



Identyfikacja mieszańców oddalonych lilii w oparciu na markerach chromosomowych

Agnieszka Marasek, Teresa Orlikowska
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Identification of distant lily hybrids on the basis of chromosomal markers

Summary

A status of plants obtained from interspecific crosses of oriental lily cultivar Marco Polo with *Lilium henryi* and *L. henryi* with cultivar Marco Polo was tested on the basis of morphology and C-band patterns of chromosomes. The positions of the secondary constrictions were found to be the best morphological markers. Also chromosomes of different C-band patterns from parental forms were chosen for hybrids identification. Four out of five plants cultivar Marco Polo x *Lilium henryi* and one out of four plants from reciprocal crosses were found to be true hybrids according to chromosomal markers.

Key words:

lilies, hybrid identification, chromosome morphology, secondary constriction, C-banding.

1. Wstęp

Krzyżowanie odległych taksonomicznie genotypów jest jedną z ważniejszych metod uzyskiwania zmienności w hodowli lilii. Występująca w rodzaju *Lilium* apomiksja (1) stwarza potrzebę wczesnej oceny wyników krzyżowania. Do tego celu stosowano różne metody, w tym cytologiczne: analizę liczby i morfologii chromosomów (2,3) oraz metodę prążków C, która umożliwia ujawnianie subtelnych różnic w budowie chromosomów (3-5).

Adres do korespondencji

Agnieszka Marasek,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

3 (54) 243-248 2001

Przedmiotem pracy było ustalenie markerów chromosomowych dla form rodzicielskich używanych w naszych krzyżowaniach oraz zbadanie, czy siewki otrzymane w wyniku krzyżowania i kultury *in vitro* załączków, są mieszańcami.

2. Materiał i metody

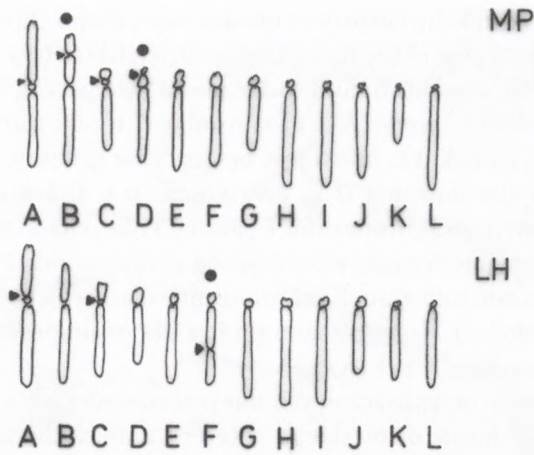
Formy rodzicielskie lili – odmiana z grupy mieszańców orientalnych Marco Polo i *Lilium henryi* oraz 5 siewek uzyskanych w kulturach *in vitro* załączków pobranych z „Marco Polo” zapylonej *L. henryi* i 4 siewki z załączków *L. henryi* zapylonej odmianą Marco Polo namnożono w kulturach *in vitro* oraz przez sadzonki łuskowe w substracie torfowym.

Markery chromosomowe opracowywano dla chromosomów w stadium metafazy mitotycznej. Stosowano różne sposoby skracania i utrwalania chromosomów, w zależności od przeznaczenia. Do analiz morfologii chromosomów, wierzchołki korzeni lili przetrzymywano w 0,1% roztworze kolchicyny przez 4 godziny i utrwalano w mieszaninie 96% alkoholu etylowego i lodowatego kwasu octowego (3:1). Do preparowania materiału w celu wytworzenia prążków C używano wody lodowatej (24 godziny), a do utrwalania 45% kwasu octowego. Morfologię chromosomów (długość chromosomu, stosunek długości ramion, indeks centromerowy, obecność przewężeń wtórnych) oceniano po barwieniu metodą Feulgena (6). Prążki C ujawniano w wyniku zastosowania zmodyfikowanej metody Smyth i Kongsuwan (3). W pracy analizowano tylko te prążki, które były widoczne na obu chromosomach homologicznych i w przynajmniej 3 płytkach metafazowych.

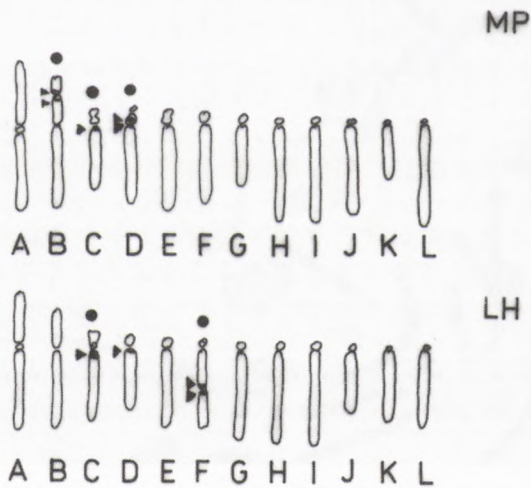
Na podstawie obrazów mikroskopowych i fotografii sporządzono idiogramy chromosomów form rodzicielskich, na które naniesiono markery – przewężenia wtórne i wzory prążkowe, które były podstawą do identyfikacji mieszańców.

