

In vitro technieken ten behoeve van het
doorbreken van kruisingsbarrières binnen
het geslacht *Lilium* (lelie)

VERTROUWELIJK

J.M. van Tuyl

CPRO-DLO

MAART 1998

CPRO-DLO

In vitro technieken ten behoeve van het
doorbreken van kruisingsbarrières binnen
het geslacht *Lilium* (lelie)

VERTROUWELIJK

J.M. van Tuyl

Eindrapportage

Het project 'In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken van kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie)' werd gefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken (Subsidieregeling bedrijfsgericht technologisch onderzoek door collectiviteiten 1993) en de lelie-veredelingsbedrijven: Bischoff Tulleken B.V., Gebr. S. & G. Bottema, Imanse Lelieveredeling B.V., De Jong Beheer, Gebr. Laan & Zn Vof, Lybelmex Hillegom BV, Sande B.V., Testcentrum voor Siergewassen, Trior Lelie B.V., Gebr. Vletter & Den Haan en World Breeding B.V.

Niets uit deze uitgave mag worden openbaar gemaakt of vermenigvuldigd zonder voorafgaande schriftelijk toestemming van CPRO-DLO en de 11 lelieveredelingsbedrijven

INHOUD

Hoofdstuk 1: Inleiding

- 1.1 Algemene gegevens van het project
- 1.2 Personele bezetting
- 1.3 Doel van het onderzoek
- 1.4 Samenvatting van de resultaten
- 1.5 Conclusies
- 1.6 Vervolgonderzoek

Hoofdstuk 2: Projectomschrijving

- 2.1 Probleemstelling
- 2.2 Doelstelling
- 2.3 Achtergrondinformatie
- 2.4 Werkplan
- 2.5 Te verwachten resultaten en toepassingen
- 2.6 Organisatie van het onderzoek
- 2.7 Literatuur

Hoofdstuk 3: Onderzoekresultaten

- 3.1 Doorbreken van kruisingsbarrières
 - 3.1.1 Optimalisatie bestuivings- en embryoreddingstechnieken
 - 3.1.2 Geslaagde kruisingscombinaties
- 3.2 Polyploidisatie onderzoek
 - 3.2.1 In vitro polyploidisatie
 - 3.2.2 In vivo polyploidisatie
 - 3.2.3 Kruisbaarheid op polyploid niveau
- 3.3 Toetsing op Fusarium-resistentie
- 3.4 Introgressie van eigenschappen

Hoofdstuk 4: Wetenschappelijke output.

Bijlagen.

1. Embryoreddingsprotocol
2. Media
3. In vitro chromosoomverdubbelingsprotocol
4. Fusarium-toetsingresultaten
5. Foto's van 6 OA-hybriden.

Hoofdstuk 1: Inleiding

1.1 Algemene gegevens van het project

Titel: In vitro technieken ten behoeve
van het doorbreken kruisingsbarrières
binnen het geslacht Lilium (lelie)

EZ-projectnummer: SBC93004
CPRO-DLO projectnummer: 2.080.016 (9232)
Periode: 1/1/94-31/12/97
Instelling: DLO-Centrum voor
Plantenveredelings- en Reproductie
Onderzoek (CPRO-DLO), Postbus 16, 6700 AA
Wageningen
Telefoon: 0317-477001
Contactpersonen: Dr. Ir. J.M. van Tuyl, Dr. Ir.
H.M.C. van Holsteijn

1.2 Personele bezetting

Voor dit project aangesteld personeel:
Ing. H. Meijer (2 dagen/week)
Ing. B. van Kronenburg- van de Ven (3 dagen/week)
A. van Dijken (2½ dag/week)
Begeleiding en ondersteuning door CPRO-medewerkers:
Dr. J.M. van Tuyl
Dr. H.J.M. Löffler
Dr. M. Wagenvoort
Dr. H.M.C. van Holsteijn
Dze bezetting is volledig gerealiseerd.

In de bollenprojectgroep 'Soortkruisingen' (later Bulb Research Meeting) werd het onderzoek maandelijks besproken.

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. B. van Kronenburg- vd Ven	CPRO-DLO
Ing. H. Meijer	CPRO-DLO
A. van Dijken	CPRO-DLO
Dr. J.M. van Tuyl	CPRO-DLO
Dr. H.M.C. van Holsteijn	CPRO-DLO
Ing. P.C. Schenk (voorzitter)	Bischoff Tulleken BV
S. Bottema	Gebr S. & G. Bottema
N. van Buggenum	Lybelmex Hillegom BV
H. Imanse	Imanse Lelieveredeling BV
Ir. D. Keulen en later Den Haan	Ir. A. Vletter Gebr. Vletter &
Ir. D. van Kleinwee	De Jong Beheer BV
P.J. Kos	World Breeding BV
Ing. K. Laan	Gebr. Laan & Zn Vof

De belangrijkste aspecten waardoor het onderzoek geslaagd is, zijn kort samengevat:

- * Het optimaliseren van de bestuivings-, embryoreddings-, en polyploïdisatie technieken en de grootschalige opzet. Factoren die van belang bleken te zijn, waren temperatuur, juiste tijdstip van embryoredding, ontwikkeling van de embryozakcultuurtechniek, aanpassing van het medium (gelrite i.p.v. agar) en snelle verificatie van de verkregen hybriden middels flowcytometrie.

- * Polyploidisatie van steriele F1-hybriden is vervolgens op grote schaal ingezet en veel fertiel polyloid materiaal is reeds verkregen. Hiermee zijn diverse interessante terugkruisingspopulaties verkregen die voor nadere analyse zijn ingebracht in het reeds gestarte vervolgonderzoek.

Er is een aanvang gemaakt met het onderzoek naar introgressie van de gewenste eigenschappen in de hybridepopulaties. Hiertoe is de Genomische In Situ Hybridisatie techniek (GISH) voor lelie ontwikkeld. De eerste resultaten, die wijzen op introgressie van genetisch materiaal, zijn reden om deze techniek ook bij veel van het nog niet onderzochte hybride materiaal toe te gaan passen in het vervolgonderzoek.

1.5 Conclusies

- * De doelstelling van het project is gehaald: er zijn vele honderden hybriden tussen Oriental en Aziatische hybriden verkregen.

- * Optimalisatie van de bestuivings-, embryoreddings-, en polyploïdisatie technieken heeft plaats gevonden.

- * De invloed van het genotype op het slagen van een bepaalde kruising is duidelijk aangetoond.

- * De grootschalige aanpak met gebruik van een breed scala van genotypen hebben geleid tot een brede genetisch basis van de OA-hybriden.

- * Genomische In Situ Hybridisatie techniek (GISH) is voor lelie in ontwikkeling genomen en kan een belangrijke bijdrage leveren voor onderzoek naar introgressie van eigenschappen in de hybridepopulaties.

1.6 Vervolgonderzoek

De gestelde doelstellingen zijn volledig gehaald. Er is echter zoveel uniek materiaal ontwikkeld waarvan de eigenschappen nog niet onderzocht zijn, dat vervolgonderzoek noodzakelijk is. Er is, gefinancierd door dezelfde groep van 11 bedrijven, daarom aansluitend aan dit project vervolgonderzoek gestart.

Vertrouwelijk

vertrouwelijk

Hoofdstuk 2: Projectomschrijving

IN VITRO TECHNIEKEN TEN BEHOEVE VAN HET DOORBREKEN VAN KRUISINGSBARRIÈRES BINNEN HET GESLACHT *LILIUM* (LELIE).

