

WPLYW RÓŻNYCH SPOSOBÓW ZAPYLENIA NA ROZWÓJ I ŻYWOTNOŚĆ NASION MIESZAŃCÓW MIĘDZYGATUNKOWYCH LILII

CZEŚĆ II

MIESZAŃCE MIĘDZYGRUPOWE AO, OA, TA, AT, TO, TL

Beata Płoszaj¹, Danuta Rzepka-Plevněš²

¹ Katedra Ogrodnictwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

² Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

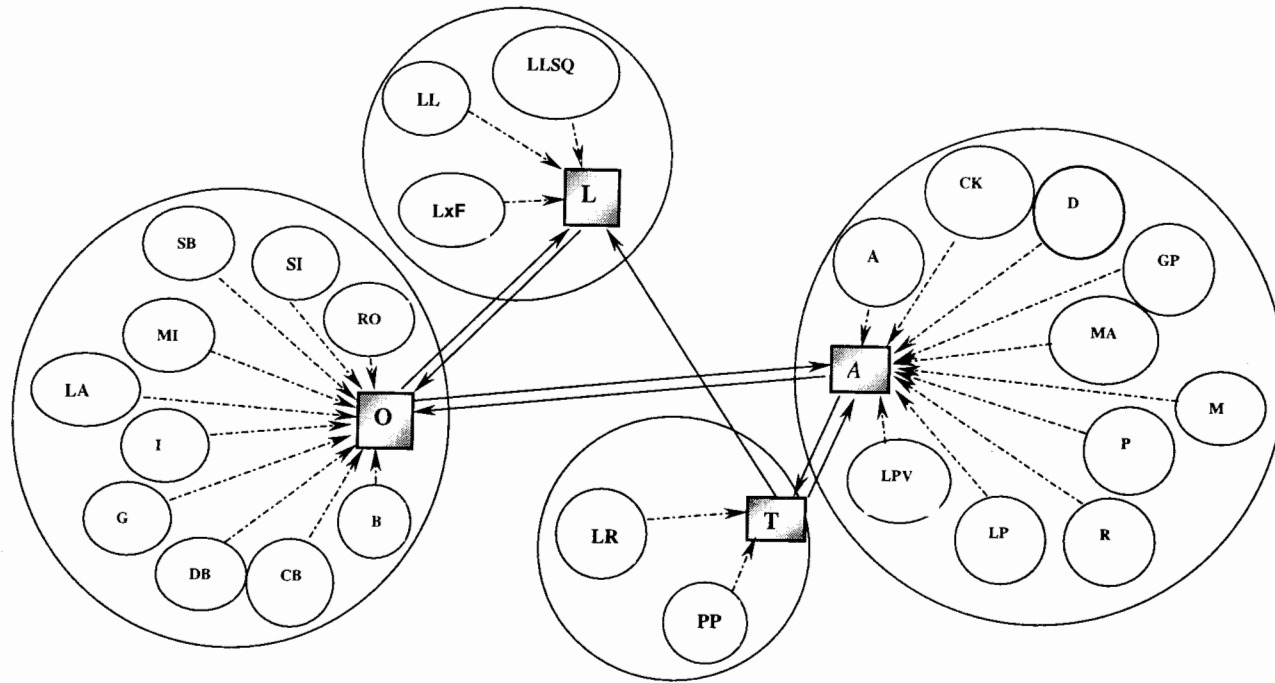
Współczesna hodowla lili (*Lilium*) opiera się przede wszystkim na poszukiwaniu rekombinantów wśród mieszańców oddalonych [ORLIKOWSKA i in. 2001]. Ich otrzymanie zależy od możliwości pominięcia wielu barier ograniczających zapłodnienie, rozwój zarodka i jego kiełkowanie. W hodowli lili orientalnych specjalizują się hodowcy amerykańscy, którzy krzyżują je z liliami trąbkowymi. Pierwsze mieszańce 'Oriempets' pokazano w 1987 roku na wystawie lili w Portland, w USA [MC RAE 1998].

