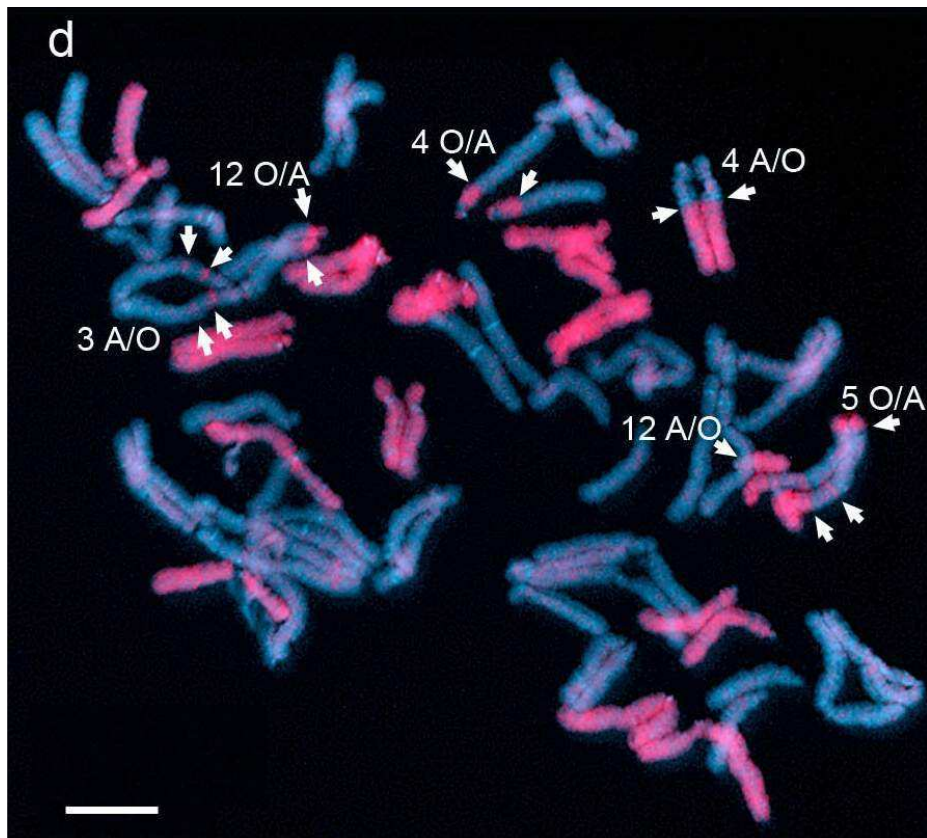




PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

## Eindrapportage PT11184

### Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie



Productschap  Tuinbouw

## **Gegevens project:**

**Projectnummer PT:** 11184

**Projectnummer PRI:** 76000012.00

**Projectleider:** Jaap M. van Tuyl

Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen

Tel: 0317 477329; 06 53362858

Fax: 0317 418094

Email: [Jaap.vantuyl@wur.nl](mailto:Jaap.vantuyl@wur.nl)

Projectperiode 1-1-2003 - 31-12-2005

## **De begeleidingscommissie:**

A. Peterse (voorzitter)

S. Bottema

M. Ceulemans / D. van Kleinwee

E. Hoogendijk / P.C. Schenk

P.J. Kos

K. Laan

N. Meiland / W.J. van Graas

H. Middelburg / Th. van Schie

C. Randag

A. van der Velde

A. Vletter

W. de Wit

## **Projectmedewerkers:**

R. Barba Gonzalez

J. Matijssen

A.A. van Silfhout

J. van Schaik

J.M. van Tuyl

M.S. Ramanna

K.B. Lim

S. Zhou

## **Inhoudsopgave**

Gegevens project .....	2
Inhoudsopgave .....	3
1. Samenvatting .....	4
2. Achtergrondinformatie .....	5
3. Korte beschrijving project .....	7
4. Resultaten .....	10
4.1 Fusarium-resistentie .....	10
4.2 Virus resistentie .....	14
4.3. Botrytis-resistentie .....	15
4.4. OA-vervolgkruisingen .....	17
4.5. GISH en FISH onderzoek .....	19
4.6.Inductie van ongereduceerde gameten .....	27
4.7 Uitgifte materiaal .....	28
4.8. Lijst van publicaties .....	29
5. Conclusies .....	32
6. Vervolg .....	33
7. Referenties .....	34

## 1. Samenvatting

Het onderzoek naar de doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie heeft in de periode 2003-2005 een aantal nieuwe resultaten opgeleverd. Nadat in de hiervoor gaande periode een reeks van hybriden tussen Oriental en Aziaat hybriden, “de moeilijkste leliekruising tot nu toe” geproduceerd waren, was de volgende stap introgressie van de beoogde resistentie eigenschappen in vervolgekruisingen en introductie van de ze hybriden in het commerciële sortiment.

Met mitotisch verdubbelde tetraploide OA's en enkele 2n-gameten producerende OA's konden reeksen van AOA en OOA-hybriden verkregen worden. Uit ziekte-toetsingen bleek dat in dit materiaal in hoge mate resistentie tegen Botrytis-, Fusarium- en virusresistentie aanwezig is.

Met behulp van Genomische en Fluorescentie In situ Hybridisatie (GISH en FISH) kon intergenomische recombinatie aangetoond worden indien gewerkt werd met 2n-gameten producerende OA's. Genotype 951502-1 bleek een hoog recombinatie percentage op te leveren in BC1-populaties (AOA). Vervolg kruisingen met deze AOA's bleek ook mogelijk, waarbij meiotische verkregen AOA's de (recombinante) Oriental chromosomen in sterke mate door te geven aan de nakomelingen in tegenstelling tot mitotische verkregen AOA, waar elke intergenomische recombinatie ontbreekt.

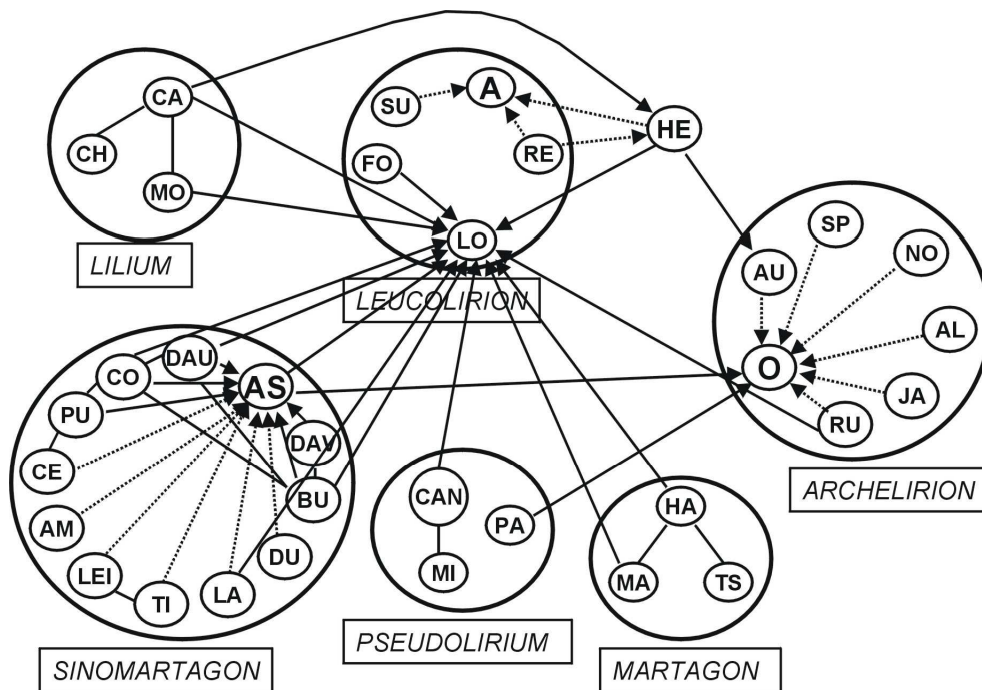
Een belangrijke vinding was de toepassing van lachgas voor de inductie van 2n-gameten. Aangezien het voorkomen van 2n-gameten zeer beperkt is en bepalend is voor het optreden van recombinatie (en hiermee introgressie) verbreedt deze toepassing de genetische basis aanzienlijk.

De vervolgstap in dit onderzoek is de ontwikkeling van moleculaire merkers t.b.v. diverse resistenties in een AOA-populatie met intergenomische recombinatie, waarbij moleculaire en fysische kaarten gecombineerd kunnen worden. Hierbij zal gebruikt gemaakt worden van enerzijds GISH en FISH en anderzijds specifieke merkertechnologieën als NBS-profiling en DArT.

## 2. Achtergrondinformatie

### Soortkruisingen en verwantschappen bij lelie

Het geslacht *Lilium* wordt ingedeeld in 7 secties (De Jong, 1974). Drie secties zijn van direct belang voor de huidige teelt en veredeling van lelies te weten de secties *Sinomartagon*, *Archelirion* en *Leucolirion* (Fig. 1). Uit ongeveer 10 species van de *Sinomartagon* zijn de Aziatische hybriden ontstaan die meer dan 50% van het huidige leliesortiment innemen. De laatste jaren hebben de Oriental hybriden zich spectaculair ontwikkeld. Deze hybriden zijn ontstaan uit enkele soorten in de *Archelirion* sectie. In de *Leucolirion* sectie bevindt zich o.a. de belangrijke soort *Lilium longiflorum*, die zowel in de teelt als in veredelingsprogramma's een belangrijke rol speelt. *L. henryi* bevindt zich tussen de secties *Archelirion* en *Leucolirion* en staat bekend om groeikracht en hoge mate van resistentie tegen de ziekten *Fusarium*, *Botrytis* en virus. Door toepassing van de afgesneden stijl methode en embryocultuur is er een nieuwe hybridegroep, de LA-hybriden, ontstaan (Van Tuyl et al. 1988). Ook zijn kruisingen van de Oriental hybriden en *L. henryi* door toepassing van deze technieken gerealiseerd (Van Creij et al. 1993). Door PRI-onderzoek is nog een reeks hybriden ontstaan, waardoor *L. longiflorum* ook gecombineerd werd met de *Martagon* en de *Lilium* sectie door kruisingen met respectievelijk *L. martagon cattaniae* en *L. candidum*. In onderstaande kruisingsveelhoek (fig.1) zijn de vijf voornoemde secties en de gerealiseerde combinaties weergegeven.