Samenvatting

Het Nederlandse lelieveredelingsbedrijfsleven neemt een prominente plaats in op de wereldmarkt voor leliebollen. Voor het behouden van deze sterke concurrentiepositie is het noodzakelijk dat nieuwe doorbraken in de lelieveredeling bewerkstelligd worden. Naast de commercieel belangrijke sortimentsverbreding richt de veredeling zich vooral op de introductie van resistentie-eigenschappen, waardoor het bestrijdingsmiddelengebruik in de leliebollenteelt teruggedrongen wordt. Resistenties worden in verschillende lelie-soorten en hybridegroepen aangetroffen. Kruisingsbarrières beletten echter de uitwisseling van eigenschappen tussen deze soorten en hybridegroepen. Door toepassing van in vitro bloembiologische en cytogenetische technieken kunnen deze kruisingsbarrières omzeild worden.

Het doel van dit project is het ontwikkelen en optimaliseren van de technieken voor het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor belangrijke eigenschappen van de twee belangrijkste hybride groepen gecombineerd kunnen worden met die van o.a. de soorten *Lilium henryi* en *L. longiflorum*. In het onderzoek worden de nieuwe bestuivings- en embryoredingstechnieken toegepast, waaronder in vitro geënte stijl en vruchtbeginselmethoden in combinatie met in vitro bestuiving waardoor een regulatie van het gehele bestuivingsproces mogelijk wordt. Met behulp van cytogenetische technieken wordt de fertiliteit van het hybridemateriaal vastgesteld en bruikbaar gemaakt voor vervolg veredelingswerk. Door toetsing op *Fusarium*-resistentie wordt de introgressie van de genetische eigenschappen vastgesteld in hybridepopulaties. De resultaten van dit onderzoek kunnen leiden tot één groep van hybride-lelies, waarin een combinatie van diverse resistenties (*Fusarium*, *Botrytis*, virus) mogelijk wordt, waardoor het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen in de bollenteelt aanzienlijk kan worden teruggedrongen. Zo'n nieuwe groep lelies zal bijdragen aan de vernieuwing van het sortiment.

1. Probleemstelling

1.1 De lelieteelt en -veredeling

De lelie (*Lilium* L.) is na de tweede wereldoorlog uitgegroeid tot één van de belangrijkste snijbloemgewassen. De laatste 25 jaar is het areaal leliebollen bijna vertwintigvoudigd. Van 'bijgoed' is de lelie opgeklommen tot in de 'snijbloemen top 5'. Het

Nederlandse leliebedrijfsleven heeft hierbij mondiaal een prominente rol ingenomen. Verreweg het grootste bollenteeltareaal bevindt zich in Nederland en vrijwel alle nieuwe lelierassen worden ontwikkeld door de Nederlandse veredelaars. Ca 80% van de in Nederland geproduceerde leliebollen wordt geëxporteerd voor bloemproductie elders. Daarnaast worden ook door de Nederlandse veredelaars ontwikkelde rassen onder licentie in het buitenland geteeld. De belangrijkste concurrenten zijn Japan en de USA, waar ook een belangrijk deel van de teelt plaats vindt. De Nederlandse lelieteelt kan de vooraanstaande positie op de wereldmarkt alleen handhaven door actief in te spelen op de wensen van teelt en handel en op de milieu-eisen die door de overheid aan de teelt gesteld worden. In het Meerjarenplan Gewasbescherming stelt dat het gebruik van chemische middelen met 50% moet zijn verminderd ten opzichte van het gebruik in 1990. De veredeling speelt hierbij een wezenlijke rol door de ontwikkeling van nieuwe rassen die naast een verbreding en vernieuwing van het sortiment in toenemende mate gericht is op de introductie van resistenties tegen ziekten. Door toepassing van nieuwe bloembiologische en cytogenetische technieken zullen de mogelijkheden voor de lelieveredeling worden vergroot. Er komen eigenschappen beschikbaar uit andere soorten en hybridegroepen waarmee de genoemde veredelingsdoelen kunnen worden bereikt. Voorwaarde is dat de technieken om soortkruisingsbarrières te doorbreken aanzienlijk worden geoptimaliseerd en nieuwe kruisingscombinaties mogelijk maken.

2. Doelstelling

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus,; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit betekent:

1. Verder ontwikkelen en optimaliseren van de bestuivings-, embryoreddings- en polyploidisatie technieken, waarmee de gewenste genotypencombinaties verkregen kunnen worden.
2. Introgressie van de gewenste eigenschappen in de hybridepopulaties, door toepassing van cytogenetische technieken en met name getoetst aan de genetische verbetering van *Fusarium*-resistentie.

3. Achtergrondinformatie

3.1. 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 sectie *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 Oriëntal 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 Oriëntal hybriden en *L. henryi* door toepassing van deze technieken gerealiseerd (Van Creij et al. 1993). Door CPRO-DLO 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 CPRO-DLO geslaagde

interspecifieke combinaties, de pijlen duiden op de richting van de pollenwolk. Afkortingen A= Aurelian hybriden; AS= Aziatische hybriden; OR= Oriëntal hybriden; A-H= *L. auratum* x *L. henryi*; L-A= *L. longiflorum* x Aziatische hybriden; LO= *L. longiflorum*; HE= *L. henryi*; CO= *L. concolor*; DA= *L. dauricum*; CA= *L. candidum*.

3.2. 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 intra-specifieke kruisingen, maar vooral bij zelfbestuivingen. Incongruentie komt bij lelie voor bij interspecifieke kruisingen.

Bij *Lilium* worden globaal 2 reactietypen van incongruentie onderscheiden, waarbij de pollenbuisgroei 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 Landbouwuniversiteit 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 CPRO-DLO 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 LUW en CPRO-DLO 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 reeds in vitro gebracht. Hiermee kan uiteindelijk het gehele bevruchttingsproces beheerst worden (Zenkteler, 1980). Onderzoek naar in vitro bestuiving is op CPRO-DLO 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).

3.3. *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 CPRO-DLO 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 Oriëntaal 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 Oriëntaal hybriden zou dan ook met behulp van de Aziatische hybriden mogelijk moeten zijn. Wanneer deze aanpak slaagt is sprake van een doorbraak.

4. Werkplan

4.1. Verder ontwikkelen en optimaliseren van de bestuivingsmethoden

4.1.1. Plantmateriaal

Het uitgangsmateriaal bestaat uit soortkruisingsproducten verkregen op CPRO-DLO (Van Tuyl et al. 1991; Van Creij et al. 1993). Dit materiaal is deels diploïd en vrijwel steriel F1-hybride materiaal en deels verdubbeld tetraploïd fertiel materiaal (zie Tabel). Dit materiaal wordt aangevuld met geselecteerde Aziatische, LA en Oriëntaal rassen van de deelnemende bedrijven. Zie ook Fig.1.

