

Rudbeckia hirta L. mikroszaporítása csíranövény explantátumból kiindulva

Szarvas Pál¹ – Zsila-André Anikó¹ – Kovács Zoltán² – Fári Miklós Gábor¹

¹Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum, Zöldségtermesztési Tanszék, Orsós Ottó laboratórium, Debrecen

²Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató-Fejlesztő Kht, Budatétény
szarvasp@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteket végeztünk *Rudbeckia hirta L.* steril csíranövény merisztémáról kiinduló *in vitro* mikroszaporítási módszer kifejlesztésére. A tenyészet indításához a magvakat 17 óráig steril ioncserélt vízben előáztattuk, majd a felületi fertőtlenítést két lépésben értük el. Először 20 percig tömény háztartási Na-hipokloritot, majd ugyancsak 20 percig 10%-os hidrogén-peroxidot alkalmaztunk, melyet háromszori steril ioncserélt vizes öblítés követett. A csíranövény merisztémák sokszorozására 10 mg/l kinetin, illetve 2 mg/l kinetin + 0,1 mg/l 2iP tartalmú szilárd MWP táptalaj kombináció bizonyultak a legmegfelelőbbnek. A legjobb táptalajokon egy csíranövényből fejlődött kis oldalhajtások száma 5-17 között változott. A fejletlen hajtáscsomókat a hajtások szétválasztása nélkül 2 mg/l IAA tartalmú MS táptalajra oltottuk át. Négy hét elteltével érett hajtásokat kaptunk, melyeket szétválasztottunk és új táptalajra olva sikerrel meggyökerestettünk. A gyökeres növényeket fényszobában fokozatosan akklimatizáltuk, becserépeztük és üvegházba vittük tovább, majd megfigyelés céljából szabadföldbe ültettük ki. E módszer felhasználásával laboratóriumunk megkezdte a *Rudbeckia hirta L.* nemesítési szempontból különleges értékű pluszvariáns genotípusainak steril klónszaporítását.

Kulcsszavak: *Rudbeckia hirta L.*, *in vitro*, csíranövény, mikroszaporítás

SUMMARY

We conducted experiments for developing an *in vitro* micropropagation protocol starting from meristems of *Rudbeckia hirta L.* seedlings. We pre-soaked the seeds in sterile ion-exchanged water for 17 hours, and then achieved surface disinfection in two separate steps. First, we used concentrated household sodium-hypochloride solution for 20 minutes and, also for 20 minutes, we applied hydrogen peroxide of 10%, which was followed by washing with sterile ion-exchanged water three times. For the propagation of seedling meristems, the combination of half-strength solid Murashige and Skoog (1962) culture medium containing 10 mg/l of kinetin and 2 mg/l of kinetin + 0.1 mg/l of 2iP proved to be the most suitable. The average number of shoot-buds developed from the seedling axillary meristem in the best culture media varied between 5 and 17. Without separating them, we inoculated the shoot-bud clusters on MS culture medium containing 2 mg/l of IAA. After four weeks of incubation, we obtained elongated shoots, which we separated and inoculated into a new culture medium and from which we obtained elongated roots. The rooted plants were gradually acclimatised in the cultivation room, potted and carried to a greenhouse, and then planted in open field for subsequent observation. By adopting this

method, our laboratory started the micropropagation of the superior and/or elite genotypes of the *Rudbeckia hirta L.* being of special value in respect to breeding.

Keywords: *Rudbeckia hirta L.*, *in vitro*, seedlings, micropropagation

BEVEZETÉS

A *Rudbeckia* az amerikai prérük vadon élő növénye. Bár több hasznos vegyületet tartalmaz, melyekkel sok tanulmányban foglalkoztak már, de az *in vitro* szaporítása mégis kevésbé tanulmányozott terület, csak néhány irodalom áll rendelkezésre ezen a téren, mint például a Kovács és Ladányi (1985) *Rudbeckia* mikroszaporítással foglalkozó cikke, és a *Rudbeckia* szövettenyésztést alkalmazó, Luczkiewicz et al. (2002), Luczkiewicz és Cisowski (1998, 2001) és Yuan et al. (1998) által publikált cikkek. Ezen túl még: Kochankov et al. (1989), és Ebringerová et al. (2002, 2003) által megjelentetett *Rudbeckia*-val is foglalkozó forrásokat találtunk.

