

## **LIETUVIŠKŲ MEILENIO HIBRIDŲ (*HIPPEASTRUM X HYBRIDUM*) SĖJINUKŲ MORFOLOGINIS IR GENTINIS ĮVERTINIMAS**

**Judita Varkulevičienė<sup>1</sup>, Judita Žukauskienė<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas, Žiliberio 2, LT-46324 Kaunas, j.varkuleviciene@bs.vdu.lt

<sup>2</sup>Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslų fakultetas, Vileikos 8, LT-44404 Kaunas, j.zukauskiene@gmf.vdu.lt

Recenzentas: dr. Antanina Stankevičienė, Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodas

### **Anotacija**

Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode (VDU KBS) yra sukaupta dekoratyvių, vasarą žydinčių gėlių meilenio (*Hippeastrum*) sėjinukų kolekcija. Šios kolekcijos hibridai buvo sukurti naudojant tarpveislinį apdulkinimo būdą, kryžminant veisles žiedadulkių mišiniu. Morfologinei ir genetinei analizei atlikti buvo pasirinkta 20 skirtingų *Hippeastrum x hybridum* varietetų, 4 olandiški ir 16 lietuviški. Morfologiniai požymiai buvo aprašomi naudojant dekoratyvinių augalų metodiką. Gauti duomenys patvirtino, jog tirtų sėjinukų daigai ir žiedai yra kokybiški ir yra atsparesni grybinėms ligoms. Taip pat atlikus morfologinę analizę buvo aptiktas platus žiedo spalvos, formos ir dydžio svyravimas sėjinukuose. Atlikus APPD analizę su 7 žymenimis buvo pagausinti 99 skirtingi fragmentai iš kurių 70 (apie 71%) buvo polimorfiniai. Fragmentų dydis svyravo nuo 250 iki 2000 bp. Unikalių fragmentų skaičius tirtuose sėjinukuose svyravo nuo 1 iki 6. Olandiški ir lietuviški sėjinukai tarpusavyje genetiškai skyrėsi 5%. Didesniu polimorfiškumas pasižymėjo lietuviški sėjinukai nei olandiški.

Meilenio hibridų (*Hippeastrum x hybridum*) vertinimas genetiniu ir morfologiniu aspektu Lietuvoje atliktas pirmą kartą.

Reikšminiai žodžiai: *Hippeastrum* spp, veislės, sėjinukai, varietetai, APPD analizė.

### **Įvadas**

Meilenis (*Hippeastrum*), amarilinių (*Amaryllidaceae*) šeimos daugiametis svogūninis augalas. Gentyje yra 75 rūšys, kilusios iš Pietų ir Centrinės Amerikos atogrąžų sričių, Bolivija, Peru. Rūšiniai augalai auginami tik kolekcijose. *Hippeastrum* veislės ir hibridai skirstomi į 9 grupes. Dažniausia auginami 5 grupės veislės, kurios gautos iš *Hippeastrum leopoldii* Domb. ir *Hippeastrum pardinum* Lem. ir vadinami Leopoldo–hibridai. Šios grupės augalams būdingas stambūs, dekoratyvios varpiškos formos, įvairių spalvų žiedai (Phuong et al., 2014). Patalpose ir šiltnamiuose auginamas hibridinis meilenis (*Hippeastrum x hortorum*), turintis daugybę veislių baltais, rausvais, raudonais žiedais, yra pilnavidurių. Dideli svogūnai išaugina po 1–3 žiedynkočius su 4–6 ir daugiau žiedų. Dažniausiai žydi sausio–balandžio mėnesiais, bet reguliuojant žydėjimo laiką žiedų galima pražydyti bet kuriuo metu.

Lietuvoje dažniausia auginamos užsienyje sukurtos veislės. Duomenų apie Lietuvoje auginamus šiuos augalus negausu. Buvo bandymų išvesti naujas veisles, bet apie tai neskelbiama informacija. Su *Hippeastrum* selekcija dirbo selekcininkas-mėgėjas J. Liutkevičius. Jo sukurtų keleto įdomių sėjinukų likimas nežinomas. VDU Kauno botanikos sode *Hippeastrum x hybridum* sėjinukai buvo užauginti atliekant tarpveislinį apdulkinimą, naudojant užsienietiškas veisles. Sėjinukai pasižymi gera žiedų ir žiedynų kokybe yra atsparesni grybinėms ligoms.