Tabel: Uitgangsmateriaal voor de soortkruisingsanalyse met de oudercombinaties, het ploïdieniveau (D=diploïd, T=tetraploïd), de fertiliteit en de herkomst (BEDR=bedrijven)

oudercombinatie herkomst		ploïdieniv.	fertiliteit	
<i>L. longiflorum</i> x <i>L. concolor</i>	D	--	CPRO	
<i>L. longiflorum</i> x <i>L. henryi</i>	TD	+-	CPRO	
<i>L. longiflorum</i> x <i>L. dauricum</i>	TD	+-	CPRO	
LA-hybriden	TD	+-	CPRO/BEDR	
Tetra <i>L. Longiflorum</i>	T	++	CPRO/BEDR	
Tetra Stargazer	T	++	CPRO/BEDR	
Tetra <i>L. henryi</i> x <i>L. candidum</i>	T	++	CPRO/BEDR	
Tetra <i>L. auratum</i> x <i>L. henryi</i>	T	++	CPRO/BEDR	
Tetra Black Beauty	T	++	CPRO	
Tetra <i>L. speciosum</i> x Royal Gold	T	?	CPRO/BEDR	
Aziatische hybriden	TD	++	CPRO/BEDR	
Oriëntaal hybriden	D	++	BEDR	
<i>L. longiflorum</i> x <i>L. rubellum</i>	D	?	CPRO	
<i>L. longiflorum</i> x <i>L. canadense</i>	D	?	CPRO	
<i>L. longiflorum</i> x <i>L. martagon</i>	D	--	CPRO	
<i>L. dauricum</i> x <i>L. concolor</i>	D	+	CPRO	
<i>L. regale</i> x <i>L. henryi</i>	D	+-	CPRO	

4.1.2. Kruisingscombinaties

Uit de tabel weergegeven onder 4.1.1 en Fig. 1 blijkt dat reeds veel halfmateriaal verkregen is. Het hoofddoel is het combineren van Aziatische met Oriëntaal hybriden. Rechtstreeks blijkt dit zeer moeilijk te zijn. Vandaar dat de aandacht vooral gelegd zal worden op de volgende tetraploïde geniteurs die zoveel mogelijk in alle combinaties zullen worden uitgevoerd:

(*L. longiflorum* x *L. henryi*), (*L. auratum* x *L. henryi*) en/of Black Beauty, LA hybriden (inclusief *L. longiflorum* x *L. dauricum*), (*L. henryi* x *L. candidum*), Aziatische hybriden en Oriëntaal hybriden. Afhankelijk van de uitkomsten van het kruisings- en het cytogenetisch-onderzoek zal met de meest perspectiefrijke combinaties op grotere schaal worden doorgaan. Indien deze aanpak na het eerste jaar van onderzoek niet succesvol is, kan als alternatief de brug met Aurelian-hybriden (*L. regale* x *L. henryi*, tetra *L. speciosum* x Royal Gold) overwogen worden. Uit Japans, Amerikaans en Duits onderzoek (Asano, 1982a; Freimann, 1988; Ewald & Reiser, 1993) is de mogelijke brugfunctie van deze hybridegroep reeds aangetoond. Na het tweede jaar van onderzoek zal een tussentijdse evaluatie plaats vinden op grond waarvan een GO-NOGO-beslissing genomen kan worden.

4.1.3. Pollenbuisgroei

Om het resultaat van de verschillende bestuivingstechnieken (zie 4.1.4.) te kunnen voorspellen, waardoor al dan niet voor bepaalde embryoreddingstechnieken zal worden gekozen, zal bij veel experimenten de pollenbuisdoorgroei worden bestudeerd.

4.1.4. Bestuivingstechnieken

Naast de meest toegepaste afgesneden-stijl methode zijn op CPRO-DLO de (in vitro) geënte stijl en geënte vruchtbeginsel en de placentale bestuiving als techniek om barrières voor de bevruchting te omzeilen ontwikkeld. Deze methoden zullen in dit project worden toegepast en geoptimaliseerd. Dit zal gebeuren in combinatie met toepassing van hoge kastemperatuur (fytotron) en aanwending van hormonen (BA) om vruchtbeginsels in leven te houden. Deze methoden zullen afhankelijk van de resultaten van de pollenbuisgroei in diverse combinaties worden toegepast.

4.1.5. Embryoreddingstechnieken

Embryocultuur is de meest bekende algemeen toegepaste techniek om barrières na de bevruchting te omzeilen. Toepassing van de ovarium-, ovariumplak en zaadknopcultuurmethode zijn technieken die een verbetering betekenen, maar optimalisatie van deze technieken is gewenst gezien het arbeidsintensieve karakter van deze technieken. Ook nieuwe inzichten zoals de toepassing van vloeibaar medium zouden een verbetering van deze technieken kunnen bewerkstelligen. In het huidige project zullen deze technieken in vergelijkende proeven worden toegepast.

4.1.5. Verificatie van de kruisingsproducten

Het is van belang om van soortkruisingsproducten in een vroeg stadium het hybridekarakter te kunnen vast stellen, zodat in vitro bijvoorbeeld reeds met chromosoomverdubbeling kan worden begonnen voordat hybriden hebben gebloeid. Hiertoe zijn isoenzymeanalyses zeer geschikt en hebben aangetoond bruikbaar te zijn (van Tuyl, et al. 1986). Zodra een hybride voor het eerst in bloei komt kan het hybridekarakter eenvoudig worden vastgesteld, vanwege het intermediaire karakter van de soortkruisingsproducten.

4.1.6. Polyploïdisatietechnieken

Chromosoomverdubbeling kan zowel in vitro als in vivo efficiënt uitgevoerd worden door behandeling met oryzaline of colchicine (Van Tuyl et al. 1993.) Selectie van tetraploïd materiaal gebeurt met behulp van flowcytometrische bepaling (Geenen, 1993).

4.2. Introgressie van eigenschappen

4.2.1. Cytogenetische technieken

De fertiliteit en de introgressie van eigenschappen bepalen de bruikbaarheid van soortkruisingscombinaties voor verdere toepassing in veredelingsonderzoek. Met behulp van meiotisch onderzoek van de hybriden kan vastgesteld worden in hoeverre paring van de chromosomen in metafase I plaats vindt. Afhankelijk van de gevonden afwijkingen in de meiose kan besloten worden met bepaalde hybriden verder te werken of niet. Na chromosoomverdubbeling wordt opnieuw de fertiliteit en het meiotisch gedrag onderzocht, waaruit moet blijken in hoeverre geschiktheid als geniteur voldoende geacht kan worden.

4.2.2. Toetsing op *Fusarium*-resistentie

De hybride planten worden, zodra voldoende materiaal voorhanden is met behulp van de schubboltoetsmethode getoetst op resistentie tegen *Fusarium*. Een vergelijking zal plaats vinden met de ouderrassen, zodat informatie beschikbaar komt over de mate van introgressie van de *Fusarium*-resistentie.

4.3. Overdracht van geniteurs aan bedrijfsleven

Een deel van het door CPRO-DLO ingebrachte halfmateriaal wordt, zodra voldoende materiaal voorhanden is, eveneens ter beschikking gesteld aan de deelnemende bedrijven. Tijdens het verloop van het project zal per jaar bekeken worden welke nummers beschikbaar kunnen komen. Aan het einde van het project wordt het halfmateriaal (geniteurs) verdeeld over de deelnemende bedrijven.

4.4. Tijdschema

Tijdschema voor het project (4 jaar) met go-nogo tijdstip

Onderdeel	1994	1995	1996	1997
4.1.1 - 4.1.4	xxxxxxxx	xxxx	xxxx	x
4.1.5 - 4.1.6	xx	xxxxx	xxxx	xx
4.2.1	xx	xxxxx	xxxx	xxx
4.2.2	xx	xx	xxxx	xxxx
4.3	x	xx	xx	xxxxx

go-nogo

5. Te verwachten resultaten en toepassingen

Het onderzoek zal leiden tot efficiënte methoden om soortkruisingsbarrières bij lelies te doorbreken. Kennis zal verkregen worden over:

- de geschiktheid van diverse in vitro bestuivingstechnieken
- de meest efficiënte embryoreddingsmethoden
- bruikbaarheid van in vitro chromosoomverdubbeling ten behoeve van herstel van fertiliteit
- het optreden van meiotische afwijkingen in complexe soortkruisingsbarrières
- de geniteurswaarde van de diverse soortkruisingsproducten
- introgressie van *Fusarium*-resistentie in hybridepopulaties
- mogelijkheden van geheel nieuwe kruisingscombinaties (o.a. t.a.v. bloemkleur, bloemvorm) en hybridecomplexen
- perspectieven voor andere in vitro bloembioologische technieken.