A magyarországi dísznövénykultúrában is kevésbé ismert ez a faj. A fokozatosan romló környezeti viszonyok – melyek a nagyvárosokban fokozottan jelentkeznek –, a virágos területek fenntartási költségeinek csökkentése, és a dekoratív, folyton, illetve hosszan virágzó növények iránti megnövekedett igények miatt került előtérbe, mint egy alternatíva. Az ehhez minél inkább megfelelőbb, új fajták kiválogatásában, a megfelelő genetikai állománnyal rendelkező egyed génállományának megőrzésében és felszaporításában lehet nagy segítség az *in vitro* hajtássokszorozás, általunk kidolgozott és jelenleg is fejlesztés alatt álló módszere. A *Rudbeckia in vitro* szaporítása több úton lehetséges, ezek közül mi a csíranövényből kiinduló hajtássokszorozás módszerét választottuk, de kísérleteket folytatunk a kifejlett növényi részekből történő tenyészetindításra is.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérletünkben három, új *Rudbeckia* fajta magjait használtuk fel, mint kiindulási anyagot az *in vitro* szaporítás folyamatához.

1. Tenyészetindítás

A steril tenyészetek létrehozásához a magvakat sterilizálni kellett. A megfelelő sterilitás érdekében

kétfázisú sterilizálást és 17 órás előáztatást alkalmaztunk ioncserélt vízben. Rövid öblítés után 100% háztartási hypó és 1% Tween-20 keverékében kezeltük a magvakat 20 percig, majd steril, ioncserélt vízzel öblítettük, és 10% hidrogén-peroxid és 1% Tween-20 oldatában folytattuk a kezelést szintén 20 percen át. Ez után egy rövid, majd 2×10 perces steril, ioncserélt vizes mosást alkalmaztunk. Rövid szárítás után a magvakat 3% szacharóz tartalmú Murashige és Skoog (MS) táptalajra helyeztük, műanyag tenyésztőedényekben. A csíráztatás ideje 3-4 hét volt.

2. Szaporítás

Többféle táptalajon és többféle hormonkoncentráció mellett vizsgáltuk a növények hajtásindukciós hajlamát. Kipróbáltuk az Mc Cown Woody plant (MWP) táptalajt és az MS táptalajt is 2, 5 és 10 mg/l Kinetin (KIN) tartalom mellett.

A Kinetin mellett kísérletképpen alkalmaztunk egy másik citokinint is kis mennyiségben, ezáltal hatféle, növekedés szabályozó tartalmú táptalajon végeztük a további hajtásindukciós kísérleteket. Ezek a következők: 1/2MS + 2, 5, 10 mg/l KIN és 1/2MS + 2, 5, 10 mg/l KIN és 0.1 mg/l 2-Izopentil-adenin (2iP). A csiranövények gyökerét a gyökér és hajtás találkozási pontjában vágással eltávolítottuk, a hajtásokat így helyeztük a hajtássokszorosító táptalajokra, 16 óra időtartamú, 2000-2500 lux megvilágítás mellett. A hajtássokszorozás időtartama 4 hét volt.

3. Megnyújtás

A keletkezett hajtásokat először egy csomóban helyeztük át MWP, MS és MS + 2 mg/l Indol-3-ecetsav (IAA) tartalmú táptalajokra a hajtások növesztése érdekében. 4 hét után a hajtáscsomókat kisebb csomókra osztottuk, majd az előbbi táptalajokra helyeztük ismét, 2-3 hét időtartamra.

4. Gyökeresítés

A megnyújtott hajtásokat tartalmazó csomókat hajtásokra bontottuk, majd különböző növekedésszabályozó tartalmú táptalajokra helyeztük gyökereztetés céljából. A következő táptalajokat alkalmaztuk: MS + 0.5 mg/l Indol-3-ecetsav (IAA) + 1.5 mg/l α -Naftil-ecetsav (NAA), MS + 2 mg/l NAA, LS + 2 mg/l IAA, MS + 2 mg/l Indol-3-ecetsav (IBA) és MS + 1 mg/l Picloram (PIC).

5. Ültetés

A jól gyökeresedett hajtásokat 800 ml-es főzőpoharakban, autoklávban sterilizált palánta földbe (Garri plus ®) ültettük steril körülmények között, és műanyag fóliával fedtük. A talajt ültetés előtt 25 ml steril ioncserélt vízzel megöntöttük.

6. Edzés

2 nappal az ültetés után a fóliaborításon 9 darab 1mm-es, majd ezt követően 3 nap múlva 12 darab 1.5×5 mm-es lyukat fűrtünk. 1 nap múlva levettük a fóliaborítást az edényekről. A növényeket 2 naponta öntöttük 25 ml csapvízzel. Ez a szakasz 8 napig tartott.

