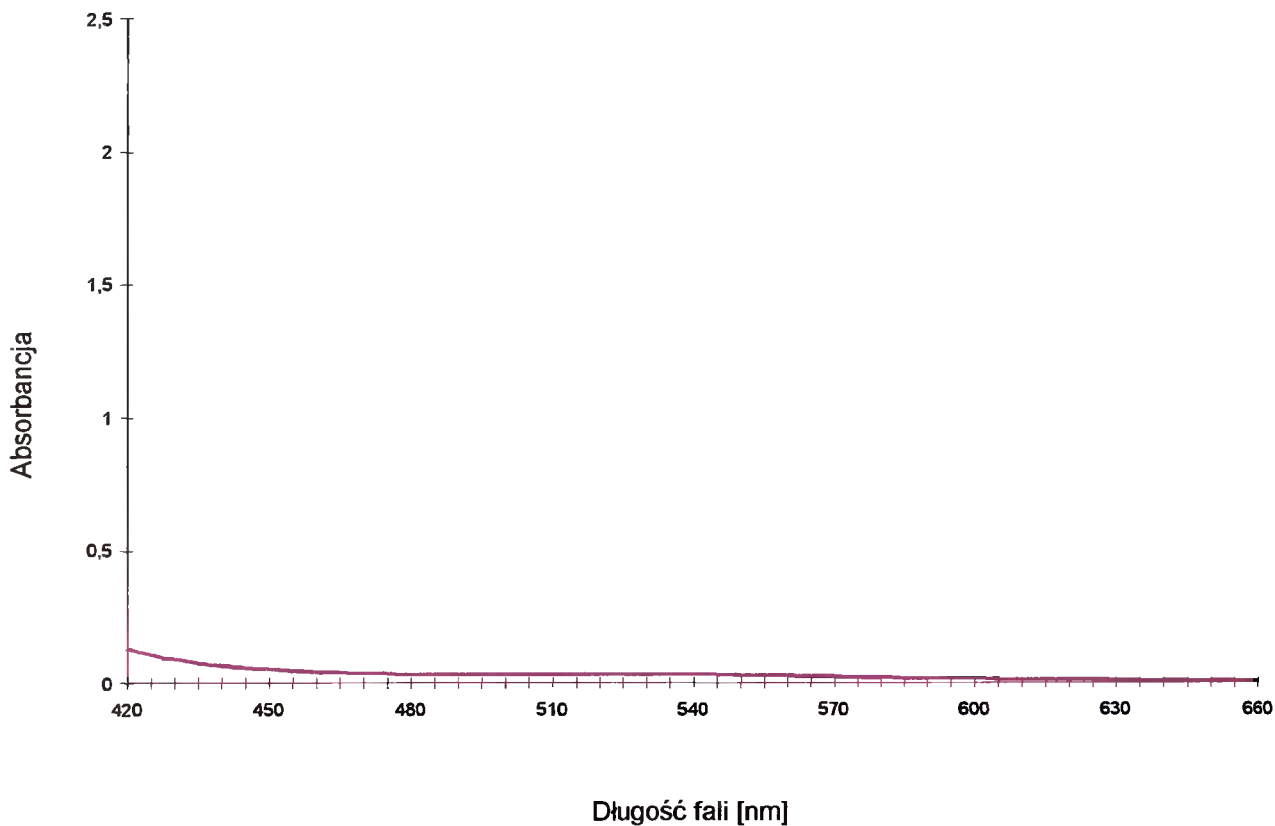




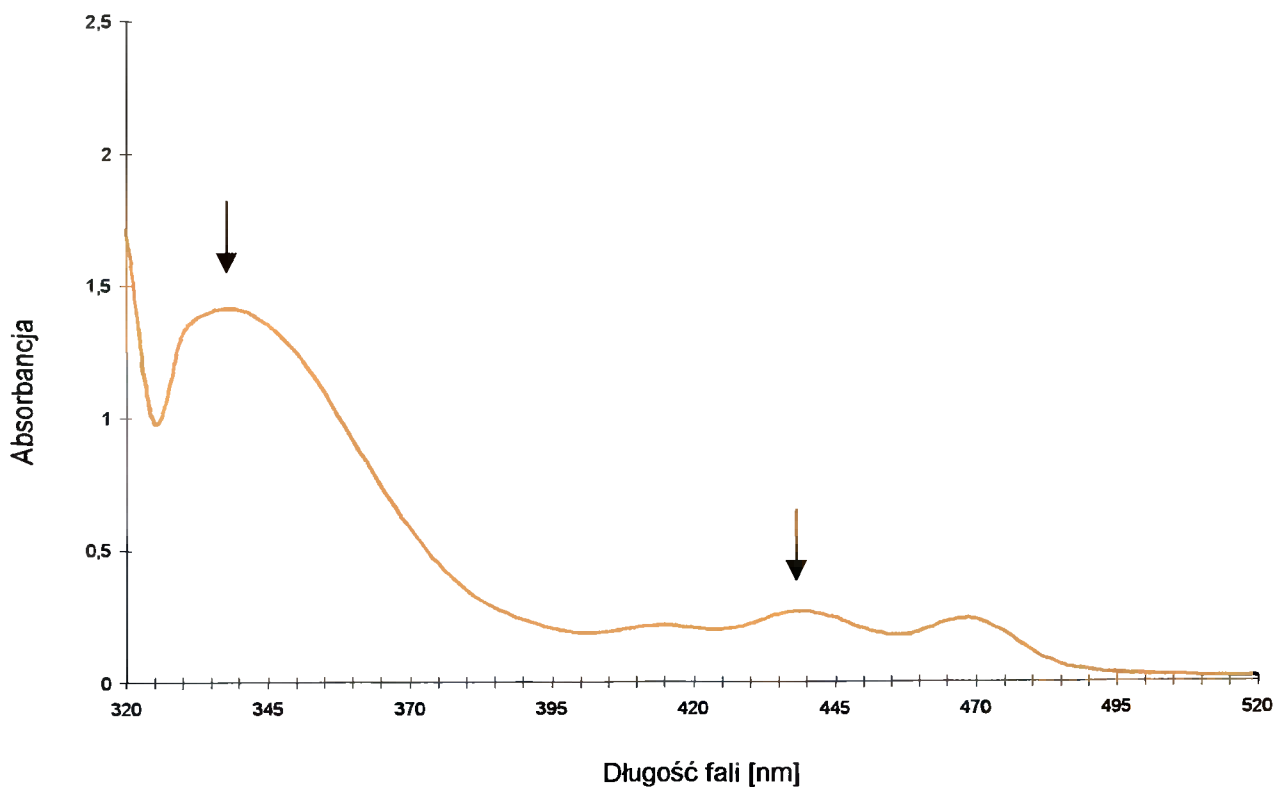
Ryc. 49. Widmo absorpcyjne wskazujące na brak antocyjanów u mutantu 'Lady Rosy'.



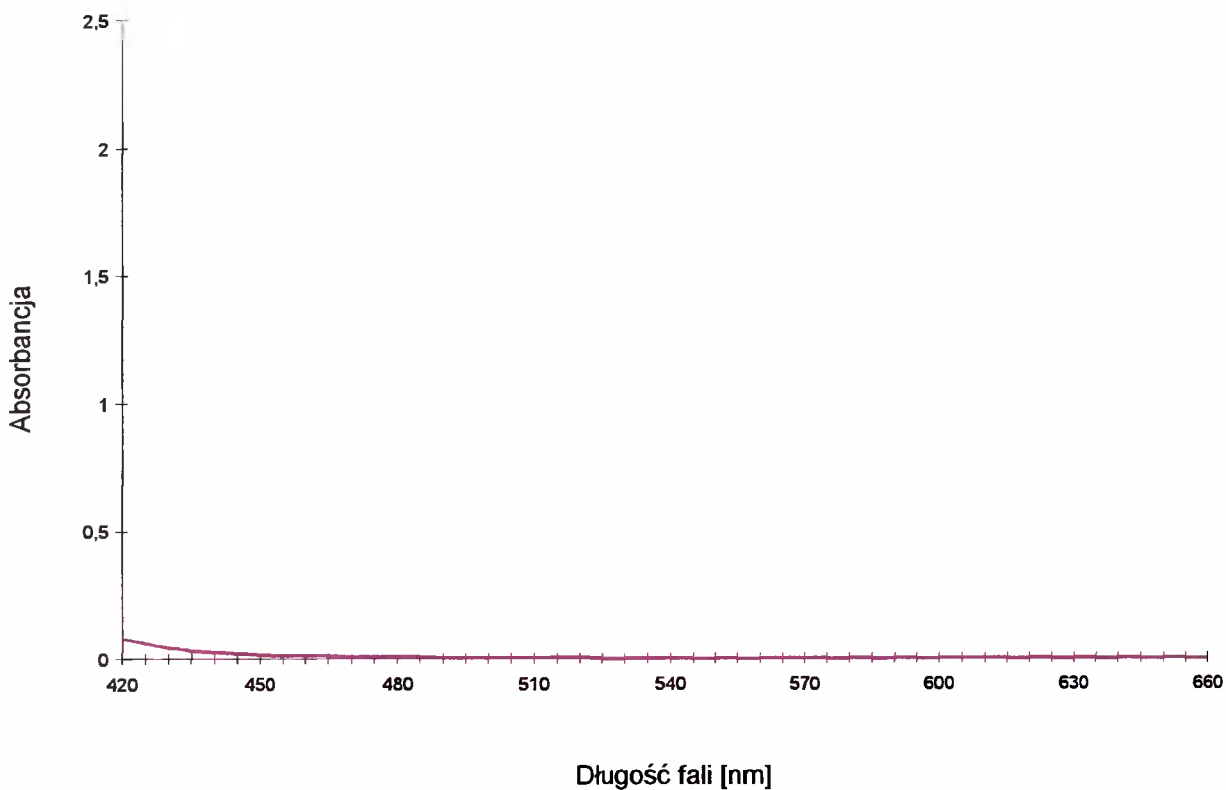
Ryc. 50. Widmo absorpcyjne flawonoli mutantu 'Lady Rosy'.



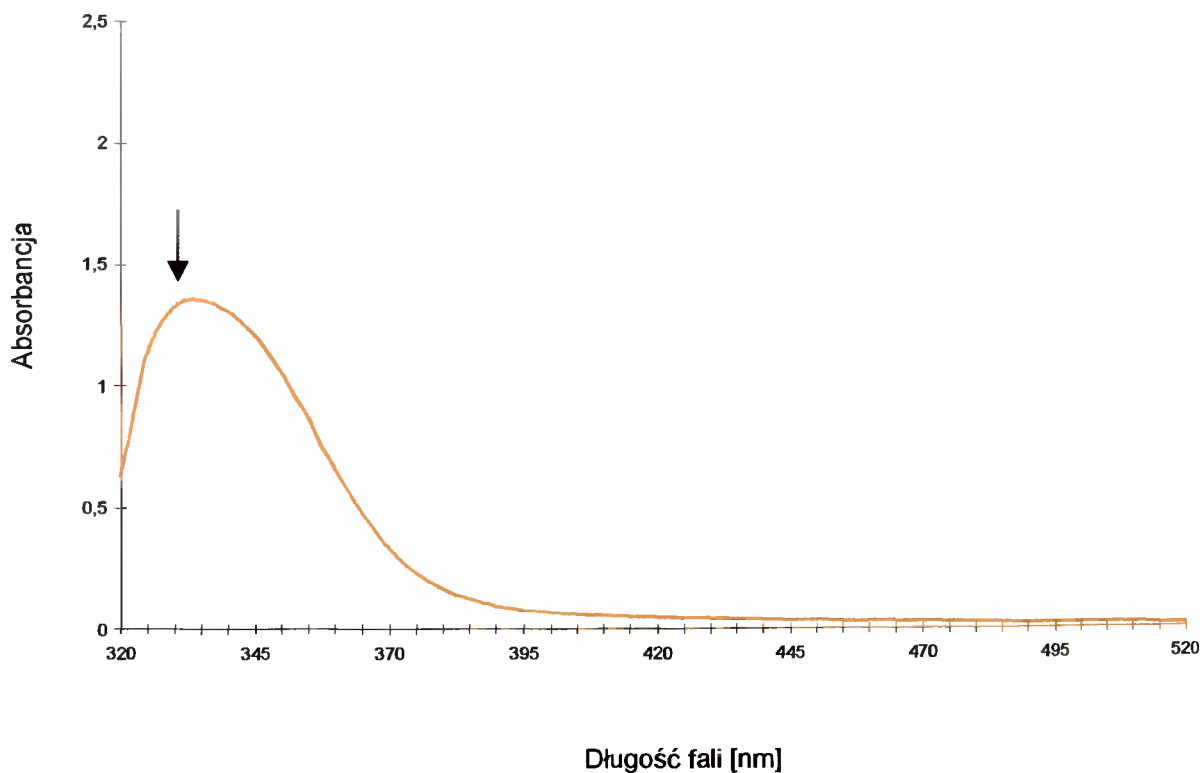
Ryc. 51. Widmo absorpcyjne wskazujące na brak antocyjanów u mutantu 'Lady Salmon'.



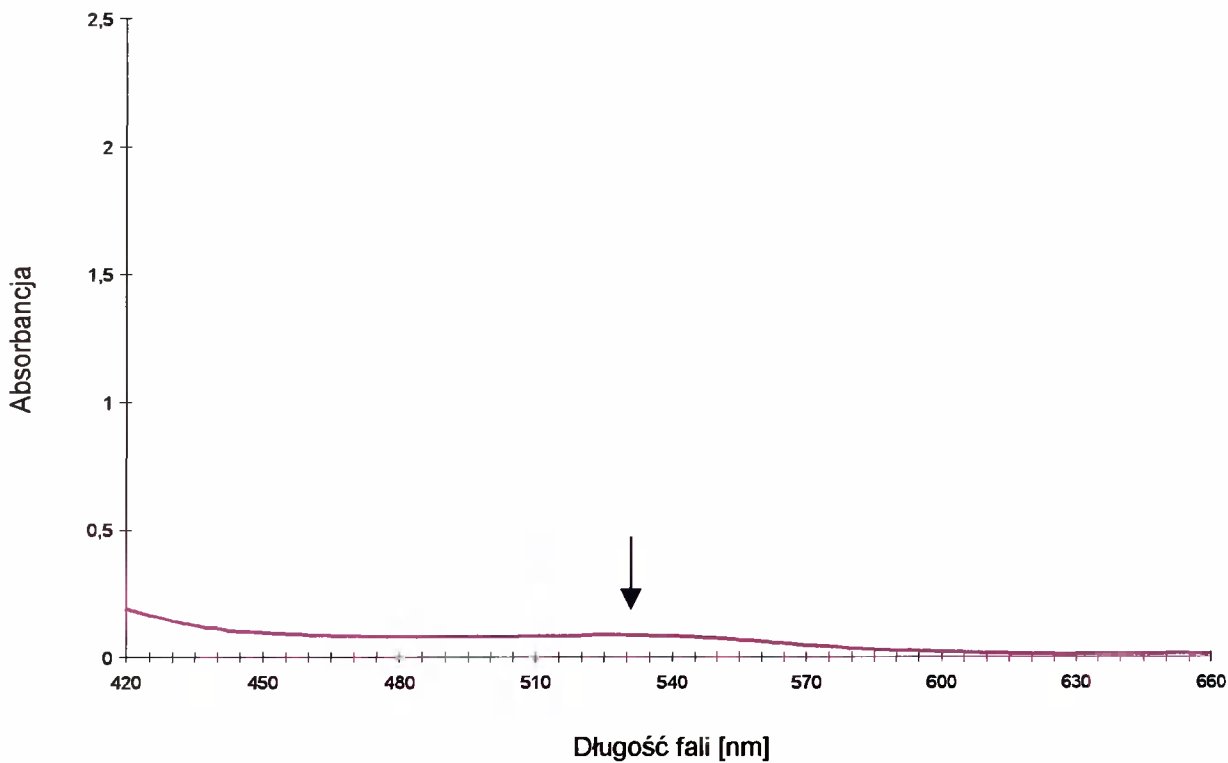
Ryc. 52. Widmo absorpcyjne flawonoli i karotenoidów mutantu 'Lady Salmon'.



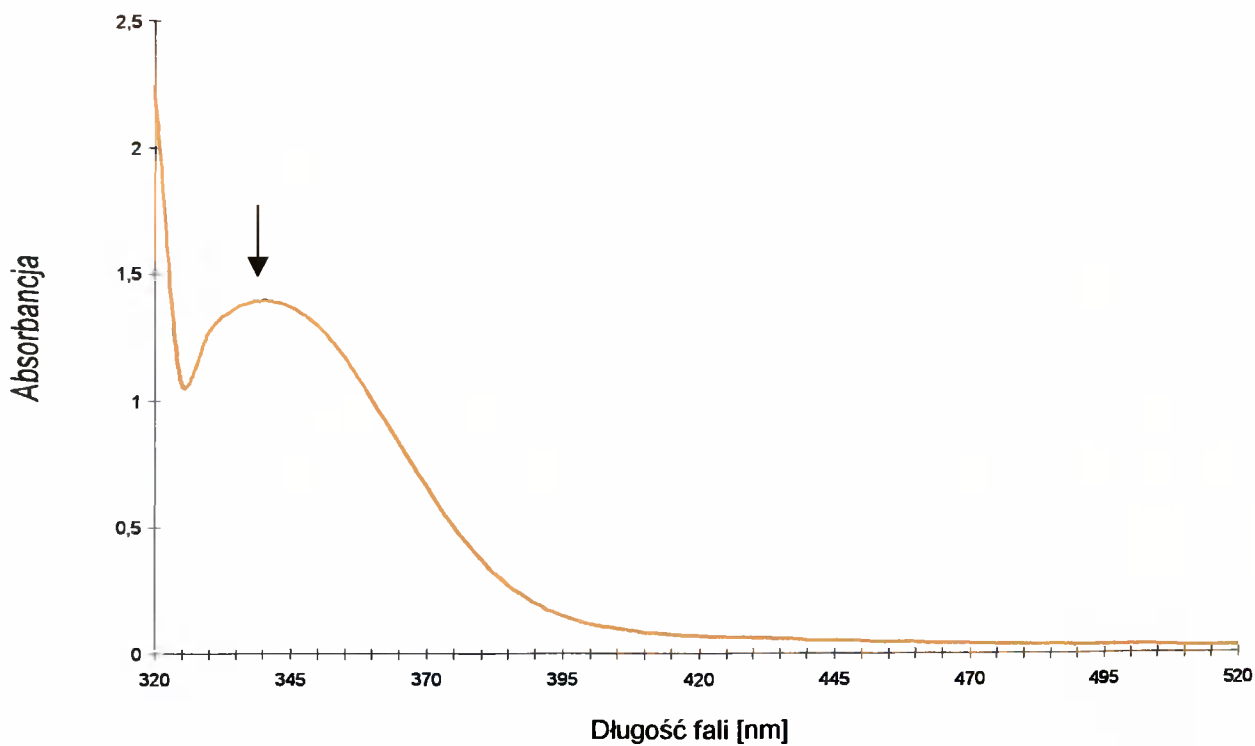
Ryc. 53. Widmo absorpcyjne wskazujące na brak antocyjanów u mutantu 'Lady White'.