Toepassing van de cytogenetische en bloembioologische technieken zal leiden tot:

- fertiele soortkruisingsproducten met een combinatie van eigenschappen van zowel Aziatische als Oriëntaal hybriden
- introductie van een combinatie van resistentiegenen waaruit nieuwe commerciële rassen ontwikkeld kunnen worden
- nieuw fertiel tetraploïd halfmateriaal, waarin veel gewenste eigenschappen zijn samengebracht. Hiermee kunnen de deelnemende veredelingsbedrijven zelf een geheel nieuw type hybride rassen ontwikkelen.

Het project kan leiden tot de productie van een nieuw leliesortiment met resistenties tegen diverse ziekten, waardoor het gebruik van bestrijdingsmiddelen in de bollenteelt wordt teruggedrongen.

6. Organisatie van het onderzoek

Voor de uitvoering van het onderzoek worden aangesteld:

- een assistent-onderzoeker met ervaring op het gebied van bloembiologische en cytogenetische technieken
- een parttime gewasverzorger met ervaring in de teelt, bloeispreiding en weefselkweek van lelies

Het onderzoek zal worden uitgevoerd bij CPRO-DLO gebouw De Goor. Daarbij zal gebruik gemaakt worden van de laboratoria en weefselkweekfaciliteiten, kassen en het fytotron.

Het onderzoek wordt medegefinancierd door 11 in Nederland en mondiaal de belangrijkste lieldieveredelings- en vermeerderingsbedrijven. Vertegenwoordigers van alle bedrijven hebben zitting in een begeleidingscommissie, die het onderzoek begeleid en twee keer per jaar bijeenkomt. De resultaten komen *direct* ter beschikking van deze bedrijven middels periodieke verslaglegging, advisering en -zo nodig- begeleiding in hun laboratoria. Geniteurs worden, zo nodig na vermeerdering, onder de deelnemende bedrijven verdeeld. Deze bedrijven zullen deze geniteurs gebruiken voor eigen rasontwikkeling. De resultaten zullen ook worden bekend gemaakt door het geven van lezingen op congressen en door publicatie in vakbladen en wetenschappelijk tijdschriften, met in achtneming van contractueel vastgelegde afspraken tussen CPRO-DLO en de deelnemende bedrijven.

7. Literatuur

- 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.
- 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 Creij, 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 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(1980), chapter 15: 137-156.

Hoofdstuk 3: Onderzoekresultaten

3.1 Doorbreken van kruisingsbarrieres

3.1.1 Optimalisatie bestuivings- en embryoreddingstechnieken

De eerste 2 jaar van het project werden bestuivingen, zowel onder kasomstandigheden als onder verhoogde temperaturomstandigheden in het fytotron uitgevoerd. Hieruit bleek dat een verhoogde kastemperatuur (minimum 20°C) een verhoogd vruchtzettingsresultaat te zien gaf. In het vervolg van het onderzoek werd tijdens het kruisingsprogramma en de periode tot embryo rescue de verhoogde kastemperatuur gehandhaafd.

De afgesneden stijl methode bleek tijdens de onderzoeksperiode voor de te maken kruisingscombinaties de beste bestuivingsmethode.

Bij de embryoredding blijken enkele factoren een cruciale rol te spelen: het tijdstip van inzet, de methode en het medium. Voor met name het maken van de OA-hybriden bleek de embryozakcultuurmethode (zie protocol Bijlage 1) efficiënt te werken. De vervanging van agar door gelrite bleek een aanzienlijk betere doorgroei van jonge embryo's en calli te veroorzaken. Agar media worden bij onderzoek niet meer gebruikt (zie media Bijlage 2).

3.1.2 Geslaagde kruisingscombinaties

Met betrekking tot kruisingscombinaties binnen het project was die tussen Oriental x Aziatische (OA) hybriden de belangrijkste. Bij deze kruising zijn vele honderden combinaties gemaakt met een groot aantal Aziatische en Oriental cultivars en afhankelijk van de cultivar zijn meer of minder hybriden verkregen. In totaal kwamen binnen de projectperiode ruim 90 OA-hybriden in bloei, die een brede genetische variatie (bloemkleur, planttype, Fusarium-resistentie) vertoonden. Andere primaire combinaties die tot stand gebracht werden waren:

LO	=	L. longiflorum x Oriental
OL	=	Oriental x L. longiflorum
LL	=	L. longiflorum x L. lankongense
ON	=	Oriental x L. nepalense
OP	=	Oriental x L. pardalinum
OHa	=	Oriental x L. hansonii

Daarnaast slaagde een reeks secundaire combinaties (terugkruisingen), waarbij een tetraploide-F1-hybride werd teruggekruist met één van de ouderhybriden. Hierbij ontstonden tri en tetraploiden:

LCoA = (L. Longiflorum x L. concolor) x Aziatische hybride

LLC = L. longiflorum x (L. longiflorum x L. candidum)
 OHC = Oriental x (L. henryi x L. candidum)
 OLA = Oriental x (L. longiflorum x Aziatische
 hybride)
 ALA = Aziatische hybride x (L. longiflorum x
 Aziatische hybride)
 ALB = Aziatische hybride x (L. longiflorum x L.
 bulbiferum)
 ALD = Aziatische hybride x (L. longiflorum x L.
 dauricum)
 LLO = L. longiflorum x (L. longiflorum x Oriental)
 OLO = Oriental x (L. longiflorum x Oriental)
 OLH = Oriental x (L. longiflorum x L. henryi)
 LLH = L. longiflorum x (L. longiflorum x L. Henryi).

In onderstaande kruisingsveelhoek fig 3.1 zijn de nieuwe geslaagde kruisingscombinaties toegevoegd aan de fig. 1 uit het projectvoorstel.

Fig. 3.1 Een kruisingsveelhoek van het geslacht *Lilium* samengesteld met de nieuwste resultaten binnen het project verkregen. Grote cirkels geven de secties weer. De kleine cirkels de species, de kleine ellipsen bekende soortkruisings-producten en de grote ellipsen de hybridegroepen. Vette lijnen wijzen op door CPRO-DLO geslaagde interspecifieke combinaties, de pijlen duiden op de richting van de pollenwolk. Afkortingen A= Aurelian hybriden; AS= Aziatische hybriden; OR= Oriëntal hybriden; AH= *L. auratum* x *L. henryi*; LO= *L. longiflorum*; HE= *L. henryi*; CO= *L. concolor*; DA= *L. dauricum*; CA= *L. candidum*; HA= *L. hansonii*; PA= *L. pardalinum*; NE= *L.*

nepalense. T= tetraploid gemaakte hybriden en species door CPRO-DLO.

