



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

ROZPRAWA DOKTORSKA
mgr inż. Piotr Licznerski

**WPŁYW PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA BARWĘ
SIEWEK ORAZ ZMIANY BIOCHEMICZNE
I MOLEKULARNE U WYBRANYCH GATUNKÓW
KAKTUSÓW**

*Influence of ionizing radiation on the colour of
seedlings and biochemical and molecular changes
in selected cacti species*

DZIEDZINA: NAUKI ROLNICZE
DYSCYPLINA: ROLNICTWO I OGRODNICTWO

PROMOTOR
DR HAB. JUSTYNA LEMA-RUMIŃSKA, PROF. UCZELNI
UNIwersytet Kazimierza Wielkiego

Bydgoszcz, 2023

*Pragnę podziękować
Pani dr hab. Justynie Lemie-Rumińskiej, prof. uczelni
za wielkie zaangażowanie i pomoc przy spełnianiu mojego marzenia
o napisaniu pracy na temat hodowli kaktusów.*

*Dziękuję także mojej córce mgr inż. Iwonie Licznarskiej,
że podjęła się jako pierwsza realizacji tematu regeneracji kaktusów in vitro,
który był dla mnie inspiracją do podjęcia niniejszych badań.*

*Poświęcam niniejszą pracę pamięci
Prof. dr hab. Małgorzacie Zalewskiej
– współzałożycielce Katedry Roślin Ozdobnych i Warzywnych,
która przed 20 laty, podczas konsultacji
zachęciła mnie do pogłębiania wiedzy
z zakresu hodowli roślin ozdobnych.*

Spis treści

1. WSTĘP	7
2. ANALIZA LITERATURY	8
2.1. Charakterystyka rodziny Cactaceae	8
2.2. Hodowla roślin	13
2.2.1. Tradycyjne metody hodowli roślin	14
2.2.1.1. Krzyżowanie (hybrydyzacja)	14
2.2.1.2. Selekcja	16
2.2.1.3. Chimeryzacja – proces tworzenia chimer	17
2.2.2. Tradycyjne a nowoczesne narzędzia i metody hodowli roślin	20
2.2.2.1. Transformacje genetyczne	20
2.2.2.2. Hodowla mutacyjna	21
2.2.2.3. Mutacje	22
2.2.2.4. Rodzaje mutacji	22
2.2.2.5. Regeneracja z pojedynczych zmutowanych komórek	26
2.2.2.6. Regeneracja przez pędy przybyszowe	27
2.2.2.7. Embriogeneza somatyczna (ES)	28
2.3. Fizyczne i chemiczne czynniki mutagenne	31
2.3.1. Barwniki roślinne a barwa roślin	33
2.3.2. Karotenoidy	35
2.3.3. Flawonoidy	37
2.3.4. Betalainy	42
2.3.5. Chlorofile	42
2.4. Możliwości zmiany barwy u roślin – szlaki metaboliczne flawonoidów oraz karotenoidów	45
2.4.1. Wykrywanie zmian (mutacji) na poziomie genetycznym	49
2.4.2. Wykrywanie zmian (mutacji) roślin na poziomie biochemicznym	49
2.4.3. Wykrywanie zmian (mutacji) na poziomie molekularnym	50
2.4.3.1. Technika RFLP	51
2.4.3.2. Technika RAPD	53
2.4.3.3. Technika ISSR	55
2.4.3.4. Technika SCOT	57
3. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ	59

4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ	60
4.1. Analizy biochemiczne	61
4.2. Ekstrakcja barwników roślinnych z uzyskanych siewek.....	61
4.3. Analizy molekularne	62
4.4. Analizy statystyczne.....	65
5. WYNIKI	66
5.1. Dynamika kiełkowania nasion w warunkach <i>in vitro</i> poddanych działaniu promieniowania X	66
5.1.1. <i>Astrophytum spp.</i> ‘Purple’	66
5.1.2. <i>Copiapoa tenuissima</i>	67
5.1.3. <i>Uebelmannia pectinifera</i>	68
5.2. Ocena barwy siewek i stężenia barwników roślinnych poddanych działaniu promieniowania X	69
5.2.1. <i>Astrophytum spp.</i> ‘Purple’	69
5.2.2. <i>Copiapoa tenuissima</i>	74
5.2.3. <i>Uebelmannia pectinifera</i>	79
5.3. Analiza molekularna siewek kaktusów uzyskanych w warunkach <i>in vitro</i> z nasion poddanych działaniu promieniowania X	84
6. Dyskusja	96
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	108
8. LITERATURA	111
Streszczenie	135
Abstract	136

1. WSTĘP

Rodzina Cactaceae jest stosunkowo liczna, gdyż składa się ze stu rodzajów i około 2000 gatunków kaktusów [Anderson, 2001]. Większość przedstawicieli tej rodziny w środowisku naturalnym występuje w obu Amerykach, jednak największe ich zagęszczenie jest na pustynnym i suchym obszarze Meksyku, w południowo-zachodniej części Stanów Zjednoczonych oraz w południowo-zachodniej części obszaru andyjskiego [Nyffeler i Egli, 1997]. Na całym świecie kaktusy wzbudzają od lat duże zainteresowanie, jako rośliny ozdobne, które są szczególnie cenione i pożądane przez hodowców i kolekcjonerów. Nowoczesna hodowla roślin ozdobnych jest ukierunkowana na stosowanie nowych, cały czas doskonalonych oraz zaawansowanych metod (takich jak: modyfikacje genetyczne roślin) i narzędzi biotechnologicznych (takich jak: kultury *in vitro*, markery molekularne) [Schum 2003, Tymoszuć 2015]. W dobie dzisiejszej mechanizacji tradycyjne metody i narzędzia hodowli roślin stały się zbyt absorbujące, powolne oraz kosztowne w celu uzyskania nowych odmian, o niespotykanych dotąd cechach [Santoz-Diaz i in. 2003, Jeong i in. 2004, Lema-Rumińska i Kulus 2014; Pérez – Molphe-Balch i in. 2015, Licznarski i Lema-Rumińska 2021a,b]. Dzięki dobraniu odpowiednich metod hodowli w połączeniu z narzędziami biotechnologicznymi istnieje możliwość spełnienia wymagań rynkowych stawianych nie tylko przez szerokie grono konsumentów, ale również przez wysublimowaną grupę kolekcjonerów, którzy zwracają szczególną uwagę na nowe i konkurencyjne cechy jakościowe w odniesieniu do odmian wcześniej znanych [Lema-Rumińska i Licznarska 2004, Czekalski 2010, Kulpa 2012, Botelho i in. 2015, Licznarski i Lema-Rumińska 2021b]. Chociaż najnowocześniejsze metody hodowli oparte są obecnie o technologię edycji genów (CRISPR/Cas), to nadal czynniki mutagenne do których zaliczane jest promieniowanie jonizujące (do którego należy również promieniowanie X), promieniowanie mikrofalowe, wysokiej energii fotony i elektrony, czy nanocząstki złota lub srebra oraz metanosulfonian etylu (EMS) stanowią cenne narzędzie zmian genetycznych szczególnie u roślin ozdobnych o dużych, nieznanym genomach oraz roślin poliploidalnych [Holme i in., 2019, Tymoszuć i Kulus, 2020, Miler i in. 2021; Nasri i in. 2021, Kulus i in. 2022].

W literaturze brakuje jednak badań nad wpływem promieniowania jonizującego u kaktusów, które stanowią ważną ekonomicznie gałąź produkcji na rynku ogrodnictwa.

2. ANALIZA LITERATURY

2.1. Charakterystyka rodziny Cactaceae

Rodzina Cactaceae Juss. jest stosunkowo liczna i składa się z 98 rodzajów i 1500-2000 gatunków [Barthlott i Hunt 1993, Nyffeler i Egli 1993, Srenscek 2011, Licznerski i Lema-Rumińska 2021a,b, Yadav i Singh 2021]. Kaktusy występują na obu kontynentach Ameryki od Kanady po Argentynę. Rosną one w różnych warunkach klimatycznych a największe ich zagęszczenie jest w tzw. Nowym Świecie – czyli Meksyku. Rośliny te można spotkać również na wyspach Kanaryjskich, na Sri Lance, na półpustyniach i pustyniach Starego oraz Nowego Świata [Srenscek 2011, Licznerski i Lema-Rumińska 2021a,b, Yadav i Singh 2021]. W rejonach Meksyku, Argentyny, Peru, Boliwii, Chile oraz na Kostaryce odnotowany jest najwyższy odsetek gatunków endemicznych, których występowanie na ograniczonym obszarze sprawia, że są one ekstremalnie zagrożone wyginięciem [Hernández 2008]. Na obszarze Meksyku najcenniejsze dla badaczy kaktusy można spotkać w dużym zagęszczeniu. Na terenie pustyni Chihuahuan Desert, 59 najcenniejszych gatunków kaktusów występuje na obszarze mniejszym niż 10 km² [Hernández i Bárcenas 1995, Hernández 2008, Licznerski i Lema-Rumińska 2021a,b, Yadav i Singh 2021].

Morfologię kaktusów ukształtowały ekstremalne warunki środowiskowe, redukując ich liście [Srenscek 2011]. Rośliny te są bylinami, o wolnym tempie wzrostu (zależnym od stopnia nawodnienia) i dużej tolerancji na suszę. Z uwagi na dużą wytrzymałość, unikatowy wygląd i barwę są one cenione przez wielu hodowców i kolekcjonerów. Poszczególne gatunki należące do rodziny Cactaceae charakteryzują się różnymi formami: drzewiastymi, krzewiastymi i rozłogowymi. Łodygi tych roślin mogą być soczyste bądź zdrewniałe i posiadać kształt kulisty, kolumnowy, cylindryczny, podłużny, czy owalnie spłaszczony. Ciernie natomiast powstają w wyspecjalizowanych strukturach tkanki merystematycznej – czyli w areolach. W areolach powstają również nowe łodygi oraz kwiaty, zawierające reprodukcyjne okółki, w tym przeplatające się płatki oraz działki (tworzące strukturę rurkową) i pręciki. Kwiaty te są bardzo atrakcyjne m.in. dla owadów, cieszą się też zainteresowaniem kolekcjonerów. Poszczególne rodzaje i gatunki różnią się między sobą kalejdoskopem barw, kształtem oraz ilością i wielkością kwiatów [Anderson 2001]. Gatunki zakwitające w nocy mają zwykle białe kwiaty o żółtym bądź czerwonym przebarwieniu. Natomiast kaktusy kwitnące w dzień mają kwiaty o barwie purpurowej, żółtej, białej, pomarańczowej, czerwonej, a nawet zielonej [Barthlott i Hunt 1993, Anderson 2001, Licznerski i Lema-Rumińska 2021a,b, Yadav i Singh 2021].

Do XIX wieku nie znano skutecznych metod rozmnażania kaktusów na dużą skalę, co uniemożliwiało tani zakup importowanych roślin. W kolejnych dekadach doszło do rozwoju efektywnych metod rozmnażania kaktusowatych, co dało możliwość do większego i korzystniejszego dostępu do tych roślin w celach sprzedaży. W ostatnich latach kaktusy stały się bardziej popularne, co spowodowało większe zainteresowanie się metodami ich reprodukcji. Kaktusy rozmnaża się wegetatywnie oraz generatywnie. Mimo, że rozmnażanie tych roślin z nasion jest niezmiernie proste to trudność sprawia pozyskanie dużej ilości nasion, co jest spowodowane wymaganiami koniecznymi do kwitnienia i produkcji nasion [Licznarski i Lema-Rumińska 2021a,b]. Wśród metod wegetatywnych wyróżnia się rozmnażanie z sadzonek pędowych i liściowych oraz szczepienie na podkładkach. Metody te nie są jednak dość efektywne dla wszystkich gatunków kaktusów. Są one zbyt powolne, kosztowne, praco- i czasochłonne. Z tych powodów naukowcy coraz bardziej skupiają się nad nowymi metodami mikrorozmnażania kaktusów, z wykorzystaniem kultur *in vitro* [Lema-Rumińska i Kulus 2014; Pérez-Molphe-Balch i in. 2015, Licznarski i Lema-Rumińska 2021a,b].

Jednym z najcenniejszych i stosunkowo rzadko spotkanych przedstawicieli rodziny *Cactaceae* jest rodzaj *Astrophytum* Lem. Wśród tego rodzaju wyróżnia się sześć gatunków: *A. asterias*, *A. capricorne*, *A. caput-medusae*, *A. coahuilense*, *A. myriostigma* oraz *A. ornatum*. Rodzaj ten ma szeroki wachlarz barw – od zieleni do brązu. W okresach dużej wilgotności okazy *Astrophytum* są barwy zielonej, jednakże w czasie suszy kaktus brązowieje, zlewając się z podłożem. Kwiaty tego rodzaju są żółte (również o pomarańczowych centrach), owalne, mięsiste długie (wielkości od 1,25 do 15cm). Nasiona są ciemnobrązowe, błyszczące. Kaktusy tego rodzaju posiadają plamki z okrywą z drobnych kłaczek [Benson 1982, Damude i Poole 1990, Licznarski i Lema-Rumińska 2021a,b].

W naturze gatunki rodzaju *Astrophytum* można spotkać na niskich wznieśleniach, wśród cierniowych krzewów i na murawach w ciepłym i subtropikalnym klimacie stepowym, który jest charakterystyczny dla obszaru Meksyku i Teksasu [Licznarski i Lema-Rumińska 2021a,b]. Kaktusy z tego rodzaju rosną na mineralnej, przepuszczalnej i lekko kwaśnej glebie marglowej o pH wynoszącym około 6,5 i bogatej w składniki pokarmowe (szczególnie w pierwiastki takie jak: potas oraz wapń). Minimalna temperatura dla kaktusów z rodzaju *Astrophytum* to około 3°C [Fleischer i Schutz 1978, Hinz i Abramowicz 1986]. Kaktusy należące do tego rodzaju są wrażliwe na zbyt wysoką wilgotność gleby. Należy podkreślić, iż rośliny te posiadają dość kruche korzenie, które można łatwo uszkodzić mechanicznie. *Astrophytum* znacznie lepiej rosną w warunkach niedoboru wody aniżeli jej nadmiaru. Istotną kwestią również jest nasłonecznienie, niezbędne do kwitnięcia kaktusów [Fleischer i Schutz 1978].

Astrophytum asterias Lem. (Ryc. 1) jest jednym z najbardziej pożądanym gatunków przez producentów oraz kolekcjonerów na całym świecie. Jest jednocześnie najbardziej zagrożonym wyginięciem w środowisku naturalnym gatunkiem kaktusa [Martinez-Avalos i in. 2007]. Gatunek ten został po raz pierwszy zebrany w 1843 roku przez barona von Karwinsky'ego i opisywany jako *Achinas echinocactus* w 1845 roku przez Józefa Zuccariniego [Damude i Poole 1990]. Charles Lemaire w 1868 roku sklasyfikował gatunek *Astrophytum asterias* w rodzaju *Astrophytum*. Nazwa gatunkowa rośliny jest powszechnie akceptowana przez środowiska naukowe do dziś [Licznarski i Lema-Rumińska 2021a,b]. *Astrophytum asterias* to niewielki szaro-zielony kaktus, w kształcie kopuły (zimną o płaskim pokroju) o wymiarach 15 × 10 cm. Składa się on najczęściej z ośmiu trójkątnych sekcji, z których każda charakteryzuje się centralnie rozłożonym pasmem wełnistych areoli. Po czasie około 5 lat tworzy jasno-żółte kwiaty, których wnętrza są czerwone. W naturze *Astrophytum asterias* zazwyczaj kwitnie w okresie od marca do maja (rzadziej w miesiącach letnich), a jego owoce występują od kwietnia do czerwca [Damude i Poole 1990]. Kwiaty są zapylane przez owady. Dla *A. asterias* najlepszym podłożem do kiełkowania jest teren piaszczysty, lekko zasadowy, który zawiera małą ilość materii organicznej. Postępująca degradacja naturalnych siedlisk *Astrophytum asterias* przez konkurencyjne trawy, spowodowała, że gatunek ten został objęty całkowitą ochroną [U.S. Fish and Wildlife Service 2003]. Z tego powodu w celu ochrony gatunków zagrożonych, w tym również *Astrophytum asterias*, istnieje konieczność rozwoju metod reprodukcji [Lema-Rumińska i Kulus 2014]. Obecnie istnieje wiele odmian tego gatunku, które zostały wyhodowane w celach komercyjnych.

Na rodzaj *Uebelmannia* składają się z trzy gatunki: (*Uebelmannia buiningii*, *Uebelmannia gummifera*, *Uebelmannia pectinifera*), powszechnie rosnące w paśmie Espinhaço i Chapada Diamantina we wschodniej Brazylii. Rośliny z tego rodzaju są endemitami. Charakteryzują się ograniczonym zasięgiem, lokalnym rozproszeniem oraz małym zróżnicowaniem genetycznym [Gitzendanner i Soltis 2000, Teixeira i in. 2018]. Występują w stosunkowo nielicznych populacjach, głównie w szczelinach skalnych oraz na kwarcowych obszarach pustynnych [Zappi i Taylor 2008, Teixeira i in. 2018]. Ze względu na rzadkość występowania tych roślin w środowisku naturalnym i duże zainteresowanie nimi wyspecjalizowanych kolekcjonerów jak i wąski zasięg dystrybucji, gatunki należące do tego rodzaju są uważane za krytycznie zagrożone i znajdują się na oficjalnej brazylijskiej Czerwonej Liście Roślin [Martinelli i Moraes 2013, Teixeira i in. 2018].



Ryc. 1. *Astrophytum asterias* w środowisku naturalnym [źródło: U.S. Fish and Wildlife Service 2003]

Uebelmannia pectinifera Buining została odkryta w 1982 roku przez Leopolda Horsta. Jest to kaktus w kształcie od kulistego do cylindryczno-wydłużonego o wielkości do 1 metra, średnicy około 10-15 cm (Ryc. 2). Barwa kaktusów *Uebelmannia pectinifera* Buining jest zależna od dostępu do światła (szaro-zielona – w miejscach zacienionych, czerwona bądź ciemnofioletowobrazowa – w obszarach silnie nasłonecznionych). Kaktusy z tego rodzaju mają 13-40 żeber, które są pokryte areolami, zawierającymi ciernie boczne, przypominające grzebień. Kwiaty lejkowate o barwie zielonkawo-żółtej pojawiają się w ilości 4-5 sztuk od wczesnej wiosny do okresu późnego lata. Nasiona są ciemne, w kształcie gruszkowatym i wielkości 2 mm [Schultz i Machado 2000, Anderson 2001, Taylor i Zappi 2004, Cullen i in. 2011, Teixeira i in. 2018]. Kaktus ten wymaga ciepłych oraz wilgotnych warunków środowiskowych oraz stanowisk nasłonecznionych [Anderson 2001, Cullen i in. 2011].

Kaktusy z rodzaju *Copiapoa* zostały opisane przez Britton'a i Rose'a w 1922 roku. Rośliny te są kuliste lub krótko cylindryczne, kwiaty są żółte. Rodzaj ten pierwotnie liczył sześć gatunków, z upływem czasu ich ilość się znacząco zwiększyła. W naturalnym środowisku większość gatunków *Copiapoa* jest endemiczna, a niektóre z nich mają ograniczony zasięg występowania [Walter i Machler 2006, Larridon i in. 2014, Larridon i in. 2015]. Należy zaznaczyć, iż nawet połowa gatunków należąca do tego rodzaju jest zagrożona wyginięciem [Larridon i in. 2014, Larridon i in. 2015]. Gatunki z rodzaju *Copiapoa*

powszechnie występują w ogrodach botanicznych w Stanach Zjednoczonych, Niemczech oraz Wielkiej Brytanii [Larridon in. 2014, Larridon i in. 2015].



Ryc. 2. *Uebelmannia pectinifera* w środowisku naturalnym [źródło: Braun, 1984]

Copiapoa tenuissima Ritt. (inaczej: *C. humilis* var. *tenuissima* Ritt.) pochodzi z wyjątkowo suchych pustynnych i kamiennych rejonów Chile. Gatunek ten jest objęty bardzo ścisłą ochroną, przez co znajduje się w załączniku II konwencji CITES [Lema-Rumińska i Niedojadło 2012, Lema-Rumińska i in. 2013]. *Copiapoa tenuissima* Ritt. ma długi i bulwiasty korzeń, gdyż rośnie na terenach ubogich w wodę oraz materię organiczną. Kaktus ten ma kształt kulisty, nieco spłaszczony o średnicy 2-5 cm (Ryc. 3). Naskórek tego kaktusa jest ciemnego koloru (ciemnozielonego, oliwkowo-zielonego, prawie fioletowo-czarnego) [Graham 1998, Anderson 2001, Cullen i in. 2011, Lema-Rumińska i Niedojadło 2012, Lema-Rumińska i in. 2013]. *Copiapoa tenuissima* Ritt. posiada 13-16 żeber, często o spiralnych, ma obficie wełniste areole, zakończone cienkimi cierniami. Kwiaty są jasno-żółte, delikatnie pachnące, rozwijają się w okresie wiosny i lata [Anderson 2001, Cullen i in. 2011]. Wśród kaktusów z gatunku *Copiapoa tenuissima* Ritt. występuje forma *monstruosa* która ma

szczególne cechy takie jak: bardzo ciemna (prawie czarna) barwa epidermy, wełniste areole i brak cierni. Został doceniony przez hodowców oraz kolekcjonerów na całym świecie [Doring 1976, Lema-Rumińska i Niedojadło 2012, Lema-Rumińska i in. 2013].



Ryc. 3. *Copiapoa tenuissima* Ritt. (fot. P.Licznernski)

2.2. Hodowla roślin

Światowy rynek roślin ozdobnych rozwija się nieustannie w sposób dynamiczny. W celu spełnienia wymagań konsumenckich konieczne jest ciągłe doskonalenie roślin. Poszukiwane są odmiany o innowacyjnych i konkurencyjnych cechach jakościowych w porównaniu do tych powszechnie występujących [Czekalski 2010, Święcicki i in. 2011, Kulpa 2012, Botelho i in. 2015]. Pojęcie „jakość” może dotyczyć cech morfologicznych, takich jak np.: wielkość pędu, kształt, jego barwa, tekstura a także właściwości, takie jak m.in.: szybkość wzrostu, zdolność adaptowania się do nowych warunków, łatwość uprawy i namnażania, odporność na szkodniki i choroby oraz stres środowiskowy [Święcicki i in. 2011, Spasibionek 2002, Degefa 2019, Licznernski i Lema-Rumińska 2021a,b].

To właśnie hodowla, połączona z selekcją, umożliwia spełnienie coraz to nowych wymagań rynkowych stawianych przez szerokie rzesze konsumentów jak i indywidualnych kolekcjonerów. Wszystkie rośliny ozdobne mają długą historię hodowli oraz selekcji, które nadały im nowe cechy morfologiczne oraz niespotykane dotąd właściwości. Hodowcy różnymi metodami zmieniają cechy morfologiczne rośliny często poprzez ingerencję w ich geny [Święcicki i in. 2011, Kulpa 2012, Botelho i in. 2015, Licznarski i Lema-Rumińska 2021b].

Postęp w produkcji roślinnej jest zależny od rozwoju metod uprawy i hodowli, która jest oparta na wiedzy dotyczącej danej rośliny. Wiele jednostek naukowych realizuje szereg projektów badawczych w celu poznania tych zależności, poprzez badania i obserwacje na poziomie genomu roślin ozdobnych (m. in. astra chińskiego – *Callistephus chinensis*, mieczyka ogrodowego – *Gladiolus hybridus*, lewkonii letniej – *Matthiola incana*, petunii ogrodowej – *Petunia hybrida*, chryzantemy wielkokwiatowej – *Chrysanthemum grandiflorum*) [Lema-Rumińska i Zalewska 2002, Lema-Rumińska i in. 2004, Czekalski 2010, Święcicki i in. 2011, Lema-Rumińska i in. 2018, Seidler-Łożykowska 2021].

2.2.1. Tradycyjne metody hodowli roślin

Podczas procesu hodowli roślin ozdobnych stosuje się konwencjonalne narzędzia takie jak: krzyżowanie, selekcja oraz chimeryzacja [Botelho i in. 2015].

2.2.1.1. Krzyżowanie (hybrydyzacja)

Znaczna część roślin doświadczyła hybrydyzacji i introgresji (przemieszania się materiału genetycznego m. in. poprzez krzyżowanie). Krzyżowanie (inaczej hybrydyzacja) należy do podstawowych zabiegów stosowanych w hodowli prowadzących do powstania potomstwa mieszańcowego (dzięki połączeniu się dwojga genetycznie różnych rodziców) [Malepszy 2000, Mallet 2005, Goulet i in. 2017, Orlikowska i in. 2001]. Hybrydyzacja dotyczy roślin samopylnych oraz zapylanych krzyżowo. Głównym jej celem jest stworzenie zmienności, która jest niezwykle cenna dla hodowców [Orlikowska i in. 2001, Chrzanowska i Jadwiszczak 2015]. Wiedza dotycząca hybrydyzacji wraz z ubiegiem lat uległa znacznemu rozwojowi [Malepszy 2000, Mallet 2005, Goulet i in. 2017, Orlikowska i in. 2001].

Badanie hybrydyzacji ma bogatą historię. Już sam Linneusz (1760) jako jeden z pierwszych uczonych w rozprawie „*Disquisitiones de sexu plantarum*” zasugerował, iż nowe gatunki powstały dzięki zjawisku hybrydyzacji, odrzucając występowanie całkowitej stabilności [Goulet i in. 2017]. Verne Grant (1981) zauważył, że wiele prac naukowych dotyczyło częstotliwości występowania hybrydyzacji bądź badania konsekwencji wywołanej jej występowaniem. Do dnia

dzisiejszego badania nad krzyżowalnością nadal koncentrują się na tych dwóch aspektach. Uważa się, iż w 1716 roku po raz pierwszy dokonano naukowej identyfikacji hybryd przez Cotton'a Mather kukurydzy (*Zea mays*) i dyni (*Cucurbita* spp.). W podobnym okresie Thomas Fairchild jako pierwszy uzyskał celową hybrydę z dzikich gatunków goździka [Zirkle 1934, Goulet i in. 2017].

Zgodnie z naturą oraz pokrewieństwem między krzyżowanymi roślinami, wyróżnia się następujące typy hybrydyzacji:

- **międzyodmianowa (wewnątrzgatunkowa)** – krzyżowanie roślin dwóch różnych odmian, należących do tego samego gatunku;
- **wewnątrzodmianowa** – krzyżowanie roślin w obrębie jednej odmiany, posiadających różne genotypy;
- **międzygatunkowa (wewnątrzgatunkowa)** – krzyżowanie odbywa się między dwoma różnymi gatunkami, które występują w obrębie rodzaju
- **międzyrodzajowa** – krzyżowanie roślin należących do dwóch, odrębnych rodzajów [Czekalski 2010, Mwangangi i in. 2019; Kumari – www.an-apatna.ac.in].

Krzyżowanie międzygatunkowe oraz międzyrodzajowe stanowią ważną metodę we współczesnej hodowli. Celem tych krzyżowań jest najczęściej włączenie genów z form nieuprawnych do materiału hodowlanego, które gwarantują lepszą zdolność przystosowawczą do warunków uprawowych oraz większą odpornością na choroby i szkodniki. Jednakże skutkiem zastosowania tego krzyżowania może być powstanie apomiktycznych zarodków oraz eliminacja całego/części genomu jednego bądź dwojga rodziców [Malepszy 1989, Orlikowska i in. 2001].

Dzięki uzyskanej wiedzy na temat genetyki, możliwości kontrolowania biologii zapylenia oraz zapłodnienia znacznie zwiększyła się skuteczność krzyżowania genetycznego dość odległych taksonów. Zdobyte doświadczenie umożliwiło ingerencję w proces zapłodnienia i ominięcia naturalnych barier niezgodności poprzez: usuwanie znamienia bądź skracanie słupka, nanoszenie pyłku na słupek lub do zalążni, inaktywację enzymów znamienia słupka w wysokiej temperaturze, aplikację regulatorów wzrostu na zalążnię lub znamię, rozwój wyizolowanego zarodka w warunkach *in vitro* czy łączenie fragmentów komórek lub protoplastów w warunkach *in vitro* [Zenkteler 2001, Orlikowska i in. 2001].

Hybrydyzacja jest zjawiskiem powszechnym, jednakże uzyskanie unikalnej, wyizolowanej linii hybrydowej w naturze jest bardzo rzadkie. Nowe linie koniecznie muszą ustanowić izolację reprodukcyjną oraz nową niszę ekologiczną w celu przezwyciężenia m.in. konkurencji ze strony gatunków rodzicielskich [Goulet i in. 2017].

W stosunkowo wielu przypadkach mieszańcowy charakter siewek może zostać rozpoznany poprzez zastosowanie markerów morfologicznych. Jednakże czasami identyfikacja mieszańców jest możliwa dopiero na podstawie uzyskanych cech kwiatów bądź owoców. Z tego powodu wykorzystywane są coraz to nowsze narzędzia takie jak markery: cytologiczne bądź molekularne, które wymagają dostępu do odpowiednio wyposażonego laboratorium i wykwalifikowanego personelu. Mimo, że są to metody bardziej kosztowne, czasochłonne i pracochłonne to umożliwiają wykonanie analiz we wcześniejszych stadium rozwojowym rośliny [Bednarek i Chwedorzewska 2001, Orlikowska i in. 2001].

2.2.1.2. Selekcja

Selekcja jest procesem, w którym osobniki o pożądanym cechach są wybierane do reprodukcji. Wielu naukowców podkreśliło, iż selekcja jest oparta na zdolności do dostrzegania subtelnych różnic między roślinami, które są wyodrębniane [Bueno i in. 2006]. Odbywa się ona nie tylko na poziomie ewolucyjnym (polegającym na doborze naturalnym), ale również w trakcie pracy danego hodowcy [Botelho i in. 2015]. Zmiana stylu życia ludzkości doprowadziła do przekształcenia się „dzikich roślin” w zależne od ludzi odmiany udomowione, różniące się od pierwotnych form. Sztuka selekcji umożliwiła powstanie zmienności biologicznej, jej identyfikację a także wybór pożądanym cech [Acquaah 2007, Licznarski i Lema Rumińska 2021, 2021a,b].

Początkowo podczas hodowli roślin wykorzystywano naturalnie występujące warianty i dzikie, pokrewne gatunki roślin uprawnych. Wybór oparty był wyłącznie na intuicji, umiejętnościach ludzkich oraz ocenie przydatności powstających nowych cech. Metoda selekcji jest obecnie stosowana przez rolników i hodowców, gdzie zachowuje się nasiona najlepiej plonujących i najatrakcyjniejszych roślin do sadzenia [Acquaah 2007].

Wraz z rozwojem rolnictwa, znajomość technik selekcji została udoskonalona. Jednakże dopiero pod koniec XVIII wieku stała się ona bardziej metodyczna, co skutkowało większą efektywnością. Największy wkład w wyjaśnienie efektów selekcji miał Louis de Vilmorin w XIX wieku. Jednakże dopiero na początku XX wieku dzięki pracy opublikowanej w 1865 r. Grzegorza Mendla, dotyczącej dziedziczenia cech u grochu ogrodowego, można było wyjaśnić pochodzenie zmienności, która stanowiła podstawę selekcji. Jednym z najwcześniejszych dokonań w hodowli roślin było opracowanie przez duńskiego botanika (w 1903 roku) – Wilhelma Johannsena teorii czystej linii podczas pracy nad fasolą ogrodową. Jego praca potwierdziła wcześniejsze obserwacje innych naukowców dotyczące wykorzystania techniki selekcji do uzyskania jednolitych, rasowych odmian. Powstałe w wyniku krzyżowania hybrydy miały interesujące

cechy, przewyższające ich wartość w stosunku do roślin rodzicielskich. Obecnie wykorzystuje się zdobytą wiedzę i technologię w celu zwiększenia precyzji i wydajności selekcji [Szymkowiak i in. 1996, Roll-Hansen 2008, Botelho i in. 2015, van Dijk i in. 2018].

2.2.1.3. Chimeryzacja – proces tworzenia chimer

Dla kolekcjonerów istotne znaczenie mają oryginalne zmiany morfologiczne, dzięki którym uzyskuje się nowe egzemplarze – najczęściej o niespotykanych kształtach czy zmienionych barwach. Szczególne znaczenie kolekcjonerskie mają tak zwane chimery [Filipiak 2008, Licznarski i Lema-Rumińska 2021b].

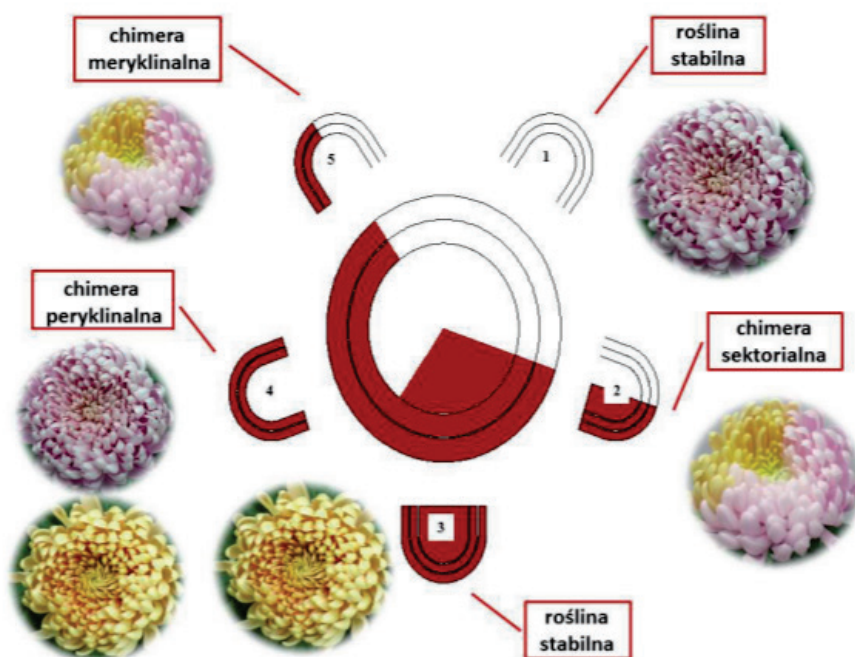
Pojęcie – „chimera” użyto po raz pierwszy w stosunku do rośliny powstałej w wyniku szczepienia dwóch gatunków *Solanum* przez niemieckiego botanika – Hansa Winklera w 1907 r. [Prina i in. 2012]. Roślina rozwinęła pęd, który miał dwie odrębne połówki, każda należąca do innego gatunku. Winker określił chimery jako organizmy trwałe, powstałe z różnych genetycznie komórek bez ich zlania się [Hejnowicz 1956, Wóycicki 1958, Szymkowiak i in. 1996, Prina i in. 2012]. Komórki te różniły się strukturą chromosomów lub ich liczbą, a nawet tylko jednym nukleotydem w obrębie genomu jądrowego i/lub organelli komórkowych [Prina i in. 2012]. Wraz z upływem czasu pojęcie zostało bardziej zdefiniowane i dotyczy roślin, które składają się z komórek co najmniej dwóch genotypów osobniczych. Chimera określana często jest mianem „mozaiki genetycznej” [Tilney-Bassett 1986, Licznarski i Lema-Rumińska 2021b].

Chimery powstają dzięki występowaniu niejednorodnych w sposób genetyczny merystemów wierzchołkowych. Uzyskuje się je w wyniku procesu szczepienia, ale również dzięki mutacji [Tilney-Bassett 1986]. Mutacje te mogą powstawać w sposób spontaniczny lub celowy – dzięki działaniu promieniowania kosmicznego, stosowaniu różnych lamp (np. rtęciowych) w szklarniach, indukcji czynnikiem chemicznym bądź fizycznym czy zmian epigenetycznych [Stewart i in. 1972, Marcotrigiano 1997, Jerzy 2000, Zalewska i Lema-Rumińska 2004, Zalewska i in. 2010, Zalewska i in. 2011]. Chimeryzm może występować podczas każdego etapu ontogenezy osobnika, co jest związane ze strukturą anatomiczną merystemów występujących u roślin wyższych [Szymkowiak in. 1996].

W merystemach wierzchołkowych oraz kątowych roślin okrytonasiennych wyróżnia się trzy warstwy histogenowe, ułożone kolejno po sobie: L1 (pierwsza warstwa tuniki), L2 (druga warstwa tuniki) oraz L3 (korpus). Układ warstw tkanekowych jest wynikiem płaszczyznowych podziałów komórkowych, występujących w merystemie. Badania nad chimarami umożliwiły poznanie funkcji

poszczególnych warstw w trakcie rozwoju organów roślinnych. Mutacje w obrębie komórek inicjalnych danych warstw prowadzą w konsekwencji do powstania chimer. Poszczególne zmiany mogą obejmować cały organ lub jego fragment [Jerzy 1997, Marcotrigiano 1997]. Wyróżnia się trzy rodzaje chimer:

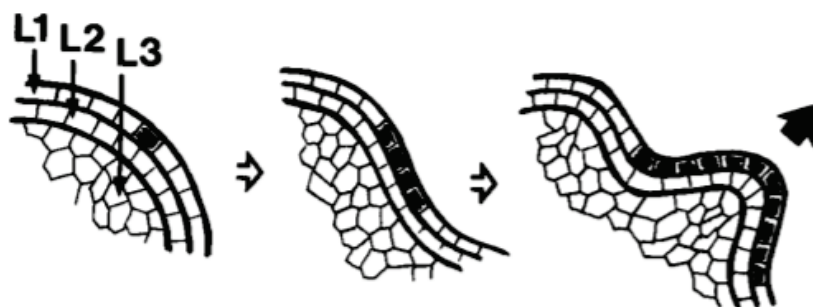
- **peryklinalne** (występuje zmieniona warstwa okrywająca – L1 w stosunku do formy wyjściowej),
- **meryklinalne** (zmiana jedynie w określonym obszarze, brak zmian w rdzeniu),
- **sektorialne** (dotyczy zmian tkanek, które sąsiadują ze sobą i zajmują całe sektory, obejmuje warstwy L1, L2 oraz L3) (Ryc. 4) [Hejnowicz 1956, Van Harten 1998, Tymoszuik 2016, Licznerski i Lema-Rumińska 2021b]. Rodzaj uzyskanej chimery jest zależny od czynnika sprawczego, a także od umiejscowienia zmutowanej komórki [Szymkowiak i in. 1996].



Ryc. 4. Typy chimer w przekroju poprzecznym i podłużnym u chryzantem: 1, 3 – roślina stabilna, 2 – chimera sektorialna, 4 – chimera peryklinalna [źródło: Tymoszuik 2016]

Chimery peryklinalne charakteryzują się odmiennym genotypem jednej lub dwóch całych warstw histogenowych. Powstają najczęściej w wyniku mutacji na wczesnym etapie rozwoju merystemu, dając początek odnodze, w której tylko jedna warstwa merystemu uległa mutacji. Rozmnażanie wegetatywne otrzymanej

odnogi zawierającej zmianę umożliwia utrzymanie chimery. Chimery peryklinalne dostarczają wielu informacji dotyczących interakcji pomiędzy warstwami komórek (Ryc. 5). [Tilney-Bassett 1986, Carpenter i Coen 1995, Tymoszuć 2016]. Chimery meryklinalne natomiast mają odmienną genetycznie część jednej bądź dwóch warstw. Zmutowane komórki zwykle zajmują tylko fragment merystemu, dając początek odnodze, w których zmiana obejmuje część warstwy. Są często z tego powodu rozpatrywane jako „częściowe” chimery peryklinalne. Umożliwiają ujawnienie zakresu interakcji pomiędzy komórkami w tej samej warstwie. Chimery sektorialne mają różny genetycznie sektor tkanek, który obejmuje wszystkie warstwy histogenowe. Ciężko jest wizualnie odróżnić chimery peryklinalne od stabilnego mutantu, a także sektorialne od meryklinalnych [Tilney-Bassett 1986, Tymoszuć 2016].



Ryc. 5. Pochodzenie chimer peryklinalnych w merystemach z trzema warstwami. Komórka L1 niosąca mutację (oznaczona na czarno), dzieli się w celu wytworzenia obszaru komórek pokrywających rozwijającą się gałąź boczną, dając w ten sposób początek chimerze peryklinalnej; [źródło: Carpenter i Coen 1995]

Zastosowanie chimer w produkcji, w których część warstwy jest genetycznie zmieniona pozwala ocenić skutki zmiany aktywności poszczególnych genów w różnych warstwach bez zmian uprawowych. W roślinach badanie interakcji pomiędzy warstwami L1 (naskórka), L2 (podnaskórkowej) oraz L3 (rdzenia) w dużej mierze jest zależne od chimer, w których genotyp jednej lub większej ilości warstw uległ zmianie. Zaletą chimer jest możliwość rozmnożenia ich w sposób wegetatywny. Jednakże są one problematyczne w rozmnażaniu i przechowywaniu oraz zbyt słabo poznane z powodu niemożności przeanalizowania genów, leżących u podstaw ich fenotypów. Rozwiązaniem tego problem jest zastosowanie technik genetycznych oraz molekularnych [Carpenter i Coen 1995, Marcotrigiano 1997].

2.2.2. Tradycyjne a nowoczesne narzędzia i metody hodowli roślin

W XIX wieku nie były znane skuteczne metody rozmnażania i hodowli kaktusów w większej skali. Z tego powodu tylko nielicznych kolekcjonerów z rejonu europejskiego było stać na zakup importowanych roślin. W kolejnych dekadach doszło do znacznego rozwoju efektywnych metod hodowli i rozmnażania roślin, w tym kaktusowatych, co sprawiło, że rośliny te stały się bardziej dostępne i bardziej różnorodne [Barthlott 2001, Lema-Rumińska i Kulus 2014]. Pomimo, że rozmnażanie kaktusów z nasion jest stosunkowo proste, to jednak trudność sprawia uzyskanie ich w dużej ilości, z uwagi na wymagania kaktusów względem kwitnienia i kiełkowania [Jenkins 1993, Rubluo 1997, Lema-Rumińska i Kulus 2014]. Wśród wegetatywnych metod rozmnażania kaktusów wyróżnia się: sadzonki pędowe i liściowe oraz szczepienia na podkładkach. Jednakże nie są to zawsze metody efektywne dla wszystkich gatunków. Tradycyjne metody są zbyt powolne i praco- i czasochłonne, a także kosztowne dla uzyskania egzemplarzy o nowych cechach. Z tego powodu coraz większą uwagę naukowcy poświęcają doskonaleniu metod i narzędzi biotechnologicznych [Santoz-Diaz 2003, Jeong i in. 2004].

Zastosowanie w hodowli nowoczesnych metod hodowli (takich jak: modyfikacje genetyczne roślin) oraz narzędzi biotechnologicznych (takich jak: kultury *in vitro*, markery molekularne), w celu oceny jakości materiału roślinnego (w początkowych etapach hodowli) prowadzi do skrócenia cyklu hodowlanego, świadomego i monitorowanego transferu genów, zwiększenia efektywności selekcji – a co za tym idzie – znaczącego obniżenia kosztów uzyskania nowych odmian [Święcicki i in. 2011].

2.2.2.1. Transformacje genetyczne

Transformacja genetyczna roślin polega na wprowadzeniu specyficznej sekwencji obcego DNA do genomu komórki w celu uzyskania osobników, zawierających nowe cechy jakościowe – np. odporności na choroby, szkodniki czy stres środowiskowy [Nowakowska 2004, Rout i in. 2006, Hnatuszko-Konka 2009]. Informacja genetyczna zawarta w DNA może być wzbogacona o kolejne sekwencje genów wprowadzone do komórki na drodze transformacji. Współcześnie wyróżniane są dwa rodzaje transformacji:

- **wektorowa** – polegająca na zastosowaniu szczepów bakteryjnych (tzw. wektorów) do wprowadzenia obcych gatunków do rośliny;
- **bezwektorowa** – oparta na bezpośrednim transferze genów między dawcą a biorcą, niewykorzystująca pośrednictwa wektorów bakteryjnych [Nowakowska 2004, Hnatuszko-Konka i in. 2009].

Transformacja wektorowa została opracowana w latach 80. XX wieku, kiedy odkryto podstawowe zasady przebiegu infekcji tkanek roślinnych przez zastosowanie szczepów bakteryjnych *Agrobacterium tumefaciens* oraz *Agrobacterium rhizogenes*. Wspomniane bakterie, żyjąc w glebie, w sposób naturalny infekują zranione tkanki niektórych roślin dwuliściennych. Podczas infekcji, część materiału genetycznego bakterii (zawartego w kolistym DNA – nazywanym plazmidem Ti) przekazana jest do wnętrza komórki roślinnej i włączona do genomu gospodarza. Przyłączony fragment DNA bakteryjnego przyczynia się do zmiany poziomu substancji wzrostowych w roślinie, co prowadzi do powstania narośli tumorowych w zainfekowanych organach roślinnych. Zjawisko infekcji z powodzeniem wykorzystano do wprowadzenia do roślin obcych genów, po zastosowanej modyfikacji struktury plazmidu bakteryjnego [Rogers i in. 1988, Rakoczy-Trojanowska 2002, Nowakowska 2004].

Bezwektorowa metoda transformacji komórek roślinnych związana jest z bezpośrednim transferem wyizolowanych genów do protoplastów dzięki użyciu czynników fizycznych – elektroporacji lub chemicznych – glikolu polietylenowego (PEG) czy mikrowstrzeliwanie [Rakoczy-Trojanowska 2002, Hnatuszko-Konka 2009]. Jedną z najczęściej stosowanych metod bezwektorowej transformacji komórek roślinnych jest mikrowstrzeliwanie DNA z użyciem tzw. „działa genowego”. Metoda ta została po raz pierwszy zastosowana w do transformacji komórek kukurydzy w latach 90. XX wieku [Nowakowska 2004].

Uzyskane rośliny transgeniczne poddawane są kolejno weryfikacji pod względem obecności obcego genu w genomie transformowanej komórki. W zależności od użytego konstruktu genomowego, proces wstępnej weryfikacji można przeprowadzić z użyciem testów ekspresji genów kodujących białka markerowe. Jednakże ostateczna weryfikacja uzyskanych linii transgenicznych i potomstwa wymaga przeprowadzenia dodatkowych analiz na poziomie molekularnym (z użyciem technik Southernblotting, Northernblotting, Westernblotting, PCR, testów enzymatycznych oraz immunochemicznych), które potwierdzą bądź wykluczą integrację transgeny z genomem roślinnym oraz jego ekspresję w roślinie [Nadolska-Orczyk 1999, Kumar i Fladung 2001, Nowakowska 2004].