7. Cserepezés

A gyökeres, edzett növényeket 9 cm-es cserepekben, szintén palántaföldbe ültettük. A növényeket 2-3 naponta öntöttük 25 ml csapvízzel. A növényeket még továbbra is a fényszobában tartottuk 18 napig.

8. Üvegház

Végül üvegházba helyeztük a cserepes növényeket, enyhe árnyékolás mellett, és 3-4 naponta 30 ml csapvízzel öntöttük.

EREDMÉNYEK

A kiindulási anyag, a magvak fertőtlenítésére kezdetben Chloroxot® használtunk 30%-os töménységben, 20 illetve 30 perc időtartamra.

Próbálkoztunk 1% tween-20 oldat és 96%-os etilalkoholos előkezeléssel is, de ez sem hozott megfelelő eredményt. Ezek után 5%-os H₂O₂, 50%-os háztartási hypó és 10%-os klórmész oldatokkal próbálkoztunk 1% tween-20 mellett. Mivel sem a háztartási hypóval való kezelés, sem a hidrogén-peroxiddal való kezelés külön-külön nem adott megfelelő eredményt, így a kettő kombinációjával próbálkoztunk.

A kombinált fertőtlenítési módszernél először 96%-os etilalkoholos öblítést alkalmaztunk a folyamat elején, majd ezt később elhagytuk, mivel szükségtelennek találtuk. Ez a módszer már sokkal jobb eredményt hozott, csak ritkán fordult elő fertőzés. De a kifejlődött csiranövényeken a szaporítási folyamat további részében kisebb számban fordult elő fertőzés, ezért ezt sem tekintettük végleges megoldásnak. A magok fertőtlenítés előtti áztatásával próbálkoztunk a továbbiakban. A megfelelő sterilítást a 17 órás előáztatás alkalmazásával sikerült végül elérni. A fertőtlenített magvakat 30 g/l szacharóz tartalmú MS táptalajra helyeztük (1a., 1b. kép).

1a. kép: Magvetés

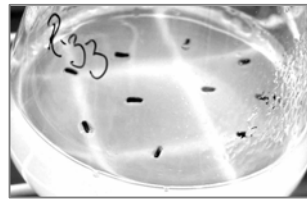


Photo 1a: Seeds on medium

1b. kép: Vetés után 10 nappal



Photo 1b: Ten days after starting of culture

Kísérleteink alapján a kezelések során a magvak csíráképességének mértéke nem csökkent jelentősen. A fél steril csíráztatási tesztünk alapján 6 nap elteltével az R-13-21 esetében 77%-os, R-23

esetében 80%-os, és az R-33 esetében pedig 90%-os volt a csírázási százalék (2a., 2b., 2c., 2d., 2e., 2f. kép). Ezek az értékek a fertőtlenítési eljárás után is 50-67% között voltak.

2a., 2b., 2c. kép: Csírateszt

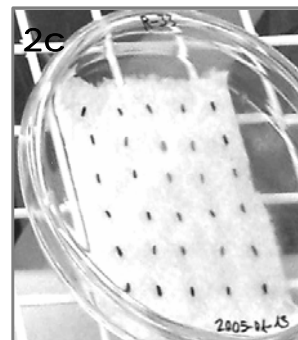
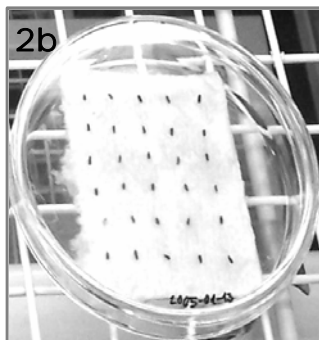
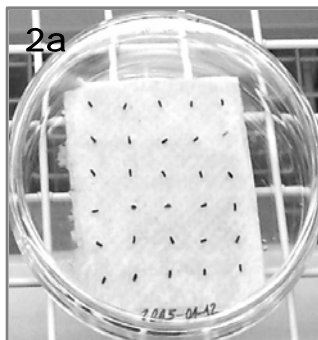


Photo 2a, 2b, 2c: Testing of germination (R-13-21, R-23, R-33)