**Fig.1. Een kruisingsveelhoek van het geslacht *Lilium*.**

Grote cirkels geven de secties weer. De kleine cirkels de species, de kleine ellipsen bekende soortkruisingsproducten en de grote ellipsen de hybridegroepen. Vette lijnen zijn op PRI geslaagde interspecifieke combinaties, de pijlen duiden op de richting van de pollenwolk. Afkortingen A= Aurelian hybriden; AS= Aziatische hybriden; O= Oriental hybriden; AU= *L. auratum*; LO= *L. longiflorum*; HE= *L. henryi*; CAN = *L. canadense*; CO= *L. concolor*; DA= *L. dauricum*; CA= *L. candidum*; HA= *L. hansonii*; MA= *L. maratgon*; MO= *L. monadelphum*; PA= *L. pardalinum*; RU= *L. rubellum*.

### Doorbreken van kruisingsbarrières

Bij lelie kunnen globaal drie typen van kruisingsbarrières onderscheiden worden te weten:

1. Kruisingsbarrières die vóór de bevruchting optreden, meestal veroorzaakt door remming van de pollenbuisgroei.
2. Kruisingsbarrières die optreden nadat bevruchting heeft plaatsgevonden. Hierbij is de oorzaak van de barrière embryoabortie en/of endospermdegeneratie.

3. F1-steriliteit: dat wil zeggen dat bij de overigens groeikrachtige hybriden vanwege afwijkingen tijdens de meiose steriliteit optreedt, waardoor verdere veredeling onmogelijk is. Bij lelie komen twee typen van 'pre-fertilization barriers' voor, namelijk incompatibiliteit en incongruentie. Incompatibiliteit speelt bij lelie een rol bij intraspecifieke kruisingen, maar vooral bij zelfbestuivingen. Incongruentie komt bij lelie voor bij interspecifieke kruisingen. Bij *Lilium* worden globaal 2 reactietypen van incongruentie onderscheiden, waarbij de pollenbuisgroeï in verschillende trajecten van de stijl stopt. Het eerste traject van remming ligt net onder de stempel. Deze 'upper-inhibition' (Asano, 1985) vindt 12 tot 24 uur na bestuiving plaats en resulteert in 'short-growth' pollenbuizen (Asano, 1980b; Ascher and Drewlow, 1975; Van Tuyl et al. 1988, 1990). De uiteinden van de pollenbuizen zijn dan sterk gezwollen. Asano (1980b) veronderstelt dat deze remming veroorzaakt wordt door interactie tussen de pollenbuizen en de papilcellen van het stijlkanaal. Het tweede traject van remming ligt iets onder het midden van de stijl. Deze 'lower-inhibition' (Asano, 1985) resulteert in 'half-growth' pollenbuizen (Asano, 1980b, Ascher and Drewlow, 1975). De pollenbuizen stoppen 3 à 4 dagen na bestuiving plotseling met groeien (Asano, 1980b), terwijl de buizen dan nog 24 uur vitaal blijven (Asano, 1982). Deze beide reactietypen blijken omzeild te kunnen worden indien op een afgesneden stijl wordt bestoven. In samenwerking met de Vakgroep Plantencytologie en Morfologie van de Landbouwwuniversiteit te Wageningen is hieraan uitgebreid onderzoek verricht (Van Went et al. 1985; Van Roggen et al. 1986; Van Tuyl et al. 1986, 1990; Janson, 1992). De 'post-fertilization barriers' kunnen op verschillende manieren tot uiting komen. Veelal treedt tijdens de ontwikkeling van het embryo abortie van het hybride embryo op, als gevolg van degeneratie van het endosperm (Dowrick and Brandram, 1970). Ook kunnen abnormaliteiten optreden in de vegetatieve groei van de F1 doordat de genomen niet goed samenwerken of doordat het genoom niet goed met het plasma werkt. Verder kunnen de F1-planten als gevolg van disharmonie van de genomen steriel zijn. Voor alle drie typen van kruisingsbarrières zijn diverse technieken ontwikkeld om de barrières te omzeilen.

### **Voor het doorbreken van de barrières vóór de bevruchting zijn verschillende methoden ontwikkeld:**

1. De afgesneden stijl methode is een bij lelie ontwikkelde methode waarbij pollenbuis remming in de stijl wordt omzeild door de gehele stijl af te snijden en vlak op het vruchtbeginsel te bestuiven (Myodo, 1963).
2. Toepassing van de mentorpollen methode: hierbij wordt bestoven met compatibel pollen dat genetisch dood is, maar wel kiemkrachtig. Het mentorpollen wordt vooraf of tegelijkertijd met soortvreemd pollen op de stempel aangebracht (Van Tuyl et al. 1982).
3. Door stijlen te enten kan zowel met de lengte van het orgaan als met de compatibiliteit tussen pollen en stijl worden gemanipuleerd. Stijlenting kan plaatsvinden voor of na pollenkieming. De geënte stijl methode is op PRI bij lelie al met succes toegepast (Van Tuyl et al. 1991).
4. Optimale beheersing van de condities waarin bestuiving en bevruchting plaatsvindt, wordt verkregen door in vitro bestuiving (Zenkteler, 1980). Het is gebleken dat lelie een geschikt gewas is om deze techniek toe te passen (Van Tuyl et al. 1991).
5. Door bestuiving met ongekiemd of gekiemd pollen op de placenta kunnen barrières in de stijl omzeild worden (placentale bestuiving). Janson (1992) heeft deze methode bij lelie in een samenwerkingsproject tussen WUR en PRI diepgaand onderzocht.

### **Barrières na de bevruchting kunnen worden omzeild door:**

1. Het toepassen van een embryo-, zaadknop- en/of ovarium(plak)cultuur, waardoor vroegtijdige abortie of endosperm degeneratie kan worden voorkomen (North & Wills, 1969, Asano & Myodo, 1977; Asano, 1980a; Van Tuyl et al. 1991).
2. Bij in vitro bestuiving worden onbestoven knoppen in een vroeg stadium al in vitro gebracht. Hiermee kan uiteindelijk het gehele bevruchttingsproces beheerst worden (Zenkteler, 1980). Onderzoek naar in vitro bestuiving is op PRI uitgebreid onderzocht met lelie als modelgewas (Van Tuyl et al. 1991).

### **Herstel van de fertiliteit van steriele F1-hybriden:**



1. Door tetraploïdisatie van steriele F1-hybriden is het mogelijk gebleken de steriliteit geheel of gedeeltelijk om te zetten in fertiliteit (Asano 1982b, Van Tuyl & Stekelenburg, 1988; Van Tuyl et al. 1993).
2. Onderzoek naar het chromosoomgedrag tijdens de meiose geeft informatie over de oorzaken van de F1-fertiliteit. Paring van chromosomen tijdens de meiose geeft belangrijke aanwijzingen over de kruisbaarheid en de mogelijke introgressie van eigenschappen in het nakomelingschap (Asano, 1983, Van Tuyl, 1993).

### ***Fusarium*-resistentie in lelie**

*Fusarium oxysporum* spp *lilii* is (één van) de belangrijkste ziekte die de leliebollenteelt bedreigt. Om dit probleem op te lossen is in het kader van het Urgentieprogramma Bollenziekten- en Veredelingsonderzoek (50% financiering Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij; 50% Productschap voor Siergewassen) in 1989 op PRI een project begonnen om resistentie tegen deze ziekte te onderzoeken. Dit heeft o.a. geresulteerd in een toetsmethode, waarmee verschillen in resistentie op schubbolniveau in een kastoets kunnen worden aangetoond. Ook is aangetoond dat er binnen de Aziatische hybriden een hoge mate van resistentie aanwezig is. Dit geldt echter niet voor de Oriental hybriden en *L. longiflorum*. (Straathof et al. 1993, Löffler, et al. 1993). Ook op tetraploïd niveau blijkt deze resistentie in dezelfde mate tot uiting te komen (Straathof & Van Tuyl, 1993). Introductie van *Fusarium*-resistentie in de Oriental hybriden zou dan ook met behulp van de Aziatische hybriden mogelijk moeten zijn. Wanneer deze aanpak slaagt, is sprake van een doorbraak.

### **3. Korte beschrijving project**

#### **Probleemstelling:**

De grootste kruisingsbarrière, waarin het leliebedrijfsleven al meer dan 10 jaar veel energie en (onderzoeks)geld steekt is die tussen Aziatische en Oriental hybriden. Deze beide hybridegroepen bepalen de leliemarkt en een combinatie van beide groepen zou introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus noodzakelijk om het bestrijdingsmiddelenverbruik als gevolg van de regelgeving in de toekomst te minimaliseren; jaarrondforcering, houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk maken. Hoewel door een grote gezamenlijke inspanning van alle lelieveredelingsbedrijven waarmee uitgebreid OA-onderzoek de afgelopen 10 jaar gefinancierd werd en er weliswaar vele nieuwe technieken inclusief talrijke OA-hybriden zijn ontwikkeld is verder veredelen met dit materiaal nog niet mogelijk. Het leliebedrijfsleven bevindt zich op dit moment op een dood spoor en roept de hulp van Plant Research International om ook oplossingen te vinden voor de laatste hindernissen die de introductie van OA-hybriden in de weg staan.

#### **Doelstelling(en) en afbakening:**

Dit project heeft als doel om de laatste hindernissen in het gebruik van OA-hybriden voor de lelieveredeling weg te nemen. Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. (geïnduceerde) mitotische en meiotische polyploidisatie (chromosoomverdubbeling).
2. Selectie van het meest fertiele materiaal en analyse van nakomelingschappen met streven naar maximale introgressie van de diverse genomen.
3. Onderzoek gericht op een combinatie van ziekteresistenties (Lily Mottle Virus, *Fusarium* en *Botrytis*).

#### **Te verwachten resultaten:**

1. Inzicht en kennis van technieken om soortkruisingsbarrières te doorbreken
  - a. Bestuivingstechnieken: welke techniek (Normaal, cut-style, vitro-bestuiving) en welke condities (hoge temperatuur) zijn gewenst voor welke type kruising?