2.2.2.2. Hodowla mutacyjna

Hodowla mutacyjna polega na indukcji mutacji w materiale genetycznym, czyli trwałych zmian, które podlegają dziedziczeniu. Jej początek sięga lat dwudziestych XX wieku, kiedy to Hans Muller (Noblista z 1946 roku) udowodnił, znaczący wpływ promieniowania X na zwiększenie częstości mutacji u muszki owocowej [Muller 1927, Miler 2005]. W latach 50-tych XX wieku powstało określenie „hodowla mutacyjna”, które do dziś jest stosowane i dotyczy wypra-

cowanych systemów działania na różnych etapach programów hodowlanych, wykorzystujących indukowanie mutacji [Broertjes 1966, Broertjes i in. 1983, Broertjes i van Harten 1988, Jerzy 1997, Przybyła 1997, Nowakowska 2002, Zalewska i Lema-Rumińska 2004, Zalewska i in. 2010, Zalewska i in. 2011]. Hodowla mutacyjna składa się pięciu następujących po sobie etapów:

- **ETAP I:** wybór materiału (całe rośliny, nasiona, eskplantaty);
- **ETAP II:** wybór sposobu traktowania mutagenami – dobór odpowiedniej dawki czynnika mutagennego (określenie jego stężenia, mocy promieniowania, czasu jego działania) i warunków zewnętrznych (ciśnienie, temperatura, wilgotność);
- **ETAP III:** wstępna i ostateczna selekcja (prowadzona jest najczęściej w drugim pokoleniu, powstałym z samozapylenia roślin poddanych działaniu czynnika mutagennego lub rozmnażanych wegetatywnie);
- **ETAP IV:** powstawanie nowych odmian;
- **ETAP V:** hodowla zachowawcza [Nowakowska 2002].

2.2.2.3. Mutacje

Mutacje, czyli stałe i dziedziczne zmiany w sekwencji zasad występujących w DNA są spowodowane błędami w replikacji DNA lub wspomnianym działaniem czynników fizycznych bądź chemicznych. Pojedyncza zmiana w sekwencji DNA jest powielana w procesie replikacji, a następnie przenoszona do komórek potomnych podczas trwania podziałów komórkowych. Mutacje powodując zmiany w sekwencji aminokwasów wpływają na funkcję białka i powstanie fenotypu innego niż fenotyp charakterystyczny dla danego gatunku [Nowakowska 2002, Pathirana 2011].

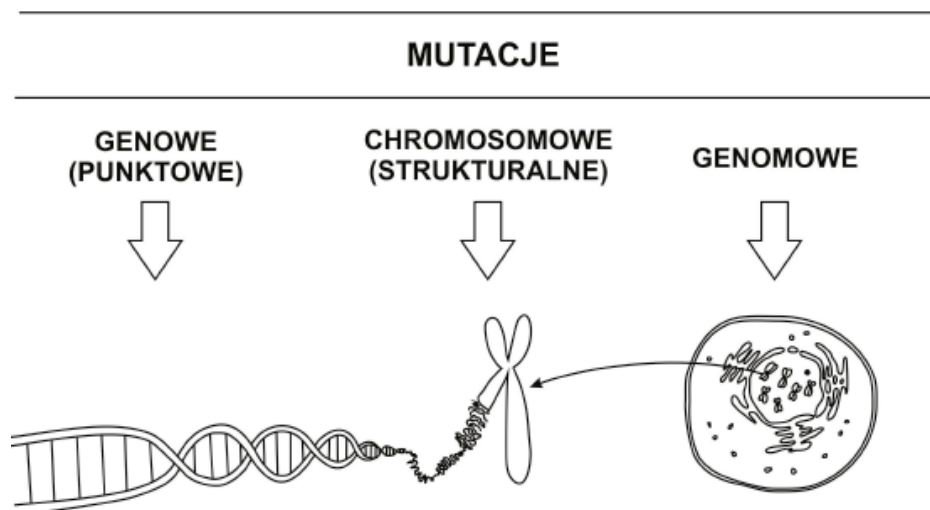
Wywołanie mutacji umożliwia zmianę poszczególnych cech. U roślin ozdobnych, dzięki jej zastosowaniu istnieje możliwość uzyskania roślin o odmiennej barwie, które jednakże mają jednakowe wymagania uprawowe – co z kolei jest bardzo cenne dla producentów czy potencjalnych klientów. Należy jednak pamiętać, iż zmiany nie wykrócą nigdy poza pulę cech charakterystycznych dla danego gatunku [Miler 2005]. Stosowanie mutacji, dzięki swojemu przebiegowi (w kierunku od allelu dominującego do recesywnego) umożliwia ujawnienie mutantów w pierwszym pokoleniu mutacyjnym – co daje możliwość uzyskania bardzo dużej ilości mutantów w stosunkowo krótkim okresie czasu [Muszyński 1976, Nowakowska 2002, Schum 2003, Tymoszek 2015].

2.2.2.4. Rodzaje mutacji

Mutacje, w zależności od poziomu rodzaju zmian (w sekwencji nukleotydowej, w strukturze chromosomów, w liczbie chromosomów) można wyróżnić w następujących formach (Ryc. 6):

- **mutacje genowe (inaczej punktowe)** – zmiany pojedynczej zasady zachodzące na poziomie sekwencji nukleotydowej; istotna jest lokalizacja występującej mutacji w obrębie genu;
- **mutacje chromosomowe** – dotyczą zmian występujących w strukturze chromosomów;
- **mutacje genomowe** – związane są ze zmianą liczby całych chromosomów oraz genomów należących do danego gatunku [Nowakowska 2002].

Mutacje genowe (punktowe) związane są ze zmianą zasady typu: tranzycja (pirymidyna zastępowana jest przez pirymidynę, a puryna przez purynę) oraz transwersja (pirymidyna jest zastępowana przez purynę i odwrotnie). Ze względu na wywołane skutki w kodowanym białku przez gen mutacje genowe dzielą się na kilka kategorii (Ryc. 7).



Ryc. 6. Rodzaje mutacji

Mutacje missensowne (zmiany sensu kodonów) dotyczą zmiany pojedynczej zasady, powodując zmianę kodonu i wbudowanie innego aminokwasu do białka. Te mutacje występują zwykle w jednej z dwóch pierwszych zasad kodonu. Efekty mutacji missensownych są różne w zależności od wpływu zmienionego aminokwasu na funkcje białka oraz jego położenia (Ryc. 7a). Mutacje nonsensowne (znajdujące się na końcu łańcucha polipeptydowego) zmieniają na kodon terminujący kodon aminokwasowy. W wyniku tego rodzaju mutacji dochodzi do przedwczesnej terminacji translacji i powstania krótszego białka. Mutacje nonsensowne mają istotny wpływ na aktywność kodowanego białka (Ryc. 7b).

(a) mutacje missensowne (zmiany sensu kodonów)

Phe	Asp	Glu	Pro	Leu	Cys	Thr	
5' – TTC	GAT	GAG	CCC	TTG	TGC	ACG	– 3'

↓ mutacja G → A

Phe	Asp	Lys	Pro	Leu	Cys	Thr	
5' – TTC	GAT	AAG	CCC	TTG	TGC	ACG	– 3'

(b) mutacje nonsensowne (wystąpienie kodonu terminującego translację)

Phe	Asp	Glu	Pro	Leu	Cys	Thr	Arg	Gly	
5' – TTC	GAT	GAG	CCC	TTG	TGC	ACG	CGC	GGT	– 3'

↓ mutacja C → A

Phe	Asp	Glu	Pro	Leu	Stop				
5' – TTC	GAT	GAG	CCC	TTG	TGA	ACG	CGC	GGT	– 3'

(c) mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu

Phe	Asp	Glu	Pro	Leu	Cys	Thr	Arg	Gly	
5' – TTC	GAT	GAG	CCC	TTG	TGC	ACG	CGC	GGT	– 3'

↓ insercja A

Phe	Asp	Glu	Thr	Leu	Val	His	Ala	Arg	
5' – TTC	GAT	GAG	ACC	CTT	GTG	CAC	GCG	CGG	T – 3'

(d) mutacje ciche

Phe	Asp	Glu	Pro	Leu	Cys	Thr	
5' – TTC	GAT	GAG	CCC	TTG	TGC	ACG	– 3'

↓ mutacja C → T

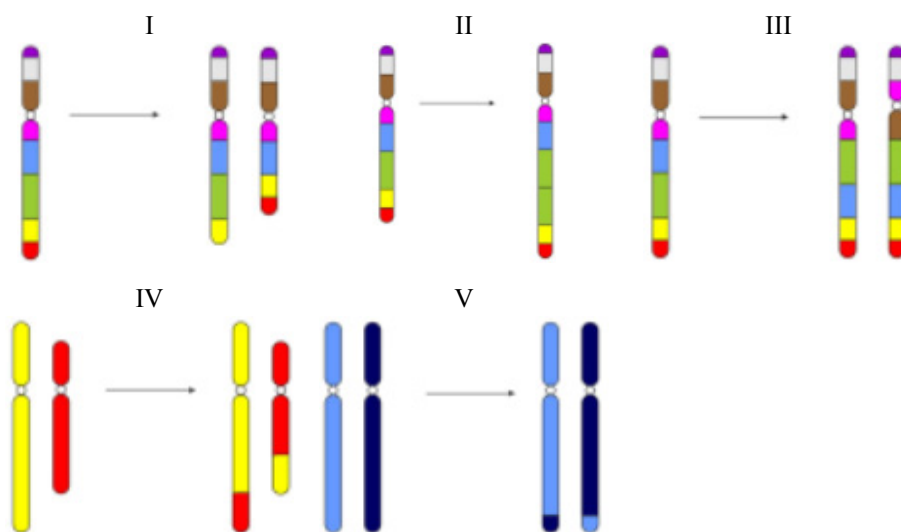
Phe	Asp	Glu	Pro	Leu	Cys	Thr	
5' – TTC	GAT	GAG	CCT	TTG	TGC	ACG	– 3'

Ryc. 7. Rodzaje mutacji genowych [źródło: Nowakowska 2002]

Kolejnym rodzajem mutacji są mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu. Są one wynikiem insercji dodatkowych bądź delecji już występujących zasad w sekwencji genu. Jeśli liczba usuniętych lub wbudowanych nukleotydów nie jest wielokrotnością trzech – dochodzi do przesunięcia ramki odczytu, co w konsekwencji skutkuje zmianie sekwencji aminokwasów kodowanego białka. Mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu wywołuje drastyczne zmiany w strukturze białka (Ryc. 7c). Mutacje ciche związane są z trzecią zasadą kodonu i nie powodują zmiany w sekwencji aminokwasów i w białku oraz fenotypie. Mutacje te wykazują tendencję do gromadzenia się i tworzenia polimorfizmu genetycznego, tym samym przyczyniając się do powstania zmian w sekwencji DNA poszczególnych gatunków (Ryc. 7d) [Winter i in. 2000, Nowakowska 2002].

Mutacje chromosomowe (inaczej aberracje chromosomowe) związane są ze zmianami strukturalnymi w dłuższych sekwencjach DNA. Polegają na przerwaniu ciągłości chromosomu. Mutacje chromosomowe powodują zwykle całkowitą utratę aktywności biologicznej kodowanego białka. Tego typu mutacje zachodzą w obrębie chromosomów (mutacje wewnątrzchromosomowe) bądź między chromosomami (mutacje międzychromosomowe). Wśród mutacji chromosomowych wyróżnia się (Ryc. 8): delecje (utrata odcinka chromosomu i informacji genetycznej, która jest w nim zawarta), deficyjencję (utrata końcowego odcinka w chromosomie), duplikacje (podwojenie części chromosomu), inwersje (odwrócenie odcinka chromosomu, a co za tym idzie kolejności genów) oraz translokacji (przeniesienie pewnego fragmentu chromosomu w nowe miejsce, doprowadzając do zmiany kolejności genów). Inwersje oraz delecje to zmiany wewnątrzchromosomowe, a translokacje i duplikacje są zmianami wewnątrz- oraz międzychromosomowymi [Rieger i in. 1974, Nowakowska 2002].

Mutacje genomowe związane są ze zmianą liczby całych chromosomów. Powodują powstanie komórek bądź organizmów heteroploidalnych (poliploidów lub aneuploidów) w porównaniu z liczbą genomów właściwą dla odpowiedniego gatunku. Wśród mutacji genomowych wyróżnia się poliploidy – mające trzy, cztery bądź pięć kompletnych zespołów chromosomowych; oraz aneuploidy – posiadające jeden, dwa lub więcej pełnych chromosomów poniżej bądź powyżej podstawowej liczby dla danego gatunku [Rieger i in. 1974, Nowakowska 2002].



Ryc. 8. Rodzaje mutacji chromosomowych: I. delecja, II. duplikacja, III. inwersja 1, IV. translokacja interchromosomalna (zewnętrzna), V. translokacja intrachromosomalna (wewnętrzna)

2.2.2.5. Regeneracja z pojedynczych zmutowanych komórek

W kulturach roślinnych wykorzystywany jest morfogenetyczny potencjał komórek roślinnych, związany z totipotencją. Zjawisko to dotyczy nieograniczonych zdolności komórek do dzielenia się, a co za tym idzie odtworzenia całego organizmu [Bartkowiak-Wieczorek i in. 2004]. Komórki dzielące się znaleźć można w tkankach twórczych – merystemach pierwotnych jak również w tkankach zróżnicowanych, czyli merystemach wtórnych [Malepszy 2001]. Komórki merystemów tworzą tkanki, a ich skład genetyczny ma istotny wpływ na fenotyp nowej rośliny. Stosując w trakcie hodowli mutacyjnej czynnika mutagennego, dochodzi do działania na zróżnicowany strukturalnie merystem. Mutacja zachodzi w jego pojedynczych komórkach i obejmują część rośliny [Muszyński 1976, Tymoszuć 2015]. Podczas rozwoju napromienionej rośliny, może dojść do selekcji diplontowej bądź diplontycznej, podczas ma miejsce eliminacja zmutowanych komórek w głębszych warstwach tkanek przez szybko dzielące się i bardziej żywotne komórki, które z kolei nie są zmutowane [Tymoszuć 2016]. W wyniku działania czynnika mutagennego, często dochodzi do powstania chimer z pojedynczej zmutowanej komórki [Broertjes 1966, Broertjes i in. 1983, Broertjes i van Harten 1988]. Rodzaj uzyskanej w ten sposób chimery zależy od czynnika sprawczego oraz położenia zmienionej, pojedynczej komórki [Szymkowiak i in. 1996].

2.2.2.6. Regeneracja przez pędy przybyszowe

Metoda pędów przybyszowych polega na powstawaniu organów przybyszowych z komórek niemerystycznych. Dzięki zastosowaniu tej metody dochodzi do powstawania roślin, które charakteryzują się mniejszą stabilnością genetyczną, gdyż stosowane eksplantaty nie zawierają merystemu. Do tej metody jako eksplantaty sprawdzają się fragmenty międzywęźli oraz korzeni, płatki kwiatów i ich szypułki, ogonki oraz blaszki liściowe, łuski cebul (bez pąków), a także wycinki bulw i kłączy. Należy jednak zaznaczyć, iż wydajność regeneracji jest zależna od położenia eksplantatu na roślinie macierzystej [Zalewska i in. 2010, Zalewska i Miler 2010, Jerzy i Krzywińska 2011]. W trakcie procesu organogenezy przybyszowej merystemy przybyszowe powstają zawsze z jednej komórki eksplantatu [Jerzy i Krzywińska 2011].

W trakcie organogenezy przybyszowej ma miejsce odróżnicowanie komórek i powstanie tak zwanych centrów merystematycznych, czyli skupisk dzielących się w sposób intensywny. Wyróżnia się bezpośrednią regenerację pędów przybyszowych bez udziału tkanki kalusowej oraz pośrednią, gdzie pierwotnie występuje kalus, a następnie z niego regenerują organy przybyszowe [Stefaniak 2004]. Pędy przybyszowe uzyskać można w sposób dwójaki, gdyż mogą one regenerować endogennie (z głębszych warstw parenchymy) oraz egzogennie (z komórek epidermy). Regeneracja pędów przybyszowych może odbywać się w trakcie regeneracji korzeni przybyszowych, a także może wyprzedzać ryzogenezę bądź występować po niej [Teixeira da Silva 2003, Jerzy i Krzywińska 2011].

Z hodowlanego punktu widzenia możliwość regeneracji pędów przybyszowych z fragmentów poddanych czynnikowi mutagennemu (np. promieniowaniu) jest niezwykle cenna. Uzyskane rośliny wówczas są jednorodnymi genetycznie mutantami, gdyż pochodzą z pojedynczych, poddanych mutacji komórek eksplantatu [Broertjes i van Harten 1988, Jerzy 1997, Zalewska 2010, Miñano i in. 2014, Tymoszuć 2016]. Zjawisko organogenezy przybyszowej może być wykorzystane podczas separacji chimer, gdyż często podczas trwania hodowli uzyskuje się chimery meryklinarne oraz sektorialne, w których tylko pewien obszar merystemu ulega zmianie. Dzięki regeneracji roślin właśnie z tego fragmentu istnieje możliwość uzyskania cennego genotypu, którego można by nie odseparować *in vivo*. Ponadto organogeneza przybyszowa może być pośrednia, przez co może towarzyszyć jej obecność zmienności somaklonalnej. W rezultacie można uzyskać wiele nowych i cennych odmian. Tak więc, technika ta jest istotna w utrwalaniu zmienności ujawniającej się podczas hodowli [Zalewska i in. 2007, Jevremović i in. 2012, Tymoszuć 2016].

2.2.2.7. Embriogeneza somatyczna (ES)

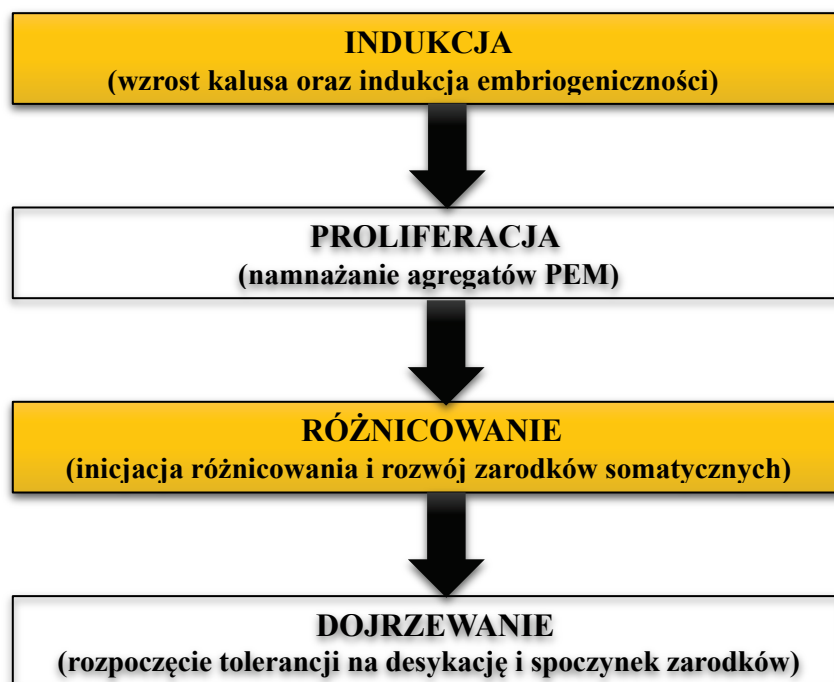
Embriogeneza somatyczna jest procesem wieloetapowym, który prowadzi do powstania zarodków somatycznych z komórek wegetatywnych bez udziału gamet oraz w konsekwencji – zapłodnienia [Stefaniak 2004, Lema-Rumińska i Kulus 2012]. Została ona po raz pierwszy opisana po raz pierwszy przez Starsburgera w 1978 roku [Kępczyński i Kępczyńska 2001]. Zachodzi ona zazwyczaj wieloetapowo, zaczynając od powstania masy proembriogenicznej, dalej poprzez formowanie się zarodka somatycznego i jego dojrzewanie (Ryc. 4), kończąc na kiełkowaniu rośliny [Kulpa 2012]. Do zapoczątkowania tego procesu stosowane są fragmenty kwiatostanu, liścia, hipokotyl, cienkie części pędu, nierozwinięte pąki kwiatowe oraz korzeń [Kulpa 2012, Lema-Rumińska i in. 2013]. Zarodki somatyczne są strukturami dwubiegunowymi, w których dzięki zaistnieniu rozwojowi dochodzi do polaryzacji pęd-korzeń. Zarodki nie wykazują połączenia waskularnego z tkanką rodzicielską [Zenkteler 1984]. Regenerują one z pojedynczych komórek wegetatywnych danego eksplantatu w stosunkowo krótkim czasie [May i Trigiano 1991, Lema-Rumińska i Kulus 2012].

Dokonano wielu badań związanych z powstawaniem zarodków somatycznych w kulturach *in vitro* [Gholami i in. 2013]. Podobnie do organogenezy przybyszowej, regeneracja zarodków przebiega w sposób bezpośredni – z komórek bądź tkanek eksplantatu, gdzie nie jest wytwarzany kalus oraz pośredni przez fazę kalusa (prolifracja komórek) [Jasrai i in. 2003, Bach 2005, Kuo i in. 2005]. Proces odbywający się poprzez wytwarzanie kalusa określany jest terminem nazywanym „wtórną embriogenezą somatyczną”. Wydajność mikrorozmnażania jest ściśle zależna od wyboru drogi rozwoju zarodka somatycznego [Gholami i in. 2013, Campos i in. 2017].

Bezpośrednia embriogeneza somatyczna związana jest z procesem formowania zarodków somatycznych bezpośrednio z komórek eksplantatów (np. liści czy korzeni). Zachodzi ona dzięki właściwościom proembriogenicznych komórek somatycznych, które posiadają zdolność do totipotencji, a także charakteryzują się dużą aktywnością metaboliczną i podziałową w wyniku izolacji komórek z rośliny matecznej. Głównym czynnikiem stymulującym proces jest obecność w pożywce egzogennej auksyny [Campos i in. 2017]. Natomiast embriogeneza pośrednia związana jest z odróżnicowaniem żywych komórek eksplantatu do stanu merystematycznego. Następnie dochodzi do powstania kalusa embriogenicznego, który posiada tak zwane embriogenicznie indukowane, zdeterminowane komórki. Wytworzoną tkankę kalusową przenosi się następnie do pożywki stałej bądź płynnej, która jest pozbawiona auksyn lecz zawierającą duże ilości cytokininy. Dzięki temu zamiast powstania pędów przybyszowych, tworzą się pojedyncze komórki masy proembriogenicznej, które prowadzą do pojawienia się

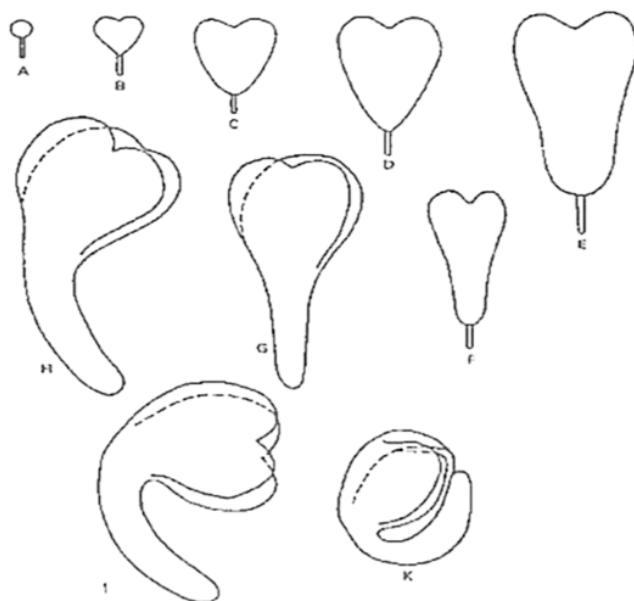
somatycznych zarodków. Proces ten odbywa się jedynie w odpowiednio uregulowanych warunkach, tj. braku światła i występowania regulatorów wzrostu [Bach 2005, Campos i in. 2017]. Podczas trwania embriogenezy pośredniej zaangażowane są dwie fazy – indukcja oraz różnicowanie (ekspresja). Indukcja dotyczy zmian w ekspresji genów oraz w metabolizmie, co następnie skutkuje różnicowaniem się w embriony podczas fazy ekspresji [Solís-Ramos i in. 2012].

Proces embriogenezy somatycznej składa się z czterech następujących po sobie faz (Ryc. 9): indukcji (podczas której odróżnicowane komórki somatyczne są zdolne do embriogenezy), namnażania (w trakcie której dochodzi do proliferacji agregatów proembriogenicznej masy komórek – PEM), różnicowania (w tym etapie zachodzi wiele procesów chemicznych, morfologicznych oraz fizjologicznych – procesy te są ściśle ze sobą powiązane; w wyniku zachodzących procesów komórki się specjalizują, zmieniając swoje właściwości ukazują swoje właściwości embriogenne kształtując się w zarodki somatyczne) oraz dojrzewania (podczas tego etapu otrzymuje się funkcjonalne zarodki, z których następnie można uzyskać rośliny) [Szczygieł 2005, Kępczyński i Kępczyńska 2001, Latkowska 2002, Kępczyńska 2006].



Ryc. 9. Schemat pośredniej somatycznej embriogenezy na podstawie monografii Kępczyńskiej (2006) – embriogeneza dwuetapowa (kolor żółty) oraz jednoetapowa [źródło: Kępczyńska 2006]

Rozwój zarodka somatycznego odbywa się w sposób podobny do zarodków zygotycznych, których rozwój ma miejsce w woreczku zalążkowym. U roślin dwuliściennych w czasie rozwoju zarodków somatycznych można wyróżnić następujące po sobie etapy: kuliste, wczesno sercowate, sercowate, późno sercowate, wczesnej torpedy, torpedy, późnej torpedy, laski, dojrzałości oraz dojrzałe (Ryc. 10) [Zenkteler 1984, Kępczyńska 2006].



Ryc. 10. Stadia rozwojowe zarodka: A – kuliste; B – wczesno sercowate; C – sercowate; D – późno sercowate; E – wczesnej torpedy; F – torpedy; G – późnej torpedy; H – laski; I – dojrzałości, K – dojrzałe [wg Willmar i Helendoorn 1968; źródło: Zenkteler 1984]

Przydatność stosowania embriogenezy somatycznej do produkcji masowej roślin zależy głównie od jakości powstałych zarodków. Z uwagi na szansę identyfikacji, konserwacji a także wyodrębnienia mutacji, która pojawia się na małym obszarze tkanki roślinnej, embriogeneza somatyczna posiada istotną przewagę nad regeneracją roślin przez pędy [Tymoszuk i in. 2014]. Metoda ta może stanowić źródło zmienności w celu uzyskania nowych odmian (hodowli), a w przypadku egzemplarzy niebędących chimerami, przy zachowaniu stabilności nowopowstałych roślin, zapewnia otrzymanie dużej ilości materiału roślinnego w bioreaktorach [George i in. 2008, Kulus i in. 2016]. Embriogeneza somatyczna z powodzeniem może być również wykorzystana w procesie transformacji genetycznej, gdyż jeżeli przebiega ona w sposób pośredni – dochodzi do rozwoju kalusa, który zawiera ogromną populację embriogenicznych komórek, które są

podatne na transformację. Warto zaznaczyć, iż każda transformowana komórka umożliwia powstanie niezależnej transgenicznie linii [Kulus i in. 2016].

2.3. Fizyczne i chemiczne czynniki mutagenne

W środowisku naturalnym występuje zjawisko spontanicznych mutacji, które wywoływane jest przez promieniowanie kosmiczne a także ultrafioletowe, pochodzące od słońca. Występują one najczęściej jako mutacje punktowe. W wyniku zaistniałych mutacji powstają mutanty (sporty), które są nowymi odmianami różniącymi się od rośliny wyjściowej pewnymi cechami (barwą, kształtem, siłą wzrostu). Wyodrębnienie mutacji spontanicznej jest stosunkowo tanie i szybkie, jednakże częstotliwość jej występowania jest stosunkowo niska (10^{-6} - 10^{-9}) [van Harten 1991, Nowakowska 2002]. Spowodowane to jest obecnością mechanizmów naprawczych DNA, które efektywnie reperują większość zachodzących zmian [Jerzy 1997]. Częstość występowania mutacji można istotnie zwiększyć, nawet tysiąckrotnie, poprzez działanie na komórki bądź całe organizmy zewnętrznymi czynnikami fizycznymi a także chemicznymi, powodując liczne uszkodzenia w strukturze DNA. Takie czynniki są określane mianem „mutageny” [Węgliński 1998, Nowakowska 2002].

Do najczęściej stosowanych czynników fizycznych wywołujących mutacje są promieniowanie jonizujące (X , α , β , γ , a także protony i neutrony), elektromagnetyczne, ultrafioletowe (UV), a także radioaktywne izotopy pierwiastków (np. Rad, ^{32}P , ^{35}S , ^{60}Co) [Broertjes i van Harten 1988, Rogalska i in. 1999, Nowakowska 2002, Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. Skutkiem działania promieniowania jonizującego są aberracje chromosomowe i zmiany w sekwencji DNA [Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. Promieniowanie jonizujące o dużej energii (X , γ) ma zdolność do penetracji w głąb tkanek i wywołania wzbudzenia atomów napotkanych cząsteczek. Dochodzi przez to do uwolnienia elektronów i powstania dodatnio naładowanych wolnych rodników, które reagują z innymi cząsteczkami, powodując rozchwianie równowagi energetycznej komórek, a w konsekwencji uszkodzenia DNA i chromosomów [Rogalska i in. 2005]. Wyróżnia się bezpośrednie i pośrednie efekty działania promieni jonizujących na cząsteczkę DNA. Bezpośrednie wynikają z bezpośredniego oddziaływania energii promieniowania ze składnikami DNA, a pośrednie związane są z reakcją z wolnymi rodnikami. Pośrednie i bezpośrednie oddziaływanie promieni jonizujących na strukturę DNA doprowadza do pęknięć w jednej bądź obu niciach, powodując aberracje chromosomowe [Rogalska i in. 1999, Nowakowska 2002]. Promieniowanie X pochodzi z aparatu rentgenowskiego. Jego źródłem jest radioaktywny izotop kobaltu (tzw. bomba kobaltowa; ^{60}Co) bądź izotop cezu (^{137}Cs) [Jerzy 1997, Tymoszuć

2015]. Neutrony jako cząsteczki niemające ładunku elektrycznego wykazują silne działanie jonizujące. Dzięki swojej szybkości z powodzeniem wykorzystywane w mutacjach typu delecje [Bryszewska i Leyko 1997]. Powszechnie znana metoda „deleteagene”, wykorzystuje strumień szybkich neutronów do bombardowania nasion roślin dzikiego typu [Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. Promieniowanie niejonizujące (ultrafioletowe; UV), o długości fali 260 nm, nie powoduje indukcji procesu jonizacji. Ma mniejszą energię, przez co penetruje głównie wierzchnie warstwy komórkowe. Promieniowanie ultrafioletowe wnika w głąb tkanki roślinnej i ulega rozproszeniu na atomach, powodując w nich stan wzbudzenia (wybijając elektrony z zewnętrznych orbit do poziomów charakteryzując się wyższą energią). W wyniku zastosowania promieniowania UV powstają cyklobutanowe dimery pirymidynowe, które zaburzają strukturę DNA, uniemożliwiają prawidłowy przebieg replikacji [Bryszewska i Leyko 1997, Rogalska i in. 1999, Maluszyńska i in. 2003, Nowakowska 2002, Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. Stosowane promieniowanie może być ciągle (obejmujące cały okres wegetacyjny bądź określone etapy wzrostu i rozwoju rośliny) lub krótkotrwały (uderzeniowy). Działanie uderzeniowe poprzez zastosowanie pojedynczej dawki jest bardziej efektywne, subtelne oraz często wywołuje efekt letalny [Jerzy 2000]. Dawki pochłonięte przedstawione są w grejach (Gy), gdzie 1 Gy odpowiada 1 dżulowi (J) energii promieniowania, które jest pochłonięte przez ciało o masie równej 1 kilograma [Ahloowalia i Maluszynski 2001]. Wysokość optymalnej dawki jest zależna od gatunku roślin oraz rodzaju materiału roślinnego. Eksplantaty *in vitro* traktowane są niższymi dawkami aniżeli sadzonki pędowe [Jerzy 2000]. Napromieniowaniu nie poddaje się całych roślin. Stosowanie promieniowania na tkankę niemerystematyczną zwiększa szansę uzyskania stabilnego, jednorodnie zmienionego mutantu [Jerzy 1997]. W zależności od fazy rozwojowej danej komórki zastosowanie promieniowania wywołuje poszczególne mutacje: faza G1 – aberracje chromosomowe, faza G2 – aberracje chromatynowe, stadium S – aberracje mieszane (chromosomowo-chromatynowe) [Rogalska i in. 2005]. Innymi czynnikami, które są zaliczane do mutagenów fizycznych zalicza się ultradźwięki o różnej częstotliwości (od 500 do 2000 kHz), prowadzące do podziału DNA na fragmencie oraz ciepło, indukujące mutacje punktowe [Winter i in. 2000, Nowakowska 2002].

Mutacje chemiczne wykorzystują czynniki alkilujące, które mają zdolność do modyfikowania puryn i pirymidyn. Zmiany te związane są z przenoszeniem grup alkilowych na pierścienie zasad azotowych. Działania mutagenne powodują zmiany we właściwościach parowania zasad. Czynniki alkilujące wywołują transycje, transwersje oraz delecje [Nowakowska 2002, Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. Wśród mutagenów chemicznych wyróżnia się m. in.: metano-

sulfonian etylu (EMS), siarczan dietylowy (DES), diepoksybutan (DEB), etyloimina (EI), N-nitrozo-N-etylomocznik (NEU), N-nitrozo-N-metylomoczan (NMUT), N-nitrozo-N-metylomocznik (NMU), oraz azydek sodu (AS) [Rogalska i in. 1999, Nowakowska 2002]. Metylenosulfonian etylu (EMS) – jest jednym ze związków chemicznych, które standardowo stosowane są do mutagenyzy roślin. EMS powoduje najczęściej tranzycję [Maluszyńska i in. 2003, Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. N-metylo-N-nitrozomocznik (MHN) wprowadza natomiast modyfikacje zachodzące w zasadach azotowych. Inny związek alkilujący – diepoksybutan (DEB) powoduje powstawanie delecji oraz mutacje punktowe [Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007]. Niektóre związki chemiczne takie jak etyloimina (EI) czy N-nitrozo-N-etylomocznik (NEU) charakteryzują się występowaniem cech radiomimetycznych. Substancje te powodują uszkodzenia w DNA podobne do działania promieniowania jonizującego. Innym związkami wykorzystywanymi w mutagenyzy roślin są: hydrochlorek 9-aminoakrydyny (9AA) (umożliwia interkalowanie pomiędzy zasady azotowe znajdujące się w strukturze DNA), analogi zasad azotowych (strukturalnie podobne do zasad znajdujących się w DNA) – np. analog tyminy – 5-bromouracyl (5BU), związki interkalujące (płaskie cząsteczki, które zaburzają replikację DNA i przesuwające ramkę odczytu) – np. bromek etydyny, kwas azotawy (powodujący deaminację adeniny do hipoksantyny czy cytozyny do uracylu) oraz azydek sodu NaN_3 [Winter i in. 2000, Nowakowska 2002, Sobkowiak i Szweykowska – Kulińska 2007].

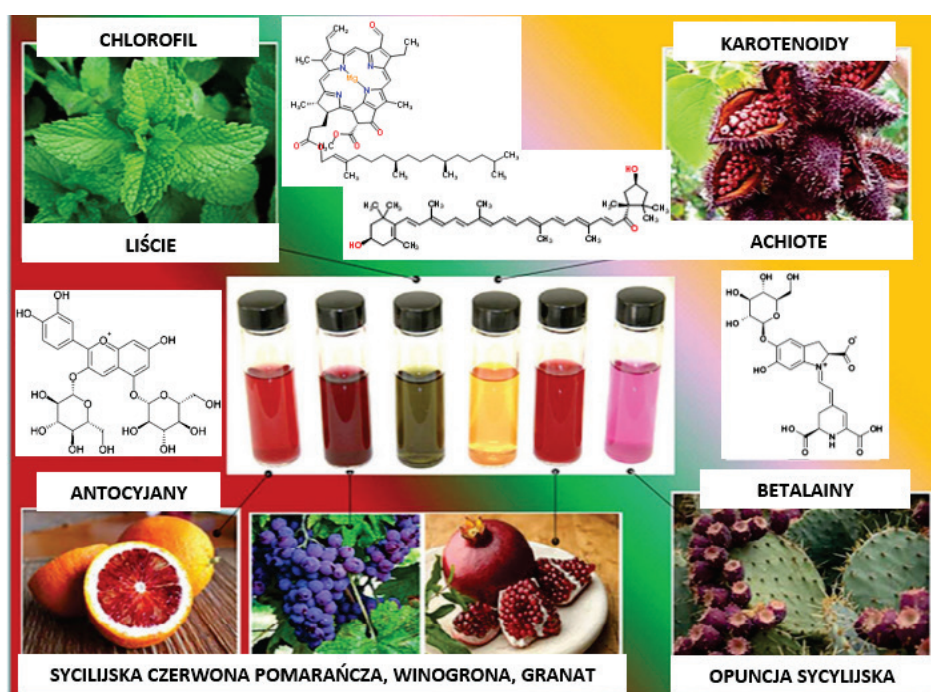
2.3.1. Barwniki roślinne a barwa roślin

Sekret związany z pigmentacją roślin jest jednym z najstarszych obiektów zainteresowań botaników i hodowców roślin. Pierwsze wzmianki dotyczące karotenoidów pojawiły się na samym początku XIX wieku. Natomiast pojęcie „chlorofil” zostało użyte po raz pierwszy w 1818 roku [Davies 2004, Młodzińska 2009]. Barwniki (pigmenty) roślinne są substancjami, które występują naturalnie w barwnych ciałkach – czyli chromatoforach [Wrona i Głowacki 2005].

Barwniki roślinne można podzielić na dwie grupy: płynne (zgromadzone w skórce) i stałe (znajdujące się w głębszych warstwach tkankowych) [Bobula 2001, Wrona i Głowacki 2005]. Występują one dość rzadko w postaci wolnej – raczej związane są z białkami i cukrami. Barwniki roślinne znajdują się w różnych miejscach organów roślinnych. Barwniki rozpuszczające się w wodzie (typu antocyjany czy betalainy) występują w soku komórkowym w wakuolach, a te rozpuszczające się w tłuszczach znajdują się w plastydach (chlorofil w chloroplastach, karotenoidy w chromoplastach) [Davies 2004, Młodzińska 2009, Bołonkowska i in. 2011]. Na barwę związku wpływa jego struktura chemiczna

(Ryc. 11). Biorąc pod uwagę funkcję barwników roślinnych, ich występowanie oraz budowę można je podzielić na pięć grup:

- barwniki będące pochodnymi pirolu: barwniki porfiryne (chlorofile, fikobiliny, pochodne benzopirołu);
- barwniki będące pochodnymi pirymidyny (ryboflawina);
- barwniki chinoidowe (pochodne benzochinonu, naftachinonu i antrachinonu);
- karotenoidy: karoteny i ksantofile;
- flawonoidy: antocyjany, flawonole i flawony [Blaim 1967, Wrona i Głowacki 2005, Bołonkowska i in. 2011, Calogero i in. 2014].



Ryc. 11. Barwniki ekstrahowane z chlorofilów, antocyjanów, betalain i karotenoidów obejmują całą widzialną część widma elektromagnetycznego [źródło: Calogero i in. 2014]

Barwniki roślinne mają wiele funkcji istotnych dla życia roślin. Chlorofile oraz karotenoidy biorą istotny udział w procesie fotosyntezy. Natomiast inne barwniki uczestniczą w procesach oksydoredukcyjnych, nadają barwę kwiatom, owocom i liściom. Spełniają także funkcję ekologiczną, stanowiąc powabnię dla owadów. Z uwagi na swoje właściwości, takie jak barwa czy aktywność biologiczna – związki barwne znajdują szerokie zastosowanie w lecznictwie, przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym oraz spożywczym [Wrona i Głowacki 2005,

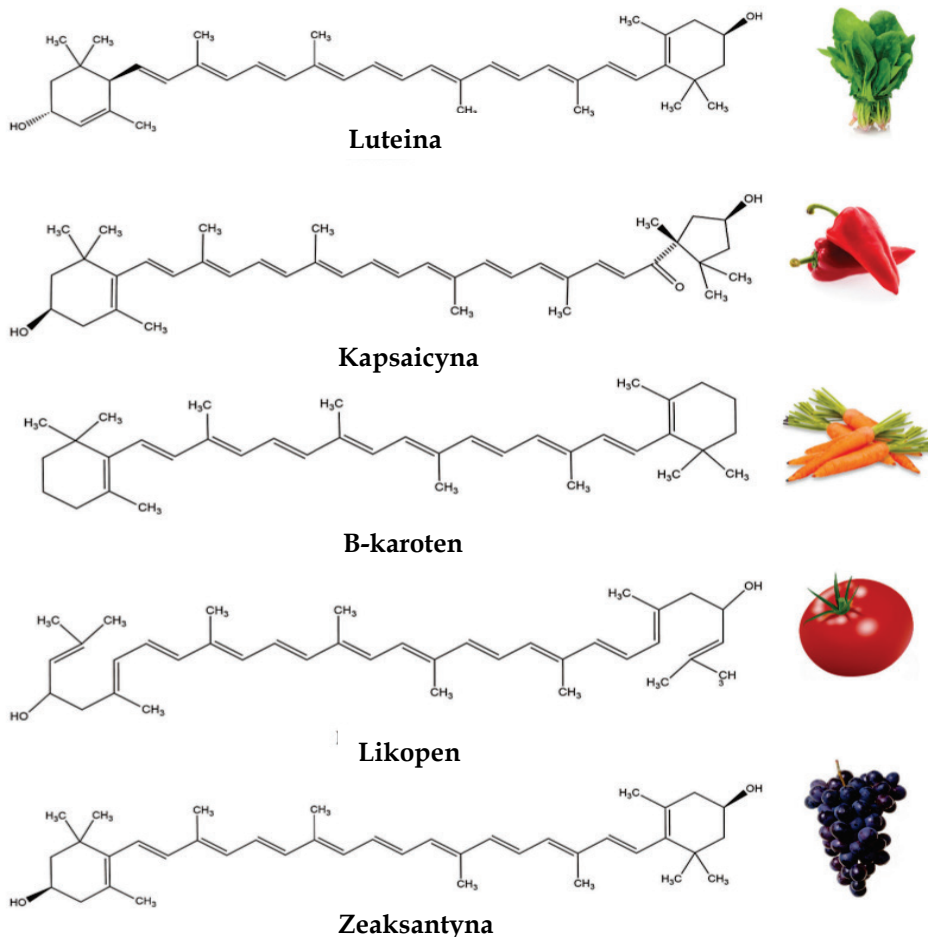
Kozłowski 2002a, 2002b, 2002c, 2002d, 2002e, Bołonkowska i in. 2011, Sudhakar i in. 2016].

2.3.2. Karotenoidy

Karotenoidy od wielu lat były interesującym obiektem badań naukowców. Prowadzone liczne eksperymenty dotyczyły nie tylko ich identyfikacji, ale także ich wpływu na organizmy [Gryszczyńska i in. 2011]. Karotenoidy stanowią dużą grupę pigmentów terpenoidowych (liczących ponad 600-700 związków), które występują w bakteriach fotosyntetycznych, algach, grzybach, komórkach roślin wyższych oraz zwierzęcych [Rodriguez-Cincepcion i in. 2018, Kolašinac i in. 2021]. Pochłaniają one światło na długościach fal niedostępnych dla chlorofilu (460-550), inicjując pierwotne procesy fotochemiczne zachodzące podczas fotosyntezy [Kolašinac i in. 2021]. Pigmenty te można podzielić na dwie grupy: pomarańczowo-czerwone karoteny oraz żółto-pomarańczowe ksantofile. Barwa ta jest wynikiem występowania co najmniej siedmiu układów chromoforowych [Młodzińska 2009, Křížová 2013, Bogacz-Radomska i Harasym 2016].

Karotenoidy są tetraterpenami, które zawierają w swojej strukturze około 40 atomów węgla. Charakteryzują się one budową alifatyczną lub alicykliczną. Mają zazwyczaj osiem jednostek izoprenowych w taki sposób, że dwie grupy metylowe, które znajdują się w pozycji najbliższej części centralnej są w pozycji 1 oraz 6, podczas gdy pozostałe są w pozycji 1 oraz 5. Szereg połączonych ze sobą wiązań podwójnych powodują powstanie systemu chromoforowego. Karotenoidy powszechnie, ze względu na zygzakowatą budowę łańcuchów, zalicza się do podgrupy barwników polienowych. Wśród karotenoidów wyróżnia się głównie dwie grupy: karoteny oraz ksantofile [Blaim 1967, Wrona i Głowacki 2005, Křížová 2013, Bogacz-Radomska i Harasym 2016].

Karoteny są węglowodorami nienasyconymi o barwie żółto-czerwonej. Powszechnie wyróżnia się trzy odmiany izomeryczne karotenu, które różnią się rozmieszczeniem wiązań podwójnych w strukturze: α -karoten, β -karoten oraz γ -karoten. Karoteny występują powszechnie w korzeniach roślinnych (np. u marchwi w chromoplastach), w warzywach (np. u pomidora i papryki). Są nierozpuszczalne w wodzie. Natomiast z powodzeniem rozpuszczają się w olejach, rozpuszczalnikach tłuszczów oraz samych tłuszczach. W świecie roślin spotkać można najczęściej β -karoten, kapsaicyna oraz likopen (Ryc. 12) [Wrona i Głowacki 2005, Młodzińska 2009, Kolašinac i in. 2021]. Ksantofile są utlenionymi pochodnymi karotenów, zawierającymi w cząsteczce grupy hydroksylowe. Występują między innymi w kwiatach słonecznika, jaskra oraz w owocach. Razem z karotenami i chlorofilem stanowią składnik chloroplastów. Do najczęściej spotykanych ksantofili zalicza się luteinę oraz zeaksantynę (Ryc. 12) [Blaim 1967, Wrona i Głowacki 2005, Kolašinac i in. 2021].