2d., 2e., 2f. kép: 6 nap múlva

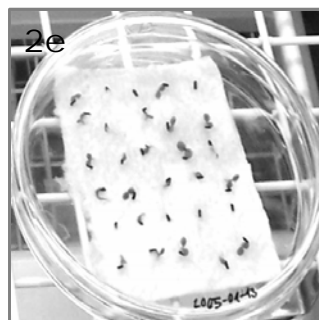
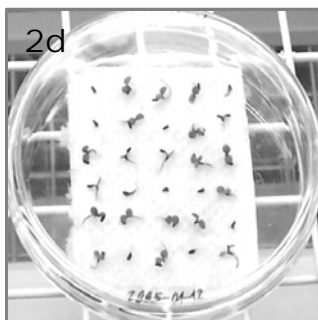


Photo 2d, e, f: Six days later

A hajtássokszorosítás fázisában először kétféle, az MS és az MWP táptalajjal próbálkoztunk, 2, 5, 10 mg/l KIN jelenlétében. Az MWP táptalajon ugyan nagyszámú hajtás keletkezett, de ezek nagyon kicsik és erősen torzultak voltak, e mellett nagyfokú kallusz képződést is megfigyeltünk (3a., 3b. kép).

3a. kép: Hajtásindukció, MWP + 10 KIN táptalajon, korai állapot



Photo 3a: Induction of shoot formation on MWP + 10 KIN in early stage

3b. kép: 1 hónap után



Photo 3b: One month later

Az MS táptalajon is megindult a hajtások indukciója és kezdeti növekedése, de körülbelül 10-14 nap után a járulékos hajtások növekedése megállt, és a főhajtás indult erőteljes növekedésnek (3c. kép).

A növények két táptalajon adott eltérő reakcióját a két táptalaj nitrogéntartalma közötti jelentős különbségnek tulajdonítottuk elsősorban.

3c. kép: Hajtásindukció, MS + 10 KIN táptalajon, korai állapot



Photo 3c: Induction of shoot formation on MS + 10 KIN in early stage

Úgy gondoltuk, hogy az MWP táptalaj nitrogéntartalma túl alacsony, az MS táptalajé pedig túl magas. A növények reakciója alapján a kettő közötti értéket találtuk megfelelőnek, ezért a további hajtássokszorozási kísérleteinket már fél MS táptalajon végeztük. Mivel az alacsonyabb növekedés szabályozóanyag koncentráció esetében a keletkezett hajtások citokinin okozta torzulása kisebb mértékű volt, de a hajtássokszorozás hatásfoka is alacsonyabb volt, ezért próbálkoztunk egy másik citokinin kis koncentrációban való adagolásához is a KIN mellett, mely az elsősorban fás hajtásoknál használatos 2iP volt. Az ezeken keletkezett hajtások száma és morfológiája alapján a fél MS + 2 mg/l KIN + 0.1mg/l 2iP táptalajt találtuk a legmegfelelőbbnek (4a., b., c., d. kép, 1. ábra).

4a., b., c., d. kép: Hajtásindukció 1/2MS táptalajon, 1 hónap után

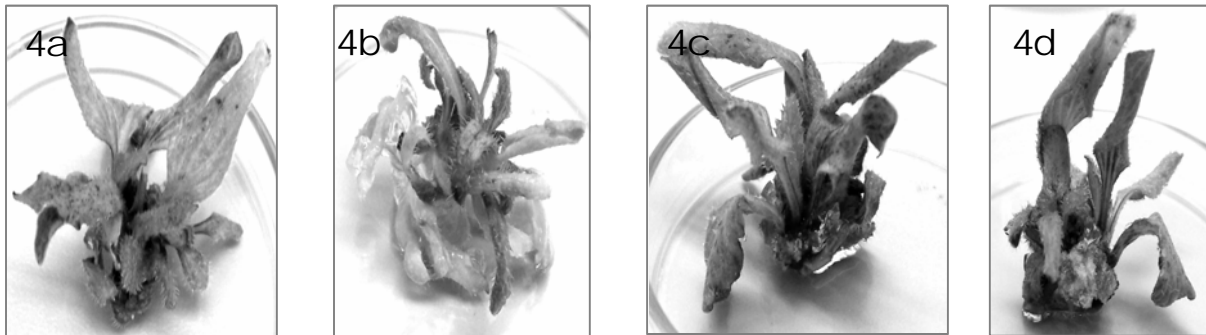


Photo 4a, b, c, d: Induction of shoot formation on 1/2MS medium after one month

1. ábra: Hajtássokszorozás kiértékelése

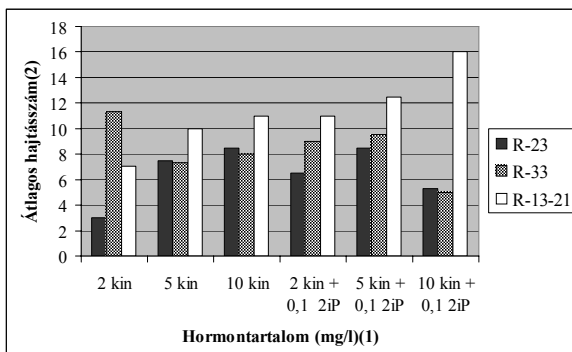


Figure 1: Evaluation of shoot multiplication
Growth regulator content(1), number of shoots in average(2)

A hajtássokszorozási kísérletet további citokininekkel is próbáltuk, de jobb eredményt egyik esetben sem kaptunk (2. ábra).