- b. Embryoescue: welke techniek (zaadknop, ovariumplak, embryozak, embryo) voor welke type kruising (OA, AOA, OOA, OAOA etc.)?
  - c. Polyploidisatie: een reeks van mitotische tetraploide OA's zijn geproduceerd, fertiliteit blijkt sterk te variëren, wat is de oorzaak? Wordt verhoging van fertiliteit in doorgekruiste OAOA-populaties verkregen?
  - d. 2n-gameten: Meiotische polyploidisatie blijkt de methode te zijn om recombinatie tussen O en A te bereiken. Het voorkomen van 2n-gameten blijkt zeer beperkt. Zoeken naar meer genotypen die dit verschijnsel vertonen en het induceren van 2n-gameten (condities, chemisch) is een belangrijk onderdeel van het onderzoek.
  - e. GISH: Genomische in situ hybridisatie is een cytogenetische techniek, waarmee recombinatie tussen genomen aangetoond kan worden. Is een noodzakelijke techniek die bij lelie ontwikkeld is om introgressie aan te tonen. Wordt in het OA-materiaal toegepast.
  - f. Introgressie: Selectie van materiaal met eigenschappen van zowel Oriental als Aziatische achtergrond vereist een goede introgressie van genen, aantoonbaar met GISH-technieken. Een snelle introgressie van alle gewenste resistentie-eigenschappen in een te selecteren groep van genotypen is het doel van het project.
2. Inzicht en kennis van de aanwezigheid en vererving van de resistentie voor belangrijkste ziekten (Lily Mottle virus, Fusarium en Botrytis) in het aanwezige OA-materiaal (m.n. de fertiele lijnen). Selectie van tetraploide fertiele OA's met 3 resistenties is essentieel voor vervolgp programma's bij de bedrijven
- a. Lily Mottle virus: resistentie afkomstig uit Aziatische achtergrond (A) wordt bepaald door 1 gen, in welke lijnen de resistentie aanwezig is nog onbekend.
  - b. Fusarium: resistentie berust op diverse genen, lastige toets; resistentie komt uit de Aziaten (A), in welke lijnen is de hoogste resistentie aanwezig?
  - c. Botrytis: resistentie is prominent aanwezig in Orientals (O), er is veel variatie in OA-hybrididen, onbekend is de variatie op tetraploid niveau in uitsplitsende OA-populaties.
3. Fertiele geniteurs met een combinatie van Aziaat en Oriental-eigenschappen die gewenst zijn voor de bollenteelt (resistentie tegen ziekten), voor de broeierij (goede forceereigenschappen) en voor de consument (houdbaar, milieuvriendelijk geteeld).

Het verkrijgen van fertiele geniteurs is essentieel om tot een doorbraak van de OA-hybriden te komen.

4. Door de ontwikkeling van commerciële OA-hybriden met behulp van de in dit project ontwikkelde materiaal en methoden zal een reductie van het bestrijdingsmiddelengebruik door een combinatie van resistentie-eigenschappen (virus, Fusarium en Botrytis: zie 2) gerealiseerd worden.

### **Bestaande kennis:**

Het betreft hier een project dat al bijna 9 jaar loopt. In voorgaande projectperiode zijn al veelbelovende resultaten behaald t.w. er zijn met behulp van diverse technieken enkele honderden OA-hybriden verkregen. Deze hybriden bleken voor 99% steriel, terwijl in 1% van de gevallen 2n-gameten werden gevormd. Er zijn van een groot aantal OA's m.b.v. oryzaline tetraploiden verkregen, die een variërende fertiliteit bleken te hebben. Er zijn inmiddels terugkruisingen gemaakt zowel richting Aziaten als Orientals. De laatste meest interessante combinatie blijkt echter opnieuw barrières op te leveren. Introgressie en recombinatie van de O en A-genomen is met de genomische in situ hybridisatietechniek goed te bestuderen. Het belang van 2n-gameten is aangetoond in het geval van LA-hybriden. In dit project draait het om verhoging van de kruisbaarheid van de OA-hybriden, het aantonen van introgressie met behulp van GISH, waarbij de ziekteresistenties die afzonderlijk in de Aziaat en de Oriental ouders aanwezig zijn, ge(re)combineerd aangetoond zullen worden in het doorgekruiste OA-materiaal. Ziektetoetsen zijn beschikbaar, GISH is ontwikkeld en een grote range van technieken om de kruisbaarheid te verhogen zijn beschikbaar.

### **Plan van aanpak:**

De volgende deelaspecten zullen in het project onderzocht worden:

1. Onderzoek naar de barrières die gevonden zijn bij terugkruisingen van OA x O en O x OA, d.m.v. o.a. pollenbuiswaarnemingen, waarbij door middel van diverse methoden dit probleem zal worden aangepakt

2. Door genomische in situ-hybridisatie technieken zal gezocht worden naar genotypen die de beste introgressie/recombinatie te zien geven.
3. Het mechanisme van 2n-gameten productie en de consequenties voor het veredelingsresultaat (mate van introgressie) zullen m.b.v. GISH onderzocht worden.
4. Er zullen methodes ontwikkeld worden waarmee bij de diverse OA-hybriden 2n-gameten geïnduceerd worden, waarmee de hoogste introgressie/recombinatie bereikt kan worden.
5. Ziektetoetsing (virus, Fusarium en Botrytis) van divers OA-materiaal zal plaats vinden, waarna met het materiaal met de hoogste resistenties verder gewerkt kan worden. Zo mogelijk wordt gebruik gemaakt van moleculaire merkers die een ander project ontwikkeld zijn/worden, waardoor deze ziekteresistenties deels zonder ziekte-toetsing worden vastgesteld.

## 4. Resultaten

### 4.1 Fusarium-resistentie

Alle fertiele OA-hybriden met hun ouders werden op Fusarium-resistentie getoetst. Tabel 1 geeft de resultaten hiervan weer. Het is duidelijk dat er in de Aziatische hybriden een hoge Fusarium-resistentie aanwezig is, in tegen stelling tot de Oriental hybriden. De OA-hybriden vertonen een variërende resistentie, van zeer resistent (951462-1, 951914-1 en 962120-1) tot zeer vatbaar (952400-1). In de BC-1's (AOA en OAA) blijkt de resistentie binnen populatie ook sterk te variëren, echter grotendeels binnen de marges van de ouders. Zo varieert de resistentie in de OAA-kruising tetra 951301-5 x Gironde van resistent (index 1.1-1.9, waarin de meeste nakomelingen) tot matig resistent (index 2.0-3.6 waarin een gering deel van de nakomelingen) tot zelfs zeer vatbaar (012105-31 met index 5.6). Selectie op resistentie is dus goed mogelijk. Met de zeer resistente tetraploide OA No 012181 werden veel kruisingen verricht. Deze OAOA bleek bovendien virusresistent en mag daarom als een zeer belangrijke geniteur beschouwd worden. Inmiddels zijn hieruit een reeks veelbelovende AOA-hybriden gegenereerd.

**Tabel 1.** Resultaten Fusarium-toets 2003

Type	Ras/nummer	MbNo	Index
AA	Mont Blanc	980072	1.1
AA	Connecticut King	021055	1.1
AA	Gironde	031039	1.4
AA	Chianti	031042	1.5
AA	Pollyanna	031028	1.9
AA	Lanzarote	031110	2.7
AA	Amarone	031040	3.3
AA	Gran Sasso	940260	3.5
OO	Merostar	031104	3.1
OO	Sissi	031108	3.8
OO	Expression	031105	3.9
OO	Bel Paso	031106	4.6
OO	Pesaro	031107	5.1
OO	Sorbonne	031031	5.1
OO	Siberia	031035	5.8
OA	Romerostar x Con King	951462 1	1.0
OA	Bernini x Con King	962120-1	1.3

OA	Romerostar x Lady Rosa	951914 1	1.3
OA	Expression x Aurevoir	952088-2	1.7
OA	Acapulco x Con King	962119-1	1.7
OA	San Marco x Con King	952462-1	2.1
OA	Merostar x Con King	951301 5	2.6
OA	Acapulco x Sancerre	951584 1	3.1
OA	Pesaro x Con King	951502 1	3.3
OA	Sissi x Mirella	962433 1	3.6
OA	Merostar X Gran Sasso	952400-1	4.5
OAOA	Te 951301-5 x te 951584-1	012304-1	1.7
OAOA	te 951301-5	991102	1.1
OAOA	te 951301-5	991101	1.4
OAOA	te 952400-1	991435	3.6
AOA	Gran Sasso x 952400-1	002433-1 A	3.5
AOA	Gran Sasso x 952400-1	002433-1	4.8
AOA	Gran Sasso x 952400-1	002433-2	5.0
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-12	1.9
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-6	2.0
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-5	2.3
AOA	Lanzarote x 952400-1	002526-7	2.5
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-4	2.7
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-1	2.8
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-11	2.9
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-3	2.9
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-11	3.0
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-13	3.1
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-15	3.1
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-2	3.2
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-12	3.4
AOA	Lanzarote x 952400-1	002531-10	3.7
AOA	Lanzarote x 952400-1	002526-1	3.9
AOA	Lanzarote x 952400-1	002526-4	4.5
AOA	Lanzarote x 952400-1	002526-5	4.7
AOA	Lanzarote x 952400-1	002526-1	5.0
AOA	Lanzarote x 952400-1	002526-6	5.9
AOA	Lanzarote x te 951301-5	002687-127	2.4
AOA	Lanzarote x te 951301-5	002687-114	2.6
AOA	Lanzarote x te 951301-5	002687-147	3.3
AOA	Lanzarote x te 951301-5	002687-132	4.1
AOA	Mont Blanc x 951301-5	012022-6	1.5
AOA	Mont Blanc x 951301-5	012022-20	2.6
OAA	952400-1 x Gironde	002538-1	4.1
OAA	952400-1 x Gironde	002538-2	5.0
OAA	Te 951301-5 x Con King	002122-1	1.1
OAA	Te 951301-5 x Con King	002122 3	1.4
OAA	Te 951301-5 x Con King	002122 2	1.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-14	1.1
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-29	1.1

OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-2	1.1
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012062-1	1.2
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-11	1.2
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-15	1.3
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-34	1.3
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-37	1.3
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012062-7	1.3
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-20	1.3
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-36	1.3
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-10	1.4
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-28	1.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-33	1.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-35	1.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-3	1.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-19	1.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-4	1.6
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-8	1.7
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-32	1.7
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-36	1.8
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-9	1.8
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-21	1.9
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-12	2.5
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-35	2.7
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-5	2.7
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-2	3.0
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012062-5	3.1
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012063-10	3.1
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012092-11	3.2
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-32	3.2
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-38	3.6
OAA	Te 951301-5 x Gironde	012105-31	5.6
OAA	Te 951914-1 x Amarone	012065	3.4
OOA	Time Out x 952400-1	992738-2	5.0



