

Morfologinis ir genetinis žolinių bijūnų polimorfizmas

**Ingrida Mažeikienė, Vidmantas Stanys,
Šarūnė Morkūnaitė-Haimi, Gražina Stanienė**

*Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institutas, LT-54333 Babtai, Kauno r.,
el. paštas: mazeikiene@hotmail.com*

Plečiant *Paeonia* genties požymių įvairovę, svarbu pasirinkti hibridizacijai kiek galima toliau vienas nuo kito morfologiškai ir genetiškai nutolusius individus. Bijūnų palyginimas vien tik pagal išorinius požymius neleidžia įvertinti, kiek genetiškai viena nuo kitos nutolusios rūšys ar veislės, turinčios gana panašius morfologinius požymius. 2003–2007 metais Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės institute ištirtas morfologinis ir genetinis 17 individų, priklausančių skirtingoms introdukuotų žolinių *Paeonia* genties augalų rūšims, Lietuvoje bei Vakarų Europoje sukurtoms bijūnų veislėms ir hibridams, polimorfizmas. Naudojant APPD žymenis, pagal 19 požymių nustatytas tarpusavio genetinis panašumas ir morfologinis giminingumas. Binarinių morfologinių duomenų matrica buvo sudaryta pagal 83 požymių vertinimo duomenis. Bijūnų bendrosios DNR polimorfiniai fragmentai pagausinti su dešimt oligonukleotidinių pradmenų. Bendras skirtingo dydžio DNR fragmentų kiekis svyravo nuo 11 iki 24, o jų dydis buvo nuo 120 iki 2 400 bp. Bijūnų genetinio atstumo ir tapatumo reikšmės apskaičiuotos pagal 160 išryškintų DNR fragmentų. Parodyta, kad bijūnai, kultivuojami LSDI dekoratyvinių augalų kolekcijoje, išsiskyrė didele morfologinių požymių įvairove. Ištirtos *Paeonia* rūšys ir veislės pasirodė skirtingai polimorfiškos ir pagal morfologinius, ir pagal genetinius požymius.

Reikšminiai žodžiai: APPD, genotipas, morfologiniai požymiai, *Paeonia*, polimorfizmas.

Įvadas. Pagal kilmę bijūnai priskiriami prie archainių, kreidos periodu susiformavusių augalų. Bijūninių šeimai yra priskiriama viena *Paeonia* gentis, kuriai priklauso apie 40 Viduržemio jūros pakrantėse, Europoje, Kaukaze, Rytų Azijoje natūraliai paplitusių rūšių, o dvi rūšys kilusios iš Šiaurės Amerikos (Stern, 1946). *Paeonia* genties padėtis augalų sistematikoje ilgai buvo ginčytinas objektas (Bigger ir kt., 1955; Kemularija-Natadze, 1958). Dabar dėl bijūnų savitos embriogenezės, žiedadulkių sandaros ir chromosomų skaičiaus yra išskirta monotipinė *Paeoniaceae* Rudolphi šeima, priskirta monotipiniam poeiliui *Paeoniales* Heintze. Tačiau iki šiol nėra galutinai išsiaiškintas rūšių tarpusavio giminingumas. Daugelis bijūnų rūšių į Lietuvą buvo introdukuotos iš Vakarų Europos ir lietuvių literatūroje J. Strazdo aprašomos nuo 1930 m. Dekoratyviniuose želdiniuose plačiau paplitusios ne bijūnų rūšys, bet selekcininkų sukurtos veislės, išsiskiriančios dekoratyviais žiedais ir kero forma.

Lietuvoje O. Skeivienė atliko veislių kryžminimus ir atrinko keletą perspektyvių *P. lactiflora* sėjinukų, iš kurių trys – ‘Garbė Motinai’, ‘Profesorius K. Grybauskas’ ir ‘Virgilijus’ – pripažinti veislėmis (Žliobienė ir kt., 1985). Plečiant bijūnų požymių įvairovę, selekcininkui svarbu atsirinkti hibridizacijai kiek galima toliau vienas nuo kito morfologiškai ir genetiškai nutolusius individus. Pagal morfologinius požymius galima spręsti apie veislių ar rūšių giminingumą, bet to nepakanka atsirenkant selekcijai viena nuo kitos genetiškai nutolusias veisles (Hosoki ir kt., 1997 a). Parodyta, kad morfologiškai gana panašios veislės ar rūšys gali būti gan skirtingos genetiškai, todėl tinkamesnės hibridizacijai (Hosoki ir kt. 1997 b). Pernelyg toli genetiškai nutolusių individų kryžminimas yra komplikuoatas arba visai neįmanomas.

Morfologiniai žolinių bijūnų tyrimai LSDI dekoratyvinių augalų kolekcijoje pradėti 1996 metais (Antanaitienė, Stanienė, 2001). Genetiniai tyrimai atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) metodu buvo sėkmingai panaudoti tiriant kai kurių *Paeonia* genties augalų – *P. suffruticosa* (Pei ir kt., 1995), *P. suffruticosa* var. *spontanea* veisles (Hosoki ir kt., 1997 c), *Paeonia* sect. *Mountan DC* (Zouy-Ping ir kt., 1999) – genetinį giminingumą ar juos identifikuojant. Lietuvoje sukurtų veislių ir kitų introdukuotų veislių ir rūšių morfologinis ir genetinis giminingumas iki šiol tirtas nebuvo.

Darbo tikslas – ištirti introdukuotų bijūnų rūšių ir Lietuvoje bei Europoje sukurtų veislių ir hibridų, auginamų LSDI kolekcijoje, morfologinių požymių ir genetinį polimorfizmą, nustatyti atskirų genotipų tarpusavio ryšius.