3.2 Polyploidisatie onderzoek

3.2.1 In vitro polyploidisatie

Gedurende het gehele project heeft chromosoomverdubbeling met oryzaline (0.001 en 0.003%) plaats gevonden. In vitro polyploidisatie vond plaats met hybriden die, reeds in een vroeg stadium, uitgekozen werden om te verdubbelen (Oriental x *L. nepalense*; *L. longiflorum* x *L. rubellum*, diverse LO en OA's). In Bijlage 3 is het in vitro chromosoomverdubbelingsprotocol weergegeven. Ook werd deze methode toegepast bij F1-hybriden waarvan in de kas slechts weinig aanwezig was. Deze werden in vitro gezet en tegelijkertijd behandeld met oryzaline (reeks OA-hybriden). Na de behandeling en het opsporen van tetraploide planten via flowcytometrie werden de tetraploiden in vitro tot uitplantbaar bolletje opgekweekt en na een koudebehandeling in de kas opgeplant. Na 1-2 jaar doorteelt is meestal bloeibaar materiaal beschikbaar. Op deze wijze kon van enkele nummers ook snel materiaal worden overgedragen aan de deelnemende bedrijven. In fig. 3.1 staat met een **T** aangegeven welke hybriden en species tetraploid gemaakt zijn op CPRO-DLO.

3.2.2 In vivo polyploidisatie

In vivo polyploidisatie vond binnen het project plaats met genotypen waar in principe enkele grote bollen beschikbaar waren. Dit betrof LD-hybriden die als resistent uit de Fusarium-toets kwamen en een reeks rassen die de bedrijven als uitgangsmateriaal inbrachten. Dit waren Aziatische en Oriental hybriden en *Lilium longiflorum*-rassen. In het laatste jaar van het project kon dit materiaal gebruikt worden voor het maken van kruisingen op tetraploid niveau. In het algemeen was het stuifmeel van alle F1's goed tot redelijk fertiel. De vrouwelijke fertiliteit van tetraploide F1's liet vaak te wensen over.

3.2.3 Kruisbaarheid op polyploid niveau

In het laatste jaar van het project was het mogelijk om een uitgebreid kruisingsprogramma op tetraploid niveau uit te voeren. Hierbij kon gebruik gemaakt worden van tetraploid materiaal van *L. longiflorum*, Oriental-rassen, Aziatische rassen, LA's, LO's, LD's en een enkele OA. Veel kruisingen slaagden met een normale bestuivingsmethode. In de meeste gevallen moest nog wel gebruik gemaakt worden van embryoreddingstechnieken. Aan het einde van het project is veel materiaal, met zeer variërende genetische achtergrond onderweg om beoordeeld en verder geanalyseerd te worden. Duidelijk is wel dat terugkruisingen soms in alle mogelijke richtingen kunnen slagen. Introgressie-onderzoek (3.4) moet uitwijzen in

hoeverre er overkruising plaats vindt tussen de genomen van Longiflorum, Aziatische en Oriental hybriden.

3.3 Toetsing op Fusarium-resistentie

Gedurende de vier jaar van het project werd elk jaar een grote Fusarium-toets uitgevoerd, waarbij met schubbolletjes of plantgoed, nieuwe hybriden of ingebracht oudermateriaal werden getoetst op de aanwezigheid van resistentie.

In enkele soortkruisingspopulaties (LD en OA-populaties) werden grote verschillen gevonden. Het mag hier duidelijk gesteld worden dat wat betreft het inbrengen van Fusarium-resistentie in het lelie-sortiment nog een lange weg te gaan is.

In Bijlage 4 zijn alle getoetste genotypen met hun verkregen ziekteindex (via de schubbolletjes toets) bijeengebracht.

3.4 Introgressie van eigenschappen

Het is van essentieel belang om te weten of de genomen van de diverse hybridegroepen (Aziaat, Oriental en Longiflorum) onderling recombineren. Wanneer dit niet het geval zou zijn kan er geen introgressie van eigenschappen (bv. Fusarium-resistentie) vanuit de ene hybridegroep naar de andere plaatsvinden.

Om dit te onderzoeken is de ontwikkeling van genomisch in situ hybridisatie (GISH) gestart. Met deze techniek kunnen de genomen van Aziaat, Oriental en Longiflorum afzonderlijk zichtbaar gemaakt worden en kunnen overkruisingen tussen deze genomen worden vastgesteld. Binnen het project kon de GISH-techniek voor lelie ontwikkeld worden. Bij een serie *L. longiflorum* x Aziatische hybriden (LA) die 2n-pollen produceren en waarvan 2 volgende generaties beschikbaar waren, konden de genomen van Longiflorum en Aziaat mooi zichtbaar gemaakt worden. In de terugkruising van de LA op een Aziatische moeder ontstonden triploïden. Met behulp van de GISH-techniek kon bij enkele hybriden duidelijk aangetond worden dat recombinatie tussen beide soorten optrad. Daarnaast is het gelukt om een zogenaamde 'multicolour GISH' tot stand te brengen van een OLA-hybride, hierbij konden de chromosomen van de Longiflorum-ouder, de Aziaat en de Oriental in één preparaat afzonderlijk zichtbaar gemaakt worden. Dit betekent dat introgressie van de 3 belangrijkste leliegroepen in nieuwe hybriden nauwkeurig bestudeerd kan worden, zodat nagegaan kan worden welke lijnen wel en welke geen goede introgressie vertonen.

Hoofdstuk 4: Wetenschappelijke output

Halfjaarlijkse verslagen

- In totaal zijn 8 halfjaarlijkse verslagen geschreven. Hierin staan de halfjaarlijkse detailresultaten beschreven en zijn bijlagen toegevoegd.

Voorlichtende publikaties

- Kronenburg, B. van, B. Meijer, A. van Dijken en J. van Tuyl, 1996. Doorbraak in lelieveredeling: Eerste OA-hybriden bloeien, Bloembollencultuur 107(6): 24-25.

- Tuyl, J.M. van, H.-S. Chi, B.C.E. van Kronenburg. & B. Meijer, 1996. In vitro techniques for overcoming interspecific crossing barriers in lily. Acta Botanica Neerlandica 45: 112 (Abstract van lezing NVPW, 10 november 1995)

Wetenschappelijke publikaties

- Karlov, G.I., L.I. Khrustaleva & J.M. Van Tuyl. The use of genomic in situ hybridization (GISH) to examine introgression and mechanism of 2n-pollen production in interspecific hybrids of lily (in voorbereiding).

- Löffler, H.J.M., H. Meijer, Th.P. Straathof & J.M. van Tuyl, 1994. Segregation of *Fusarium* resistance in an interspecific cross between *Lilium longiflorum* and *Lilium dauricum*. Acta Horticulturae 414: 203-208.

- Tuyl, J.M. van & H.M.C. van Holsteijn, 1994. Lily breeding research in the Netherlands. Acta Horticulturae 414: 35-45.

- Tuyl, J.M. van & M.J. de Jeu, 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Chapter 13. In: Sawhney, K.R. & V.K. Shivanna (Eds.). Biotechnology and Crop Improvement, University Press, Cambridge, pp. 273-293.

- Tuyl, J.M. van, 1997. Interspecific hybridization of flower bulbs: a review. Acta Horticulturae 430: 465-476.

- Tuyl, J.M. van, H.S. Chi, B.C.E. van Kronenburg & B. Meijer, 1997. Interspecific lily hybrids: a promise for the future. Acta Horticulturae 430: 539-544.

- Tuyl, J.M. van & E. Boon. Variation in DNA-content in the genus *Lilium*, 1997. Acta Horticulturae 430: 829-835.