Celem badań było określenie skuteczności krzyżowania różnych gatunków lili przy zastosowaniu dwóch różnych sposobów zapyleń oraz wspomaganie kiełkowania otrzymanych zarodków w kulturach *in vitro*.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 1999–2001 w Katedrze Roślin Ozdobnych Akademii Rolniczej w Szczecinie. W latach 1999–2000 krzyżowania przeprowadzono w tunelu foliowym, w 1999–2001 – w gruncie odkrytym. Materiałem badawczym były Mieszańce Orientalne, Mieszańce Longiflorum, Mieszańce Trąbkowe i Mieszańce Azjatyckie. Schemat krzyżowań przedstawiono na rys. 1. Formy przeznaczone do krzyżowań zgrupowano w czterech okręgach uwzględniając ich przynależność do poszczególnych grup lili ogrodowych. Kierunek krzyżowań zaznaczono na schemacie strzałkami zwróconymi w kierunku roślin matecznych.

Kwiaty roślin matecznych kastrowano w fazie zamkniętego, dobrze wybarwionego pąka. Po ich otwarciu usuwano pylniki, a znamiona zabezpieczano przed niekontrolowanym zapyleciem i uszkodzeniem aluminiową folią. Zebrane z kwia-



A: Mieszkańce Azjatyckie; Asiatic hybrids: A – ‘Apeldoorn’, CK – ‘Connecticut King’, ‘D – ‘Dreamland’, GP – ‘Gran Paradiso’, LP – *L. pumilum*, LPV – *L. pumilum* ‘Viva’, MA – ‘Miss Alice’, M – ‘Montreux’, P – ‘Prima’, R – ‘Roma’

L: Mieszkańce Longiflorum; Longiflorum hybrids: LL – *Lilium longiflorum*, LLSQ – *Lilium longiflorum* ‘Snow Queen’, LxF – *Lilium ×formolongi*

O: Mieszkańce Orientalne; Oriental hybrids: B – ‘Berlin’, CB – ‘Casa Blanca’, DB – ‘Dame Blanche’, G – ‘Girosa’, I – ‘Impressiv’, LA – ‘La Reve’, MI – ‘Miami’, SB – ‘Sorbonne’, SI – ‘Simplex’, RO – ‘Rosato’

T: Mieszkańce Trąbkowe; Trumpet hybrids: LR – *Lilium regale*, PP – ‘Pink Perfection’

Rys. 1. Schemat krzyżowań międzygrupowych w rodzaju *Lilium* przeprowadzonych w latach 1999–2001

Fig. 1. Model of crossbreeding within groups of the *Lilium* genus, conducted in the period of 1999–2001

tów roślin ojcowskich pylniki umieszczano w szalkach Petriego i przechowywano w eksykatorze z żelazem krzemionkowym w temperaturze 18–20°C. Stosowano równolegle dwie techniki krzyżowania. W jednej pyłek nakładano na dojrzałe znamiona bez przycinania słupka, w drugiej – słupki przycinano na wysokość 1 cm, ułatwiając w ten sposób przeniknięcie łagiewki pyłkowej do zalążni. Otrzymane nasiona wykładano na pożywkę MS [MURASHIGE, SKOOG 1962] z dodatkiem kazeiny hydrolizowanej (60 g·dm⁻³ i 200 mg·dm⁻³), w temperaturze 25°C i oświetleniu 16 godz. Przed i po zapyleniu kwiatów prowadzono obserwacje dotyczące przebiegu fazy kwitnienia, formowania się zarodków i nasion. Szczegółowe dane dotyczące wykonanych krzyżowań w obu wymienionych warunkach uprawy lilii przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1; Table 1

Komponenty rodzicielskie przeznaczone do krzyżowań,
liczba wykonanych zapyleń w gruncie odkrytym i tunelu foliowym w latach 1999–2001

Parent components intended for crossbreeding, number of performed pollinations
in the open field and in a plastic tunnel in the period of 1999–2001