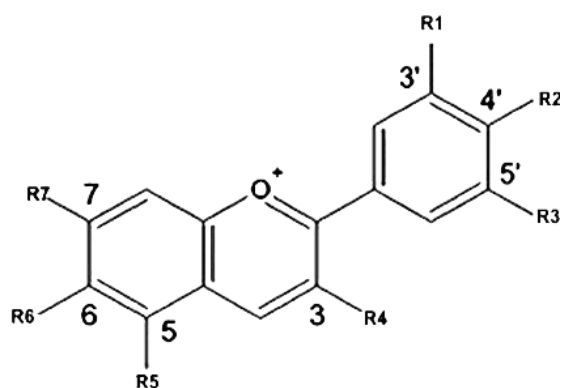
Ryc. 12. Przykłady karotenoidów, ich budowa i występowanie [źródło: Kolašinac i in. 2021]

Karotenoidy u roślin wyższych biorą udział w procesie fotosyntezy oraz ochronie przed nadmiernym promieniowaniem. Występując powszechnie w chromoplastach nadają żółto-czerwono-pomarańczową barwę kwiatom (róża, nagietek), warzywom (pomidor, czerwona papryka, marchew). Mają ponadto zdolność do wchłaniania istotnych składników odżywczych dolistnych – takich jak fosfor czy azot. Stosowane jako barwniki żywności mają oznaczenie E-160, a ich roczną produkcję szacuje się na 100 milionów ton rocznie [Wissgott et Bortlik 1996, Bołonkowska 2011]. W organizmie człowieka karotenoidy będąc przeciwutleniaczami są istotną częścią obrony przed wolnymi rodnikami. Ponadto mają ochronny wpływ na oczy i przeciwdziałają takim chorobom jak zaćma czy zwyrodnienie plamki żółtej. Karotenoidy również mają korzystny wpływ w prewencji

nowotworów ze względu na swoje antyoksydacyjne właściwości [Młodzińska 2009, Bołonkowska 2011].

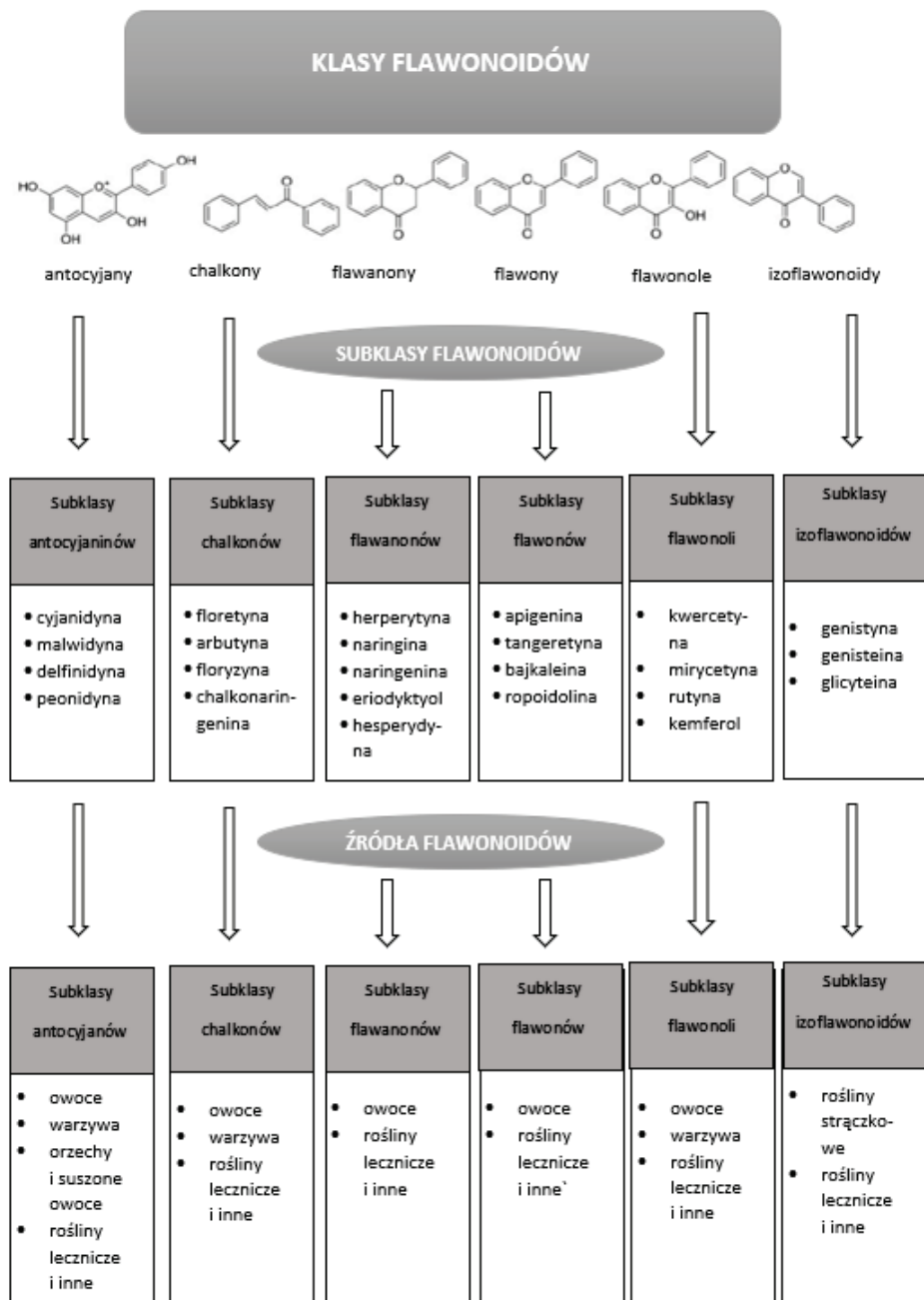
2.3.3. FLAWONOIDY

Flawonoidy to substancje chemiczne z grupy polifenoli, których szkielet podstawowy zawiera 15 atomów węgla ułożonych w dwa pierścienie fenyłowe, połączone mostem trójwęglowym (Ryc. 13) [Arct i Pytkowska 2008, Młodzińska 2009, Bołonkowska 2011, Křížová 2013]. Flawonoidy różnią się między sobą liczbą i miejscem przyłączenia grup hydroksylowych (OH). Wodory w tych grupach mogą być podstawione jednym bądź wieloma podstawnikami cukrowymi bądź alkilowymi [Horbowicz 2000]. Są one rozpuszczalne w wodzie i absorbują światło w zakresie 280-315 nm. Najczęściej występują one jako żółte barwniki głównie kwiatów i liści w soku komórkowym. Spośród roślin zidentyfikowano ponad 5000-7000 flawonoidów [Horbowicz 2000, Arct i Pytkowska 2008, Młodzińska 2009, Bołonkowska 2011, Křížová 2013].



Ryc. 13. Budowa podstawowego szkieletu flawonoidowego, składającego się z 15 atomów węgla i dwóch pierścieni aromatycznych [źródło: Młodzińska 2009]

Tą szeroką grupę związków dzieli się (z uwagi na stopień utlenienia układu heterocyklicznego oraz liczby i umiejscowienia grup hydroksylowych znajdujących się przy pierścieniach) na wiele klas, m.in.: aurony (o intensywnie żółtym zabarwieniu), antocyjanidyny, chalkony (barwniki jasnożółte), flawony (o barwie jasnożółtej i kremowej), flawonole (wyróżniające się barwą intensywnie żółtą), flawanony (bezbarwne) (Ryc. 14). W obrębie tych grup widzi się również szeroką różnorodność. Należy podkreślić, iż flawony oraz flawonole są istotnymi barwnikami roślinnymi [Crozier i in. 2009, Bołonkowska 2011, Křížová 2013].



Ryc. 14. Klasy, subklasy i naturalne źródła pochodzenia flawonoidów [źródło: Panche i in. 2016]

Flawonoidy pełnią różnorodną funkcję: odpowiadają za kolor kwiatów i owoców, tworzą barierę przed promieniowaniem UV oraz temperaturą, wykazują działanie przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Ponadto wspomagają mechanizmy tolerancji na wysokie stężenia metali ciężkich czy stymulują procesy mikoryzy, są naturalnymi repelentami [Horbowicz 2000, Krasowska i Łukaszczyk 2003, Jasiński i in. 2009, Młodzińska 2009]. Mają również istotne znaczenie w biosyntezie auksyn, które są ważnymi regulatorami stymulującymi wzrost i rozwój roślin. Często są także odpowiedzialne za kolor, smak i jędrność tkanek roślinnych [Moore 1989, Horbowicz 2000]. Flawonoidy zwiększają drożność, uszczelniają i wzmacniają naczynia krwionośne (zapobiegając występowaniu żylaków, krwawień, miażdżycy), hamują rozprzestrzenianie się wirusa opryszczki [Aret i Pytkowska 2008, Młodzińska 2009, Křížová 2013].

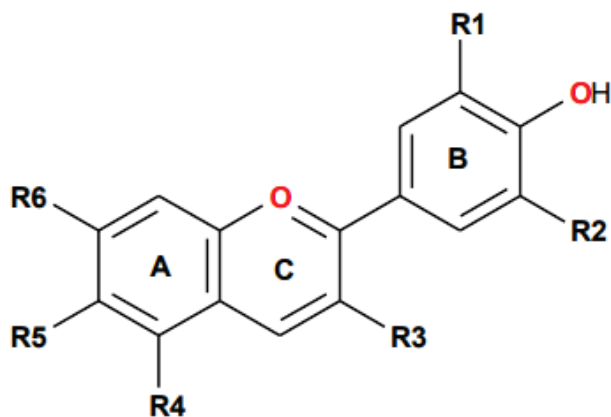
Nazwa ta została pierwszy raz użyta w 1835 r. do określenia niebieskich barwników chabrowych przez Marquarta. Znanych jest obecnie kilkaset naturalnych barwników antocyjanowych [Mosiewicz 2002, Piątkowska i in. 2011, Křížová 2013, Szaniawska i in. 2015]. W komórkach występują w wakuolach w postaci granulek o różnej wielkości. Nadają one między innymi płatkom kwiatów, liściom, owocom i łodygom jaskrawoczerwoną, czerwoną (przy pH kwaśnym), niebieską a nawet fioletową (przy pH zasadowym) barwę (Ryc. 15) [Młodzińska 2009, Bołonkowska 2011, Piątkowska i in. 2011, Křížová 2013]. Antocyjany pozyskiwane są z winogron czerwonych, aronii i czarnej porzeczki, czernicy, czarnej jagody czy kapusty czerwonej [Piątkowska 2011, Szaniawska i in. 2015].

RODZAJ ANTOCYJANÓW	BARWA
pelargonidyna	pomarańczowa, czerwona
cyjanidyna	fioletowa, czerwona
delfinidyna	niebieska
malwidyna	odcienie fioletu
peonidyna	różowe
petunidyna	odcienie fioletu

Ryc. 15. Najbardziej popularne antocyjany i ich barwy [źródło: Młodzińska 2009]

Podstawową jednostką strukturalną antocyjanów jest antocyjanidyna, która składa się z pierścienia aromatycznego (A) połączonego z heterocyklicznym pierścieniem (C), zawierający tlen. Pierścień węglowy połączony jest wiązaniami -C-C- z trzecim pierścieniem aromatycznym (B) (Ryc. 16) [Konczak i Zhang 2004, Bołonkowska 2011]. Część cukrowa przyłączona jest w pozycjach C-3

(najczęściej), C-5 lub C-7 (najrzadziej) i składa się od jednego do trzech cząstek cukrów prostych [Kohlmünzer 2007, Bołonkowska 2011, Szaniawska i in. 2015]. Antocyjany zaliczane są do związków nietrwałych, które w środowisku wodnym ulegają odwracalnym przemianom wywołującym zmianę barwy [Szaniawska i in. 2015].

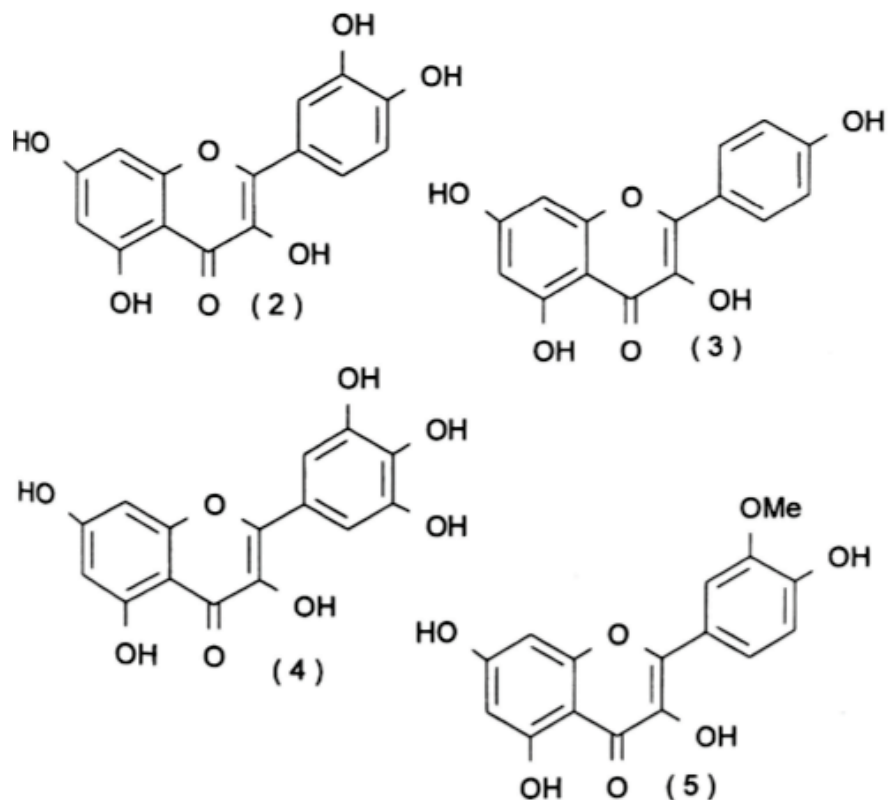


Ryc. 16. Jon flawyliowy – podstawowa struktura antocyjanin [źródło: Młodzińska 2009]

Antocyjany mają duże znaczenie w nadawaniu barwy roślinom i organom roślinnym, w których występują. Wykazują działanie przeciwutleniające oraz antybakteryjne. W żywności stosowane są jako barwnik E-163, wskaźnik do oceny jakości żywności kolorowej. Ponadto mają działanie farmakologiczne i z tego powodu z powodzeniem wykorzystuje się je w celach terapeutycznych (w leczeniu obrzęków, stanów zapalnych, chorób oczu, wątroby, nowotworów, cukrzycy) [Kong i in. 2003, Chattopadhyay i in. 2008, Jasiński i in. 2009, Bołonkowska 2011].

Flawony należą do jednej z klas flawonoidów, który przyciągnął zainteresowanie badaczy na całym świecie. Żółtej barwy związki mają strukturę szkieletową. Składają się one z trójpierścieniowej struktury chemicznej C6-C3-C6 oraz trzech grup funkcyjnych: karbonylowej, hydroksylowej i sprzężonych wiązań podwójnych. Flawony rozpuszczalne są w etanolu oraz w wodzie. Do głównych flawonów zalicza się luteolinę – występującą w brokułach, selerze, marchwi, pietruszce czy kwiatkach chryzantemy, apigeninę i tricetynę – które z powodzeniem można odnaleźć w cebuli, kielkach pszenicy, herbacie czy pomarańczach [Bansal i in. 2017]. Flawony wykazują właściwości lecznicze: przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, przeciwutleniające oraz przeciwnowotworowe [Bansal i in. 2017].

Flawonole są flawonoidami o żółtym zabarwieniu, zawierającymi grupę ketonową. Stanowią budulec proantocyjanów. Flawonole występują w sposób obfity w różnych owocach i warzywach takich jak: cebula, jarmuż, pomidory, jabłka, winogrona. Do flawonów zalicza się: kempferol, kwercetynę, mirycetynę i fisetynę (Ryc. 17). Stosowanie flawonoli w codziennej diecie jest związane z wieloma korzyściami zdrowotnymi, w tym działaniem antyoksydacyjnym oraz przeciwkrwotocznym [Horbowicz 2000, Panche i in. 2016]. Kolejną i zarazem ważną zaletą flawonoli jest ich istotna rola w podtrzymywaniu elastyczności, integralności i odporności na uszkodzenia ścian naczyń krwionośnych [Formica i Regelson 1995, Horbowicz 2000].



Ryc. 17. Wzory chemiczne flawonoli: 2 – kwercetyna, 3 – kempferol, 4 – mrycetyna, 5 – izoramnetyna [źródło: Horbowicz 2000]

2.3.4. Betalainy

Pojęcie „betalaina” wywodzi się z łacińskiej nazwy buraka zwyczajnego – *Beta vulgaris.*, z którego wyodrębniono po raz pierwszy związki betalainowe.

Natomiast nazwę tą wprowadził po raz pierwszy Mabry oraz Dreiding w 1968 roku [Strack i in. 2003]. Do tej pory opisano ponad 50 betalain. Betalainy są naturalnymi barwnikami rozpuszczalnymi w wodzie, występującymi u roślin, bakterii oraz grzybów. Charakteryzują się większą stabilnością w środowiskach kwaśnych w porównaniu z antocyjanami [Strack i in. 2003, Křížová 2013, Contreras-Llano 2019].

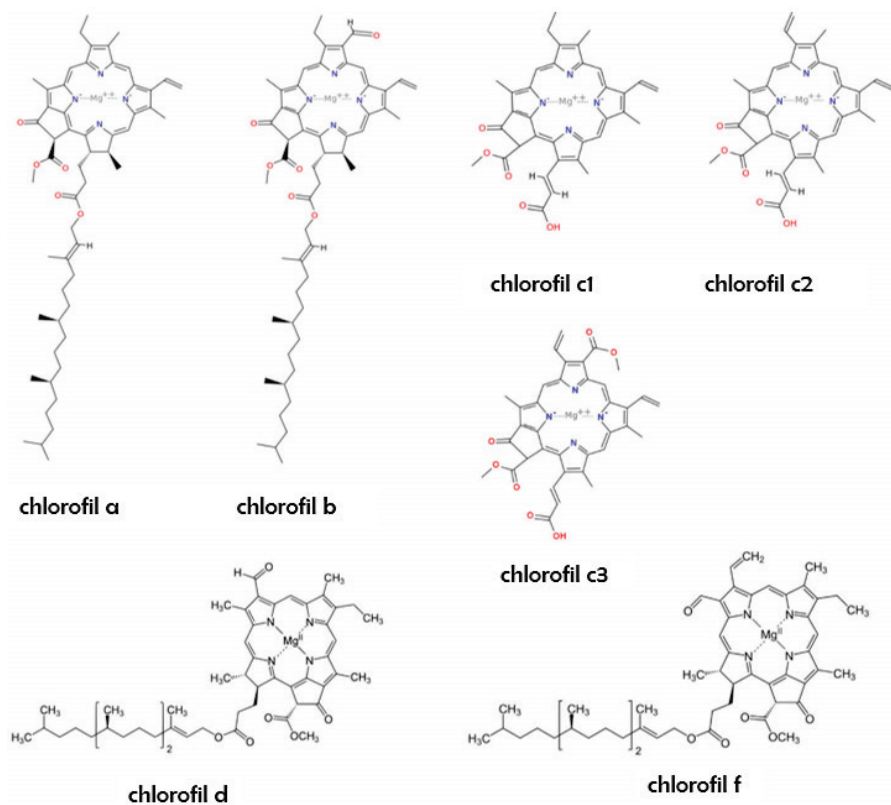
Betalainy w swojej strukturze zawierają heterocykliczny indol. Z uwagi na budowę chemiczną wyróżnia się żółto-pomarańczowe betaksantyny oraz czerwono-fioletowe betacyjaniny [Křížová 2013]. Betacyjaniny to barwniki azotowe, które zbudowane są z kwasu betalainowego u cyklo-DOPA. Układ chromoforowy stanowi żółty kwas betalainowy. Fioletowa barwa betacyjanin powstała w wyniku znacznego wydłużenia układu sprzężonych wiązań podwójnych, dzięki połączeniu kwasu betalainowego z cząsteczką glikozydu [Klewicka 2012].

Barwniki betalainowe mają wiele użytecznych właściwości biologicznych: takich jak przeciwutleniające, chemoprewencyjne, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe i przeciwnowotworowe. W dodatku betalainy poprawiają zdolności poznawcze, redukują stres oksydacyjny [Allegra i in. 2007].

2.3.5. Chlorofile

Dominująca zielona barwa na naszej planecie jest zasługą występowania zielonego barwnika fotosyntetycznego – chlorofilu. Chlorofile stanowią część składową białka roślinnego, który tworzy chloroplasty [Wrona i Głowacki 2005]. Średniej wielkości liść rośliny ma przeciętnie około 70 milionów komórek z pięcioma miliardami chloroplastów, z których każdy zawiera około 600 milionów cząsteczek chlorofilu [Simpson i Knötzel, 1996, Grimm 2001]. Chlorofile znajdują się we wspomnianych liściach roślinnych oraz zielonych częściach roślin, które wystawione są na działanie światła słonecznego [Młodzińska 2009, Bołkowska i in. 2011].

Chlorofile mają umiejętność absorpcji promieniowania świetlnego w zakresie widzialnym, dzięki wiązaniom podwójnym i pojedynczym. Ich główne pasma pochłaniania promieniowania słonecznego występują w części niebieskiej oraz czerwonej widma (od 400 do 800 nm) [Bołkowska i in. 2011]. Wyróżnianych jest wiele odmian chlorofili, które oznaczane są następującymi po sobie kolejnymi literami alfabetu (Ryc. 18). U roślin wyższych wyróżnia się dwa rodzaje chlorofilu: chlorofil a (zielono-niebieski) oraz chlorofil b (zielono-żółty). Ilość chlorofilu jest zależna od gatunku rośliny, warunków świetlnych i dostępności minerałów (głównie magnezu). Należy zaznaczyć, iż chlorofilu a jest 2-4 razy więcej niż chlorofilu b. Jednakże rośliny rosnące mają przewagę chlorofilu b [Strzałka 2005, Dżugan 2006, Młodzińska 2009, Bołkowska 2011].

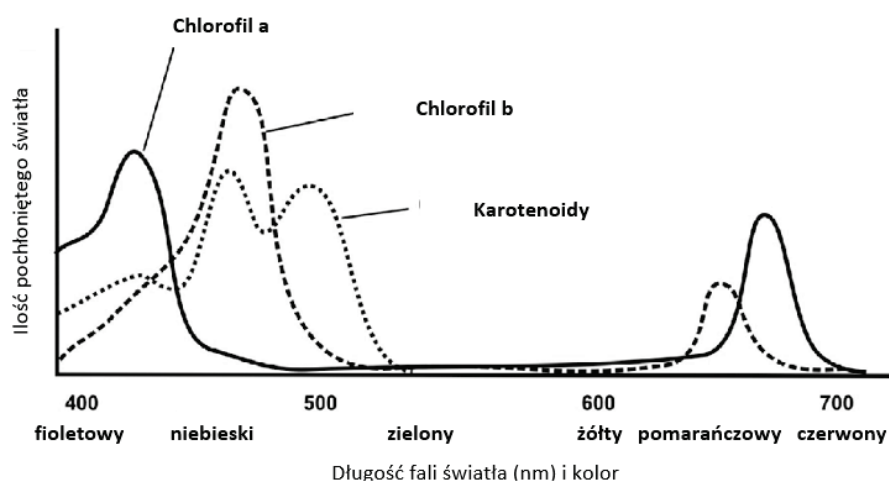


Ryc. 18. Różne typy i struktury chlorofilów [źródło: Pareek i in. 2017]

Cząsteczka chlorofilu jest pochodną porfiryny, której główny szkielet stanowi układ czterech pierścieni pirolowych, zawierających w centrum atom magnezu, który pełni istotną rolę w absorpcji energii świetlnej. Natomiast pierścienie pirolowe, dzięki swojej strukturze (wiązaniami pojedynczym i podwójnym) ułatwiają absorpcję fotonów. Natomiast łańcuch fitolowy składa się z 20 atomów węgla. Charakteryzuje się on właściwościami hydrofobowymi. Rolą tego łańcucha jest zakotwiczenie i zapewnienie odpowiedniej orientacji chlorofilu w błonie tylakoidów [Młodzińska 2009, Bołonkowska i in. 2011].

Najczęściej spotykanymi formami chlorofilu są chlorofile a i b. Jednakże wyodrębnione zostały również między innymi u niektórych roślin naczyniowych oraz bakterii dodatkowe formy chlorofilu: c, d oraz f [Wrona i Głowacki 2005, Pareek i in. 2017]. Chlorofil a (α) można znaleźć praktycznie we wszystkich organizmach fotosyntetycznych: glonach, sinicach i roślinach. Ten rodzaj chlo-

rofilu pochłania głównie czerwone światło (Ryc. 19) [Jordan i in. 2001, Nakamura i in. 2003, Pareek i in. 2017]. Chlorofil b (β), posiadający naturalnie żółtą barwę znajduje się w zielonych algach oraz roślinach wyższych. Chlorofil b wspomaga chlorofil a w zachodzącym procesie fotosyntezy. Ma zdolność do pochłaniania całego spektrum światła niebieskiego (Ryc. 19) [Wrona i Głowacki 2005, Pareek i in. 2017]. Chlorofil b różni się w sposób istotny od chlorofilem a jednym z podstawników znajdujących się przy drugim pierścieniu pirolowym. Chlorofil b posiada grupę aldehydową, natomiast a metylową [Wrona i Głowacki 2005, Kozłowska i Potylicka 2007, Bołonkowska i in. 2011].



Ryc. 19. Absorpcja światła pigmentów roślinnych: chlorofilu a i b oraz karotenoidów; źródło: [Młodzińska 2009]

Chlorofil uzyskuje się z roślin i stosuje do barwienia produktów spożywczych (E-140, E-141) i kosmetycznych. Najczęściej można go uzyskać z liści lucerny oraz pokrzywy. Ma on również właściwości lecznicze, zwiększa przemianę materii oraz stanowi cenne źródło magnezu. Często stanowi jako dodatek do dezodorantu, gdyż pochłania nieprzyjemne zapachy [Kozłowski 2002a, Bołonkowska i in. 2007]. Ponadto barwnik ten, ze względu na korzyści zdrowotne odgrywa bardzo istotną rolę w leczeniu chorób takich jak choroby układu krążenia czy rak. Ponadto ma działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne. [Liu i in. 2007, Sangeetha i Baskaran 2010, Pareek 2017].

2.4. Możliwości zmiany barwy u roślin – szlaki metaboliczne flawonoidów oraz karotenoidów

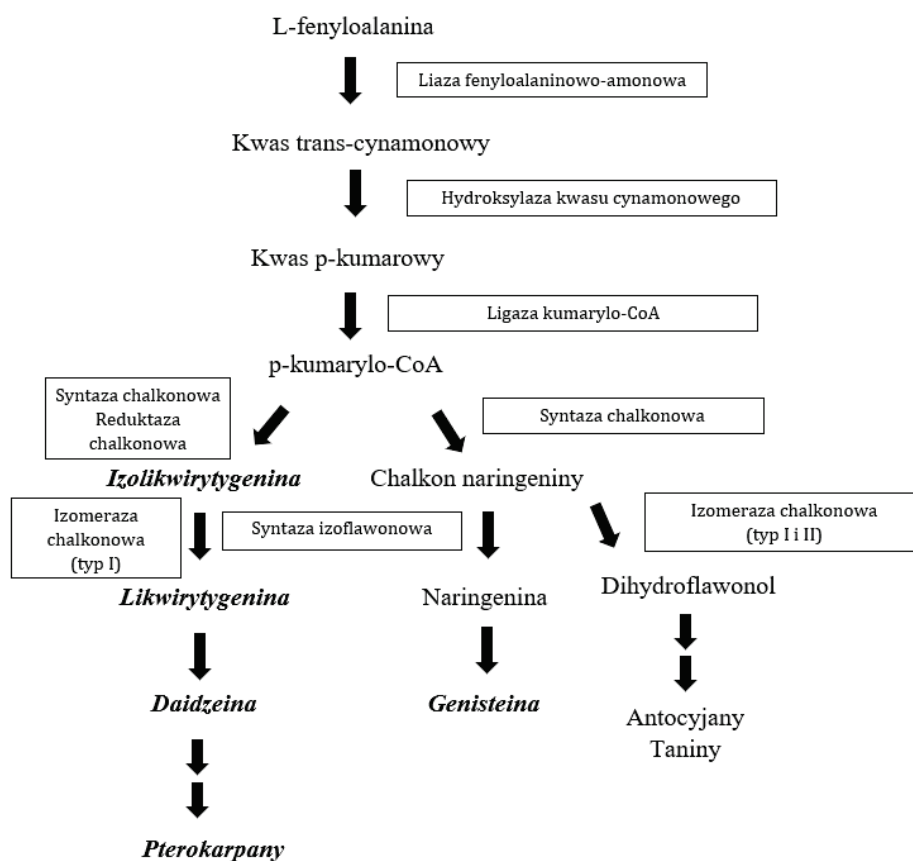
Barwa roślin postrzegana ludzkim okiem jest wynikiem równoczesnej obecności kilku barwników w różnych proporcjach oraz z zachodzących przemian na poziomie biochemicznym. Realizowane one są w komórkach w sposób sekwencyjny, przy udziale wielu enzymów kodowanych przez dużą liczbę genów. Sama produkcja barwników roślinnych jest wieloetapowa, podczas której bierze udział kilka enzymów [Davies i Schwinn 1997, Orlikowska 2005].

Powstawanie flawonoidów jest bardzo złożone (Ryc. 20). Powstają one z prekursorów metabolizmu podstawowego, w procesie przemian tworzących dwa szlaki metaboliczne:

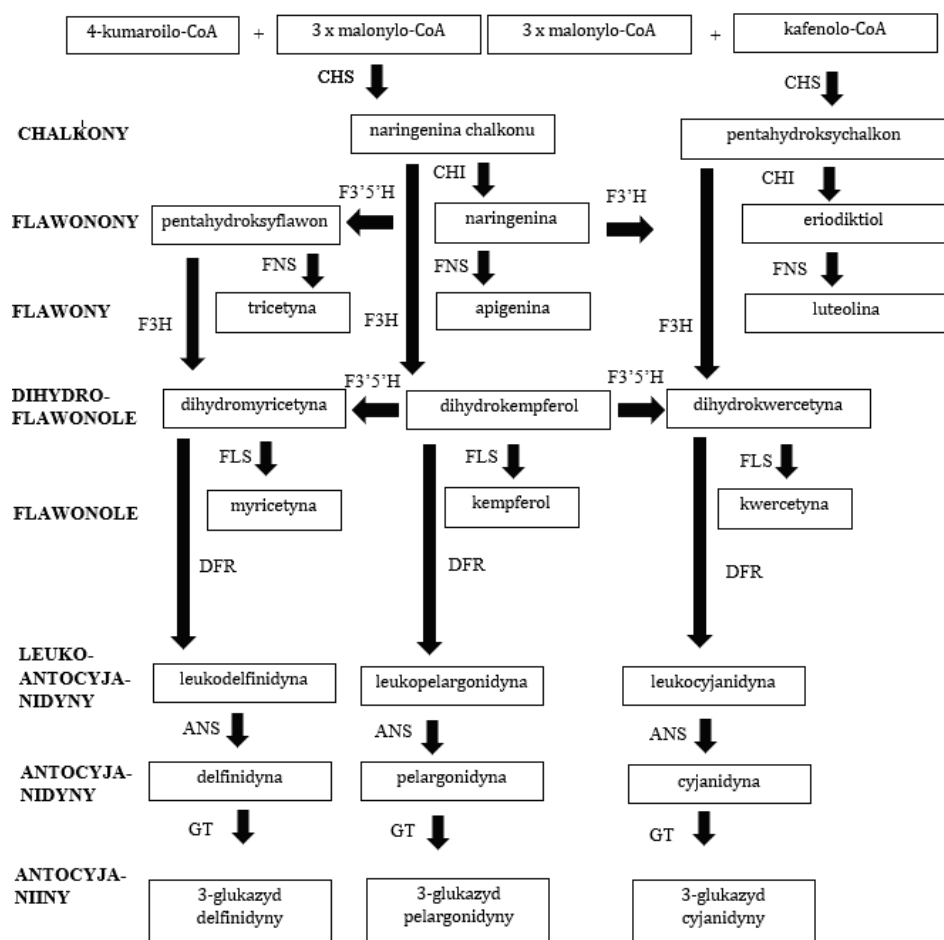
- szlak kwasu malonowego – gdzie z wywodzącego się z glikolizy acetylokoenzymu A powstaje malonylokoenzym A, który jest źródłem pierścienia aromatycznego A;
- szlak kwasu szikimowego – gdzie powstały w szlaku pentozo-fosforanowym erytozo-4-fosforan oraz wytworzony w wyniku glikolizy fosfoenolopirogronian przekształcone są w kwas szikimowy, a w dalszych przemianach w aminokwasy aromatyczne, tyrozynę bądź fenyloalaninę. W kolejnych procesach dochodzi do deaminacji i w konsekwencji powstaje kwas cynamonowy [Winkel-Shirley 2001, Jasiński i in. 2009]. Kolejnym etapem biosyntezy związków flawonoidowych jest przemiana kwasu cynamonowego do kwasu parakumarowego. Kwas ten przekształca się następnie w parakumaroilokoenzym A. Najważniejszym etapem biosyntezy związków flawonoidowych to cyklizacja parakumaroilokoenzymu A do chalkonu, który jest nietrwały. Zachodzi ona przy współdziałaniu trzech cząsteczek malonylokoenzymu A oraz syntazy chalkonowej. Następnie w kolejnych etapach biosyntezy z chalkonu tworzy się układ flawanu i powstają dalsze modyfikacje [Jasiński i in. 2009].

Antocyjaniny są zaliczane do flawonoidów. Enzymy, które uczestniczą w procesie powstawania antocyjanin są kodowane przez geny jądrowe i przekazywane przez formę mateczną jak również ojcowską. Ich powstawanie odbywa się w ramach szlaku metabolicznego fenylopropanoidów. Na początku dochodzi do kondensacji jednej jednostki estru hydroksycynamonowego-CoA (najczęściej kumaroilo-S-CoA) z trzema jednostkami malonylo-CoA, który jest katalizowany przez syntazę chalkonową (CHS) (Ryc. 21) [Horbowicz 2000, Ben-Meir i in. 2002, Orlikowska 2005, Bołonkowska i in. 2011]. W wyniku zachodzących reakcji powstaje żółty chalkon, czyli 15-węglowa struktura składa się z dwóch 6-węglowych pierścieni. Chalkony mają zdolność do przekształcania się w aurony o zabarwieniu ciemno-żółtym. Najczęściej chalkony ulegają jednak

przekształceniu we flawanony (takie jak: eriodyktiol czy naringenina) w zachodzącym procesie izomeryzacji. Podczas trwającego procesu katalizatorem jest izomeraza chalkonu (CHI) [Ben-Meir i in. 2002, Orlikowska 2005, Bołonkowska i in. 2011]. Flawanony mogą ulegać metabolizmowi w kierunku flawonów (takich jak: luteolina czy apigenina) za pomocą syntazy flawonowej (FNS), do dihydroflawonoli (takich jak: dihydrokwercytyna czy dihydrokempferol) z udziałem 3-hydroksylazy flawononu lub do flawonoli (takich jak: kwercytyna czy kempferol) dzięki występowaniu syntazy flawonoli (FLS). Natomiast redukcja dihydroflawonoli z udziałem DFR (4-reduktazy dihydroflawonoli) doprowadza do wytworzenia bezpośrednich prekursorów antocyjanidyn – czyli leukoantocyjanidyn (o bezbarwnym zabarwieniu) [Ben-Meir i in. 2002, Orlikowska 2005].



Ryc. 20. Diagram pośrednich związków uzyskanych w wyniku biosyntezy. Kursywa określa szlak biosyntezy izoflawonoidów, zaś w obramowaniu znajdują się enzymy [źródło: Jasiński i in. 2009]

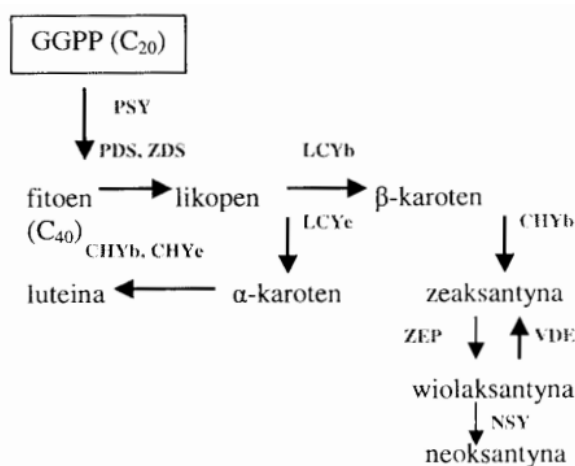


Ryc. 21. Schemat powstawania barwników antocyjanowych (skrótami oznaczono enzymy: CHS – syntaza chalkonu, CHI – izomeraza chalkonu, F3'H – 3'-hydroksylaza flawanonu, FNS – syntaza flawonu, F3'5'H- hydroksylaza 3'5' flawonoidu, FLS – syntaza flawonolu, DFR – 4-reduktaza dihydroflawonolu, ANS – syntaza antocyjanu, GT – transferaza glukozyłowa [źródło: Ben-Meir i in. 2002]

Udział syntazy antocyjanidyny (ANS) powoduje powstanie niestabilnych barwnych cząsteczek antocyjanidyn (takich jak: cyjanidyna, delfinidyna czy pelargonidyna). Do ich stabilizacji dochodzi dzięki przyłączeniu reszt cukrowych przy udziale enzymu – transferazy 3-O-glikozyłowej antocyjanidyn (GT). Skutkiem tego jest wytworzenie rozpuszczalnych w wodzie antocyjanin, które z kolei są gromadzone w wodniczkach. Podstawowa struktura antocyjanin może być zmodyfikowana poprzez przyłączenie do pierścienia B reszt metylowych oraz hydroksylowych, co z kolei prowadzi do zmiany barwy. Tworzone kompleksy

antocyjanin z flawonolami i flawonami prowadzą do zmiany koloru [Ben-Meir i in. 2002, Orlikowska 2005].

Naukowcy już od lat 60. XX wieku prowadzili liczne badania w celu zrozumienia zachodzących biochemicznych procesów, które doprowadziły do powstania cząsteczek karotenoidów [Simkin i in. 2008, Gryszczyńska i in. 2011]. Geny odpowiedzialne za powstawanie karotenoidów znajdują się w chromoplasmach. Powstają one w szlaku izoprenoidowym. Prekursorem karotenoidów jest difosforan izopentenyłu (IPP), który izomeryzowany jest do difosforanu dimetyloallilu (DMAPP), który zaś zostaje substratem dla pirofosforanu geranylogeranylowego – czyli GGPP; C₂₀PP (Ryc. 22). Właściwy szlak karotenoidowy rozpoczyna się od wytworzenia fitoenu C₄₀ (40 węglowego produktu) z dwóch cząsteczek pirofosforanu geranylogeranylowego. Proces jest katalizowany przez syntazę fitoenu (PSY). Bezbarwny fitoen następnie przekształca się w związki barwne, dzięki działaniu enzymów takich jak: desaturazy fitoenu (PD) czy desaturazy karotenu (CD). Dochodzi do wytworzenia likopenu – związku o barwie różowo-czerwonej. Następne etapy (związane z zamykaniem łańcucha pierścieniami węglowymi) są zależne od enzymów cyklaz likopenu, które katalizują powstawanie żółto-pomarańczowego β-karotenu, a także ζ-karotenu o barwie żółtej. Zachodzące kolejne modyfikacje – czyli hydroksylacje i oksydacje doprowadzają do powstania ksantofili (takich jak: luteiny, wiolaksantyny) [Cunningham i Gantt 2002, Orlikowska 2005, Bołonkowska i in. 2011, Gryszczyńska i in. 2011].



Ryc. 22. Schemat powstawania karotenoidów; skróty oznaczają enzymy: PSY – syntaza fitoenu, PSD – desaturaza fitoenu, ZDS – desaturaza ζ-karotenu, LCYb – cyklaza likopenu β, LCYc – cyklaza likopenu ε, CHYb – hydroksylaza pierścienia β, CHYc – hydrolaza pierścienia ε, ZEP – epoksydaza zeaksantyny, VDE – de-epoksydaza wiołaksantyny, NSY – syntaza neoksantyny [źródło: Cunningham i Gantt 2002]

2.4.1. Wykrywanie zmian (mutacji) na poziomie genetycznym

Każdy osobnik w naturalnych populacjach jest organizmem niepowtarzalnym oraz wyjątkowym. Wiele wśród ukrytych bądź widocznych różnic ma podłoże w różnicowaniu sekwencji genów, które z kolei wchodzi w skład genomu [Węgliński 2015]. Do ukazania polimorfizmu, czyli różnic, występujących pomiędzy poszczególnymi organizmami, liniami, odmianami bądź gatunkami stosuje się odpowiednio dobrany system markerowy (inaczej znacznikowy) [Nowakowska 2004, Sztuba-Solińska 2005]. System znacznikowy jest cechą fenotypową lub dowolną różnicą genetyczną, stosowaną w celu ujawnienia różnicy (polimorfizmu) [Sztuba-Solińska 2005].

Pierwsze zastosowanie markerów genetycznych na roślinach miało miejsce w 1923 roku, gdy Karl Sax szukał zależności między barwą fasoli a jej wielkością [cyt. za Andersen i Lubberstedt 2003]. Od tego czasu markery genetyczne znacznie się rozwinęły, począwszy od markerów bazujących na morfologii rośliny – czyli markerów morfologicznych, a skończywszy na markerach molekularnych [Knopkiewicz i in. 2012, Surma i in. 2012]. Do markerów genetycznych zalicza się trzy główne grupy:

- **markery morfologiczne** (stosowane przy cechach łatwo identyfikowanych i manipulowanych; określają np. kształt blaszki liściowej, typ i długość szypułki, karłowatość roślin, omszenie, zawartości barwników, kształt owocu, barwa kwiatu, strąków, nasion oraz miąższu owocu);
- **markery biochemiczne** (allozymy oraz izoenzymy);
- **markery molekularne:**
 - **bazujące na hybrydyzacji,**
 - **bazujące na reakcji PCR** [Guo-Liang 2013, Pachota 2016, Nadeem i in. 2017].

2.4.2. Wykrywanie zmian (mutacji) roślin na poziomie biochemicznym

Od najdawniejszych czasów takie cechy morfologiczne jak barwa roślin były z powodzeniem wykorzystywane do badania zmienności, a także hodowli roślin. Markery morfologiczne, mimo, iż są tanie oraz łatwe, gdyż ich działanie opiera się na obserwacji i analizie wizualnej, mają wiele ograniczeń. Wady tego systemu markerowego związane są m.in. z zależnością od warunków środowiskowych, ograniczoną liczbą markerów, późnego ujawniania się cech umożliwiających dokonanie oceny czy dominująco-recesywny sposób dziedziczenia cech [Andersen i Lubberstedt 2003, Weising i in. 2005, Surma i in. 2012, Knopkiewicz i in. 2012, Nadeem i in. 2017].

Specjalistyczne techniki biochemiczne były już powszechnie znane w latach pięćdziesiątych XX wieku. Służyły one do oszacowania zmienności i oceny struktury genetycznej populacji w sposób szybki oraz dokładny [Markert i Moller 1959, Sammour 2014]. Wśród markerów biochemicznych wyróżnia się dwie klasy białek:

- **izoenzymy** (enzymy: o różnej strukturze, powinowactwie do substratu, szybkości reakcji, kodowane przez inne regiony DNA, przeprowadzające taką samą reakcję) [Knopkiewicz i in. 2012, Guo-Liang 2013].
- **alloenzymy** (enzymy: wysoce odtwarzalne, będące różnymi białkami, spełniające tę samą funkcję, są kodowane przez różne geny, łatwe w stosowaniu i bardzo tanie) [Nadeem i in. 2017, Kumar i in. 2018].

W analizach wykorzystujących markery biochemiczne stosuje się ekstrakt białkowy. Białka znajdujące się w nim są oddzielane zgodnie z ich wielkością oraz ładunkiem za pomocą elektroforezy na żelu. Następnie żel jest wybarwiany poprzez dodanie substratu oraz barwnika dla konkretnego enzymu. W zależności od konfiguracji molekularnej enzymu oraz od liczby *loci* stanu heterozygotycznego bądź homozygotycznego u danego osobnika uzyskuje się od jednego do kilku pasm. Uzyskane pozycje tych pasm są polimorficzne i posiadają dużą ilość danych [Guo-Liang 2013, Al-Samarai i Al-Kazaz 2015, Kumar i in. 2018].

Ten system markerowy zawiera wiele zalet takich jak: prostota (gdyż analiza allozymu nie wymaga ekstrakcji DNA oraz posiadania informacji o sekwencji) oraz szybkość analizy. Jednakże jest też wiele wad do których zalicza się: duże koszty pojedynczej analizy, niska obfitość i wielopostaciowość allozymów, ograniczenie liczbowe markerów biochemicznych oraz zależność od czynników środowiskowych i fazy rozwojowej rośliny [Mondini i in. 2009, Pachota i in. 2016].