Poster-presentaties

- Löffler, H.J.M., H. Meijer, Th.P. Straathof & J.M. van Tuyl, 1994. Segregation of *Fusarium* resistance in an interspecific cross between *Lilium longiflorum* and *Lilium dauricum*. International Symposium on the genus *Lilium* 28 August - 1 September 1994, Taejon, Korea.
- Tuyl, J.M. van, H.S. Chi, B.C.E. van Kronenburg & B. Meijer, 1996. Interspecific lily hybrids: a promise for the future. 7th International Symposium on Flower Bulbs, March 10-16, Israël.
- Tuyl, J.M. van & E. Boon. Variation in DNA-content in the genus *Lilium*, 1996. 7th International Symposium on Flower Bulbs, March 10-16, Israël

Lezingen

- Tuyl, J.M. van & H.M.C. van Holsteijn, 1994. Lily breeding research in the Netherlands. Lecture on the International Symposium on the genus *Lilium*, August 28 - September 1, Taejon, Korea.
- Tuyl, J.M. van & H.M.C van Holsteijn, 1994. Breeding of bulbous crops in the Netherlands. Lecture at the Flower Market Fukuoka, Japan, 19 August.
- Tuyl, J.M. van, H. Meijer & M. Wagenvoort, 1994. Meiotic polyploidization as tool for breeding lilies at tetraploid level. XXIV International Horticultural Congress, 21-28 August, Kyoto, Japan.
- Tuyl, J.M. van, H.S. Chi, B.C.E.van Kronenburg. & B. Meijer, 1995. Weefselkweektechnieken als hulpmiddel bij het doorbreken van kruisingsbarrières bij lelie. Najaarssymposium Ned. Vereniging voor PlantenWeefselkweek (NVWP), Leiden, 10 november 1995.
- Tuyl, J.M. van. Lily production and breeding of lilies in the Netherlands. Lily Symposium, National Horticultural Research Institute, Suwon, Republic of Korea, 26 June 1997.

Bijlage 1 Embryoreddingsprotocol

PROTOCOL

HET IN VITRO BRENGEN VAN LELIE-EMBRYO'S EN ZAADKNOPPEN

25 Tot 70 dagen na het bestuiven van de bloemen in de kas, meestal met de afgesneden stijl techniek, worden de zaaddozen verder in het lab behandeld.

Van welke techniek er gebruik wordt gemaakt om de zaadknoppen en/of embryo's te isoleren, is behalve afhankelijk van de kruisingscombinatie ook vooral een kwestie van 'gevoel' en ervaring. Pas op het moment dat de zaaddoos opengemaakt wordt, kan er worden beslist wat er met de zaden gebeurt.

Globaal geldt het volgende.

zaadknopcultuur, embryocultuur en embryozak cultuur.

De zaaddoos wordt van de plant gehaald als: - deze zacht begint aan te voelen, of
- als er afwijkende vergeling optreedt.

Na het open maken van de zaaddoos kunnen er verschillende dingen aan de hand zijn.

- * I Alle zaden zijn groen of wit en zien er allemaal hetzelfde uit.
Als de zaden er zo uitzien was het vruchtbeginsel vaak niet zacht, maar voelde nog hard en stevig aan. In dit geval worden alle zaden op zaadknopcultuur medium gelegd.
- * II Alle zaden zijn even klein, bruin en verschrompeld.
De zaden uit deze zaaddoos worden niet ingezet. Er is in dit geval te lang gewacht met het oogsten van de zaaddoos, of de gemaakte kruising was niet succesvol.
- * III Een deel van de zaden zijn bruin en verschrompeld, sommige zijn nog wit of groen en klein en enkele zijn wit of groen en gezwollen.
 - De kleine bruine verschrompelde zaden worden weggegooid.
 - De kleine wit/groene zaden worden op zaadknopcultuur medium gelegd.
 - De gezwollen wit/groene zaden worden onder de binoculair opengemaakt.
Als er een embryo zichtbaar is wordt dit geïsoleerd, en op embryocultuur medium gelegd.
Als er geen embryo zichtbaar is wordt de embryozak op embryocultuur medium legd.
 - Soms is een zaadknop bruin, maar is hij toch gezwollen en dik, in dat geval wordt er ook embryo of embryozak cultuur toegepast.

Het is het gemakkelijkst om zaaddozen te gebruiken uit stadium III. Dit geeft het minste werk, met het meeste resultaat. Afhankelijk van onder andere het type kruising en het aantal bevruchte zaden wordt dit stadium vroeger (25 DAP) of later (70 DAP) bereikt.

Bijlage 2. MEDIA:

LELIE VERMEERDERINGS MEDIUM

per liter

* MS zouten MS vitaminen	halve concentratie
* Sucrose	50 gr
* phytigel	4 gr

pH 5,8 voor autoclaveren

ZAADKNOPCULTUUR MEDIUM MEDIUM

per liter

* MS zouten en MS vitaminen	hele concentratie
* Sucrose	50 gr
* NAA	0,1 mg
* Phytigel	4 gr

pH 5,8 voor autoclaveren

EMBRYO-EMBRYOZAKCULTUUR

per liter

* MS zouten en MS vitaminen	halve concentratie
* Sucrose	60 gr
* Phytigel	4 gr

ph 5,8 voor autoclaveren

LELIE OVARIUMPLAKCULTUUR MEDIUM

per liter

* MS zouten MS vitaminen	halve concentratie
* Sucrose	90 gr
* NAA	1,0 mg
* phyagel	4 gr

pH 6,0 voor autoclaveren

Bijlage 3: In vitro chromosoomverdubbelingsprotocol

- * van de in vitro bolletjes worden schubjes gehaald
- * deze worden in segmenten gesneden
- * direct na het snijden worden de segmenten in de oryzaline oplossing in petrischalen gelegd
- * meestal worden de concentraties: 0,001% en 0,003% gebruikt ook worden er ter controle een aantal segmenten in steriel water gelegd, eventueel kan als controle worden meegenomen het leggen van segmenten in DMSO (oplosmiddel van oryzaline)
- * de behandeling duurt drie uur
- * daarna wordt de oplossing vervangen door water
- * na drie keer spoelen, 1 min, 5 min, en 15 min, worden de segmenten even gedroogd
- * na het drogen worden de segmenten op medium in potten of schalen uitgelegd; ongeveer 15 stukjes per pot/schaal
- * de potten / schalen worden in het licht gezet
- * na enkele weken wordt van de ontstane planten het ploëidienivo bepaald door middel van flowcytometrie

ORYZALINE OPLOSSING

- * stock: 20 mg oryzaline per 1 ml DMSO
- * werk oplossingen:
 - 0,001% : 75 µl stock in 150 ml water (12,5 µl / 25 ml)
 - 0,002% : 150 µl stock in 150 ml water (25 µl / 25 ml)
 - 0,003% : 225 µl stock in 150 ml water (37,5 µl / 25 ml)
- ! let op bij het verdunnen in water !
goed mengen op het moment van toevoegen, voeg druppel-gewijs toe anders ontstaan er kristallen
- * na het mengen met water is de oplossing niet houdbaar

DMSO OPLOSSING (controle)

- * DMSO concentratie als in een 0,003% oryzaline oplossing:
225 µl DMSO in 150 ml water

Bijlage 4: Fusarium-toetsingresultaten

Resultaten van de Fusarium-toetsingen van de diverse monsterboeknummers (Mbnr), afkomstig uit de diverse hybridegroepen/ species of combinaties hiervan (A=Aziaat, O=Oriental, L=longiflorum, H=hernyi, D=dauricum, B=bulbiferum, R=regale, Co=concolor), met hun naam en met de ziekteindex (1=gezond ... 6= maximale aantasting) uitgevoerd in de jaren 1994-1997.