3. Wyniki

Wszystkie testowane genotypy lili były diploidami z $2n = 24$. Chromosomy uporządkowano od A do L, na podstawie pozycji przewężenia pierwotnego, zgodnie z opisem przedstawionym przez Stewart (7). Wyodrębniono dwa typy chromosomów: submetacentryczne (dwie pary) i akrocentryczne (dziesięć par). Kariotypy badanych form rodzicielskich różniły się znacząco jedynie obecnością i pozycją przewężeń wtórnych. U „Marco Polo” przewężenia wtórne występowały na krótszym ramieniu chromosomów A, B, C i D, natomiast u *L. henryi* były widoczne na krótszym ramieniu chromosomów A i C oraz na dłuższym ramieniu chromosomu F (rys. 1). Za najbardziej charakterystyczny (a zatem markerowy) dla identyfikacji mieszańców „Marco Polo” x *L. henryi* uznano chromosom F, a dla mieszańców *L. henryi* x „Marco Polo”, za markerowe dla formy ojcowskiej uznano chromosomy B i D (rys. 1). W wy-



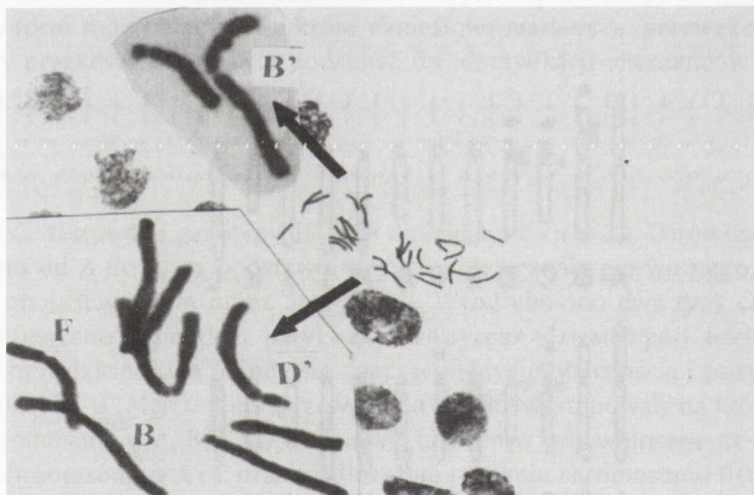
Rys. 1. Idiogramy form rodzicielskich (MP) „Marco Polo” i (LH) *L. henryi*. Strzałki wskazują przewężenia wtórne na chromosomach. Chromosomy uznane za markerowe dla form rodzicielskich oznaczono kropką.



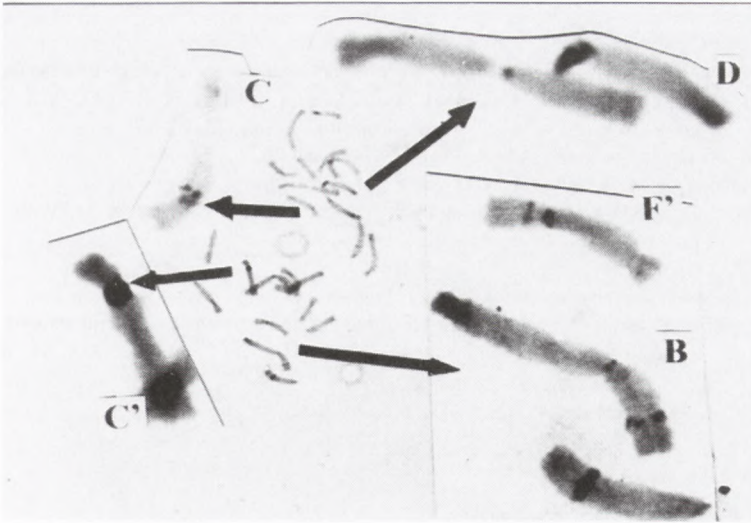
Rys. 2. Idiogramy (MP) „Marco Polo” i (LH) *L. henryi*, na których zaznaczono prążki C (strzałki). Chromosomy uznane za markerowe dla form rodzicielskich oznaczono kropką.