Forma matczna Maternal form	Długość słupka Style length (cm)	Forma ojcowska Paternal form	Długość słupka Style length (cm)	Żywotność pyłku Pollen vitality (%)	Oczekiwane miejsca Expected hybrids	Miejsce wykonania zapylenia Place of pollination	Sposób zapylenia Method of pollination		Liczba zapylnych kwiatów Number of pollinated flowers
							1	2	
1999									
<i>L. longiflorum</i>	9,4	Miami	4,1	60–70	OA	**	–	+	10
		Rosato	4,0	60–70		**	–	+	10
Connecticut King	4,0	Dame Blanche	4,3	75–80	AO	*	–	+	10
		Miami	4,1	60–70		*	–	+	5
		Rosato	4,0	60–70		*	–	+	5
Dreamland	4,4	Dame Blanche	4,3	75–80	AO	*	+	+	10
		Girosa	4,2	60–75		*	–	+	10
Gran Paradiso	4,2	Dame Blanche	4,3	75–80	AO	*	–	+	5
Miss Alice	4,5					*	+	+	20
Montreux	4,2	Rosato	4,0	60–70	AO	*	+	+	10
						*	–	+	10
Roma	4,3				AO	*	+	+	10
Girosa	4,2				AO	**	–	+	10
Berlin	4,4	Connecticut King	4,0	70–85	OA	**	–	+	10
Dame Blanche	4,3					**	–	+	10

2000									
<i>L. longiflorum</i>	9,4	Casa Blanca	4,5	65–75	LO	*	+	+	10
		Rosato	4,0	60–70		*	+	+	10
Connecticut King	4,0	Impressive	4,5	60–75	AO	*	+	+	10
		Sorbonne	4,2	60–70		*	+	+	10
		Simplex	4,3	60–70		*	+	+	10
		<i>L. regale</i>	7,2	65–70	AT	*	+	+	10
		Pink Perfection	8,4	65–70		*	+	+	10
Miss Alice	4,5	Sorbonne	4,2	60–70	AO	*	+	+	20
		Simplex	4,3	60–70		*	+	+	20
		Dame Blanche	4,3	75–80		*	–	+	10
		Impressive	4,5	60–75		*	+	+	20
		Pink Perfection	8,4	65–70	AT	*	+	+	25
		<i>L. regale</i>	7,2	65–70		*	–	+	5
Montreux	4,2	Casa Blanca	4,5	65–75	AO	*	–	+	5
		Rosato	4,5	60–70		*	–	+	5
<i>L. ×formolongi</i>	7,3	Casa Blanca	4,5	65–75	LO	**	+	+	10
		Pink Perfection	8,4	65–70	LT	**	+	+	20
Pink Perfection	8,4	<i>L. longiflorum</i>	9,4	65–75	TL	*	+	+	10
<i>L. regale</i>	7,2					*	+	+	10
2001									
Dreamland	4,4	La Reve	4,2	60–70	AO	*	+	+	10
		Casa Blanca	4,5	65–75		*	+	+	10
Miss Alice	4,5	La Reve	4,2	60–70		*	+	+	10
<i>L. regale</i>	7,4	Miss Alice	4,5	70–80	TA	*	+	+	10
Connecticut King	4,0	Casa Blanca	4,5	65–75	AO	*	+	+	10

* zapylenia wykonane w gruncie odkrytym; pollination in the open field

** zapylenia wykonane w tunelu foliowym; pollination in a plastic tunnel

1 naturalne zapylenie; open pollination

2 skracanie szyjki słupka; style-shortening

+ wykonano zapylenie; performed pollination

– nie wykonano zapylenia; not performed pollination

Wyniki i dyskusja

Rodzaj *Lilium* wyróżnia się wśród innych roślin dużą zmiennością gatunkową, tak ważną w pracach hodowlanych [MYNETT 2000; BUZON i in. 2001]. Różnice te dotyczą budowy kwiatów, pędów, liści i cebul [MYNETT 1993].