Tyrimo objektas, metodai ir sąlygos. 2003–2007 metais pagal išorinius požymius vertinta ir genetiškai tirta 10 *Paeonia* rūšių ir 7 veislės, introdukuotos į LSDI dekoratyvinių augalų kolekciją: du *P. lactiflora* rūšies pavyzdžiai, dvi *P. officinalis* rūšies sodinės formos *alba plena* ir *rosea plena*, *P. tenuifolia* ir šios rūšies var. *plena*, *P. peregrina*, *P. daurica*, *P. anomala*, *P. veitchii*, penkios O. Skeivienės sukurtos *P. lactiflora* veislės ir hibridai – ‘Garbė Motinai’, ‘Virgilijus’, ‘Profesorius K. Grybauskas’, ‘Maironis’, ‘Darius Girėnas’, ir dvi pasaulyje paplitusios prancūzų selekcijos veislės ‘Sarah Bernhard’ ir ‘Festiva Maxima’.

1 lentelė. Požymiai, pagal kuriuos buvo vertinti bijūnų genties augalai
Table 1. Characteristics used to describe peony genus plants

Bijūnų požymiai Characteristics of peony	Augalų požymių vertinimo kriterijai Criterion of plant characteristic evaluation
1	2
Kero Habit: forma form aukštis height	Kompaktiškas, pusiau išsidraikęs, išsidraikęs Compact, semi scattered, scattered Labai žemi – iki 40 cm, žemi – 41–60 cm, vidutiniai – 61–80 cm, aukšti – 81–100 cm, labai aukšti – daugiau kaip 100 cm Very low – up to 40 cm, low – 41–60 cm, average – 61–80 cm, high – 81–100 cm, very high – more than 100 cm

1 lentelės tęsinys

Table 1 continued

<i>1</i>	<i>2</i>
žiedstiebio storis prie pagrindo flower-stem at the base	Ploni – 0,7–0,9 cm, vidutiniai – 1,0–1,2 cm; stori – 1,3–1,5 cm Thin – 0.7–0.9 cm, average – 1.0–1.2 cm, thick – 1.3–1.5 cm
generatyvinių stiebų kiekis number of generative stems	Mažas – iki 50 proc., vidutinis – 51–75 proc., gausus – 75 proc. Small – up to 50 %, average – 51–75 %, abundant – 75 %
vegetacijos trukmė vegetation duration	Trumpa – iki 90 d., vidutinė – 90–120 d., ilga – daugiau kaip 120 d. Short – up to 90 days, average – 90–120 days, long – more than 120 days
atsparumas ligoms ir kenkėjams (1–5 balai) resistance to diseases and pests (1–5 scores)	Visai neatsparus, mažai atsparus, vid. atsparus, atsparus, l. atsparus Completely not resistant, little resistant, averagely resistant, resistant, very resistant
atsparumas pavasario šalnums (1–5 balai) resistance to spring frosts (1–5 scores)	Visai neatsparus, mažai atsparus, vid. atsparus, atsparus, l. atsparus Completely not resistant, little resistant, averagely resistant, resistant, very resistant
Žiedo Flower:	
forma form	Paprastas, dvieilis, pusiau rutulinis, karūninis, rožiškas Simple, of two rows, semi ball, crown type, rose type
skersmuo diameter	Smulkūs – mažiau kaip 10 cm, vidutiniai – 11–16 cm, stambūs – 17–20 cm; gigantiniai – daugiau kaip 20 cm Small – less than 10 cm, average – 11–16 cm, big – 17–20 cm, gigantic – more than 20 cm
vytis sex	Dvilytis, vyriškas, moteriška, sterilus Bisexual, male, female, sterile
vainiklapių spalva colour of petals	Balti, kremiška balti, šviesiai rožiniai, kremiška rožiniai, tamsiai rožiniai, alyviškai rožiniai, tamsiai avietiniai, raudoni, kraujo raudonumo, karmininiai raudoni White, cream white, light rose, cream rose, dark rose, olive rose, dark crimson, red, blood red, carmine red
purkos spalva colour of stigma	Balta, rausva, raudona, geltona, nėra White, pink, red, yellow, there is no
kuokelio kotelio spalva colour of the stem of stamen	Rausva, raudona, geltona, nėra Pink, red, yellow, there is no
kuokelio kotelio ilgis length of the stem of stamen, cm	Trumpi – 1–2 cm, ilgi – 2–4 cm, nėra Short – 1–2 cm, long 2–4 cm, there is no

1 lentelės tęsinys

Table 1 continued

1	2
žydėjimo ankstyvumas earliness of flowering	L. ankstyvi (05 15–20), ankstyvi (05 21–06 05), vid. ankstyvi (06 06–10), vidutiniai (06 11–15), vid. vėlyvi (06 16–20), vėlyvi (06 21–25), l. vėlyvi (po 06 26) Very early (05 15–20), early (05 21–06 05), average early (06 06–10), average (06 11–15), average late (06 16–20), late (06 21–25), very late (after 06 26)
žydėjimo trukmė, d. duration of flowering, days	Trumpalaikė – 6–10 d., vidutinė – 11–14 d.; ilgalaikė – 15 d. Short term – 6–10 days, average 11–14 days, long term – 15 days
Lapavaisių Follicles:	
vilnotumas wooliness	Lygūs, vilnoti, nėra Even, woolly, there is no
kiekis ant stiebo, vnt. number per stem, unt.	Mažai – 1–2, vidutiniškai – 3–4, gausiai – 4 ir daugiau, neformuoja Little amount – 1–2, average – 3–4, abundant – 4 and more, do not form
sėklų kiekis jame, vnt. number of seeds in it	Mažai – iki 5, vidutiniškai – 5–10, gausiai – daugiau kaip 10, nebrandina Little amount – up to 5, average – 5–10, abundant – more than 10, do not ripen

Pagal J. Vaidelio parengtą metodiką (2005) įvertinome 19 morfologinių bijūnų požymių. Binarinių duomenų matrica buvo sudaryta pagal bijūninių augalų 83 požymių vertinimo kriterijus, pateiktus 1 lentelėje.