A mikroszaporítási folyamat további lépéseiben az MWP + 10 mg/l KIN táptalajon keletkezett hajtásokat használtuk fel.

2. ábra: Hajtássokszorozás kiértékelés további citokininekkel

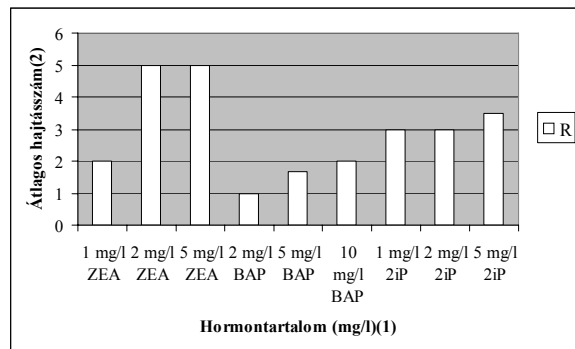


Figure 2: Evaluation of shoot multiplication with other cytokinines
Growth regulator content(1), number of shoots in average(2)

Mivel a sokszorosító táptalajon keletkezett hajtások mérete kicsi volt, ezért a hajtáscsomókat elongációs táptalajra helyeztük a szaporítás után. Elongációs táptalajként az MWP0-t, az MS0-t és az MS + 2 mg/l IAA tartalmú táptalajokat alkalmaztuk (5a., b., c., d. kép).

5a., b. kép: Elongáció, 7 nap után

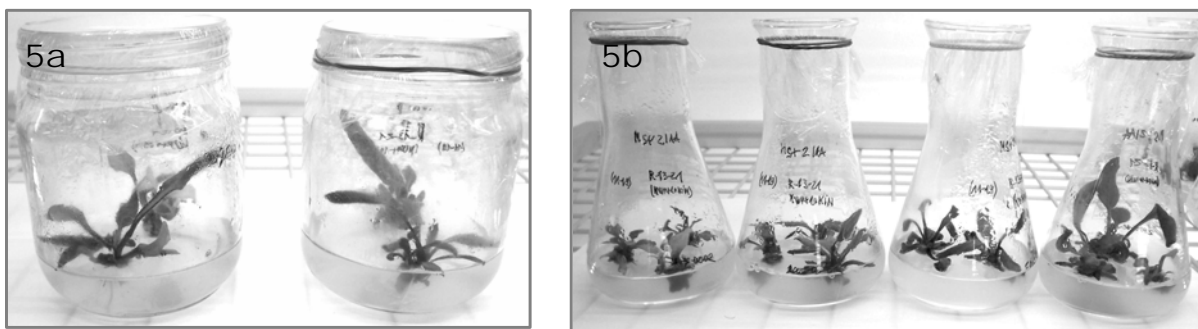


Photo: 5a, b: Elongation of shoots after 7 days

5c., d. kép: 21 nap után

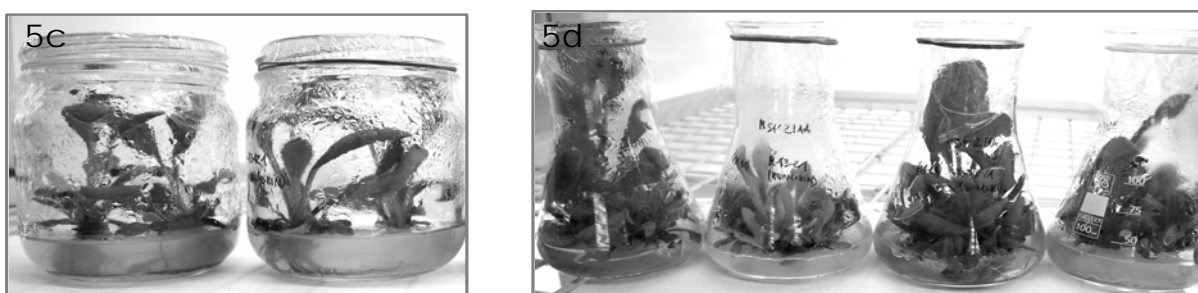


Photo 5c, d: After 21 days

A hajtások mindegyik táptalajon növekedtek. Ennek mértéke, legkisebb az MWPO és legnagyobb az MS + 2 mg/l IAA tartalmú táptalajon volt. Az MS + 2 mg/l IAA táptalajon a hajtások erőteljesebb hosszirányú növekedése volt megfigyelhető, mely a szaporító szakasz során

keletkezett kalluszos hajtáscsomók szétszedése szempontjából előnyösnek tűnt.