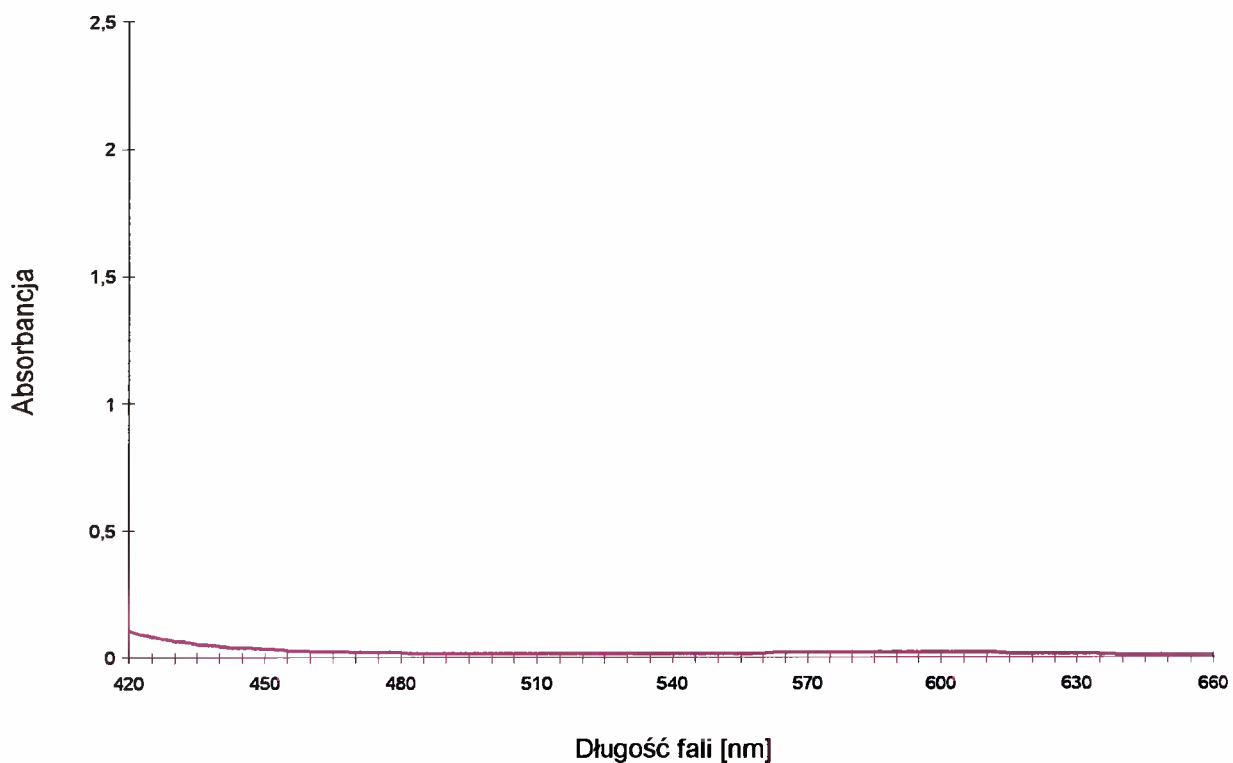
Ryc. 54. Widmo absorpcyjne flawonów mutantu 'Lady White'.



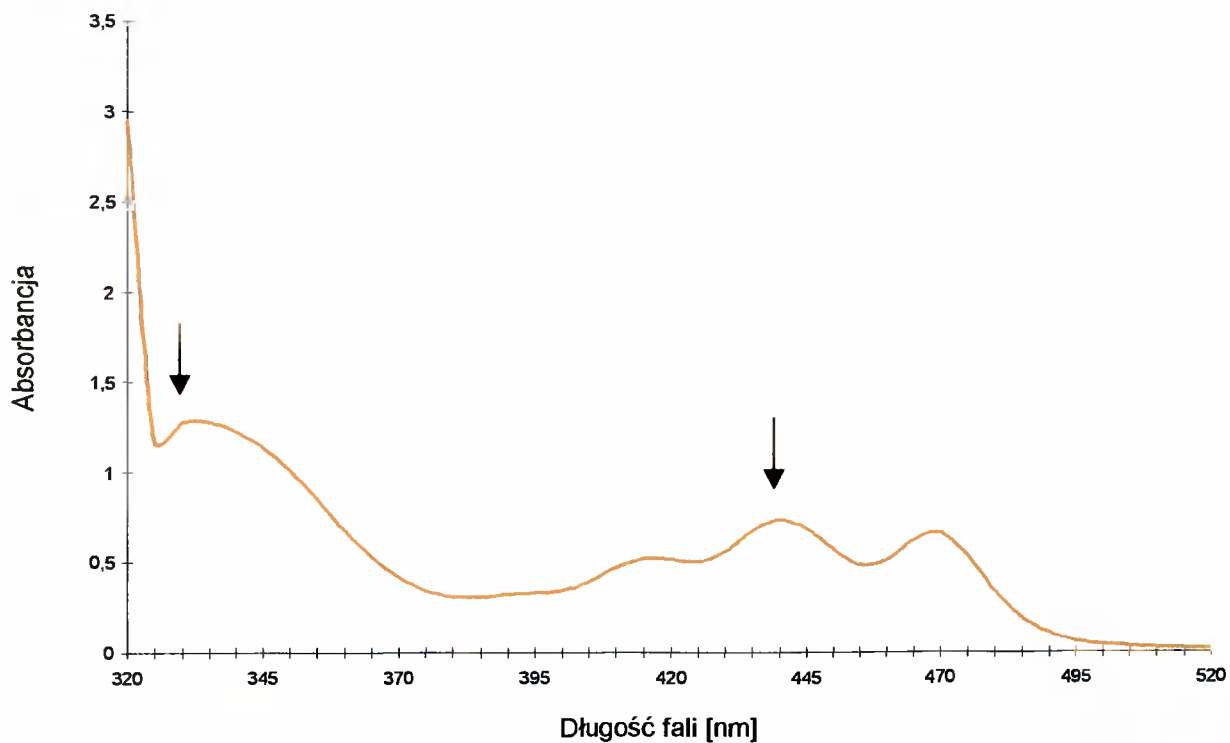
Ryc. 55. Widmo absorpcyjne antocyjanów mutantu 'Lady Vitroflora'.



Ryc. 56. Widmo absorpcyjne flawonoli mutantu 'Lady Vitroflora'.

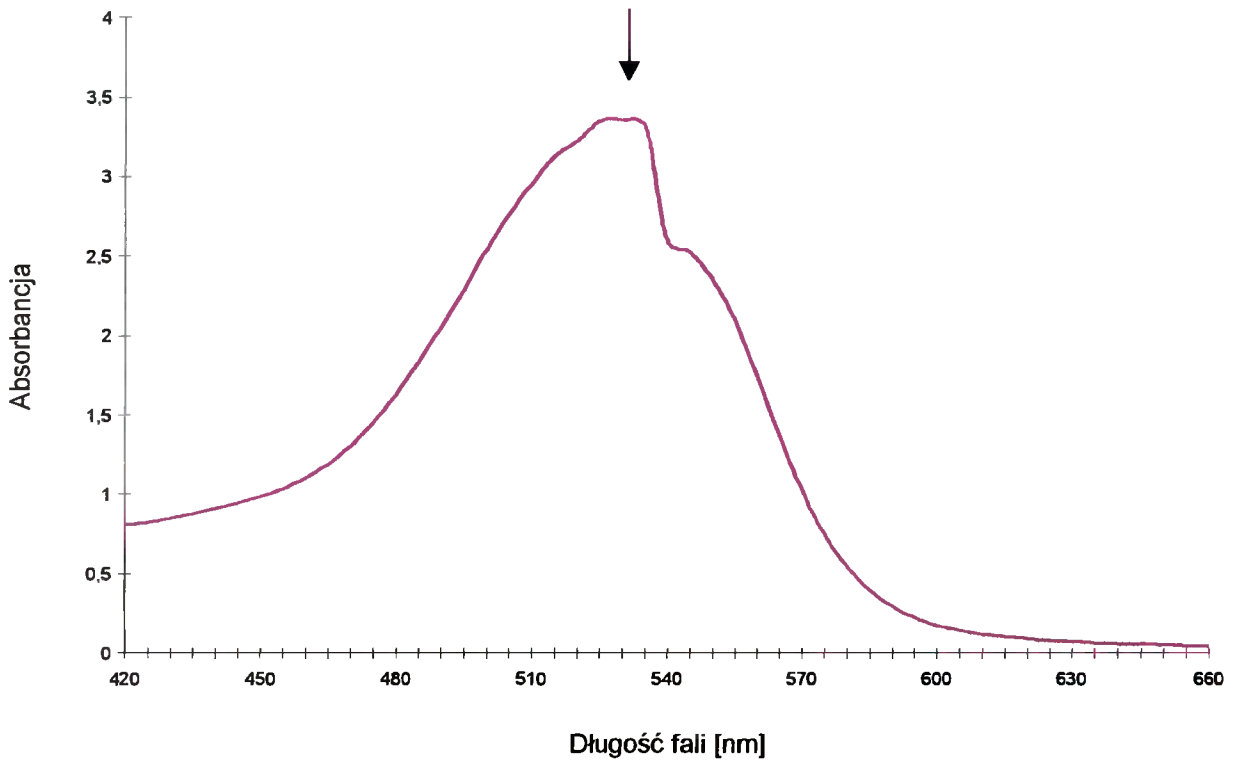


Ryc. 57. Widmo absorpcyjne wskazujące na brak antocyjanów mutantu 'Lady Yellow'.

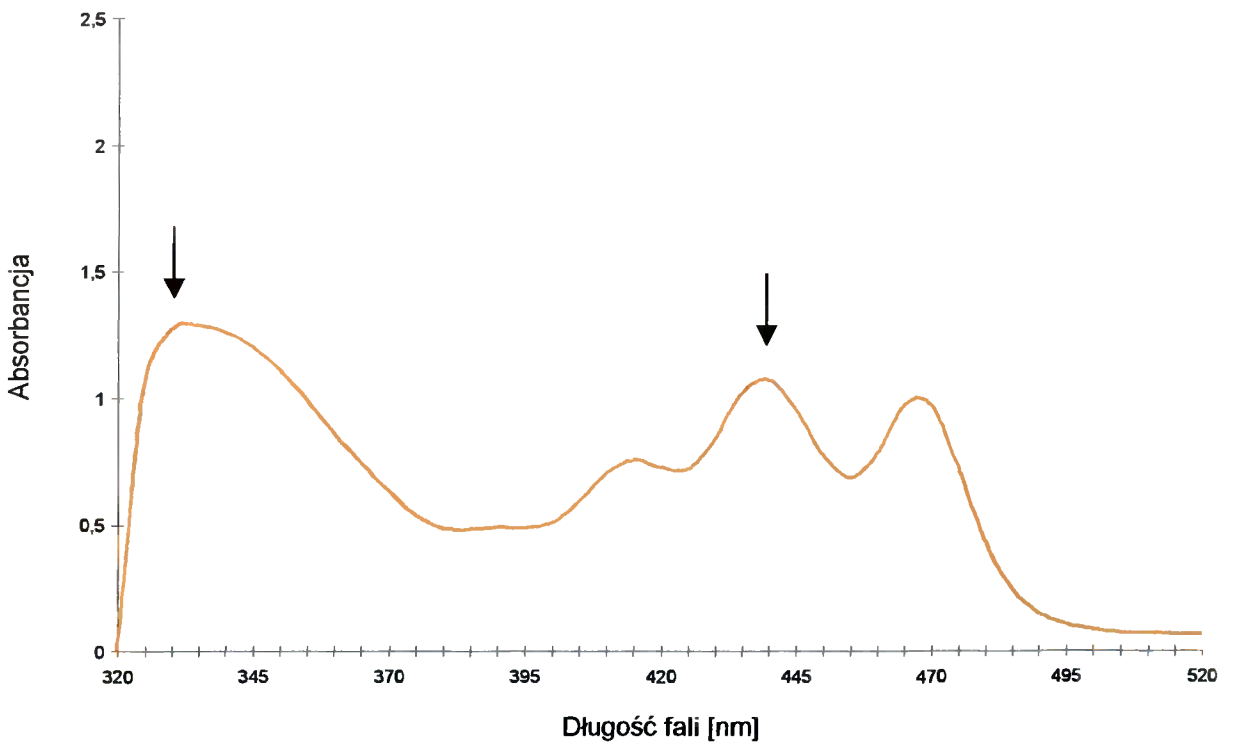


Ryc. 58. Widmo absorpcyjne flawonów i karotenoidów mutantu 'Lady Yellow'.

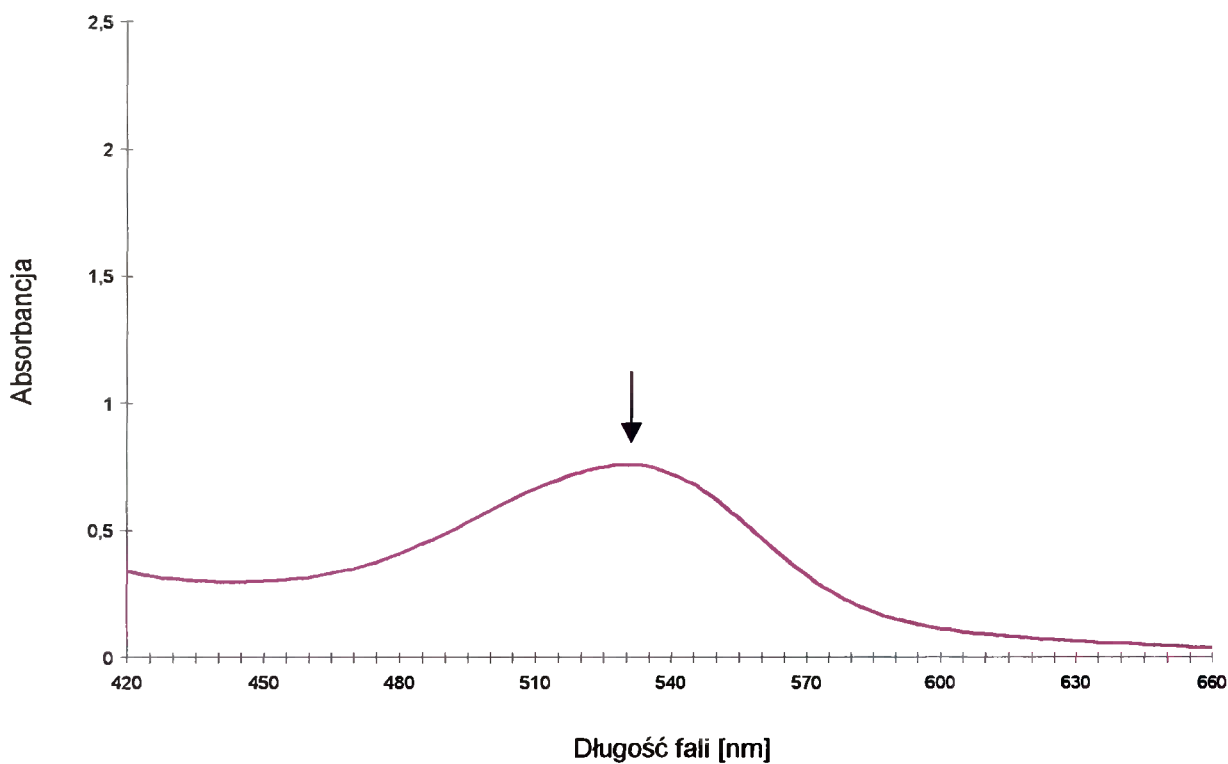




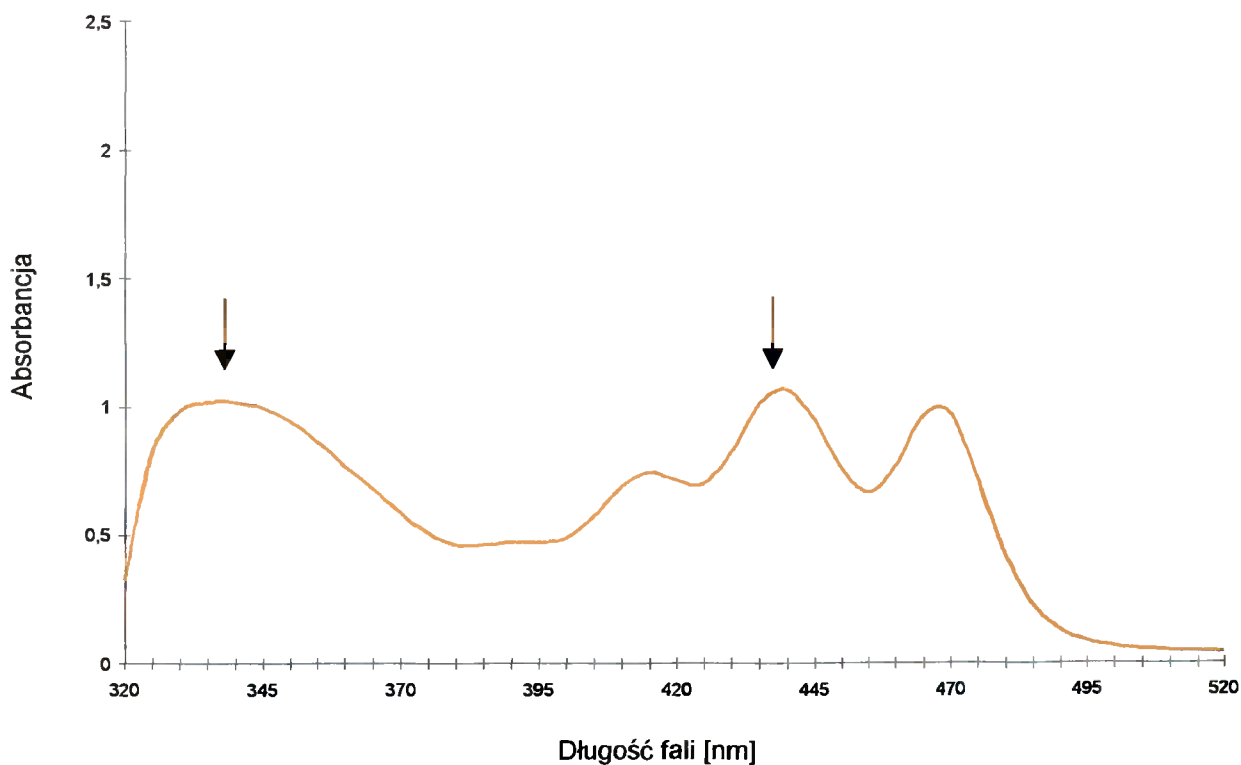
Ryc. 59. Widmo absorpcyjne antocyjanów odmiany wyjściowej 'Red Nero'.