Genetinei analizei naudojome APPD (atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR) metodą. Bendroji DNR išskirta CTAB metodu (Doyle, Doyle, 1990). Atsitiktinių DNR sekų amplifikacija vykdyta naudojant 10 oligonukleotidinių pradmenų (4 lentelė) (Fermentas, Vilnius). 20 µl mišinys amplifikacijos reakcijai buvo sudarytas iš 2 µl *Taq* DNR polimerazės buferio, 4 µl MgCl₂, 2 µl dNTP mišinio, 2 µl pradmens, 0,25 µl *Taq* DNR polimerazės ir apie 1 µg genominės DNR, ištirpintos 0,25 µl TE buferio. Amplifikacija atlikta cikleryje (Eppendorf) tokiu režimu: pirminis dvigrandės DNR išlydimas 94 °C temperatūroje 3 min.; 45 ciklai atsitiktinių fragmentų gausinimo – dvigrandės DNR išlydimas 94 °C 45 s., pradmenų hibridinimo etapas 40 °C (45 °C MP 8 pradmeniui) 45 s., fragmentų sintezės etapas 72 °C 45 s.; paskutinis sintezės etapas 72 °C 5 min.

Gauti DNR fragmentai frakcionuoti 1,5 g l⁻¹ agarozės gelyje. Fragmentų dydžiui nustatyti naudotas Gene Ruler 1 kb DNR Marker (Fermentas, Vilnius). Gauti duomenys dokumentuoti ir įvertinti Herolab UV kameroje naudojant E.A.S.Y. Win 32 dokumentavimo programą.

Genetinių rezultatų statistinė analizė atlikta PopGene 3.2 kompiuterine programa. Fenotipiniai požymiai statistškai apdoroti programomis STAT_ENG ir ANOVA (Tarakanovas, 1999), klasterinė analizė pagal fenotipinius požymius atlikta SPSS 16.0 paketu.

Rezultatai. Septyniolika introdukuotų žolinių bijūninių šeimos augalų buvo polimorfiški ir pagal kero (2 lentelė), ir pagal žiedų (3 lentelė) morfologinius požymius. Vertinti požymiai gan pastoviai kartojosi Lietuvos klimato sąlygomis. Tai rodo nedidelės bandymo paklaidos. Kiekybiniai augalų rodikliai skiriasi nuo kitų Lietuvos ir užsienio autorių pateiktų duomenų, bet pagal vertinimo kriterijus išlieka augalui būdingoje sodo grupėje (Vaidelys, 2005).

2 lentelė. Paeonia genties augalų kero morfologinis įvertinimas LSDI dekoratyvinių augalų kolekcijoje

Table 2. Morphological evaluation of Paeonia genus plants in LIH collection

*Paeonia augalai Plants of Paeonia	Kero aukštis Height of habit, cm	Kero forma Form of habit	Stiebo storis Diameter of stem, cm	Žiedinių stiebų kiekis kere Generative stems in habit, %	Vegetacijos trukmė, d. Duration of vegetation	Lapavaisių kiekis ant stiebo, vnt. Number of foliols on stem	Lapavaisio plaukuotumas Hairiness of foliols	Subrandina sėklų lapavaisyje, vnt. Number of seeds in foliols, unt.	Atsparumas ligoms ir kenkėjams balais Resistance to diseases and pests, in points	Atsparumas pavasario šaloms balais Resistance to frost, in points
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	84,2 ± 1,9	pusiau išsidriakęs semi scattered	1,12 ± 0	100	144,5 ± 3,2	3,60 ± 0,24	lygūs even	8,2 ± 0,57	4,0 ± 0,6	4,7 ± 0,5
2	100,5 ± 2,1	pusiau išsidriakęs semi scattered	1,14 ± 0	100	143,7 ± 3,7	5,0 ± 0,32	vilnoti woolly	12,0 ± 1,05	4,1 ± 0,5	4,8 ± 0,6
3	90,7 ± 2,1	pusiau išsidriakęs semi scattered	1,33 ± 0	95,24	141,2 ± 2,4	-	lygūs even	-	4,1 ± 0,5	4,7 ± 0,5
4	82,7 ± 1,9	kompaktiškas compact	1,17 ± 0,01	87,5	141,2 ± 2,4	-	nėra there is no	-	4,4 ± 0,4	4,8 ± 0,2
5	98,5 ± 2,53	kompaktiškas compact	0,81 ± 0,01	25	141,2 ± 2,4	-	nėra there is no	-	3,5 ± 0,7	4,6 ± 0,7