A hajtások gyökereztetését *in vitro* tenyésztet formájában 5 fajta táptalajon próbáltuk (6a., b., c., d., e. kép).

6a., b., c., d., e. kép: Gyökérindukció

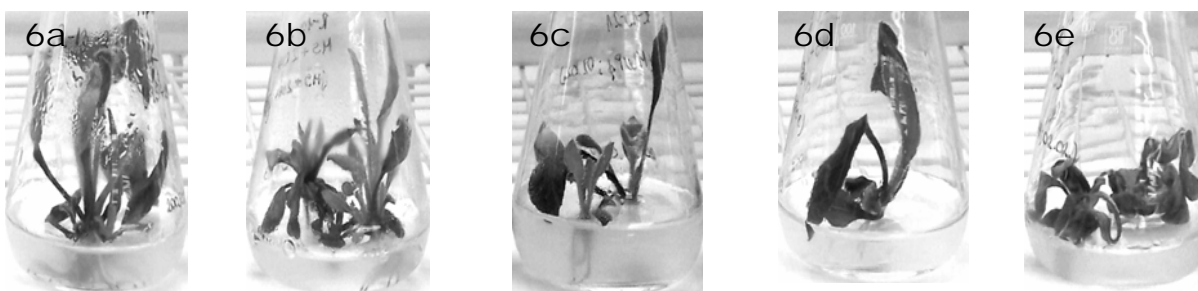


Photo 6a, b, c, d, e: Induction of rooting on MS + 1.5 mg/l NAA + 0.5 IAA, MS + 2 mg/l NAA, LS + 2 mg/l IAA, MS + 2 mg/l IBA, MS + 1 mg/l PIC media

A gyökérbépződés mindegyik táptalajon megindult 4-7 nap elteltével, kivéve az MS + 1 mg/l PIC táptalajon, ahol nagymértékű kalluszosodás következett be.

Leggyorsabban az IBA-t tartalmazó táptalajon indult meg a gyökérbépződés (6 nap elteltével), de gyorsan követte ezt az IAA-t tartalmazó táptalaj, melyen sokkal gyorsabb volt a növekedés, és az

IAA-t és NAA-t is tartalmazó táptalaj is, amelyen kicsit lassabban nőttek a gyökerek, mint az előzőn (8 nap elteltével).

A NAA-t tartalmazó táptalajon kicsit később jelentek meg az első gyökerek, melyek a későbbiekben behozták a lemaradásukat, és a legnagyobb gyökérmennyiség is ezen a táptalajon képződött (13 nap elteltével) (3., 4., 5. ábra).

3. ábra: Gyökérképződés kiértékelése, 6 nap után

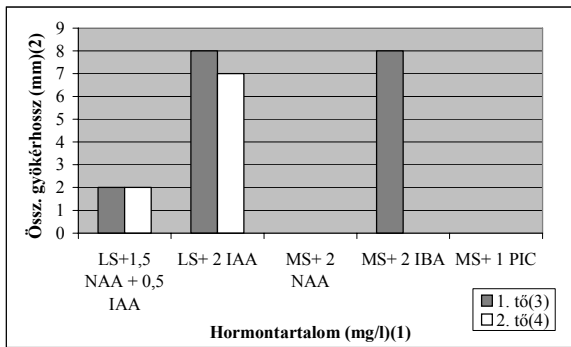


Figure 3: Evaluation of root induction

Growth regulator content(1), total length of roots(2), 1. clone(3), 2. clone(4)