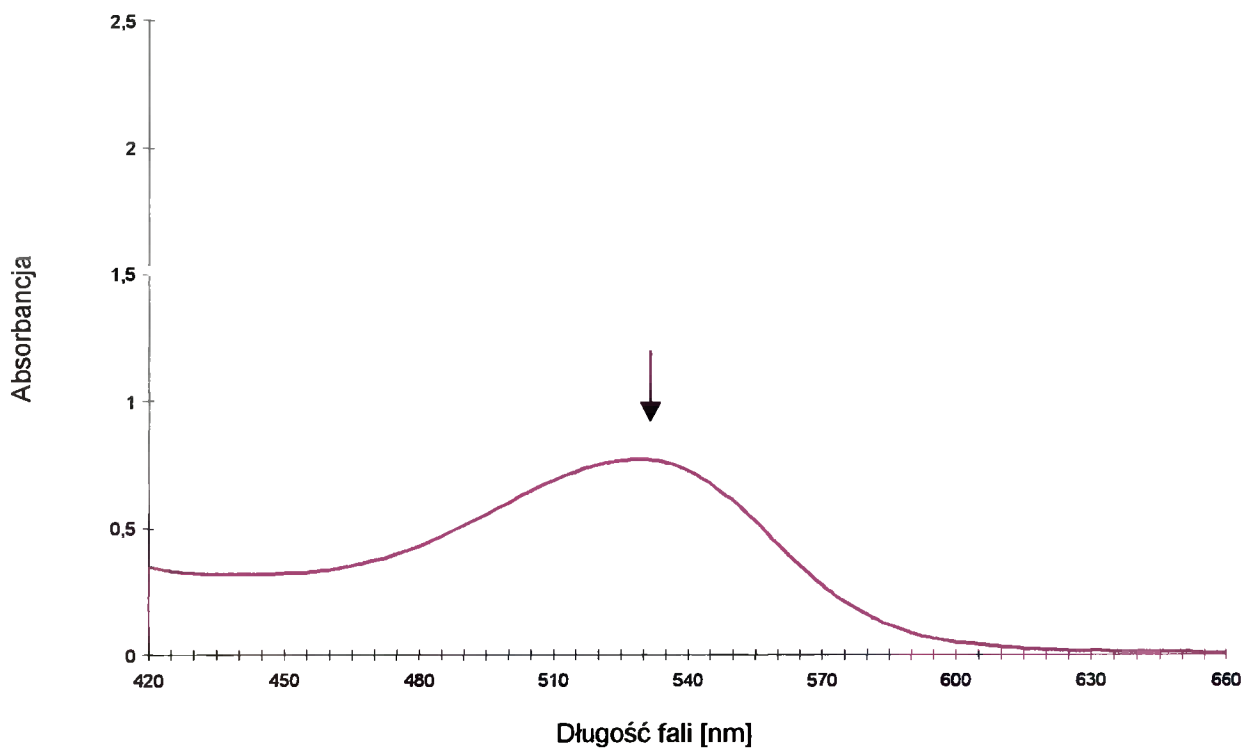
Ryc. 60. Widmo absorpcyjne flawonów i karotenoidów odmiany wyjściowej 'Red Nero'.



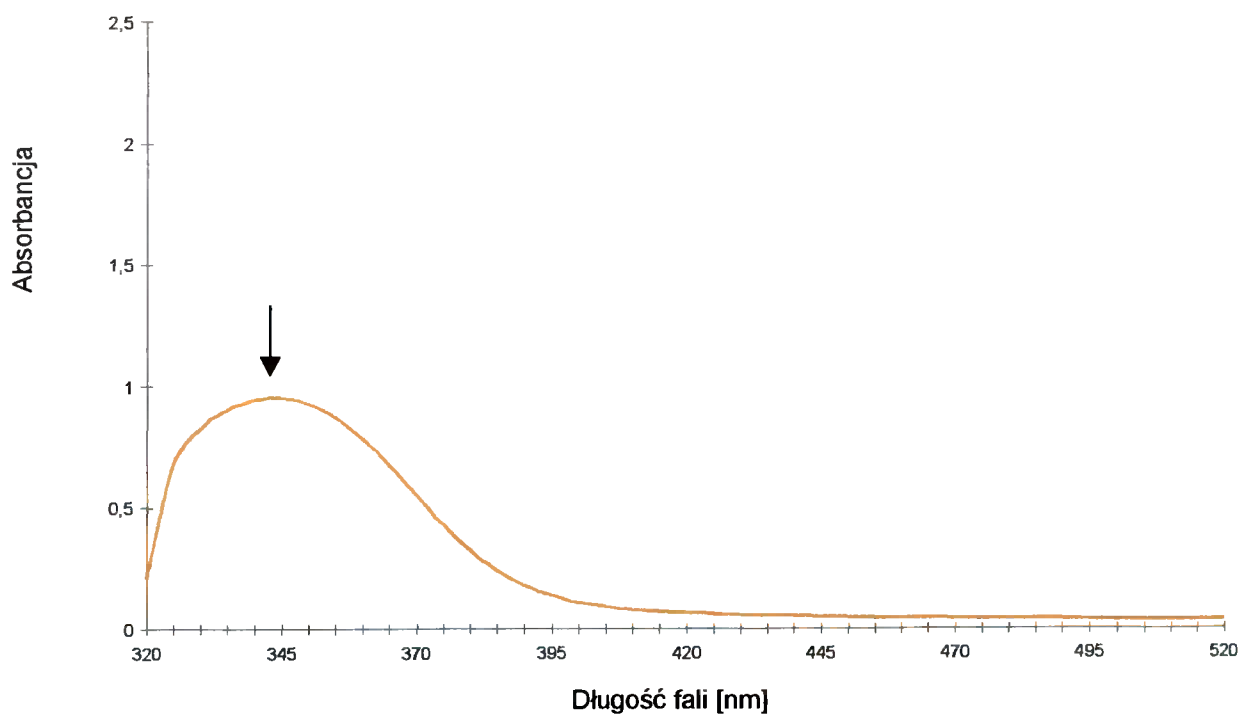
Ryc. 61. Widmo absorpcyjne antocyjanów mutantu 'Mini Nero'.



Ryc. 62. Widmo absorpcyjne flawonoli i karotenoidów mutantu 'Mini Nero'.

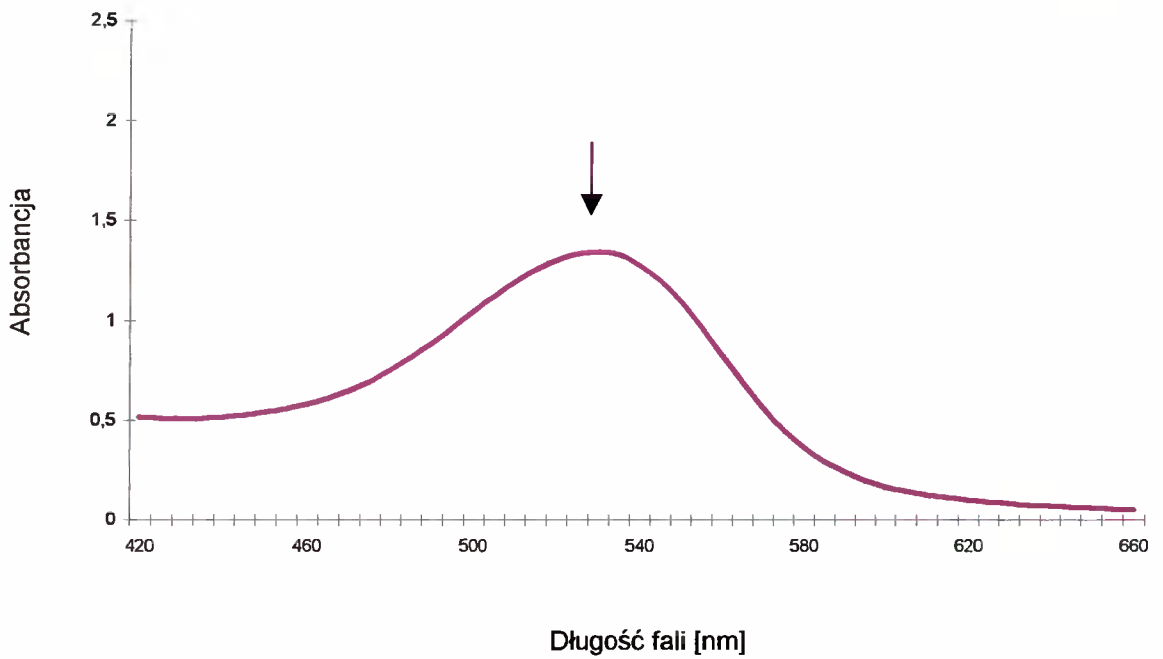


Ryc. 63. Widmo absorpcyjne antocyjanów odmiany wyjściowej 'Lilac Wonder'.

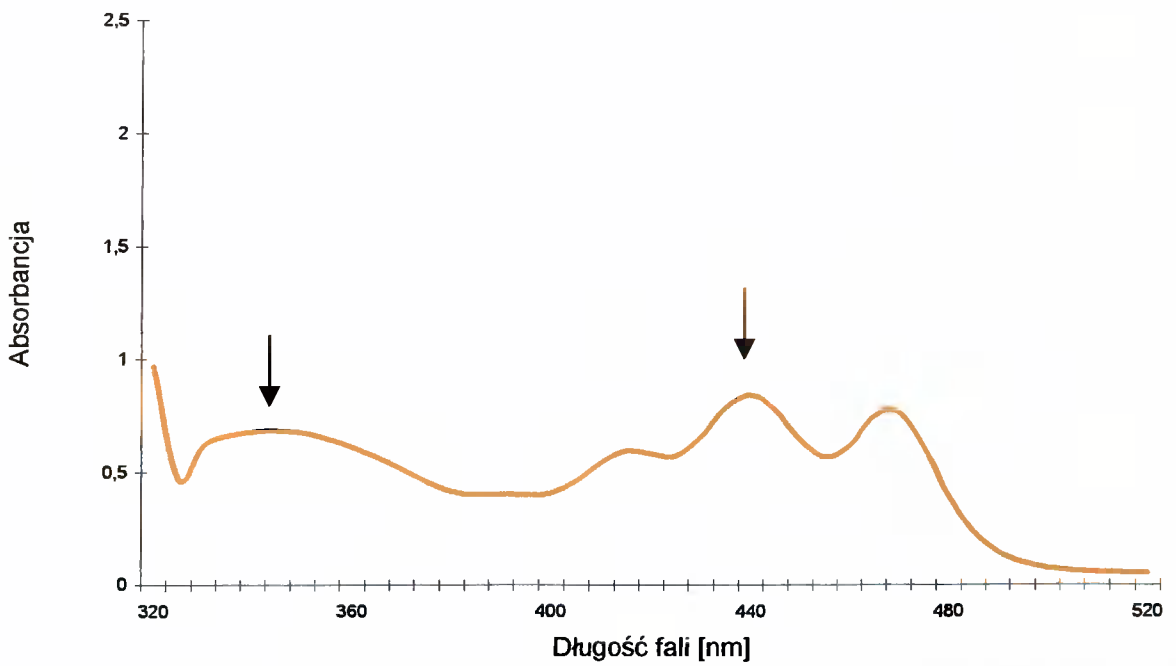


Ryc. 64. Widmo absorpcyjne flawonoli odmiany wyjściowej 'Lilac Wonder'.

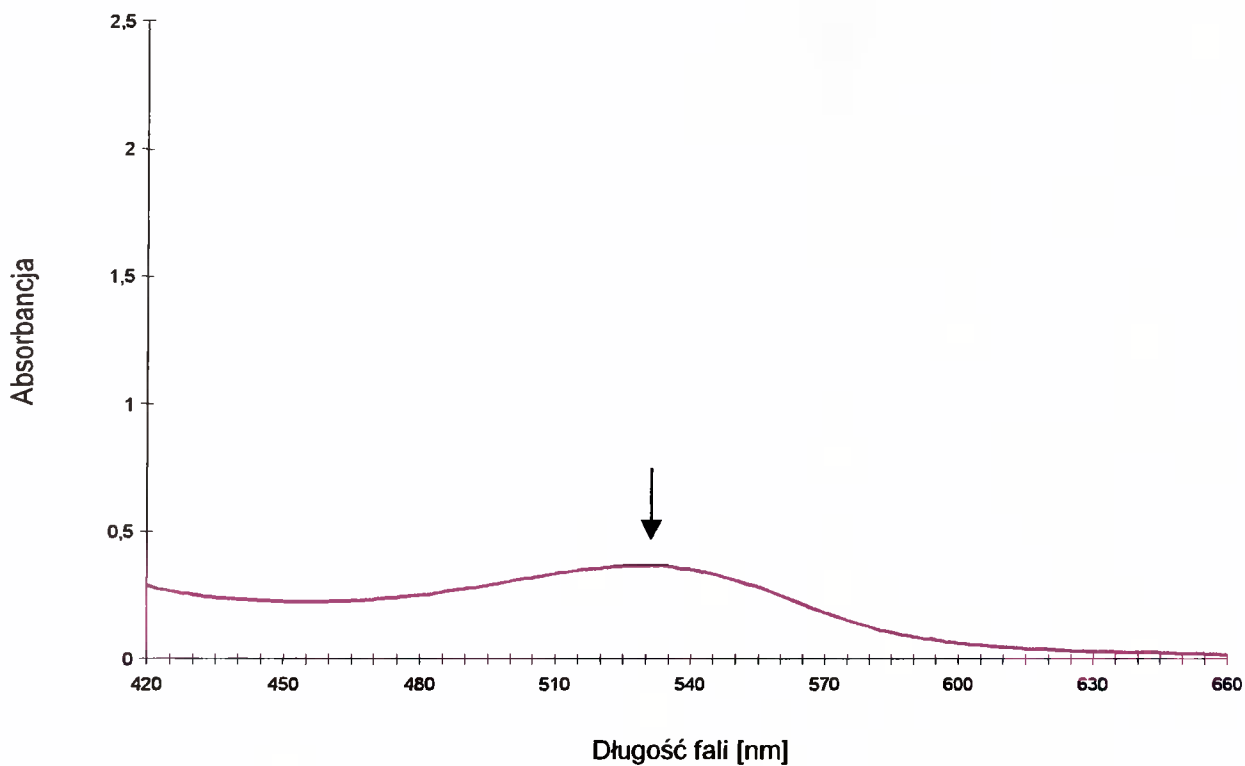




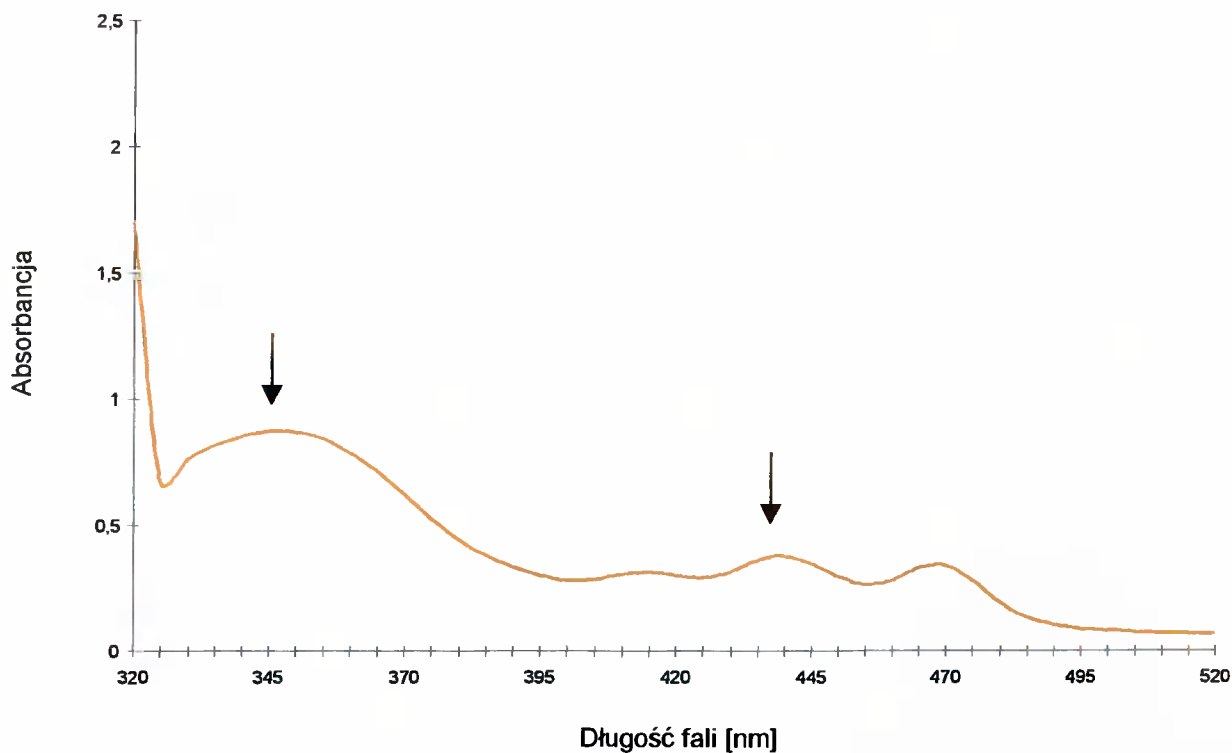
Ryc. 65. Widmo absorbcyjne antocyjanów mutantu 'Bronze Wonder'.



Ryc. 66. Widmo absorpcyjne flawonoli i karotenoidów mutantu 'Bronze Wonder'.



Ryc. 67. Widmo absorpcyjne antocyjanów mutantu 'Red Wonder'.



Ryc. 68. Widmo absorpcyjne flawonoli i karotenoidów mutantu 'Red Wonder'.

Tab. 6. Występowanie barwników w kwiatach języczkowatych odmian wyjściowych i ich mutantów.