W literaturze przedmiotu, poza nielicznymi pracami w zakresie hodowli lilii [BUZON i in. 2001], brak jest dokładnych wskazówek metodycznych dotyczących prowadzenia krzyżowań w obrębie tego rodzaju, jak również wspomagania kiełkowania otrzymanych w ich wyniku nasion mieszańcowych w kulturach *in vitro*. W literaturze krajowej doniesienia na temat krzyżowań oddalonych i z wykorzystaniem kultur *in vitro* u lilii są raczej fragmentaryczne. Ośrodkiem, w którym prowadzone były tego typu badania pod kierunkiem Orlikowskiej jest Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach [MYNETT 2000].

Z badań RZEPKI-PLEVNEŠ [1990], ZENKTELERA [1996; 2001] i ROGALSKIEJ [1999] wynika, że jednym z ważniejszych powodów wielu niepowodzeń w krzyżowaniach oddalonych jest niezgodność kwitnienia komponentów rodzicielskich (izolacja czasowa). W prezentowanych badaniach formy rodzicielskie różniły się terminem zakwitania. Różnice były na tyle duże, że nie udało się w żadnym przypadku przeprowadzić krzyżowań zwrotnych. Bariere tę w obu wariantach doświadczenia (pole, tunel foliowy) pokonywano w ten sposób, że niedojrzałe jeszcze pylniki wcześniej zakwitających form ojcowskich przenoszono do eksykatora i przechowywano w temperaturze 18–20°C. Kwiaty roślin matecznych zapyłano pyłkiem, którego zdolność do barwienia wynosiła więcej niż 55%. Nie odzwierciedlało to jednak jego żywotności i zdolności do kiełkowania i było prawdopodobnie jedną z przyczyn niewielkiej liczby zawiązanych nasion mieszańcowych (tab. 2).

Do kolejnych barier mających istotny wpływ na powodzenie prowadzonych krzyżowań międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Lilium* można zaliczyć niejednakową długość szyjki słupka wybranych do badań komponentów rodzicielskich. Ominięcie tej bariery jest możliwe poprzez skracanie szyjki słupka [MYODO 1975; ASANO, MYODO 1977; ASANO 1980; VAN TUYL i in. 1988, 1990, 1997; FERNÁNDEZ i in. 1996; ROH i in. 1996]. Najdłuższą szyjką słupka charakteryzowały się *L. longiflorum* (9,4 cm), *L. xformolongi* (7,3 cm), *Lilium regale* (7,2 cm) i jej odmiana 'Pink Perfection' (8,4 cm), tab. 1. Otrzymane wyniki wykazały, że skrócenie szyjki słupka miało korzystny wpływ na liczbę zawiązanych nasion (tab. 2). Przy konwencjonalnym sposobie zapylenia liczba zawiązanych nasion mieszańcowych wahała się od 101 do 354, przy zastosowaniu skracania szyjki – od 205 do 432.

Powodzenie krzyżowań międzygatunkowych zależy często od tego, który z wybranych do krzyżowań gatunków będzie formą mateczną [RZEPKA-PLEVNEŠ 1990]. W niniejszych badaniach, jak to już wspomniano, ustaleń takich nie można było dokonać ze względu na zróżnicowany termin kwitnienia, uniemożliwiający zbyt długie przetrzymywanie zdolności kwiatów roślin matecznych do przyjęcia pyłku.

Kłopoty z mieszańcami międzygatunkowymi nie kończą się na zapyleniu i otrzymaniu nasion z wyraźnie zaznaczonymi zarodkami. Zarodki mieszańcowe często charakteryzują letalność i słabość, wynikające ze współdziałania genotypów mieszańcowych i cytoplazmy jednego z gatunków rodzicielskich [RZEPKA-PLEVNEŠ 1990; PRZYBECKI 1993].