2 lentelės tęsinys

Table 2 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
6	104,7 ± 2,3	pusiau išsidrai- kės semi scattered	1,44 ± 0,02	91,3	140,0 ± 2,4	-	lygūs even	-	4,9 ± 0,5	5,0 ± 0
7	92,0 ± 1,6	pusiau išsidrai- kės semi scattered	1,19 ± 0,01	90	140,0 ± 2,4	2,20 ± 0,37	lygūs even	-	4,9 ± 0,5	5,0 ± 0
9	104,2 ± 2,0	pusiau išsidrai- kės semi scattered	1,34 ± 0,02	42,86	86,2 ± 2,4	4,80 ± 0,20	lygūs even	4,14 ± 0,67	4,4 ± 0,4	4,9 ± 0,5
8	100,0 ± 1,4	pusiau išsidrai- kės semi scattered	1,35 ± 0,01	38,89	86,2 ± 2,4	4,60 ± 0,24	lygūs even	5,57 ± 0,69	4,4 ± 0,4	4,9 ± 0,4
10	41,0 ± 1,5	pusiau išsidrai- kės semi scattered	0,72 ± 0,01	100	87,5 ± 2,5	1,80 ± 0,20	vilnoti woolly	2,29 ± 0,29	5,0 ± 0	5,0 ± 0
11	56,2 ± 1,5	pusiau išsidrai- kės semi scattered	1,33 ± 0,02	53,33	85,0 ± 2,8	3,00 ± 0,32	vilnoti woolly	2,43 ± 0,37	3,6 ± 0,9	3,5 ± 0,9
12	37,2 ± 1,8	pusiau išsidrai- kės semi scattered	1,17 ± 0,01	100	85,0 ± 2,9	2,60 ± 0,24	vilnoti woolly	-	4,3 ± 0,9	4,6 ± 0,3
13	27,0 ± 1,4	išsidrai- kės scattered	0,57 ± 0,01	50	86,2 ± 2,4	2,80 ± 0,20	vilnoti woolly	6,14 ± 0,40	5,0 ± 0	5,0 ± 0
14	61,0 ± 2,	išsidrai- kės scattered	1,14 ± 0,04	75	86,2 ± 2,4	2,60 ± 0,24	vilnoti woolly	-	4,6 ± 0,5	4,6 ± 0,9
15	69,5 ± 1,5	išsidrai- kės scattered	1,19 ± 0	77,8	85,0 ± 2,9	2,20 ± 0,20	vilnoti woolly	3,29 ± 0,29	4,7 ± 0,4	5,0 ± 0

2 lentelės tęsinys

Table 2 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
16	91,5 ± 1,5	pusiau išsidriakęs semi scattered	0,86 ± 0,01	100	87,5 ± 2,5	4,40 ± 0,24	lygūs even	5,29 ± 0,47	4,2 ± 0,9	5,0 ± 0
17	73,2 ± 2,14	pusiau išsidriakęs semi scattered	1,32 ± 0,01	100	87,5 ± 2,5	5,00 ± 0,32	vilnoti woolly	6,29 ± 0,42	5,0 ± 0	5,0 ± 0

LSD₀₅
R₀₅ = 5,44

* *Paeonia* augalai / Plants of *Paeonia*: 1 – ‘Maironis’; 2 – ‘Virgilijus’; 3 – ‘Garbė Motinai’; 4 – ‘Prof. K. Grybauskas’; 5 – ‘Darius Girėnas’; 6 – ‘Sarah Bernhard’; 7 – ‘Festiva Maxima’; 8 – *P. lactiflora-1*; 9 – *P. lactiflora-2*; 10 – *P. peregrina*; 11 – *P. daurica*; 12 – *P. tenuifolia* var. *plena*; 13 – *P. tenuifolia*; 14 – *P. officinalis* f. *alba plena*; 15 – *P. officinalis* f. *rosea plena*; 16 – *P. anomala*; 17 – *P. weitchii*

3 lentelė. Bijūnų žiedų morfologinė charakteristika LSDI dekoratyvinių augalų kolekcijoje

Table 3. Description of morphologic characters of peonies flowers in LIH collection of ornamental plants

* <i>Paeonia</i> augalai Plants of <i>Paeonia</i>	Žiedo skersmuo Diameter of flower, cm	Žiedo forma Shape of flower	Vainiklapių spalva Colour of petals	Žiedo lytis Sex of flower	Žydėjimo ankstyvumas Earliness of flowering	Žydėjimo trukmė, d. Duration of flowering	Purkos spalva Colour of stigma	Kuokelio kotelio ilgis Length of stem's stamen, cm	Kuokelio kotelio spalva Colour of stem's stamen
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	14,7 ± 0,9	paprastas simple	balti white	dvilytis bisexual	ankstyvi early	10,2 ± 0,6	rausva pink	1,70 ± 0,06	geltona yellow
2	18,2 ± 0,6	dvieilis of two rows	tamsiai rožiniai dark rose	dvilytis bisexual	ankstyvi early	11,5 ± 0,5	rausva pink	1,93 ± 0,05	geltona yellow
3	15,7 ± 0,3	rožiškas rose type	šviesiai rožiniai light rose	vyrishkas male	vid. ankstyvi average early	11,7 ± 1,4	nėra there is no	1,86 ± 0,06	geltona yellow
4	13,7 ± 0,7	pusiau rutulinis semi ball	karmniniai raudoni carmine red	sterilus sterile	vėlyvi late	14,2 ± 0,8	nėra there is no	-	neturi there is no