Grupa	Odmiana wyjściowa mutant	Barwniki			
		Flawonole	Flawonole	Karotenoidy	Antocyjany
Lady	Richmond	-	+	-	+
	Lady Apricot	-	+	+	+
	Lady Bronze	-	+	+	+
	Lady Orange	+	-	+	+
	Lady Vitroflora	-	+	-	+
	Lady Salmon	-	+	+	-
	Lady Amber	+	-	+	-
	Lady Yellow	+	-	+	-
	Lady Pink	-	+	-	-
	Lady Rosy	-	+	-	-
	Lady White	+	-	-	-
Nero	Red Nero	+	-	+	+
	Mini Nero	-	+	+	+
Wonder	Lilac Wonder	-	+	-	+
	Bronze Wonder	-	+	+	+
	Red Wonder	-	+	+	+

+ obecność barwnika; - brak barwnika

Grupę Wonder tworzą dwa mutanty uzyskane z odmiany wyjściowej 'Lilac Wonder'. Odmiana ta podobnie jak 'Richmond' nie miała karotenoidów, zawierała zaś flawonole przy  $\lambda = 344$  nm oraz antocyjany przy  $\lambda = 530$  nm. Zarówno mutant 'Red Wonder', jak i 'Bronze Wonder' posiadały różne wobec siebie wartości absorpcji świadczące o obecności karotenoidów. Natomiast poziom antocyjanów wzrósł u 'Bronze Wonder', zaś zmalał u 'Red Wonder'.

Ciekawym zjawiskiem jest również wyróżnienie się tej grupy na tle pozostałych wystąpieniem maksimum absorpcji dla flawonoli przy  $\lambda = 344$  nm. Przy tej długości fali tylko 'Bronze Wonder' różnił się od pozostałych odmian w grupie wartością absorpcji.

Wszystkie mutanty uzyskane z odmian wyjściowych różniły się między sobą oraz w stosunku do odmiany wyjściowej ze względu na wartość absorpcji i na

długość fali, przy której wystąpiło maksimum. Każda z badanych odmian chryzantem miała swój stały i powtarzalny profil występowania określonych barwników przy charakterystycznych długościach fali, co zostało potwierdzone w roku 2000. Zmianie uległ jedynie ogólny poziom wartości absorpcji – w roku 2000 był on generalnie niższy niż w roku 1999. Nawet jeśli u kilku odmian wystąpił ten sam zespół barwników to wartości absorpcji przy tych samych długościach fali różniły się statystycznie.

Zależności dotyczące wartości stężeń karotenoidów i antocyjanów w kwiatach języczkowatych badanych chryzantem w przeliczeniu na 1 g świeżej masy przedstawiono w tabeli 7 i 8. Wartości stężeń stanowią dokładne odzwierciedlenie wartości absorpcji przy długości fali  $\lambda = 440$  nm dla karotenoidów oraz  $\lambda = 530$  nm dla antocyjanów.

Tabela 7.

Wartości stężeń karotenoidów i antocyjanów [mg/g] w kwiatach języczkowatych chryzantemy wielkokwiatowej w roku 1999.

Odmiana wyjściowa mutant	Karotenoidy	Antocyjany
Richmond	-	228,0 c
Lady Amber	36,5 d	-
Lady Apricot	14,5 b	12,5 b
Lady Bronze	35,7 d	15,0 b
Lady Orange	25,1 c	15,5 b
Lady Pink	-	-
Lady Rosy	-	-
Lady Salmon	12,7 a	-
Lady White	-	-
Lady Vitroflora	-	7,0 a
Lady Yellow	34,5 d	-
Red Nero	50,4 a	273 b
Mini Nero	50,1 a	61,5 a
Lilac Wonder	-	64,0 b
Bronze Wonder	39,6 b	109,0 c
Red Wonder	17,8 a	28,5 a

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

Tabela 8.

Wartości stężeń karotenoidów i antocyjanów [mg/g] w kwiatach języczkowatych chryzantemy wielkokwiatowej w roku 2000.

Odmiana wyjściowa mutant	Karotenoidy	Antocyjany
Richmond	-	43,5 c
Lady Amber	26,4 d	-
Lady Apricot	11,0 b	6,5 b
Lady Bronze	29,8 e	6,5 b
Lady Orange	21,6 c	5,5 b
Lady Pink	-	-
Lady Rosy	-	-
Lady Salmon	8,6 a	-
Lady White	-	-
Lady Vitroflora	-	4,5 a
Lady Yellow	27,3 d	-
Red Nero	41,8 a	62,5 b
Mini Nero	38,7 a	21,5 a
Lilac Wonder	-	22,5 b
Bronze Wonder	31,6 b	46,0 c
Red Wonder	11,0 a	14,5 a

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

### 4.3. Analiza DNA-fingerprinting metodą RAPD.

Z przebadanych 20 starterów tylko 8 (OPB-04, OPB-18, OPF-06, OPM-09, OPM-18, RAD-01, RAD-09 i RAD-12) dało polimorficzne prążki będące podstawą do wykazania odrębności odmian chryzantem.

Starter RAD-09 (ryc. 69, tab. 9) lub zestawy starterów: OPB-04 i OPF-06 (ryc. 70, tab. 10), OPB-18, OPB-04 i OPF-06 (ryc. 71, tab. 11), OPF-06, OPB-04 i OPB-18 (ryc. 72, tab. 12), RAD-01, OPF-06 i OPB-04 (ryc. 73, tab. 13), RAD-12, OPF-06 i OPB-18 (ryc. 74, tab. 14) dawały dla każdej odmiany wyjściowej lub mutanta specyficzny, stały i powtarzalny (przy zachowaniu warunków reakcji) układ prążków tzw. DNA-fingerprinting.

Starter RAD-09 rozróżniał 15 badanych odmian, a dla jednej odmiany – ‘Lady Rosy’ nie dawał żadnego produktu PCR. Pozostałe pojedyncze startery rozróżniały między sobą od 3 do 10 odmian. Dopiero połączenie wybranych starterów w grupy dało w efekcie możliwość rozróżnienia wszystkich badanych odmian.

Przedstawione w tabeli 15 współczynniki zgodności wg Ney’a wskazują na wysokie podobieństwo mutantów ‘Lady Salmon’ i ‘Lady White’. Najwyższe jednak podobieństwo wystąpiło pomiędzy ‘Lady Bronze’ i ‘Lady Pink’ (0,9385).

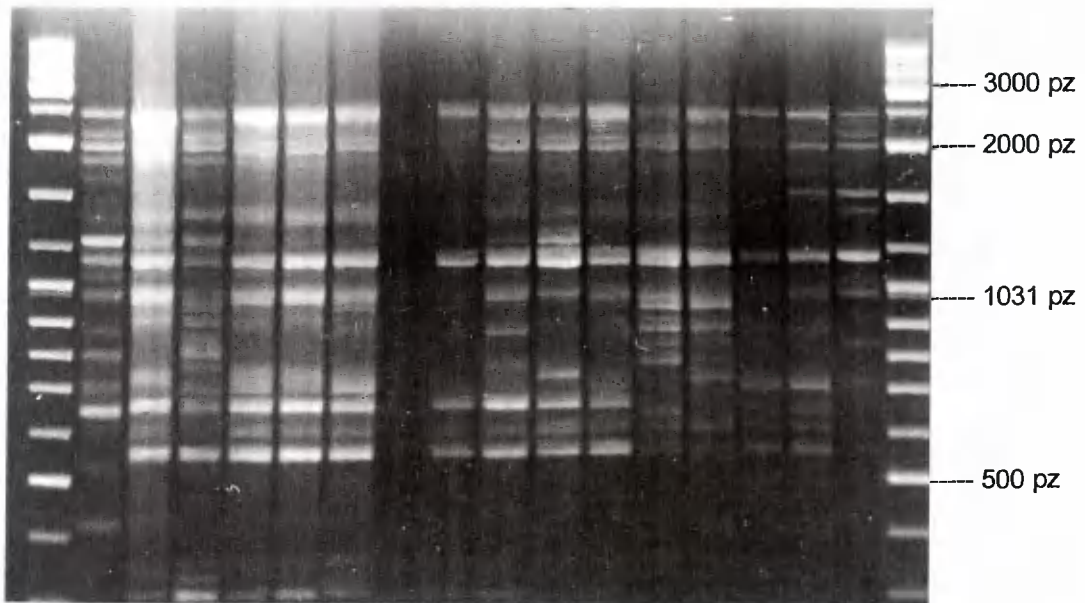
Wysoki współczynnik podobieństwa zaobserwowano też między odmianami: ‘Lady Amber’ i ‘Lady Apricot’, ‘Lady Bronze’ i ‘Lady Amber’, ‘Lady Orange’ i ‘Lady Amber’, ‘Lady Pink’ i ‘Lady Amber’, ‘Lady White’ i ‘Lady Amber’, ‘Lady Orange’ i ‘Lady Bronze’, ‘Lady White’ i ‘Lady Bronze’, ‘Lady White’ i ‘Lady Orange’.

W grupie Lady największe podobieństwo do odmiany wyjściowej było u mutantów ‘Lady Amber’, ‘Lady Apricot’, ‘Lady White’, ‘Lady Orange’ i ‘Lady Bronze’. Najniższy współczynnik podobieństwa wystąpił zaś u ‘Lady Salmon’ i ‘Lady Rosy’.

W grupie Nero, wystąpiło silne podobieństwo genetyczne (0,7021) mutantu ‘Mini Nero’ w stosunku do odmiany wyjściowej ‘Red Nero’.

W grupie Wonder podobieństwo molekularne mutantu ‘Red Wonder’ było dużo wyższe niż ‘Bronze Wonder’ w stosunku do odmiany wyjściowej ‘Lilac Wonder’.

M R LAM LAP LB LO LP LR LS LW LV LY RN MN LIW RW BW M



Ryc. 69. Analiza RAPD odmian wyjściowych i mutantów chryzantemy wielokwiatowej przy użyciu startera RAD – 09 (M - marker molekularny DNA Ladder Mix, pz – par zasad; R - 'Richmond', LAM - 'Lady Amber', LAP - 'Lady Apricot', LB - 'Lady Bronze', LO - 'Lady Orange', LP - 'Lady Pink', LR - 'Lady Rosy', LS - 'Lady Salmon', LW - 'Lady White', LV - 'Lady Vitroflora', LY - 'Lady Yellow', RN - 'Red Nero', MN - 'Mini Nero', LIW - 'Lilac Wonder', RW - 'Red Wonder', BW - 'Bronze Wonder').

Tab. 9. DNA - fingerprinting 16 odmian chryzantemy wielokwiatowej uzyskany przy pomocy startera RAD-09.

Starter	Masa prążka [pz]	Odmiana wyjściowa mutant																
		R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW	
RAD -09	2107,2	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1955,9	1	1	1	1	1	1	-	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1816,2	1	1	1	1	1	1	-	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1428,0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	1225,9	1	1	1	0	0	0	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1172,6	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	999,5	1	1	1	1	1	1	-	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
	930,6	0	1	1	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	876,6	1	0	0	0	0	1	-	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	801,6	1	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	755,5	0	1	0	0	1	0	-	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	709,6	1	0	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.

M R LAM LAP LB LO LP LR LS LW LV LY RN MN LIW RW BW M



Ryc. 70. Analiza RAPD odmian wyjściowych i mutantów chryzantemy wielokwiatowej przy użyciu startera OPB – 04 (objaśnienia symboli – ryc. 69).

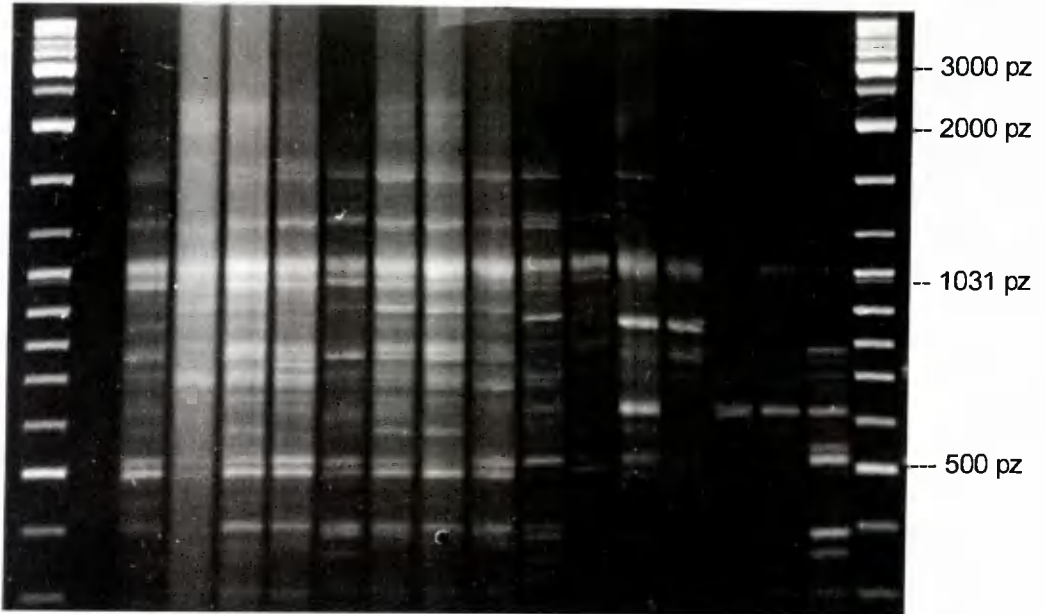
Tab. 10. DNA - fingerprinting 16 odmian chryzantemy wielokwiatowej uzyskany przy pomocy starterów OPB-04 i OPF-06.

Starter	Masa prążka [pz]	Odmiana wyjściowa mutant															
		R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW
OPB-04	2729,7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	-	0	-	0
	1657,4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	0	-	0
	1537,1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	-	0	-	1
	1452,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	-	0
	1396,6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	-	1	-	1
	954,3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	1
	612,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	1
509,5	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	-	0	-	0	
OPF-06	3019,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2701,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1145,0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	1111,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	948,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.



M R LAM LAP LB LO LP LR LS LW LV LY RN MN LIW RW BW M

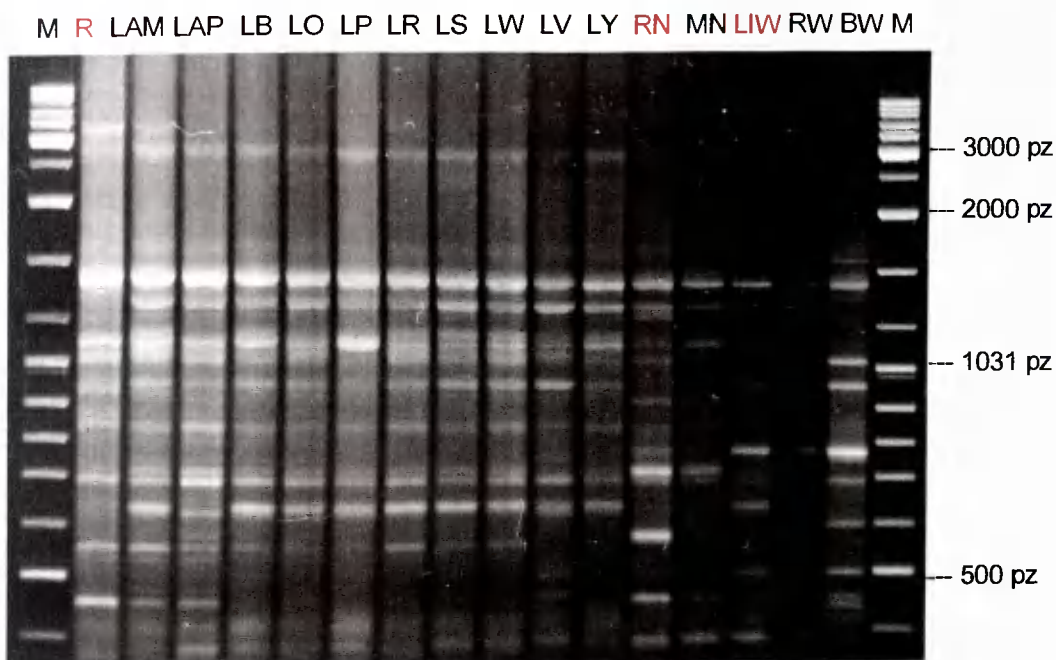


Ryc. 71. Analiza RAPD odmian wyjściowych i mutantów chryzantemy wielokwiatowej przy użyciu startera OPB – 18 (objaśnienia symboli – ryc. 69).

Tab. 11. DNA - fingerprinting 16 odmian chryzantemy wielokwiatowej uzyskany przy pomocy starterów OPB-18, OPB-04 i OPF-06.

Starter	Masa prążka [pz]	Odmiana wyjściowa mutant															
		R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW
OPB-18	1548,6	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
	1245,0	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	983,0	-	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	932,9	-	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	854,4	-	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
	660,6	-	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	630,7	-	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
OPB-04	1657,4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	0	-	0
	1537,1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	-	0	-	1
OPF-06	1276,9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1111,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.



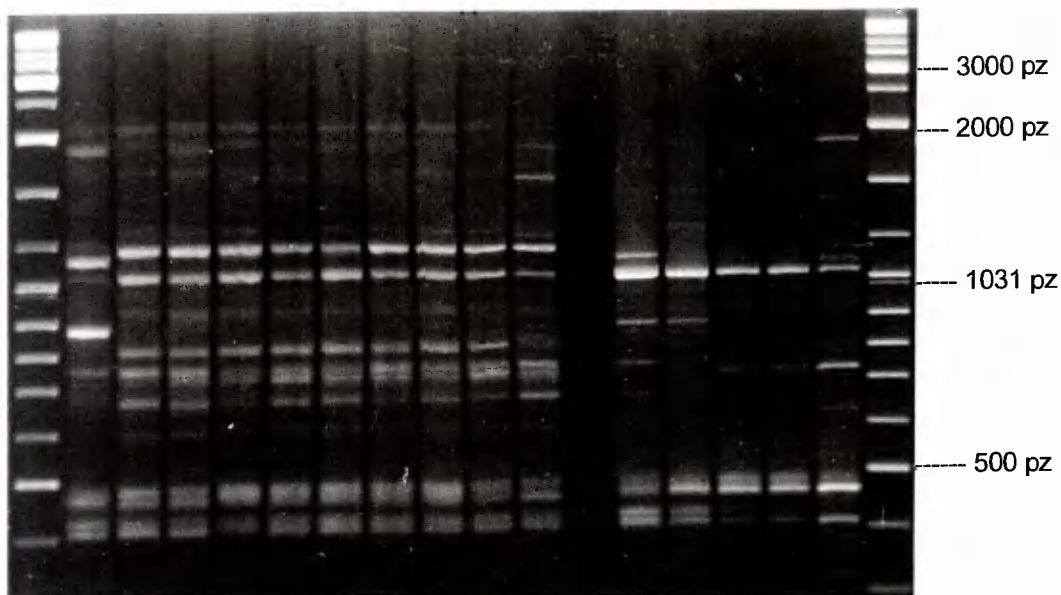
Ryc. 72. Analiza RAPD odmian wyjściowych i mutantów chryzantemy wielokwiatowej przy użyciu startera OPF - 06 (objaśnienia symboli – ryc. 69).