W niniejszej pracy obserwowano zamieranie zalążni, przy czym przyczyn tego zjawiska nie udało się ustalić. Być może było ono wynikiem wystąpienia opisywanych przez autorów barier pozapłodnieniowych. Po jednym nasionku mieszańcowym otrzymano z krzyżowań między odmianami 'Montreux' x 'Rosato', 'Montreux' x 'Miami' i 'Berlin' x 'Connecticut King'. Z krzyżowań między *L. regale* x 'Apeldoorn' i 'Miss Alice' x 'La Reve' otrzymano po 3 nasiona mieszańcowe,

między *L. regale* x 'Miss Alice' – 2 nasiona, a ze skrzyżowania odmian 'Miss Alice' x 'Impressive' – 5 nasion (tab. 2). W sumie otrzymano 16 nasion. Wszystkie miały wyraźnie wykształcone zarodki.

Tabela 2; Table 2

Wyniki krzyżowań między trzema grupami lili: Mieszzańce Azjatyckie (A), Orientalne (O), Longiflorum (L), Trąbkowe (T) przy zastosowaniu dwóch metod zapylania (naturalne zapylanie¹, skracanie szyjki słupka²) w tunelu foliowym i gruncie odkrytym w latach 1999–2001

Results of crossbreeding between three groups of lilies: Asiatic hybrids (A), Oriental hybrids (O), Longiflorum hybrids (L), Trumpet hybrids (T), using two methods of pollination (open pollination¹, style-shortening²) in a plastic tunnel and in an open field, in the period of 1999–2001

Forma mateczna Maternal form	Forma ojcowska Paternal form	Oczekiwany mieszańiec Expected hybrid	Liczba uzyskanych nasion Number of obtained seeds	Liczba nasion z zarodkiem Number of seeds with embryo	Procent uzyskanych nasion; Percentage of obtained seeds (%)	Liczba otrzymanych siewek Number of obtained seedlings
1999						
Montreux	Rosato	AO	325 ²	1	0,3	0
	Miami		250 ²	1	0,4	0
Berlin	Connecticut King	OA	318 ¹	1	0,3	1
2000						
Connecticut King	Pink Perfection	AT	245 ¹	0	0	0
<i>L. regale</i>	Apeldoorn	TA	252 ¹	3	1,2	0
	<i>L. longiflorum</i> Snow Queen	TL	432 ²	0	0	0
321 ²			0	0	0	
Pink Perfection	<i>L. longiflorum</i>	TA	205 ²	0	0	0
Miss Alice	Impressive	OA	354 ¹	5	1,4	0
	Sorbonne		101 ¹	0	0	0
2001						
Miss Alice	La Revc	AO	225 ¹	3	1,3	0
<i>L. regale</i>	Miss Alice	TA	232 ²	2	0,9	0

Jedną z możliwości otrzymania większej liczby form mieszańcowych jest regeneracja zarodków w kulturach *in vitro* [PRZYBECKI 1993; ZENKTELER 2001]. Próby kiełkowania nasion mieszańcowych lili w kulturach *in vitro* nie powiodły się. Inicjację kiełkowania obserwowano tylko w jednym przypadku u mieszańca 'Berlin' x 'Connecticut King' (tab. 2).

Dotychczasowe badania nad możliwością wspomaganie krzyżowań oddalonych kulturami *in vitro* nie ograniczają się jedynie do kiełkowania nasion mieszańcowych otrzymanych metodami konwencjonalnymi [ZENKTELER 2001]. Można

je wykorzystać do przeprowadzenia zapyleń, wspomaganie rozwoju niedojrzałego zarodka oraz łamiąc wszelkiego rodzaju bariery między wybranymi do krzyżowań gatunków tworzyć poprzez fuzję protoplastów tzw. mieszańce somatyczne. Być może jest to jedyna droga dalszego postępu w pracach nad mieszańcami międzygatunkowymi lili.