3 lentelės tęsinys

Table 3 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	15,3 ± 1,3	karūninis crown type	šviesiai rožiniai light rose	sterilus sterile	vėlyvi late	12,0 ± 0,8	nėra there is no	-	neturi there is no
6	21,7 ± 0,9	rožiškas rose type	alyviškai rožiniai olive rose	sterilus sterile	vid. ankstyvi average early	13,2 ± 0,7	nėra there is no	-	neturi there is no
7	19,3 ± 0,3	rožiškas rose type	balti white	moteriška female	vidutiniai average	13,0 ± 1,1	geltona yellow	-	neturi there is no
8	8,2 ± 0,2	paprastas simple	balti white	dvilytis bisexual	vid. ankstyvi average early	12,7 ± 1,0	balta white	1,73 ± 0,08	geltona yellow
9	9,5 ± 0,3	paprastas simple	balti white	dvilytis bisexual	vid. ankstyvi average early	12,5 ± 1,0	raudona red	1,75 ± 0,09	geltona yellow
10	7,8 ± 0,2	paprastas simple	tamsiai avietiniai dark crimson	dvilytis bisexual	ankstyvi early	11,7 ± 0,8	rausva pink	2,13 ± 0,09	raudona red
11	8,8 ± 0,6	paprastas simple	alyviškai rožiniai olive rose	dvilytis bisexual	ankstyvi early	8,7 ± 0,5	rausva pink	1,48 ± 0,05	geltona yellow
12	12,3 ± 0,3	pusiau rutulinis semi ball	karmiškai raudoni carmine red	moteriška female	l. ankstyvi very early	7,7 ± 0,6	raudona red	-	neturi there is no
13	8,0 ± 0,1	paprastas simple	kraujo raudono blood red	dvilytis bisexual	l. ankstyvi very early	8,0 ± 0,6	raudona red	1,83 ± 0,05	geltona yellow
14	9,3 ± 0,3	pusiau rutulinis semi ball	kremiškai balti white	moteriška female	l. ankstyvi very early	9,0 ± 0,4	balta white	-	neturi there is no
15	9,7 ± 0,7	pusiau rutulinis semi ball	kre- miškai rožiniai cream rose	moteriška female	l. ankstyvi very early	9,5 ± 0,5	balta white	-	neturi there is no

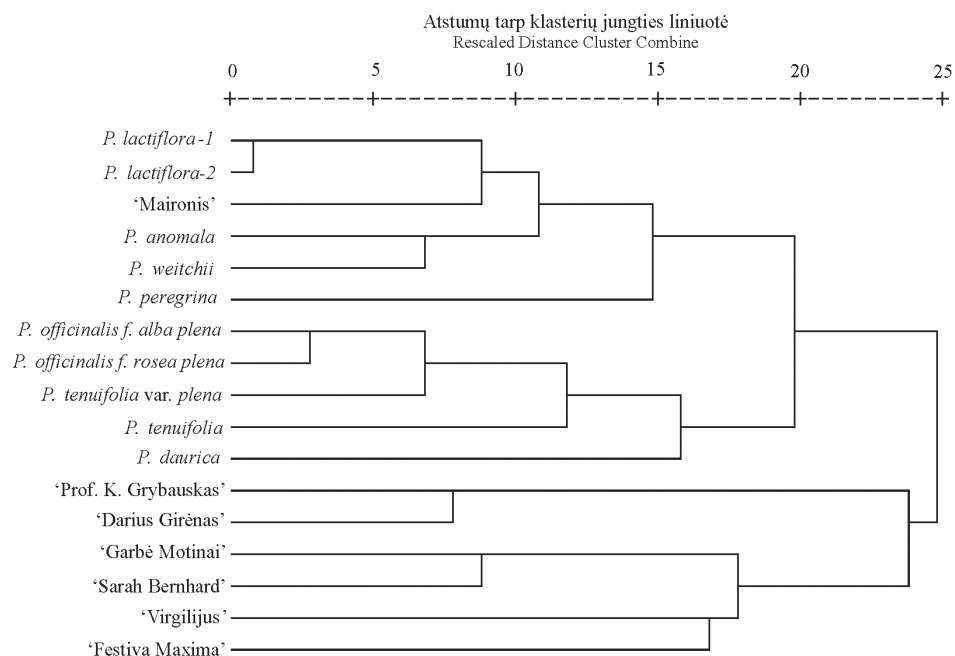
3 lentelės tęsinys

Table 3 continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
16	9,3 ± 0,3	paprastas simple	raudona red	dvilytis bisexual	l. anks- tyvi very early	10,7 ± 0,7	rausva pink	1,30 ± 0,05	rausva pink
17	7,2 ± 0,2	paprastas simple	alyviškai rožiniai olive rose	dvilytis bisexual	l. anks- tyvi very early	11,2 ± 0,8	rausva pink	0,73 ± 0,05	geltona yellow

* *Paeonia* augalai / Plants of *Paeonia*: 1 – ‘Maironis’; 2 – ‘Virgilijus’; 3 – ‘Garbė Motinai’; 4 – ‘Prof. K. Grybauskas’; 5 – ‘Darius Girėnas’; 6 – ‘Sarah Bernhard’; 7 – ‘Festiva Maxima’; 8 – *P. lactiflora*-1; 9 – *P. lactiflora*-2; 10 – *P. peregrina*; 11 – *P. daurica*; 12 – *P. tenuifolia* var. *plena*; 13 – *P. tenuifolia*; 14 – *P. officinalis* f. *alba plena*; 15 – *P. officinalis* f. *rosea plena*; 16 – *P. anomala*; 17 – *P. weitchii*

Tirtų bijūnų augalų polimorfizmas pagal tirtus požymius grafiškai pavaizduotas dendrogramoje (1 pav.). Joje bijūnai iš karto susiskirstė į dvi grupes, kurių kiekviena dar skirstėsi, kol susigrupavo panašiausių individų grupės.



1 pav. *Paeonia* genties augalų hierarchinė klasterinė analizė. Skirtumams tarp genotipų nustatyti naudotas Euklido atstumo kvadratas. Dendrograma konstruota pagal jungties vidurkį tarp grupių.

Fig. 1. Hierarchic clustering analysis of *Paeonia* genus plants. Difference among genotypes estimated by squared Euclidean distance. The dendrogram constructed by between-groups linkage method.

Į vieną grupę pateko visos tirtos rūšys ir porūšiai. Kitoje grupės šakoje susitelkė visos tirtos veislės. Išimtis buvo Lietuvos selekcijos hibridas 'Maironis', kuris buvo prijungtas prie *P. lactiflora* rūšies individų.