2.4.3. Wykrywanie zmian (mutacji) na poziomie molekularnym

Markery molekularne ujawniają różnice na poziomie DNA. Należą one do najbardziej wiarygodnych systemów markerowych, które zrewolucjonizowało nauki biologiczne oraz dziedziny związane z kryminalistyką [Kumar i in. 2009b, Kesawat i Das 2009, Al-Samarai i Al-Kazaz 2015]. Markery te wykorzystywane są do oceny a także selekcji materiału roślinnego. Markerami molekularnymi określa się fragmenty DNA, wskazujące mutację. Używane są one do wykrycia zmian pomiędzy allelami genu dla określonej sekwencji DNA bądź różnych genotypów. Fragmenty te związane są ze ściśle określonym miejscem w genomie. Natomiast wykrywane są poprzez użycie odpowiedniego systemu markerowego [Al-Samarai i Al-Kazaz 2015]. Markery molekularne, w przeciwieństwie do innych systemów markerowych mają więcej zalet. Są wysoce dziedziczne, łatwe

do oznaczenia oraz nie ulegają wpływom środowiska [Działuk i Burczyk 2001]. Idealny marker molekularny powinien cechować się:

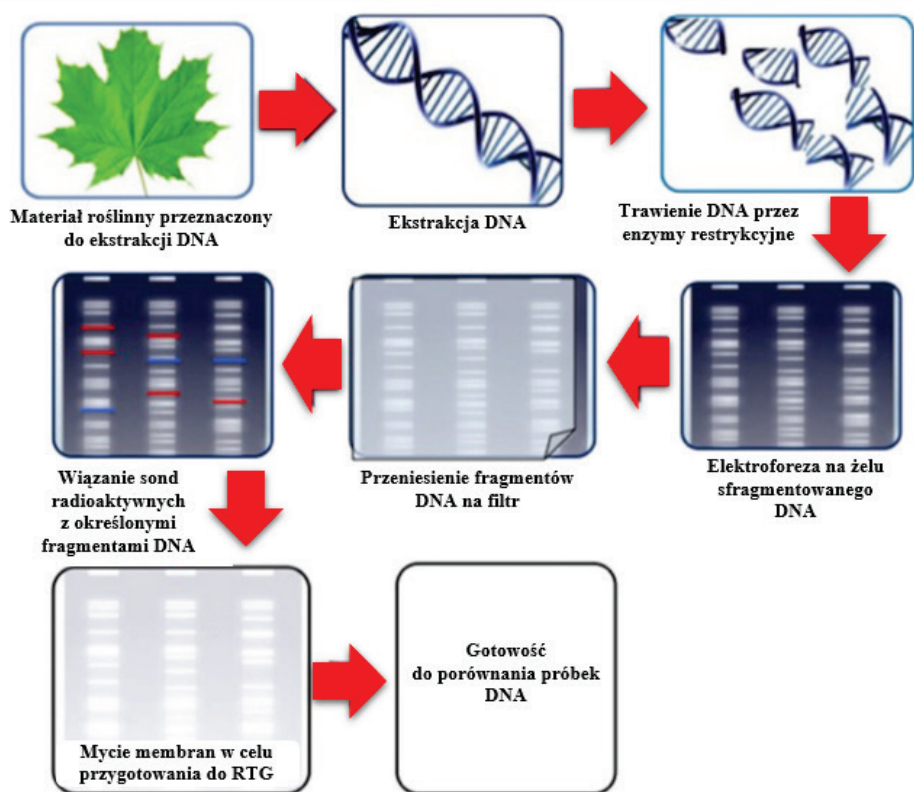
- wysokim polimorfizmem;
- dziedziczeniem kodominacyjnym (współdominującym);
- możliwością zastosowania w dowolnej części genomu (eksony, introny i regiony regulacji);
- częstym i równomiernym występowaniem w genomie;
- brakiem reaktywności na warunki środowiskowe;
- łatwością wykorzystania, dużą dostępnością i niską kosztownością użycia;
- wysoką powtarzalnością uzyskanych wyników, które można z łatwością udostępnić innym laboratoriom [Kesawat i Das 2009, Kundan i in. 2014, Nadeem i in. 2017].

Jednakże żaden marker molekularny nie posiada wszystkich wyżej wymienionych cech pożądanых. Można natomiast wykorzystać taki system znacznikowy, który posiada chociaż kilka wyżej wspomnianych cech [Sharma i in. 2008, Kesawat i Das 2009].

Wyróżnia się wiele rodzajów markerów, które bazują na reakcji przyłączania (hybrydyzacji) DNA, reakcji PCR z wykorzystaniem charakterystycznych starterów, reakcji PCR, a następnie trawieniu restrykcyjnym, polimorfizmie pojedynczych nukleotydów czy też reakcji PCR z użyciem arbitralnego startera [Sztuba-Solińska 2005].

2.4.3.1. Technika RFLP (ang. Restriction fragment length polymorphism)

Polimorfizm Długości Fragmentów Restrykcyjnych (Technika RFLP; ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) jest jedną z pierwszych technik stosowanych w analizach genetycznych. Po raz pierwszy wykorzystano ją w 1980 roku do badań dotyczących DNA genomu roślinnego [Łuczak 2004, Rasmussen 2012]. Metoda ta związana jest z powielaniem konserwatywnych regionów sekwencji DNA oraz w dalszym etapie trawieniem endonukleazami restrykcyjnymi DNA (Ryc. 23). W metodzie tej dochodzi do przeniesienia fragmentów DNA na filtr w celu dokonania hybrydyzacji [Spooner i in. 2005, Jones i in. 2009, Przybylska i in. 2016].



Ryc. 23. Schemat przedstawiający zasadę działania techniki RLFP [źródło: Gaene i in. 2015]

Enzymy restrykcyjne wycinają ściśle określone elementy nukleotydowe w sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego. Następnie fragmenty ulegają rozdeleniu poprzez elektroforezę na żelu agarozowym i są identyfikowane przez radioaktywnie lub fluorescencyjnie znakowany fragment DNA. Do sond stosuje się najczęściej cDNA bądź DNA w zakresie wielkości 300-500 pz. Do polimorfizmu DNA dochodzi poprzez utratę lub mutację pojedynczej pary zasad bądź delecję lub insercję w obrębie sąsiadujących ze sobą dwóch miejsc restrykcyjnych [Spooner i in. 2005, Gaene i in. 2015].

Technika RFLP jest kosztowna, skomplikowana oraz niezmiernie pracochłonna. Ponadto wymaga dużych ilości oczyszczonego DNA oraz nie ma możliwości zautomatyzowania procesu [Ovesná i in. 2002, Spooner i in. 2005, Sztuba-Solińska 2005]. Jednakże posiada również kilka zalet, takich jak: umożliwienie stwierdzenia homozygotyczności bądź heterozygotyczności danego

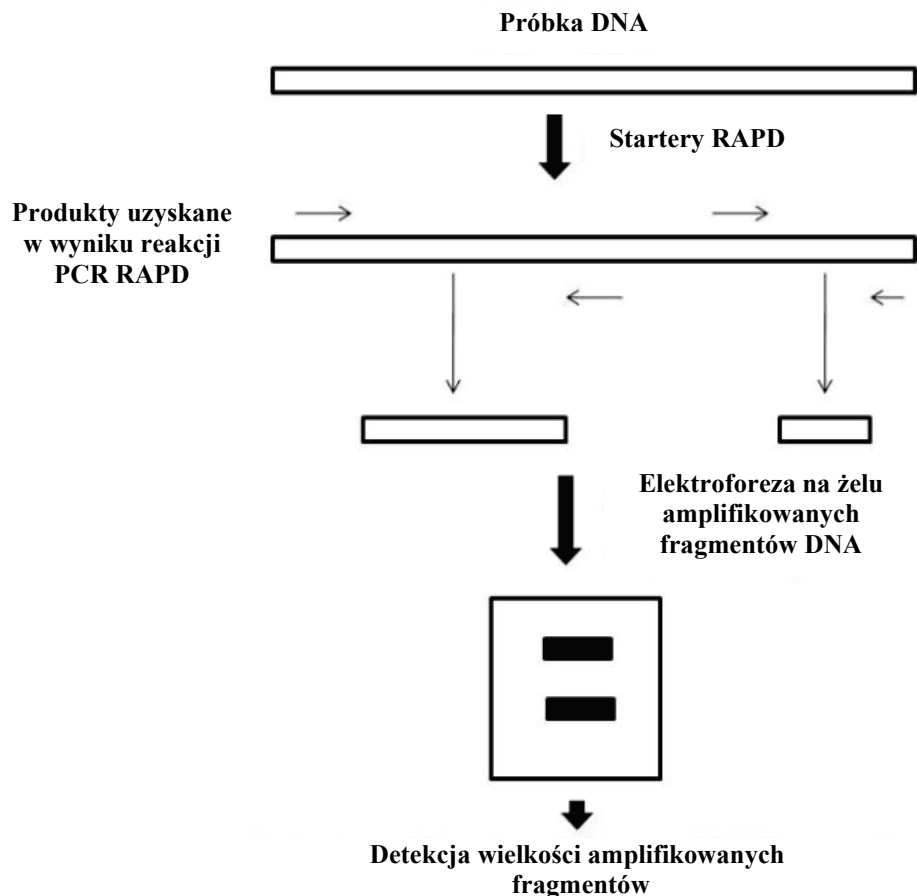
osobnika na podstawie uzyskanego profilu genetycznego czy częstotliwość wykrywania zmienności [Sztuba-Solińska 2005].

2.4.3.2. Technika RAPD (ang. Random amplified polymorphic DNA)

Technika Losowo Amplifikowanego Polimorficznego DNA (RAPD; ang. Random Amplified Polymorphic DNA) znana jest już od początku lat 90-tych przez dokonania Williams'a i jego współpracowników (1990) (cyt. za Łuczak 2004, Bhagyawant 2016). Technika ta wykorzystuje reakcję PCR z użyciem arbitralnego startera, który charakteryzuje się przypadkową sekwencją genomową i długością w zakresie od 9 do 11 pz. Oligonukleotydy wykorzystywane są do powielenia od 1 do 10 miejsc w genomie jednocześnie. W technice tej starter hybryduje do matrycy DNA (Ryc. 24). Następnie dochodzi do powielenia fragmentów w zakresie wielkości od 0,2 do 5 kb jednocześnie w wielu miejscach w genomie [Spooner 2005, Arif i in. 2010]. Produkty amplifikacji rozdzielane są na żelu agarozowym, a ich detekcja zachodzi z użyciem bromku etydydy bądź srebra [Łuczak 2004, Arif i in. 2010, Bhagyawant 2016]. W wyniku przeprowadzonej reakcji PCR i elektroforezy na żelu agarozowym stwierdza się następnie obecność bądź brak charakterystycznych pas o danej wielkości [Spooner 2005, Arif i in. 2010]. Polimorfizm systemu markerowego RAPD jest konsekwencją mutacji miejsc przyłączenia starterów jak i zachodzących procesów delekcji/insercji fragmentów w obszarze powielanym w trakcie zachodzącej reakcji PCR [Spooner 2005].

Do wad tego systemu markerowego można zaliczyć niską odtwarzalność oraz konieczność używania oczyszczonego materiału genetycznego o dużej masie cząsteczkowej. Należy również dbać o to, by nie występowała kontaminacja próbek DNA, gdyż krótkie, losowe startery są zdolne do amplifikacji DNA w różnych organizmach [Spooner 2005]. Metoda ta jest niezmiernie wrażliwa na zmiany warunków reakcji oraz uniemożliwia rozróżnienie osobników homozygotycznych od heterozygotycznych. Do niewątpliwych zalet techniki RAPD można zaliczyć prostotę, szybkość i wydajność metody oraz łatwość w testowaniu [Łuczak 2004, Spooner 2005, Bhagyawant 2016]. Ponadto wymagane są stosunkowo małe ilości materiału (około 5-10 ng/reakcję), który może pochodzić z surowego ekstraktu, a wykorzystywane startery są nie wymagają danych sekwencyjnych i są dostępne komercyjnie [Spooner 2005].

Dzięki swoim właściwościom markery RAPD zostały wykorzystane w wielu dziedzinach życia: od tożsamości genetycznej, poprzez badania z udziałem blisko spokrewnionych ze sobą genów, po mapowanie genów [Spooner 2005, Avise 2009].



Ryc. 24. Schemat przedstawiający zasadę działania techniki RAPD [źródło: Arif i in. 2010]

Markery RAPD z pewnością znalazły zastosowanie w badaniach zmienności somaklonalnej u chryzantemy wielkowiatowej (*Chrysanthemum x grandiflorum*) [Lema-Rumińska i in. 2004, Minano i in. 2009, Miler i Zalewska 2014], gerbery (*Gerbera jamesonii* Bolus) [Bhatia i in. 2011], do identyfikacji i określenia zróżnicowania genetycznego roślin z rodzaju *Annona* [Ahmad i in. 2010], oliwek jordańskich (*Olea europaea* L.) [Brake i in. 2014], odmian pszenżyta [Milczarski i in. 2001], jęczmienia [Kuczyńska i in. 2001], wiśni ptasiej (*Prunus avium* L.) [Lisek i in. 2006], brzoskwini (*Prunus persica* L.) [Han J. i in. 2014], moreli (*Prunus armeniaca*) [Mariniello i in. 2002] nerkowca indyjskiego (*Anacardium occidentale* L.) [Archak i in. 2003], morwy (*Morus spp.*) [Vijayan 2004], gruszki

(*Pyrus pyrifolia*) [Lee i in. 2004], czy pomiędzy roślinami matecznymi róży chińskiej (*Rosa chinensis*), a radiomutantami, które zostały poddane promieniowaniu gamma [Chakrabarty i Datta 2010], a nawet do analiz filogenetych kaktusów z rodzaju *Astrophytum* [Das 2008].

2.4.3.3. Technika ISSR (ang. Inter simple sequence repeats)

Pierwsze wzmianki o wykorzystaniu techniki związanej z polimorfizmem sekwencji międzymikrosatelitarnych (ISSR; ang. Inter Simple Sequence Repeats) pojawiły się w latach 90-tych [Zietkiewicz i in. 1994, Pasqualone 2014, Amom i Nongdam 2017]. Technika ta opiera się na amplifikacji fragmentów DNA, które występują między dwoma, takimi samymi lecz zwróconymi w przeciwnym kierunku regionami powtórzeń mikrosatelitarnych [Reddy i in. 2002, Kumar i in. 2014]. Markery ISSR są głównie markerami dominującymi, chociaż wykazano, że w niektórych przypadkach mają właściwości markerów współdominujących, które umożliwiają odróżnienie heterozygoty od homozygoty [Kumar i in. 2014].

Mikrosatelity od dwu-, trzy-, cztero-, a nawet pięcionukleotydujowej sekwencji wykorzystywane są jako startery do amplifikacji w głównej mierze prostych powtórzeń sekwencji o różnych rozmiarach. Wspomniane startery posiadają powtarzające się sekwencje, komplementarne w stosunku do regionów mikrosatelitarnych, które występują w genomie. Do reakcji wykorzystuje się startery, które mają długość około 16-25 pz [Kumar i in. 2014]. Fakt ten umożliwia stosowanie wysokiej temperatury przyłączania, a w dalszej konsekwencji uzyskania wyższej ostrości. Jednakże temperatura ta zależy również od obecności par zasad cytozyny (C), a także guaniny (G) [Sztuba-Solińska 2005, Amom i Nongdam 2017]. Miejsca, w których przyłączane są startery są rozmieszczone w sposób równomierny w genomie. Jeżeli miejsca te znajdują się w odpowiedniej odległości od siebie (około 2000 pz) to obszar pomiędzy tymi dwoma starterami będzie powielany w wyniku reakcji PCR. Jeżeli odległość ta będzie większa lub wystąpi rozbieżność w miejscach wiązania startera, to region pomiędzy starterami nie będzie powielany [Kurane i in. 2009, Paczos-Grzęda 2009].

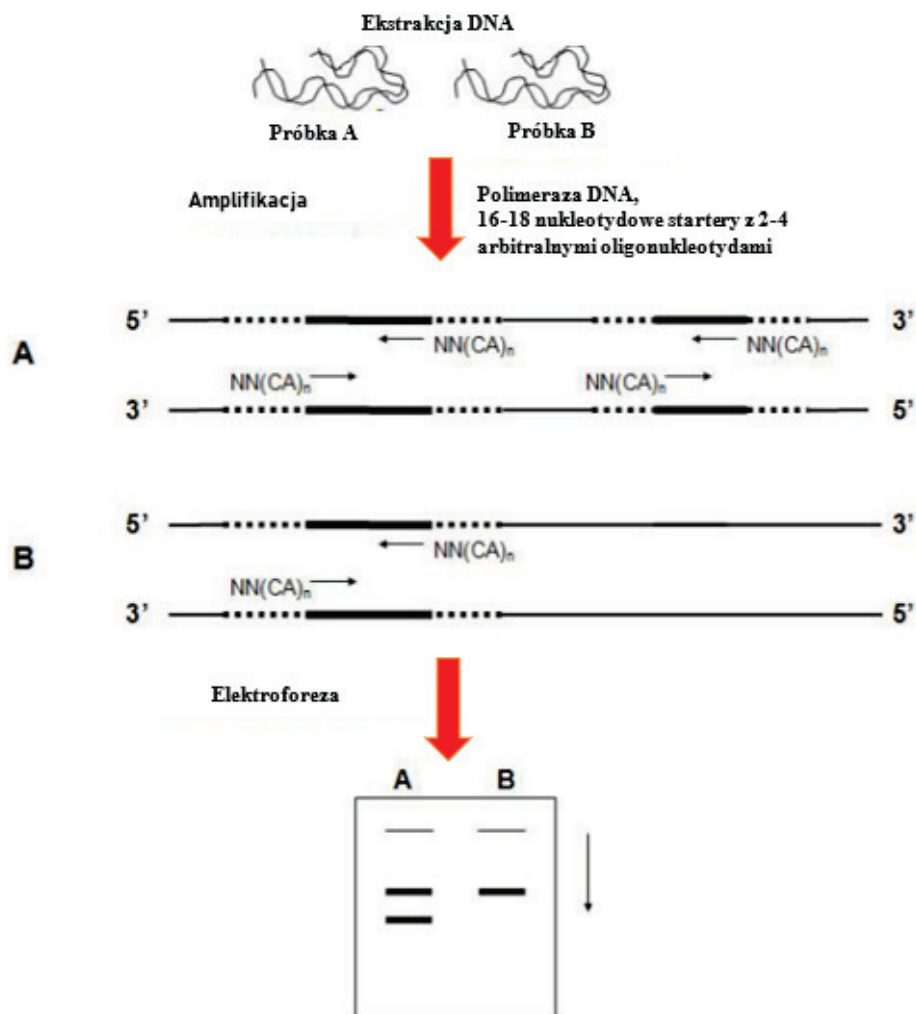
W wyniku zachodzącej hybrydyzacji dochodzi do przyłączenia się starterów do zakotwiczonych na końcu 3' bądź 5' od dwóch do czterech nukleotydów (Ryc. 25). Z uwagi na duże powtórzenia sekwencji, starter łączy się z kilkoma regionami, dając możliwość badania stosunkowo dużej liczby *loci* [Pasqualone 2014]. W wyniku przeprowadzonej amplifikacji DNA uzyskuje się około 10-60 produktów w zakresie wielkości 200-3000 pz. Następnie, po zakończonej reakcji PCR, produkty rozdziela się na żelu agarozowym bądź poliakrylamidowym (ang.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE), wykorzystując do barwienia bromek etydyny. Do wizualizacji powstających produktów reakcji PCR stosuje się światło UV lub barwienie AgNO₃. [Sztuba-Solińska 2005, Amom i Nongdam 2017, Dhutmal 2018]. Następnie dokonuje się oceny występowania (1) bądź braku (0) produktów amplifikacji. Otrzymana matryca z powodzeniem stanowi podstawę w obliczeniach statystycznych, co daje możliwość zaprezentowania zmienności między badanymi osobnikami, wykorzystując dane parametry genetyczne [Celiński i Zbránková 2010].

Technika ISSR jest niezmiernie szybka, prosta i tania, a przede wszystkim uniwersalna. Nie wymaga ona specjalistycznej i kosztownej aparatury, a analizy dokonuje się nawet wykorzystując zdegradowany materiał DNA [Celiński i Zbránková 2010, Okoń i in. 2013, Michałowska i Lema-Rumińska 2018]. Stosowany system markerowy charakteryzuje się wysoką stabilnością oraz informatywnością. Stosowanie markerów ISSR daje wyższą powtarzalność aniżeli wykorzystanie znaczników RAPD z powodu większej długości wykorzystywanych starterów. Ponadto wcześniejsza wiedza o sekwencji matrycowego DNA nie jest konieczna [Vijayan 2005, Amom i Nongdam 2017]. Należy również zaznaczyć, iż markery ISSR wykazują większy polimorfizm w stosunku do markerów biochemicznych [Vijayan 2005]. Z tego powodu markery ISSR znalazły zastosowanie do badania zróżnicowania genetycznego u wielu roślin: cytusów (*Citrus spp.*) [Fang i Roose 1997], trójlistkowej pomarańczy (*Poncirus trifoliata*) [Fang i in. 1997], winogron (*Vitis spp.*) [Wu i in. 2009], katarantusa różowego (*Catharanthus roseus*) [Shaw 2009] bambusa [Mukherjee i in. 2010], jałowca (*Juniperus*), świerku (*Picea*), jodły [Celiński i Zbránková 2010] czy roślin uprawnych: dzikiego ryżu (*Oryza granulata*) [Qian i in. 2001], pelargonii pachnącej (*Pelargonium graveolens*) [Qing-yuan i in. 2018], chryzantemy wielkokwiatowej (*Chrysanthemum × grandiflorum*) [Michałowska i Lema-Rumińska 2018] czy opuncji figowej (*Opuntia ficus-indica*) [Ganopoulou i in. 2015].

Dzięki wspomnianym wyżej zaletom, technika ta została określona mianem wybitnego narzędzia stosowanego do genetycznej charakterystyki wielu organizmów i stosowana jest w:

- badaniach związanych z różnorodnością genetyczną;
- analizie filogenetycznej – tzw. „DNA-fingerprinting”;
- mapowaniu genomu;
- oznaczaniu genów i selekcji;
- identyfikacji szczepów oraz klonów [Okoń i in. 2013, Kumar i in. 2014].
- szerokie zastosowanie w selekcji wspomaganą markerami, ekologii oraz ewolucji, filogenezie – tzw. „DNA-fingerprinting” czy ocenie zróżnicowania genetycznego

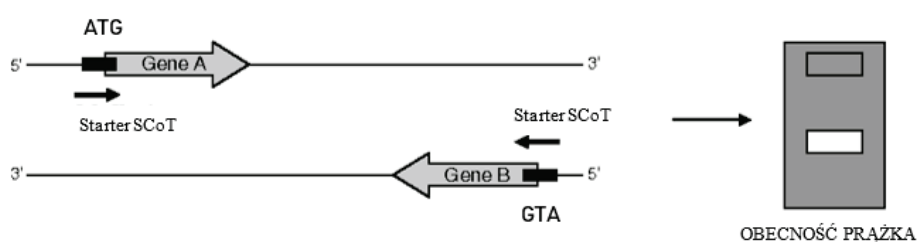


Ryc. 25. Schemat przedstawiający zasadę działania techniki ISSR [źródło: Pasqualone 2014]

2.4.3.4. Technika SCoT (ang. start codon targeted)

Jedną z najbardziej nowatorskich technik jest system markerowy SCoT (polimorfizm w obrębie kodonu start), opracowany przez zespół Collard'a i Mackill'a (2009) [Vivodík i in. 2016, Amom i Nongdam 2017]. System ten opiera się o stosunkowo krótkie oraz konserwatywne regiony, które otaczają kodon startu translacji – ATG (adenina-tymina-guanina) w genomie roślinnym. Markery SCoT są markerami dominującymi, które ze względu na swoje cechy mają szereg zainteresowań [Amom i Nongdam 2017, Xutian 2017].

Markery SCoT jest podobne do systemu ISSR oraz RAPD, gdyż pojedynczy starter przyłącza się do dwóch, o przeciwnie skierowanych końców (Ryc. 26) [Zeng i in. 2015, Zeng i in. 2016]. Technika SCoT wykorzystuje 18-nukleotydowe startery o temperaturze przyłączania wynoszącej około 50°C. Długość starterów oraz temperatura hybrydyzacji są czynnikami, które zasadniczo wpływają na powtarzalność markerów [Vivodík i in. 2016]. Markery są wizualizowane stosując standardową elektroforezę żelową i barwienie. Poprzez to zastosowanie, technika ta jest odpowiednia dla większości laboratoriów badawczych, które posiadają standardowe wyposażenie [Zhang i in. 2015].



Ryc. 26. Zasada działania markera SCoT [źródło: Collard i Mackill 2009]

Z uwagi na swoje zalety, markery SCoT mają wyższość nad innymi wcześniej wspomnianymi systemami markerowymi. Wykazują się wyższym polimorfizmem i lepszą zdolnością detekcji [Satya i in. 2015, Zeng i in. 2016]. Markery te są niezmiernie proste, niezawodne i niedrogie. Ponadto stosowane startery nie są skomplikowane do zaprojektowania, a ich użycie umożliwia uzyskanie szerokiej informacji genetycznej [Zeng i in. 2015, Zeng 2016]. Markery SCoT są stosunkowo blisko związane z genem docelowym, zapewniając otrzymanie większej ilości informacji, które są skorelowane z cechami biologicznymi [Zeng i in. 2015]. Podobnie jak markery ISSR, ten system markerowy nie wymaga dostarczenia informacji odnośnie sekwencji [Shanguo 2018].

Markery SCoT, dzięki swoim właściwościom z wielkim powodzeniem znajdują zastosowanie do budowy map genetycznych tzw. „DNA-fingerprinting” w analizach genetycznych roślin, mapowaniu *loci* cech ilościowych (QTL), a także w badaniach filogenetycznych roślin [Xiong i in. 2011]. Ten system markerowy został wykorzystany w badaniach zróżnicowania genetycznego mango (*Mangifera indica* L.) [Gajera i in. 2014], pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [Shahlaei i in. 2014], orzecha arachidowego (*Arachis hypogaea* L.) [Xiong i in. 2011], pistacji pistacji (*Pistacia vera* L.) [Baghizadeh i Deghan 2018], szczniela białego (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.) [Satya i in. 2015], komosy ryżowej (*Chenopodium quinoa* Willd) [Lema-Rumińska i in. 2017], kukurydzy (*Zea mays* L.) [Sadek i in. 2018] czy gerberii (*Gerbera jamesonii*) [Saidi i in. 2020].

3. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ

Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że promieniowanie X wpływa na dynamikę kiełkowania nasion kaktusów, częstotliwość zmian morfologicznych, zmiany biochemiczne oraz zmiany na poziomie molekularnym. Spodziewano się również różnic pomiędzy badanymi gatunkami kaktusów.

Głównym celem badań jest ocena, czy i w jakim stopniu zastosowane promieniowanie X w różnych dawkach wpływa na dynamikę kiełkowania nasion w warunkach *in vitro*, częstotliwość zmian morfologicznych, zmiany biochemiczne oraz zmiany na poziomie molekularnym u wybranych gatunków kaktusów: *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera*.

Cele szczegółowe:

- Analiza dynamiki kiełkowania nasion w warunkach *in vitro* w zależności od czynników badawczych,
- Ocena barwy siewek przy pomocy katalogu barw RHSCC w zależności od czynników badawczych,
- Analiza zawartości metabolitów wtórnych – barwników roślinnych (karotenoidów i antocyjanów) oraz ocena zawartości chlorofilu a i chlorofilu b w tkankach przy pomocy metody spektrofotometrycznej w materiale roślinnym uzyskanym w wyniku napromienienia promieniowaniem X w stosunku do kontroli,
- Ocena molekularna uzyskanego materiału roślinnego uzyskanego w wyniku napromienienia promieniowaniem X w stosunku do kontroli przy pomocy markera SCoT (Start Codon Targeted).

4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Materiałem badawczym były nasiona trzech gatunków kaktusów: *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* Ritt. oraz *Uebelmannia pectinifera* Buining, uzyskane z hodowli własnej (*Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* Ritt.) lub zakupione w firmie Kakteen Koheres z Niemiec (*Uebelmannia pectinifera* Buining.). Nasiona zostały napromienione promieniowaniem X o nominalnym potencjale 6 MV przy pomocy akceleratora Clinac 2300 CD w Zakładzie Radioterapii Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy. Wyznaczenie wymaganego czasu ekspozycji zostało przeprowadzone w Zakładzie Fizyki Medycznej, przy pomocy system planowania Eclipse firmy Varian. Zastosowano dla każdego gatunku dawki promieniowania: 0 Gy (kontrola), 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy i 50 Gy. W danej kombinacji podczas napromieniania znajdowało się 500 nasion w woreczku strunowym o wymiarach 13,5 x 8 cm, które umieszczono w celu zwiększenia udziału promieniowania wtórnego na płytach solid water RW3 i przykryto warstwą bolusa o znanej grubości, który uwzględniono w obliczeniach czasu napromieniania.

Po napromienieniu nasiona kaktusów zostały poddane sterylizacji wstępnej, polegającej na płukaniu materiału pod bieżącą wodą przez 30 minut, następnie płukaniu w wodzie destylowanej z dodatkiem kropli detergentu 5-10 minut oraz moczeniu w 0,2% środka grzybobójczym (62,5 WG Switch, Syngenta) z dodatkiem detergentu przez około 17 godzin (na wytrząsarce) i moczeniu w 0,5% środka grzybobójczym Amistar 250 S.C. (Syngenta) przez 15 minut. Po tym czasie nasiona zostały wypłukane w wodzie destylowanej w ciągu 5-10 minut. W kolejnym etapie została wykonana sterylizacja właściwa w warunkach sterylnych. Nasiona zostały poddane kolejno działaniu 70% etanolu przez 5-10 sekund, 1,6% roztworu podchlorynu sodu przez 30 minut i na koniec zostały przepłukane 3-krotnie przez 10 minut w sterylnej wodzie destylowanej. Następnie materiał był umieszczony (po 2 nasiona) na pożywce MS [Murashige i Skoog, 1962], zestalonej agarą (8 g · dm⁻³) i pH ustalonym na poziomie 5,8 przed autoklawowaniem, w szalkach Petriego o średnicy 5,5 cm. Kultury *in vitro* (zaklejone parafilmem) były utrzymywane w pokoju wzrostowym, w temperaturze 24 ± 2°C, przy 16 godzinnym fotoperiodzie (Philips TLD 54/34 W), przy średnim natężeniu napromienienia kwantowego 47,84 μmol m⁻²s⁻¹.

Przez kolejne 8 tygodni były wykonywane codzienne obserwacje dotyczące dynamiki kiełkowania nasion. Przy czym za makroskopowy objaw kiełkowania nasion uznano pojawienie się korzonka zarodkowego. Po okresie 8 tygodni uzyskane z nasion siewki zostały ocenione pod względem zabarwienia przy pomocy katalogu barw RHSCC (1966), zmierzone, zważone i przeznaczone do dalszych analiz biochemicznych oraz molekularnych.

4.1. Analizy biochemiczne

Do badań biochemicznych przeznaczono losowo wybrane siewki z każdej kombinacji dawki promieniowania oraz barwy określonej za pomocą katalogu barw RHSCC. Badania wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej kombinacji z wyjątkiem siewek bezchlorofilowych u *Astrophytum spp.* 'Purple' oraz barwnych u *Copiapoa tenuissima*.

Ze względu na bardzo małą liczebność uzyskanych siewek **bezhlorofilowych** u *Astrophytum spp.* 'Purple' przeznaczono je głównie do analiz genetycznych, natomiast do badań barwników oprócz siewek zawierających chlorofil (siewki zielone i brunatne) przeznaczono wyłącznie siewki kremowo-białe (dla dawek 0, 15, 20, 25 Gy) lub pomarańczowe (dla dawki 50 Gy). Podobnie u *Copiapoa tenuissima* ze względu na bardzo małą liczebność siewek **barwnych** przeznaczono je głównie do analiz genetycznych, natomiast do badań barwników oprócz siewek zawierających chlorofil (siewki zielone i brunatne) przeznaczono wyłącznie siewki żółto-kremowe (dla dawek 15, 20, 25 Gy) lub pomarańczowo-brunatne (dla dawki 50 Gy).

4.2. Ekstrakcja barwników roślinnych z uzyskanych siewek

Przygotowany materiał roślinny zważono na wadze analitycznej z dokładnością 0,1 mg, a następnie rozdrobniono każdą siewkę z osobna w moździerzu porcelanowym z dodatkiem kilkudziesięciu mg piasku kwarcowego, który uciarano wraz z siewką. Do ekstrakcji antocyjanów dodawano 3,5 ml 1% HCl w metanolu cz.d.a., natomiast do ekstrakcji karotenoidów i chlorofilu a oraz chlorofilu b dodawano 3,5 ml 100% acetonu cz.d.a. W kolejnym etapie ekstrakty przefiltrowano ilościowo przez lejek z bibułą filtracyjną (średnią, jakościową) do probówek o pojemności 3,5 ml. Wyznaczono maksima absorpcji przy charakterystycznej dla danego barwnika długości fali (λ_{\max}) i wykonano pomiar absorpcji przy określonych długościach fal dla sumy: antocyjanów przy 530 nm, dla karotenoidów przy 440 nm, oraz chlorofili: 645 nm i 662 nm. Badania przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej kombinacji barwy i dawki promieniowania, poza wspomnianymi wyjątkami. Ocena zawartości antocyjanów, karotenoidów i chlorofili zostały wykonane przy pomocy spektrofotometru Shimadzu 1601PC wg zmodyfikowanej procedury Lichtenthaler i Buschmann [2001] oraz Wettstein [1957] i Harborne [1967] cyt. za Lema-Rumińska i Zalewska [2004].

Do ilościowego oznaczenia stężenia sumy antocyjanów zastosowano metodę algebraiczną wykorzystując wzór:

$$C_A = \frac{A_{530}}{h \cdot k} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

gdzie:

$k = 61,7$ (współczynnik ekstynkcji dla glikozydu 3-cyjanidyny)

$h = 1 \text{ cm}$ (grubość warstwy)

Stężenie karotenoidów obliczono wg wzoru:

$$C_K = 4,695 \cdot A_{440} [\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}]$$

Chlorofil a obliczono wg wzoru:

$$C_a = 11,24 \cdot A_{662} - 2,04 \cdot A_{645} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}]$$

Chlorofil b obliczono zgodnie z wzorem:

$$C_b = 20,13 \cdot A_{645} - 4,19 \cdot A_{662} [\mu\text{g} \cdot \text{ml}]$$

4.3. Analizy molekularne

Z uzyskanych dwumiesięcznych siewek zostało wyizolowane DNA, z wykorzystaniem gotowych zestawów do izolacji DNA – Genomic Mini AX Plant (Spin), firmy A&A Biotechnology. Z każdej kombinacji dawki promieniowania oraz barwy określonej za pomocą katalogu barw RHSCC wykonano izolację według protokołu Genomic Mini AX Plant (Spin). Do ekstrakcji wykorzystano około 100 mg świeżej masy siewki, które umieszczono w próbówce o pojemności 1,5 ml i dokonano homogenizacji tkanek za pomocą urządzenia FastPrep®-24 (firmy MP Biomedicals). W dalszej kolejności dodano 900 μl zawiesiny lizującej LS oraz 20 μl roztworu Proteinazy K. Całość wymieszano i inkubowano w temperaturze 50°C przez 10 minut na termowyrzășarce TS-100C firmy Biosan, przy parametrach ciągłego mieszania 1400 RPM. W celu całkowitego usunięcia RNA dodano 2 μl RNA-zy (10 mg/ml) firmy A&A Biotechnology. Po inkubacji próbki worteksowano przez 2 minuty przy parametrach 1000-1400 rpm. Następnie próbki zwirowano przy prędkości 14 000 x g przez 5 minut, przy wykorzystaniu wirówki MPW-260R. Po zwirowaniu pobrano 600 μl supernatantu i naniesiono go na kolumnę Mini AX Spin o objętości 2 ml. Kolumny zwirowano przez 30-60 sekund przy prędkości 8 000 x g. Usunięto zużytą 2 ml probówkę i umieszczono kolumnę Mini AX Spin w nowej 2 ml próbówce. Przepłukano pierwszym buforem płuczącym W1 w objętości 600 μl . Całość zwirowano przy prędkości 8 000 x g przez 30-60 sekund. Ponownie usunięto zużytą 2 ml probówkę

i umieszczono kolumnę Mini SX Spin w nowej 2 ml probówce. Przepłukano drugim buforem płuczającym W2 w objętości 500 μ l. Całość zwirowano przy prędkości 8 000 x g przez 30-60 sekund. Pominięto dodanie buforu zobojętniającego N, ponieważ wyizolowane DNA nie było zamrażane. Po zwirowaniu ostrożnie usunięto zużytą 2 ml probówkę i umieszczono kolumnę Mini AX Spin w probówce do elucji. Naniesiono 150 μ l buforu elucyjnego E i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po upływie tego czasu wirowano przez 30-60 sekund przy prędkości 8 000 x g. Usunięto kolumnę i zamknięto probówkę, która zawierała oczyszczone DNA. Pomiar czystości DNA przeprowadzono za pomocą NanoPhotometru® NP 80. Wyizolowane DNA było przechowywane w lodówce w temperaturze 6°C. Analizę molekularną przeprowadzono za pomocą siedmiu starterów SCoT (Start Codon Target, Collard i Mackill, 2009), których charakterystyka została przedstawiona w Tabeli 1. Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze Thermal Cycler (BIO-RAD, model C1000 TOUCH) w objętości 25 μ l. Na końcową objętość składało się: 2,5 μ l startera, 12,5 μ l PCR MIX Plus (A&A Biotechnology, Poland), w skład którego wchodziło 0,1 U/ μ l polimerazy *Taq* DNA, 4 mM MgCl₂, 0,5 mM każdego z dNTPs, 20 ng matrycy DNA oraz wodę jałową. Reakcja PCR polegała na wstępnej denaturacji w temperaturze 94°C przez 4 minut. Następnie przez 35 cykli: 1 minuta w temperaturze 94°C, 1 minuta w temperaturze przyłączania dla odpowiedniego starterów 10 minut w temperaturze 72°C. Po przeprowadzonej amplifikacji 10 μ l produktu reakcji PCR zostało rozdzielone na 1,5% żelu agarozowym, wybarwionym bromkiem etydyny w objętości 18 μ l w buforze TBE pod napięciem 90V przez 20 minut a następnie przez 90 minut pod napięciem 110V w komorze Standard Power Pack25 (Biometria). Jako obciążacza wykorzystano 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) oraz markera wielkości prążka GenRuler Express DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific). Uzyskane produkty zarchiwizowano za pomocą systemu archiwizacji żeli Gel Doc™XR+ (BIO-RAD). Oznakowanie prób w żelu przedstawia tabela 2.

Tab. 1. Sekwencje starterów SCoT użytych w reakcji PCR

Starter	Sekwencja 5'-3'
S3	CAACAATGGCTACCACCG
S4	CAACAATGGCTACCACCT
S8	CAACAATGGCTACCACGT
S12	ACGACATGGCGACCAACG
S13	ACGACATGGCGACCATCG
S25	ACCATGGCTACCACCGGG
S33	CCATGGCTACCACCGCAG

Tab. 2. Oznakowanie prób w żelu i/lub na dendrogramach

Nr próby na żelu	Dawka promieniowania X [Gy]	Gatunek	Barwa siewki
1	0	<i>Astrophytum spp. 'Purple'</i>	brunatna
2	0		zielona
3	0		kremowo-biała
4	15		brunatna
5	15		zielona
6	15		kremowo-biała
7	15		pomarańczowa
8	15		czerwona
9	20		brunatna
10	20		zielona
11	20		kremowo-biała
12	20		pomarańczowa
13	25		brunatna
14	25		zielona
15	25		kremowo-biała
16	25		pomarańczowa
17	50		brunatna
18	50		zielona
19	50		kremowo-biała
20	50		pomarańczowa
21	50		czerwona
22/1	0	<i>Copiapoa tenuissima</i>	brunatna
23/2	0		zielona
24/3	15		brunatna
25/4	15		zielona
26/5	15		żółto-kremowa
27/6	20		brunatna
28/7	20		zielona
29/8	20		żółto-kremowa
30/9	25		brunatna
31/10	25		zielona
32/11	25		pomarańczowo-brunatna
33/12	25		żółto-kremowa
34/13	50		brunatna
35/14	50		zielona
36/15	50		pomarańczowo-brunatna
37/16	50		żółto-kremowa

cd. tab. 2

38/1	0	<i>Uebelmannia pectinifera</i>	brunatno-brunatna
39/2	0		brunatno-zielona
40/3	0		zielono-zielona
41/4	15		brunatno-brunatna
42/5	15		brunatno-zielona
43/6	15		zielono-zielona
44/7	20		brunatno-brunatna
45/8	20		brunatno-zielona
46/9	20		zielono-zielona
47/10	25		brunatno-brunatna
48/11	25		brunatno-zielona
49/12	25		zielono-zielona
50/13	50		brunatno-brunatna
51/14	50		brunatno-zielona
52/15	50		zielono-zielona
53/16	Anomalia 1		brunatna (sam hypokotyl bez pędu)
54/17	Anomalia 2		zielono-brunatna (sam hypokotyl bez pędu)

4.4. Analizy statystyczne

Uzyskane wyniki analiz biochemicznych oraz parametry morfologiczne zostały opracowane statystycznie za pomocą analizy wariancji, przy poziomie istotności $p < 0,05$ z wykorzystaniem programu komputerowego Statistica 13.1 (StatSoft). Analizy molekularne zostały wykonane za pomocą programu GelAnalizier 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc). Wszystkie *loci* markera SCoT, wskazane dla każdego genotypu, policzone zostały z zastosowaniem systemu binarnego, gdzie obecność prążka oznacza (1) a brak (0). Otrzymana matryca stanowiła podstawę do obliczeń statystycznych. Do opracowania wyników zostanie wykorzystana analiza skupień (cluster analysis) metodą UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) przy pomocy programu Statistica 13.1 (StatSoft).

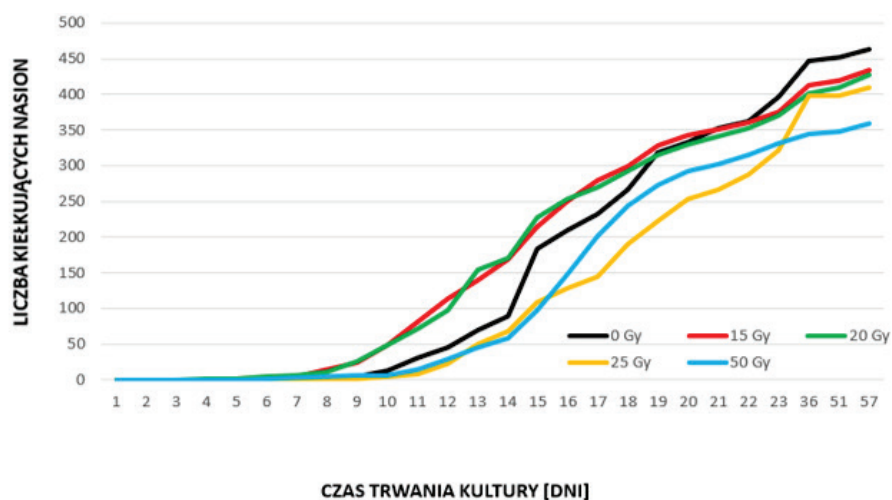
5. WYNIKI

5.1. Dynamika kiełkowania nasion w warunkach *in vitro* poddanych działaniu promieniowania X

Przez kolejne osiem tygodni od dnia sterylnego wysiewu nasion trzech gatunków kaktusów (*Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima*, *Uebelmannia pectinifera*), uprzednio poddanych działaniu promieniowaniu X w dawkach 0 Gy (kontrola), 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy, dokonano obserwacji dynamiki ich kiełkowania.

5.1.1. *Astrophytum spp.* 'Purple'

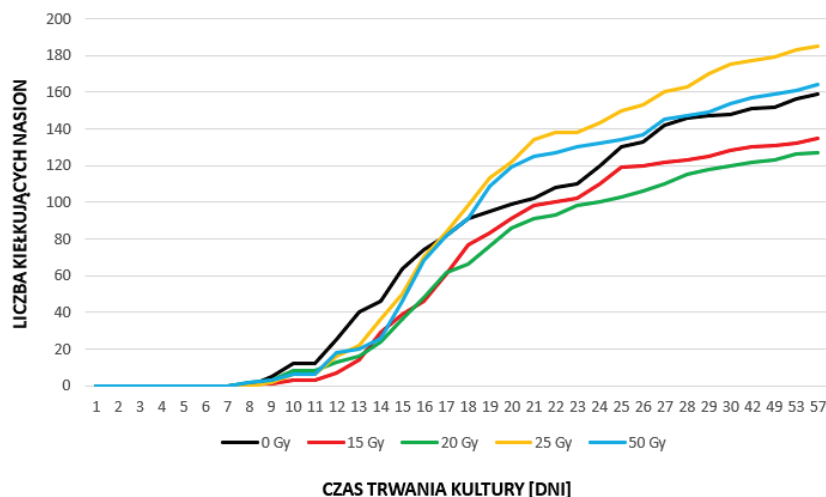
Przez pierwsze trzy dni prowadzenia doświadczenia w warunkach *in vitro* nie stwierdzono makroskopowego objawu kiełkowania nasion u kaktusa *Astrophytum spp.* 'Purple', które były poddane działaniu promieniowania X oraz nasion kontrolnych (Ryc. 27). Początek kiełkowania odnotowano czwartego dnia, gdy stwierdzono pojawienie się korzonka zarodkowego u jednej siewki z nasiona poddanego uprzednio promieniowaniu w dawce 20 Gy. Następnego dnia stwierdzono kiełkowanie dwóch nasion napromienionych tą dawką oraz dwóch, które uprzednio potraktowano dawką 15 Gy. Początek kiełkowania nasion nienapromienionych oraz nasion napromienionych wyższymi dawkami (25 i 50 Gy) był opóźniony o 3-4 dni w stosunku do dawek 15 – 20 Gy. Kolejne dni (od dnia szóstego do dziewiętnastego) były również najbardziej efektywne pod względem uzyskanej liczby kiełkujących nasion poddanych działaniu promieniowania X w dawce 15 i 20 Gy. Liczba kiełkujących nasion dla tych dwóch dawek (15 i 20 Gy) była wyższa niż nasion nienapromienionych (kontroli – 0 Gy) oraz nasion napromienionych dawkami 25 i 50 Gy. Dopiero 19-tego dnia obserwacji stwierdzono, że liczba kiełkujących nasion nie poddanych działaniu promieniowania zrównała się z liczbą kiełkujących nasion poddanych działaniu dawek promieniowania 20 Gy, a w kolejnych dniach (od 22 dnia obserwacji) liczba kiełkujących nasion kontrolnych zaczęła przewyższać wszystkie pozostałe kombinacje. Tendencja ta utrzymała się do zakończenia obserwacji. Od 14 do 18 dnia trwania kultury oraz od 36 do końca trwania obserwacji stwierdzono najmniej kiełkujących nasion poddanych promieniowaniu w dawce 50 Gy. Różnica w ilości kiełkujących nasion dla nasion poddanych działaniu promieniowania X w dawce 50 Gy w stosunku do kontroli wynosiła 22,13%.