Wnioski

1. Uzyskanie nasion mieszańcowych na drodze krzyżowań międzygrupowych w obrębie rodzaju *Lilium* jest możliwe. Ich liczba zależy od zastosowanej metody zapylenia. Większą liczbę udanych przepyleń otrzymano przycinając przed zapyleniem szyjkę słupka roślin matecznych.
2. Otrzymane nasiona charakteryzowały się słabą żywotnością i brakiem zdolności do kiełkowania, nie stwierdzono wpływu warunków *in vitro* na regenerację badanych roślin mieszańcowych lili.

Literatura

- ASANO Y. 1980. *Studies on crosses between distantly related species of Lilies. IV. The culture of immature hybrid embryos 0,3–0,4 mm long.* J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49: 114–118.
- ASANO Y., MYODO H. 1977. *Studies on crosses between distantly related species of lilies. II. The culture of immature hybrid embryos.* J. Japan. Soc. Hort. Sci. 46: 267–273.
- BUZON D., MROCZKO R., SZLACHETKA W.I. 2001. *Ocena polskich odmian lili z grupy mieszańców azjatyckich hodowli mgr. J. Wiśniewskiego.* Folia Hort. An. 13/1A: 357–367.
- FERNÁNDEZ A.M., NAKAZAKI T., TANISAKA T. 1996. *Development of diploid and triploid interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. concolor* by ovary slice culture.* Plant Breed. 115: 167–171.
- MC RAE E. 1998. *Lilies – a guide for Growers and Collectors.* Timber Press, Portland, USA: 67–70.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.* Physiol. Plant. 15: 473–497.
- MYNETT K. 1993. *Lilie.* PWRiL, Warszawa: 11–15.
- MYNETT K. 2000. *Nowe odmiany w rodzaju *Lilium*.* Materiały XIII Ogólnopolskiego Zjazdu Kwiaciarzy, Skierniewice, 19–20 X 2000: 3–6.
- MYODO H. 1975. *Successful setting and culture of hybrid embryos between remote species of the genus *Lilium*.* The Lily Yearbook NALS: 13–17.
- ORLIKOWSKA T., WIEJACHA K., MARASEK A. 2001. *Identyfikacja roślinnych mieszańców oddalonych – przegląd metod.* Biul. Inst. Hod. i Aklim. Rośl. 220: 3–21.
- PRZYBECKI Z. 1993. *Regeneracja *in vitro* i zmienność somaklonalna *C. wrightii* i mieszańców *C. wrightii* x *C. toluhana*.* Rozpr. hab. Wyd. SGGW, W-wa: 11–15.

- ROGALSKA S. 1999. Zastosowanie metod cytogenetycznych w badaniach genetycznych i w hodowli roślin, w: Podstawy cytogenetyki roślin. Praca zbiorowa pod red. M.J. Olszewskiej. PWN, Warszawa: 177–210.
- ROH M.S., GRIESBACH R.L., GROSS K.C., LINE M. 1996. Identification and evaluation of the interspecific hybrid between *Lilium longiflorum* and *L. callosum*. Acta Hort. 414: 111–124.
- RZEPKA-PLEVNEŠ D. 1990. Studia nad mieszańcami międzygatunkowymi *Secale sp.* pod kątem przydatności niektórych ich cech w hodowli żyta *S. cereale L.*, Rozpr. hab., AR w Szczecinie: 1–30.
- VAN TUYL J.M., CHI H.S., VAN KRONENBURG B.C.M., MEIJER B. 1997. Interspecific lily hybrids: A promise for the future. Acta Hort. 430: 539–554.
- VAN TUYL J.M., KEIJZER C.J., WILMS H. J., KWAKKENBOS A.A.M. 1988. Interspecific hybridization between *Lilium longiflorum* and White Asiatic hybrid 'Mont Blanc'. The Lily Yearbook NALS 41: 103–111.
- VAN TUYL J.M., VAN DE SANDE K., VAN DIËN R., STRAATHOF D., VAN HOLSTEIJN H.M.C. 1990. Overcoming interspecific crossing barriers in *Lilium* by ovary and embryo culture. Acta Hort. 226: 317–322.
- ZENKTELER M. 1996. Uzyskanie mieszańców z krzyżowań oddalonych przy pomocy kultur zarodków *in vitro*. Materiały z konferencji „Hodowla roślin ozdobnych”. Skierniewice, 17 IV 1996: 39–44.
- ZENKTELER M. 2001. Kultura zalążków, zalążni i zarodków, w: *Biotechnologia*. Praca zbiorowa pod red. S. Malepszego. PWN, Warszawa: 70–85.