Tab. 12. DNA – fingerprinting 16 odmian chryzantemy wielokwiatowej uzyskany przy pomocy starterów OPF-06, OPB-04 i OPB-18.

Starter	Masa prążka [pz]	Odmiana wyjściowa mutant															
		R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW
OPF-06	3019,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2701,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1577,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1276,9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1237,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	1145,0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	1111,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	948,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
	556,9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
	494,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
460,0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
OPB-04	1657,4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	0	-	0
	1537,1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	-	0	-	1
	612,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	1
OPB-18	854,4	-	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.

M R LAM LAP LB LO LP LR LS LW LV LY RN MN LIW RW BW M



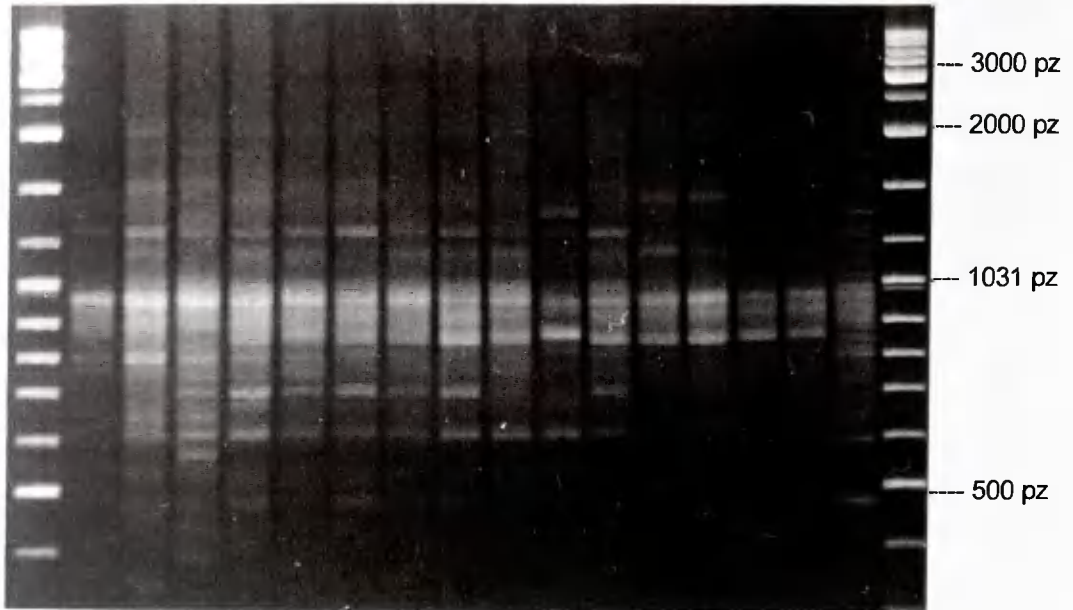
Ryc. 73. Analiza RAPD odmian wyjściowych i mutantów chryzantemy wielokwiatowej przy użyciu startera RAD – 01 (objaśnienia symboli – ryc. 69).

Tab. 13. DNA - fingerprinting 16 odmian chryzantemy wielokwiatowej uzyskany przy pomocy starterów RAD -01, OPF-06 i OPB-04.

Starter	Masa prążka [pz]	Odmiana wyjściowa mutant															
		R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW
RAD-01	1176,3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	0	0	0	0	0
	1120,1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	0	1
	871,3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	1	0	0	0
	812,2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	0	0	0	0	0
OPF-06	3019,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2701,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	1276,9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	1145,0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	1111,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
	460,0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
OPB-04	1657,4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	0	-	0
	1396,6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	-	1	-	1
	612,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	1
	509,5	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	-	0	-	0

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.

M R LAM LAP LB LO LP LR LS LW LV LY RN MN LIW RW BW M



Ryc. 74. Analiza RAPD odmian wyjściowych i mutantów chryzantemy wielokwiatowej przy użyciu startera RAD – 12 (objaśnienia symboli – ryc. 69).

Tab. 14. DNA – fingerprinting 16 odmian chryzantemy wielokwiatowej uzyskany przy pomocy starterów RAD - 12, OPF-06 i OPB-18.

Starter	Masa prążka [pz]	Odmiana wyjściowa mutant															
		R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW
RAD-12	1499,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
	1333,8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	910,0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	833,7	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	795,5	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	699,7	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
OPF-06	1145,0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
	1111,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
	556,9	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
	460,0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
OPB-18	983,0	-	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.

Tabela 15. Współczynniki zgodności według Ney'a (1979) dla badanych odmian wyjściowych i ich mutantów.

	R	LAM	LAP	LB	LO	LP	LR	LS	LW	LV	LY	RN	MN	LIW	RW	BW
R	1	0,6418	0,6308	0,6094	0,6142	0,5938	0,5000	0,4957	0,6240	0,5691	0,5225	0,5254	0,4510	0,3409	0,2651	0,5000
LAM	0,6418	1	0,8116	0,8676	0,8889	0,8529	0,7500	0,7680	0,8722	0,8092	0,7227	0,6349	0,5273	0,3750	0,3077	0,5161
LAP	0,6308	0,8116	1	0,7879	0,8092	0,7576	0,7759	0,7438	0,7907	0,6772	0,6087	0,5738	0,4528	0,3913	0,3218	0,5167
LB	0,6094	0,8676	0,7879	1	0,8992	0,9385	0,7895	0,8739	0,8976	0,7680	0,7788	0,6000	0,5577	0,4222	0,3529	0,5085
LO	0,6142	0,8889	0,8092	0,8992	1	0,8837	0,8142	0,8305	0,9048	0,8226	0,7500	0,6555	0,6019	0,4045	0,3333	0,5128
LP	0,5938	0,8529	0,7576	0,9385	0,8837	1	0,7544	0,8571	0,8819	0,7680	0,7788	0,6167	0,5385	0,4444	0,3529	0,5254
LR	0,5000	0,7500	0,7759	0,7895	0,8142	0,7544	1	0,8738	0,8108	0,6789	0,6186	0,5962	0,4545	0,4054	0,2899	0,4314
LS	0,4957	0,7680	0,7438	0,8739	0,8305	0,8571	0,8738	1	0,8448	0,7368	0,7255	0,6055	0,5161	0,4304	0,3243	0,4860
LW	0,6240	0,8722	0,7907	0,8976	0,9048	0,8819	0,8108	0,8448	1	0,8033	0,8000	0,6667	0,5545	0,4138	0,3415	0,5217
LV	0,5691	0,8092	0,6772	0,7680	0,8226	0,7680	0,6789	0,7368	0,8033	1	0,7407	0,6261	0,5455	0,4235	0,3500	0,5487
LY	0,5225	0,7227	0,6087	0,7788	0,7500	0,7788	0,6186	0,7255	0,8000	0,7407	1	0,5631	0,5287	0,4384	0,3235	0,5149
RN	0,5254	0,6349	0,5738	0,6000	0,6555	0,6167	0,5962	0,6055	0,6667	0,6261	0,5631	1	0,7021	0,5250	0,4533	0,5741
MN	0,4510	0,5273	0,4528	0,5577	0,6019	0,5385	0,4545	0,5161	0,5545	0,5455	0,5287	0,7021	1	0,5000	0,4407	0,5217
LIW	0,3409	0,3750	0,3913	0,4222	0,4045	0,4444	0,4054	0,4304	0,4138	0,4235	0,4384	0,5250	0,5000	1	0,800	0,5385
RW	0,2651	0,3077	0,3218	0,3529	0,3333	0,3529	0,2899	0,3243	0,3415	0,3500	0,3235	0,4533	0,4407	0,8000	1	0,4384
BW	0,5000	0,5161	0,5167	0,5085	0,5128	0,5254	0,4314	0,4860	0,5217	0,5487	0,5149	0,5741	0,5217	0,5385	0,4384	1

Objaśnienia symboli odmian – ryc. 69.

## *5. Dyskusja*

W pierwszym etapie badań prześlędzono kariotypy badanych odmian wyjściowych i ich mutantów w celu ewentualnego potwierdzenia zaistniałych zmian w genomie.

Liczba chromosomów u chryzantem jest różna dla poszczególnych gatunków i waha się od  $2n = 18$  do  $2n = 72$ , a nawet  $2n = 198$ . U większości gatunków uprawnych liczba ta wynosi jednak 54 chromosomy skupione w dziewięciu zespołach (Nazeer i Khoshoo, 1983).

U badanych mutantów i odmian wyjściowych trzech grup chryzantem – Lady, Nero i Wonder stwierdzono 45 lub 54 chromosomy. U większości mutantów nie stwierdzono zmian w liczbie chromosomów w wyniku działania promieniowania jonizującego, z jednym tylko wyjątkiem. Stanowił go mutant ‘Bronze Wonder’, u którego nastąpiło zwiększenie liczby chromosomów o dziewięć. W wyniku tej autopoliploidyzacji badany mutant posiadał 54 chromosomy. Drugi mutant z grupy Wonder – ‘Red Wonder’ oraz jego odmiana wyjściowa – ‘Lilac Wonder’ miały tylko 45 chromosomów. Zwiększenie liczby chromosomów nie wiązało się tu ze zwiększeniem średnicy kwiatostanu, czy zmianą pokroju rośliny lecz tylko ze zmianą barwy kwiatów języczkowatych, co wynika z badań Jerzego i Zalewskiej (1997). To potwierdza hipotezę Nazeer i Khoshoo (1983), że liczba chromosomów nie zawsze jest ściśle skorelowana z wielkością kwiatostanu, ponieważ  $2n = 54$  jest typową liczbą chromosomów zarówno dla odmian o małych jak i dużych kwiatostanach.

Badania przeprowadzone przez Jerzego i Zalewską (1997) dotyczące separacji chimer grupy odmian Wonder, dowodzą, że właśnie odmiana ‘Bronze Wonder’ jest homohistonowa, czyli składa się z tkanek jednorodnych genetycznie, drugi mutant – ‘Red Wonder’ jest natomiast chimerą peryklinalną ze zmienioną tylko warstwą L1. Zmiana liczby chromosomów u ‘Bronze Wonder’ potwierdza zatem wystąpienie u tego mutantu mutacji obejmującej wszystkie warstwy – L1, L2 i L3, gdyż analiza kariologiczna była przeprowadzona w wierzchołkach wzrostu korzeni zbudowanych z warstwy L3. Tak więc, w tym przypadku zmiana barwy była skorelowana ze zwiększeniem liczby chromosomów. Badania dowodzą jednak, że większość mutantów i sportów u chryzantem jest chimerami peryklinalnymi ze zmienioną genetycznie tylko warstwą L1 (Stewart i Dermen, 1970; Langton, 1980; Wolff, 1996; Shibata

i in. 1998). Badania przeprowadzone przez Dattę i Guptę (1981) oraz Dattę i Banerji (1990) sugerują, że najczęściej promieniowanie jonizujące 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 (1970) donosi, że sztucznie indukowane mutanty dwóch odmian chryzantem 'Yellow Deleware' i 'Deleware' posiadały zmieniony zespół chromosomowy w stosunku do odmian wyjściowych. Autorzy ci zanotowali zarówno ubytek jak i pojawienie się dodatkowych chromosomów u badanych mutantów – u jednego z nich zaobserwowali nawet  $2n = 110$  chromosomów.

Spośród przebadanych mutantów grup Lady, Nero i Wonder zauważono, że u mutantu 'Mini Nero' podczas mitozy w wierzchołkach wzrostu korzeni chromosomy tworzyły tzw. biwalenty, czyli ułożone w pary chromosomy homologiczne. Zjawisko to jest o tyle ciekawe, że biwalenty tworzą się normalnie w czasie mejozy podczas wymiany fragmentów chromatyd homologicznych. Trudno jest wytłumaczyć biologiczny sens wystąpienia tego zjawiska podczas mitozy. Watanabe (1977; 1983) badał zachowanie się chromosomów w czasie mejozy u chryzantem. Z badań tych wynika, że wszystkie odmiany tworzyły biwalenty regularnie, lecz kilka odmian tworzyła także multiwalenty. Watanabe (1977) sugeruje, że chryzantemy mogą być autopoliploidami z genetycznym mechanizmem stabilizującym powstawanie par chromosomów.

Gatunki heksaploidalne chryzantem są ponadto samoniezdodne i charakteryzują się hamowaniem wytwarzania pyłku (Drewlow i in., 1973; Ronald i Ascher, 1975), stąd generatywne rozmnażanie takich odmian jest często niemożliwe. Z tego względu większość odmian chryzantem uprawnych rozmnażanych jest wegetatywnie, poprzez sadzonki pędowe lub mikrosadzonki *in vitro*. To umożliwia przekazanie całej informacji genetycznej zawartej w trzech warstwach, z których składa się merystem, zawarty w eksplantatach wyjściowych. 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.

W taksonomii liczba chromosomów stanowi cechę pozwalającą często na klasyfikację gatunków. Badania własne wskazują, że liczba chromosomów nie może być podstawą do wykazania odrębności odmianowej ani do identyfikowania odmian. Badania kariotypów mogą natomiast służyć w pierwszym etapie badań do ewentualnego potwierdzenia zaistniałych zmian w genomie mutantów. Problemem, w przypadku kariotypu chryzantemy, jest stosunkowo duża liczba chromosomów utrudniająca ich precyzyjne policzenie. Metoda ta wydaje się być bardziej użyteczna u gatunków roślin posiadających mniejsze liczby chromosomów, takich jak krokus (*Crocus graveolens*) mający 6 chromosomów, czy pelargonium (*Pelargonium hortorum*), która ma 18 chromosomów (Darlington i Wylie, 1955).

W celu lepszego poznania zmian jakie zaszły u mutantów na poziomie molekularnym, przeprowadzono analizę barwników występujących w kwiatach jęczyczkowatych. W badaniach tych została zastosowana metoda spektrofotometryczna opracowana po raz pierwszy przez Shibatę (1958). Identyfikację na podstawie składu barwników występujących w kwiatach jęczyczkowatych roślin ozdobnych przeprowadzili dotychczas Kawase i Tsukamoto (1974; 1976), Datta i Gupta (1983), Asen (1984) i Solecka (1987), umożliwiając tym samym odróżnienie wielu odmian roślin ozdobnych o bardzo zbliżonej do siebie barwie kwiatostanów.

Przeprowadzone badania własne potwierdzają przydatność metody spektrofotometrycznej do wykazania odrębności analizowanych mutantów w stosunku do odmian wyjściowych oraz ich pełną identyfikację. Wszystkie mutanty uzyskane z odmian wyjściowych różniły się między sobą oraz w stosunku do odmiany wyjściowej. Każda z badanych odmian wyjściowych i ich mutantów posiadały swój stały i powtarzalny profil występowania określonych barwników przy charakterystycznych długościach fal. Nawet, jeśli u kilku

odmian wystąpił ten sam zestaw barwników, to wartości absorbancji przy tych samych długościach fal różniły się. W kolejnych latach badań zmianie uległ jedynie ogólny poziom absorbancji, natomiast maksima absorpcji przy określonych długościach fal pozostały bez zmian, co może być wynikiem odmiennych warunków świetlnych panujących w czasie trwania uprawy w poszczególnych latach badań. Tak więc każda z badanych odmian została zidentyfikowana na podstawie charakterystyki widmowej przez wartość absorbancji w maksimum przy odpowiedniej długości fali.

Metoda spektrofotometryczna oprócz oczywistych zalet, takich jak obiektywność i dokładność pomiarów, stwarza też pewien problem – do analizy potrzebne są kwiatostany w pełni kwitnienia.

Głównym barwnikiem antocyjanidynowym występującym u chryzantem jest glikozyd 3-cyjanidyny, zwany także chryzantemina, wyizolowany przez Kawase i in. (1970). Późniejsze badania (Saito, 1967; Saito i in., 1988) dowiodły, że barwnikiem tym był malonyloglikozyd 3-cyjanidyny. Ostatnio przeprowadzone analizy, przy pomocy najnowocześniejszej aparatury wykorzystującej spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego i spektroskopię masową dowiodły, że główną antocyjanidyną wszystkich purpurowo - różowych chryzantem jest w formie natywnej dimalonyloglikozyd 3-cyjanidyny (Nakayama i in., 1997).

U dziesięciu z szesnastu badanych odmian chryzantem wystąpiło maksimum absorpcji świadczące o obecności tego antocyjanu w kwiatach języczkowatych.

Biosynteza flawonoidów (antocyjanów, flawonów i flawonoli) jest kontrolowana przez dwa enzymy początkowe – syntazę chalkonu i izomerazę chalkonu. Substratami początkowymi potrzebnymi do zainicjowania syntezy są – kumarylo-CoA i malonylo-CoA. W wyniku działania enzymów powstaje prekursor – naringenina, która dzięki enzymowi – hydroksylazie 3-flawanonu przekształca się w dihydrokempferol. Na tym etapie drogi biosyntezy się rozchodzą i w zależności od obecności kluczowego enzymu – hydroksylazy – 3-flawonoidu zależy, czy powstanie cyjanidyna i kwercetyna czy też pelargonidyna i kempferol (Biolley, 1994). U chryzantem enzym hydroksylaza 3-flawonoidu jest aktywny i z tego względu powstający dihydrokempferol jest całkowicie przekształcany w dihydrokwercetynę i dalej w cyjanidynę. Nie ma

zatem możliwości, aby powstała pelargonidyna. Jedynie przez zablokowanie aktywności genu odpowiedzialnego za powstawanie enzymu hydroksylazy 3-flawonoidu istnieje możliwość powstania pelargonidyny - nowego antocyjanu dla chryzantem. Modyfikacja genetyczna drogi biosyntezy poprzez inhibicję aktywności tej hydroksylazy, stwarza możliwość produkcji nowych odmian o innym zabarwieniu kwiatostanów (Schwinn i in., 1994). Cel ten można osiągnąć poprzez zastosowanie inżynierii genetycznej (Mol i in., 1999; Aida i in., 2000 a i b; Cadic i Widehem, 2001; Zaccai i in., 2001) lub hodowli mutacyjnej (Broertjes i in. 1976; Stepczyńska i in., 1980; Jerzy i in., 1993; Banerji i Datta, 1992; Malaure i in., 1991; Zalewska, 1995).