Ryc. 27. Dynamika kiełkowania nasion kaktusa *Astrophytum* spp. 'Purple' (kontrolnych i poddanych promieniowaniu X) w trakcie trwania kultury *in vitro*

5.1.2. *Copiapoa tenuissima*

Przez siedem kolejnych dni prowadzenia kultury *in vitro* nie zaobserwowano pojawienia się kiełkujących nasion *Copiapoa tenuissima* nienapromienionych (kontrola) jak i napromienionych dawkami 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy czy 50 Gy (Ryc. 28). Ósmego dnia odnotowano początek kiełkowania nasion poddanych promieniowaniu X w dawkach 20 Gy oraz 50 Gy (odpowiednio po 2) oraz 15 Gy (1). Pierwsze kiełkujące nasiona kontrolne (5) i poddanych promieniowaniu 25 Gy (2) stwierdzono w dziewiątym dniu trwania doświadczenia. W kontroli (0 Gy) w dniach o dziewiątego do szesnastego dnia trwania kultury *in vitro* zaobserwowano powstanie największej liczby kiełkujących nasion. Tendencja ta zmieniła się od 17 dnia do końca trwania doświadczenia, gdzie najefektywniej kiełkowały nasiona uprzednio potraktowanych dawką promieniowania wynoszącą 25 Gy. Najmniej kiełkujących nasion stwierdzono natomiast od dziewiątego do 13 oraz od 16 do 17 dnia trwania kultury, które wcześniej poddano działaniu promieniowania X w dawce 15 Gy, a w 14 i 15 dniu oraz od 18 do zakończenia obserwacji dla kiełkujących nasion napromienionych dawką 20 Gy. Należy zaznaczyć, iż już od dziewiątego dnia doświadczenia do samego końca doświadczenia, zaobserwowano wytworzenie się mniejszej liczby kiełkujących nasion napromienionych dawką 15 Gy oraz 20 Gy w stosunku do kontroli (0 Gy) oraz wyższych dawek promieniowania (25 i 50 Gy). Natomiast w przypadku nasion napromienionych dawką 50 Gy, odnotowano, iż od 19 dnia trwania kultury uzyskano większą liczbę kiełkujących nasion w stosunku do kontroli. Najwięcej kiełkujących nasion uzyskano dla nasion napromienionych dawką 25 Gy (o 15,87 % więcej kiełkujących nasion w stosunku do kontroli).

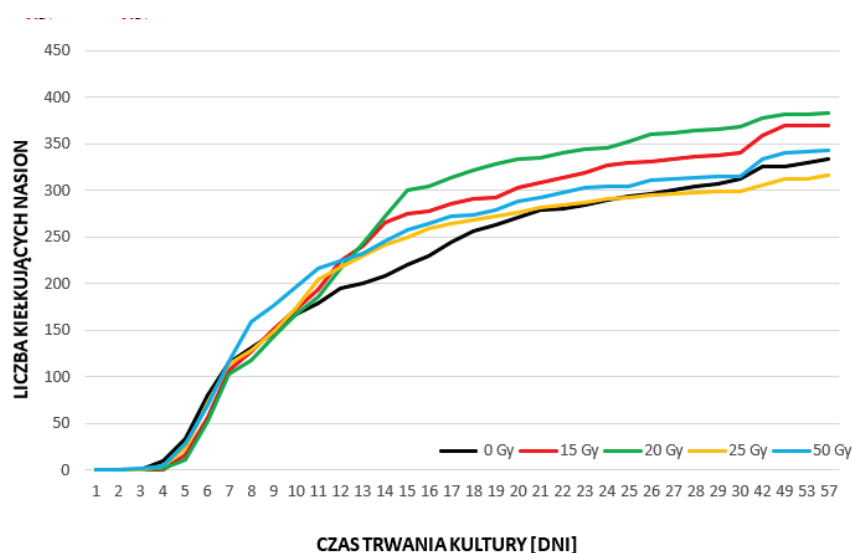


Ryc. 28. Dynamika kiełkowania nasion kaktusa *Copiapoa tenuissima* (kontrolnych i poddanych promieniowaniu X) w trakcie trwania kultury *in vitro*

5.1.3. *Uebelmannia pectinifera*

U gatunku *Uebelmannia pectinifera* przez pierwsze dwa dni nie zaobserwowano kiełkowania nasion (Ryc. 29). Początek kiełkowania stwierdzono trzeciego dnia (w ilości dwóch nasion) tylko dla nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem X w dawce 50 Gy. Czwartego dnia trwania obserwacji odnotowano początek kiełkowania nasion niepoddanych promieniowaniu (kontrola; 0 Gy) oraz tych, które poddano działaniu dawki 15 Gy, 20 Gy oraz 25 Gy. Największą liczbę kiełkujących nasion odnotowano dla nasion kontrolnych (10), natomiast najmniej dla nasion potraktowanych promieniowaniem X w dawce 15 Gy (1). Mimo, że od czwartego do szóstego dnia trwania kultury *in vitro* odnotowano największą ilość kiełkujących nasion uzyskanych dla próby kontrolnej, wraz z upływem czasu tendencja ta uległa zmianie. Już siódmego dnia (dla zastosowanej dawki na nasiona 50 Gy), dziewiątego (dla nasion poddanych dawką 15 Gy oraz 25 Gy) oraz 11 dnia (dla materiału napromieniowanego dawką 20 Gy) prowadzenia doświadczenia uzyskano większą liczbę kiełkujących nasion niż w kontroli (0 Gy). Dopiero od 25 dnia trwania kultury do 57 dnia zaobserwowano, że mniejszą liczbę kiełkujących nasion otrzymano dzięki napromieniowaniu nasion dawką 25 Gy (o 8,48% w stosunku do kontroli). Należy zaznaczyć, iż już od 13 dnia do końca trwania doświadczenia największą liczbę kiełkujących nasion uzyskano dla nasion, które napromieniono promieniowaniem X w dawce 20 Gy (o 17,28% w stosunku do kontroli). Mniej efektywnym w stosunku do

kontroli było zastosowanie dawki 20 Gy, ale bardziej korzystnym okazało się użycie dawek kolejno 15 Gy oraz 50 Gy.



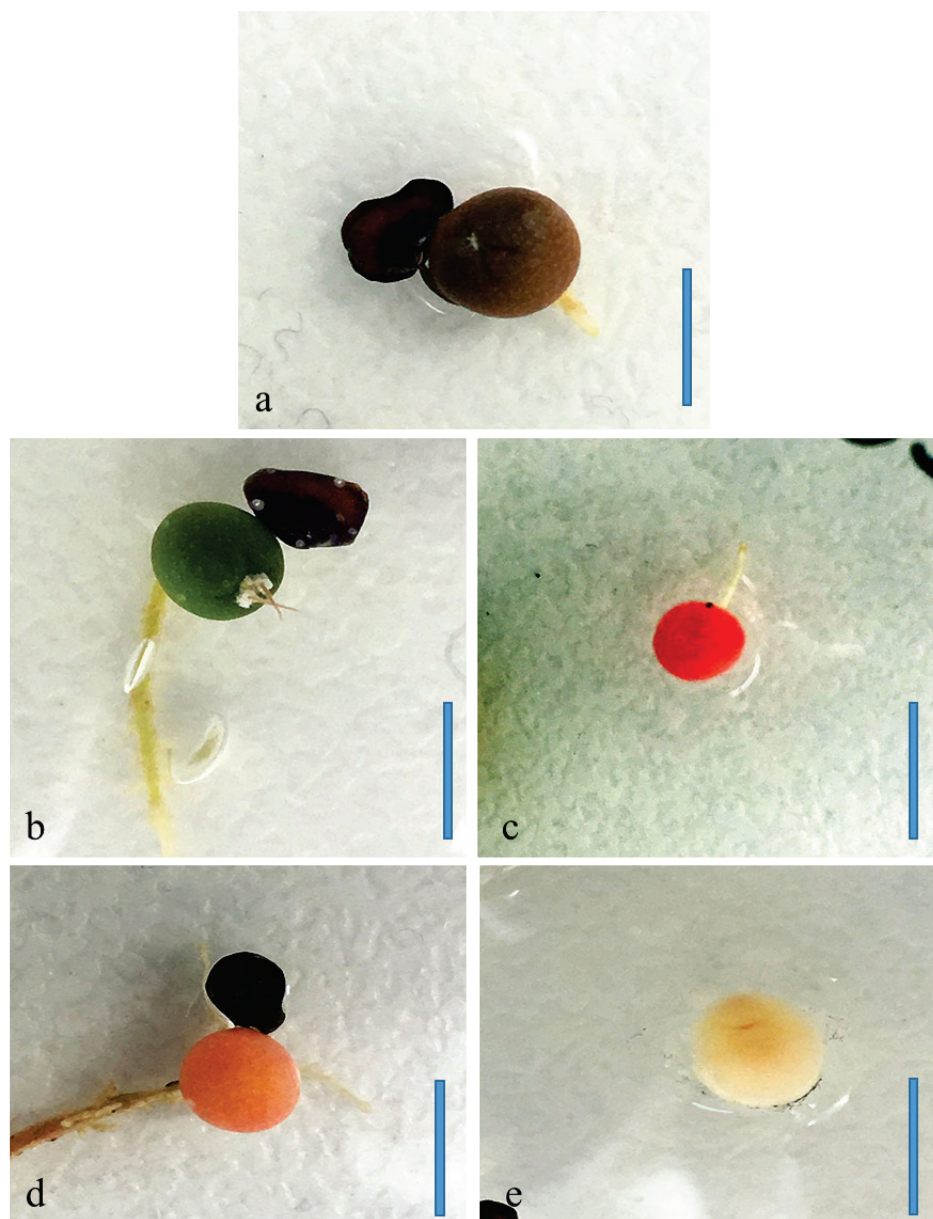
Ryc. 29. Dynamika kiełkowania nasion kaktusa *Uebelmannia pectinifera* (kontrolnych i poddanych promieniowaniu X) w trakcie trwania kultury *in vitro*

5.2. Ocena barwy siewek i stężenia barwników roślinnych poddanych działaniu promieniowania X

Po upływie ośmiu tygodni od napromienienia nasion kaktusów *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera* dawkami 0 Gy (kontrola), 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy i założenia kultury *in vitro*, dokonano oceny barwy uzyskanych siewek (według katalogu RHSCC), a także określono stężenie barwników roślinnych (antocyjanów, karotenoidów, chlorofili a oraz chlorofili b) w nich zawartych.

5.2.1. *Astrophytum spp.* 'Purple'

W wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion *Astrophytum spp.* 'Purple' uzyskano 1869 siewek, z czego 1425 uzyskano z nasion poddanych działaniu promieniowania jonizującego X o odmiennej dawce (Ryc. 30, Tab. 3). Najwięcej siewek bezchlorofilowych uzyskano z nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem w dawce 50 Gy (5,12%), natomiast najmniej dla siewek kontrolnych, niepoddanych działaniu czynnika mutagennego (1,33%).



Ryc. 30. Barwy siewek uzyskane w wyniku działania promieniowania X w dawce 25 Gy na nasiona *Astrophytum* spp. 'Purple': a – barwa brązowa – Greyed – Orange (176B,176C), b – barwa zielona – Yellow – Green (144A, 144C), c – barwa czerwona – Red Group – 50C, d – barwa pomarańczowa – Orange Group 28C, e – barwa kremowo – żółta Yellow Group – 158B; (bar = 1 cm)

Tab. 3. Liczbowy i procentowy udział siewek o różnych barwach wg katalogu RHSCC u *Astrophytum spp.* 'Purple' po zastosowaniu promieniowania X

Dawka promieniowania [Gy]	Liczba siewek							
	siewki bezchlorofilowe [barwa wg RHSCC]			siewki chlorofilowe [barwa wg RHSCC]		Razem		Udział [%]
	50C	28C	158B	144A 144C	176B 176C	siewki bezchl.	siewki ogółem	siewek bezchl.
0 (kontrola)	0	3	2	4	435	5	444	1,13
15	1	3	2	16	394	6	416	1,44
20	1	5	2	27	363	8	398	2,01
25	3	7	2	28	356	12	396	3,03
50	1	9	1	4	200	11	215	5,12
Ogółem	6	27	9	79	1748	42	1869	2,23

[barwa uzyskanych siewek: ■ – brunatna, ■ – zielona, ■ – pomarańczowa, ■ – kremowo-biała; ■ – czerwona]

Wśród siewek pozbawionych chlorofilu stwierdzono najwięcej tych o pomarańczowej barwie (27), natomiast najmniej było siewek charakteryzujących się barwą czerwoną (6) oraz kremowo-żółtą (9). W przypadku siewek chlorofilowych najwięcej stwierdzono egzemplarzy o barwie brunatnej (1748 siewek), natomiast najmniej mających zielone zabarwienie (79).

W przypadku kontroli stwierdzono powstanie 444 siewek, z czego pięć było bezchlorofilowych, charakteryzujących się barwą pomarańczową (3) oraz kremowo-żółtą (2). Natomiast nie uzyskano siewek o barwie czerwonej dla próby kontrolnej. W przypadku siewek chlorofilowych uzyskano 435 siewek o barwie brunatnej oraz cztery siewki barwy zielonej. W wyniku poddania nasion promieniowaniu X w dawce 15 Gy stwierdzono powstanie 416 siewek, z czego sześć było bezchlorofilowych (jedna czerwona, dwie kremowo-żółte oraz 5 pomarańczowych), natomiast 410 stanowiły siewki chlorofilowe (394 brunatne, 16 zielonych). Działanie promieniowania w dawce 20 Gy na nasiona spowodowało uzyskanie w sumie 398 siewek, z czego tylko osiem było bezchlorofilowych (jedna czerwona, dwie kremowo-żółte i pięć pomarańczowych), natomiast 390 było chlorofilowych (z czego 363 brunatne, a 27 zielonych). W wyniku działania dawki 25 Gy na nasiona otrzymano łącznie 396 siewek, z czego 12 było bezchlorofilowych (trzy czerwone, siedem pomarańczowych, jedna kremowo-żółta), natomiast 384 było chlorofilowych (356 brunatnych, 28 zielonych). Zastosowanie największej dawki (50 Gy) spowodowało uzyskanie w sumie 215 siewek, z czego 11 było bezchlorofilowych (jedna barwy czerwonej, jedna barwy

kremowo-żółtej, dziewięć o zabarwieniu pomarańczowym), natomiast liczbę 204 stanowiły siewki chlorofilowe (z czego 200 charakteryzowało się barwą brunatną, a cztery – zieloną).

Ze względu na bardzo małą liczebność siewek bezchlorofilowych (Tab. 3) przeznaczono je głównie do analiz genetycznych, natomiast do badań barwników oprócz siewek zawierających chlorofil (siewki zielone i brunatne) przeznaczono wyłącznie siewki kremowo-białe (dla dawek 0, 15, 20, 25 Gy) lub pomarańczowe (dla dawki 50 Gy).

Tab. 4. Barwa siewki (wg katalogu RHSCC) oraz stężenie sumy antocyjanów, karotenoidów i chlorofli a oraz b przeliczeniu na 1 g świeżej masy siewki w zależności od dawki promieniowania X u *Astrophytum spp.* ‘Purple’

Dawka promieniowania X [Gy]	Barwa siewki (wg RHSCC)	Stężenie barwników [mg·dm ⁻³]			
		antocyjany	karotenoidy	chlorofil a	chlorofil b
0	176 B, C	23,64 c*	40,91 d	41,53 g	35,81 a
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	30,47 a	38,82 f	45,58 d	26,12 e
15	176 B, C	17,42 c	57,41 a	75,21 a	33,50 b
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	13,56 i	41,70 e	51,01 chki	30,10 c
20	176 B, C	15,45 f	45,09 cf	43,06 f	21,41 f
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	24,37 b	47,85 b	66,50 bc	27,12 d
25	176 B, C	22,88 e	29,85 e	35,76 h	13,51 h
	158 B	-	-	-	-
	144 A, C	23,20 d	33,33 cf	44,57 e	19,83 g
50	176 B, C	14,18 h	17,97 g	24,74 bhk	8,28 i
	144 A, C	12,40 j	8,33 i	11,15 hi	4,06 j
	28 C	14,68 g	11,49 h	7,88 j	7,70 i

[barwa uzyskanych siewek: – brunatna, – zielona, – pomarańczowa, – kremowo-biała; – stężenie najwyższe; – stężenie najniższe]

* dane w kolumnach oznaczone tymi samymi literami alfabetu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$

W przypadku *Astrophytum spp.* 'Purple' wszystkie badane siewki kremowo-białe, bez względu na zastosowaną dawkę promieniowania nie zawierały antocyjanów, karotenoidów, chlorofilu a i chlorofilu b (Tab. 4). W przypadku siewek bezchlorofilowych o barwie pomarańczowej dokonano oceny stężenia barwników roślinnych z uwagi na ich występowanie w badanych siewkach.

Najwyższe stężenie antocyjanów oraz chlorofilu b stwierdzono dla siewek kontrolnych (dawka wynosząca 0 Gy), natomiast karotenoidów i chlorofilu a dla siewek, uzyskanych w wyniku wcześniejszego napromienienia nasion dawką 15 Gy. Najmniejsze stężenie antocyjanów, karotenoidów oraz chlorofilu a uzyskano z siewek, które uprzednio potraktowano promieniowaniem wynoszącym 50 Gy. Natomiast najmniejsze stężenie chlorofilu b uzyskano dla siewki uzyskanej z nasion poddanych promieniowaniu wynoszącemu 25 Gy. W każdej z siewek, niezależnie od ich barwy czy uprzednio zastosowanej dawki promieniowania na nasiona, stwierdzono niższe stężenie antocyjanów w stosunku do próby kontrolnej. Największe stężenie barwników tego rodzaju stwierdzono w przypadku siewki barwy zielonej, którą uzyskano z nasiona niepoddanego promieniowaniu X ($30,47 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), natomiast najmniejsze ($12,40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dla tej o barwie zielonej, której nasiono było uprzednio potraktowane promieniowaniem rentgenowskim, w dawce wynoszącej 50 Gy. Porównywalny poziom stężenia antocyjanów w stosunku do kontroli (siewka brunatna: $23,64 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$; zielona: $30,47 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stwierdzono dla materiału uzyskanego z nasion potraktowanych promieniowaniem rentgenowskim wynoszącemu 25 Gy (dla siewki brunatnej: $22,88 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$; a dla siewki zielonej: $23,20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Najwięcej karotenoidów stwierdzono w przypadku siewki, otrzymanej z nasiona poddanego promieniowaniu w dawce 15 Gy, charakteryzującej się barwą brunatną ($57,41 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), a najmniej dla siewki, uzyskanej z nasiona potraktowanego dawką promieniowania 50 Gy, mającej pomarańczową barwę ($11,49 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W stosunku do próby kontrolnej o barwie brunatnej ($40,91 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), siewki o tym samym zabarwieniu, uzyskane z nasion poddanych działaniu czynnika mutagennego w dawce 15 Gy oraz 20 Gy, miały wyższe stężenie antocyjanów (odpowiednio: $57,41 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $45,09 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W odniesieniu do kontroli barwy zielonej ($38,82 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), siewki tej samej barwy, również otrzymane z nasion poddanych działaniu promieniowania X w dawce 15 Gy i 20 Gy, miały wyższe stężenie karotenoidów (kolejno: $41,70 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $47,85 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Najwięcej chlorofilu a stwierdzono dla próbek wyekstrahowanych z siewki brunatnej, której nasiono poddano promieniowaniu X w dawce 15 Gy ($75,21 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), natomiast najmniej dla siewki pomarańczowej, uzyskanej z nasiona poddanego czynnikiowi mutagennemu w dawce 50 Gy ($7,88 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Stwierdzono wyższe stężenie chlorofilu a w stosunku do siewki kontrolnej barwy brunatnej ($41,53 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dla próbek, otrzymanych z nasion narażonych dawką promieniowania wynoszącej 15 Gy ($75,21 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz 20 Gy ($43,06 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

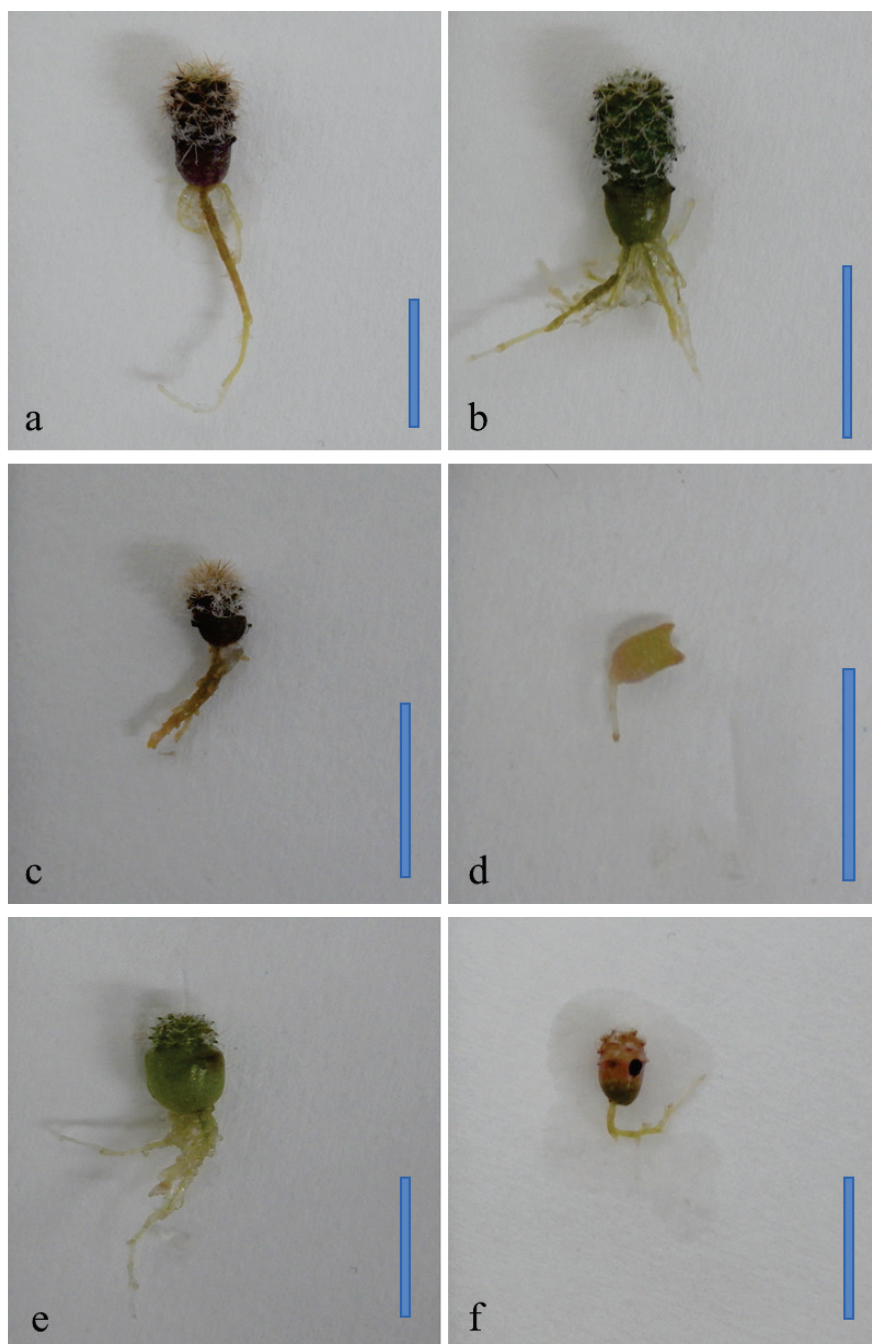
Natomiast w odniesieniu do próby kontrolnej, charakteryzującej się barwą zieloną, uzyskane ekstrakty z siewek o tym samym zabarwieniu (gdzie nasiona były potraktowane promieniowaniem w dawce 15 Gy i 20 Gy) miały wyższe stężenie chlorofilu a (odpowiednio: 51,01 mg·dm⁻³ oraz 66,50 mg·dm⁻³). Chlorofilu b stwierdzono w największym stężeniu (wynoszącym 35,81 mg·dm⁻³) w ekstrakcie uzyskanym z siewki kontrolnej barwy brunatnej, natomiast najmniej dla wyekstrahowanej próbki z siewki otrzymanej z nasiona poddanego napromieniowaniu dawką 25 Gy (13,51 mg·dm⁻³).

Ekstrakt uzyskany z siewki zielonej, pochodzący z nasiona poddanego promieniowaniu rentgenowskiemu (dawka 15 Gy) zawierał większe stężenie antocyjanów (30,10 mg·dm⁻³) w stosunku do kontroli o tej samej barwie (26,12 mg·dm⁻³). Stwierdzono nieco niższy poziom stężenia chlorofilu b u siewki brunatnej, uzyskanej z nasiona narażonego na promieniowanie w dawce 15 Gy (33,50 mg·dm⁻³) w stosunku do siewki kontrolnej o tej samej barwie (35,18 mg·dm⁻³), nienarażonej na działanie czynnika mutagennego.

5.2.2. *Copiapoa tenuissima*

W wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion dla *Copiapoa tenuissima* uzyskano 777 siewek, z czego 636 uzyskano w wyniku działania promieniowania jonizującego X o odmiennej dawce na nasiona (Ryc. 31, Tab. 5). W wyniku napromieniowania nasion dawkami od 15 do 50 Gy uzyskano w sumie 17 siewek barwnych (9,60 %), charakteryzujących się pomarańczowo-brunatnym oraz żółto-kremowym zabarwieniem. Najwięcej siewek barwnych stwierdzono u siewek uzyskanych z nasion poddanych promieniowaniu w dawce 50 Gy (4,90%), natomiast najmniej dla siewek kontrolnych (1,85%).

W przypadku kontroli uzyskano łącznie 141 siewek, z czego 29 stanowiło siewki barwy zielonej, a 112 barwy brunatnej, natomiast nie stwierdzono obecności siewek barwnych. W wyniku zastosowania promieniowania X w dawce 15 Gy na nasiona otrzymano w sumie 142 siewki, z czego tylko trzy stanowiły barwne siewki żółto-kremowe. Nie stwierdzono wytworzenia się siewek pomarańczowo-brunatnych. Jednakże otrzymano 17 siewek zielonych oraz 122 brunatne. Dzięki poddaniu działaniu czynnika mutagennego w postaci promieniowania X w dawce 20 Gy uzyskano w sumie 135 siewki, wśród których trzy miały barwę żółto-kremową, 22 zieloną a 110 brunatną. Zastosowanie dawki 25 Gy na nasiona spowodowało powstanie trzech siewek żółto-kremowych, jednej pomarańczowo-brunatnej, 51 zielonych oraz 161 brunatnych. Natomiast użycie największej dawki, wynoszącej 50 Gy spowodowało wyodrębnienie się aż sześciu siewek barwy pomarańczowo-brunatnej oraz jednej żółto-kremowej. Stwierdzono również powstanie 51 siewek zielonych i 85 siewek barwy brunatnej.



Ryc. 31. Barwy siewek uzyskane w wyniku działania promieniowania X na nasiona *Copiapoa tenuissima*: a – siewka brunatna 0 Gy, b – siewka zielona 0 Gy, c – siewka brunatna 15 Gy, d – siewka żółto-kremowa 15 Gy, e – siewka zielona 20 Gy, f – pomarańczowo-brunatna 50 Gy; (bar = 1 cm)

Tab. 5. Liczbowy i procentowy udział siewek o różnych barwach wg katalogu RHSCC u *Copiapoa tenuissima* po zastosowaniu promieniowania X

Dawka promieniowania [Gy]	Liczba siewek						
	siewki barwne [barwa wg RHSCC]		siewki typowe [barwa wg RHSCC]		Razem		Udział [%]
	158B,C	163A	144A,C	176B,C	barwne	ogółem	siewki barwne
0 (kontrola)	0	0	29	112	0	141	0,00
15	3	0	17	122	3	142	2,11
20	3	0	22	110	3	135	2,22
25	3	1	51	161	4	216	1,85
50	1	6	51	85	7	143	4,90
Ogółem	10	7	170	590	17	777	9,60

[barwa uzyskanych siewek: ■ – brunatna, ■ – zielona, ■ – pomarańczowo-brunatna, ■ – żółto-kremowa]

Podczas dokonywania charakterystyki morfologicznej siewek uzyskanych z nasion poddanych promieniowaniu w zróżnicowanej dawce (od 0 Gy do 50 Gy), oprócz parametrów dotyczących ich barwy, dokonano oceny świeżej masy, długości, szerokości siewki i długości jej najdłuższego korzenia (Tab. 6).

Siewki uzyskane z nasion napromieniowanych dawką 25 Gy posiadały najwyższą średnią wartość parametrów takich jak świeża masa, długość całej siewki (epikotyłu i hipokotyłu), szerokość epikotyłu. Należy zaznaczyć, iż nie różniły się pod względem szerokości epikotyłu i długości najdłuższego korzenia dla siewek kontrolnych (0 Gy). Średni parametr najdłuższego korzenia odnotowano dla siewki uzyskanej z nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem X w dawce 50 Gy. Natomiast najniższe średnie parametrów świeżej masy, długości hipokotyłu oraz epikotyłu, szerokości epikotyłu oraz długości najdłuższego korzenia odnotowano dla siewek potraktowanych promieniowaniem w dawce 20 Gy, jednak długość siewki i szerokość epikotyłu nie różniła się przy dawce 50 Gy.

Ze względu na bardzo małą liczebność siewek barwnych (Tab. 7) przeznaczono je głównie do analiz genetycznych, natomiast do badań barwników oprócz siewek zawierających chlorofil (siewki zielone i brunatne) przeznaczono wyłącznie siewki żółto-kremowe (dla dawek 15, 20, 25 Gy) lub brunatno-pomarańczowe (dla dawki 50 Gy).

Tab. 6. Charakterystyka morfologiczna siewek *Copiapoa tenuissima* uzyskanych z nasion poddanych działaniu promieniowania X na podstawie danych statystycznych

Dawka promieniowania [Gy]	Siewka			
	Świeża masa [mg]	Długość (epikotyl+hypokotyl) [mm]	Szerokość epikotylu [mm]	Długość najdłuższego korzenia [mm]
0 (kontrola)	33,4b	4,34b	3,04a	8,90a
15	32,5b	4,00a	2,84ab	7,38b
20	16,0d	3,52c	2,20c	6,14c
25	41,7a	4,42a	3,04a	9,92a
50	20,0c	3,44c	2,46c	10,46a
Ogółem	150,5	19,72	13,58	42,80

[■ – wartości najwyższe; ■ – wartości najniższe]

U *Copiapoa tenuissima* najwyższe stężenie antocyjanów oraz chlorofilu b stwierdzono dla siewek uzyskanych z nasion uprzednio poddanym promieniowaniu X w dawce 15 Gy, natomiast karotenoidów oraz chlorofilu a dla siewek kontrolnych (dawka 0 Gy). Najmniejsze stężenie antocyjanów stwierdzono w wyniku zastosowania promieniowania w dawce 50 Gy, natomiast karotenoidów oraz chlorofilu a i b dla próbek kontrolnych (dawka wynosząca 0 Gy).

Dla gatunku *Copiapoa tenuissima* stwierdzono najwyższe stężenie antocyjanów ($46,76 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dla siewki o barwie zielonej, uzyskanej z nasiona poddanego promieniowaniu X w dawce 15 Gy, natomiast najniższe ($0,44 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), dla siewki brunatnej, którą uzyskano dzięki zastosowaniu promieni rentgenowskich w dawce 50 Gy. Pozostałe siewki barwy zielonej, otrzymane z nasion potraktowanych promieniowaniem X (w dawce 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy) również miały wyższe stężenie antocyjanów w stosunku do próby kontrolnej ($2,83 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Próbkę wyekstrahowaną z siewek barwy brunatnej (uzyskanych z nasion potraktowanych działaniem czynnika mutagennego w dawce 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy), posiadały niższe stężenie antocyjanów w stosunku do próbek uzyskanych z siewek kontrolnych (Gy = 0), o tym samym zabarwieniu. Siewki poddane czynnikowi mutagennemu barwy żółto-kremowej posiadały mniejsze stężenie antocyjanów w stosunku do siewki kontrolnej barwy brunatnej, jednakże większe od siewki barwy zielonej. Największe i najmniejsze stężenie karotenoidów odnotowano dla siewek kontrolnych, kolejno dla barwy zielonej ($52,40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), barwy brunatnej ($5,28 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

W przypadku siewek o zabarwieniu zielonym, wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania stężenie karotenoidów malało (od $39,38 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$

– zastosowana dawka na nasiono: 15 Gy do 32,84 mg·dm⁻³ – użyta dawka 25 Gy i 33,21 mg·dm⁻³ – podana dawka 50 Gy). Ekstrakty z siewek barwy brunatnej oraz żółto-kremowej, niezależnie od uprzednio zastosowanej dawki promieniowania, zawierały większe stężenie karotenoidów w stosunku do próbek kontrolnych, które nie były narażone na działanie czynnika.

Tab. 7. Barwa siewki (wg katalogu RHSCC) oraz stężenie antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu a oraz b w przeliczeniu na 1 g świeżej masy siewki w zależności od dawki promieniowania X u *Copiapoa tenuissima*.

Dawka promieniowania X [Gy]	Barwa siewki (wg RHSCC)	Stężenie barwników [mg·dm ⁻³]			
		antocyjany	karotenoidy	chlorofil a	chlorofil b
0	176 B, C	26,22 c*	5,28 fk	7,32 m	3,30 k
	144 A, C	2,83 l	52,40 a	87,32 a	29,73 d
15	176 B, C	17,75 h	23,10 e	31,23 f	16,32 g
	144 A, C	46,76 a	39,38 b	36,74 d	36,97 a
	158 B, C	24,18 d	21,20 f	17,47 j	24,00 e
20	176 B, C	14,36 j	13,22 i	20,38 h	26,84 a
	144 A, C	6,06 k	37,87 c	43,81 b	35,04 b
	158 B, C	11,29 i	22,78 e	19,85 i	23,84 e
25	176 B, C	21,72 f	19,06 g	29,95 g	13,23 h
	144 A, C	22,46 e	32,84 d	36,36 e	30,09 d
	158 B, C	7,61 i	18,00 f	16,60 k	20,83 f
50	176 B, C	29,20 b	13,64 h	15,99 l	7,61 j
	144 A, C	19,27 g	33,21 d	40,03 c	33,63 c
	163 A	0,44 l	8,45 j	8,37 l	10,53 i

[barwa uzyskanych siewek: ■ – brunatna, ■ – zielona, ■ – pomarańczowo-brunatna, ■ – żółto-kremowa; ■ – stężenie najwyższe; ■ – stężenie najniższe]

* dane w kolumnach oznaczone tymi samymi literami alfabetu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$

Największe (87,32 mg·dm⁻³) i najmniejsze (7,32 mg·dm⁻³) stężenie chlorofilu a stwierdzono również dla próbek wyekstrahowanych z siewek kontrolnych. Działanie promieniowania X wpłynęło znacznie na obniżenie stężenia chlorofilu a u siewek barwy zielonej, otrzymanych z nasion potraktowanych działaniem promieni rentgenowskich, jednakże w przypadku siewek barwy brunatnej, których nasiona były również poddane działaniu promieniowaniu X odnotowano znaczny wzrost stężenia chlorofilu a. W przypadku chlorofilu b największe stężenie (36,97 mg·dm⁻³) stwierdzono w ekstraktach uzyskanych dla siewki barwy zielonej, uzyskanej z nasiona poddanego promieniowaniu o dawce 15 Gy, natomiast

najniższe dla próby kontrolnej barwy brunatnej (3,30 mg·dm⁻³). Siewki barwy brunatnej, pomarańczowo-brunatnej oraz żółto-kremowej, których nasiona uprzednio były potraktowane promieniowaniem X posiadały wyższe stężenie antocyjanów w stosunku do siewek kontrolnych tej samej barwy, jednakże niższe aniżeli siewek kontrolnych barwy zielonej.

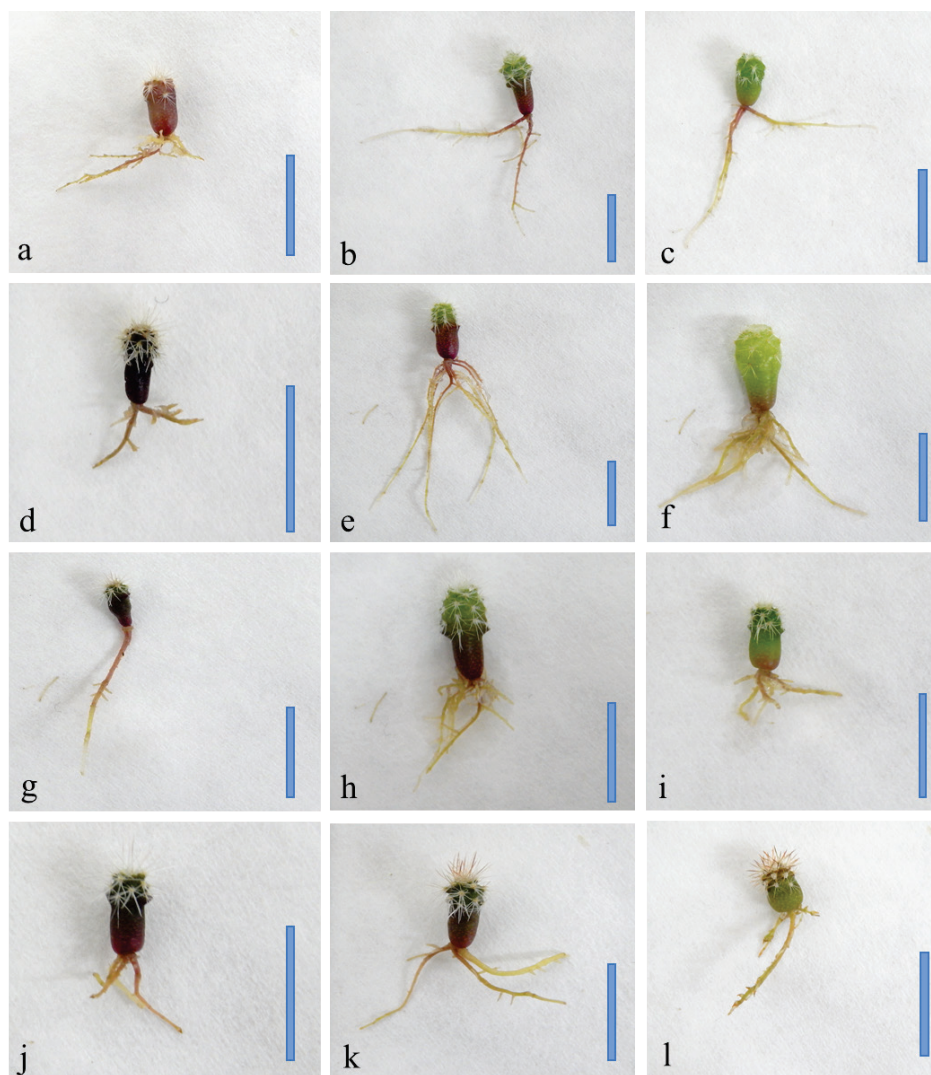
5.2.3. *Uebelmannia pectinifera*

W wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion *Uebelmannia pectinifera* najczęściej uzyskanych siewek charakteryzowało się barwą brunatno-zieloną (69,80%), natomiast najmniej siewek miało barwę brunatno-brunatną (10,20%) (Tab. 8, Ryc. 32).

Tab. 8. Liczbowy i procentowy udział siewek o różnych barwach wg katalogu RHSCC u *Uebelmannia pectinifera* po zastosowaniu promieniowania X

Dawka promieniowania [Gy]	Liczba siewek – udział procentowy		
	barwa [wg RHSCC]		
	164 A,B-164A,B	164A,B-143A,B	143 A,B – 143 A,B
0 (kontrola)	27 (8,00%)	62 (18,00%)	253 (74,00%)
15	37 (10,00%)	282 (76,00%)	52 (14,00%)
20	0 (0,00%)	369 (96,00%)	15 (4,00%)
25	19 (6,00%)	282 (90,00%)	13 (4,00%)
50	131 (38,33%)	205 (60,00%)	57 (1,67%)
Ogółem	214 (11,86%)	1198 (66,48%)	390 (21,64%)

[barwa uzyskanych siewek: ■ – brunatno-brunatna, ■ – brunatno-zielona, ■ – zielono-zielona]



Ryc. 32. Barwy siewek uzyskane w wyniku działania promieniowania X na nasiona *Uebelmannia pectinifera*: a – siewka brunatno-brunatna 0 Gy, b – siewka brunatno-zielona 0 Gy, c – siewka zielono-zielona 0 Gy, d – siewka brunatno-brunatna 15 Gy, e – siewka brunatno-zielona 15 Gy, f – siewka zielono-zielona 20 Gy, g – siewka brunatno-brunatna 20 Gy, h – siewka brunatno-zielona 20 Gy, i – siewka zielono-zielona 25 Gy, j – siewka brunatno-brunatna 25 Gy, k – siewka brunatno-zielona 50 Gy, l – siewka zielono-zielona 50 Gy, (bar = 1 cm)

W przypadku kontroli, której nasiona nie zostały poddane działaniu czynnika mutagennego w postaci promieniowania X, spośród 50 siewek najwięcej było barwy zielono-zielonej (74%), natomiast najmniej brunatno-brunatnej (8%). W przypadku siewek otrzymanych z nasion uprzednio potraktowanych promieniowaniem sytuacja wyglądała odmiennie, gdyż w przypadku zastosowania dwóch najniższych dawek promieniowania nie uzyskano wcale siewek barwy brunatno-brunatnej (20 Gy) bądź stosunkowo małe ilości (dla 15 Gy – 10% siewek miało barwę brunatno-brunatną). Z kolei w wyniku zastosowania na nasiona dawek 25 Gy i 50 Gy spowodowało uzyskanie najmniejszej liczby siewek (kolejno 4% oraz 2,22%) barwy zielono-zielonej w stosunku do pozostałych barw. W wyniku zastosowania promieniowania na nasiona w dawkach od 15 do 50 Gy stwierdzono największą liczbę otrzymanych siewek koloru brunatno-zielonego (od 68,89% do 96% w stosunku do całkowitej liczby siewek).

Podczas dokonywania charakterystyki morfologicznej siewek *Uebelmannia pectinifera* uzyskanych z nasion poddanych promieniowaniu w zróżnicowanej dawce (od 0 Gy do 50 Gy), oprócz parametrów dotyczących ich barwy, dokonano oceny świeżej masy, długości, szerokości siewki i długości jej najdłuższego korzenia (Tab. 9).

Tab. 9. Charakterystyka morfologiczna siewek *Uebelmannia pectinifera* uzyskanych z nasion poddanych działaniu promieniowania X na podstawie danych statystycznych

Dawka promieniowania [Gy]	Siewka			
	Świeża masa [mg]	Długość (epikotyl+hypokotyl) [mm]	Szerokość epikotyłu [mm]	Długość najdłuższego korzenia [mm]
0 (kontrola)	73,4a	7,62a	4,04a	20,24ad
15	19,7d	5,38c	2,64c	8,76e
20	43,7b	6,54b	2,96b	11,26c
25	44,5bc	6,30b	2,74bc	16,34b
50	24,8c	5,70c	2,32d	17,90bd
Ogółem	206,1	31,54	14,7	74,5

[■ – wartości najwyższe; ■ – wartości najniższe]

Siewki kontrolne, uzyskane z nasion niepoddanych działaniu czynnika mutagennego w postaci promieniowania X posiadały najwyższe oceniane parametry (tj. świeżą masę, średnią wartość długości siewek, szerokość epikotyłu oraz najwyższą wartość długości najdłuższego korzenia), wyjątek stanowiła długość najdłuższego korzenia siewek uzyskanych przy dawce 50 Gy, która nie różniła się

istotnie od siewek z kombinacji kontrolnej. Najniższe natomiast mierzone parametry odnotowano dla siewek uzyskanych z nasion uprzednio potraktowanych dawką 15 Gy (świeża masa, średnia wartość długości hipokotyli oraz epikotyli, szerokość epikotyli, najwyższa średnia wartość długości najdłuższego korzenia), jednak przy dawce 50 Gy długość siewki nie różniła się istotnie od siewek z kombinacji kontrolnej a szerokość epikotyli była najniższa.

Największe stężenie wszystkich analizowanych barwników roślinnych stwierdzono w ekstraktach siewek, uzyskanych z nasion poddanych promieniowaniu w dawce 15 Gy. Natomiast najmniejsze stężenie antocyjanów stwierdzono dla ekstraktu pochodzącego z siewki uzyskanej z nasiona poddanego promieniowaniu 25 Gy, a karotenoidów oraz chlorofilu a i b dla siewek kontrolnych.

W przypadku *Uebelmannia pectinifera* największe stężenie antocyjanów ($93,19 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) stwierdzono dla siewki barwy brunatno-brunatnej, którą uzyskano w wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion uprzednio poddanych promieniowaniu X w dawce 15 Gy, natomiast najmniej ($5,00 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) dla siewki charakteryzującej się barwą brunatno-zieloną, którą uzyskano w wyniku działania promieni X w dawce 25 Gy (Tab. 10). Działanie promieniowania rentgenowskiego w każdej zastosowanej dawce wpłynęło korzystnie na zwiększenie zawartości antocyjanów w uzyskanych siewkach barwy brunatno-brunatnej (od $34,84 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $93,19 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz zielono-zielonej (od $13,48 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $32,30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku do siewek kontrolnych, charakteryzujących się tą samą barwą (brunatno-brunatna: $9,61 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, zielono-zielona: $13,06 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Siewki o zabarwieniu brunatno-zielonym, uzyskane z nasion napromieniowanych dawkami 15 Gy oraz 50 Gy miały większe stężenie antocyjanów (kolejno: $18,14 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $18,94 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku do kontroli o tej samej barwie. Jednakże inne siewki brunatno-zielone, poddane czynnikowi mutagennemu w dawce 20 Gy ($7,30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz 25 Gy posiadały niższe stężenie tego barwnika.