**Tabel 2.** Resultaten Fusarium-toets 2005

<b>Type</b>	<b>Ouder(s)</b>	<b>MbNo.</b>	<b>Ziekteindex</b>
OAA	Te 951301-5 x Gironde	<b>012062-5</b>	1.00
OAOA	Te 951301-5 x Te 951462-1	<b>012181-3</b>	1.00
OAA	Te 951301-5 x Gironde	<b>012092-29</b>	1.05
OA	Romero Star x Con. King	<b>951462-1</b>	1.30
AA	Connecticut King	<b>021055</b>	1.45
OA	Casa Blanca X Con King	<b>969023-2</b>	1.45
AA	Mont Blanc	<b>980072</b>	1.50
AOA A	002787-28 x Gironde	<b>022145</b>	2.00
OA	Pesaro x Con King	<b>951502-1</b>	2.35
OAA	Te 951301-5 x Gironde	<b>012105-2</b>	2.50
OAA	Te 951301-5 x Gironde	<b>012105-9</b>	3.00
AOA	Amarone x 951502-1	<b>022605-24</b>	3.25
AOA	Amarone te x Te 951407-9	<b>012248-1 (574)</b>	3.40
AOA	Gironde x Te 952088-2	<b>012246-1 (573)</b>	3.69
AOA	Amarone x 951502-1	<b>022605</b>	3.70
OA	Expression x Lanzarote	<b>967243 1</b>	4.00
OAA	te 951914-1 x Amarone	<b>012065-1 (575)</b>	4.15
AOA	Amarone x 951502-1	<b>022538-12-1</b>	4.15
OAOA	Te 951301-5 x Te 951914-1	<b>014050</b>	4.30
OO	Sissi	<b>031108</b>	4.35
AOA	Amarone x 951502-1	<b>022605-54</b>	4.45
AOA	Amarone x 951502-1	<b>022605-27</b>	4.65
OA	Merostar x Gran Sasso	<b>952400-1</b>	4.65
AOA	Gironde 952400-1	<b>002531-12</b>	5.25
OAA	Te 951914-1 x Amarone	<b>022004-4</b>	6.00
AOA	Amarone x 951502-1	<b>022605-17</b>	6.00

## 4.2 Virus resistentie

In de virusveldtoets werden een reeks van OA en AOA-hybriden opgenomen. Deze toets duurt enkele jaren omdat ontsnappers kunnen voorkomen. Met behulp van de met de AFLP-techniek gevonden koppeling van LMoV-resistentie met een moleculair bandje is een serie OA-genotypen, waarin deze resistentie zou kunnen zitten onderzocht ([zie eindrapportage PT-project Indirecte selectie PT 10314](#)). Hieruit bleek dat 951301-5, 951502-1, 953521-1, 952063-10 en 952462-1 dit bandje niet hebben, maar 951462-1, 951407-9, 951479-2, 952059-9 en 969023-2 daarentegen wel (Tabel 3). Interessant was dat OAOA No 012181 afkomstig uit een vatbare en een resistente OA dit bandje ook bezit en ook als virusresistent beschouwd mag worden. De veldtoets was met deze resultaten in overeenstemming.

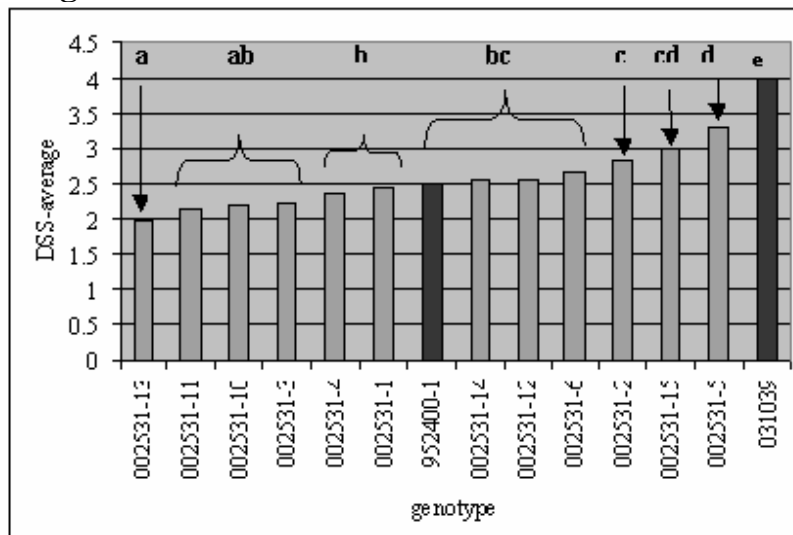
**Tabel 3. Virusresistentie in OA-hybriden via moleculaire merker analyse; R=resistent, V=vatbaar.**

type	Monsterboek nummer	Moeder	Vader	R/V
OA	951407 9	Bel Paso	Con King	R
OA	951479 2	Expression	Con King	R
OA	951462 1	Romerostar	Con King	R
OA	952059 9	Touch	Con King	R
OA	969023 2	Casa Blanca	Con King	R
OA	952377 1	Romerostar	Con King	R
OA	953521 1	Expression	Con King	V
OA	952462 1	San Marco	Con King	V
OA	951301 5	Merostar	Con King	V
OA	951502 1	Pesaro	Con King	V
OA	952063 10	Time out	Con King	V
OA	962433 1	Sissi	Con King	V
A OA	012248	Amarone	Te 951407 9	R
OAOA	012181	Te 951301-5	Te 951462-1	R
AA	021055	Con King		R
AA	041028	Pollyanna		R

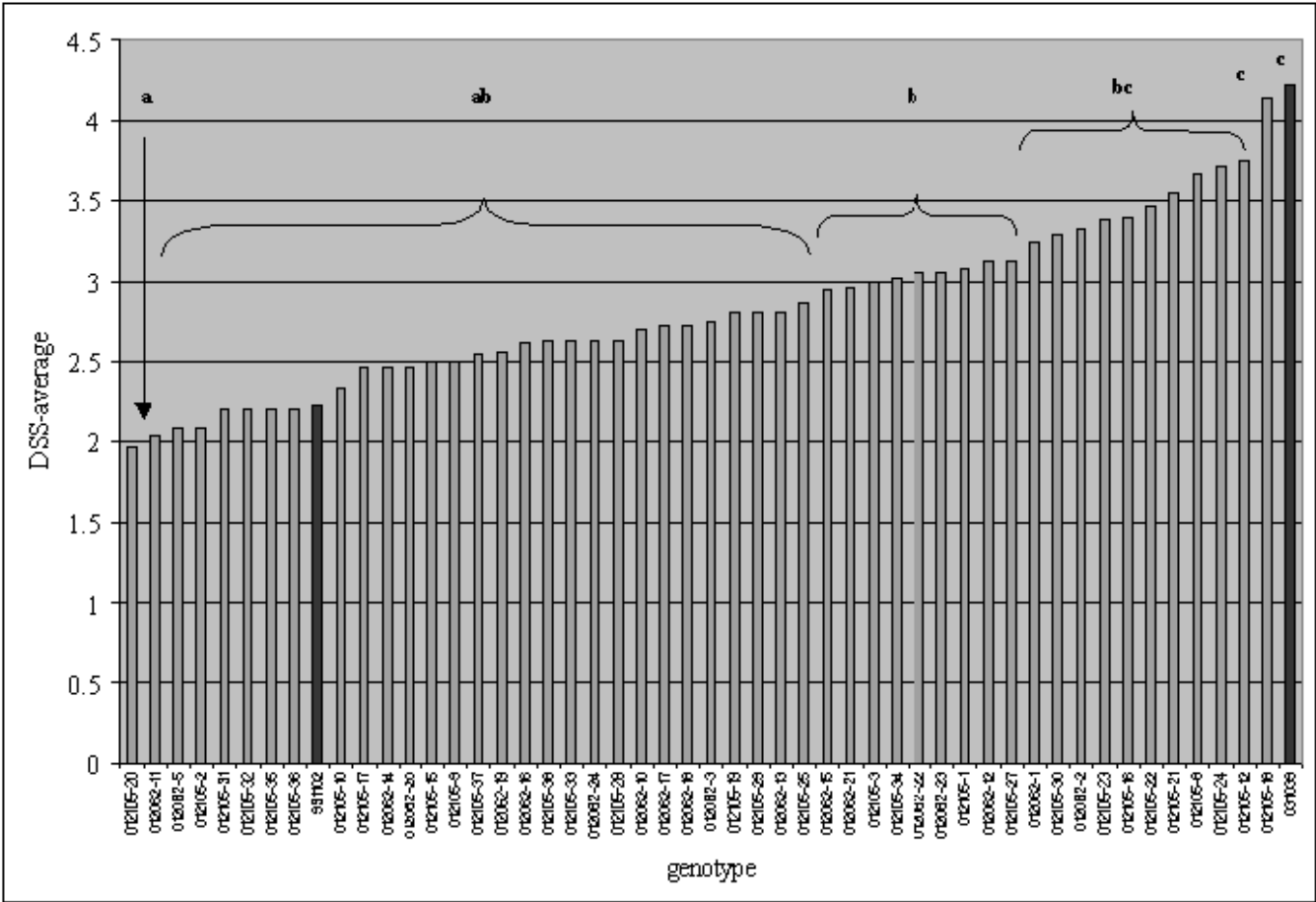
### 4.3. Botrytis-resistentie

Botrytis toetsing vond plaats met de bladtoets. Er werden 101 mitotisch en 20 meiotisch verkregen AOA's onderzocht. De mitotische populatie bestond uit zaailingen afkomstig van tetraploide 951301-5 x Gironde. Gironde is zeer vatbaar en de tetraploide 951301-5 resistent. De resistentie van de zaailingen varieerde van de vatbaarheid van Gironde tot resistenter dan de tetraploide 951301-5. Transgressie werd gevonden bij 6 zaailingen. De resultaten moeten echter herhaald worden, omdat slechts beperkt getoetst kon worden. Bij meiotische populatie 002531 (Gran Sasso x 952400-1) werden vergelijkbare resultaten gevonden, waarbij zelfs de helft van de zaailingen resistenter was dan de OA. Onderstaande Fig.2 en 3 illustreren het een en ander.

**Fig. 2. Botrytis resistentie in een meiotisch verkregen AOA-populatie (Gran Sasso x 952400-1). Zwarte balk: ouders; grijze balken diverse nakomelingen.**



**Fig. 3. Botrytis resistentie in een mitotisch verkregen OAA-populatie (951301-5 x Gironde). Zwarte balken: ouders; grijze balken: diverse nakomelingen.**