4. ábra: Gyökérképződés kiértékelése, 8 nap után

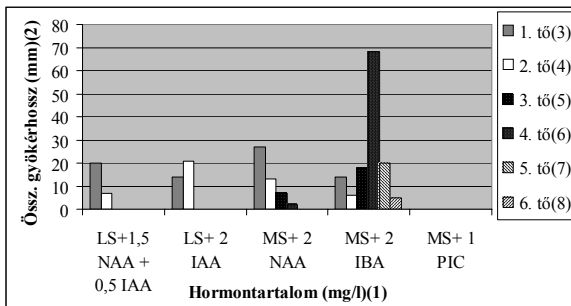


Figure 4: Evaluation of root induction

Growth regulator content(1), total length of roots(2), 1. clone(3), 2. clone(4), 3. clone(5), 4. clone(6), 5. clone(7), 6. clone(8)

5. ábra: Gyökérképződés kiértékelése, 13 nap után

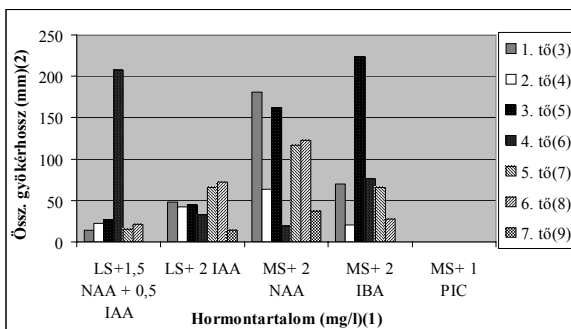


Figure 5: Evaluation of root induction

Growth regulator content(1), total length of roots(2), 1. clone(3), 2. clone(4), 3. clone(5), 4. clone(6), 5. clone(7), 6. clone(8), 7. clone(9)

Az IBA-t tartalmazó táptalajon a hajtások vágási felületén keletkezett kallusz mennyisége jelentősebb volt, mint a többinél, melyen gyökerek is képződtek.

A hajtások egy részét a szaporítás során keletkezett kallusz egy részével együtt helyeztük gyökereztető táptalajra, ezeken 3-5 nappal később a gyökérképződés megindulása, és némelyeken egyáltalán nem képződött gyökér, a frissen vágott, kallusz nélküli felülettel rendelkező hajtásokon volt először gyökér, és a gyökeresedés mértéke is 10-15%-kal magasabb volt. Mellégyökér képződése legnagyobb mértékben az IBA-t tartalmazó táptalajon következett be (30%, 2-6 db mellégyökér/tő), és kis mértékben még IAA jelenlétében is előfordult (10%, 1 db mellégyökér/tő) (16 nap elteltével).

Megfigyeléseink alapján a NAA-t tartalmazó táptalajon volt a legerőteljesebb a gyökeresedés, de jól használhatóak az IAA-t és a NAA-t és IAA-t is tartalmazó táptalajok is.

Az immár gyökeres és steril körülmények között palántaföldbe ültetett növények 2 nap múlva már üdén, erőteljesen néztek ki és fejlődtek. Ekkor elkezdtük az edzésüket. Az első lépésben apróbb nyílásokat készítettünk, így még 3 nap elteltével is párás volt az edény falának alsó része. Ekkor nagyobb nyílásokat készítettünk, így már 1 nap múlva eltűnt a pára, majd következő nap kinyitottuk az edényt (7. kép).

7. kép: Akklimatizált növény



Photo 7: An acclimatized, plant

Az edzés 8 nap elteltével sikeresen végbement, és az edzett, gyökeres növényeket cserépbe ültettük (8a., b., c., d. kép).

A növényeket még 18 napig a fényszobában tartottuk, közben 2-3 naponta öntöttük, majd üvegházba vittük azokat, és 3-4, illetve egy esetben 5 naponta öntöttük. Megfigyeltük, hogy minden öntözési periódus között ugyanazok a növények kókadnak le kisebb, illetve nagyobb mértékben, illetve hosszabbított periódus esetén még 1-2 az előbbieken kívül. Az 5 napos öntözési periódusnál a korábbi eseményeket/kezeléseket visszakövetve megállapítottuk, hogy ezen növények többsége (55%) ugyanarról a gyökereztető táptalajról származott. Ez az IBA tartalmú táptalaj volt. A kisebbik része pedig IAA (11%) és NAA (33%) tartalmú táptalajokról származott.