niku barwienia odczynnikiem Giemsy za markerowe uznano chromosomy B, C, D i F, których układ prążków jest różny u obu form rodzicielskich (rys. 2). U „Marco Polo”, na krótszym ramieniu chromosomu B widoczne są dwa prążki, które nie występują na tym chromosomie u *L. henryi*. Na chromosomie C u obu form występuje prążek przycentromerowy, jednak u *L. henryi* jest on znacznie grubszy. U „Marco Polo”, na krótszym ramieniu chromosomu D są dwa prążki, a u *L. henryi* obecny jest tylko prążek przycentromerowy. Chromosom F „Marco Polo” charakteryzuje się obecnością prążka przycentromerowego, natomiast na chromosomie F *L. henryi* występują dwa prążki na dłuższym ramieniu. Za chromosomy markerowe dla identyfikacji mieszańców „Marco Polo” x *L. henryi* uznano C i F, a dla roślin powstałych z krzyżowań odwrotnych chromosomy B i D (rys. 2).

Analiza kariotypów przypuszczalnych mieszańców wykazała obecność markerowych chromosomów formy ojcowskiej u czterech z pięciu badanych roślin „Marco Polo” x *L. henryi* (przykład na fot. 2) i jednej z czterech roślin *L. henryi* x „Marco Polo” (przykład na fot. 1).



Fot. 1. Mieszańiec *L. henryi* x „Marco Polo”. Barwienie za pomocą metody Feulgena: F – chromosom markerowy formy matecznej, B' i D' – chromosomy markerowe formy ojcowskiej. Strzałki wskazują powiększone chromosomy markerowe.



Fot. 2. Mieszaniec „Marco Polo” x *L. henryi*. Barwienie za pomocą prążków C: B, C i D – chromosomy markerowe dla formy matcznej, C' i F' – chromosomy markerowe dla formy ojcowskiej. Strzałki wskazują powiększone chromosomy markerowe.

4. Dyskusja

Ze względu na wielkość i zróżnicowanie morfologiczne, chromosomy lili są dogodnymi obiektami do ustalania markerów identyfikujących genotypy. W pracy przyjęto założenie, że obecność markerów formy ojcowskiej potwierdza mieszańcowy status roślin. W przypadku badanych form stwierdzono, że najlepszymi markerami morfologicznymi chromosomów jest obecność i położenie przewężeń wtórnych. Podobnie, lokalizację przewężeń wtórnych wykorzystano, m.in. do identyfikacji mieszańca lili „Black Beauty”, który powstał z krzyżowania *L. henryi* z *L. speciosum* (8) oraz do analizy mieszańców *L. nobilissimum* x *L. regale* (9). Metoda wybarwienia prążków C jest często stosowana do identyfikacji poszczególnych chromosomów roślinnych. Wykorzystano ją, m.in. do identyfikacji chromosomów żyta w liniach addycyjnych pszenżyta (4) oraz identyfikacji mieszańców alstremerii (2). W prezentowanej pracy niekiedy stwierdzano obecność bardzo cienkich prążków tylko na jednym z pary chromosomów. Podobne zjawisko obserwowano, m. in. u *L. martagon* i *L. concolor* (10). Barwienie odczynnikami Giemsy dostarczyło więcej szczegółów pozwalających na identyfikację chromosomów niż barwienie wg metody Feulgena.

Praca ta była wykonana w ramach projektu badawczego KBN 0756/P06/98/14.

Autorki dziękują pani Lucynie Ogórek za pomoc techniczną przy przeszczepianiu kultur.

Literatura

1. Myodo H., (1975), *The Lily Yearbook NALS (The North American Lily Society)*, 28, 66-69.
2. Rustanius P., Hang A., Hughes H. G., Tsuchiya T., (1991), *HortScience*, 7, 902-904.
3. Smyth D. S., Kongsuwan K., (1980), *The Lily Yearbook NALS*, 33, 83-85.
4. Darvey N. D., Gustafson J. P., (1975), *Heredity*, 15, 239-243.
5. Smyth D. S., (1991), *The Lily Yearbook NALS*, 44, 103-105.
6. Kononowicz A., (1981), w: *Metody badania chromosomów*, red. Olszewska M. J., PWRiL, Warszawa, 135-168.
7. Stewart R., (1947), *Amer. Jour. Bot.*, 34, 9-26.
8. Uhring J., (1968), *The Lily Yearbook NALS*, 21, 44-51.
9. Obata Y., Niimi Y., Nakano M., Okazaki K., Miyajima I., (2000), *Scientia Horticulturae*, 84, 205-212.
10. Smyth D. S., Kongsuwan K., Wisudharomn S., (1991), *The Lily Yearbook NALS*, 44, 107-118.