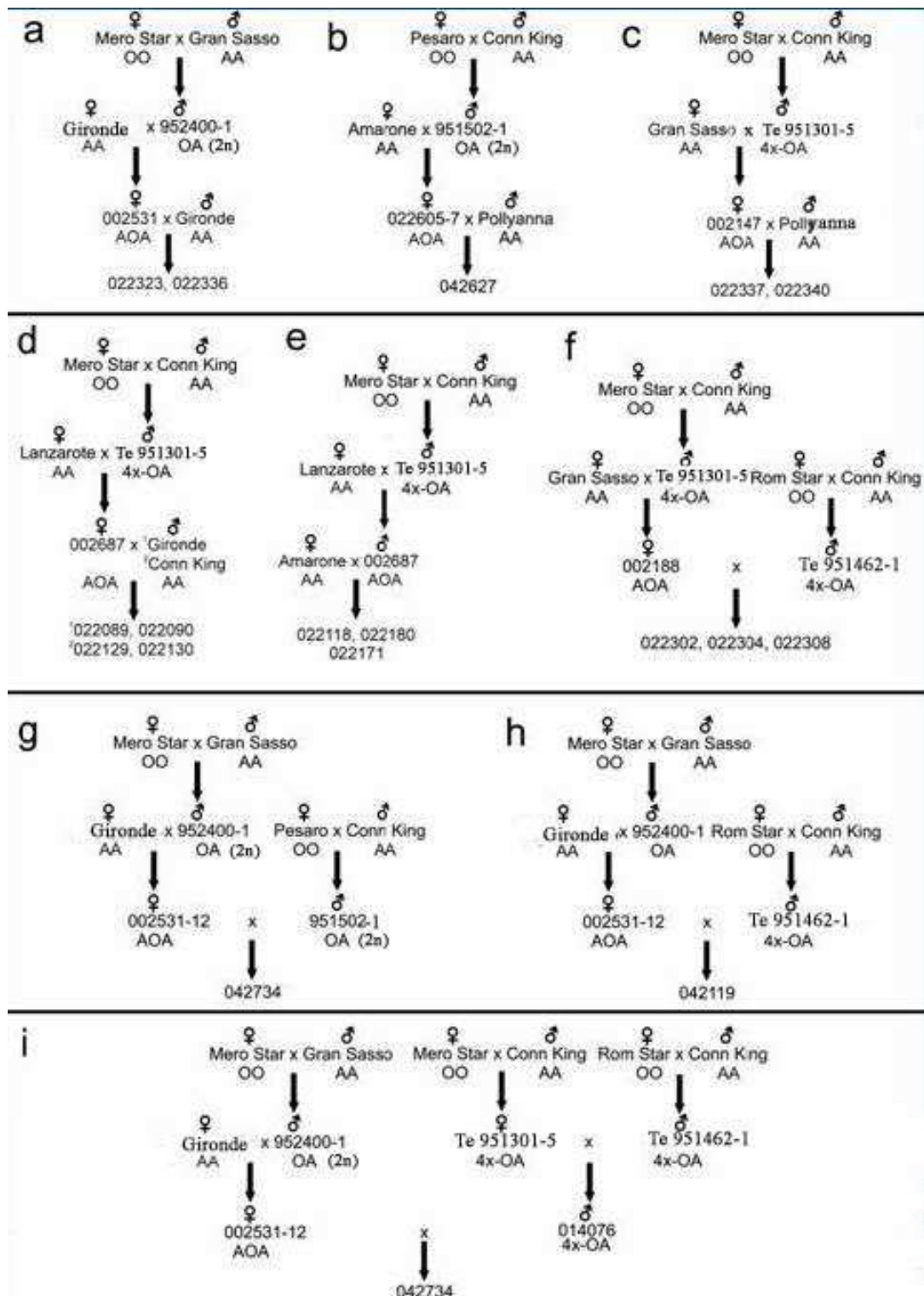


#### 4.4. OA-vervolgkruisingen

De geringe fertiliteit van de OA-hybriden is een groot probleem. Doordat veel OA-hybriden in de beginfase geproduceerd waren, was een goede selectie op fertiliteit mogelijk. Van de ruim 600 gegenereerde OA-hybriden bleken slechts 8 hybriden  $2n$ -gameten te produceren, waarvan 951502-1 en 952400-1 met de hoogste percentages. Van de enkele tientallen mitotische verdubbelde OA's bleken slechts enkele als ouder goed bruikbaar t.w. de tetraploïde versies van 951301-5, 951462-1, 951914-1, 951407-9 en 952400-1. In de BC1's van het type AOA en OAA werden vele honderden nakomelingen verkregen. De triploïde BC1's (AOA) werden in diverse combinaties gekruist met Aziaten en OA's. In Fig. 4 zijn schematisch een negental OA-doorkruisingsschema's (BC1 en BC2) weergegeven. Met behulp van GISH en FISH werden deze populaties nader geanalyseerd (zie 4.4). Uit de kruising A x AOA blijken veel aneuploïde nakomelingen te ontstaan. Deze hybriden blijken slechts enkele chromosomen meer dan het diploïde aantal te bezitten. Een interessante vondst hierbij was zaailing 022171-1 ( $2n=25$ ) die 24 Aziat en 1 Oriental chromosoom heeft meegekregen. Hiermee is een monosome additief verkregen.

BC1's van het type OOA of OAO bleken zeer moeilijk. Slechts een gering aantal hiervan hebben tot nu gebloeid. De achtergrond van deze barrière is onbekend.

**Fig. 4.** Kruisingsschema's van 9 verschillende OA-doorkruisingen.



#### **4.5. GISH en FISH van AOA-hybriden**

Met behulp van de moleculaire cytogenetische chromosoomkleuringstechnieken GISH en FISH is het mogelijk Aziatisch en Oriental chromosomen van elkaar te onderscheiden. Hiermee kan niet alleen het hybride karakter geïdentificeerd worden, maar is ook recombinatie tussen A en O-chromosomen (intergenomische recombinatie) aantoonbaar. Dit laatste is een verschijnsel, dat door Lim et al (2001) als eerste gevonden werd in LA-hybriden en dat alleen voorkomt indien hybriden ontstaan via ongereduceerde gameten (zie Fig. 5).

Een kruising waarin veel intergenomische recombinatie gevonden werd, was No 022605 en 022538 (Amarone x 951502-1). Een serie nakomelingen is door Rodrigo Barba (zie 4.8. Barba, 2005; Barba et al 2005) in detail onderzocht (Fig. 6). Het blijkt dat de meeste van deze hybriden ontstaan zijn via het zogenaamde FDR-mechanisme (zie Fig. 7), maar drie van de 10 onderzochte hybriden bleek via het IMR-mechanisme te zijn ontstaan. Bij dit laatste mechanisme zijn in 1 of meer gevallen in de chromosoomset van een hybride de zusterchromosomen aanwezig waarbij deling van de chromosomen via SDR heeft plaats gevonden. Dit mechanisme is van belang voor introgressie omdat hierbij bepaalde chromosoomgedeelten volledig homozygoot worden voor Aziatisch of voor Oriental-eigenschappen. Uit Tabel 4 blijkt dat AOA's ontstaan via een meiotische OA veel meer Oriental chromosomen doorgeven naar de het nageslacht dan AOA's ontstaan via een mitotisch verkregen OA.

Fig 5. GISH analyses in mitotische cellen van OA nakomelingen van meiotische oorsprong. Oriental chromosomen zijn roze en Aziatische chromosomen blauw. (a) 12 Oriental en 24 Aziatische chromosomen in een AOA hybride (022218-7= Gironde x 952400-1). (b) Triploïde AOA hybride (022215-1 = 952400-1 x Mont Blanc) met 1 set Oriental en 2 sets Aziatische chromosomen (c) AOA hybride met een recombinant chromosoom (pijl (022219-2 = Mont Blanc x 952400-1). (d) Tetraploïde AAOA hybride, afkomstig van 2 2n-gameten, 1 van de Aziatische hybride en de ander van de OA hybride (022218-11). (e) Recombinatie in een van de chromosomen van de AOA hybride (022218-4). (f) Twee recombinante chromosomen in een AOA hybride (012168-10 = Mont Blanc x 951914-1). (g) Meiotische chromosomale paring van homologe chromosomen met 2 overkruisingssegmenten (951502-1). (h) Meiotische chromosomale paring met 1 recombinatie lokatie (951502-1). (i) Twee recombinante chromosomen in een AOA hybride, elk chromosoom heeft de tegenhanger van de ander (022217-3 = Gironde x 952400-1). (j) Chromosoom paring in een meiotische cel van een OA hybride (951502-1).

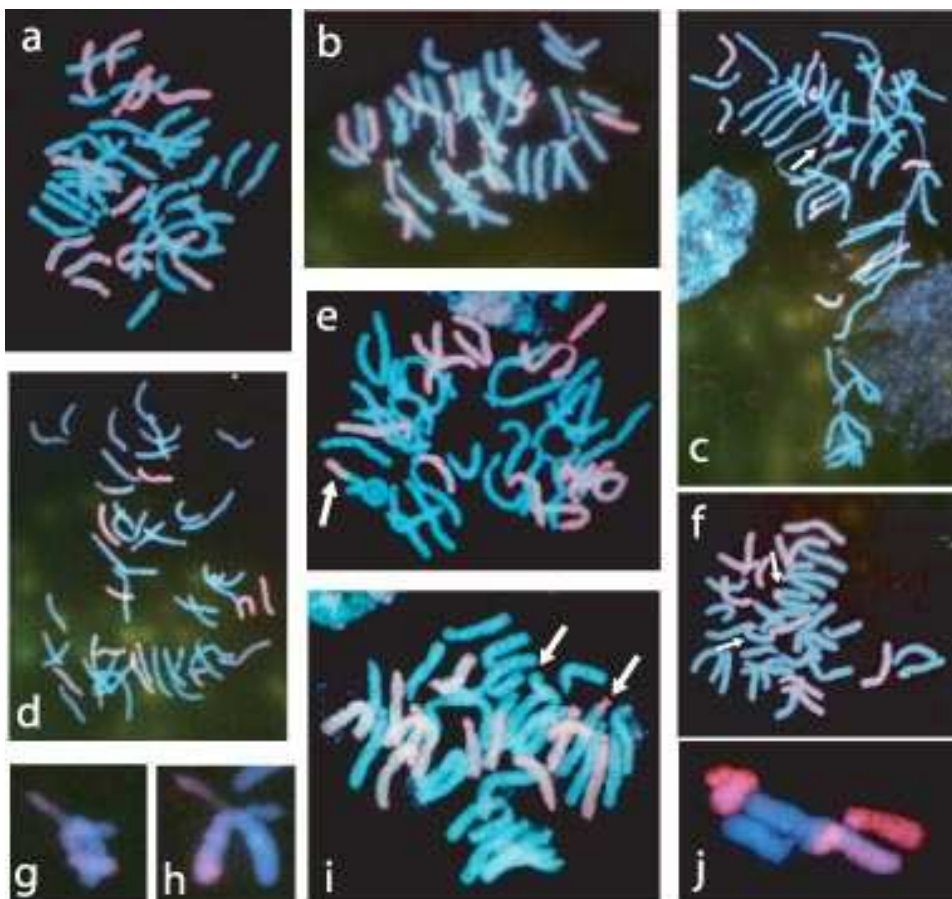
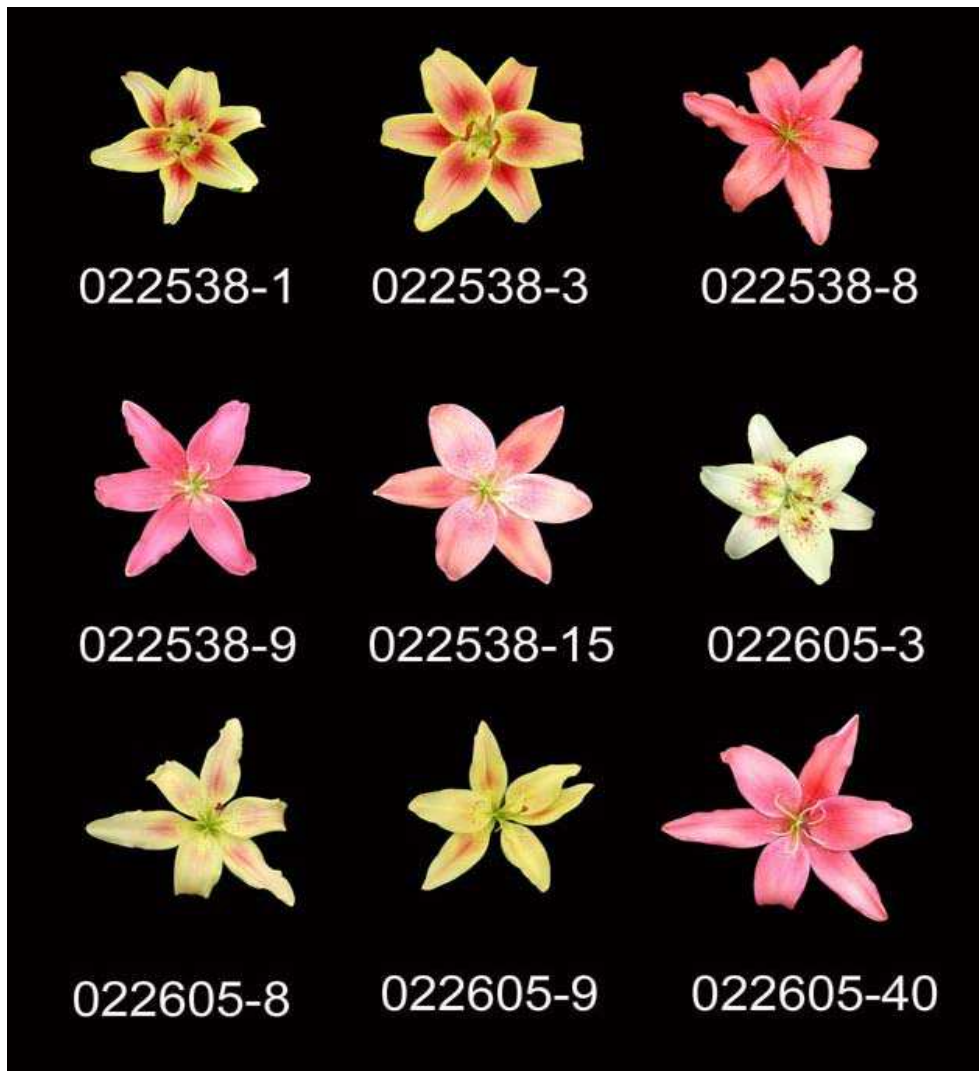