Genetiniu aspektu vis dar nėra aiškios informacijos apie faktorius, kurie nulemtų evoliuciją genties lygyje. Sodininkystės srityje dirbantiems veisėjams labai svarbus yra varietetų identifikavimas ir jų tarpusavio ryšys. Hibridams identifikuoti yra daugybė klasikinių metodų. Lyginant klasikinius metodus su molekuliniais žymenimis, jie suteikia daugiau galimybių identifikuojant naujas veisles. Atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) žymenys įprastai

naudojami rutininiuose veislių vertinimo ir identifikavimo darbuose, bei vertinant hibridinių sėklų grynumą. (Paran et al., 1998; Ballester, Vicente 1998; Won et al., 1998; Zhou et al., 1999).

APPD taip pat buvo naudojami analizuojant daugelį kitų žydinčių svogūninių gėlių. 1996 m. K. Hamada ir M. Hagimor tyrimo metu panaudojo 60 APPD žymenų vertinant 12 lelijų genetinę įvairovę. 2007 m. D. Chakrabarty ir kiti, naudodami RAPD žymenis, tyrė ryšius tarp *Hippeastrum* varietetų. Pastaruoju metu daugelis autorių teigia jog derinant APPD analizę su morfologiniais stebėjimais gali būti labai naudinga tiriant genetinę įvairovę (Perleb et al., 2000; Pham et al., 2006; Chakrabarty et al., 2007).

Šio darbo tikslas – įvertinti lietuviškų *Hippeastrum* sėjinukų genetinę įvairovę ir palyginti su fenotipo kintamumu.

## Metodika

Tyrimų objektu buvo pasirinkta VDU Kauno botanikos sode atrinkti *Hippeastrum x hybridum* selekciniai numeriai ir 4 olandiškos *Hippeastrum x hybridum* veislės: 'Apple Blossom', 'Picote', 'Fantastica', 'Fairylanď', kurių labai skyrėsi žiedų spalva (1 lentelė).

1 lentelė. *Hippeastrum x hybridum* olandiškų veislių morfologinė charakteristika.  
**Table 1.** Morphological characterization of Dutch cultivars of *Hippeastrum x hybridum*.

Veislė <i>Cultivar</i>	Žiedo forma <i>Flower form</i>	Žiedo skersmuo <i>Flower diameter, cm</i>	Vainiklapio spalva <i>Petal color</i>	Žiočių spalva <i>Throat color</i>	Kuokelių spalva <i>Stamen color</i>	Žiedynkočio ilgis <i>Stalk length, cm</i>	Žiedų kiekis žiedyne <i>Flower number of truss, vnt.</i>
'Apple Blossom'	Varpiška	20	Rožinė į centrą šviesėjanti	Gelsva	Balta	50–55	4–6
'Fantastica'	Varpiška	18	Lašišinė su tamsesniais dryžiais	Žalsva	Balta	60–65	3–4
'Fairylanď'	Varpiška	18	Raudona	Rožiška ruda	Ryškiai raudona	50–60	4–6
'Picote'	Varpiška	20	Balta su rožiniu kraštu	Žalsva	Balta	60–65	3–4

*Hippeastrum x hybridum* sėjinukai buvo užauginti atliekant tarpveislinį apdulkinimą, naudojant olandiškas veisles. Subrendusios sėklos buvo sudaigintos pagal dekoratyvinių augalų sėklų daiginimo metodiką (Vaidelys, 2005). 500 sėjinukų buvo auginami vazonuose, kimininės durpės (pH 5,5–6,5) bei kompostinės žemės substrate. Vasaros metu augalai augo lauke, meteorologinės sąlygos tyrimų metais augalams augti buvo tipiškos, vidutiniškai palankios. Įvertinus 2006–2013 m. vykdytų tyrimų rezultatus, tolimesniems tyrimams buvo atrinkta 16 sėjinukų, kurie sužymėti pagal žiedo spalvas: raudona (R), tamsiai raudona (TR), šviesiai raudona (ŠvR), ryškiai raudona (RR), labai ryškiai raudona (LRR) ir sėjinukas (F). Augalų morfologinės savybės pateiktos 2 lentelėje. Augalų morfologiniai požymiai aprašyti pagal dekoratyvinių augalų vertinimo metodiką (Vaidelys, 2005). Vertinta augalų žiedo kiekis žiedyne (vnt.), forma ir dydis (cm), vainiklapių spalva, žiočių spalva, žiedynkočio ilgis (cm). Buvo įvertinti šie bendrieji ir specifiniai žoliniai dekoratyvinių augalų vertės kriterijai 5 balų sistema.