W przypadku karotenoidów i chlorofilu a, najwyższe stężenia barwników odnotowano dla siewki o barwie zielono-zielonej, uzyskanej w wyniku napromieniowania nasiona dawką wynoszącą 15 Gy (kolejno $53,53 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $85,82 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), a najmniej dla siewki kontrolnej barwy brunatno-brunatnej (kolejno: $3,09 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $3,80 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Wszystkie siewki barwy zielono-zielonej, uzyskane w wyniku napromieniowania nasion, posiadały wyższe stężenie karotenoidów (od $4,16 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $53,53 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku dla siewek kontrolnych ($3,77 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), charakteryzujących się tą samą barwą. Wszystkie siewki barwy brunatno-zielonej, uzyskane w wyniku prowadzenia kultury *in vitro* nasion uprzednio napromieniowanych wykazywały niższe stężenie karotenoidów w stosunku do kontroli posiadającej tę samą zabarwienie ($16,01 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W przypadku chlorofilu a siewki barwy zielono-zielonej, poddane uprzednio działaniu promieniowania w dawkach 20 Gy, 25 Gy oraz 50 Gy

posiadały niż jego stężenie (od 6,25 mg·dm⁻³ do 26,77 mg·dm⁻³) w stosunku do kontroli (27,41 mg·dm⁻³). Natomiast wszystkie siewki barwy brunatno-zielonej charakteryzowały się wyższym stężeniem chlorofilu a (od 11,03 mg·dm⁻³ do 21,74 mg·dm⁻³) w stosunku do siewki kontrolnej (5,59 mg·dm⁻³). Ostatniego ocenianego barwnika roślinnego – chlorofilu b, stwierdzono najwięcej w siewce barwy zielono-zielonej (35,47 mg·dm⁻³), którą uzyskano z nasiona napromienionego dawką 15 Gy, natomiast najmniej w próbie kontrolnej barwy brunatno-zielonej (1,93 mg·dm⁻³). Każda z siewek barwy brunatno-brunatnej (od 11,80 mg·dm⁻³ do 28,96 mg·dm⁻³) oraz brunatno-zielonej (od 3,52 mg·dm⁻³ do 6,59 mg·dm⁻³) posiadała wyższe stężenie chlorofilu b w stosunku do kontroli o tej samej barwie (kolejno: 2,12 mg·dm⁻³ oraz 7,76 mg·dm⁻³). W przypadku barwy zielono-zielonej, tylko siewka, której nasiono uprzednio zostało poddane promieniowaniu X w dawce 20 Gy posiadała niższe stężenie chlorofilu b (2,07 mg·dm⁻³) w stosunku do rośliny kontrolnej o tej samej barwie (7,76 mg·dm⁻³).

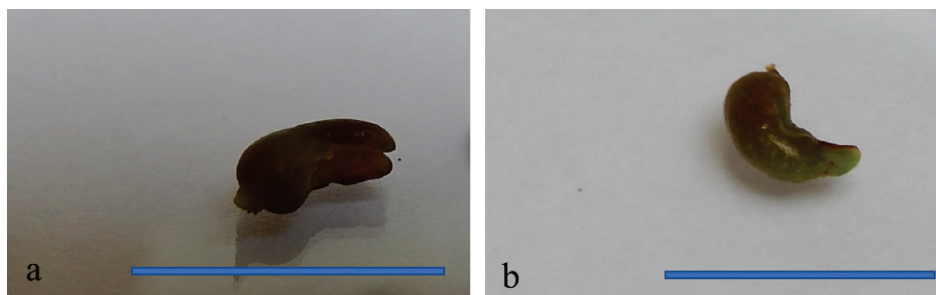
Tab. 10. Barwa siewki (wg katalogu RHSCC) oraz stężenie antocyjanów, karotenoidów i chlorofilu a oraz b w przeliczeniu na 1 g świeżej masy siewki w zależności od dawki promieniowania X u *Uebelmannia pectinifera*

Dawka promieniowania X [Gy]	Barwa siewki (wg RHSCC)	Stężenie barwników [mg·dm ⁻³]			
		antocyjany	karotenoidy	chlorofil a	chlorofil b
0	164A – 164A	9,61 k*	3,09 l	3,80 l	2,12 k
	143 A,B – 143 A,B	13,06 f	3,77 l	27,41 e	7,76 h
	164A – 143 A,B	11,70 j	16,01 f	5,59 l	1,93 kl
15	164A – 164A	93,19 a	43,50 b	68,74 ab	27,40 b
	143 A,B – 143 A,B	24,00 f	53,53 a	85,82 a	35,47 ab
	164A – 143 A,B	18,14 h	8,69 h	14,28 h	4,13 j
20	164A – 164A	55,91 c	20,27 d	32,47 d	11,80 f
	143 A,B – 143 A,B	13,49 i	4,16 k	6,25 k	2,07 k
	164A – 143 A,B	7,30 l	6,83 j	11,03 j	3,52 j
25	164A – 164A	34,84 d	24,53 c	40,73 c	12,51 e
	143 A,B – 143 A,B	13,48 i	17,58 f	26,77 f	11,12 g
	164A – 143 A,B	5,00 l	7,26 i	11,22 i	3,83 j
50	164A – 164A	61,29 b	51,77 a	79,22 ab	28,96 b
	143 A,B – 143 A,B	32,30 e	19,80 e	23,64 g	18,62 d
	164A – 143 A,B	18,94 g	13,11 g	21,74 g	6,59 i

[barwa uzyskanych siewek: ■ – brunatno-brunatna, ■ – zielono-zielona, ■ – brunatno-zielona; ■ – stężenie najwyższe, ■ – stężenie najniższe]

* dane w kolumnach oznaczone tymi samymi literami alfabetu nie różnią się istotnie przy poziomie istotności $\alpha=0,05$

W przypadku zastosowania promieniowania X w dawkach 25 Gy na nasiona *Uebelmannia pectinifera* uzyskano anomalie w budowie siewek. Uzyskane siewki wytworzyły sam hipokotyl bez pędu (Ryc. 33).



Ryc. 33. Anomalie uzyskane w wyniku działania promieniowania X na nasiona *Uebelmannia pectinifera*: a – sam hipokotyl bez pędu (dawka 25 Gy); b – sam hipokotyl bez pędu (dawka 25 Gy); (bar = 1 cm)

5.3. Analiza molekularna siewek kaktusów uzyskanych w warunkach *in vitro* z nasion poddanych działaniu promieniowania X

Wyniki badań molekularnych uzyskanych przy pomocy markera SCoT przedstawiono w tabelach 11-13 oraz rycinach 34-43.

Liczba uzyskanych produktów dla *Astrophytum spp.* ‘Purple’ wyniosła ogółem 1544, na jeden starter średnio wyniosła 220,57 (Tab. 11). Najwięcej produktów u *Astrophytum spp.* ‘Purple’ uzyskano dla startera S25, a najmniej dla S8. Zakres wielkości prążków wahał się od 353 do 4878 par zasad. Uzyskano maksymalnie 31 *loci* dla startera S25. Stwierdzono bardzo wysoki polimorfizm (od 59,09% dla startera S12 do 100,0% dla S3 i S8) w wyniku działania promieniowania X.

Dla *Copiapoa tenuissima* liczba produktów wyniosła łącznie dla wszystkich starterów 926. Na jeden starter średnio przypadło 132,28 produktu (Tab. 12). Starter S13 generował najwięcej produktów, najmniej starter S8. Zakres wielkości prążków wahał się od 319 do 3733 par zasad. Największą liczbę *loci* (29) wygenerował starter S25. Polimorfizm wahał się od 53,33% dla startera S13 do 100% dla startera S8.

Dla *Uebelmannia pectinifera* uzyskano dla wszystkich starterów 1255 produktów, średnio 179,29 na jeden starter (Tab. 13). Najwięcej produktów generował starter S12, najmniej S4. Zakres wielkości prążków wyniósł od 329 do 4312 par zasad. Największą liczbę *loci* wygenerował starter S33, najmniej S4. Najniższy polimorfizm wygenerował starter S13 (65%), najwyższy polimorfizm (100%) dały startery S3 i S8.

Tab. 11. Liczba produktów, zakres wielkości prążków, liczba *loci* oraz polimorfizm uzyskanych w wyniku analizy molekularnej za pomocą markera SCoT u *Astrophytum spp.* 'Purple'

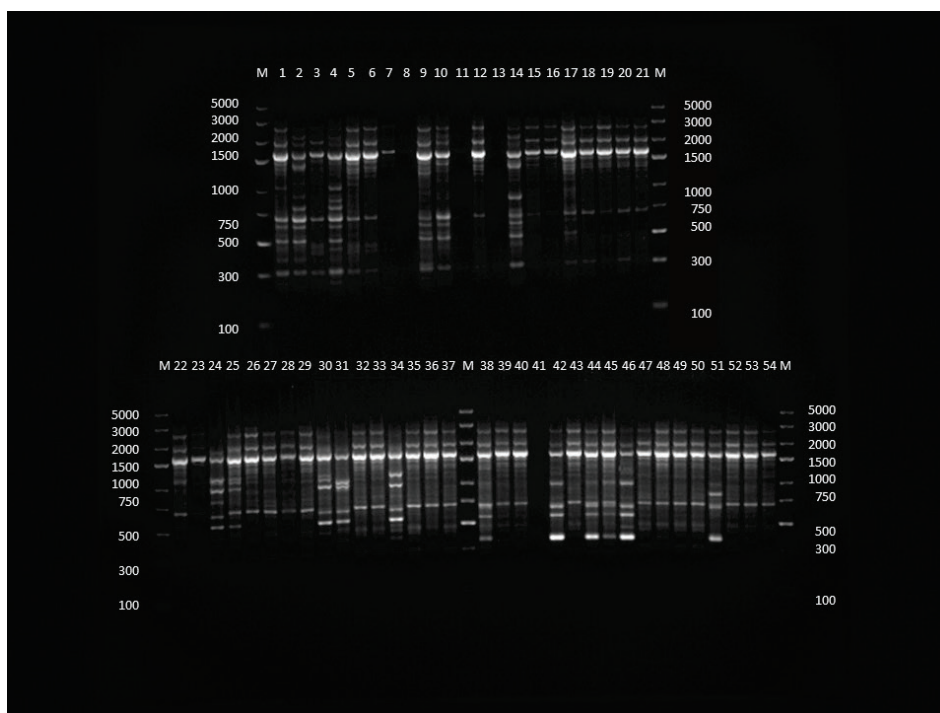
Starter	Liczba produktów	Zakres wielkości prążków [pz]	Liczba <i>loci</i>		Razem <i>loci</i>	Polimorfizm %
			monomorficzne	specyficzne		
S3	137	370-2830	0	21	22	100,00
S4	179	516-3613	1	22	24	95,83
S8	99	379-2338	0	22	25	100,00
S12	278	361-4878	9	11	22	59,09
S13	246	353-1900	3	12	19	84,21
S25	307	370-3040	3	27	31	90,32
S33	298	372-2776	5	18	26	80,77
Razem	1544	-	21	133	169	-

Tab. 12. Liczba produktów, zakres wielkości prążków, liczba *loci* oraz polimorfizm uzyskanych w wyniku analizy molekularnej za pomocą markera SCoT u *Copiapoa tenuissima*

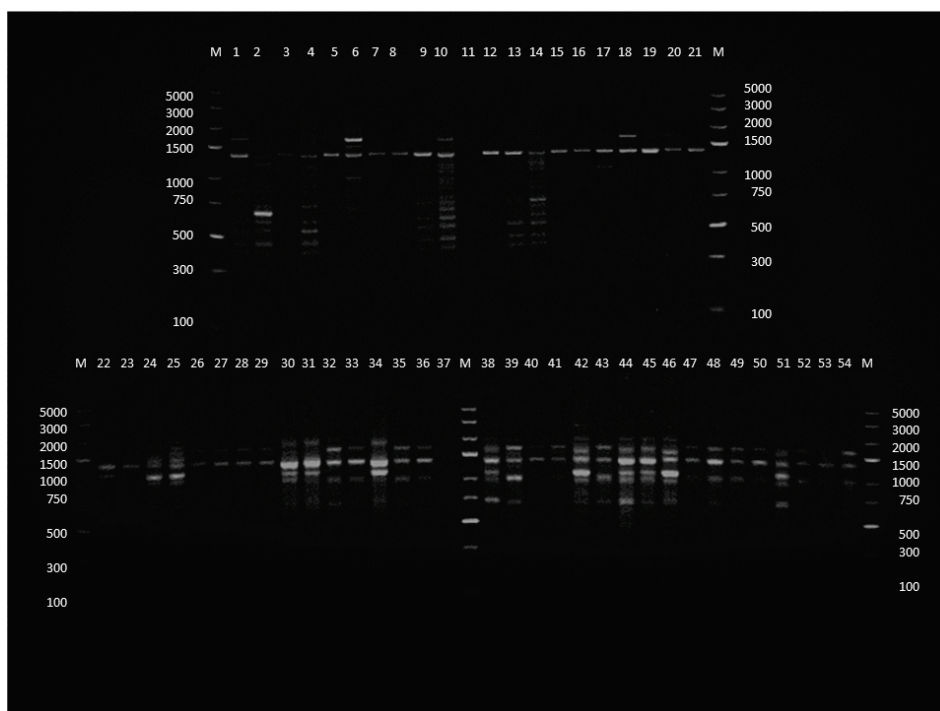
Starter	Liczba produktów	Zakres wielkości prążków	Liczba <i>loci</i>		Razem <i>loci</i>	Polimorfizm %
			monomorficzne	specyficzne		
S3	143	366-2806	1	14	19	94,74
S4	78	455-2787	1	11	12	91,67
S8	49	956-2123	0	7	9	100,0
S12	158	319-3009	1	15	19	94,74
S13	177	365-1949	7	8	15	53,33
S25	175	362-3733	2	21	29	93,10
S33	146	873-2546	2	14	19	89,47
Razem	926	-	14	90	122	-

Tab. 13. Liczba produktów, zakres wielkości prążków, liczba *loci* oraz polimorfizm uzyskanych w wyniku analizy molekularnej za pomocą markera SCoT u *Uebelmannia pectinifera*

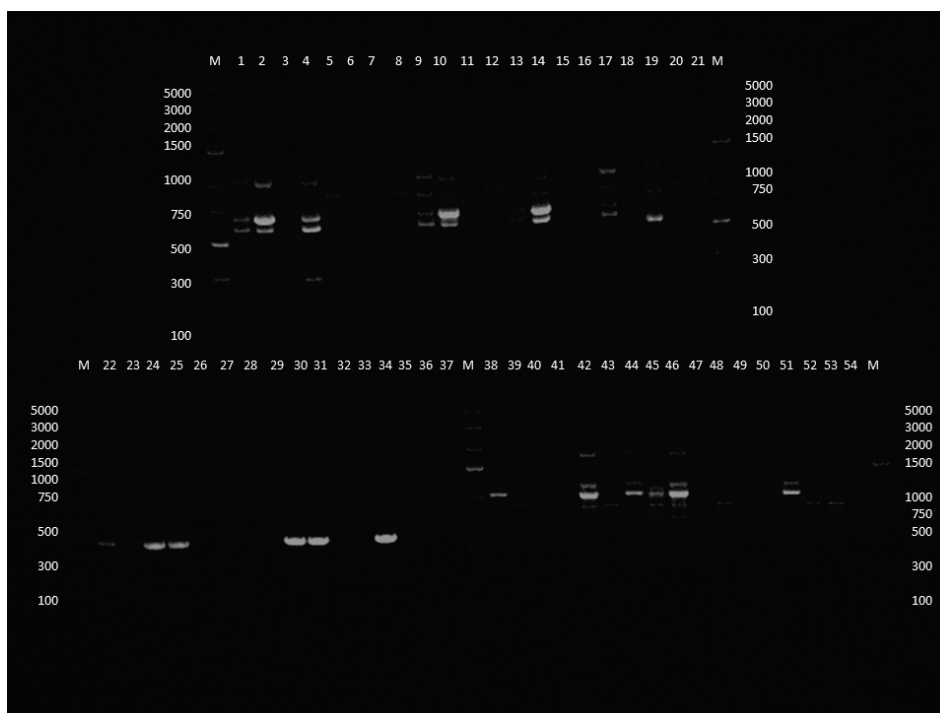
Starter	Liczba produktów	Zakres wielkości prążków	Liczba <i>loci</i>		Razem <i>loci</i>	Polimorfizm %
			monomorficzne	polimorficzne		
S3	156	366-2835	0	17	18	100,00
S4	113	394-3264	1	12	16	93,75
S8	136	423-2525	0	22	25	100,00
S12	250	329-2933	3	20	25	88,00
S13	180	348-2381	7	9	20	65,00
S25	224	362-4312	2	20	24	91,67
S33	196	355-2882	3	17	27	88,89
Razem	1255	-	16	117	155	-



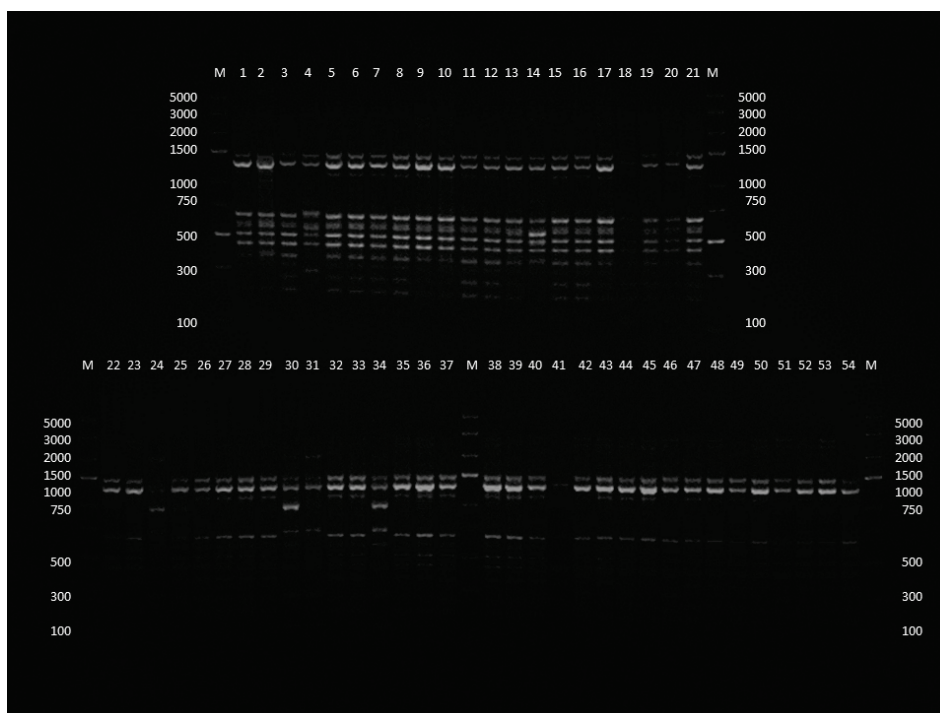
Ryc. 34. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S3: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum spp.* ‘Purple’, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M – marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)



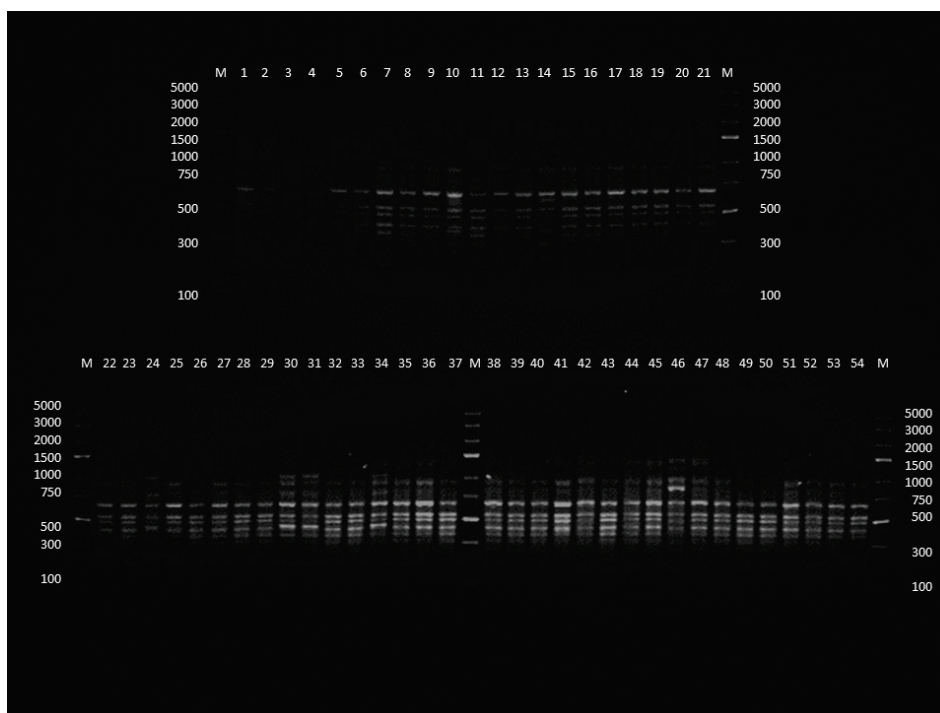
Ryc. 35. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S4: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum spp.* ‘Purple’, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M – marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)



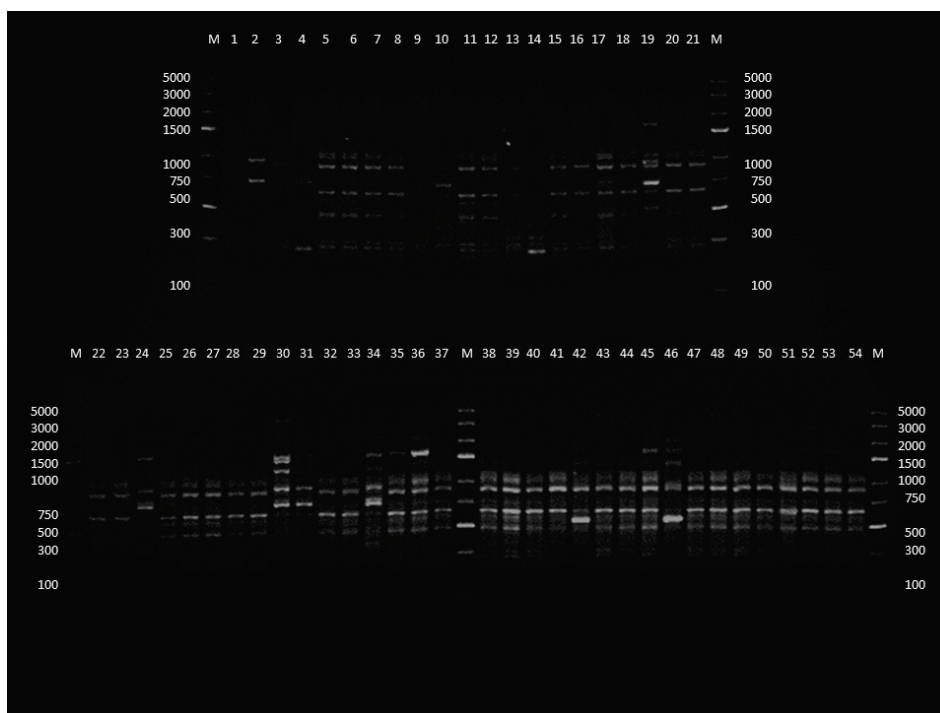
Ryc. 36. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S8: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum spp. 'Purple'*, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M – marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)



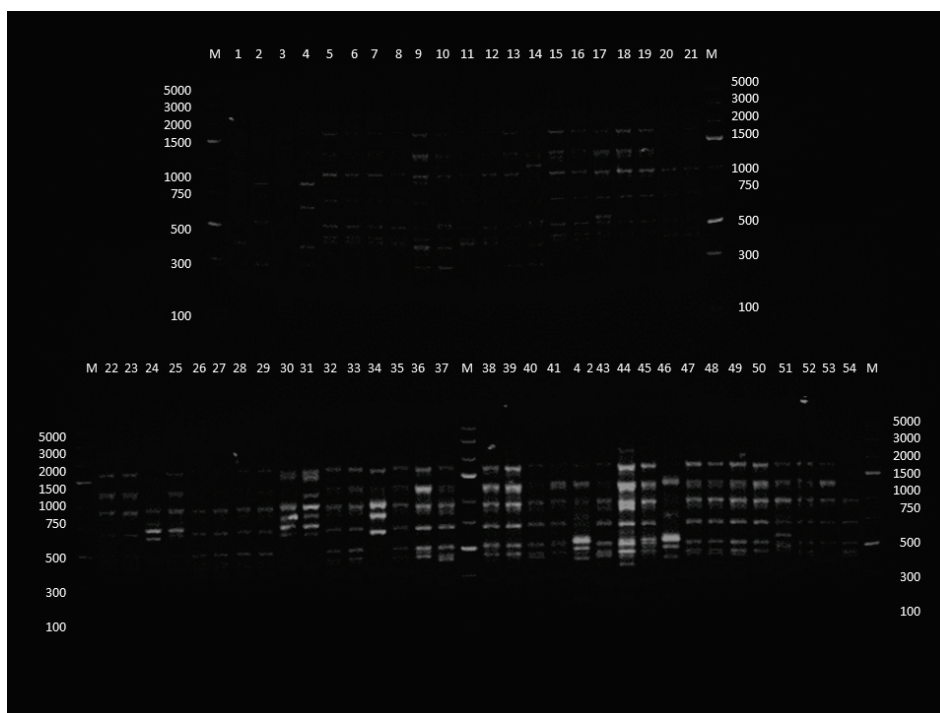
Ryc. 37. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S12: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum* spp. ‘Purple’, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M- marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)



Ryc. 38. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S13: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum* spp. ‘Purple’, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M – marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)

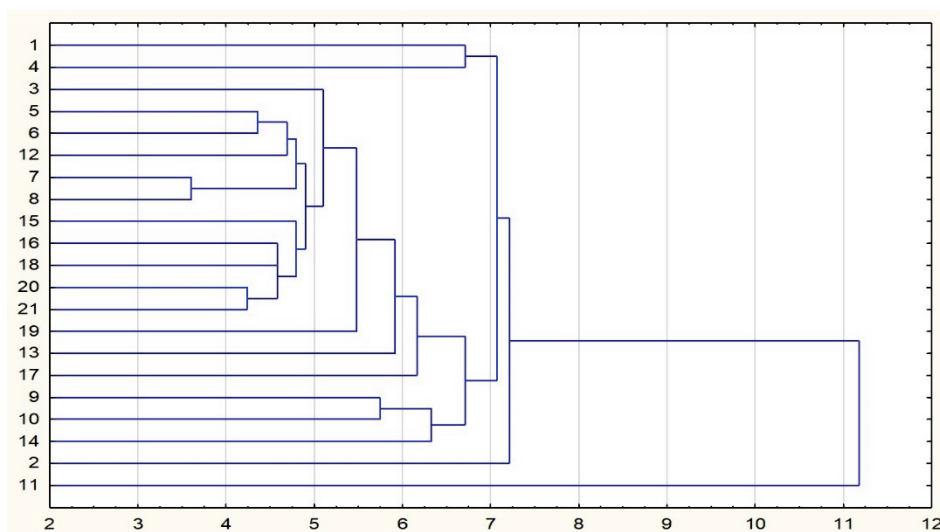


Ryc. 39. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S25: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum* spp. ‘Purple’, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M – marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)



Ryc. 40. Profile prążków uzyskane przy pomocy startera S33: Góra: M – marker wielkości, próby kolejno od 1 do 21 *Astrophytum spp.* ‘Purple’, M – marker wielkości; Dół: M – marker wielkości, próby 22-37 *Copiapoa tenuissima*, M – marker wielkości, próby 38-54 *Uebelmannia pectinifera*, M – marker wielkości (oznaczenie genotypów – Tab. 2)

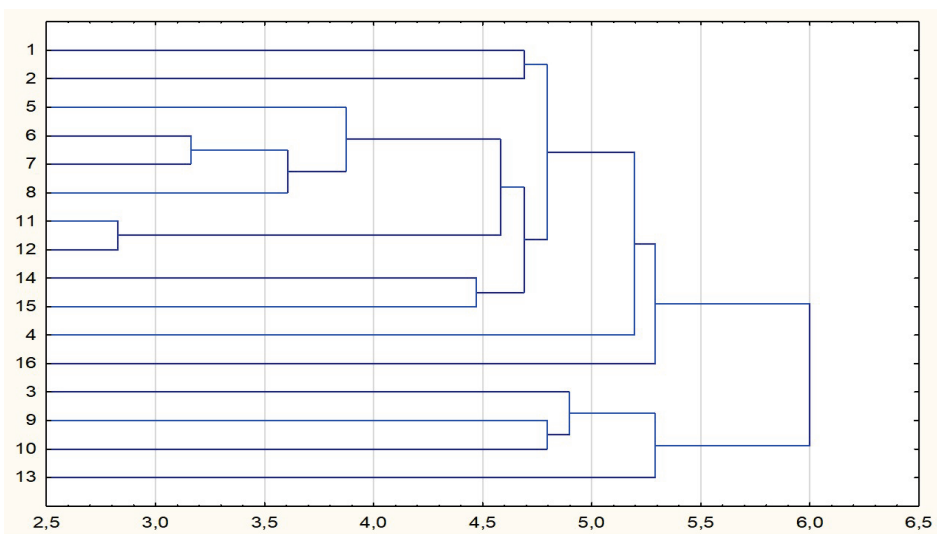
Wyniki analizy skupień UPGMA badanych genotypów u *Astrophytum spp.* ‘Purple’ przedstawiono na Rycinie 41. Stwierdzono, że największy dystans genetyczny wystąpił pomiędzy genotypem 11 (siewka kremowo-biała, którą uzyskano w wyniku działania dawki 20 Gy promieniowania X), który utworzył odrębny klaster od pozostałych. W obrębie dwóch subklastrow odrębne skupienie utworzył genotyp nr 2 stanowiący siewkę o barwie zielonej nie poddanej działaniu promieniowania X (kontroli). Najmniejszy dystans genetyczny stwierdzono natomiast pomiędzy genotypem nr 7 (pomarańczowa) i 8 (czerwona) poddane działaniu promieniowania w dawce 15 Gy oraz nr 5 (siewka zielona) i 6 (siewka kremowo-biała) poddane działaniu promieniowania w dawce 15 Gy, a także pomiędzy genotypem nr 20 (pomarańczowa) i 21 (czerwona), które były poddane działaniu promieniowania w dawce 50 Gy.



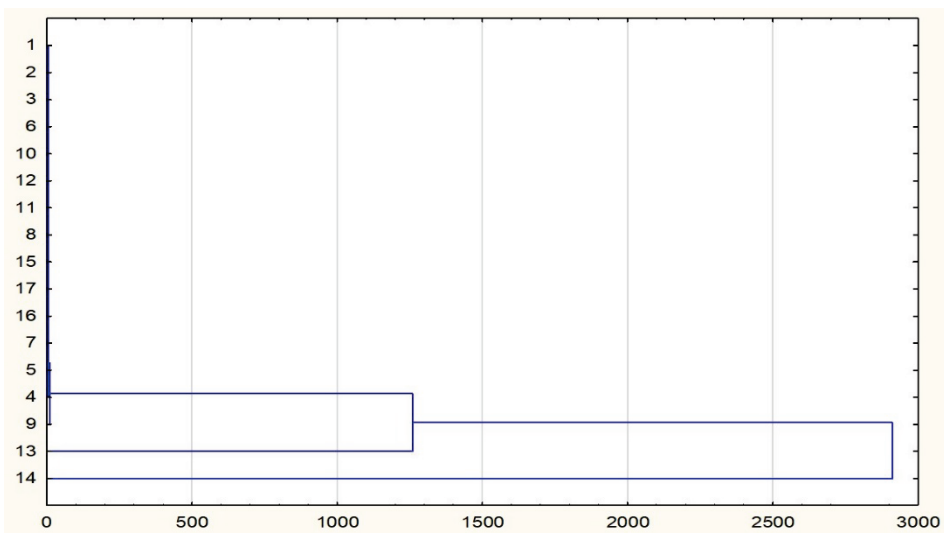
Ryc. 41. Dendrogram uzyskany metodą UPGMA dla genotypów *Astrophytum spp.* 'Purple' poddanych działaniu różnych dawek promieniowania X (oznaczenie genotypów – Tab. 2)

Analiza skupień u *Copiapoa tenuissima* wykazała 2 oddzielne klastry (Ryc. 42). W jednym skupione były genotypy 3 (siewka brunatna podana działaniu promieniowania 15 Gy, 9 i 10 (odpowiednio siewka brunatna i zielona, dawka 25 Gy) oraz genotyp nr 13 (siewka brunatna poddana dawce 50 Gy), natomiast w drugim wszystkie pozostałe genotypy. Najmniejszy dystans genetyczny stwierdzono pomiędzy genotypami 11 i 12 poddanymi działaniu promieniowania X w dawce 25 Gy oraz pomiędzy genotypami 6 i 7 poddanymi dawce promieniowania X 20 Gy.

Analiza UPGMA dla *Uebelmannia pectinifera* wykazała bardzo duży dystans genetyczny pomiędzy genotypem 14 (siewka brunatno-zielona, uzyskana w wyniku ekspozycji na dawkę 50 Gy) a pozostałymi genotypami, przy czym genotyp nr 13 i 4 utworzył klaster, który rozgałęził się na kolejne subklastry, przy czym w jednym subklastrze genotyp 13 (siewka brunatno-brunatna, 50 Gy) tworzył odrębne odgańlenie od genotypu 4 (siewka brunatno-brunatna, 15 Gy) i pozostałych genotypów (Ryc. 43).



Ryc. 42. Dendrogram uzyskany metodą UPGMA dla genotypów *Copiapoa tenuissima* poddanych działaniu różnych dawek promieniowania X (oznaczenie genotypów – Tab. 2)



Ryc. 43. Dendrogram uzyskany metodą UPGMA dla genotypów *Uebelmannia pectinifera* poddanych działaniu różnych dawek promieniowania X (oznaczenie genotypów – Tab. 2)

6. DYSKUSJA

Indukowanie mutacji w genach przy pomocy promieniowania jonizującego jest znaną metodą zwiększenia zróżnicowania genetycznego w hodowli roślin uprawnych. Promieniowanie jonizujące X z powodzeniem znalazło zastosowanie w wywołaniu zmian fenotypowych także u wielu gatunków roślin ozdobnych, takich jak: achimenes, alstremeria, azalia, begonia, bugenwilla, chryzantema, dalia, goździk, hibiskus, lilia, kalia, róża, tulipan [Datta 1989, Jerzy i Lubomski 1991, Zalewska 1995, Jerzy 2000, Ahloowalia i Maluszyński 2001, Zalewska 2010, Zalewska i in. 2010, Zalewska i in. 2011, Tymoszuć 2015, Sedaghatoor i in. 2017, Reznik i in. 2021, Jankowicz-Cieślak i in. 2022, Kulus i in. 2022]. Jednak w literaturze brakuje badań nad wpływem promieniowania jonizującego u kaktusów.

Mutacje mogą pojawiać się w sposób spontaniczny, jednak z bardzo niską częstotliwością lub być sztucznie indukowane poprzez zastosowanie zabiegów fizycznych lub chemicznych [Boujghagh i in. 2015]. Promieniowanie jonizujące jest jednym z najczęściej stosowanych czynników fizycznych, wywołującym mutacje. Jest to promieniowanie, które dzięki swojej dużej energii ma zdolność penetracji w głąb tkanek [Rogalska i in. 2005]. Ważnym początkowym aspektem w badaniach wpływu promieniowania na powstanie mutacji jest odpowiednie dobranie tkanki roślinnej, która ma być poddana działaniu czynnika mutagennego. Należy zaznaczyć, iż napromienienie tkanek niemerystatycznych powoduje zwiększenie szansy na uzyskanie jednorodnych i stabilnych genetycznie zmienionych mutantów, gdyż mutanty te pochodzą z pojedynczych oraz niedotkniętych mutacją komórek, a nowa barwa może obejmować cały organ roślinny, np. kwiatostan [Broertjes i van Harten 1988, Jerzy 1997, Tymoszuć 2016]. Jednakże w przypadku tkanek merystatycznych dochodzi przeważnie do powstania niejednorodnych genetycznie chimer, co ma miejsce często w przypadku chryzantem [Tymoszuć 2015].

Wpływ promieniowania na nasiona był badany przez wiele zespołów badawczych. Powszechnie uważa się, że duża dawka promieniowania X czy gamma jest szkodliwa dla roślin i opóźnia, hamując ich wzrost [Mensah i in. 2005, Animasaun i in. 2014, Deshmukh i in., 2018, Dada i in., 2022]. Z tego powodu konieczne jest prowadzenie wcześniejszych badań w celu określenia optymalnych dawek promieniowania. W przypadku kaktusów dawki te nie są znane [Boujghagh i in. 2015].

Jedyne badania dotyczące wpływu promieniowania na nasiona kaktusa na działanie promieniowania zostały przedstawione przez Boujghagh i in. (2015). Nasiona opuncji (*Opuntia ficus-indica*) pochodzące z dwóch rejonów Ait Baamrane (południe Maroka) i SkhourRhamna (Marakesz) poddano działaniu

promieniowania gamma w dawkach 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy oraz 200 Gy. Kiełkujące nasiona zliczano co dwa tygodnie, prowadząc doświadczenie przez okres czterech miesięcy. Kontrola wykazywała wyższą zdolność do kiełkowania (97%; 0,75 nasion dziennie) aniżeli uprzednio napromieniowane nasiona. Jednakże napromieniowane nasiona wykazywały zmniejszającą się zdolność do kiełkowania wraz ze zwiększeniem dawki promieniowania. Niższą zdolność do kiełkowania odnotowano dla dawki promieniowania dla nasion z rejonu Aït Baamrane: 37% dla dawki 200 Gy, 39% dla dawki 150 Gy, 49% dla dawki 100 Gy, a dla rejonu SkhourRhamna: 37 i 42% dla dawki 200 Gy, 39 oraz 39% dla dawki 150 Gy, 52% dla dawki 100 Gy. Napromieniowanie nasion nie tylko zmniejszyło zdolność do kiełkowania, ale również wydłużyło jego okres. Może być to spowodowane uszkodzeniami nasion, które z natury miały zdolność do wczesnego kiełkowania oraz stosunkowo cienką okrywą nasienną. Ponadto napromieniowane nasiona mają mniejszą zawartość wody w stosunku do tych, które nie są poddane działaniu czynnika mutagennego [Rojas-AreHchiga i VaHzquez-Yanes 2000]. Pod koniec doświadczenia procent nasion niekiełkujących zwiększał się wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania. Na podstawie uzyskanych wyników określono, iż dawką optymalną promieniowania dla nasion opuncji powinna mieścić się w zakresie od 50 Gy do 125 Gy, co pozwala na uzyskanie kolejno: 70 % (dla nasion z rejonu Aït Baamrane) oraz 50% (dla nasion z rejonu SkhourRhamna) zdolności do kiełkowania. Badania wpływu promieniowania na nasiona kaktusów *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera* nie były dotąd prowadzone. Badania własne z użyciem promieniowania X zostało użyte w celu napromieniowania nasion wyżej wymienionych trzech gatunków kaktusów. W badaniach własnych, w zależności od zastosowanej dawki promieniowania obserwowano zwiększenie bądź zmniejszenie liczby uzyskanych siewek oraz przyspieszenie lub spowolnienie kiełkowania nasion. Podobnie jak w przypadku badań Boujghagh i in. (2015), u *Astrophytum spp.* 'Purple' poddanie nasion promieniowaniu X skutkowało uzyskanie mniejszego odsetku wykiełkowanych nasion w stosunku do kontroli (0 Gy). Najwyższa dawka, wynosząca 50 Gy spowodowała otrzymanie najmniejszego odsetku kiełkujących nasion. Jednakże w przeciwieństwie do badań nad opuncją, mimo niekorzystnego wpływu promieniowania X na liczbę uzyskanych siewek, zastosowanie niskich dawek promieniowania wpłynęło w sposób korzystny na czas skrócenie czasu kiełkowania. Dawki 15 Gy oraz 20 Gy przyspieszyły powstanie siewek o 3-4 dni w stosunku do kontroli (0 Gy). Analogicznie do doświadczenia Boujghagh i in. (2015), wraz ze wzrostem użytej dawki promieniowania (25 Gy-50 Gy) kiełkowanie zostało opóźnione o 1-2 dni w stosunku do kontroli. W przeciwieństwie do *Astrophytum spp.* 'Purple', a tym samym badań Boujghagh i in. (2015) w przypadku *Copiapoa tenuissima*

zastosowanie najniższych dawek promieniowania (15 Gy i 20 Gy) na nasiona skutkowało powstaniem mniejszej liczby wykiełkowanych nasion. Natomiast napromieniowanie nasion dawkami 25 Gy oraz 50 Gy doprowadziły do otrzymania zwiększonej liczby wykiełkowanych nasion w stosunku do kontroli niepoddanej promieniowaniu X. W przeciwieństwie do badań nad opuncją, zastosowane promieniowanie w dawkach 20 Gy oraz 50 Gy spowodowało otrzymanie siewek o 1 dzień szybciej w stosunku do kontroli (0 Gy). Podobnie wyglądała sytuacja w przypadku *Uebelmannia pectinifera*, gdzie liczba wykiełkowanych nasion powstałych w wyniku ich uprzedniego napromieniowania promieniowaniem X w dawce 15 Gy, 20 Gy oraz 50 Gy była wyższa aniżeli w przypadku kontroli. Warto dodać, iż dawka 50 Gy przyspieszała początek kiełkowania nasion o 1 dzień w stosunku do nasion kontrolnych. Badania własne wskazują, iż każdy z badanych gatunków kaktusów posiadał najbardziej optymalną dawkę promieniowania X, która stymulowała uzyskanie większej liczby siewek czy krótszego czasu kiełkowania nasion.

Kumar wraz z zespołem (Kumar i in., 2007) wskazał, że promieniowanie ma zasadniczy wpływ na hamowanie kiełkowania nasion, które zostały narażone na wyższe dawki promieniowania. Jednakże naukowcy wskazują również, iż odpowiednio dobrana mała dawka może być korzystna dla roślin [Bless 1937, Kumar 2007, Al.-Enezi i Al.-Khayri 2012 a,b, Dada i in. 2022]. Badania własne również wykazały istotny wpływ promieniowania X na kiełkowanie nasion u badanych gatunków *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera*. Zastosowana dawka promieniowania miała zasadniczy wpływ na zwiększenie bądź zmniejszenie liczby uzyskanych siewek oraz przyspieszenie lub spowolnienie kiełkowania nasion. W przypadku *Astrophytum spp.* 'Purple' poddanie nasion promieniowaniu X skutkowało uzyskaniem mniejszego odsetku wykiełkowanych nasion w stosunku do kontroli (0 Gy). Najwyższa dawka, wynosząca 50 Gy spowodowała otrzymanie najmniejszego odsetku kiełkujących nasion. Mimo niekorzystnego wpływu promieniowania nasion na liczbę uzyskanych siewek, niskie dawki promieniowania X wpłynęły korzystnie na czas skrócenie czasu kiełkowania. Najmniejsze zastosowane dawki (15 Gy oraz 20 Gy) przyspieszyły powstanie siewek o 3-4 dni w stosunku do kontroli, która nie była poddana promieniowaniu. Wraz ze wzrostem użytej dawki promieniowania (25-50 Gy) kiełkowanie zostało opóźnione o 1-2 dni w stosunku do kontroli. W przeciwieństwie do *Astrophytum spp.* 'Purple', w przypadku *Copiapoa tenuissima* użycie najniższych dawek promieniowania 15 Gy oraz 20 Gy na nasiona spowodowało uzyskanie mniejszej liczby wykiełkowanych nasion. Natomiast napromieniowanie nasion większymi dawkami (25 Gy oraz 50 Gy) skutkowało otrzymaniem większej liczby wykiełkowanych nasion w stosunku do kontroli (0 Gy). Zastosowane promieniowanie w dawkach 20 Gy oraz 50 Gy

spowodowało otrzymanie siewek o 1 dzień szybciej w stosunku do kontroli. W przypadku *Uebelmannia pectinifera* liczba wykiełkowanych nasion powstałych w wyniku ich uprzedniego napromieniowania promieniowaniem X w dawce 15 Gy, 20 Gy oraz 50 Gy była wyższa aniżeli w przypadku kontroli, niepoddanej działaniu czynnika mutagennego. Ponadto dawka 50 Gy przyspieszała początek kiełkowania nasion o 1 dzień w stosunku do kontroli. Badania własne wskazują, iż każdy z badanych gatunków kaktusów posiadał najbardziej optymalną dawkę, która stymulowała uzyskanie większej liczby siewek czy krótszy czas kiełkowania nasion.

Dada wraz z zespołem (Dada i in., 2022) przeprowadzili szereg doświadczeń mających na celu stwierdzenie wpływu promieniowania X oraz gamma w dawkach 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy, 200 Gy oraz 400 Gy na kiełkowanie trzech odmian nasion *Coffea arabica* ('Kent', 'Mundo Novo' oraz 'Geisha'). Kontrolę stanowiły nasiona niepoddane działaniu czynnika mutagennego (0 Gy). Zebrano dane dotyczące szybkości kiełkowania oraz długości korzeni i hipokotyli. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że dawki od 50 Gy do 100 Gy stymulowały wigor siewek. Nasiona kontrolne kawy, niepoddane uprzednio działaniu promieniowania, kiełkowały po około 7 dniach od momentu założenia doświadczenia. Zastosowania dawek promieniowania 50 Gy, 100 Gy, 150 Gy, 200 Gy oraz 400 Gy, skutkowało kiełkowaniem nasion po upływie kolejno: 7, 9, 11, 14, 15 dni od dnia jego rozpoczęcia. W przeciwieństwie do zespołu Dady i in. (2022), badania własne wyraźnie wskazały, iż promieniowanie X może wpływać w sposób korzystny na skrócenie czasu kiełkowania. U *Astrophytum spp.* 'Purple' przyspieszenie (o 3-4 dni) początku kiełkowania nasion napromieniowanych w stosunku do kontroli niepoddanej promieniowaniu uzyskano w wyniku zastosowania dawki 15 Gy oraz 20 Gy. Natomiast u *Copiapoa tenuissima* poddanie nasion dawką 20 Gy a także 50 Gy skutkowało przyspieszeniem początku kiełkowania o 1 dzień. Podobnie wyglądała sytuacja u *Uebelmannia pectinifera*, gdzie zastosowanie dawki 50 Gy zaskutkowało przyspieszeniem początku kiełkowania o 1 dzień w stosunku do kontroli (0 Gy). Badania własne również potwierdziły, iż promieniowanie jonizujące może spowalniać kiełkowanie nasion. W przypadku *Astrophytum spp.* 'Purple' dawka 25 Gy oraz 50 Gy spowodowała późniejsze kiełkowanie o 1-2 dni w stosunku do kontroli. Badania własne prowadzone nad gatunkiem *Astrophytum spp.* 'Purple' potwierdziły zależność wydłużenia czasu kiełkowania wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X. Uzyskane wyniki przez Dada i współpracowników (2022) wyraźnie wskazały, iż wraz ze wzrostem zastosowanych dawek promieniowania odnotowano spadki kiełkowania. Dawki 50 Gy – 100 Gy stymulowały, podczas gdy 150 Gy niekorzystnie wpływały na kiełkowanie oraz wigor siewek. Wyższe dawki natomiast,

wynoszące 150 Gy, w sposób niekorzystny wpływało na wyżej wspomniane parametry. Warto zaznaczyć, iż promieniowanie w dawkach 200 Gy – 400 Gy skutkowało brakiem występowania kiełkowania. W badaniach własnych żadna z zastosowanych dawek promieniowania nie skutkowała brakiem jego występowania. W przeciwieństwie do nasion kawy – zastosowane wyższe dawki promieniowania (za wyjątkiem *Astrophytum spp.* ‘Purple’) wpływały korzystnie na uzyskanie większej liczby siewek: dla *Copiapoa tenuissima* – dawki 25 Gy oraz 50 Gy, a dla *Uebelmannia pectinifera* dawki 15 Gy, 20 Gy oraz 50 Gy. Warto zaznaczyć, iż u *Copiapoa tenuissima* napromieniowania najniższymi dawkami promieniowania (15 Gy oraz 20 Gy) skutkowało uzyskanie mniejszej liczby wykiełkowanych nasion. Uzyskane wyniki badań własnych nie potwierdzają zależności wzrostu zastosowanej dawki na wydłużenie czasu kiełkowania czy uzyskanie mniejszej liczby wykiełkowanych nasion. Jednakże warto podkreślić, iż w niniejszych badaniach nie zostały zastosowane tak wysokie dawki promieniowania. Badania przeprowadzone przez Boujghagh i in. 2015 nad kiełkowaniem napromienionych promieniowaniem gamma nasion *Opuntia ficus-indica* w warunkach *in vivo*, sugerują że dla kaktusów optymalna dawka powinna wynosić od 50 do 125 Gy co daje odpowiednio 70 i 50% kiełkujących nasion. Warto zaznaczyć, że tak wysoka dawka promieniowania jonizującego jest dla większości gatunków roślin dawką letalną, np. u chryzantemy wielkokwiatowej już dawka 25 Gy jest dawką subletalną (Jerzy i Zalewska, 1997).