Mbnr	knr	groep	naam	1994	1995	1996	1997
940309		A	Au Revoir		2.2		
940327		A	Bright Beauty			2.3	
940316		A	Castello		1.4	2.0	
920155		A	Connecticut King	2.2	1.0	1.6	1.7
960002		A	Gran Sasso				3.6
940326		A	Lady Rosa			4.3	
960019		A	Lanzarote				4.7
940313		A	Mirella		1.6		3.4
920034		A	Mont Blanc	1.8			
920025		A	Montreux				4.4
79209	1	A	Orlito	1.5	1.0	1.9	2.2
90150		A	Pirate		5.3	3.7	5.4
950283		A	Sarina				4.2
80287	1	A	Whilito				3.0
80314	1	A	Yellito				3.8
82344	12	O	Easter Bunny x Stargazer	4.3	2.9		
940029		O	Acapulco		4.0	4.1	6.0
960011		O	Actrice				4.6
940064		O	Anais Anais		2.7	4.6	3.5
960012		O	Angelo				4.9
940022		O	Angora		4.7		4.3
950015		O	Anton Geesink			6.0	4.7
960017		O	Aruba				3.9
960013		O	Aubade				5.9
960008		O	Avelino				3.7
950197		O	Barbaresco			5.1	5.8
950097		O	Belcanto				4.9
960004		O	Bellissimo				5.1
960005		O	Belpasso				5.1
950195		O	Bernini			4.0	5.1
891482		O	Tetra Black Beauty	4.1	3.1	5.7	4.3
901253		O	Capitol		5.4	5.5	5.6
901273		O	Casa blanca		5.1	3.8	
950103		O	Cascade				4.9
940027		O	Cherry Blossom		3.5		5.3
950267		O	Con Amore				5.1
901249		O	Dame Blanche		5.1	5.4	5.5
950269		O	Dendera				5.6
940320		O	Expression				4.4
950261		O	Francia				5.0
950260		O	Helvetia				4.7
960003		O	Kiss Proof				4.3
901254		O	Laura Lee			4.1	4.0

901274	O	Le Reve	3.5	4.2	3.5	4.7
950096	O	Lombardia				5.4
950061	O	Louvre			5.0	5.7
950194	O	Marco Polo			4.7	5.8
940041	O	Merostar		3.5		4.3
950092	O	Montana				5.8
950063	O	Montrachet				4.9
940037	O	Muscadet		4.0	4.5	4.5
940044	O	Opus One		4.3	5.1	4.0
940023	O	Pesaro		4.1		5.6
950254	O	Pompei				5.6
940312	O	Romero Star		3.6		5.5
940042	O	Royal Class		4.5		5.1
940061	O	San Marco		4.9		5.9
960007	O	Sempre Avanti				5.0
950190	O	Sissi			5.5	4.9
940310	O	Starfighter		4.0	4.6	
91226	O	Stargazer	5.5	3.2	4.9	4.5
960015	O	Tenerife				4.9
940307	O	Time Out		4.6		3.9
940311	O	Touch		2.4		3.5
86132	O	White Mountain		4.1	3.7	5.1
960016	O	Wisdom				4.9
931498	1 O	Black Beauty hybride				3.1
85842	1 L	Tetra L. longiflorum.				5.7
85842	5 L	Tetra L. longiflorum.				5.7
940317	L	Avita		3.9	4.3	5.3
81212	L	Flevo		2.2		
920161	L	L. longiflorum	3.1	2.7		
771017	L	L. longiflorum.'Indian Summer'	3.8	1.9	5.7	4.1
940059	L	Lorina				4.2
940315	L	Mount Everest		3.1	4.9	
940006	L	Snow Queen		3.1		
940314	L	Virginia		2.2	4.9	4.5
950257	L	White elegans				5.0
950282	L	White fox				5.4
80127	O	Easter Bunny		4.7		
89206	B	L. bulbiferum croceum		4.3		
89209	B	L. bulbiferum croceum		4.9		
77543	6 Co	L. concolor luteum	2.4			
73139	D	L. dauricum	1.6	1.1	1.3	1.3
72122	H	L. henryi		3.8		
86151	H	L. henryi		3.1		
89159	H	L. henryi erectum		2.4		
72254	3 R	L. regale	1.3			
72309	11 R	L. regale		3.4		
74030		L. speciosum	2.5			
77046		L. speciosum	3.9			
77017	6	L. speciosum 'album'	2.9			
921061	2 AHC	Aziaat x (hen x cand)				4.9
931331	8 RA	L. regale x aziaat				2.8
931380	1 HC	L. henryi x L. candidum			4.9	
931380	7 HC	L. henryi x L. candidum			5.4	
82111	OH	L. auratum pl. X L. henryi	5.6	5.2		
76220	HR	L. henryi x L. regale	2.1	1.7	3.5	
82109	OH	Shikayama x L. henryi	5.4			

Vertrouwelijk

901122	1	ALA	78251-1 x 88542-24		2.5		3.9
940318		LA	Fidelity		1.4		
89302	1	LA	78372 x 80287-1	1.5	1.4	3.0	
87674	2	LA	85902 x 84165		1.3		
88542	24	LA	L. longiflorum x Whilito	4.3	2.3		
88542	52	LA	L. longiflorum x Whilito	3.1	3.4		
88542	80	LA	L. longiflorum x Whilito	5.9			
921159	3	LALA	88542-80 x 88542-69		2.1	4.2	
921159	4	LALA	88542-80 x 88542-69			4.9	4.4
940308		LA	Money Maker		2.1		
960020		LA	Royal Star				3.8
960021		LA	Washington				3.7
89318	8	LC	L. longiflorum x L. candidum	5.9			
89318	49	LC	L. longiflorum x L. candidum	4.5			
89318	77	LC	L. longiflorum x L. candidum	5.8			
89312	1	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.0			
89312	2	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.2			
89308	3	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.1			
89308	4	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.5			
89308	5	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.3			
89314	18	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.5			
89314	19	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.7			
89314	23	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.9			
89314	25	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.5			
89314	28	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.6			
89314	30	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.5			
89314	31	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.8			
89315	2	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.2			
89315	6	LD	L. longiflorum x L. dauricum	1.6			
89315	10	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.9			
89315	11	LD	L. longiflorum x L. dauricum	3.7			
89315	13	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.2			
89315	18	LD	L. longiflorum x L. dauricum	2.1			
89314	27	LD	L. longiflorum x L. dauricum		1.6		
89315	14	LD	L. longiflorum x L. dauricum		1.7		
89315	23	LD	L. longiflorum x L. dauricum		2.3		
89315	31	LD	L. longiflorum x L. dauricum		1.9		
931119	13	LDA	L.D x Aziaat				2.7
920112		LH	L. longiflorum x L. henryi		3.5		
87458	1	LH	L. longiflorum x L. henryi	4.0			
88458	1	LH	L. longiflorum x L. henryi	4.7			
88458	2	LH	L. longiflorum x L. henryi	6.0			
88458	5	LH	L. longiflorum x L. henryi	4.1			
89351	1	LH	L. longiflorum x L. henryi	4.3			
89352	1	LH	L. longiflorum x L. henryi	5.7	4.3		
89352	2	LH	L. longiflorum x L. henryi	5.7			
89352	3	LH	L. longiflorum x L. henryi	6.0			
89352	4	LH	L. longiflorum x L. henryi	5.1			
89352	6	LH	L. longiflorum x L. henryi	5.1			
89352	7	LH	L. longiflorum x L. henryi	2.7	3.1		
89352	10	LH	L. longiflorum x L. henryi	4.0			
89352	13	LH	L. longiflorum x L. henryi	6.0			
89352	70	LH	L. longiflorum x L. henryi		5.5		
89356	1	LH	L. longiflorum x L. henryi	4.9			
911101	4	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			5.2	
911101	5	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			5.5	