Fig. 6. De BC1-populatie 022538/022605 Amarone x 951502-1, waarin een grote uitsplitsing in bloemkleur waarneembaar is.



**Fig. 7.** Ideogrammen van 5 BC1-nakomelingen, waarin zichtbaar de recombinante chromosomen en de 45S- rDNA-banden. De reciproke en niet-reciproque producten van recombinante chromosomen zijn aangegeven met RP en NRP. Zuster centromeren zijn aangegeven met SC (dit duidt op het IMR-mechanisme). Wit is Aziat, rood Oriental chromosomen(delen).

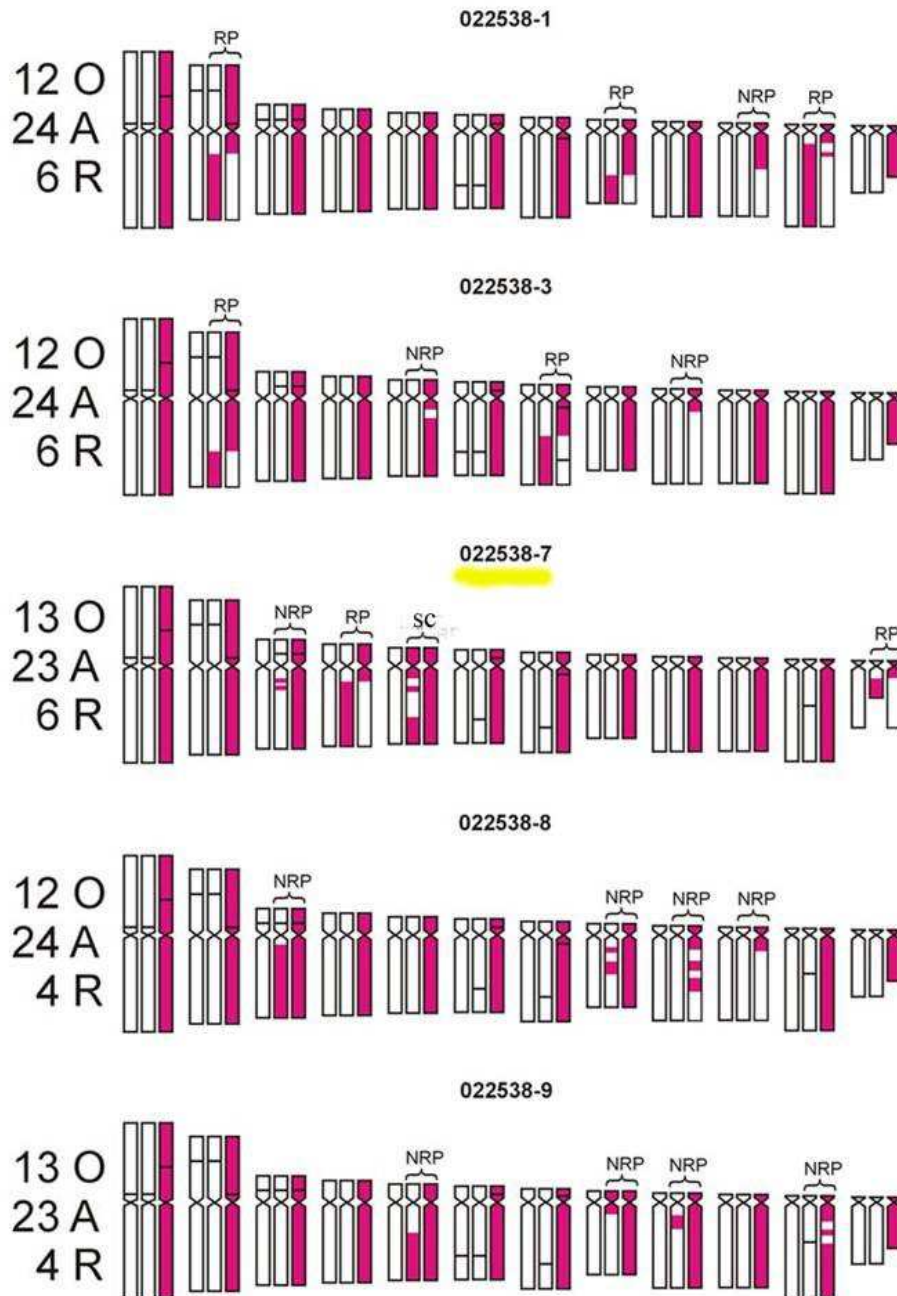
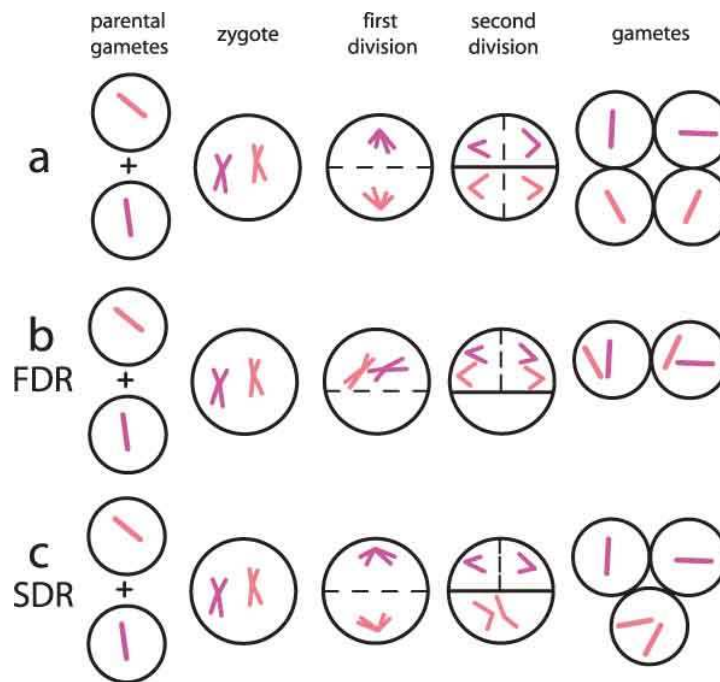


Fig 8. Meiotische restitutie mechanismen. (a) Vier haploide cellen vormen een tetraade, het resultaat van een normale meiose. (b) Twee  $2n$  gameten die de twee “non-sister” chromatiden van de homologe chromosomen bevatten, zijn gevormd via het FDR-mechanisme. (c) De zuster chromatiden van de homologe chromosomen bevinden zich in een diade, indien een  $2n$ -gameet via het SDR-mechanisme is ontstaan.



**Tabel 4.** Genoom samenstelling van nakomelingen afkomstig van 3x – 2x, 2x – 3x en 3x – 4x kruisingen. Het aantal recombinante chromosomen en de chromosoom bijdrage van de oudergameten werd met behulp van GISH geanalyseerd (zie ook Fig. 3.).