Reikia pažymėti, kad pergrupuojant arba įtraukiant naujus fenotipinius požymius klasterinės analizės rezultatai gali kisti. Žolinių bijūnų palyginimas tik pagal morfolo-ginius bei agronominius požymius neleidžia pamatyti, kiek genetiškai viena nuo kitos nutolusios veislės, turinčios gana panašius fenotipus. Parenkant kryžminimui poras vien pagal išorinių požymių vertinimą galima negauti norimo rezultato dėl neįvertinto genetinio atstumo tarp individų.

Žolinių bijūnų giminingumo tyrimą atlikome APPD metodu. Bijūnų bendrosios DNR polimorfinius fragmentus pavyko pagausinti su dešimt pasirinktų pradmenų (4 lentelė).

4 lentelė. APPD analizei naudoti oligonukleotidiniai pradmenys ir su jais pagausintų DNR fragmentų kiekis bei jų dydis

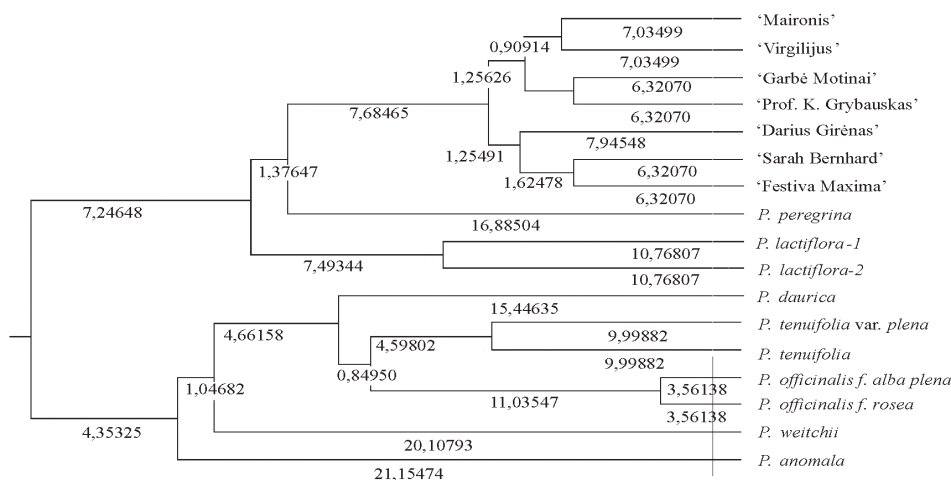
Table 4. List of oligonucleotide primers used for RAPD analysis; number and size of amplified DNA bands

Pradmuo Primer	Nukleotidų seka Nucleotide sequence	Pagausintų fragmentų kiekis Number of amplified bands			Pagausintų fragmentų ilgis Length of ampli- fied bands, bp
		bendras total	monomorfinių monomorphic	polimorfinių polymorphic	
OPA 07	GAAACGGGTG	16	1	15	210–1 300
OPA 08	GTGACGTAGG	13	1	12	140–940
OPA 09	GGGTAACGCC	13	2	11	250–1 000
OPA 18	AGGTGACCGT	13	1	12	200–1 031
OPB 07	GGTGACGCAG	11	3	8	330–720
OPB 08	GTCCACACGG	19	3	16	180–1 300
OPB 17	AGGGAACGAG	24	0	24	120–1 330
OPB 19	ACCCCCGAAG	16	0	16	200–1 200
MP 5	GTCATGCCTGGA	13	2	20	370–1 500
MP 8	GTAAAACGACGGCCATG	22	3	19	400–2 400

Agarozės gelyje išryškintas bendras skirtingo dydžio fragmentų kiekis svyravo nuo 11 iki 24. Pagausinimo metu gautų DNR fragmentų dydis svyravo nuo 120 iki 2 400 bp. Pavyko išskirti 16 skirtingo dydžio monomorfinių fragmentų, kurie gali būti naudojami kaip specifiniai kai kurių genetiškai tirtų bijūnų genotipų žymenys. Pagausinti polimorfiniai fragmentai, būdingi vieniems genotipams, bet neišryškėję kituose, gali būti panaudojami kaip žymenys tai veislei ar rūšiai identifikuoti.

Remiantis 160 agarozės gelyje išryškintų fragmentų, buvo sudaryta genetinio atstumo ir tapatumo matrica. Pagal genetinio atstumo reikšmes tarp tirtų bijūnų genotipų sukonstruota dendrograma (2 pav.). Bendras genetinis atstumas tarp tirtų genotipų buvo 25,50799. Genetiškai tirti žoliniai bijūnai pasidalijo į dvi grupes. Į vieną grupę pateko visos tirtos *P. lactiflora* veislės, abu tirti *P. lactiflora* rūšies genotipai ir *P. peregrina*. Lietuvoje sukurtos veislės 'Maironis', 'Virgilijus', 'Garbė Motinai' ir 'Profesorius K. Grybauskas' dideliu genetiniu atstumu nutolusios nuo laukinių *P. lactiflora* rūšies

individų, todėl šias rūšis tikslinga kryžminti su lietuviškos selekcijos veislėmis. *P. peregrina* rūšis gan dideliu genetiniu atstumu nutolusi nuo *P. lactiflora* veislių, bet jos visos yra vienoje grupėje. Tuo galima paaiškinti faktą, kodėl kryžminant šias rūšis pavyko gauti gyvybingas sėklas. Į kitą grupę pateko introdukuotos rūšys: *P. daurica*, *P. tenuifolia* var. *plena*, *P. tenuifolia*, *P. officinalis* f. *alba plena* ir f. *rosea plena*, *P. anomala* ir *P. weitchii*. Šioje grupėje, esant genetinio atstumo reikšmei 4,35325, genotipai išsiskyrė į dvi grupes. Į vieną grupę pateko šešios žolinių bijūnų rūšys, į kitą – *P. anomala* rūšis. Dendrogramoje išryškėjo šešios poros labai genetiškai artimų individų: ‘Virgilijus’ ir ‘Maironis’, ‘Garbė Motinai’ ir ‘Prof. K. Grybauskas’, ‘Sarah Bernhard’ ir ‘Festiva Maxima’, *P. lactiflora-1* ir *P. lactiflora-2*, *P. tenuifolia* var. *plena* ir *P. tenuifolia*, *P. officinalis* f. *alba plena* ir *P. officinalis* f. *rosea plena*. Į tai reikėtų atkreipti dėmesį parenkant poras bijūnams kryžminti. Palyginę morfologinių požymių ir atsitiktinai pagausintų genetinių fragmentų dendrogramas (1 ir 2 pav.) įsitikime, kad daugelis individų grupavosi panašiai.