Badane mutanty powstały w wyniku działania promieniowania jonizującego, a więc drugą z wymienionych metod. Zmiana barwy u powstałych tą drogą mutantów polegała zarówno na jakościowych jak i ilościowych modyfikacjach barwników. Odmiana wyjściowa 'Richmond', dająca początek grupie Lady posiadała wysoki poziom antocyjanów. Z powstałych w tej grupie mutantów, u sześciu zanikły antocyjany, u czterech pozostałych znacznie obniżyła się wartość absorbancji świadcząca o zmniejszeniu się ilości tego barwnika w kwiatostanie. W grupie Nero również zaobserwowano wyraźny spadek zawartości antocyjanów u powstałego mutantu, zaś w grupie Wonder u mutantu 'Bronze Wonder' wystąpił wzrost zawartości antocyjanów, zaś u 'Red Wonder' spadek. Można przypuszczać, że promieniowanie jonizujące u większości mutantów spowodowało częściową lub całkowitą inaktywację genów uczestniczących w biosyntezie tych barwników. Natomiast wzrost zawartości antocyjanów w grupie Wonder może mieć związek ze zwiększeniem liczby chromosomów u mutantu 'Bronze Wonder'.

Znane są obecnie geny odpowiedzialne za powstawanie enzymów biosyntezy antocyjanów (Holton i Cornish, 1995; Oren-Shamir i in., 1999; Rosati i in., 1999; Norimoto i in., 2000; Martens i Forkmann, 2001; Martens i in., 2001; De Schepper i in., 2001; Yabuya i in., 2001). W wielu przypadkach mutacja w pojedynczym genie powoduje akumulację pośrednich związków, co doprowadza do zmiany barwy kwiatów czy nasion (Onozaki i in., 1999; Selinger i Chandler, 1999; Kobayashi i in., 2001). Mutacja może także dotyczyć białek pośredniczących (GS-X) w transporcie antocyjanów przez błony do wakuoli, gdzie są gromadzone. Według Mola i in. (1998) istnieją trzy zespoły genów

biosyntezy antocyjanów – bg1, które zawierają wszystkie geny białek regulatorowych (MYB, bHLH, WD40) i odpowiedzialne za barwę purpurową, bg2 zawierające mniejszą ilość białek regulatorowych i odpowiadające za barwę żółtą oraz geny bg3 odpowiadające barwie czerwonej.

U fiołka afrykańskiego (*Saintpaulia ionantha*) wykryto aż osiem genów kontrolujących barwę kwiatów. Dwa z nich (I i S) są odpowiedzialne za inhibicję genów biosyntezy antocyjanów i są obecne jako dominujące allele w białych kwiatach. Pozostałe geny odpowiadają za intensywność barwy (W, Bd, Bw, P, R i A). Tak więc kwiaty o genotypach iissWPR są purpurowe, iissWppR różowe, zaś iissWPrr czerwone (Griesbach, 1998).

Z pewnością nie znamy wszystkich czynników kontrolujących geny biosyntezy antocyjanów. Również mechanizm działania białek regulatorowych nie jest jeszcze dobrze poznany i wymaga jeszcze wielu badań. Jednak możliwe stały się już dziś modyfikacje barwy kwiatów dzięki zastosowaniu osiągnięć inżynierii genetycznej. Realnym staje się stworzenie tą drogą róż o niebieskiej barwie kwiatów poprzez manipulację genetyczną polegającą na wprowadzeniu genów syntezy flawonoidów albo genów odpowiedzialnych za wartość wakuolarnego pH (Mol i in., 1998). Uzyskano już niebieskie kwiaty u transgenicznej torenii (*Torenia fournieri* Lind.) poprzez inaktywację genu reduktazy 4-dihydroflawonolu, co doprowadziło do nagromadzenia się pośrednich metabolitów w postaci flawonoli (Aida i in., 2000 a i b). Od dawna wiadomo bowiem, że o barwie decydują również oprócz samych barwników także inne czynniki, takie jak pH (Jurd i Asen, 1966; Stewart i in., 1975; Hoshino, 1986; Brouillard, 1988; Griesbach, 1992; Dangles i in., 1993), kopigmenty flawonów, flawonoli oraz metali (Yokoi i Saito, 1973; Chen i Hrazdina, 1981; Brouillard, 1988; Takeda i in. 1994; Griesbach, 1992; Aida i in., 2000 a i b). Światło i temperatura, które mogą stymulować biosyntezę antocyjanów również wpływają na barwę roślin (Griesbach, 1992; Kopcewicz i in., 1992; Dangles i in., 1993; Bach i in., 1997; Świdorski, 1998). Obecnie znane są już geny odpowiadające za te czynniki. U petunii (*Petunia hybrida*) na przykład wykryto aż siedem genów odpowiedzialnych za wartość komórkowego pH (geny ph-1 – ph-7), gen kodujący syntazę flawonolu (FI), czy gen regulator światła LRU-1 (Mol i in., 1998). Dzięki tej wiedzy stworzono już żółto kwitnące petunie, u których gen odpowiedzialny za syntezę enzymu

izomerazę chalkonu był niefunkcjonalny (Van der Meer i in., 1992; Mol i in. 1999).

Drugą ważną grupą barwników występujących u roślin są karotenoidy. U chryzantem występują one w kwiatach języczkowatych w postaci 5,8-epoksydów i zwane są również chryzanthemaksantyną lub 5,8 – epoksyluteiną (Blaim, 1967). Karotenoidy są syntetyzowane ze specyficznego prekursora - kwasu mewalonowego, z którego poprzez liczne przemiany pirofosforanów powstaje związek o czterdziestu atomach węgla – fitoen. Ze związku tego powstaje podstawowy czerwony barwnik – likopen, który ulega cyklizacji, w wyniku czego powstają specyficzne pierścienie. Najczęściej u roślin występuje kilka różnych karotenoidów ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ ) tworząc swoistą mieszaninę (Goodwin, 1980).

Z przeprowadzonych badań wynika, że u sześciu mutantów w grupie Lady i dwóch w grupie Wonder pojawiły się karotenoidy, których nie posiadały odmiany wyjściowe – ‘Richmond’ i ‘Lilac Wonder’. W grupie Nero zmiana barwy nie dotyczyła karotenoidów, gdyż u odmiany wyjściowej i jej mutantu zanotowano ten sam poziom absorbancji świadczący o zawartości barwnika. Coraz więcej badań jest prowadzonych w celu poznania genów odpowiedzialnych za biosyntezę tych ważnych barwników roślinnych (Giuliano i in., 1993; Arcari i in., 1994; Bouvier i in., 1994; Nielsen i Bloor, 1997; Bouvier i in., 1998; Fraser i in., 2001). Wyizolowano już wiele enzymów odpowiedzialnych za kolejne etapy biosyntezy karotenoidów, takie jak: syntazę fitoenu (Psy), reduktazę fitoenu (Pds), syntazę kapsantyno-kapsorubiny,  $\beta$  - glukorynidazę, syntazę pirofosforanu geranylogeranylu (Ggps) (Giuliano i in., 1993; Bouvier i in., 1998). Sklonowano też liczne geny odpowiedzialne za biosyntezę tych ważnych barwników, przy czym najczęściej manipulacje genetyczne dotyczą genu syntazy fitoenu, który katalizuje kluczowy etap ich powstawania (Hirschberg, 2001).

Badania dziedziczenia barwy u chryzantem były prowadzone przez Langtona (1980; 1989), Teynora i in. (1989 a i b) oraz przez Hattori (1991; 1992). Langton (1989) sugeruje, że białe i różowo kwitnące odmiany chryzantem, które miały lub nie antocyjany posiadają dominujący gen I – inhibitor biosyntezy karotenoidów. W ten prosty sposób tłumaczy autor genetyczną kontrolę ekspresji barwników karotenoidowych w epidermie

kwiatów języczkowatych u chryzantem. Blokada aktywności genu I, daje możliwość powstania karotenoidów u żółto, pomarańczowo czy brązowo zabarwionych odmian. Hattorii (1991) dodaje, że oprócz kontrolującego biosyntezę karotenoidów genu inhibitora musi istnieć drugi dominujący gen odpowiedzialny za ich biosyntezę. Z tego wynika, że wystarczy zablokować gen inhibitor, aby uzyskać odmiany mające zdolność do biosyntezy karotenoidów. Nie można zatem wykluczyć, że zmiana barwy u powstałych mutantów chryzantem była skutkiem mutacji genu inhibitora, która sprawiła, że u sześciu z dziesięciu powstałych mutantów w grupie Lady pojawiły się karotenoidy nieobecne u odmiany wyjściowej 'Richmond'. Podobne skutki spowodowało promieniowanie jonizujące w grupie Wonder. U dwóch powstałych z odmiany 'Lilac Wonder' mutantów również pojawiły się karotenoidy. Wysoce prawdopodobne jest więc, że odmiany wyjściowe 'Richmond' i 'Lilac Wonder' posiadały geny biosyntezy karotenoidów zablokowane przez gen inhibitor. Można przypuszczać też, że u odmian, u których nastąpiło zmniejszenie zawartości antocyjanów w kwiatach języczkowatych, nastąpiła mutacja w genie odpowiedzialnym za tworzenie któregoś z enzymów biosyntezy antocyjanów.

U wszystkich badanych odmian wystąpiły różne flawony lub flawonole. Według Stich i in. (1997) w kwiatostanach złocenia zbożowego (*Chrysanthemum segetum* L.) występują glikozydy kwercetyny, kempferolu i gossypetyny, zaś Hu i in. (1994) donosi o glikozydach akacetyny, apigeniny, luteoliny i kwercetyny w kwiatach języczkowatych chryzantemy wielkokwiatowej. Sugeruje to, że w wyniku mutacji u badanych mutantów nastąpiły zmiany w genach biosyntezy flawonoidów polegające na inaktywacji któregoś z enzymów na szlaku ich biosyntezy.

Należałoby się zastanowić również nad tym, czy mutacje powstałe w genach odpowiedzialnych za tworzenie barwników były korzystne? Z punktu widzenia człowieka i kwaciarstwa na pewno tak, gdyż powstały tą drogą m. in. odmiany o innych, często atrakcyjniejszych barwach kwiatostanów. Takie nowe odmiany poszerzają ofertę dostępną w handlu i wspaniale komponują się w postaci różnobarwnych bukietów i kompozycji kwiatowych, co w połączeniu z trwałością chryzantem daje różnorodne możliwości ich zastosowań. Z drugiej jednak strony niektóre radiomutanty są biologicznie słabsze od odmian wyjściowych z których powstały.

Powstawanie nowych barw kwiatostanów na drodze mutacji wydaje się być związane z destrukcją materiału genetycznego. Można przypuszczać, że odmiany wyjściowe posiadają zablokowane geny biosyntezy poszczególnych barwników. Geny blokujące tzw. inhibitory, jeśli występują w formie dominującej skutecznie blokują szlaki biosyntezy barwników. Zniszczenie tych genów poprzez zastosowanie np. promieniowania jonizującego, odsłania możliwość powstawania danego barwnika u mutantu.

Dziedziczenie barwy u chryzantem dodatkowo komplikuje fakt, że za barwę odpowiadają dwie warstwy komórek L1 i L2, z których zbudowane są kwiaty języczkowe. Karotenoidy występujące w chromoplastach mogą być obecne w dwóch warstwach, zaś występowanie antocyjanów ograniczone jest tylko do wakuol epidermy (Langton, 1980; Hattori, 1992). Nie można wykluczyć, że w większości chryzantemy są chimerami peryklinalnymi (Hattori, 1991; Malaure i in., 1991; Hattori, 1992; Shibata i in., 1998), co dodatkowo utrudnia zrozumienie mechanizmów przekazywania informacji genetycznej dotyczącej barwy kwiatostanów.

W celu lepszego poznania zmian jakie zaszły w materiale genetycznym wykonano jeszcze dokładniejsze analizy z zastosowaniem metody RAPD, wykorzystującej reakcją PCR.

Badania molekularne DNA przy pomocy markerów RAPD zostały zapoczątkowane przez Williamsa i in. (1990). Od tego czasu metodę tę wykorzystano do badań nad identyfikacją wielu odmian różnych gatunków roślin uprawnych: jabłoni (Koller i in., 1993; Kuras i in., 1997), buraków cukrowych i bananów (Newbury i Ford-Lloyd, 1993), czerwonej porzeczki (Graham i in., 1994), czarnej porzeczki (Lanham i in., 1995; Szafran i in., 1997b), pszenicy (Tyrka i Stefanowska, 1997), łubinu (Wolko i Kruszka, 1997) oraz winogron (Wang i in., 1999).

Markery RAPD wykorzystano także do identyfikacji roślin ozdobnych – chryzantem (Wolff i in., 1995), róż (Matsumoto i Fukui, 1996) oraz alstremerii (Dubouzet i in., 1997; 1998). W badaniach dotyczących chryzantem, autorzy przetestowali dwadzieścia sześć starterów na trzynastu odmianach należących do rodziny „A” i piętnaście starterów na siedmiu odmianach z rodziny „B”. Przy pomocy markerów RAPD rozróżnili oni odmiany chryzantem nie należące do jednej grupy odmianowej przy użyciu dwóch – trzech starterów. Trudności

jednak pojawiły się, gdy badacze chcieli rozróżnić odmiany wywodzące się od jednej odmiany wyjściowej.

Badania własne przeprowadzone na trzech odmianach wyjściowych i ich trzynastu mutantach z grup Lady, Nero i Wonder uzyskanych w wyniku działania promieniowania jonizującego potwierdzają możliwość ich rozróżnienia na poziomie molekularnym. Z dwudziestu przetestowanych starterów osiem dało polimorficzne prążki, świadczące o różnicach w badanych genotypach. Jeden ze starterów RAD-09 pozwolił na pełną identyfikację piętnastu odmian, a tylko dla jednej nie zregenerował żadnego produktu. Pozostałe startery, pogrupowano w zestawy składające się z dwóch – trzech primerów, które umożliwiły pełną identyfikację wszystkich badanych genotypów odmian wyjściowych i ich mutantów. Według Wolffa i Peters – Van Rijn (1993), rodzaj *Dendranthema* wyróżnia się wśród gatunków roślin wysokim poziomem genetycznej różnorodności. Jednak ci sami autorzy dowodzą, że znaleźli tylko jeden polimorfizm dla grupy odmian, pochodzącej od jednej odmiany wyjściowej. Należy przy tym podkreślić, że badane przez autorów odmiany były spontanicznymi mutantami, uzyskanymi wegetatywnie z jednej odmiany wyjściowej. Jest wysoce prawdopodobne, że u odmian uzyskanych w wyniku działania czynników mutagennych jakimi są promienie X i gamma w genomie zachodzą dużo większe zmiany, które łatwiej jest znaleźć przy użyciu markerów RAPD, niż u mutantów powstających samorzutnie. Potwierdzenie tej hipotezy możemy znaleźć w pracy Wolffa (1996), który badał zjawisko spontanicznej mutagenezy u chryzantem przy pomocy markerów RAPD. Okazało się, że spośród dziewięciu odmian uzyskanych z jednej odmiany wyjściowej, dwie powstały w wyniku zastosowania napromienienia jonizującego, pozostałe zaś spontanicznie. Właśnie te dwa – sztucznie indukowane mutanty posiadały polimorficzne prążki, które różniły je od pozostałych. Fakt ten sugeruje, iż w ich genomie zaszły większe zmiany niż u mutantów spontanicznych (sportów). Zmiany te mogły dotyczyć mutacji punktowych w genach, jak i większych aberracji chromosomowych polegających np. na utracie części lub całego chromosomu (Wolff, 1996; Shibata i in., 1998).

Metoda RAPD jest jedną z wielu metod biologii molekularnej wykorzystywaną do identyfikacji odmian tzw. DNA – fingerprinting („odcisk palca” cząsteczki DNA), jest jednak najpowszechniej stosowana. Związane jest



to z jej wieloma zaletami, takimi jak łatwość i szybkość wykonania analizy, potrzebą użycia niewielkich próbek DNA oraz użyciem odczynników nie radioaktywnych (Waugh i Powell, 1992; Wolff i in., 1995). Jest to metoda wygodna, gdyż nie potrzebna jest znajomość sekwencji DNA. Użyte do zapoczątkowania reakcji PCR startery mają sekwencje przypadkowe (random), co biorąc pod uwagę wielkość genomu chryzantem –  $3 \times 10^9$  par zasad, jest sprawą niebagatelną (Wolff i in., 1995). Oprócz licznych zalet, metoda ta ma pewne wady – otóż, aby wyniki były w pełni powtarzalne, konieczne jest wierne zachowanie warunków reakcji PCR, a więc ścisła standaryzacja metody. Ponadto do znalezienia polimorfizmów rozróżniających wszystkie odmiany trzeba przetestować na ogół wiele starterów (Jones i in., 1997).

Wyniki własnych doświadczeń potwierdzają przydatność tej metody do identyfikacji odmian. Przetestowanie dwudziestu starterów okazało się być wystarczającym do wykazania odrębności wszystkich badanych chryzantem. Fakt, że do analiz wystarczą tylko niewielkie próby pochodzące z liści dodatkowo przemawia za szerokim wykorzystaniem tej metody w ogrodnictwie do identyfikowania odmian już na etapie sadzonki lub siewki. Badania takie mogłyby ponadto służyć do rozstrzygnięcia kwestii spornych dotyczących odmian, a także znacznie skrócić prace hodowlane na etapie selekcji roślin.

Oprócz metody RAPD Wolff i in. (1995) sprawdzili także inne techniki z zakresu biologii molekularnej, takie jak – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) oraz krótkie, proste sekwencje mikrosatelitarne (inter-SSR) rozproszone w całym genomie. Wyniki powyższych badań wskazują, że identyfikacja odmian chryzantem może być wykonana każdą z powyższych technik, gdyż uzyskane wyniki są porównywalne. Zastosowanie sekwencji mikrosatelitarnych daje najwyższą liczbę prążków i najniższe prawdopodobieństwo znalezienia identycznego prążka. Wadą tej techniki jest konieczność znajomości sekwencji w genomie w celu zaprojektowania komplementarnych starterów. W analizach za pomocą techniki RFLP konieczne jest natomiast użycie radioaktywnych sond oraz kosztownych membran na które przenosi się DNA. Tych problemów nie stwarza metoda RAPD, której użycie dwóch – trzech starterów daje takie same możliwości rozróżnienia odmian, co jeden starter sekwencji mikrosatelitarnych. Dla szeroko pojętego rolnictwa i ogrodnictwa ta metoda stwarza zupełnie nowe możliwości

rozdzielania odmian roślin już w stadium sadzonki lub siewki. Jest to szczególnie przydatne, gdyż rośliny w tym stadium są do siebie morfologicznie i anatomicznie bardzo podobne. Technika RAPD powinna także znacznie skrócić prace hodowlane na etapie selekcji, gdyż nie potrzebny jest tu czas, często wielomiesięczny, dla oceny i klasyfikacji roślin. Może ona dostarczyć także cennych informacji dla ochrony praw hodowcy – przy rozstrzygnięciu kwestii spornych dotyczących odmian.