DNR išskyrimas iš sėjinukų. DNR buvo skiriama iš 4 veislių ir 16 sėjinukų (1, 2 lentelė). Pirminis ląstelių ardyimas buvo atliekamas naudojant skystą azotą. Tolimesnis DNR skyrimas buvo atliekamas naudojant „Zymo Research“ (JAV) išskyrimo rinkinį laikantis gamintojo nurodymų.

DNR analizė APPD metodu. Šešiolikai sėjinukų tirti buvo pasirinkti 7 APPD pradmenys (P4, P8, P9, P11, P14, 916, OPA-4 (Metabion, Vokietija)). Pradmenų rinkinys buvo sudarytas remiantis D. Chakrabarty ir kt., (2007) ir Phuong ir kt. (2014) tyrimais. PGR reakcija vykdyta 25 µl bendro tūrio. PGR reakcijos mišinyje buvo: 12.5 µl 2x PCR Master Mix (0.05 U/µl Tag DNA polimerazė; 4

mm MgCl<sub>2</sub>; 0.4mM kiekvieno dNTP) (Thermo scientific, Lietuva), 2 µl pradmenis (koncentracija 10 pmol/µl) (Metabionas, Vokietija), 6.5 µl du kart distiliuoto vandens ir 4 µl (25 ng/ µl) DNR. DNR pagausinimas buvo amplifikatoriuje (Master cycler®, Eppendorf, Vokietija) pagal šias sąlygas: pirminė denatūracija 4 min 94 °C, 45 ciklai DNR denatūracija 15 s 94 °C, Matricinės DNR pradmenų hibridizacija 45 s 36°C, DNR fragment sintezė 30 s 72 °C paskutinė DNR sintezės fazė 4 min 72 °C. Amplifikuoti fragmentai buvo frakcionuojami elektroforezės būdu 1,5% agarozės gelyje naudojant 0,5 X TBE buferį. Fragmentų dydžiui nustatyti buvo naudojamas molekulinis žymuo Gene Rulers™ DNA Ladder Plus (Thermo scientific, Lithuania). Fragmentai buvo vizualizuojami naudojant etidžio bromide po UV šviesa. Geliai buvo fotografuojami ir dokumentuojami naudojant Hero lab transiliuminator ir Win32 sistemas (Hero lab, Vokietija).

Statistinė genetinių duomenų analizė buvo atlikta MS Exel, Genalex 6.4 (Peakal, Smouse, 2006) programomis.

### Rezultatai

Sėjinukų stebėjimai. Lyginant augalų veisles pagal morfologinius ir dekoratyvinius požymius yra svarbiausi veislės vertinimo kriterijai. Todėl atrinkti sėjinukai buvo lyginami su olandiškomis veislėmis. Nustatyta, kad selekciniai numeriai visais tyrimo metais buvo labai dekoratyvūs ir išlaikė stabilius veislės požymius.

Selekciniai numeriai FR/3, FTR/6, FŠvR/7, FRR/8, FRŠv/10, FRR/12 ir FRR/13 išsiskyrė gražiais žiedais, taip pat buvo pastebėtos didelės variacijos žiedų dydžio visuose augaluose, 2 sėjinukai buvo mažais žiedais (FRR/11 ir FR/52), 2 buvo siaurais vainiklapiais (FR/5, FRR/11) ir 4 plačiais vainiklapiais (FR/3, FŠvR/7, FRR/12 ir FRR/13). Sėjinukų žiedų spalva varijavo nuo raudonų žiedų (FR/3, FR/5, FR/31), ryškiai raudonų (FRR/8, FRR/11, FRR/12, FRR/13, FRR/14, FRR/35), šviesiai raudonų (FŠvR/4, FŠvR/7) iki labai ryškiai raudonų (FLRR/9) ir tamsiai raudonų (FTR/6 ir FTR/15). Pastebėti skirtumai žiočių spalvos FRR/14 – tamsiai raudona ir FŠvR/7 - baltomis juostomis, FLRR/9 - baltais dryžiais ar FRŠv/10 – baltomis dėmėmis. Žiedynkočiai žemesni nei olandiškų veislių (30–55 cm).