2 pav. Genetinis atstumas tarp bijūnų genotipų. Dendrograma sudaryta remiantis genetinio atstumo reikšmėmis pagal Nei's (1978) (PopGene 3.2 programa UPGMA PHYLIP).

Fig. 2. Genetic distance among peony genotypes.

Dendrogram was made by Nei's (1978) on the strength of genetic distance means (PopGene 3.2 program UPGMA PHYLIP).

Bijūnų polimorfizmas ir pagal pasirinktus 83 išorinius vertinimo kriterijus, ir pagal 160 pagausintų DNR fragmentų nebuvo visiškai tapatus. Nesutapimų greičiausiai atsirado dėl to, kad geno dalys, turinčios įtakos bijūnų morfologijai, tik iš dalies ar visai nebuvo amplifikuotos PGR reakcijos metu. Norint pašalinti šį trūkumą, reikia rasti tikslesnius genetinius žymenis, susijusius su tam tikrais morfologiniais požymiais.

Aptarimas. Iki šiol morfologiniu ir fenologiniu aspektu buvo tirtos tik į Lietuvą introdukuotos *P. lactiflora* ir O. Skeivienės sukurtos veislės (Antanaitienė, Stanienė,

2001; Varkulevičienė, Stankevičienė, 2006; Dapkūnienė ir kt., 2007). Lyginant duomenis su jau minėtų ir užsienio autorių veislių aprašymais, nesunkiai galima prijungti tiriamas veisles ir rūšis prie vienos ar kitos bijūnų sodo grupės (Hosoki ir kt., 1991). Be to, tokia analizė leidžia pasirinkti želdynams tinkamiausius individus vietos klimato sąlygomis. Bijūnų palyginimas tik pagal morfologinius požymius neleidžia pamatyti, kiek genetiškai viena nuo kitos nutolusios panašios veislės. Parenkant kryžminimui poras vien pagal išorinių požymių vertinimą galima negauti norimo rezultato dėl neivertinto genetinio atstumo tarp individų. Išsamesniam bijūnų giminingumo tyrimui atlikti dažniausiai naudojama APPD analizė (Pei ir kt., 1995; Hosoki ir kt., 1997c; Zouy-Ping ir kt., 1999). Bijūnų bendrosios DNR polimorfinius fragmentus pavyko pagausinti su dešimt pasirinktų pradmenų. Kitaip nei kiti jau minėti autoriai, tyrę *Paeonia* genties polimorfizmą APPD metodu, mes, be OPA ir OPB pradmenų, ištyrėme ir MP grupės pradmenis. MP 5 ir MP 8 pradmenys, turintys po 12 ir 17 nukleotidų, gerai tiko tirtų rūšių ir veislių DNR analizei. Įvertinus APPD metodu gautus duomenis, atsirado galimybė palyginti Lietuvoje išvestas bijūnų veisles su pasaulyje jau genetiškai tirtomis Europos, Kinijos ir Japonijos (Hosoki ir kt., 1997 a) selekcijos žolinių bijūnų veislėmis. Be to, pagausinti polimorfiniai fragmentai, būdingi vieniems genotipams, bet neišryškėję kituose, gali būti panaudojami kaip žymenys tai veislei ar rūšiai identifikuoti. Mūsų tyrimuose genetiškai tirti bijūnai pasidalijo į dvi grupes. Į vieną grupę pateko visos tirtos *P. lactiflora* veislės, abu tirti *P. lactiflora* rūšies genotipai ir *P. peregrina*. Japonijos mokslininkų duomenimis laukinė *P. lactiflora* rūšis, kilusi iš Kinijos, o į Japoniją introdukuota X amžiuje, yra genetiškai artimesnė daugeliui šiose šalyse sukurtų veislių nei europinės kilmės veislės. Mūsų rezultatai rodo, kad Lietuvoje sukurtos veislės 'Maironis', 'Virgilijus', 'Garbė Motinai' ir 'Profesorius K. Grybauskas' taip pat gana dideliu genetiniu atstumu nutolusios nuo laukinių *P. lactiflora* rūšies individų, todėl jas tikslinga įtraukti į kryžminimų su *P. lactiflora* rūšimi schemas. Hosoki su bendraautoriais (1997a) ir mūsų tyrimai parodė vidutinį genetinį atstumą tarp *P. peregrina* rūšies ir *P. lactiflora* veislių, esančių vienoje grupėje. Tuo galima paaiškinti faktą, kodėl tik atliekant šių rūšių (*P. lactiflora* ir *P. peregrina*) selekcinis kryžminimus institute pavyko gauti gyvybingas sėklas. Reikėtų atkreipti dėmesį į analizės metu išryškėjusias labai artimų individų poras. Svarbu į tai atsižvelgti parenkant poras bijūnams kryžminti. Palyginę dendrogramas (1 ir 2 pav.) pamatėme, kad kartais gana toli genetiškai nutolusios rūšys pasirodo labai artimos fenotipiškai. Anot Zheng (2002), tai atsitinka dėl to, kad genomo dalys, turinčios įtakos bijūnų morfologiniams požymiams, PGR reakcijos metu buvo amplifikuotos tik iš dalies ar visai nebuvo amplifikuotos.