Al.-Enezi i Al.-Khayri (2012a,b) dokonali szeregu doświadczeń w celu weryfikacji wpływu niskich dawek promieniowania X (od 0,05 Gy do 15 Gy) na kiełkowanie i wzrost siewek palmy daktylowej (*Phoenix dactylifera* L., cv. Khalas). Stwierdzono, iż kiełkowanie zasadniczo wpłynęło na uzyskanie mniejszej liczby siewek w stosunku do kontroli. Znaczący spadek procentu kiełkowania nasion zaobserwowano już podczas zastosowaniu dawki wynoszącej 0,25 Gy (82,85%), jednakże najniższe wartości procentu wykiełkowanych nasion uzyskano dla nasion, uprzednio potraktowanych dawką 15 Gy (61,42%). Co prawda badania własne opierały się na wykorzystaniu większych dawek promieniowania, jednakże dawka 15 Gy również została użyta do napromieniowania nasion badanych kaktusów. W badaniach własnych u *Copiapoa tenuissima* uzyskano mniejszą liczbę kiełkujących nasion, które zostały uprzednio napromieniowane dawką 15 Gy w stosunku do kontroli. U *Uebelmannia pectinifera* natomiast promieniowanie X w dawce 15 Gy spowodowało otrzymanie większej liczby wykiełkowanych nasion. Badania własne wskazują, iż każdy gatunek kaktusa: *Astrophytum spp.* ‘Purple’, *Copiapoa tenuissima* oraz *Uebelmannia pectinifera* ma swoją optymalną (zarówno niską jak i wysoką) dawkę promieniowania rentgenowskiego, które wpływa na zwiększenie bądź zmniejszenie liczby uzyskanych wykiełkowanych nasion.

Od wielu lat wiodącą w Polsce jednostką naukową zajmującą się badaniami związanymi z hodowlą mutacyjną chryzantem jest obecnie Pracownia Roślin Ozdobnych i Warzywnych Politechniki Bydgoskiej (dawniej Akademia Techniczno – Rolnicza w Bydgoszczy, Uniwersytet Technologiczno – Przyrodniczy w Bydgoszczy) [Zalewska 2010, Zalewska i in. 2010, Tymoszuć 2015]. Pracownicy naukowi uczelni w latach 1977-1978 w tejże jednostce przeprowadzali szereg doświadczeń związanych z działaniem promieniowania X w dawce 15 Gy na odmianę chryzantem ‘Bravo’, charakteryzujących się fioletowym zabarwieniem półkolistych kwiatostanów. Dzięki badaniom uzyskano kwiatostany o odmiennych barwach (różowej, brązowej, czerwonej oraz fioletowej) oraz kształtach (rurkowatym, piwoniatym, pojedynczym oraz pomponowym) [Stepczyńska i in. 1980, Stepczyńska i Jerzy 1981, Tymoszuć 2015]. W 1983 roku trzy mutanty zarejestrowano jako nowe odmiany ‘Promyk’, ‘Poranek’ oraz ‘Paloma’. W kolejnych latach badań dzięki wykorzystaniu promieniowania X oraz gamma w dawce 15 Gy z eksplantatów liściowych *in vitro* fioletowo-różowej odmiany ‘Richmond’ otrzymano ‘Lady Amber’ (barwa złocisto – brązowa), ‘Lady Bronze’ (barwa czerwono – brązowa), ‘Lady Pink’ (barwa różowa), ‘Lady Rosy’ (barwa kremowo – różowa), ‘Lady Salamon’ (barwa łososiowa), ‘Lady Yellow’ (barwa żółta) [Jerzy i in. 1991, Jerzy i in. 1993, Tymoszuć 2015]. Lata pracy nad wpływem promieniowania gamma w dawce 15 Gy na fioletową odmianę ‘Lilac Wonder’ spowodowały uzyskanie nowych dwóch odmian ‘Red Wonder’ (barwa czerwona) oraz ‘Bronze Wonder’ (barwa ciemnoczerwona), natomiast dzięki badaniom z wykorzystaniem promieniowania X w dawce 25 Gy otrzymano odmianę ‘Mini Nero’ [Zalewska 1995, Jerzy i Zalewska 1996, Tymoszuć 2015]. Dorobek naukowy Politechniki Bydgoskiej, dotyczący indukowanej mutagenyzy w przypadku chryzantem spowodował uzyskanie w ostatnich dekadach wiele nowych odmian ‘Albugo Sunny’ (barwa żółta), ‘Alchemist Tubular’ (barwa srebrzysto-fioletowa), ‘Alchemist Golden Beet’ (barwa buraczkowo-żółta), ‘Satinbleu Minty’ (barwa jasnoróżowa), ‘Satinbleu Honey’ (barwa łososiowa) [Zalewska i in. 2011, Tymoszuć 2015, Miler i in. 2021]. W badaniach własnych zastosowanie promieniowania X w dawkach w dawce 25 Gy oraz 50 Gy wywołało powstanie nowej, powszechnie niewystępującej barwy pomarańczowo – brunatnej, która dotąd nie była stwierdzona u tego gatunku. Natomiast zastosowanie promieniowania X u *Astrophytum spp.* ‘Purple’ skutkowało powstaniem nowej – czerwonej barwy siewek.

Istotne znaczenie w zastosowaniu promieniowania X, oprócz doboru odpowiedniego materiału roślinnego do napromieniowania ma również wyselekcjonowanie odpowiedniej dawki promieniowania. Suyitno i in. (2017) uzyskali pięć grup mutantów powstałych w wyniku potraktowania nasion storczyka (*Spathoglottis plicata*) promieniowaniem X w dawkach 0 rad, 6 rad, 12 rad, 18 rad oraz

24 rad (1 rad = 0,01 Gy). Mutacje obejmowały zmiany w kształcie liści (grube, nieotwarte liście) korzeni (duża liczba korzeni bocznych), pędów (wątle, nabrzmiące pędy), pigmentu (żółte zabarwienie liści, białe plamki na liściach) oraz przyspieszenia kwitnienia. Wyniki badań wskazały, iż użycie dawki od 12 rad do 18 rad jest w stanie stymulować zmienność morfologiczną, zwłaszcza zmiany związane z korzeniem, liściem oraz pędem. Badania własne nad kaktusami wykazały znaczący wpływ promieniowania X na zwiększenie liczby siewek bezchlorofilowych u *Astrophytum spp.* 'Purple' oraz barwnych u *Copiapoa tenuissima*. W przypadku *Astrophytum spp.* 'Purple' wraz ze zwiększeniem dawki promieniowania rentgenowskiego wzrastał procentowy udział siewek bezchlorofilowych barwy pomarańczowej, kremowo – białej i czerwonej (od 1,44% – dawka: 15 Gy do 5,12% – dawka 50 Gy). W przypadku *Copiapoa tenuissima* zwiększenie promieniowania X wpłynęło znacząco na przyrost procentowego udziału siewek barwnych o zabarwieniu pomarańczowo – brązowym oraz żółto – kremowym (od 2,11% – dla 15 Gy do 4,90% – dla 50 Gy). Należy zaznaczyć, iż w przypadku nasion kontrolnych *Copiapoa tenuissima*, niepoddanych promieniowaniu nie stwierdzono obecności żadnej siewki barwnej. W badaniach własnych promieniowanie X wpłynęło również na parametry takie jak: świeża masa, długość epikotyłu oraz hipokotyłu, szerokość epikotyłu i długość najdłuższego korzenia. W przypadku *Copiapoa tenuissima* siewki uzyskane z nasion napromieniowanych dawką 25 Gy charakteryzowały się najwyższą średnią wartością następujących parametrów: świeża masa (41,7 mg), długość epikotyłu i hipokotyłu (4,42 mm), szerokość epikotyłu (3,04 mm), a najdłuższy korzeń (10,16 mm) uzyskano z siewki otrzymanej w wyniku poprzedniego potraktowania nasion dawką 50 Gy. Natomiast najniższe średnie wartości parametrów takich jak: świeża masa (16,0 mg), długości hipokotyłu oraz epikotyłu (3,52 mm), szerokość epikotyłu (2,20 mm) oraz długość najdłuższego korzenia (6,14 mm) uzyskano z nasion napromieniowanych dawką 20 Gy. Badania własne nad kaktusem *Copiapoa tenuissima* wyraźnie wskazują, iż promieniowanie X może powodować uzyskanie wyższych wartości parametrów morfologicznych w porównaniu do kontroli niepoddanej promieniowaniu. Jednakże w przypadku *Uebelmannia pectinifera* promieniowanie X zaskutkowało otrzymanie niższych wartości badanych parametrów w stosunku do kontroli (0 Gy). Najniższe wartości parametrów (świeża masa – 19,7 mg, średnia wartość długości hipokotyłu oraz epikotyłu – 5,38 mm, szerokość epikotyłu – 2,64 mm, najwyższa średnia wartość długości najdłuższego korzenia – 8,76 mm) uzyskano dla siewek uzyskanych w wyniku promieniowania w dawce 15 Gy na nasiona. Należy podkreślić, iż zastosowanie wyższych wartości promieniowania doprowadziło do uzyskania wyższych wartości mierzonych parametrów morfologicznych.

Reznik i in. (2021) uzyskali mutanty z nasion kalii etiopskiej (*Zantedeschia aethiopica*) uprzednio potraktowanych promieniowaniem X w odmiennych dawkach. W wyniku szeregu badań stwierdzono, iż dawka 50 Gy (czas ekspozycji: 10 minut) okazała się najbardziej dopasowana do wskaźnika przeżywalności roślin. Jednakże dawka 100 Gy (czas ekspozycji: 20 minut) wykazywała największą zmienność fenotypową. Na skutek doświadczeń uzyskano rośliny o odmiennym kształcie i zabarwieniu liści czy liczbie łodyg. W okresie kwitnienia stwierdzono kolejne różnice, obejmujące: czas kwitnienia, liczbę uzyskanych kwiatów, wielkość, kształt i zabarwienie a także zapach kwiatów. W przypadku badań własnych kaktusów *Astrophytum spp.* 'Purple' procentowy udział siewek bezchlorofilowych wzrastał wraz z wielkością zastosowanej dawki promieniowania i był najwyższy dla dawki 50 Gy. U *Copiapoa tenuissima* natomiast wraz ze wzrostem użytej dawki promieniowania wzrastał procentowy udział siewek barwny i był najwyższy dla dawki 50 Gy. Zastosowanie dawki 25 Gy oraz 50 Gy spowodowało powstanie nowej barwy siewek, która była zmianą fenotypową dotąd niestwierdzoną u gatunku tego kaktusa. Wzrost zastosowanej dawki promieniowania X u *Uebelmannia pectinifera* wywołało spadek liczby siewek zielono – zielonych, a wzrost brązowo – brązowych. Badania własne potwierdzają zależność wpływu wzrostu wielkości zastosowanej dawki promieniowania X na zwiększenie zmian fenotypowych.

Badania Miler i zespołu (Miler i in., 2021) również udowodniły, iż istotne znaczenie ma dobór odpowiedniej dawki promieniowania. Miler wraz z zespołem (Miler i in., 2021) badała efekt napromieniowania różnymi dawkami (5 Gy, 10 Gy oraz 15 Gy) na zalążnie znajdujące się w kwiatach języczkowatych chryzantem wielkokwiatowych odmian 'Profesor Jerzy' oraz 'Karolina'. Dokonano oceny parametrów wzrostu i kwitnienia, gdzie uzyskano najbardziej satysfakcjonujące wyniki dla dawki 10 Gy. Wpływ tej dawki okazał się najskuteczniejszy w celu indukowania stabilnych mutacji koloru oraz kształtu kwiatostanu bez wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych, takich jak: opóźnienie czy wydłużenie czasu uprawy. Nowe fenotypy kwiatostanów w przypadku odmiany 'Profesor Jerzy' były ciemnożółte oraz różowawe, natomiast w przypadku odmiany 'Karolina' mutant posiadał pomarańczowo-czerwony kwiatostan. Zwiększenie dawki promieniowania powodowało zmniejszenie zdolności do regeneracji eksplantatów. Badania własne nad kaktusami *Astrophytum spp.* 'Purple' wskazały, iż procentowy udział siewek bezchlorofilowych był najwyższy dla dawki 50 Gy. U *Copiapoa tenuissima* natomiast procentowy udział siewek barwnych był najwyższy dla dawki 50 Gy. Zastosowanie dawki 25 Gy oraz 50 Gy spowodowało powstanie nowej barwy siewek, nietypowej u gatunku tego kaktusa. Wzrost zastosowanej dawki promieniowania X u *Uebelmannia pectinifera*

wywołało spadek liczby siewek zielono – zielonych, a wzrost brązowo – brązowych. Badania własne potwierdzają zależność między wzrostem zastosowanej dawki a zwiększeniem zmian fenotypowych.

Pewne ograniczenia dotyczące kiełkowania nasion poddanych promieniowaniu X zaobserwowano w przypadku jęczmienia, petunii, sosny zwyczajnej, pszenicy [Joshi i Ledoux 1970, Gilissen 1978, Floris i Anguillesi 2003, Rudolph 2003, Zelles 2003, Al.-Enezi i Al.-Khayri 2012a,b]. W wyniku zastosowania promieniowania X po upływie siedmiu dni przyrost parametrów morfologicznych – tj. długości korzeni wahał się od 3,7% (dawka 0,05 Gy) do 8,05% (dawka 15 Gy) w stosunku do kontroli niepoddanej działaniu promieniowania. W czasie dwóch tygodni największy przyrost korzeni uzyskano dla dawki 15 Gy (10,94%), natomiast po czterech tygodniach (15,19%). Ponadto zaobserwowano znaczny wzrost długości liści palmy daktylowej przy zastosowaniu dawek od 0,05 Gy do 0,25 Gy [Enezi i in. 2012]. Badania własne nad kaktusami *Copiapoa tenuissima* i *Uebelmannia pectinifera* potwierdziły istotny wpływ promieniowania X na parametry morfologiczne takie jak świeża masa, długość epikotyłu oraz hipokotyłu, szerokość epikotyłu oraz długość najdłuższego korzenia. U *Copiapoa tenuissima* uzyskano parametry najwyższe po zastosowaniu dawki na nasiona wynoszące 25 Gy. Najniższe parametry natomiast otrzymano przy zastosowaniu dawek 20 Gy oraz 50 Gy. U *Uebelmannia pectinifera* natomiast parametry morfologiczne były najniższe w siewkach kontrolnych uzyskanych z nasion niepoddanych promieniowaniu X, a najniższe przy zastosowaniu promieniowania X na nasiona w dawce 15 Gy.

U roślin ozdobnych takich jak chryzantemy barwa ich kwiatostanów jest zależna od obecności i ilości antocyjanów znajdujących się w warstwie L1, karotenoidów, flawonów i flawonoli, które z kolei występują w warstwach L1 oraz L2 [Bush i in. 1976, Tymoszek 2015]. Antocyjany są odpowiedzialne za powstawanie barwy niebieskiej, czerwonej oraz fioletowej. Natomiast flawonole i flawony warunkują barwę białą, kremową i żółtą. Karotenoidy mają wpływ na barwę żółtą, czerwoną oraz pomarańczową [Lema – Rumińska i Zalewska 2005]. Chlorofil odgrywa skuteczną rolę w przemianie energii świetlnej w energię chemiczną. Jego zawartość stanowi wskaźnik sprawności metabolizmu roślin i stanu zdrowotnego. Karotenoidy z kolei odgrywają główną rolę w fotoprotekcji oraz obronie komórki roślinnej przed stresem oksydacyjnym [Bartley i Scolnik, 1995; Demmig-Addams i in., 1996; Lefsrud i in., 2005; Kopsell i in., 2007]. Nowe barwy kwiatostanów powstają w wyniku modyfikacji szlaków biosyntezy barwników roślinnych [Mekapoogu i in. 2020]. Chociaż występowanie antocyjanów u roślin wyższych jest szeroko rozpowszechnione, to w przypadku kaktusów, jak również większości roślin z rodzaju *Caryophyllales*, zostały one zastąpione przez betalainy. Biosynteza antocyjanów może być u nich blokowana na późnym etapie, podczas przejścia z dihydroflawonoli do antocyjanów. Badania prowadzone

przez Sakuta i in. 2021 nad wyizolowaniem oraz scharakteryzowaniem funkcjonalnej 4-reduktazy dihydrofawonolu (DFR) i syntazy antocyjanidyny (ANS) wykazały brak antocyjanów z powodu supresji tych enzymów. Jednak u transgenicznej odmiany *Astrophytum myriostigma* potwierdzono możliwość biosyntezy antocyjanów w miejsce betalain w płatkach kwiatów [Sakuta i in. 2021].

Al.-Enezi i Al.-Khayri (2012a,b) w swoich badaniach nad palmą daktylową wykazali, iż promieniowanie rentgenowskie w sposób znaczący wpłynęło na stężenie barwników roślinnych (takich jak: chlorofil a, chlorofil b oraz karotenoidy). W porównaniu z kontrolą (0 Gy), niepoddaną działaniu promieniowania X, siewki poddane promieniowaniu w dawkach 5 rad, 10 rad, 25 rad, 50 rad, 100 rad, 250 rad, 500 rad, 750 rad, 1250 rad oraz 1500 rad (co odpowiada kolejno: 0,05 Gy, 0,1 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2,5 Gy, 5 Gy, 7,5 Gy, 12,5 Gy i 15 Gy) wykazywały obniżone stężenie badanych barwników roślinnych. Zauważono odwrotną zależność między zastosowaną dawką promieniowania a zawartością barwników fotosyntetycznych. Wraz ze wzrostem dawki promieniowania X zawartość chlorofilu a, chlorofilu b oraz karotenoidów malała. Spadek zawartości chlorofilu a zaobserwowano przy zastosowaniu 5 rad (0,05 Gy) i wynosiła 11,43 µg/g, a osiągnęła najwyższy poziom przy użyciu 1500 rad, wynosząc 7,49 µg/g. W przypadku chlorofilu b od zastosowanej dawki wynoszącej 10 rad odnotowywano coraz niższe stężenia tego barwnika (4,31 µg/g). Najniższe stężenie chlorofilu b (2,55 µg/g) odnotowano w przypadku wcześniejszego zastosowania promieniowania X w dawce 1500 rad (15 Gy). Spadek stężenia karotenoidów był podobny do pozostałych barwników roślinnych. Znacząca redukcja karotenoidów rozpoczęła się przy zastosowaniu 5 rad (0,05 Gy) – 2,66 µg/g, a najniższy poziom osiągnęła w wyniku zastosowania dawki 1500 rad (15 Gy) – 2,94 µg/g. Zawartość barwników roślinnych w konsekwencji znacząco wpłynęła na zabarwienie roślin. Badania własne wskazały, iż w przypadku gatunków kaktusów zależność między użytą dawką promieniowania a zawartością barwników jest różna. W przypadku *Astrophytum spp.* ‘Purple’ wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X stwierdzono spadek stężenia barwników roślinnych. Wyjątek natomiast stanowiła dawka 15 Gy, która spowodowała otrzymanie zwiększonego stężenia zawartości karotenoidów oraz chlorofilu a w siewkach barwy brązowej. Dawka 50 Gy spowodowała otrzymanie najniższego stężenia antocyjanów, chlorofilu b, a także karotenoidów w siewkach o zabarwieniu zielonym oraz chlorofilu a w siewkach barwy pomarańczowej. U *Copiapoa tenuissima* natomiast promieniowanie X na nasiona wpłynęło w sposób zróżnicowany na otrzymane stężenie barwników roślinnych i zależny był również od ich zabarwienia. Wraz ze zwiększeniem dawki promieniowania rentgenowskiego w siewkach barwy brązowej odnotowano wzrost stężenia karotenoidów, chlorofilu

a oraz chlorofilu b w stosunku do siewek kontrolnych niepoddanych promieniowaniu. W siewkach zielonych natomiast doszło do wzrostu stężenia antocyjanów oraz chlorofilu b, a spadek chlorofilu a oraz karotenoidów. U *Uebelmannia pectinifera* stwierdzono korzystny wpływ promieniowania X na stężenie wszystkich badanych barwników we wszystkich badanych barwach siewek w stosunku do kontroli (0 Gy). W szczególności dotyczyło to dawki dawce 15 Gy. Dawka 25 Gy stanowiła wyjątek u siewek brunatno – zielonych, gdzie uzyskano mniejsze stężenie antocyjanów w stosunku do kontroli, niepoddanej promieniowaniu X.

Dhawi oraz Al-Khayri (2008) wykazali natomiast, że niskie dawki promieniowania miały korzystny wpływ na barwniki fotosyntetyczne palmy daktylowej (*Phoenix dactylifera*), podczas gdy wysokie dawki miały wpływ negatywny. Zaobserwowali również, że chlorofil a oraz karotenoidy są bardziej wrażliwe na pola magnetyczne niż chlorofil b. Pick Kiong Ling z zespołem (2008) uzyskali niższą zawartość chlorofilu z sadzonek napromienianych promieniowaniem γ w porównaniu z niepoddanymi promieniowaniu sadzonkami pomarańczy słodkiej (*Citrus sinensis*). Zawartość chlorofilu jednakże była praktycznie niewrażliwa na niskie dawki promieniowania γ . Natomiast Abu i in. (2005) uzyskali wzrost poziomu chlorofilu a, chlorofilu b oraz całkowitego chlorofilu w poddanej działaniu promieniowania γ wspanięci zwyczajnej (*Vigna unguiculata*) [Abu i in. 2005, Dhawi i Al-Khayri 2008, Pick Kiong Ling i in. 2008]. W badaniach własnych dla *Astrophytum spp.* 'Purple' wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X (za wyjątkiem dawki 15 Gy) stwierdzono spadek stężenia barwników roślinnych. U *Copiapoa tenuissima* jednakże promieniowanie X na nasiona wpłynęło w sposób zróżnicowany na otrzymane stężenie barwników i było zależne również od ich zabarwienia. U *Uebelmannia pectinifera* stwierdzono korzystny wpływ promieniowania X na stężenie wszystkich badanych barwników we wszystkich badanych barwach siewek w stosunku do kontroli niepoddanej promieniowaniu.

Identyfikację i określenie odrębności od roślin matecznych uzyskanych nowych odmian potwierdza się często nie tylko w oparciu o cechy morfologiczne, stosując analizę składu jakościowego oraz ilościowego barwników roślinnych [Lema – Rumińska i Zalewska 2005], a także wykorzystując najbardziej niezawodne i obiektywne narzędzia biotechnologiczne jakimi są markery molekularne [Lema – Rumińska i in. 2004, Miler i Zalewska 2014]. Markery genetyczne wykorzystywane są także do określenia dystansu genetycznego w hodowli mutacyjnej. Badania własne potwierdziły bardzo wysokie różnicownie genetyczne przy pomocy markerów SCoT w napromienionych promieniowaniem X siewkach trzech gatunkach kaktusów: *Astrophytum spp.* 'Purple', *Copiapoa tenuissima*, *Uebelmannia pectinifera*. W innych badaniach promieniowanie X okazało się najbardziej efektywnym mutagenem w stosunku do nanocząstek złota i mikrofal

u serduszki okazałej (*L. spectabilis*) 'Valentine' [Kulus i in. 2022]. Szczególnie dawka promieniowania 20 Gy okazała się najbardziej skuteczna w wywoływaniu mutacji u serduszki okazałej, jednak liczba roślin ze zmianami genetycznymi była stosunkowo niewielka, gdyż zaledwie 3,3% miało zmiany zawartości DNA po napromienieniu promieniowaniem X, a polimorfizm (w zależności od startera SCoT) wyniósł od 0 do 6,25%, zaś liczba *loci* polimorficznych wynosiła średnio 2,4. W badaniach własnych szczególnie duży dystans genetyczny stwierdzono u siewek kaktusów napromienionych dawką 50 Gy. U badanych kaktusów stwierdzono znacznie wyższy poziom polimorfizmu w siewkach, który w zależności od zastosowanego startera SCoT wyniósł od 53,33% do 100% u *Copiapoa tenuissima*, od 59,09% do 100% u *Astrophytum spp.* 'Purple' i od 65,00% do 100,00% dla *Uebelmannia pectinifera*. Warto zauważyć, że podobny dystans genetyczny generował marker SCoT dla odrębnych gatunków należących do rodzaju *Astrophytum* i *Frailea* (Lema-Rumińska i in. 2022). Podobnie wysoki poziom polimorfizmu (PPB%) wynoszący od 75 do 100% wykazał Nasri i in. (2021) u mutantów chryzantemy uzyskanych w wyniku działania mutagenu chemicznego EMS (ethyl methanesulfonate) przy pomocy markera IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism), w badaniach tych marker ISSR wykazał nieco mniejszy polimorfizm. Także w badaniach Michałowskiej i Lemy-Rumińskiej (2018) marker ISSR dał niższy polimorfizm dla linii chryzantem uzyskanych w wyniku embriogenezy somatycznej, która także może stanowić dodatkowe źródło zmienności genetycznej u roślin.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Promieniowanie X wpłynęło na dynamikę kiełkowanie nasion u badanych gatunków kaktusów:

- u *Astrophytum spp.* 'Purple' promieniowanie X w dawce 15 i 20 Gy przyspieszyło początek kiełkowania nasion o 3-4 dni, w stosunku do nasion nienapromienionych (kontrolnych), nasiona napromienione wyższymi dawkami (25-50 Gy) kiełkowały o 1-2 dni później niż nasiona kontrolne. Najwięcej kiełkujących nasion uzyskano dla nasion niepoddanych działaniu promieniowania X (kontrolnych – 0 Gy), natomiast dawka promieniowania 50 Gy najbardziej wpłynęła na obniżenie liczby kiełkujących nasion w stosunku do kontroli (o 22,13 %) oraz pozostałych dawek promieniowania;
- u *Copiapoa tenuissima* dawka promieniowania 20 i 50 Gy przyspieszyła początek kiełkowania nasion o 1 dzień w stosunku do kontroli (0 Gy). Zaobserwowano wytworzenie się mniejszej liczby kiełkujących nasion napromienionych dawką 15 Gy oraz 20 Gy w stosunku do kontroli (0 Gy), natomiast wyższe dawki promieniowania (25 i 50 Gy) dały większą liczbę kiełkujących nasion niż nasiona nienapromienione (kontrola 0 Gy). Najwięcej kiełkujących (wzrost o 15,87%) nasion uzyskano dla nasion napromienionych dawką 25 Gy w stosunku do nasion nienapromienionych (kontroli);
- u *Uebelmannia pectinifera* dawka 50 Gy przyspieszyła początek kiełkowania nasion o 1 dzień w stosunku do kontroli i pozostałych dawek promieniowania. Największą liczbę kiełkujących nasion uzyskano dla nasion, które napromieniono promieniowaniem X w dawce 20 Gy (o 17,28% więcej niż w kontroli). Dawki promieniowania 15 i 50 Gy także zwiększyły liczbę kiełkujących nasion, natomiast dawka 25 Gy obniżyła o 8,48% w stosunku do kontroli liczbę kiełkujących nasion.

2. Zastosowane na nasiona promieniowanie X wpłynęło na udział procentowy siewek bezchlorofilowych u *Astrophytum spp.* 'Purple' lub barwnych u *Copiapoa tenuissima* oraz zróżnicowane zabarwienie siewek u *Uebelmannia pectinifera*. Stwierdzono ponadto istotny wpływ promieniowania na parametry morfologiczne siewek u *Copiapoa tenuissima* i *Uebelmannia pectinifera*.

- u *Astrophytum spp.* 'Purple' udział procentowy siewek bezchlorofilowych rósł wraz z wielkością dawki promieniowania i był największy dla dawki 50 Gy. Zastosowanie promieniowania X spowodowało powstanie nowej barwy siewek (czerwonej), która dotąd nie była stwierdzona u *Astrophytum spp.* 'Purple';

- u *Copiapoa tenuissima* udział procentowy siewek barwnych rósł wraz z wielkością dawki promieniowania i był najwyższy dla dawki 50 Gy. Użycie dawki promieniowania 25 Gy oraz 50 Gy spowodowało uzyskanie nowej barwy siewek (pomarańczowo – brunatnej), która dotąd nie była stwierdzona u *Copiapoa tenuissima*; parametry morfologiczne siewek były najwyższe przy dawce 25 Gy, a najniższe przy 20 i 50 Gy.
- u *Uebelmannia pectinifera* wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X stwierdzono spadek liczby siewek barwy zielono – zielonej, natomiast wzrost liczby siewek barwy brunatno – zielonej; parametry morfologiczne siewek były najwyższe w kombinacji kontrolnej (0 Gy), a najniższe przy 15 Gy.

3. Stwierdzono istotny wpływ promieniowania X na barwę siewek oraz zróżnicowane stężenie barwników roślinnych w siewkach.

- u *Astrophytum spp.* ‘Purple’ wraz ze wzrostem zastosowanej dawki promieniowania X stwierdzono spadek stężenia barwników roślinnych, także w obrębie danej barwy. Wyjątkiem było promieniowanie w dawce 15 Gy, które wpłynęło na zwiększenie zawartości karotenoidów oraz chlorofilu a w siewkach barwy brunatnej. Zastosowanie promieniowania w dawce 50 Gy spowodowało uzyskanie najniższego stężenia antocyjanów, chlorofilu b oraz karotenoidów w siewkach barwy zielonej i chlorofilu a w siewkach barwy pomarańczowej. W siewkach kremowo-białych nie stwierdzono obecności antocyjanów i karotenoidów.
- u *Copiapoa tenuissima* wpływ promieniowania X był zróżnicowany i zależał od barwy siewek. Wraz ze wzrostem dawki promieniowania w siewkach brunatnych nastąpił wzrost stężenia karotenoidów, chlorofilu a i chlorofilu b w stosunku do kontroli, natomiast w siewkach zielonych nastąpił wzrost stężenia antocyjanów i chlorofilu b, a spadek karotenoidów i chlorofilu a.
- u *Uebelmannia pectinifera* stwierdzono bardzo pozytywny wpływ promieniowania X w dawce 15 Gy na stężenie wszystkich badanych barwników, we wszystkich barwach siewek w stosunku do kontroli. Pozostałe dawki promieniowania także wpłynęły pozytywnie na zwiększenie zawartości barwników roślinnych, z wyjątkiem dawki 25 Gy u siewek brunatno-zielonych, która istotnie wpłynęła na obniżenie w nich stężenia antocyjanów w stosunku do kontroli.

4. Stwierdzono istotny wpływ promieniowania X na zróżnicowanie genetyczne siewek badanych gatunków kaktusów przy pomocy markera SCoT.

- stwierdzono bardzo wysoki poziom polimorfizmu w siewkach poddanych działaniu promieniowania X: *Astrophytum* spp. 'Purple', *Copiapoa tenuissima*, *Uebelmannia pectinifera*;
- analiza UPGMA wykazała bardzo duży dystans genetyczny u badanych genotypów poddanych działaniu promieniowania X u wszystkich gatunków kaktusów.

5. Promieniowanie jonizujące może być wykorzystane w hodowli radiomutacyjnej do uzyskiwania nowych odmian kaktusów.

8. LITERATURA

1. Abu J. D., Duodu G., Minnaar A., 2006. Effects of X-irradiation on some physicochemical and thermal properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) starch. *Food Chemistry*; 95: 386-393. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.008.
2. Acquaah G., 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing: 3-560.
3. Ahloowalia B. S., Maluszyński M., 2001. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118: 167-173.
4. Ahmad I., Bhagat, S., Sharma T. V. R. S., Kumar K., Simachalamand P., Srivastava R. C., 2010. ISSR and RAPD marker based DNA fingerprinting and diversity assessment of *Annona* spp. in South Andamans. *Indian J. Hort.*; 67(2): 147-151.
5. Al.-Enezi N. A., Al.-Khayri J. M., 2012a. Alterations of DNA, ions and photosynthetic pigments content in date palm seedlings induced by X-irradiation. *Int. J. Agric. Biol.*; 14: 329–336.
6. Al.-Enezi N. A., Al.-Khayri J. M., 2012b. Effect of X-irradiation on proline accumulation, growth, and water content of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings. *J. Biol. Sci.*; 12(3): 146-153.
7. Allegra M., Tesoriere L., Livera M. A., 2007. Betanin inhibits myeloperoxidase/nitrite-induced oxidation of human low-density lipoproteins. *Free Radic. Res.*; 41: 335-341. DOI: 10.1080/10715760601038783
8. Al-Samarai F. R., Al-Kazaz A. A., 2015. Molecular markers: an introduction and applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*; (9)3: 118-130. DOI:10.13187/ejmb.2015.9.118CrossRef
9. Amom T., Nongdam P., 2017. The use of molecular marker methods in plants: a review. *Int. J. Cur. Res. Rev.*; 9(17): 1-7. DOI: 10.7324/IJCRR.2017.9171
10. Andersen J. R., Lubberstedt T., 2003. Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*; 8(11): 554-560. DOI: 10.1016/j.tplants.2003.09.010
11. Anderson E. F., 2001. The Cactus Family. Timber Press, Portland, OR, USA.
12. Animasaun D. A., Morakinyo J. A., Mustapha O. T., 2014. Assessment of the effects of gamma irradiation on the growth and yield of *Digitaria exilis*. *Journal of Applied Biosciences*; 75: 6164-6172. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v75i1.1>
13. Archak S., Gaikwad A. B., Gautam D., Rao E. V. V. B., 2003. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. *Euphytica*; 130: 397-404. DOI:10.1023/A:1023074617348

14. Arct J., Pytkowska K., 2008. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin Dermatol.*; 26(4): 347-357. DOI:10.1016/j.clindermatol.2008.01.004
15. Arif I. A., Bakir A., Khan H., Al. Farhan A. H., 2010. A Brief Review of Molecular Techniques to Assess Plant Diversity. *International Journal of Molecular Sciences*; 11(5): 2079-2096. DOI:10.3390/ijms11052079
16. Avise J. C., 2009. Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa: 85-92.
17. Bach A., 2005. Zastosowania praktyczne biotechnologii. *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN; 268-272, 302-304.
18. Baghizadeh A., Dehghan E., 2018. Efficacy of SCoT and ISSR markers in assessment of genetic diversity in some Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *Pistachio and Health Journal*; 1(1): 37-43. DOI: 10.22123/PHJ.2017.54299
19. Bansal M., Kaur K., Tomar J., Kaur L., 2017. Synthesis of Flavones. *Manisha Bansal. Biomed. J. Sci. & Tech. Res.*;1(6): 1752-1755. DOI: 10.26717/BJSTR.2017.01.000530
20. Barthlott W. 2001. Foreword. In: Anderson EF. (ed.) *The cactus family*. Timber Press, Portland, Oregon; s: 9.
21. Barthlott W., Hunt D. R., 1993. *Cactaceae: The families and genera of vascular plants*. Vol. 2. red.: Kubitzki K., Rohwer J. G., Bittrich V. Springer Verlag, Berlin: 161-197.
22. Bartkowiak-Wieczorek J., Czarniewska E., Mrozikiewicz P. M., 2004. Molekularne aspekty somatycznego klonowania organizmów. *Herba Polonica*; 50(1): 94-105.
23. Bartley G. E., Scolnik P. A., 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attractant and human health. *The Plant Cell* 7: 1027/1038.
24. Bednarek P. T., Chwedorzewska, K. 2001. Markery molekularne, ich charakterystyka genetyczna oraz wybrane zastosowania w analizie genetycznej roślin. *Biotechnologia* 1 (52): 9-34.
25. Ben-Meir H., Zuker A., Weiss D., Vainstein A. 2002. Molecular control of floral pigmentation: anthocyjanins. *Breeding for ornamental: classical and molecular approaches*; 273-293. DOI: 10.1007/978-94-017-0956-9_13
26. Bhagyawant S. S., 2016. RAPD-SCAR Markers: An interface tool for authentication of traits. *Journal of Biosciences And Medicines*; 4: 1-9. DOI: 10.4236/jbm.2016.41001
27. Bhatia R., Singh K. P., Sharma T. R., Jhang T., 2011. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 104: 131-135. DOI:10.1007/s11240-010-9806-5
28. Blaim K., 1967. *Barwniki roślinne*, PWRiL. Warszawa

29. Bless A. A., 1937. Effects of the length of X-ray waves on seeds. *Physics: A. A. Bless*; 23: 194-196.
30. Bobula J., 2001. Doświadczenia nad barwnikami roślinnymi w szkolnej pracowni, Wyd. UJ Kraków; 26-28.
31. Bogacz-Radomska L., Harasym J., 2016. Plant carotenoids – activity, types and methods of obtaining (Karotenoidy roślinne – aktywność, rodzaje i metody pozyskiwania). *Rośliny w medycynie, farmacji i przemyśle*; 67-84.
32. Bołonkowska O., Pietrosiuk A., Sykłowska-Baranek K., 2011. Roślinne związki barwne ich właściwości biologiczne oraz możliwości wytwarzania w kulturach *in vitro*. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*; 1: 1-27.
33. Botelho F. B. i in., 2015. Ornamental Plant Breeding. *Ornamental Horticulture*; 9-16.
34. Boujghagh M, Bouharroud R., Mouhib M., 2015. Germination of cactus (*Opuntia ficus-indica*) seeds irradiated with various doses of radiations mutagenic treatment. *Acta Horticulturae* 1067: 75-84.
35. Brake M., Migdadi H., Al-Gharaibeh M., Ayoub S., Haddad N., El Oqlah A., 2014. Characterization of Jordanian olive cultivars (*Olea europaea* L.) using RAPD and ISSR molecular markers. *Scientia Horticulturae*; 176: 282-289. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.07.012
36. Braun P., J., 1984. *Uebelmannia pectinifera* Buining var. *Horrida*. *Kakteen und andere Sukkulente*; 35(12): 264.
37. Broertjes C., 1966. Mutation breeding of chrysanthemums. *Euphytica*; 15, 156–162.
38. Broertjes C., Koene P., Pronk T.H., 1983. Radiation-induced low-temperature tolerant cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica*; 32, 97-101.
39. Broertjes C., van Harten A., 1988. *Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops*. Elsevier; 29-59.
40. Bryszewska M., Leyko W., 1997. *Biofizyka dla biologów*, PWN, Warszawa.
41. Bueno L. C. S., Mendes A.N.G., Carvalho, S.P., 2006. *Plant Breeding: Principles and Procedures*. 2nd Edition, UFLA, Lavras; 319.
42. Bush S. R., Earle E. D., Langhans R. W., 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Am. J. Bot.*; 63: 729–737.
43. Calogero G., Bartolotta A., Di Marco G., Di Carlo A., Bonaccorso F., 2014. Vegetable-based Dye-Sensitized Solar Cells. *Chemical Society Reviews*; 1- 75.

44. Campos N. A., Panis B., Carpentier S. C., 2017. Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science*; 8: 1-12. DOI: 10.3389/fpls.2017.01460
45. Carpenter R., Coen E. S., 1995. Transposon induced chimeras show that *floricaula*, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. *Development*; 121: 19-26.
46. Celiński K., Zbránková V., 2010. Zastosowanie markerów ISSR do oceny zróżnicowania genetycznego iglastych. *Management of Environmental Protection in Forests*; 4(8): 8-19.
47. Chakrabarty D., Datta S. K., 2010. Application of RAPD markers for characterization of γ -ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity. *Plant Biotechnology Reports*; 4: 237-242. DOI: 10.1007/s11816-010-0140-5
48. Chattopadhyay P., Chatterjee S., Sen S. K., 2008. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology*; 7(17): 2972-2985
49. Chrzanowska A., Jadwiszczak K. A., 2015. Rola hybrydyzacji międzygatunkowej w kształtowaniu zmienności genetycznej oraz morfologicznej brzoź (*Betula* L.). *Różnorodność biologiczna – od komórki do ekosystemu. Funkcjonowanie roślin i grzybów. Środowisko – eksperyment – edukacja*; 145-157.
50. Collard B.C.Y., Mackill D.J., 2009. Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants *Plant Mol. Biol. Rep.*, 27: 86-93. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5>.
51. Crozier A., Jaganath I., Clifort M. N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*; 26(8): 965-109. DOI: 10.1039/b802662a
52. Cullen J., Knees S. G., Cubey H. S., 2011. *The European Garden Flora Flowering Plants: A Manual for the Identification of Plants Cultivated in Europe, Both Out-of-Doors and Under Glass*. Cambridge University Press.
53. Cunningham F. X., Gantt E. 2002. Molecular control of floral pigmentation: carotenoids, Breeding for ornamental: classical and molecular approaches; 253-272.
54. Czekalski M., 2010. *Ogólna uprawa roślin ozdobnych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu; 3: 191-192.
55. Dada K. E., Animasaun D. A., Mustapha O. T., Bado S., Foster B. P., 2022. Radiosensitivity and biological effects of gamma and X-rays on germination

- and seedling vigour of three *Coffea arabica* varieties. *Journal of Plant Growth Regulation*; 42: 1582-1591.
56. Damude N., Poole J., 1990. Status report on Echinocactusasterias (*Astrophytum asterias*). U.S. Fish and Wildlife Service, Albuquerque, New Mexico.
 57. Das A. B., 2008. Assessment of Genetic Diversity and Phylogenetic analysis of 'Star Cactus' (*Astrophytum*) Through Chromosome and RAPD Markers. *The Japan Mendel Society*; 73(2): 179-188. DOI: 10.1508/cytologia.73.179
 58. Datta S. K. D., 1989. Improvement of ornamental plants through induced mutation, Recent advances in genetics and cytogenetics (Farook, SA, Khan, IA, eds).
 59. Davies K. M., 2004. Plant Pigments and their Manipulation. Annual Review of Plant Biology 14 Blackwell Publishing Ltd, Oxford UK
 60. Davies K. M., Schwinn K. E., 1997. Flower colour, w: Biotechnology of ornamental plants. Geneve R. L., Preece J. E., Merkle S. A. CAB International, Wallingford; 259-294.
 61. Degefa I, 2019. Plant Breeding Methods: In Brief for Students. *International Journal of Agriculture & Agribusiness*; 3(2): 156-203.
 62. Demmig- Addams B., Gilmore A. M., Addams W. W. 1996. Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.*; 10(4): 403-412. DOI: 10.1096/fasebj.10.4.8647339
 63. Deshmukh S. B., Bagade A. B. Choudhari A. K., 2018. Induced Mutagenesis in Rabi Sorghum. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*; 6: 766-771.
 64. Dhawi F., Al-Khayri J., Hassan E., 2009. Static Magnetic Field Influence on Elements Composition in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*; 5: 161-166.
 65. Dhutmal R. R., Mundhe A. G., More A. W., 2018. Molecular marker techniques: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 6: 816-825.
 66. Działuk A., Burczyk J., 2001. Molekularne markery DNA jako narzędzie badawcze genetyki drzew leśnych. *SYLWAN* 8: 67-83.
 67. Dżugan M. 2006. Czynniki wpływające na stabilność zielonych barwników roślin. *Zeszyty Naukowe Polskiego Towarzystwa Inżynierii Ekologicznej*; 7: 26-33.
 68. *Euphytica* 118: 167–173.
 69. Fang D. Q., Roose M. L., 1997. Identification of closely related citrus cultivars with Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*; 95 (3): 408-417.
 70. Fang D. Q., Roose M. L., Krueger R. R., Federici C. T., 1997. Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and Inter-

- Simple Sequence Repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*; 95(1-2): 211-219.
71. Filipiak 2008. Efektywność hodowli roślin rolniczych w spółkach ANR. *Roczniki Nauk Biologicznych*; 95(1): 150-157.
 72. Fleischer Z., Schutz B., 1986. *Kaktusy*. PWRiL. Warszawa, 130-163.
 73. Floris, C. P., Anguillesi M. C., 2003. Response to X-rays of dormant and non-dormant seeds of *Triticum durum* desf. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutag.* 28: 63-67.
 74. Formica J. V., Regelson W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.*; 33: 1061-1080.
 75. Gaene S. H., Upadhyay P., Das S., Sharma M. P., 2015. Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*; 4: 53-99. DOI: 10.1016/j.plgene.2015.10.002
 76. Gajera H. P., Bambharolia R. P., Domadiya, R. K., Patel S. V., Golakiya B. A. 2014. Molecular characterization and genetic variability studies associated with fruit quality of indigenous mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Plant Systematics and Evolution*; 300(5): 1011-1020. DOI: 10.1007/s00606-013-0939-y
 77. George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J., 2008. Plant propagation by tissue culture volume 1. The Background. Springer; 334-354.
 78. Gholami A. A., Alavi S. V., Majd A., Fallahian F., 2013. Plant regeneration through direct and indirect somatic embryogenesis from immature seeds of citrus. *European Journal of Experimental Biology*; 3(3): 307-310.
 79. Gilissen L. J. W., 1978. Post-X-irradiation effects on petunia pollen germinating *in vitro* and *in vivo*. *Env. Exp. Bot.*; 18: 81-86.
 80. Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Amer J Bot* 87: 783– 792
 81. Goulet B. E., Roda F., Hopkins R., 2017. Hybridization in Plants: Old Ideas, New Techniques. *Plant Physiology*; 173: 65-78. DOI: 10.1104/pp.16.01340
 82. Grant V., 1981. *Plant Speciation*, Ed 2. Columbia University Press, New York.
 83. Grimm B., 2001. Chlorophyll: Structure and Function. *Encyclopedia of life sciences*; 1-8.
 84. Gryszczyńska A., Gryszczyńska B., Opala B., 2011. Karotenoidy. Naturalne źródła, biosynteza, wpływ na organizm ludzki. *Postępy Fitoterapii*; 2: 127-143.
 85. Guo-Liang J., 2013. Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*; 45-83.