2 lentelė. Kolekcijos *Hippeastrum x hybridum* augalų charakteristika Kauno botanikos sodo oranžerijoje.

**Table 2.** *Hippeastrum x hybridum* plants collection characterization in greenhouse of Kaunas Botanical Garden

Selekciniai numeriai <i>Breeding numbers</i>	Žiedo forma <i>Flower form</i>	Žiedo skersmuo <i>Flower diameter</i> cm	Vainiklapių spalva <i>Petal color</i>	Žiočių spalva <i>Throat color</i>	Žiedynkočio ilgis <i>Stalk length</i> , cm	Žiedų kiekis, vnt. <i>Flower number</i>	Balai <i>Grades</i>
FR/3	Varpiška pilnavidurė	Dideli	Raudona, vainiklapiai platūs	Raudona	45–50	4-5	5
FŠvR/4	Varpiška	Vidutinis	Šviesiai raudona	Raudona	45–50	3-4	4
FR/5	Varpiška	Vidutinis	Raudona, vainiklapiai siauri	Raudona	50–55	3-4	4
FTR/6	Varpiška	Dideli	Tamsiai raudona	Raudonai ruda	50–55	4-5	4
FŠvR/7	Varpiška	Dideli	Šviesiai raudona, vainiklapiai platūs	Baltomis juostomis	45–50	4-5	5
FRR/8	Varpiška	Dideli	Ryškiai raudona su baltu kraštu	Ryškiai raudona	45–50	4-5	5
FLRR/9	Varpiška	Vidutinis	Labai ryškiai raudona	Baltas dryžiais	50–55	3-4	4
FRŠv/10	Varpiška	Vidutinis	Raudonas kraštas, šviesėjantis	Baltomis dėmėmis	50–55	3-4	4
FRR/11	Varpiška	Maži	Ryškiai raudona,	Ryškiai	30–40	2-3	3

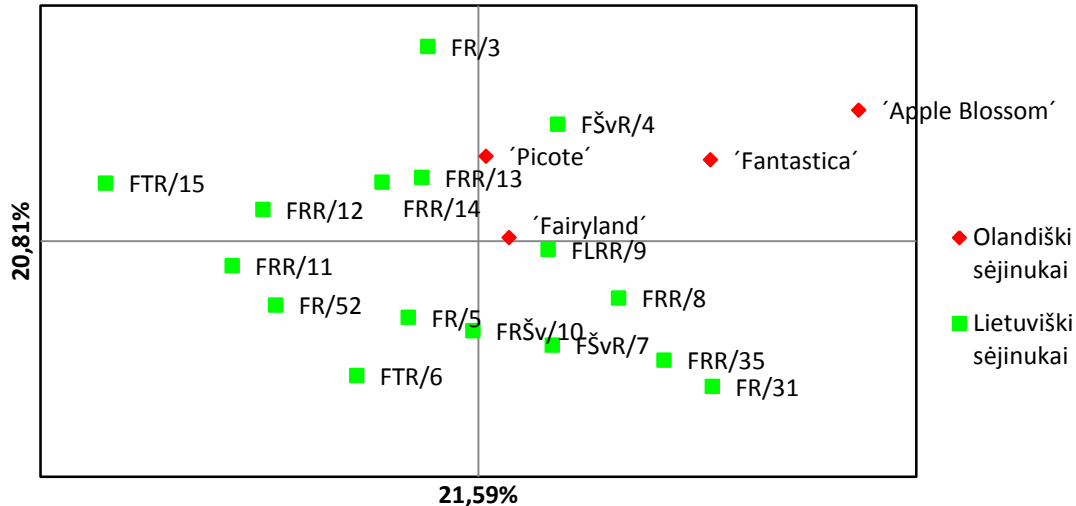
			vainiklapiai siauri	raudona			
FRR/12	Varpiška	Dideli	Ryškiai raudona, vainiklapiai platūs	Ryškiai raudona	45–50	4-5	5
FRR/13	Varpiška	Dideli	Ryškiai raudona, vainiklapiai platūs	Balta	45–50	4-5	5
FRR/14	Varpiška	Vidutinis	Ryškiai raudona	Tamsiai raudona	50–55	3-4	4
FTR/15	Varpiška	Vidutinis	Tamsiai raudona	Raudona	50–55	3-4	4
FR/31	Varpiška	Vidutinis	Raudona	Raudona	40–45	3-4	4
FRR/35	Varpiška	Vidutinis	Ryškiai raudona	Tamsiai raudonas	50–55	3-4	4
FR/52	Varpiška	Maži	Raudona šviesėjanti	Raudona	30–40	2–3	3