Išvados. Žoliniai bijūnai, augantys LSDI dekoratyvinių augalų kolekcijoje, išsiskyrė didele morfologinių požymių įvairove. Ištirtos *Paeonia* rūšys ir veislės buvo skirtingai polimorfiškos ir pagal morfologinius ir pagal genetinius požymius. Rūšių ir veislių giminingumui nustatyti grupuoti pagal morfologinius požymius nepakanka.

Gauta 2008 12 01
Parengta spausdinti 2008 12 16

Literatūra

1. Antanaitienė R., Stanienė G. 2001. Research on morphological and ornamental traits of *P. lactiflora* Pall. Varieties. Sodininkystė ir daržininkystė, 20(1): 44–54.
2. Bigger M. D., Karrels M. C., Krekler W. H., Peyton G. W., Pirone P. P., Saunders S., Wister G. S., Wolfe H. E. 1955. The Peonies. American Horticultural Society, Washington.
3. Dapkūnienė S., Varkulevičienė J., Stankevičienė A., Motiejūnaitė O. 2007. Kauno botanikos sode sukurtų bijūnų morfologinių ir dekoratyvinių savybių tyrimas. Sodininkystė ir daržininkystė, 26(3): 217–225.
4. Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. Focus, 12: 13–15.
5. Hosoki T., Nagasako T., Kimura D., Nishimoto K., Hasegawa R., Ohta K., Sugiyama M., Haruki K. 1997 a. Classification of Herbaceous Peony Cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 65(4): 843–849.
6. Hosoki T., Nagasako T., Kimura D., Nishimoto K., Hasegawa R., Ohta K., Sugiyama M., Haruki K. 1997 c. Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Scientia Horticulturae, 70: 67–72.
7. Hosoki T., Nagasako T., Kimura D., Nishimoto K., Hasegawa R., Ohta K., Sugiyama M., Haruki K. 1997 b. Comparative Study of Tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) Cultivars and Hybrids by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 66(2): 393–400.
8. Hosoki T., Seo M., Hamada M., Itoh K., Inaba K. 1991. New Classification Method of Herbaceous Peony Cultivars Based on Morphological Characters and Distribution Pattern of Flavone / Flavonol Components in the Petals. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 59(4): 787–793.
9. Pei Y., Zou Y., Yin Z., Wang X., Zhang Z., Hong D. 1995. Preliminary Report of RAPD Analysis in *Paeonia suffruticosa* subsp. *spontanea* and *Paeonia rockii*. Acta Phytotaxonomica Sinica, 33(4): 350–356.
10. Stern F. C. 1946. A study of the genus *Paeonia*. The Royal Horticultural Society, London.
11. Tarakanovas P. 1999. Statistinių duomenų apdorojimo programos paketas „Selekcija“. Akademija.
12. Vaidelys J. 2005. Dekoratyviųjų žolinių augalų fenologinių stebėjimų, biometrinių matavimų ir sortimento sudarymo metodika. Kauno kolegija, Mastaičiai.
13. Varkulevičienė J., Stankevičienė A. 2006. Lietuvoje sukurtų bijūnų veislių ir hibridų introdukcija ir tyrimai Kauno botanikos sode. Vytauto Didžiojo universiteto botanikos sodo raštai, XI: 36–44.
14. Zheng G., Cheng X., Meng L. 2002. RAPD-PCR Analysis on Genetic Relationships between Cultivars of Tree Peony. Agricultural Sciences in China, 7: 792–797.
15. Zou P., Caim L., Wangzi P. 1999. Systematic studies on *Paeonia* sect. Moutan DC. based on RAPD analysis. Acta Phytotaxonomica Sinica, 37(3): 220–227.

16. Žliobienė E., Butkienė D., Juronis V. 1987. Vijūnai. Kaunas.
17. Кемулария-Нотадзе Л. М. 1958. К вопросу о положении семейства *Paeoniaceae* в системе покрытосеменных растений. Заметки по систематике и географии растений, 20: 19–29.

SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ. SCIENTIFIC ARTICLES. 2008. 27(4).

Morphologic and genetic polymorphism of herbaceous peony

I. Mažeikienė, V. Stanys, Š. Morkūnaitė-Haimi, G. Stanienė

Summary

In widening *Paeonia* genus traits with breeding, it is important to select plants with higher morphologic and genetic distance for hybridization process. Comparison of peonies by external characters only does not enable to estimate distance among species or varieties with similar morphologic traits. Selecting pairs for hybridization by morphologic characters only, we may not get desirable results due to unvalued genetic distance among genotypes. In our research we investigated morphologic and genetic polymorphism of 17 herbaceous species of *Paeonia* genus and Lithuanian or European peony varieties and hybrids. We established the genetic identity of peony genotype samples by the RAPD markers, and morphologic relationship according to 19 traits. Estimation and observation of morphologic characters of plant habit and flowers was executed during 2003–2007 at the Lithuanian Institute of Horticulture. Binary matrix was calculated for 83 characteristics of plants. Ten oligonucleotide primers were used for amplification of polymorphic bands from total DNA of peony. 11 to 24 number of DNA bands were obtained in our experiments, and their size varied from 120 to 2 400 bp. Genetic distance and identity of peonies was calculated by 160 identified DNA bands. In our research there was established the extensive variety of morphologic characters of peony in a collection of ornamental plants of LIH. Investigated species and varieties of *Paeonia* showed polymorphism depending on morphologic or on genetic traits.

Key words: genotype, morphologic characters, *Paeonia*, polymorphism, RAPD.