8a., b., c., d. kép: A mikroszaporítási folyamat végeredménye

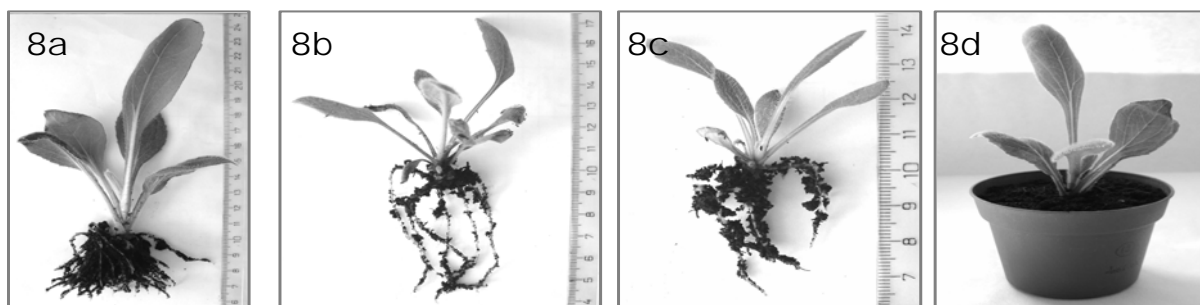


Photo 8a, b, c, d: The result of our micropropagation process

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kidolgoztunk egy lehetséges módszert a *Rudbeckia in vitro* szaporítására, mellyel lehetséges diverz genetikai anyag klónozása, az egyedek rögzítése, és a legmegfelelőbb genetikai állománnyal rendelkező példányok kiválogatása és elterjesztése, mint új fajták. Ezen belül kidolgoztunk egy módszert a steril csíranövény tenyésztéséhez szükséges anyag, a magvak felületi sterilizálására, mely során 17 órás előáztatást alkalmazva egy háztartási hypót és hidrogén-peroxidot tartalmazó kombinált módszert alkalmaztunk.

Kísérleteket végeztünk a csíranövények *in vitro* hajtás sokszorozására többféle táptalajon, melyekből eredményeink alapján használhatónak bizonyult a 10 mg/l KIN tartalmú MWP táptalaj, és újabb kísérleteink alapján jobb eredményt kaphatunk a 2 mg/l KIN-t és 0.1 mg/l 2iP-t tartalmazó, feles erősségű, MS táptalajon.

Az előállított hajtástömegeből a nyújtás folyamatán keresztül sikerült kis energia-befektetéssel jól izolálható hajtásokat létrehozni a 2 mg/l IAA tartalmú MS táptalajon.

Ezeket sikeresen gyökeresítettük különböző táptalajokon, melyek közül vizsgálataink során több táptalaj is hasonlóan megfelelőnek bizonyult.

Létrehoztunk egy módszert az *in vitro* előállított *Rudbeckia* klónok edzésére, mely során a növények kijuttathatóak a szabadba, virágágyásokba, parkokba.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm meg Dr. Fári Miklós tanszékvezető úrnak, Zsiláné André-Anikó tanszéki munkatársnak, Dr. Kovács Zoltán nemesítő úrnak, Béres csilla szakdolgozónak, és a tanszék valamennyi dolgozójának, hogy lehetővé tették, illetve segítették munkámat.

IRODALOM

- Ebringerová, A.-Kardosová, Z.-Hromádková, A.-Hřibalová, V. (2003): Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, Volume 74, Issues 1-2, February 2003, 52-61.
- Ebringerová, A.-Kardosová, Z.-Hromádková, A.-Malovíková-Hřibalová, V. (2002): Immunomodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 30, Issue 1, 8 March 2002, 1-6.
- Kochankov, V.G.-Milyaeva, E.L.-Zhyvukhina, E.-Chailakhyan, M.K.h. (1989): Effect of 6-benzylaminopurine on stem formation and flower bud initiation in *Rudbeckia bicolor* plants of different ages under non-inductive conditions. *Acta Hort. (ISHS)* 251:25-34.
- Kovács, Z.-Ladányi, E. (1985): The *in vitro* propagation of the tetraploid forms of *Rudbeckia hirta*. *Acta Hort. (ISHS)* 167:307-308.
- Luczkiewicz, M.-Cisowski, W. (1998): The RP-HPLC analysis of anthocyanins. *Chromatographia* 48 (5-6): 360-364.
- Luczkiewicz, M.-Cisowski, W. (2001): Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta* Plant Cell Tissue and Organ Culture 65 (1): 57-68.
- Luczkiewicz, M.-Zárate, R.-Dembinska-Migas, W.-Migas, P.-Verpoorte, R. (2002): Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L. *Plant Science*, Volume 163, Issue 1, July 2002, 91-100.
- Yuan, M.-Carlson, W.H.-Heins, R.D. (1998): Effect of forcing temperature on time to flower of *Coreopsis grandiflora*, *Gaillardia xgrandiflora*, *Leucanthemum xsuperbum*, and *Rudbeckia fulgida*. *Hortscience* 33.4. 663-667.