Mūsų tyrimų duomenimis geriausiomis savybėmis, vienodumu, stabilumu ir išskirtinumu pasižymėjo 5 sėjinukai (FR/3, FŠvR/7, FRR/8, FRR/12, FRR/13), kurie buvo įvertinti 5 balais.

**Lentelė 3.** AAPD fragmentų dydis, skaičius ir unikalių fragmentų skaičius skirtinguose meileno sėjinukuose  
*Table 3. RAPD fragments size, number of unique bands, total number of fragments detected in different Hippeastrum cultivars.*

Pradmuo <i>Germ</i>	Fragmento dydis <i>Fragment size</i>	Bendras fragmentų skaičius <i>Total number of fragments</i>	Bendras unikalių fragmentų skaičius <i>The total number of unique fragments</i>
P8	350-1800	21	3
P4	400-1250	19	3
P9	475-1050	8	1
P11	250-1500	11	2
P14	430-2000	12	3
P16	310-1800	16	4
OPA-4	270-1370	11	5

Atliekant genetinę 4 veislių ir 16 sėjinukų analizę buvo naudojami 7 APPD žymenys. Naudojant juos buvo aptikta 99 fragmentai, kurių dydis svyravo nuo 250 iki 2000 bp. (3 lentelė). Daugiausiai fragmentų buvo aptikta su P8 žymeniu, o unikalių fragmentų buvo aptikta su OPA-5 pradmeniu (3 lentelė). Olandiškuose veislėse buvo aptikti šeši, o lietuviškuose 15 unikalių fragmentų. Daugiausiai unikalių fragmentų buvo aptikta lietuviškame sėjinuke FR/3 (6 unikalūs fragmentai). Molekulinė įvairovė tarp tirtų *Hippeastrum* grupių buvo 5%. Didesniu polimorfinių fragmentų skaičiumi taip pat pasižymėjo lietuviški sėjinukai (89,90%) nei olandiški (51,52%). Lyginant polimorfiškumą tiriant *Hippeastrum* jis buvo skirtingas. Natūralių augaviečių *Hippeastrum* varietetuose (Phuong ir kt 2014) polimorfiškumas buvo 72%, tuo tarpu kolekcijos varietetuose polimorfizmas buvo 81% (Charbarty ir k t., 2007). Šio tyrimo metu analizuotų hibridų polimorfiškumas buvo 71%. Natūralių agaviečių polimorfiškumas gali būti mažesnis už kolekcinis, nes kolekcijose siekiama palaikyti didesnę įvairovę. Aptiktas mažesnis polimorfiškumas analizuojamuose *Hippeastrum* hibriduose gali būti dėl tirtų hibridų genetinės struktūros.



1 pav. Principinių koordinatinių analizės rezultatai tirtiems lietuviškiems ir olandiškiems *Hippeastrum* sėjinukams.  
Fig. 1. PCA analysis of Dutch and Lithuanian varieties of *Hippeastrum*

### Apibendrinimas

Atlikus genetinę analizę APPD metodu pagal principinių koordinatinių duomenis matome, jog labiausiai atsiskyrė 2 olandiškos veislės 'Fantastic' ir 'Apple Blossom', bei lietuviški sėjinukai FR/3 ir FTR/15. Olandiška veislė 'Fairyland' PCA plokštumoje yra labai arti su lietuvišku sėjinuku FLRR/9 (1 pav.). Genetiškai labiausiai besiskiriantis sėjinukas FR/3 (unikalių fragmentų skaičiumi, atsiskiria ir PCA plotmėje) išsiskiria ir savo morfologinėmis charakteristikomis (žiedo forma, dydžiu ir vainiklapiais).