Kruising	Genotype	Ploidie Niveau	Genoom compositie *		Totaal aantal recombinante chromosomen	Chromosoom bijdrage van de gameten			
			O (O/A)	A (A/O)		♀		♂	
						O	A	O	A
<b>2x – 3x (MP)</b>									
AA × AOA	022118-2	2x+3	0	27	0	12	0	15	
AA × AOA	022118-4	2x+3	0	27	0	12	0	15	
AA × AOA	022118-7	2x	0	24	0	12	0	12	
AA × AOA	022118-8	2x+3	0	27	0	12	0	15	
AA × AOA	022171-1	2x+1	1	24	0	12	1	12	
AA × AOA	022180-2	2x	0	24	0	12	0	12	
<b>3x (2n) – 2x</b>									
AOA × AA	042627-1	2x+1	1	24(1)	1	1	12	12	
AOA × AA	042627-2	2x+8	8(1)	24(1)	2	8	12	12	
AOA × AA	042627-3	2x+7	7(1)	24(1)	2	7	12	12	
AOA × AA	042627-4	2x+6	6(1)	24(1)	2	6	12	12	
AOA × AA	042627-5	2x+5	5(1)	24(2)	3	5	12	12	
AOA × AA	042627-6	2x+5	5(1)	24(2)	3	5	12	12	
AOA × AA	042627-7	2x+8	8(2)	24(2)	4	8	12	12	
<b>3x (MP) – 4x-OA</b>									
AOA × 4x-OA	022302-3	4x	22	26	0	10	14	12	12
AOA × 4x-OA	022302-4	3x+7	18	25(1)	1	6	13	12	12
AOA × 4x-OA	022302-5	3x+4	16	24	0	4	12	12	12
AOA × 4x-OA	022304-1	3x+3	14	25	0	2	13	12	12
AOA × 4x-OA	022304-2	3x+7	19	24(1)	1	7	12	12	12
AOA × 4x-OA	022304-3	3x+7	18	25	0	6	13	12	12
AOA × 4x-OA	022304-4	3x+3	15	24	0	3	12	12	12
AOA × 4x-OA	022308-2	4x+1	20	29	0	8	17	12	12
AOA × 4x-OA	022308-4	5x+2	20	42	0	8	30	12	12
AOA × 4x-OA	022308-9	3x+8	19	25	0	7	13	12	12
<b>3x (2n) – 4x-OA</b>									
AOA × 4x-OA	032971-1	3x+2	14(1)	24	1	2	12	12	12
AOA × 4x-OA	032971-2	3x+10	22(1)	24	1	10	12	12	12
AOA × 4x-OA	032971-3	3x+8	20	24	0	8	12	12	12
AOA × 4x-OA	042119-4	3x+6	18	24	0	6	12	12	12
AOA × 4x-OA	042119-5	3x+9	19(1)	26(1)	2	7	14	12	12
AOA × 4x-OA	042119-7	4x	23(1)	25	1	11	13	12	12
<b>3x (2n) – 2x*</b>									
AOA × OA	042734-1	5x	12(1)	48(1)	2	0	36	12	12
AOA × OA	042734-2	3x+2	14(4)	24(3)	7	2	12	12	12

\* Bij de genoomcompositie, staat tussen haakjes het aantal chromosomen met recombinatie, O/A betekent een Oriental chromosoom met gecombineerde stukken A en A/O net andersom.

## 4.7 Inductie van ongereduceerde gameten

Het optreden van  $2n$ -gameten bij OA-hybriden blijkt een zeer zeldzaam verschijnsel. Minder dan 1% van de geproduceerde OA-hybriden bleek dit verschijnsel te vertonen. Het is daarom niet vreemd dat we al geruime tijd op zoek waren naar behandelingen  $2n$ -gameetvorming stimuleren. Gezocht is door variërende temperatuur-behandelingen toe te passen. Veel effect werd hierbij echter niet gevonden. Een belangrijke vinding was de toepassing van lachgas voor de inductie van  $2n$ -gameten. Hierbij werden OA-hybriden in het juiste knopstadium, als eerste 951301-5, behandeld met lachgas gedurende 1-2 dagen bij 6 atmosfeer in een afgesloten cilinder. Het juiste knopstadium is wanneer net voordat de meiose in de antheren plaats vindt. Het effect was fantastisch. Er werd op deze wijze pollen verkregen die voor 70-100% kiemde en in kruisingen goed fertil bleek. Na GISH-onderzoek bleek bij 3 van de 12 nakomelingen ook inderdaad intergenomische recombinatie op te treden (zie 4.8; Barba et al 2006). Deze methode bleek ook voor andere tot nu toe steriel OA's effectief.

## 4.7 Uitgifte materiaal

Bollen van de volgende nummers werden inde periode 2003-2005 beschikbaar gesteld aan de deelnemende bedrijven. De nummers 573, 574 en 575 zijn in vitro codes van Ceres BV. Deze nummers werden in vitro vermeerderd.

<b>Mb-NUMMER</b>	Type	MOeder	Vader	Jaar
<b>991107</b>	OAOA	Te 951914-1		2003
<b>981013</b>	OAOA	Te 951584-1		2003
<b>991357</b>	OAOA	Te 952400-1		2003
<b>002687-1</b>	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
<b>002687-8</b>	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
<b>002687-10</b>	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
<b>002687-13</b>	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
<b>002687-32</b>	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
<b>002531-12</b>	AOA	Gironde	952400-1	2005
<b>012246-1 (573)</b>	AOA	Gironde	981056	2005
<b>012248-1 (574)</b>	AOA	Amarone	981004	2005
<b>012065-1 (575)</b>	OAA	991107	Amarone	2005
<b>014050-1</b>	OAOA	981029	991112	2005
<b>022301-1</b>	AOA OA	002188-18	991112	2005
<b>022145-1</b>	AOA A	002687-38	Gironde	2005
<b>022589-1</b>	A OA	Amarone	952462-1	2005

## 4.8 Lijst van publicaties voortgekomen uit dit project

- Barba, Rodrigo Gonzalez 2005. The use of 2n gametes for introgression breeding in Oriental × Asiatic lilies. PhD-thesis, WUR, 111 pages.
- Barba-Gonzalez, Rodrigo, Bram H. Lokker, Ki-Byung Lim, Muncote S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl, 2004. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental × Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). *Theor. Appl. Genet* 109: 1125-1132.
- Barba-Gonzalez, R., K.-B. Lim, M.S. Ramanna, R.G.F. Visser & J.M. Van Tuyl, 2005. Occurrence of 2n gametes in the F1 hybrids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*): Relevance to intergenomic recombination and backcrossing. *Euphytica* 143: 67-73.
- Barba-Gonzalez, B, M.S. Ramanna, R.G.F. Visser & J.M. Van Tuyl 2005. Intergenomic recombination in the F1 hybrids of Oriental × Asiatic lily hybrids (*Lilium*) and its significance for genetic variation in the BC1 progenies as revealed by GISH and FISH. *Genome* 48: 884-894.
- Barba-Gonzalez, R., Chad T Miller M.S. Ramanna, & J.M. Van Tuyl 2006. Nitrous oxide N<sub>2</sub>O induces 2n gametes in sterile F1 hybrids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) and leads to intergenomic recombination. *Euphytica* in press.
- Barba-Gonzalez, Rodrigo, Alex A. Van Silfhout, Richard G. F. Visser, Muncote S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl. 2006. Progenies of allotriploids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. *Euphytica* accepted.
- Beers, Carla M., Rodrigo Barba-Gonzalez, Alex A. Van Silfhout, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl, 2004. Mitotic and meiotic polyploidization in lily hybrids for transferring Botrytis resistance. *Acta Hort* 673: 449-452.
- Lim, K.-B., M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl 2003. Comparison of homologous recombination frequency in interspecific hybrids of *Lilium*. *Korean J. Breed* 35 (1): 8-12.
- Lim, K.-B., M.S. Ramanna, JH De Jong, E. Jacobsen & J.M. Van Tuyl, 2002. Evaluation of BC2 progenies derived from 3x-2x and 3x-4x crosses of *Lilium* hybrids: a GISH analysis. *Theor. Appl. Genet* 106: 568-574.
- Lim, Ki-Byung & Jaap M. Van Tuyl (2004). Elegant Lady a pink longiflorum lily cultivar suitable for cut flower forcing. *Korean J. Breed* 36 (2): 123-124.
- Lim Ki-Byung, Rodrigo Barba-Gonzalez, Shujun Zhou, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2005, Meiotic Polyploidization with Homoeologous Recombination Induced by Caffeine Treatment in Interspecific Lily Hybrids. *Korean J of Genetics*. 27 (3): 219-226.
- Lim, K.-B., Barba-Gonzalez, R., M.S. Ramanna, Tsai-Mu Shen & J.M. Van Tuyl, 2004. Occurrence of SDR 2N-gametes in *Lilium* hybrids. *Breeding Science* 54: 13-18.
- Lim Ki-Byung, Rodrigo Barba-Gonzalez, Shujun Zhou, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2005, Meiotic Polyploidization with Homoeologous Recombination Induced by Caffeine Treatment in Interspecific Lily Hybrids. *Korean J of Genetics*. 27 (3): 219-226.
- Lokker, A.C., Rodrigo Barba-Gonzalez, Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl, 2004. Genotypic and environmental variation in production of 2n-gametes of Oriental × Asiatic lily hybrids. *Acta Hort* 673: 453-456.
- Van Tuyl JM & Lim KB 2003. Interspecific hybridization and polyploidization as tools in ornamental plant breeding. *Acta Hort* 612: 13-22.

Van Tuyl, Jaap. M., Rodrigo Barba-Gonzalez, Alex A. Van Silfhout, Ki-Byung Lim & M.S. Ramanna. 2004. Meiotic polyploidization in five different interspecific *Lilium* hybrids. *Acta Hort* 673: 99-105.

## 5. Conclusies

Ten aanzien van de verwachte en de bereikte resultaten kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- 5.1. Er zijn veel nieuwe inzichten en veel kennis van technieken om kruisingsbarrières te doorbreken verkregen.
  - a. Bestuivingstechnieken: voor verkrijging van de F1-hybriden blijkt cutstyle noodzakelijk terwijl voor BC1 en BC2 normale bestuiving goede resultaten oplevert. Een hoge temperatuur (20-25°C) blijkt voor alle kruisingen positief te werken.
  - b. Embryo-rescue blijkt niet in alle gevallen nodig te zijn: veel hybriden o.a. AOA, A x AOA kunnen via normale uitzaai en dus zonder embryo rescue verkregen worden.
  - c. Polyploidisatie: de oorzaken van de verschillen in fertiliteit van diverse mitotische tetraploide OA's zijn niet gevonden. Dit blijken genotype gebonden eigenschappen te zijn, die door de jaren een vast gegeven blijken.
  - d. 2n-gameten: Meiotische polyploidisatie blijkt de methode te zijn om recombinatie tussen O en A te bereiken. Er zijn bepaalde OA's 951502-1 waarbij dit in hoge mate voorkomt, terwijl dit bij anderen veel minder het geval is. Inductie van 2n-gameten met behulp van lachgas blijkt een zeer interessante nieuwe vondst te zijn. De steriele OA 951301-5 blijkt hierdoor fertiel stuifmeel te geven, waarmee bovendien nakomelingen met recombinaties kunnen worden verkregen. Deze techniek kan breed ingezet worden.
  - e. GISH: Genomische in situ hybridisatie is gebleken een onmisbaar hulpmiddel te zijn bij de cytogenetische karakterisatie van het OA-materiaal. De diverse restitutie mechanismen (FDR, IMR) konden hierdoor in divers materiaal worden aangetoond. Dit is genetisch van cruciaal belang.



- f. Introgressie: Selectie van materiaal met eigenschappen van zowel Oriental als Aziatische achtergrond vereist een goede introgressie van genen, aantoonbaar met GISH-technieken. Introgressie is op diverse manieren aangetoond. Het verschil in introgressie van mitotisch en meiotisch verkregen AOA-hybriden ten aanzien van het aantal overgedragen Oriental-chromosomen blijkt frappant. Recombinatie kan van diverse aard zijn: in AOA-hybriden is enerzijds de vorming van zogenaamde nulliplexen (Aziatische chromosomen homozygoot op alle 3 homeologe chromosomen) aangetoond en anderzijds is de introgressie van Oriental chromosoomsegmenten in AOA's herhaaldelijk gevonden.