Fakt, że do analizy DNA pobiera się najczęściej liście stwarza też pewne komplikacje. Liście składają się ze wszystkich trzech warstw – L1, L2 i L3. Zmiany barwy w grupie odmian wywodzących się od jednej odmiany wyjściowej mogą być efektem zmiany tylko w jednej lub dwóch najbardziej zewnętrznych warstwach, tak więc mogą zostać niezauważone jeśli DNA będzie pochodzić z liści (Wolff, 1996). Badania własne wyraźnie zaprzeczają jednak tym poglądom. Analizowane mutanty, należące do grup Lady, Nero i Wonder powstały właśnie dzięki napromienieniu eksplantatów niemerystematycznych i regeneracji roślin metodą pędów przybyszowych. Stewart i Dermen (1970) oraz Broertjes i in. (1976) uważają, że rozwijające się pędy przybyszowe powstają na ogół tylko z jednej komórki eksplantatu, która intensywnie zaczyna się dzielić i tworzy nowe centrum merystematyczne dające początek nowemu pędowi. Jest więc prawdopodobne, że powstałe tą drogą mutanty nie są chimerami a organizmami homohistonowymi, składającymi się z jednego rodzaju tkanek. Udowodnienie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań nad separacją ewentualnych chimer z zastosowaniem techniki *in vitro*.

W przyszłości, przy użyciu markerów molekularnych, być może zostanie skonstruowana mapa genetyczna chryzantem z lokalizacją ważniejszych genów, jak choćby barwa kwiatów czy odporność na choroby. Obecnie taka mapa powstaje dla róż (Rajapakse i Byrne, 2001), co umożliwi przyszłym hodowcom na bardziej precyzyjne manipulacje genomem tych ważnych z punktu widzenia światowej produkcji ogrodniczej kwiatów.

## 6. *Wnioski*

I. Analiza kariotypów wykazała, że określenie liczby chromosomów jest niewystarczające do identyfikacji odmian chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) i wykazania ich odrębności na poziomie komórkowym.

1. Tylko u jednego z badanych mutantów w grupie Wonder nastąpiło zwiększenie zespołu chromosomowego o 9, natomiast u pozostałych nie zaobserwowano zmian w liczbie chromosomów w stosunku do odmian wyjściowych.

II. Rezultaty badań spektrofotometrycznych ekstraktów barwników z kwiatów języczkowatych wskazały, iż mogą one służyć do obiektywnego określenia barwy kwiatostanów oraz identyfikacji odmian i wykazania ich odrębności.

1. Każda z odmian wyjściowych i uzyskanych mutantów miała swój stały, charakterystyczny i powtarzalny profil występowania określonych barwników.
2. Na podstawie zmian w jakości i ilości barwników stwierdzono, iż u mutantów nastąpiły wyraźne zmiany w stosunku do odmian wyjściowych.
  - a) W grupie Lady u sześciu mutantów pojawiły się karotenoidy. U sześciu zanikły antocyjany, a u czterech zmniejszyła się ich ilość. U sześciu innych mutantów oraz u odmiany wyjściowej wystąpiły flawonole, a u czterech mutantów zamiast flawonoli pojawiły się flawony.
  - b) W grupie Nero nie wystąpiły zmiany w zawartości karotenoidów. U mutantów zmniejszyła się zawartość antocyjanów, a miejsce flawonów zajęły flawonole.
  - c) W grupie Wonder u obu mutantów pojawiły się karotenoidy. U jednego z nich zmniejszyła się zawartość antocyjanów, zaś u drugiego zwiększyła. U wszystkich odmian z tej grupy wystąpiły flawonole.

III. Analiza genomu metodą RAPD-PCR potwierdziła możliwość wykorzystania jej do identyfikacji odmian i wykazania ich tożsamości już we wczesnych etapach rozwoju wegetatywnego.

1. Jeden starter lub zestawy dwóch – trzech starterów dawały dla każdej odmiany wyjściowej i jej mutantów specyficzny, stały i powtarzalny układ prążków DNA-fingerprinting.
2. Analiza DNA wykazała, że u mutantów nastąpiły zmiany w genach w stosunku do odmian wyjściowych.

## *7. Spis literatury*

1. **Aida R., Kishimoto S., Tanaka Y., Shibata M., 2000 a.** Modyfication of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Science* 153: 33-42.
2. **Aida R., Yoshida K., Kondo T., Kishimoto S., Shibata M., 2000 b.** Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Science* 160: 49-56.
3. **Andersen O. M., Viksund R. I., Pedersen A. T., 1995.** Malvidin 3-(6-acetylglucoside)-5-glucoside and other anthocyanins from flowers of *Geranium sylvaticum*. *Phytochemistry* 38 (6): 1513-1517.
4. **Arcari B., Bartley G., E., Scolnik P. A., Giuliano G., 1994.** Sequence of the phytoene desaturase locus of tomato. *Plant Physiol.* 106: 789.
5. **Asen S., 1984.** High pressure liquid chromatographic analysis of flavonoid chemical markers in petals from gerbera flowers as an adjunct for cultivar and germplasm identification. *Phytochemistry* 23 (11): 2523-2526.
6. **Bach A., Włodarczyk Z., Świdorski A., 1997.** Wpływ rodzaju światła na wzrost i rozwój tulipanów pędzonych w szklarniach. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 449: 23-30.
7. **Banerji B. K., Datta S. K., 1992.** Gamma ray induced flower shape mutation in *Chrysanthemum* cv 'Jaya'. *Nuclear Agric. Biol.* 21(2): 73-75.
8. **Barański R., Grzebelus D., 1999.** Badanie zmienności genetycznej w kolekcji buraka ćwikłowego metodą RAPD. *Materiały z Konferencji: „Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin”, Skierniewice: 17.*
9. **Biolley J. P., Jay M., Forkmann G., 1994.** Pigmentation patterns of modern rose mutans throw light on the flavonoid pathway in *Rosa x hybrida*. *Phytochemistry* 36 (5): 1189-1196.
10. **Blaim K., 1967.** Barwniki roślinne. PWRiL, Warszawa.
11. **Bloor S. J., 1998.** A macrocyclic anthocyanin from red\mauve cornation flowers. *Phytochemistry* 49 (1): 225-228.
12. **Bouvier F., Hugueney P., d'Harlingue A., Kuntz M., Camara B., 1994.** Xantophyll biosynthesis in chromoplast: Izolation and molecular cloning of an enzyme catalysing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6 (1): 45-54.

13. **Bouvier F., Backhaus R. A., Camara B., 1998.** Induction and control of chromoplast – specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 237 (46): 30651-30659.
14. **Brandt K., Kondo T., Aoki H., Goto T., 1993.** Structure and biosynthesis of anthocyanins in flowers of *Campanula*. *Phytochemistry* 33 (1): 209-212.
15. **Broda B., 1971.** Metody histochemii roślinnej. PWRiL, Warszawa.
16. **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.
17. **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.
18. **Broertjes C., Van Harten A. M., 1985.** Single cell origin of adventitious buds. *Euphytica* 34: 93-95.
19. **Brouillard R., 1988.** Flavonoids and flower colour. Harborne J. B., 1988. The flavonoids. Chapman and Hall, London.
20. **Bushuk W., Zillman R. R., 1978.** Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Canadian Journal of Plant Science* 58: 505-515.
21. **Cadic A., Widehem C., 2001.** Breeding goals for new ornamentals. *Acta Hort.* 552: 75-85.
22. **Caetano-Anolles G., Bassam B. J., Gresshoff P. M., 1991.** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9: 553-557.
23. **Caetano-Anolles G., 1996.** Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: New developments and applications. *Nature Biotechnology* 14: 1668-1673.
24. **Chan A. P., 1966.** Chrysanthemum and rose mutations induced by X rays. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 88: 613-620.
25. **Chen L. J., Hrazdina G., 1981.** Structural aspects of anthocyanin flavonoid complex formation and its role plant color. *Phytochemistry* 20: 297-303.

26. **Chriki A., Harborne J. B., 1983.** Anthocyanins of *Hedysarum coronarium* and their contribution to flower colour variation. *Phytochemistry* 22 (10): 2322-2323.
27. **Dangles O., Saito N., Brouillard R., 1993.** Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry* 34: 119-124.
28. **Darlington C. D., Wylie A. P., 1955.** Chromosome Atlas of Flowering Plants.
29. **Darlington C. D., 1957.** Chromosomen Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
30. **Datta K., Datta S. K., 1998.** Palynological interpretation of gamma ray and colchicine induced mutation in chrysanthemum cultivars. *Israel Journal of Plant Sciences* 46: 199-207.
31. **Datta S. K., 1998.** Chrysanthemum germplasm at NBRI, lucknow and search for novel genes. *Applied Botany Abstracts* 18 (1): 45-72.
32. **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.
33. **Datta S. K., Gupta M. N., 1981.** Cytomorphological, palynological and biochemical studies on control and gamma-induced mutants of chrysanthemum cultivar E-13. *Sabrao Journal* 13 (2): 136-148.
34. **Datta S. K., Gupta M. N., 1983.** Thin layer chromatographic and spectrophotometric analysis of flower color mutations in roses. *American Rose Annual* : 102-106.
35. **De Schepper S., Debergh P., Van Bocktaele E., De Loose M., 2001.** Molecular characterisation of flower colour genes in azalea sports (*Rhododendron simsii* Hybrids). *Acta Hort.* 552: 143-150.
36. **Dowrick G. J., 1953.** The chromosomes of *Chrysanthemum*, I: The species. *Heredity* 7: 365-375.
37. **Drewlow L. W., Ascher P.D., Widmer R. E., 1973.** Genetic Studies of Self Incompatibility in the Garden Chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Theoretical and Applied Genetics* 43: 1-5.
38. **Dubouzet J. G., Murata N., Shinoda K., 1997.** RAPD analysis of genetic relationships among *Alstroemeria* L. cultivars. *Scientia Hort.* 68: 181-189.



- 39. Dubouzet J. G., Murata N., Shinoda K., 1998.** Relationships among some cultivated species and varieties of *Alstroemeria* L. based on RAPD analysis. *Scientia Hort.* 73: 37-44.
- 40. Fossen T., Larsen A., Andersen O. M., 1998.** Anthocyanins from flowers and leaves of *nymphaea x marliacea* cultivars. *Phytochemistry* 48 (5): 823-827.
- 41. Fraser P. D., Bramley P., Seymour G. B., 2001.** Effect of the *Cnr* mutation on carotenoid formation during tomato fruit ripening. *Phytochemistry* 58: 75-79.
- 42. Fukui Y., Kasumi T., Yoshida K., Kondo T., Matsuda C., Nomoto K., 1998.** Structures of two diacylated anthocyanins from *Petunia hybrida* cv. *Surfinia violet mini*. *Phytochemistry* 47 (7): 1409-1416.
- 43. Fuleki T., Francis F. J., 1968.** Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. *Journal of Food Science* 33: 78-83.
- 44. Gerlach D., 1972.** *Zarys mikrotechniki botanicznej*. PWRiL, Warszawa.
- 45. Giuliano G., Bartley G. E., Scolnik P. A., 1993.** Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* 5:379-387.
- 46. Golembiewski R. C., Danneberger T. K., Sweeney P. M., 1997.** RAPD Analysis of Creeping Bent Seed and Leaf Tissue. *Seed Biology* 8: 291-296.
- 47. Goodwin T.W., 1980.** Nature and distribution of carotenoids. *Food Chemistry* 5: 3-13.
- 48. Graham J., McNicol R. J., Greig K., Van de Ven W. T. G., 1994.** Identification of red raspberry cultivars and an assessment of their relatedness using fingerprints produced by random primers. *Journal of Horticultural Science* 69 (1): 123-130.
- 49. Griesbach R. J., 1992.** Correlation of pH and light intensity on flower color in potted *Eustoma grandiflorum* Grise. *Hort. Science* 27 (7): 817-818.
- 50. Griesbach R. J., 1998.** Flavonoids in *Saintpaulia ionantha* expressing the fantasy mutation. *Phytochemistry* 48 (5): 829-830.
- 51. Grodzicker T., Williams J., Sharp P., Sambrook J., 1974.** Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 439-446.
- 52. Grzebelus. D., 1996.** Markery DNA. Rozdz. 6, w pracy zbiorowej pod red. B. Michalik "Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin", Drukrol, Kraków.

- 53. Grzebelus. D., Barański R., Jagosz B., 1999.** Ocena zróżnicowania genetycznego metodą RAPD i AFLP w materiałach hodowlanych marchwi. Materiały z Konferencji: „Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin”, Skierniewice: 15-16.
- 54. Guzy J., Szarejko I., Balcerzyk A., 1997.** Segregacja markerów RAPD w populacji podwojonych haploidów pszenicy, uzyskanych w krzyżówkach z kukurydzą. Materiały z I Krajowej Konferencji: „Hodowla Roślin”, Poznań: 403-407.
- 55. Harborne J. B., 1967.** Comparative Biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London.
- 56. Harborne J. B., 1986.** The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids. *Phytochemistry* 25(8): 1887-1894.
- 57. Harborne J. B., 1988.** The flavonoids. Chapman and Hall, London.
- 58. Harborne J. B., 1997.** Ekologia biochemiczna. PWN, Warszawa.
- 59. Hattori K., 1991.** Inheritance of carotenoid pigmentation in flower color of *Chrysanthemum*. *Japan. J. Breed.* 41: 1-9.
- 60. Hattori K., 1992.** Inheritance of anthocyanin pigmentation in flower color of *Chrysanthemum*. *Jpn. J. Genet.* 67: 253-258.
- 61. Hirschberg J., 2001.** Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210-218.
- 62. Hoelzel A. R., Green A., 1998.** PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting, Chapter 6, in edited by A. R. Hoelzel: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. Series Edytor: B. D. Hames.
- 63. Holton T. A., Cornish E. C., 1995.** Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.
- 64. Hoshino T., 1986.** Circular dichroic measurements on anthocyanins in intact flower petals. *Phytochemistry* 25 (4): 829-832.
- 65. Hu C. Q., Chen K., Shi Q., 1994.** Anti-aids agents, Acacetin-7-O- $\beta$ -D-galactopyranoside, an anti-hiv principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure – activity corellation with some related flavonoids. *Journal of Natural Products* 57 (1): 42-51.

- 66. Huang K. L., Miyajima I., Okubo H., Shen T. M., Huang T. S., 2001.** Flower colours and pigments in hybrid tuberose (*Polianthes*). *Scientia Hort.* 88 (3): 235-241.
- 67. 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.
- 68. Jerzy M., 2000.** Chryzantemy odmiany i uprawa. PWRiL, Warszawa.
- 69. Jerzy M., Lubomski M., 1991a.** Tworzenie się pędów przybyszowych na izolowanych *in vitro* liściach chryzantem poddanych działaniu promieniowania jonizującego. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 2: 26-30.
- 70. Jerzy M., Lubomski M., 1991b.** Adventitious shoot formation on *ex vitro* derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. *Scientia Hort.* 47: 115-124.
- 71. Jerzy M., Lubomski M., 1992.** *In vitro* adventitious bud techniques for mutation breeding of *Gerbera jamesonii*. *Acta Hort.* 314: 269-274.
- 72. 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.
- 73. Jerzy M., Zalewska M., Garczewska A. 1994.** Indukowanie mutacji i separacja chimer *in vitro* u gerbery Jamesona. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 414: 343-352.
- 74. 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.
- 75. Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., Van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmiroli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A., 1997.** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
- 76. Jordan Ch., Reimann-Philipp R., 1979.** Chrysanthenen, Grundlage der Zuchtung. *Gb – Gw* 79 (26): 612.

- 77. Jurd L., Asen S., 1966.** The formation of metal and „co-pigment” complexes of cyanidin 3-glukoside. *Phytochemistry* 5: 1263-1271.
- 78. Kawase K., Tsukamoto Y., Saito N., Osawa Y., 1970.** Studies on flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. I. Anthocyanins. *Plant and Cell Physiology* 11: 349-353.
- 79. Kawase K., Tsukamoto Y., 1974.** Studies on flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. II. Absorption spectra of intact flowers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 43 (2): 165-173.
- 80. Kawase K., Tsukamoto Y., 1976.** Studies on flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. III. Quantitative effects of major pigments on flower color variation, and measurement of color qualities of petals with a color difference meter. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 45 (1): 65-75.
- 81. Kevan P., Giurfa M., Chittka L., 1996.** Why are there so many and so few white flowers? *Trends in Plant Science* 1(8): 280-284.
- 82. Klyne A. M., Plummer J. A., Growns D. J., Spadek Z., Best W., Hall D., 2001.** Pigments in geraldton wax (*Chamelaucium uncinatum* Schauer) varieties. *Acta Hort.* 552: 87-93.
- 83. Kobayashi S., Ishimaru M., Ding C. K., Yakushiji H. Goto N., 2001.** Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Science* 160: 543-550.
- 84. Koller B., Lehmann A., McDermott J. M., Gessler C., 1993.** Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901-904.
- 85. Kopcewicz J., Tretyn A., Cymerski M., 1992.** Fitochrom i morfogeneza roślin. PWN, Warszawa.
- 86. Kull D., Pfander H., 1995.** Isolation and Identification of Carotenoids from the Petals of Rape (*Brassica napus*). *J. Agric. Food Chem.* 43: 2854-2857.
- 87. Kuras A., Szafran E., Wróblewski T., Żurawicz E., 1997.** Wyniki wstępnych prac nad identyfikacją odmian i klonów jabłoni techniką RAPD. Materiały z I Krajowej Konferencji: „Hodowla Roślin”, Poznań: 439-443.
- 88. Langton F.A., 1980.** Chimerical structure and carotenoid inheritance in *Chrysanthemum morifolium* (Ramat.). *Euphytica*, 29: 807-812.