### Literatūra

1. Ballester J, Vicente C. 1998. Determination of F1 hybrid seed purity using PCR-based markers. *Euphytica* 103. 223–226
2. Chakrabarty D., Gupta V. N., Datta S. K. 2007. Varietal identification and assessment of genetic relationships in *Hippeastrum* using RAPD markers. *Plant Biotechnol Rep* (2007) 1. P. 211–217
3. Hamada K., Hagimori M. 1996. RAPD-based method for cultivar identification of calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Sci. Hortic.*, **65**(2–3). P. 215–218.
4. Paran I., Aftergoot E., Shiftriss C. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99. P.167–173.
5. Pham T. M. P., Isshiki S., Tashiro Y. 2006 Genetic variation of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group) in Vietnam. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **75**(3). P. 236–242.
6. Phuonp P. T. M., S. Isshiki S. and Miyajia I. 2014. Genetic Variation of *Hippeastrum* Accessions in Vietnam. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 59 (2). P. 235–241.
7. Peakall R., Smouse P. E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28. P. 2537–2539.
8. Perleb P. F., Terzi V., Pecchioni N., Berio T., Giovannini A., Allavena A. 2000 Genetic diversity in cultivated *Osteospermum* as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Breeding*, 119. P. 351–355.
9. Vaidelys J. 2005. Dekoratyviųjų žolinių augalų fenologinių stebėjimų, biometrinių matavimų ir sortimento sudarymo metodika: metodinė priemonė. Kaunas.
10. Won C. Y., Young P. D., Ho S. K. 1998. Pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivar identification and seed purity test by random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and phosphoglucosyltransferase (PGM) isozyme. *RDA J Horticult Sci* 40. P. 15–23
11. Zhou Q. C., Ma Y. Q., Li X. F., Ai X. 1999. Purity determination of pepper hybrid by randomly amplified polymorphic technique. *J Hum Agric Univ* 25. P. 95–98.

## MORPHOLOGIC AND GENETIC EVALUATION OF LITHUANIAN *HIPPEASTRUM X HYBRIDUM*

Judita Varkulevičienė, Judita Žukauskienė

Kaunas Botanical Garden of Vytautas Magnus university, Ž. E. Žiliberio 2, LT-46324 Kaunas,  
e-mail: j.varkuleviciene@bs.vdu.lt

Vytautas Magnus university, Faculty of nature science, Vileikos 8, LT- 44404 Kaunas,  
e-mail: j.zukauskiene@gmf.vdu.lt

Peer reviewer dr. Antanina Stankevičienė, Kaunas Botanical Garden of Vytautas Magnus University

### Summary

Kaunas Botanical Garden of Vytautas Magnus University in Lithuania maintains a beautiful summer blooming ornamental plants collection of *Hippeastrum*. Seedlings of *Hippeastrum x hybridum* were grown using intervarietal pollination method crossing foreign cultivars. For morphologic and genetic analyses were used 20 different cultivars (4 dutch and 16 lithuanian) of *Hippeastrum x hybridum*. Plant morphological features are described according to the evaluation methodology of ornamental plants. The morphologic results confirmed that seedlings characterizing by a good quality of flowers and inflorescences and more resistant to fungal diseases. In the RAPD analysis result, 7 primers produced a total of 99 distinct bands, of which 70 were polymorphic (about 71%). The length of band ranged from 250 to 2000 bp. The number of unique fragments ranged from 1 to 6. Lithuanian and dutch cultivars groups genetically differed in 5%. Biggest polymorphism was detected in lithuanian cultivars than in dutch. In the present study for the first time in Lithuania, were evaluated morphologic and genetic characteristics of *Hippeastrum x hybridum*

**Key words:** *Hippeastrum* spp, species, seedling, APPD analysis.