**5.2** De aanwezigheid van resistentie voor de belangrijkste ziekten (Lily Mottle virus, Fusarium en Botrytis) in het OA-materiaal is duidelijk aangetoond. Een combinatie van virus en Fusarium-resistentie was in diverse fertiele OAOA-lijnen prominent aanwezig. Hiermee blijken zeer resistente AOA-hybriden geproduceerd te kunnen worden.

**5.3** Er zijn veel fertiele OA-geniteurs verkregen. Hierbij blijken morfologisch de Aziatische eigenschappen in het algemeen dominant te zijn over de Oriental-eigenschappen. Hoewel zeer belangrijke eigenschappen die gewenst zijn voor de bollenteelt (resistentie tegen ziekten), voor de broeierij (goede forceereigenschappen) en voor de consument (houdbaar, milieuvriendelijk geteeld), aanwezig kunnen zijn, is het Oriental-uiteindelijk voor de meeste lelieveredelaars essentieel. Om dit te bereiken zal na het uitgebreide werk met AOA en vervolgekruisingen hiermee, in het vervolgonderzoek een sterke focus op OOA-typen moeten liggen.

**5.4** Er is een begin gemaakt met de ontwikkeling van commerciële OA-hybriden met behulp van de in dit project ontwikkelde materialen.

## **6. Vervolg**

De vervolgstap in dit onderzoek is de ontwikkeling van moleculaire merkers t.b.v. diverse resistenties in een AOA-populatie met intergenomische recombinatie, waarbij moleculaire en fysische kaarten gecombineerd kunnen worden. Dit vervolg-project wordt gefinancierd door PT en SENTER. Hierbij zal gebruikt gemaakt worden van

enerzijds GISH en FISH en anderzijds specifieke merkertechnologieën als NBS-profiling en DArT.

## 7. Referenties:

- Asano, Y. & H. Myodo, 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.
- Asano, Y.1980a. 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.1980b. Studies on crosses between distantly related species of lilies. VI. Pollen tube growth in interspecific crosses of *L. longiflorum*. J.Japan. Soc. Hort. Sci. 49:392-396.
- Asano, Y.1982a. Oriempet hybrids: a hybrid group between the oriental and trumpet families. The lily yearbook of the NALS 35:64-66.
- Asano, Y.1982b. Overcoming interspecific hybrid sterility in *Lilium*. J.Japan. Soc. Hort. Sci. 51:75-81.
- Asano, Y.1983. Random distribution of the number of chromosome pairings in interspecific hybrids of *Lilium longiflorum*. Cytologia 48:803-808.
- Asano, Y.1984. Fertility of a hybrid between distantly related species in *Lilium*. Cytologia 49:447-456.
- Asano, Y.1985. Interspecific pollen tube growth behavior and a model for the explanation in *Lilium*. Plant Cell Incompatibility Newsletter 4-7.
- Ascher, P.D. & L.D. Drewlow, 1975. The effect of prepollination injection with stigmatic exudate on interspecific pollen tube growth in *Lilium longiflorum* Thunb. Styles. Plant Sci. Letters 4:401-405.
- De Jong, P.C.1974. Some notes on the evolution of lilies. The lily yearbook of the NALS 27: 23-28.
- Dowrick, G.J. & S.N. Brandram, 1970. Abnormalities of endosperm development in *Lilium* hybrids. Euphytica 19:433-442.
- Ewald, A. & W. Reiser, 1993. Kurzbeschreibung der Erfurter interspezifischer Lilienhybriden. Info der Fachgruppe Lilien, Gesellschaft der Staudenfreunde 1993 heft 1:11-13.
- Freimann, L.V.1988. Catch the tetraploid wave, polyploid in Liliums by the use of colchicine. Quart Bull. of the NALS 42(3):4-10, 12-14.
- Geenen, G.J.J.1993. Flowcytometric DNA analysis for determination of ploidy levels in lily. The lily yearbook of the NALS 43 (1990): 70-77.
- Janson, J.1992. Pollen tube - pistil interaction and fertilization in *Lilium longiflorum*. Thesis LUW-Wageningen, Chapter 5: Placental pollination in *Lilium longiflorum* Thunb. p 91-109.
- Lim, Ki-Byung, Jae-Dong Chung, Bernadette C.E. Van Kronenburg, Munikote S. Ramanna, J. Hans De Jong & Jaap M. Van Tuyl, (2000). Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L.*

*longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F1 hybrid, BC1 and BC2 progenies. Chromosome Research 8(2): 119-125.

Lim, Ki-Byung, M.S. Ramanna, J.H. de Jong, E. Jacobsen & Jaap M. Van Tuyl (2001). A novel type of meiotic nuclear restitution detected interspecific lily hybrids by genomic in situ hybridization, TAG 103: 219-230.

Lim, Ki-Byung, Jannie Wenekes, J. Hans De Jong, Evert Jacobsen & Jaap M. Van Tuyl, (2001) Karyotype analysis of *Lilium longiflorum* Thunb. And *Lilium rubellum* Baker by chromosome banding and fluorescence in situ hybridisation (FISH). Genome 44: 911-918.

Kronenburg, B. van, B. Meijer, A. van Dijken en J.M. van Tuyl, (1996). Doorbraak Lelieveredeling: eerste OA-hybriden bloeien. Bloembollencultuur 107(12): 24-25; Vakwerk 70 (24):14-15

Kronenburg, B. van, A. van Dijken, R. Snijder, K.B. Lim & J.M. van Tuyl, (1998). Veredeling lelie: opheffing steriliteit OA-hybriden in onderzoek. Bloembollencultuur 109 (22):13.

Löffler, H.J.M., J.R. Mouris & M.J. Van Harmelen, 1993. In vitro selection for resistance against *Fusarium oxysporum* in lily: prospects. The Lily Yearbook of the North American Lily Society (1990) 43: 56-60.

Myodo, H.1963. Experimental studies on the sterility of some *Lilium* species. Journ. Fac. Agr. Univ. Sapporo 52 (1963)70-122.

North, C. & A.B. Wills, 1969. Inter-specific hybrids of *Lilium lankongense* franchet produced by embryo-culture. Euphytica 18 :430-434.

Straathof, Th.P., J. Jansen & H.J.M. Löffler, 1993. Determination of resistance to *Fusarium oxysporum* in *Lilium*. Phytopathology 83:568-572.

Straathof, Th.P. & H.J.M. Löffler, 1992. Nieuwe toets toont *Fusarium*-resistentie aan: lelie en gladiool. Prophyta 6:26-29.

Straathof, Th.P. & J.M. van Tuyl, 1993. Breeding for resistance against *Fusarium* in tetraploid *Lilium*. The lily yearbook of the NALS 43 (1990): 23-27.

Van Creijl, M.G.M., L.W.D. van Raamsdonk & J.M. van Tuyl, 1993. Wide interspecific hybridization of *Lilium*: preliminary results of the application of pollination and embryo-rescue methods. The lily yearbook of the NALS 43 (1990): 28-37.

Van Roggen, P.M., C.J. Keijzer, H.J. Wilms & J.M. van Tuyl, 1986. Pollen tube growth in an interspecific cross between two *Lilium* species IN: E.G.

Williams, R.B. Knox, D. Irvine (EDS), Pollination '86 p 240-241. Van Tuyl, J.M., M.C. Marcucci & T. Visser, 1982. Pollen and pollination experiments. VII. The effect of pollen treatment and application method on incompatibility and incongruity in *Lilium*. Euphytica 31: 613-619.

Van Tuyl, J.M., J. Franken, M.C. Jongerius, C.A.M. Lock & A.A.M. Kwakkenbos, 1986. Interspecific hybridization in *Lilium*. Acta Hort. 177:591-595.

Van Tuyl, J.M., A.J. van Dijk & L.W.D. van Raamsdonk, 1986. Identification of interspecific hybrids and determination of relationships between species in the genus *Lilium* by isoelectricfocusing. Acta Hort. 177:601-605.

Van Tuyl, J.M., Th.P. Straathof, R.J. Bino & A.A.M. Kwakkenbos, 1988. Effect of three pollination methods on embryo development and seedset in intra- and interspecific crosses between seven *Lilium* species. Sex. Plant Reprod. 1(1988) 119-123.

Van Tuyl, J.M.; C.J. Keijzer, H.J. Wilms & A.A.M. Kwakkenbos, 1990. Interspecific hybridization between *Lilium longiflorum* and the white asiatic hybrid 'Mont Blanc'. The Lily Yearbook of the NALS 41 (1988): 103-111.

Van Tuyl, J.M., M.P. van Diën, M.G.M. van Creij, T.C.M. van Kleinwee, J. Franken & R.J. Bino, 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Science 74 (1991): 115-126.

Van Tuyl, J.M., H. Meijer & M.P. Diën, 1991. Leliesoortkruisingsonderzoek op CPRO-DLO, In-vitro technieken bij nieuwe leliesoortkruisingen succesvol. Bloembollencultuur 102(23): 20-21.

Van Tuyl, J.M., H. Meijer & M.P. van Diën, 1993. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in in-vitro chromosome doubling of *Lilium*. The lily yearbook of the NALS 43 (1990): 19-22.

Van Tuyl, J.M., & P.B. Stekelenburg, 1988. Genotypic and environmental variation in production of 2N-gametes in *Lilium*. In: Sexual reproduction in higher plants (EDS. M. Cresti, P.Gori and E.Pacini) Springer Verlag, p 486.

Van Tuyl, J.M. 1993. Survey of research on mitotic and meiotic polyploidization at CPRO-DLO. The lily yearbook of the NALS 43 (1990): 10-18.

Van Tuyl, J.M. , M.P. van Diën, M.G.M. van Creij, T.C.M. van Kleinwee, J. Franken & R.J. Bino, (1991). Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Science 74 (1991): 115-126.

Van Tuyl, J.M. & M.J. de Jeu, (1997). Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Chapter 13. Biotechnology and Crop Improvement (ed. Sawhney & Shivanna) pp. 273-293.

Van Tuyl, J.M., K.B. Lim & M.S. Ramanna, M.S. (2002). Interspecific hybridization and introgression Chapter in: Breeding for ornamentals "Classical and molecular approaches" page 93-108. Kluwer Academic Publishers.

Van Went, J.L., N.M. van Beek & J.M. van Tuyl, 1985. Ovule development in relation to ovule position and flower development in *Lilium*. In: Sexual Reproduction in seedplants, ferns and mosses, Wageningen: 136.

Zenkter, M. 1980. Intraovarian and in vitro pollination. International Review of Cytology, Suppl. 11B, chapter 15: 137-156.