86. Han J., Wang W. Y., Leng X. P., Guo L., Yu M. L., Jiang W. B., Ma R. J., 2014. Efficient identification of ornamental peach cultivars using RAPD markers with a manual cultivar identification diagram strategy. *Genetics and Molecular Research*; 13(1): 32-42. DOI: 10.4238/2014.January.8.2.
87. Hejnowicz Z., 1956. O pierwszej chimerze peryklinarnej wśród nagonasien-nych. *Acta Societatis Botanicorum Polonae*; XXV(1): 181-202.
88. Hernández H. M., 2008. Rere cacti and the need to protect Mexican drylands. The nature of drylands. One Union – a wealth of expertise on drylands, IUCN: 26.
89. Hernández H. M., Bárcenas R. T., 1995. Endangered cacti in the Chihuan desert. I. Distribution patterns. *Conservation Biology* 9: 1176-1188.
90. Hinz S., Abramowicz M., 1984. Uprawa kaktusów. Wydawnictwo Glob Szczecin; 1-203.
91. Hnatuszko-Konka K., Łuchniak P., Wiktorek-Smagur A., Gerszberg A., Kowalczyk T., Kononowicz A. K., 2009. Transformacja roślin za pośred-nictwem *Agrobacterium rhizogenes*. *Postępy biologii komórki*; 36(25): 189-200.
92. Holme I.B., Gregersen P.L., Brinch-Pedersen H., 2019. Induced Genetic Var-iation in Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. *Front Plant Sci.* 10, 1468, doi:10.3389/fpls.2019.01468.
93. Horbowicz M., 2000. Występowanie, biosynteza i właściwości biologiczne flawonoli. *Postępy Nauk Rolniczych*; 2: 3-18.
94. Jankowicz-Cieślak J., Hofinger B. J., Jarc L., Junttila S., Galik B., Gyenesei A., Ingelbrecht I. L., Till B. J., 2022. Spectrum and Density of Gamma and X-ray Induced Mutations in a Non-Model Rice Cultivar. *Plants*; 11: 3232. <https://doi.org/10.3390/plants11233232>.
95. Jasiński M., Mazurkiewicz E., Rodziewicz P., Figlerowicz M., 2009. Flawo-noidy – budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem ro-ślin motylkowatych. *Kosmos*; 2(85): 81-94.
96. Jasrai T.Y., Thaker K.N., D'Souza C.M. 2003. *In vitro* propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. through somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cult.*; 13(1): 31-36.
97. Jeong I. M., Cho H. C., Lee J. M., 2004. Production and breeding of cacti for grafting in Korea. *Chronica Horticulturae*; 44: 7-10.
98. Jerzy M., 1997. Rola eksplantatu w indukowaniu mutacji *in vitro* i tworzeniu roślin transgenicznych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*; 2: 27-32.
99. Jerzy M., 2000. Chryzantemy. Odmiany i uprawa. PWRiL, Warszawa, 2-27.

100. Jerzy M., Krzywińska A., 2011. Rozmnażanie wegetatywne roślin ozdobnych. PWRiL, Poznań; 88-98.
101. Jerzy M., Lubomski M., 1991. Tworzenie się pędów przybyszowych na izolowanych *in vitro* w liściach chryzantem poddanych działaniu promieniowania jonizującego. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo* 2, 26–29.
102. 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.
103. Jevremović S., Subotić A., Miljković D., Trifunović M., Petrić M., Cingel A. 2012. Clonal fidelity of Chrysanthemum cultivars after long-term micropropagation by stem segments culture. *Acta Horticulturae*; 961: 211-216. DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.961.25
104. Jones N., Ougham H., Thomas H., Pašakinskienė I., 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist* 183 (4): 935-966. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02933.x
105. Jordan P., Fromme P., Witt H. T., Klukas O., Saenger W., Kraub N., 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*; 411(6840): 909-917.
106. Joshi R. K., Ledoux L., 1970. Influence of X-irradiation and seed-moisture on nucleic-acid and protein metabolism in barley. *Radiation Botany*; 10 (5): 437-443.
107. Kesawat M. S., Das B. K., 2009. Molecular markers: it's application in crop improvement. *J. Crop Sci. Biotech.*; 12(8): 168-178. DOI: 10.1007/s12892-009-0124-6
108. Kępczyńska E., 2006. Kiełkowanie i konwersja somatycznych zarodków *in vitro*. *Biotechnologia*; 4 (75): 78-94.
109. Kępczyński J., Kępczyńska E. 2001. Regulatory wzrostu w somatycznej embriogenezie *Medicago sativa* L. *Biotechnologia*; 2(53): 16-25.
110. Klewicka E., 2012. Betacyjaniny – biodostępność i biologiczna aktywność. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*; 2(81): 5-21.
111. Knopkiewicz K., Gawłowska M., Święcicki W., 2012. Poszukiwanie polimorficznych markerów zdefiniowanych sekwencyjnie w populacji grochu Carneval X MP1401. *Fragm. Agron.*; 29(4): 87-94.
112. Kohlmünzer S., 2007. Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji. Wyd. V unowocześnione. PZWL, Warszawa: 150-198, 253-277, 377-379, 531.
113. Kolašinacs. M., Dajić Stevanović Z. P., Kilibarda S. N., Kostić A. Ž., 2021. Carotenoids: New Applications of “Old” Pigments. *Phyton*; 90(4): 1041-1062.

114. Konczak I., Zhang W., 2004. Anthocyanins-more than naturés colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 5: 239-240. DOI: 10.1155/S1110724304407013
115. Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*; 64: 923-933. DOI: 10.1016/s0031-9422(03)00438-2.
116. Kopsell D. A., Kopsell D. E., Curran-Celentano J., 2007. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Volume; 87 (5): 900-907.
117. Kozłowska M., Politycka B., 2007. Fotosynteza i aktywność fotosyntetyczna roślin. Faza świetlna procesu. W: *Fizjologia roślin: od teorii do nauk stosowanych* pod redakcją Moniki Kozłowskiej. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań: 215-222.
118. Kozłowski J., 2002a. Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część I. *Wiadomości zielarskie*; 5: 9-12
119. Kozłowski J., 2002b. Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część II. *Wiadomości zielarskie*; 6: 13-15
120. Kozłowski J., 2002c. Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część III. *Wiadomości zielarskie*; 7: 19-20
121. Kozłowski J., 2002d. Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część IV. *Wiadomości zielarskie*; 8-9: 35
122. Kozłowski J., 2002e. Rośliny bogate w barwniki oraz ich znaczenie i zastosowanie. Część V. *Wiadomości zielarskie*; 10: 17-19.
123. Krasowska A., Łukaszewicz M., 2003. Czy warto jeść kolorową żywność? *AURA*; 2: 20-21.
124. Křížová H., 2013. *Natural Dyes. Textile Dyeing – Theory and Applications*; 18: 317-334.
125. Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.*; 42(1): 43-48.
126. Kulpa D., 2012. Somatyczna embriogeneza w kulturach chryzantemy wielokwiatowej (*Chrysanthemum × grandiflorum*) (Ramat.) Kitam.). Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Szczecin: ss: 7-76.
127. Kulus D., Lema-Rumińska J., Miler N., Tymoszuć A., 2016. Wybrane aspekty biotechnologii *Chrysanthemum × grandiflorum* (Ramat.) Kitam. *Współczesne kierunki badań nad roślinami ozdobnymi w Polsce*; 253-263.
128. Kulus D., Tymoszuć A., Jędrzejczyk I., Winięcki J., 2022. Gold nanoparticles and electromagnetic irradiation in tissue culture systems of bleeding

- heart: biochemical, physiological, and (cyto) genetic effects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149:715–734 <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02236-1>.
129. Kumar A., Mishra M. N., Kharkwal M. C., 2007. Induced mutagenesis in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Indian J Genet*; 67 (1): 41-46.
 130. Kumar M., Chaudhary V., Sirohi U., Singh M. K., Malik S., Naresh R. K., 2018. Biochemical and molecular markers for characterization of chrysanthemum germplasm: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 7(5): 2641-2652.
 131. Kumar S., Fladung M., 2001. Controlling transgene integration in plants. *Trends Plant Sci.*; 6(4): 155-159.
 132. Kumar V., Rajvanshi S. K., Yadav R. K., 2009. Potential Application of molecular markers in improvement of vegetable crops. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*; 5(4): 690-707. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)01890-8.
 133. Kumar V., Rajvanshi S. K., Yadav R. K., 2014. Potential Application of molecular markers in improvement of vegetable crops. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*; 5(4): 690-707.
 134. Kundan M., Fougat R. S., Ballani A., Vinita T., Yachana J., Madhumati B., 2014. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Int. J. Pure App. Biosci.*; 2(1): 169-188.
 135. Kuo H., Chen J., Chang W. 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of Phalaenopsis ‘Little Steve’. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 41: 453-456.
 136. Kurane J., Shinde V., Harsulkar A., 2010. Application of ISSR marker in pharmacognosy: current update. *Phcog Rev.*; 3(6): 216-228.
 137. Larridon I., Shaw K., Cisternas M. A., Paizanni Guillén A., Sharrock S., Oldfield S., Goetghebeur P., Samain M. S., 2014. Is there a future for the *Cactaceae* genera *Copiapoa*, *Eriogyne* and *Eulychnia*? A status report of a prickly situation. *Biodiversity and Conservation* 23: 1249-1287.
 138. Larridon I., Walter H. E., Guerrero P. C., Duarte M., Cisternas M. A., Hernández C. P., Bauters K., Asselman P., Goetghebeur P., Samain M. S., 2015. An integrative approach to understanding the evolution and diversity of *Copiapoa* (*Cactaceae*), a threatened endemic Chilean genus from the Atacama Desert. *American Journal of Botany*; 102(9): 1506-1520.
 139. Latkowska M. J. 2002. Somatyczna embriogeneza roślin iglastych na przykładzie świerka pospolitego (*Picea bies* [L.] Karst.). *Biotechnologia* 4(59): 210-226.

140. Lee G. P., Lee C. H., Kim C. S., 2004. Molecular markers derived from RAPD, SCAR, and the conserved 18S rDNA sequences for classification and identification in *Pyrus pyrifolia* and *P. communis*. *Theor. Appl. Genet.*; 108: 1487-1491. DOI: 10.1007/s00122-003-1582-8.
141. Lefsrud M. G., Kopsell D. A., Kopsell D. E., Curran-Celentano 2005. Air temperature affects biomass and carotenoid pigment accumulation in kale and spinach grown in a controlled environment. *Hort. Science*; 40: 2026-2030.
142. Lema-Rumińska J., 2013. Embriogeneza somatyczna jako wydajna technika mikrorozmnażania chryzantem (*Chrysanthemum* × *grandiflorum* Ramat./ Kitam.). *Wiadomości chryzantemowe*; 24-27.
143. Lema-Rumińska J., Goncerzewicz K., Gabriel M., 2013. Influence of Abscisic Acid and Sucrose on Somatic Embryogenesis in Cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *monstruosa*. *The Scientific World Journal*; 1-7; DOI: 10.1155/2013/513985.
144. Lema-Rumińska J., Kulus D. 2012. Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* [Zucc.] Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2,4-D concentrations. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*; 11(4): 77-87.
145. Lema-Rumińska J., Kulus D., 2014. Micropropagation of cacti – a review. *Haseltonia* 19: 46-63. DOI:10.2985/026.019.0107
146. Lema-Rumińska J., Licznarska I., 2004. Wpływ regulatorów wzrostu na regenerację kaktusa *Copiapoa tenuissima* Ritt f. *monstruosa* z eksplantatów merystematycznych. *Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura* 236 (94): 109-114.
147. Lema-Rumińska J., Michałowska E., 2018. ISSR markers in the genetic diversity of chrysanthemum plants derived via somatic embryogenesis. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 594: 17–25 DOI: 10.22630/ZPPNR.2018.594.22.
148. Lema-Rumińska J., Michałowska E., Licznarski P., Kulpa D., 2022. Genetic diversity of important horticultural cacti species from the genus *Astrophytum* and *Frailea* established using issr and SCoT markers. *Acta Sci. Pol. Agricultura* 21(1): 3–14.
149. Lema-Rumińska J., Miler N., Gęsiński K., 2018. Identification of new polish lines of *Chenopodium quinoa* (Willd.) by spectral analysis of pigments and a confirmation of genetic stability with SCoT and RAPD markers. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 17(1): 75-86. DOI: 10.24326/asphc.2018.1.7
150. Lema-Rumińska J., Niedojadło J., 2012. Direct somatic embryogenesis in dependent on the topophysical position of the explant in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *monstruosa*. *J. PACD*; 14: 1-6.

151. Lema-Rumińska J., Niedojadło J., 2012. Direct somatic embryogenesis in dependent on the topophysical position of the explant in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *monstruosa* J.PACD; 14: 1-6.
152. Lema-Rumińska J., Zalewska M. 2002. Ocena ploidalności mutantów chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) uzyskanych w wyniku mutagenезy indukowanej *in vitro* i *in vivo* promieniowaniem jonizującym. *Acta Sci. Pol.*, Hortorum Cultus; 1(2): 43-48.
153. Lema-Rumińska J., Zalewska M., 2004. Studies on flower pigments of chrysanthemum mutants: Nero and Wonder groups. *Acta Scientiarum Polonorum*, Hortorum Cultus; 3(1): 125-135.
154. Lema-Rumińska J., Zalewska M., 2005. Changes in flower colour among Lady group of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) as a result of mutation breeding. *Folia Horticulturae*; 17 (1): 61-72.
155. Lema-Rumińska J., Zalewska M., Sadoch Z., 2004. Radiomutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) of the Lady group: RADP analysis of the genetic diversity. *Plant Breeding*; 123: 290-293.
156. Licznarski P., Lema-Rumińska J., 2021a. Kierunki i metody hodowli kaktusów z rodzaju *Astrophytum*. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze – fauna i flora. Część II*; 85-93.
157. Licznarski P., Lema-Rumińska J., 2021b. Charakterystyka rodzaju *Astrophytum*. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze – fauna i flora. Część II*; 85-93.
158. Linnaeus C., 1760. *Disquisitiones de sexu plantarum. Amoenitates Acad* 10: 100-131.
159. Lisek A., Korbin M., Rozpara E., 2006. Using simply generated RAPD markers to distinguish between sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*; 14(1): 53-59.
160. Liu Y. T., Perera C. O., Suresh V., 2007. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chem*; 101: 1533-1539.
161. Łuczak M., 2004. Markery molekularne. *Racjonalista*: 1-6.
162. Malepszy S., 2000. Wpływ osiągnięć biologii na hodowlę roślin. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*; 49(3): 421-427.
163. Malepszy S., 2001. *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 1-372.
164. Mallet J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.*; 20: 229-237.
165. Maluszyńska J., Maluszyński M., Szarejko I., 2003. Crop improvement. Mutation techniques; 186-201. DOI: 10.1016/j.tree.2005.02.010

166. Marcotrigiano M., 1997. Chimeras and variegation, patterns and deceit. *Hort. Sci.*; 32: 773-784.
167. Mariniello L., Sommella M. G., Sorrentino A., Forlani M., 2002. Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnol. Lett.*; 24: 749-755.
168. Markert C. L., Møller F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 45(5): 753-763. DOI: 10.1073/pnas.45.5.753
169. Marquart L. C., Farben der Blüten. Eine chemisch-physiol. Abhandlung, Bonn, 1835. 1-92.
170. Martinelli G, Moraes MA (Orgs) (2013) Livro vermelho da flora do Brasil. Andrea Jakobsson: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 110.
171. Martínez-Ávalos, J.G., Golubov, J., Mandujano, M.C., Jurado, E. 2007. Causes of individual mortality in the endangered star cactus *Astrophytum asterias* (Cactaceae): The effect of herbivores and disease in Mexican populations. *J. Arid Environm.*; 71, 250–258.
172. Mateuszczak M., 2013. Markery molekularne w badaniach rzepaku (*Brassica napus* L.) I. Przegląd stosowanych technik. *Rośliny oleiste – Oilseed Crops*; 34 (2): 129-150.
173. May R. A., Trigiano R. N., 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*; 33: 171-180.
174. Mensah J. K., Akomeah P. A., Ekpekurede E. O., 2005. Gamma irradiation induced variation of yield parameters in Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*. 11. 10.4314/gjpas.v11i3.16509.
175. Michałowska E., Lema-Rumińska J., 2018. ISSR markers in the genetic diversity of chrysanthemum plants derived via somatic embryogenesis. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych.*; 594: 17-25. DOI: 10.22630/ZPPNR.2018.594.22
176. Milczarski P., Banek-Tabor A., Masojć P., 2001. Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta. *Biuletyn Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*; 2018/2019: 261-267.
177. Miler N., 2005. Dlaczego warto stosować indukowaną mutagenezę w hodowli chryzantem. *Biotechnologia* 2: 196-205.

178. Miler N., Jędrzejczyk I., Jakubowski S., Winiecki J., 2021. Ovaries of Chrysanthemum Irradiated with High-Energy Photons and High-Energy Electrons Can Regenerate Plants with Novel Traits. *Agronomy* 11: 1111. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061111>.
179. Miler N., Zalewska M., 2014. Somaclonal variation of chrysanthemum propagated in vitro from different explants types. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*; 13(2): 69-82.
180. Minano H. S., Gonzales-Benito M. E., Martin C., 2009. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivars using RAPD markers. *Scientia Horticulturae*; 122: 238-243. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.05.001
181. Miñano H. S., Ibáñez M., González-Benito M., Martín C., 2014. Sequential study of the genetic stability of callus and regenerated shoots in chrysanthemum. *Prop. Orn. Plants*; 14: 57–67.
182. Młodzińska E., 2009. Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta Biologica Cracoviensia*; 7-16.
183. Mondini L., Noorani A., Pagnotta M. A., 2009. Assessing Plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19-35. DOI: 10.3390/d1010019
184. Moore T. C., 1989. Auxins. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer.
185. Mosiewicz R.: Antocyjany – zdrowa alternatywa. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2002, 2, 1- 2.
186. Mukherjee A. K., Ratha S., Dhar S., Debata A. K., Acharya P. K., Mandal S., Panda P. C., Mahapatra A. K., 2010. Genetic relationships among 22 taxa of bamboo revealed by ISSR and EST-based random primers. *Biochem Genet.*; 48 (11-12):1015-1025. DOI: 10.1007/s10528-010-9390-8.
187. Muller H. J., 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*; 46: 84-87.
188. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
189. Muszyński S., 1976. Hodowla mutacyjna roślin ozdobnych. *Hodowla Roślin*; 2: 37.
190. Mwangangi I. M., Muli J. K., Neondo J. O., 2019. Plant Hybridization as an Alternative Technique in Plant Breeding Improvement. *Asian Journal of Research in Crop Science*; 4(1): 1-11. DOI: 10.9734/ajrcs/2019/v4i130059
191. Nadeem M. A., Nawaz M. A., Shahid M. Q., Doğan Y., Comertpay G., Yıldız M., Hatipoğlu R., Ahmad F., Alsaleh A., Labhane N., Özkan H., Chung G., Baloch F. S., 2017. DNA molecular markers in plant breeding: current status

- and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*; 32(2): 261-285. DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401
192. Nadolska-Orczyk A., 1999. Transformacja roślin za pomocą *Agrobacterium* – podstawowy model działania i czynniki na niego wpływające. *Biotechnologia*; 1(44): 116-124.
 193. Nakamura A., Akai M., Yoshida E., Taki T., Watanabe T., 2003. Reversed-phase HPLC determination of chlorophyll a and phylloquinone in photosystem I of oxygenic photosynthetic organisms. Universal existence of one chlorophyll a molecule in Photosystem I. *Eur J Biochem*; 270: 2446-2458. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03616.x
 194. Nasri F., Zakizadeh H., Vafae Y., Mozafari A.A., 2021. In vitro mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 149: 657-673. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02163-7>.
 195. Niemirowicz-Szczytt K., Malepszy S. 1989. Otrzymywanie i wykorzystanie mieszańców form oddalonych. W: *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., Przybecki Z. (red.). PWN, Warszawa: 81-150.
 196. Niklas K. J., 2016. *Plant Evolution. An Introduction to the History of Life*. The University of Chicago Press Chicago and London: 1-28.
 197. Nowakowska J., 2002. Mutageniza i jej zastosowanie w badaniach nad roślinami oleistymi. Tom XXIII. *Rośliny Oleiste*: 547-559.
 198. Nowakowska J., 2004. Zastosowanie roślin transgenicznych w leśnictwie – perspektywy i zagrożenia. *Biotechnologia*; 3(66): 78-86.
 199. Nyffeler R., Eggli U. 1997. Comparative Stem Anatomy and Systematics of Eriosecensulato (Cactaceae). *Ann. Bot.*; 80: 767-786.
 200. Okoń S., Surmacz-Magdziak A., Paczos-Grzęda E., 2013. Genetic diversity among cultivated and wild chamomile germplasm based on ISSR analysis. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*; 12(2): 43-50.
 201. Orlikowska T., 2005. Jak powstają barwy i zapachy kwiatów. *Zeszyty Problemowe Nauk Rolniczych*; 504: 199-207.
 202. Orlikowska T., Wiejacha K., Marasek A., 2001. Identyfikacja roślinnych mieszańców oddalonych – przegląd metod. *Biuletyn IHAR*: 220.
 203. Ovesná J., Poláková K., Leišová L., 2002. DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.*; 38(1): 29-40.

204. Pachota K., Niedziela A., Orłowska R., Bednarek P., 2016. Nowoczesne metody genotypowania DArT i GBS w hodowli gatunków roślin użytkowych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*; 279: 3-18.
205. Paczos-Grzęda E., Chrzastek M., Okoń S., Grądzielewska A., Miazga D., 2009. Zastosowanie markerów ISSR do analizy wewnątrzgatunkowego podobieństwa genetycznego *Avena sterilis* L. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*; 252: 215-223.
206. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R., 2016. Flawonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 5. 10.1017/jns.2016.41. DOI: 10.1017/jns.2016.41
207. Pareek S., Sagar A. N., Sharma S., Kumar V., Agarwal T., González-Aguilar G. A., Yahia E. M., 2017. Chlorophylls: Chemistry and Biological Functions. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*; 1: 269-284.
208. Pasqualone A., 2013. Cultivar identification and varietal traceability in processed foods: a molecular approach. *Botanical Research and Practices*; 83-105.
209. Pérez-Molphe-Balch, E., Dávila-Figueroa, C. A. 2002. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 38, 73–78. <https://doi.org/10.1079/IVP2001248>.
210. Piątkowska E., Kopeć A., Leszczyńska T., 2011. Antocyjany – charakterystyka, występowanie i oddziaływanie na organizm człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, 4(77), 24 – 35.
211. Pick Kiong Ling A., Chia J. Y., Hussein S., Harun A. R., 2008. Physiological Responses of *Citrus sinensis* to Gamma Irradiation. *World Applied Sciences Journal*; 5 (1): 12-19.
212. Prina A. R., Landau A. M., Pacheco M. G., 2012. Chimeras and Mutant Gene Transmission. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*; 179-187. DOI: 10.1079/9781780640853.0181
213. Przybylska A., Fiedler Z., Obrepalska-Stepłowska A., 2016. PCR-RFLP method to distinguish *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella intonsa*, *Frankliniella pallida* and *Frankliniella tenuicornis*. *Journal of Plant Protection Research*; 56(1): 60-66. DOI: 10.1515/jppr-2016-0009
214. Przybyła A., 1997. Możliwości wykorzystania mutagenyzy w tworzeniu nowych odmian roślin uprawnych. *Hodowla Roślin, Materiały z I Krajowej Konferencji, Poznań, 19-20 listopada*: 87-90.
215. Qing-yuan Y., Shao-wen Y., Tai-feng Q., Cheng-yun L., 2018. Using RAPD and ISSR molecular markers to analyze the genetic diversity of rose scented

- pelargonium populations. *Flavour and Fragrance Journal* 33(1): 75-81. DOI: 10.1002/ffj.3427
216. Rakoczy-Trojanowska M., 2002. Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cell Mol Biol Lett*; 7: 849-858.
217. Rakoczy-Trojanowska M., 2007. Wprowadzanie genów do roślin. *Biotechnologia roślin*. PWN: 233-246.
218. Rasmussen H. B., 2012. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and Gel electrophoresis – valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech: 315-334. DOI: 10.5772/37724
219. Reddy M. P., Sarla N., Siddiq E. A., 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*; 128: 9-17.
220. Reznik N. Subedi B. S., Weizman S., Friesem, G., Carmi N., Yedidia I., Sharon-Cohen M., 2021. Use of X-ray mutagenesis to increase genetic diversity of *Zantedeschia aethiopica* for Early Flowering, Improved Tolerance to Bacterial Soft Rot, and Higher Yield. *Agronomy* 11, 2537. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122537>
221. Rieger R., Michaelis A., Green M.M. 1974. Słownik terminów genetycznych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
222. Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez L., 2018. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*; 70: 62-93. DOI: 10.1016/j.plipres.2018.04.004.
223. Rogalska S., Małuszyńska J., Olszewska M.J. 1999. Podstawy cytogenetyki roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
224. Rogers S. G., Florsh R. B., Fraley R. T., 1988. *Methods for Plant Molecular Biology*, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Eds, Academic Press Inc.: 423-436.
225. Rojas-Aréchiga M., Vázquez-Yanes C., Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*; 44 (1): 85-104.
226. Roll-Hansen N., 2008. Sources of Wilhelm Johannsen's Genotype Theory. *Journal of the History of Biology* 42:457-493.
227. Rubluo A., 1997. Micropropagation of *Mammillaria* species (Cactaceae). In: Bajaj YPS. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry* 40. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg; 193-205.
228. Rudolph T. D., 2003. Effects of X-irradiation of seed on X1 and X2 generations in *Pinus banksiana* Lambert. *Rad. Bot.*; 7: 303-312.

229. Sadek M. S. E., Shafik. D. I., 2018. Genetic relationships among maize inbred lines as revealed by start codon targeted (SCoT) analysis. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*; 5 (1): 103-107.
230. Saidi A., Hajkazemian M., Emami S. N., 2020. Evaluation of genetic diversity in gerbera genotypes revealed using SCoT and CDDP markers. *Polish Journal of Natural Sciences*; 35(1): 21-34.
231. Sakuta M., Tanaka A., Iwase K., Miyasaka M., Ichiki S., Yoriko M.H., Yamagami T.Y., Nakano T., Yoshida K., Shimada S. 2021. Anthocyanin synthesis potential in betalain-producing Caryophyllales plants. *Journal of Plant Research* (2021) 134:1335–1349. <https://doi.org/10.1007/s10265-021-01341-0>.
232. Sammour R. H., 2014. Cultivars identification based on biochemical markers. *RRBS* 8(9): 347-358.
233. Sangeetha R. K., Baskaran V., 2010. Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance: efficacy of β -carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats. *Food-Chem*;119(4): 1584-1590.
234. Santos-Diaz M.S., Mendez-Ontiveros R., Arredondo-Gomez A. 2003. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plants*; 39: 480-484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.047
235. Satya P., Karan M., Jana S., Mitra S., Sharma A., Karmakar P. G., Ray D. P., 2015. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. *Meta Gene.*; 3: 62–70. DOI: 10.1016/j.mgene.2015.01.003.
236. Schum A., 2003. Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method? *Acta Hort.* 612: 47-60.
237. Sedaghatoor S., Sharifi F., Eslami A., 2017. Effect of chemical mutagens and X-rays on morphological and physiological traits of tulips. *International Journal of Experimental Botany*; 86: 252-257.
238. Seidler-Łożykowska K., 2021. Hodowla i odmiany roślin zielarskich. *Post. Fitoter.*; 22(4): 251-257.
239. Shahlaei A., Torabi S., Khosroshahli M., 2014. Efficiency of SCoT and ISSR markers in assessment of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genetic diversity. *International Journal of Biosciences*; 5(2): 14-22.
240. Shangguo F., Yujia Z., Chenliang Y., Kaili J., Mengying J., Jiangjie L., Chenjia S., Qicai Y., Huizhong W., 2018. Development of Species-Specific

- SCAR markers, based on a SCoT Analysis, to authenticate *Physalis (Solanaceae)* Species. *Front. Genet.* 9: 1-10. DOI: 10.3389/fgene.2018.00192
241. Sharma A., Namdeo A. G., Mahadik K. R., 2008. Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. *Pharmacognosy Reviews*; 2(3): 23-34.
242. Shaw R. K., Acharya L., Mukherjee A. K., 2009. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*; 9: 52-59. DOI: 10.12702/1984-7033.v09n01a08
243. Simkin A. J., Moreau H., Kuntz M., 2008. An investigation of carotenoids biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *J Plant Physiol*; 165: 1087-106. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.06.016
244. Simpson D. J., Knötzel J., 1996. Light-harvesting complexes of plants and algae: introduction, survey and nomenclature. In: Ort DR and Yocum CF (eds.) *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction*; 493-506.
245. Sobkowiak Ł., Szweykowska-Kuklińska Z., 2007. Fizyczne, chemiczne i genetyczne metody mutagenyzy roślin. *Biotechnologia*; 4(79): 1157-169.
246. Solís-Ramos L. Y., Andrade-Torres A., Sáenz Carbonell L. A., Oropeza Salín C. M., Castaño de la Serna E., 2012. Somatic Embryogenesis in Recalcitrant Plants. *Embryogenesis*; 1: 597-618. DOI: 10.5772/35967
247. Sosnowska K., Wykorzystanie krzyżowania oddalonego do poszerzania zmienności genetycznej w rodzaju *Brassica* sp. *Rośliny Oleiste – oilseed crops*; 32: 211-222.
248. Spasibionek S., 2002. Znaczenie mutagenyzy w tworzeniu nowych genotypów roślin oleistych o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. *Rośliny Oleiste*; 23: 533-546.
249. Spooner D., van Treuren R., de Vicente M. C., 2005. Molecular markers for genebank management. *IPGRI Technical Bulletins* 10: 6-16.
250. Srenscek S., 2011. Kaktusy i sukulenty stosowane w lecznictwie, kulinarii i technice. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego* 647: 237-244.
251. Stefaniak B., 2004. Roślinne kultury *in vitro*. W: Woźny A., Przybył K. (red.). *Regulatory wzrostu i rozwoju. Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom 2. Komórki in vitro*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, 35-39; 81-88; 94-96.
252. Stepczyńska K., Jerzy M., 1981. Mutagenesis in *Chrysanthemum* cv. Bravo propagated from the X-ray influenced leaf cuttings. Part II. MV₂ generation. *Prace Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa*, B 6: 55-60.
253. Stepczyńska K., Jerzy M., Widacka M., 1980. Mutagenesis in *Chrysanthemum* cv. Bravo propagated from the X-rays influenced leaf cuttings. Part I. MV₁ generation. *Pr. Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa*. B 5: 17-30.

254. Stewart R.N., Meyer F.G., Dermen H., 1972. *Camellia* 'Daisy Eagleson' a graft chimera of *Camellia sasanqua* and *C. japonica*. *Am. J. Bot.*; 59(5): 515-524.
255. Strack D., Vogt T., Schliemann W., 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*; 62: 247-269.
256. Strzałka 2005. Przemiany związków organicznych i energii u roślin. Fotosynteza i chemosynteza. Budowa i funkcja błon fotosyntetycznych. W: *Fizjologia roślin*. PWN, Warszawa: 278-291.
257. Sudhakar P., Latha P., Reddy P. V., 2016. Phenotyping Crop Plants for Physiological and Biochemical Traits. Chapter 15 – Plant pigments; 121-127.
258. Surma M., Adamski T., Krystkowiak M., Kuczyńska A., Mikołajczak K., Ogrodowicz P., 2012. Markery funkcjonalne dla cech ilościowych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 264: 5-14.
259. Suyitno A., Aziz P., Kumala D., Endang S. 2017. Improvement of genetic variability in seedlings of *Spathoglottis plicata* orchids through X-ray irradiation. *Biodiversitas* 18(1): 20-27. DOI: 10.13057/biodiv/d180104
260. Szaniawska M., Taraba A., Szymczyk K., 2015. Budowa, właściwości i zastosowanie antocyjanów. *Nauki inżynierskie i technologie*; 2(17) : 63-78. DOI: 10.15611/nit.2015.2.06
261. Szczygieł K., 2005. Somatyczna embriogeneza – alternatywny sposób uzyskiwania wyselekcjonowanego materiału sadzeniowego gatunków drzew iglastych. *Leśne Prace Badawcze*; 3: 71-92.
262. Sztuba-Solińska, 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos*; 54(2-3): 227-239.
263. Szymkowiak, Eugene J.; Sussex, Ian M., 1996. What chimeras can tell us about plant development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*; 47(1): 351-376.
264. Święcicki W. K., Surma M., Koziara W., Skrzypczak G., Szukała J., Bartkowiak-Broda J., Zimny J., Banaszak Z., Marciniak K., 2011. Nowoczesne technologie w produkcji roślinnej – przyjazne dla człowieka i środowiska. *Polish Journal of Agronomy*; 7: 102-112.
265. Teixeira da Silva J. A., Fukai S., 2003a. Four gene introduction methods affect the shoot regeneration and localization of transgene expression in greenhouse stem explants and in vitro-grown chrysanthemum stem thin cell layers. *African Journal of Biotechnology* 2 (5): 114-123.
266. Teixeira da Silva J. A., Fukai S., 2003b, Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. *Asian Journal of Plant Sciences* 2 (6): 505-514.

267. Teixeira V. D., Verola C. F., da Costa I. R., Zappi D. C., da Costa G. M., Silva S. R., Pereira de Carvalho Costa M. A., Saleme Aoina L. Y., 2018. Investigating the floral and reproductive biology of the endangered micro-endemic cactus *Uebelmannia buiningii* Donald (Minas Gerais, Brazil). *Folia Geobot*; 53: 227–239; DOI: 10.1007/s12224-018-9315-6.
268. Tilney-Bassett R. A. E., 1986. *Plant Chimeras*. Cambridge University Press; 1: 1-208.
269. Tymoszuik A., 2015. Hodowla chryzantemy wielkokwiatowej na drodze mutagenozy indukowanej promieniowaniem X i gamma. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*; 582: 101-113.
270. Tymoszuik A., 2016. Regeneracja *in vitro* pędów i zarodków przybyszowych z kwiatów języczkowatych w hodowli chryzantemy wielkokwiatowej. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*; 584: 103-115.
271. Tymoszuik A., Kulus D., 2020. Silver nanoparticles induce genetic, biochemical, and phenotype variation in chrysanthemum. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 143:331–344. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01920-4>.
272. Tymoszuik A., Zalewska M., Lema-Rumińska J., 2014. Regeneration of somatic embryos from *in vitro* isolated ligulate florets of chrysanthemum. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*; 13 (4): 13-22.
273. U.S. Fish and Wildlife Service. 2003. Recovery plan for star cactus (*Astrophytum asterias*). U.S. DOI Fish and Wildlife Service, Albuquerque, New Mexico.
274. Van Dijk P. J., Weissing F. J., Ellis T. H. N., 2018. How Mendel's Interest in Inheritance Grew out of Plant Improvement. *Genetics*; 210: 347-355. DOI: 10.1534/genetics.118.300916
275. Van Harten A. M., 1991. Mutation breeding. Internat. Agric. Centre, Wageningen, The Netherlands; ss: 85.
276. Van Harten A., 1998. *Mutation Breeding: Theory and Practical Applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
277. Vijayan K., 2004. Genetic relationships of Japanese and Indian mulberry (*Morus spp.*) genotypes revealed by DNA fingerprinting. *Plant Systemat. Evol.* 243: 221-232.
278. Vijayan K., 2005. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. *Int. J. Indust. Entomol.* 10(2): 79-86.
279. Vivodík M., Gálová Z., Balážová Z., Petrovičová L., 2016. Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in european old maize (*Zea mays* L.) Genotypes. *Potravinarstvo* 10(1): 563-569.

280. Walter H., Machler W., 2006. An old acquaintance from the Guanillos Valley (Prov. de Atacama, Chile) is finally validated. *CactusWorld* 24 : 185-192.
281. Weising K., Nybom H., Wolff K., Kah G., 2005. DNA Fingerprinting in plants principles, methods, and applications. Taylor & Francis Group; 2-73. DOI: 10.1093/aob/mcj057
282. Węgleński P., 1998. Genetyka molekularna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
283. Winkel B., 2006. The science of flavonoids, Ed. Grotewold E., 71-97, Springer, Nowy Jork.
284. Winkel-Shirley B., 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*; 126: 485-493. DOI: 10.1104/pp.126.2.485.
285. Winkler H., 1907. Über das Wesen der Pfropfbastarde. *Ztsch. F. Bot. Bd. 1*, ss:342.
286. Winter P. C., Hickey G. I., Fletcher H. L., 2000. Krótkie wykłady – Genetyka. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
287. Wissgott U., Bortlik K., 1996. Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, 7: 298-302. DOI: 10.1016/0924-2244(96)20007-X
288. Wóycicki S., 1958. Chimery [mieszance szczepionkowe] w świetle najnowszych badań. *Wiadomości Botaniczne*; 2(3): 129-140.
289. Wrona K., Głowacki J., 2005. „Chodź, pomaluj mój świat” – rzecz o barwnikach. ABiD: 195-202.
290. Wu Z. L., Fang L. Y., Wang J., Shen Y. J., 2009. Analysis of genetic diversity of *Vitis* by using ISSR markers. *Acta Hort.* 827: 125–130. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.827.17
291. Xiong F. Q., Tang R. H., Chen Z. L., Pan L. H., Zhuang W. J., 2009. SCoT: A novel gene targeted marker technique based on the translation start codon. *Mol. Plant Breed. (Chn)* 7(3): 635-638.
292. Xiong, F., Zhong R., Han Z., 2011. Start Codon Targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Mol. Biol. Rep.*; 38(5): 3487-3494.
293. Xutian C., Rui D., Wenxian L., Yanrong W., Zhipeng L., 2017. Optimizing Sample Size to Assess the Genetic Diversity in Common Vetch (*Vicia sativa* L.) Populations Using Start Codon Targeted (SCoT) Markers. *Molecules*; 22(4): 1-10. DOI: 10.3390/molecules22040567
294. Yadav P. K., Singh R. P., 2021. Cacti and Succulents. Flower Production & Gardening. New Delhi; 151-163.

295. 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: 5-83.
296. Zalewska M. 2010. *In vitro* adventitious bud techniques as a tool in creation of new chrysanthemum cultivars. W: Floriculture. Role of tissue culture and molecular techniques. red.: Datta S. K., Chakrabarty D. Pointer Publishers, Jaipur, 196.
297. Zalewska M., Miler N. 2010. Zjawisko topofizy w regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* u chryzantemy wielkokwiatowej. *Biotechnologia* 2(89), 89–95.
298. Zalewska M., Lema-Rumińska J., 2004. Wpływ promieniowania gamma na regenerację pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych chryzantemy wielkokwiatowej (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Biotechnologia*; 2(65): 86-92.
299. Zalewska M., Lema-Rumińska J., Miler N., 2007. In vitro propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae* 113: 70-73.
300. Zalewska M., Miler N., Tymoszuć A., Drzewiećka B., Winiećki J., 2010. Results of mutation breeding activity on *Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam. in Poland. *EJPAU*; 13(4): 27.
301. Zalewska M., Tymoszuć A., Miler N., 2011. New chrysanthemum cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explant types. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*; 10(2): 109-123.
302. Zappi D, Taylor N 2008. Diversidade e endemismo das Cactaceae na Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4: 111–116.
303. Zelles 2003. Effect of X-ray and UV-light on the levels of NAD(P), NAD(P)H and hydroxylproline in *Pinus silvestris* pollen. *Environmental and Experimental Botany* 18: 39-45.
304. Zeng B., Huang X., Huang L. K., Zhang J., Yan H. D., Luo D., Liang H., Yuan Y., 2015. Optimization of SCoT-PCR reaction system in *Dactylis glomerata* by orthogonal design. *Genetics and Molecular Research*; 14(2): 3052-3061. DOI: 10.4238/2015.April.10.15
305. Zeng B., Yan H. D., Huang L. K., Wang Y. C., Wu J. H., Huang X., Zhang A. L., Wang C. R., Mu Q., 2016. Orthogonal design in the optimization of a Start Codon Targeted (SCoT) PCR system in *Roegneria kamoji* Ohwi. *Genetics and Molecular Research* 15(4): 1-9. DOI: 10.4238/gmr15048968

306. Zenkteker M. 1984. Metoda hodowli *in vitro* w embriologii doświadczalnej. W: Zenkteler M. (red.), Hodowla i tkanek roślinnych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 220-270.
307. Zenkteler M., 2001. Kultura zalążków, zalążni i zarodków. W: Biotechnologia roślin. Red. Malepszy S., PWN, Warszawa: 70-86.
308. Zhang J., Xie W., Wang Y., Zhao X., 2015. Potential of Start Codon Targeted (SCoT) Markers to Estimate Genetic Diversity and Relationships among Chinese *Elymus sibiricus* Accessions. *Molecules*; 20(4): 5987-6001. DOI: 10.3390/molecules20045987
309. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeats (SSR) anchored Polymerase Chain Reaction amplification. *Genomics* 20(2): 176-83.
310. Zirkle C., 1934. More records of plant hybridization before Koelreuter. *J Hered* 25: 3-18.

NETOGRAFIA

1. Kumari M. Methods of Plant Breeding (Continued). B.Sc. Part III Botany Hons: 1-4. [www.ancpatna.ac.in]
2. GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc

STRESZCZENIE

Wpływ promieniowania jonizującego na barwę siewek oraz zmiany biochemiczne i molekularne u wybranych gatunków kaktusów

Mgr inż. Piotr Licznerski

Słowa kluczowe: barwniki, Cactaceae, *in vitro*, hodowla, markery molekularne

Kaktusy należą do szczególnie cenionych roślin ozdobnych ze względu na bogactwo barw i kształtów oraz łatwość uprawy. Co roku, na całym świecie, szerokie gremium kolekcjonerów oczekuje nowych atrakcyjnych odmian. Nowoczesna hodowla roślin ozdobnych jest ukierunkowana na stosowanie nowych, cały czas doskonalonych oraz zaawansowanych metod i narzędzi biotechnologicznych. Celem badań była ocena, czy i w jakim stopniu zastosowane promieniowanie X w różnych dawkach wpływa na dynamikę kiełkowania nasion w warunkach *in vitro*, zmiany morfologiczne, zmiany biochemiczne i zmiany na poziomie molekularnym u wybranych gatunków kaktusów. Materiałem badawczym były nasiona kaktusów uzyskane z hodowli własnej (*Astrophytum* spp. 'Purple' oraz *Copiapoa tenuissima* Ritt.), a także zakupione w firmie Kakteen Koheres z Niemiec (*Uebelmannia pectinifera* Buining). Materiał ten został napromieniony promieniowaniem X przy pomocy akceleratora Clinac 2300 CD w Zakładzie Radioterapii Centrum Onkologii im. prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy (dawki: 0 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy i 50 Gy). Po napromienieniu promieniowaniem jonizującym nasiona kaktusów zostały poddane sterylizacji wstępnej i właściwej. Następnie materiał był umieszczony na pożywce MS (1962). Przez okres 8 tygodni została oceniana dynamika kiełkowania nasion. Po upływie tego czasu dokonano oceny uzyskanych siewek pod kątem barwy przy pomocy katalogu barw the Royal Horticultural Society Colour Chart (RHSCC), a także wykonano pomiary parametrów morfologicznych oraz przeprowadzono analizy biochemiczne i molekularne. Stwierdzono, że promieniowanie X wpłynęło na dynamikę kiełkowania nasion u badanych gatunków kaktusów, powodując przyspieszenie bądź opóźnienie początku kiełkowania. Zastosowane na nasiona promieniowanie X znacząco wpłynęło na zabarwienie siewek, parametry morfologiczne oraz zróżnicowane stężenie barwników roślinnych w powstałych siewkach. Analizy molekularne z wykorzystaniem markera SCoT potwierdziły istotny wpływ promieniowania X na zróżnicowanie genetyczne uzyskanych siewek u badanych gatunków kaktusów.

ABSTRACT

Influence of ionizing radiation on the colour of seedlings and biochemical and molecular changes in selected cacti species

M.Sc. Eng. Piotr Licznerski

Key words: breeding, Cactaceae, *in vitro*, molecular markers, pigments

Cacti are among the most valued ornamental plants due to the richness of colours and shapes, as well as the ease of cultivation. Every year, around the world, a wide range of collectors expect new attractive cultivars. Modern breeding of ornamental plants focuses on the use of new and constantly improved and advanced methods and biotechnological tools. The aim of the study was to estimate whether, and to what extent, the X-radiation applied in different doses affects the dynamics of seed germination *in vitro*, morphological and biochemical changes and changes at the molecular level in selected cacti species. The research material consisted of cacti seeds from own breeding (*Astrophytum spp.* 'Purple' and *Copiapoa tenuissima* Ritt.), as well as purchased from a German company Kakteen Koheres (*Uebelmannia pectinifera* Buining). The material was irradiated with X-rays using the Clinac 2300 CD accelerator at the Radiotherapy Department, Prof. Franciszek Lukaszczyk Memorial Oncology Center in Bydgoszcz (doses: 0 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy and 50 Gy). After the exposure to the ionizing radiation, cacti seeds were subjected to initial and proper sterilization. The material was then placed on the MS medium (1962). The dynamics of seed germination was evaluated for the period of 8 weeks. After the time, the obtained seedlings were assessed in terms of colour using the the Royal Horticultural Society Colour Chart catalogue and morphological parameters were measured, as well as biochemical and molecular analyzes were performed. As a result of the research, it was found that X-radiation affected the dynamics of seed germination in the examined cacti species, causing the acceleration or delay in the beginning of germination. X-radiation applied to the seeds essentially affected the colour of the seedlings, and significantly – the morphological parameters and concentrations of plant pigments in the resulting seedlings. The molecular analyzes using the SCoT marker confirmed the significant effect of X-radiation on the genetic diversity of the seedlings obtained in the cacti species examined.