- 89. Langton F.A., 1989.** Inheritance in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Heredity 62: 419-423.
- 90. Lanham P. G., Brennan R. M., Hackett C., McNicol R. J., 1995.** RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. Theor. Appl. Genet. 90: 166-172.
- 91. Lin M., Shi Z., Francis F. J., 1992.** A simple method of analysis for *Tradescantia* anthocyanins. J. Food Sci. 57: 766-767.
- 92. Lu M. Z., Szmidt A. E., Wang X. R., 1995.** Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). Heredity 74: 582-589.
- 93. Lu T. S., Saito N., Yokoi M., Shigihara A., Honda T., 1992a.** Acylated pelargonidin glycosides in the red-purple flowers of *Pharbitis nil*. Phytochemistry 31(1): 289-295.
- 94. Lu T. S., Saito N., Yokoi M., Shigihara A., Honda T., 1992b.** Acylated peonidin glycosides in the violet-blue cultivars of *Pharbitis nil*. Phytochemistry 31(2): 659-663.
- 95. Malaure R. S., Barclay G., Power J. B., Davey M. R., 1991.** The production of novel plants from florets of *Chrysanthemum morifolium* using tissue culture. 2. Securing natural mutation (sports). J. Plant Physiol. 139: 14-18.
- 96. Małuszyńska J., 2001.** Cytogenetyczne badania struktury genomów poliploidalnych. Biotechnologia 1 (52): 35-41.
- 97. Martens S., Forkmann G., 2001.** Genetic, biochemical and molecular biological studies of flavone formation in *Gerbera* hybrids. Acta Hort. 552: 129-135.
- 98. Martens S., Forkmann G., Matern U., Lukacin R., 2001.** Cloning of parsley flavone synthase I. Phytochemistry 58 (1): 43-46.
- 99. Matławska I., 1992.** Flawonoidy w kwiatach *Althaea rosea* Cav. var. *nigra* (*Malvaceae*). Herba Polonica 38 (4): 163-171.
- 100. Matławska I., Sikorska M., Henzel-Malak K., Kowalewski Z., 1992.** Związki flawonoidowe w kwiatostanach *Trifolium arvense* L. (*Leguminosae*). Herba Polonica 38 (4): 155-161.
- 101. Matsumoto S., Fukui H., 1996.** Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. Scientia Hort. 67: 49-54.

102. Mitchell K. A., Markham K. R., Boase M. R., 1998. Pigment chemistry and colour of *Pelargonium* flowers. *Phytochemistry* 47 (3): 355-361.
103. Mol J., Grotewold E., Koes R., 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3 (6): 212-217.
104. Mol J., Cornish E., Mason J., Koes R., 1999. Novel coloured flowers. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 198-201.
105. Morgante M., Olivieri A. M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3 (1): 175-182.
106. Mullis K. B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*: 56-65.
107. Nakayama M., Koshioka M., Shibata M., Hiradate S., Sugie H., Yamaguchi M., 1997. Identification of cyanidin 3-O-(3",6"-O-dimalonyl- $\beta$ -glucopyranoside) as a flower pigment of chrysanthemum (*Denranthema grandiflorum*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (9): 1607-1608.
108. Nazeer M. A., Khoshoo T. N., 1983. Variation in the chromosome complement of *Chrysanthemum morifolium* complex. *The Nucleus* 26 (1): 22-29.
109. Nei M., Li W. H., 1979. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
110. Newbury H. J., Ford-Lloyd B. V., 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation* 12: 43-51.
111. Nielsen K. M., Bloor S. J., 1997. Analysis and developmental profile of carotenoid pigments in petals of three yellow petunia cultivars. *Scientia Hort.* 71: 257-266.
112. Noguchi J., Fukui K., 1995. Chromatin Arrangements in Intact Interphase Nuclei Examined by Laser Confocal Microscopy. *Journal of Plant Research* 108: 209-216.
113. Norbak R., Kondo T., 1998. Anthocyanins from flowers of *Crocus* (*Iridaceae*). *Phytochemistry* 47 (5): 861-864.
114. Norimoto S., Tomoyoshi A., Toshio A., Shinichi A., 2000. Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis. *Plant Science* 160 (1): 37-47.

- 115. Onozaki T., Mato M., Shibata M., Ikeda H., 1999.** Differences in flower color and pigment composition among white carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. *Scientia Hortic.* 82: 103-111.
- 116. Oren-Shamir M., Shaked-Sachray L., Nissim-Levi A., Ecker R., 1999.** Anthocyanin pigmentation of lisianthus flower petals. *Plant Science* 140: 81-86.
- 117. Pale E., Nacro M., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R., Ottinger R., 1998.** Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomoea asarifolia*. *Phytochemistry* 48 (8): 1433-1437.
- 118. Primrose S. B., 1999.** Zasady analizy genomu. Przewodnik do mapowania i sekwencjonowania DNA różnych organizmów. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- 119. Rajapakse S., Byrne D., 2001.** Gene map speeds selection of commercial traits. *Flower Tech.* 4: 24-26.
- 120. R.H.S. Colour Chart, 1966.** The Royal Horticultural Society, London.
- 121. Ronald W. G., Ascher P. D., 1975.** Self Compatibility in Garden Chrysanthemum: Occurrence, Inheritance and Breeding Potential. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 45-54.
- 122. Rosati C., Cadic A., Duron M., Ingouff M., Simoneau P., 1999.** Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia x intermedia* reveals organ-specific expression during flower development. *Plant Science* 149: 73-79.
- 123. Sadoch Z., Goc A., Wierzchosławski R., Pańczyk T., 2000.** Analiza zróżnicowania genetycznego linii męskosterylnych i zapylaczy buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) metodą RAPD. IX Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin pt. „Modyfikowanie genomu roślin”, Gdańsk-Sobieszewo: 57.
- 124. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A., 1988.** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491.
- 125. Saito N., 1967.** Light absorption of anthocyanin – containing tissue of fresh flowers by the use of the opal glass transmission method. *Phytochemistry* 6: 1013-1018.
- 126. Saito N., Harborne J. B., 1983.** A cyanidin glycoside giving scarlet coloration in plants of the *Bromeliaceae*. *Phytochemistry* 22 (8): 1735-1740.

- 127. Saito N., Toki K., Honda T., Kawase K., 1988.** Cyanidin 3-malonylglucuronide in *Bellis* and cyanidin 3-malonylglucoside in *Dendranthema*. *Phytochemistry* 27 (9): 2963-2966.
- 128. Saito N., Toki K., Uesato K., Shigihara A., Honda T., 1994.** An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*. *Phytochemistry* 37 (1): 245-248.
- 129. Saito N., Tatsuzawa F., Yoda K., Yokoi M., Kasahara K., Iida S., Shigihara A., Honda T., 1995 a.** Acylated cyanidin glycosides in the violet-blue flowers of *Ipomoea purpurea*. *Phytochemistry* 40 (4): 1283-1289.
- 130. Saito N., Toki K., Kuwano H., Moriyama H., Shigihara A., Honda T., 1995 b.** Acylated cyanidin 3-rutinoside-5,3-diglucoside from the purple-red flower of *Lobelia erinus*. *Phytochemistry* 39 (2): 423-426.
- 131. Schwinn K. E., Markham K., Given N. K., 1994.** Floral flavonoids and potential for pelargonidin biosynthesis in commercial *Chrysanthemum* cultivars. *Phytochemistry* 35 (1): 145-150.
- 132. Selinger D. A., Chandler V.L., 1999.** A mutation in the *pale aleurone color 1* gene identifies a novel regulator of the maize anthocyanin pathway. *The Plant Cell* 11: 5-14.
- 133. Shibata K., 1958.** Spectrophotometry of intact biological materials. *The Journal of Biochemistry* 45 (8): 599-623.
- 134. 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.
- 135. Singh A., Chaudhury A., Srivastava P. S., Lakshmikumaran M., 2002.** Comparison of AFLP and SAMPL markers for assessment of intra-population genetic variation in *Azadirachta indica* A. Juss. *Plant Science* 162: 17-25.
- 136. Solecka M., 1987.** Zastosowanie chromatografii i spektrofotometrii do oceny barwy kwiatów i pokrewieństwa roślin ozdobnych. *Rozprawy Naukowe i Monografie*. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa.
- 137. Stace C. A., 1993.** Taksonomia roślin i biosystematyka. PWN, Warszawa.
- 138. Staniszek M., Habdas H., Marczewski W., Kozik E., 2000.** Identyfikacja markerów RAPD genu *I-2* warunkującego odporność pomidora na *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. IX Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin: „Modyfikowanie genomu roślin”, Gdańsk-Sobieszewo: 59.



- 139. Stepczyńska K., Jerzy M., Widacka M., 1980.** Mutagenesis in *Chrysanthemum* cv. Bravo propagated from the X-ray influenced leaf cuttings. Part I. MV<sub>1</sub> generation. Pr. Inst. Sad. i Kwiac., Seria B 5: 17-30.
- 140. Stewart R. N., Dermen H., 1970.** Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in chrysanthemum by experimental production of adventitious shoots. Amer. J. Bot. 57 (9): 1061-1071.
- 141. Stewart R. N., Norris K.H., Asen S., 1975.** Microspectrophotometric measurement of pH and pH effect on color of petal epidermal cells. Phytochemistry 14: 937-942.
- 142. Stich K., Halbwirth H., Wurst F., Forkmann G., 1997.** UDP-glucose: flavonol 7-O-glucosyltransferase activity in flower extracts of *Chrysanthemum segetum*. Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung 52 c: 153-158.
- 143. Sulyok G., Laszlo-Bencsik A., 1985.** Cyanidin 3-(6-succinyl glucoside)-5-glucoside from flowers of seven *Centaurea* species. Phytochemistry 24 (5): 1121-1122.
- 144. Szafran E., Kuras A., Doruchowski R. W., 1997 a.** Próby znalezienia markerów genetycznych odporności na mączniaka rzekomego u ogórka techniką RAPD. Materiały z I Krajowej Konferencji: „Hodowla Roślin”, Poznań: 463-466.
- 145. Szafran E., Kuras A., Wróblewski T., Pluta S., Żurawicz E., 1997 b.** Badanie polimorfizmu odmian porzeczki czarnej (*Ribes nigrum* L.) techniką RAPD. Materiały z I Krajowej Konferencji: „Hodowla Roślin”, Poznań: 445-448.
- 146. Szklarczyk M., 1999.** Analiza molekularna cechy męskiej sterylności u marchwi. Materiały z Konferencji: „Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin”, Skierniewice: 18-19.
- 147. Szurpicki H., 2000.** Ochrona wyłącznego prawa do odmian. Ogrodnictwo 1: 3-6
- 148. Śliwa H., Malinowski T., Kamińska M., 2001.** PCR detection of phytoplasma in roses showing symptoms of leaf curl disease in Poland. Folia Hortic. 13/ 1a: 161-167.
- 149. Świdorski A., 1998.** Oznaczanie barwników w materiale roślinnym za pomocą tradycyjnych i zmodyfikowanych metod. Rozprawa doktorska, AR im. H. Kołłątaja, Kraków.

- 150. Takeda K., Harborne J. B., Self R., 1986a.** Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the *Compositae*. *Phytochemistry* 25 (6): 1337-1342.
- 151. Takeda K., Harborne J. B., Self R., 1986b.** Identification of malonated anthocyanins in the *Liliaceae* and *Labiatae*. *Phytochemistry* 25 (9): 2191-2192.
- 152. Takeda K., Yanagisawa M., Kifune T., Kinoshita T. i Timberlake C., F. 1994.** A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. *Phytochemistry* 35 (5): 1167–1169.
- 153. Terahara N., Saito N., Toki K., Sakata Y., Honda T., 1992.** Cyanidin 3-lathyroside from Berries of *Fatsia japonica*. *Phytochemistry* 31 (4): 1446-1448.
- 154. Terahara N., Yamaguchi M. A., Takeda K., Harborne J. B., Self R., 1986.** Anthocyanins acylated with malic acid in *Dianthus caryophyllus* and *D. deltoides*. *Phytochemistry* 25 (7): 1715-1717.
- 155. Teynor T. M., Ascher P. D., Widmer R. E., Luby J. J., 1989 a.** Inheritance of flower color in *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) using cultivars and inbreds. I. Plastid pigmentation. *Euphytica* 42: 199-207.
- 156. Teynor T. M., Ascher P. D., Widmer R. E., Luby J. J., 1989 b.** Inheritance of flower color in *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) using cultivars and inbreds. II. Vacuole pigmentation. *Euphytica* 42: 297-305.
- 157. Timberlake C. F., 1980.** Anthocyanins – occurrence, extraction and chemistry. *Food Chemistry* 5: 69-80.
- 158. Toki K., Yamamoto T., Terahara N., Saito N., Honda T., Inoue H., Mizutani H., 1991.** Pelargonidin 3-acetylglucoside in *Verbena* flowers. *Phytochemistry* 30 (11): 3828-3829.
- 159. Toki K., Saito N., Kuwano H., Shigihara A., Honda T., 1995.** Acylated pelargonidin 3,7-glycosides from pink flowers of *Senecio cruentus*. *Phytochemistry* 38 (6): 1509-1512.
- 160. Toki K., Saito N., Honda T., 1998.** Acylated anthocyanins from blue-purple flowers of *Triteleia bridgesii*. *Phytochemistry* 48 (4): 729-732.
- 161. Tyrka M., Stefanowska G., 1997.** Zastosowanie metody RAPD do badania genomu mieszańców *Triticum* i *Aegilops*. Materiały z I Krajowej Konferencji: „Hodowla Roślin”, Poznań: 457-462.

- 162. Van der Meer I., Stam M., van Tunen A., Mol J., Stuitje A., 1992.** Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *The Plant Cell* 4: 253-262.
- 163. Wang Y., Chen J., Lu J., Lamikanra O., 1999.** Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vitis* species and Florida bunch grapes. *Scientia Hort.* 82: 85-94.
- 164. Watanabe K., 1977.** The control of diploid-like meiosis in polyploid taxa of *Chrysanthemum* (*Compositae*). *Japan. J. Genetics* 52 (2): 125-131.
- 165. Watanabe K., 1983.** Studies on the control of diploid-like meiosis in polyploid taxa of *Chrysanthemum*. *Theoretical and Applied Genetics* 66: 9-14.
- 166. Waugh R., Powell W., 1992.** Using RAPD markers for crop improvement. *Focus* 10: 186-192.
- 167. Wcisło-Lauraniec E., 1985.** Zastosowanie metody chemotaksonomicznej w paleobotanice. *Wiadomości Botaniczne* 29 (1): 25-28.
- 168. Welsh J., McClelland M., 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24): 7213-7218.
- 169. Wettstein D., 1957.** Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Exp. Cell Res.* 12: 427-487.
- 170. Williams C., Harborne J., Mayo S. J., 1981.** Anthocyanin pigments and leaf flavonoids in the family *Araceae*. *Phytochemistry* (20): 217-234.
- 171. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 (22): 6531-6535.
- 172. Wolff K., Peters-Van Rijn J., 1993.** Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71: 335-341.
- 173. Wolff K., Schoen E. D., Peters-Van Rijn J., 1993.** Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1033-1037.
- 174. Wolff K., Peters-Van Rijn J., Hofstra H., 1994.** RFLP analysis in chrysanthemum. I. Probe and primer development. *Theor. Appl. Genet.* 88: 472-478.

- 175. Wolff K., Zietkiewicz E., Hofstra H., 1995.** Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91: 439-447.
- 176. Wolff K., 1996.** RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. *Euphytica* 89: 159-164.
- 177. Wolko B., Kruszka K., 1997.** Identyfikacja odmian uprawnych łubinów przy pomocy markerów DNA. *Materiały z I Krajowej Konferencji: „Hodowla Roślin”* Poznań: 427-432.
- 178. Wolverson B. C., 1996.** *Rośliny przyjazne dla domu*, Koroprint-Elew, Warszawa.
- 179. Yabuya T., Yamaguchi M., Fukui Y., Katoh K., Imayama T., Ino I., 2001.** Characterization of anthocyanin *p*-coumaroyltransferase in flowers of *Iris ensata*. *Plant Science* 160: 499-503.
- 180. Yokoi M., Saito N., 1973.** Light absorption patterns of intact Rosa flowers in relation to the flower colour. *Phytochemistry* 12: 1783-1786.
- 181. Zaccai M., Lewinsohn E., Pichersky E., 2001.** Modifying *Lisianthus* traits by genetic engineering. *Acta Hort.* 552: 137-141.
- 182. Zalewska M., 1995.** Somatyczna mutageneza u chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) indukowana in vivo oraz in vitro promieniowaniem X i gamma. *Wydawnictwo Uczelniane ATR w Bydgoszczy, Rozprawy* 63: 5.
- 183. Zgirski A., Gondko R., 1998.** Analityczne metody instrumentalne. Rozdz. 12., w pracy zbiorowej: „Obliczenia biochemiczne”, PWN, Warszawa.

## *8. Streszczenie*

Badano trzy odmiany wyjściowe (macierzyste) chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) oraz ich trzynaście mutantów (odmian pochodnych) należących do grup: Lady, Nero i Wonder.

Celem niniejszej pracy było poznanie zmian jakie zaszły na skutek działania promieniowania jonizującego u mutantów z grup Lady, Nero i Wonder w stosunku do odmian wyjściowych. Badano czy i jakie zmiany zaszły w liczbie chromosomów na poziomie komórkowym. Analizowano również wtórne metabolity – barwniki roślinne występujące w kwiatach języczkowatych oraz DNA przy pomocy nowoczesnej metody z zakresu biologii molekularnej. Powyższe analizy odmian wyjściowych oraz ich mutantów miały ponadto na celu prześledzenie kierunku zmian mutacyjnych. Zadaniem badań było także wykazanie odrębności analizowanych mutantów i ich odmian wyjściowych oraz ich obiektywna identyfikacja.

Analiza kariotypów badanych roślin wykazała, że u wszystkich mutantów, poza jednym nie wystąpiły zmiany w liczbie chromosomów.

Wyniki badań spektrofotometrycznych ekstraktów barwników z kwiatów języczkowatych chryzantem dowiodły, że każda z odmian wyjściowych i uzyskanych mutantów miała swój stały, charakterystyczny i powtarzalny profil występowania określonych barwników. Na podstawie zmian w jakości i ilości barwników stwierdzono, iż u mutantów nastąpiły wyraźne zmiany w stosunku do odmian wyjściowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących analizy genomu różnych odmian chryzantem metodą RAPD-PCR stwierdzono, że pojedynczy starter lub zestawy dwóch – trzech starterów dawały dla każdej odmiany wyjściowej i jej mutantów specyficzny, stały i powtarzalny układ prążków DNA-fingerprinting, który umożliwił potwierdzenie ich tożsamości. Startery te odróżniały między sobą badane genotypy chryzantem, co potwierdza możliwość wykorzystania ich do identyfikacji badanych odmian i wykazania ich odrębności.

**Biblioteka Główna ATR  
w Bydgoszczy**

D211