Słowa kluczowe: lilie, krzyżowanie, bariery, mieszańce międzygrupowe, nasiona, żywotność

Streszczenie

Obiektem badań były mieszańce międzygrupowe lilii Mieszańce Orientalne, Mieszańce Longiflorum, Mieszańce Trąbkowe i Mieszańce Azjatyckie. Określono skuteczność krzyżowania różnych gatunków lilii przy zastosowaniu dwóch różnych sposobów zapyleń oraz wspomaganie kiełkowania otrzymanych zarodków w kulturach *in vitro*. Do udanych krzyżowań zaliczono 'Montreux' x 'Rosato', 'Montreux' x 'Miami', 'Berlin' x 'Connecticut King'. *L. regale* x 'Apeldoorn' i 'Miss Alice' x 'La Reve' Pięć pierwszych mieszańców zawiązało po jednym nasionku. Z krzyżowań między *L. regale* x 'Apeldoorn' i 'Miss Alice' x 'La Reve' *L. regale* x 'Apeldoorn' i 'Miss Alice' x 'La Reve' otrzymano po 3 nasiona, między *L. regale* x 'Miss Alice'– 2 nasiona, a ze skrzyżowania odmian *L. regale* x 'Apeldoorn' i 'Miss Alice' x 'La Reve'– 5 nasion. W sumie z 452 krzyżowań udało się otrzymać 16 nasion z wykształconymi zarodkami. Wszystkie odznaczały się słabą żywotnością. W kulturach *in vitro* zainicjowano do wzrostu tylko jedno z zawiązanych nasion 'Berlin' x 'Connecticut King'.

CROSSING DIFFERENT SPECIES AND CULTIVARS
OF LILY USING TECHNIQUES FOR OVERCOMING
ANTI-FERTILIZATION BARRIERS

PART II

INTERGROUP CROSSES AO, OA, TA, AT, TO, TL

*Beata Płoszaj*¹, *Danuta Rzepka-Plevneš*²

¹ Chair of Horticulture, Warmia and Mazury University, Olsztyn

² Department of Horticulture breeding, Agricultural University, Szczecin

Key words: lily, crossing, barriers, inter-group crosses, seeds, vitality

Summary

The studies were conducted on the inter-group lily crosses – Oriental hybrids (10), Longiflorum hybrids (3), Trumpet hybrids (2) and Asiatic hybrids (9). The work aimed at determining the efficiency of crossing various lily species using two different methods of pollination and assisting the germination of the embryo in the *in vitro* cultures. Among the successful crossings were: 'Montreux' x 'Rosato', 'Montreux' x 'Miami', 'Berlin' x 'Connecticut King', *L. regale* x 'Apeldoorn' and 'Miss Alice' x 'La Reve'. The first five crossbreds produced one seed each. Crossing between *L. regale* and 'Apeldoorn', 'Miss Alice' and 'La Reve' resulted in three seeds each, *L. regale* and 'Miss Alice' – 2 seeds, *L. regale* and 'Apeldoorn', 'Miss Alice' x 'La Reve' – 5 seeds each. In total out of 452 crossings 16 seeds were obtained with a well formed embryo. All were characterized with a poor vitality. In the *in vitro* cultures only one seed was initiated for growth – 'Berlin' x 'Connecticut King'.

Dr inż. Beata **Płoszaj**
Katedra Ogrodnictwa
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
ul. Prawocheńskiego 21
10-719 OLSZTYN
e-mail: beataploszaj@uwm.edu.pl