Vertrouwelijk

911108	1	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			5.9		
921078	1	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			4.9		
921078	2	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)	4.1				
921078	3	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			5.7		
921078	4	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)	3.1				
921078	5	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			4.4		
921078	8	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)	4.3				
921078	10	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)	3.1				
921078	11	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)			5.5		
921078	12	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)	3.5				
921078	13	LHC	L. longiflorum x (L. henryi x L. candidum)	2.9	4.5	4.7		
931402	2	LLLA	L. longiflorum x LA			5.1		
931402	11	LLLA	L. longiflorum x LA			4.6		
931403	7	LLLA	L. longiflorum x LA			5.7		
931403	9	LLLA	L. longiflorum x LA			5.5		
921250	1	LO	L. longiflorum x L. rubellum	5.4		5.6		
921250	2	LO	L. longiflorum x L. rubellum			5.5		
921250	3	LO	L. longiflorum x L. rubellum			5.7		
921250	4	LO	L. longiflorum x L. rubellum			5.7		
921250	5	LO	L. longiflorum x L. rubellum			5.5		
941030	1	LO	L. longiflorum x Oriental				4.1	
942077	1	LO	L. longiflorum x Oriental				5.1	
942077	2	LO	L. longiflorum x Oriental				4.9	
942077	4	LO	L. longiflorum x Oriental				5.6	
942102	4	LO	L. longiflorum x Oriental				4.7	
942323	1	ALA	Aziaat x LA				2.7	
942323	2	ALA	Aziaat x LA				3.1	
942323	3	ALA	Aziaat x LA				3.2	
942645	1	OLA	Oriental x LA				2.8	
942280	1	OLH	Oriental x (L. longiflorum x L. henryi)				4.9	
942668	1	OLH	Oriental x (L. longiflorum x L. henryi)				4.9	
88374	5	LCo	L. longiflorum x L. concolor	3.8	4.2			
88374	8	LCo	L. longiflorum x L. concolor	3.4				
89305	2	LCo	L. longiflorum x L. concolor	3.3	2.3			
89305	4	LCo	L. longiflorum x L. concolor	5.8				
89305	5	LCo	L. longiflorum x L. concolor	3.1				
89305	14	LCo	L. longiflorum x L. concolor	4.3				
89305	16	LCo	L. longiflorum x L. concolor	5.3				
942180	1	OA	Oriental x Aziaat				2.8	
942584	1	OA	Oriental x Aziaat				4.2	
942587	1	OA	Oriental x Aziaat				5.7	
942675	2	OA	Oriental x Aziaat				4.3	
89224		OH	L. auratum x L. henryi		4.5			
89245		OH	L. auratum x L. henryi	2.9				
942144	1	OHC	Oriental x (L. henryi x L. candidum)				5.3	
942550	1	OHC	Oriental x (L. henryi x L. candidum)				5.3	
942642	5	OHC	Oriental x (L. henryi x L. candidum)				4.8	
82110			Royal gold x L. speciosum	2.7				
86371	1	DCo	L. dauricum x L. concolor	1.5	4.0	3.3		
86371	2	DCo	L. dauricum x L. concolor	3.7	1.7	1.5		
86371	4	DCo	L. dauricum x L. concolor	4.3				

Bijlage 5.

Foto's van 6 OA-hybriden

Enkele interessante OA-hybriden ontwikkeld binnen het project. Het betreft (van linksboven naar beneden, rechtsboven naar beneden) hybriden ontstaan uit Touch x Montreux (951405-2), Pesaro x Connecticut King (951402-1), Romero Star x Mont Blanc (952530-1), Romero star x Connecticut King (951462-1), Romero Star x Lady Rosa (951914-1) en uit Expression x Connecticut King en vervolgens in vitro tetraploid gemaakt (950239).

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Het laatste jaar van het leliesoortkruisingsproject is een oogstjaar, zowel wat betreft de OA-hybriden die in grote aantallen in bloei zijn gekomen, als ook de mogelijkheden van verdere veredeling met de soortkruisingsproducten. De perspectieven van het materiaal lijken een goede basis te vormen om te komen tot nieuwe rassen. Het geheel lijkt het begin van een geheel nieuwe weg, waarvoor ook weer nieuw onderzoek vereist is. In gezamenlijk overleg zal de richting en de opzet met de bedrijven besproken worden. Verheugend zijn ook de resultaten van het genomisch in situ hybridisatie onderzoek, dat met de Russische gastmedewerker Genady Karlov een grote stap voorwaarts kreeg: de eerste bewijzen dat bij bepaalde genotypen introgressie optreedt, konden worden geleverd.

5.2. Fusarium-toets

Extra aandacht krijgt dit jaar het toetsen van Oriental-hybriden. Er is zowel een plantgoed als een schuboltoets ingezet met respectievelijk 44 en 114 nummers, waarvan 34 en 55 orientals. In de schuboltoets zijn naast de 55 orientals, 13 aziaten, 8 longiflorums, 4 species en 29 soortkruisingsproducten ingezet (6 LO, 4 OA, 3 OHC, 4 ALA, 1 OLA, 2 OLH, 1 AHC, 1 LHC, 1 LDA en 9 LA).

5.3. Chromosoomverdubbeling in vitro

Chromosoomverdubbeling van een serie na de eerste bloei geselecteerde OA-hybriden in vitro heeft de eerste tetraploïde selecties opgeleverd (942172-1, 951301-5, 951502-1, 951462-1, 952530-1).

5.4. Chromosoomverdubbeling in vivo

Veel tetraploïde nummers afkomstig van de eerste verdubbelingsproeven, die dit jaar in bloei kwamen, zijn of worden geschubd. Van enkele nummers komt dit jaar bolmateriaal beschikbaar voor de bedrijven.

5.6. Bestudering van introgressie

Met behulp van genomische in situ hybridisatie (GISH) kunnen chromosomen van verschillende soorten zichtbaar gemaakt worden. Deze techniek ontwikkelt zich snel en ons doel was om de genomen van longiflorum, aziat en oriental afzonderlijk zichtbaar te kunnen maken, zodat recombinatie van deze genomen onderling (in bepaalde genotypen) aangetoond kan worden. Er is gestart een serie *L. longiflorum* x Aziatische hybriden (LA)

die 2n-pollen produceren en waarvan 2 volgende generaties beschikbaar waren. De gekozen LA's waren 88542-24 en -50, deze produceren 2n-gameten en zijn daardoor als diploid terug te kruisen op aziaten. Van 88542-24 konden de beide genomen van *longiflorum* en van de aziaat 'Whilito' mooi zichtbaar gemaakt worden. Deze LA bestoven op een aziaat 78251-1 leverde de triploid 901122-1 (een ALA-combinatie, ook al beschikbaar gesteld aan de bedrijven). In een GISH-experiment bleek dat van de 36 chromosomen van dit nummer er 5 te vinden waren die recombinatie met beide soorten vertoonden (zie foto). Hetzelfde kon ook worden aangetoond bij een andere ALA, 921238-1 aangetoond worden, maar niet bij 2 andere nummers (921238-2, -3). Daarnaast is het gelukt om een multicolour GISH tot stand te brengen van een OLA-hybride (942653-1 = San Marco x 88542-69), hierbij konden de chromosomen van de *longiflorum*-ouder, de aziaat en de oriental in één preparaat afzonderlijk zichtbaar gemaakt worden (zie foto 2). Dit betekent dat introgressie van de 3 belangrijkste lelie-groepen in nieuwe hybriden nauwkeurig bestudeerd kan worden, zodat nagegaan kan worden welke lijnen wel en welke geen goede introgressie vertonen.

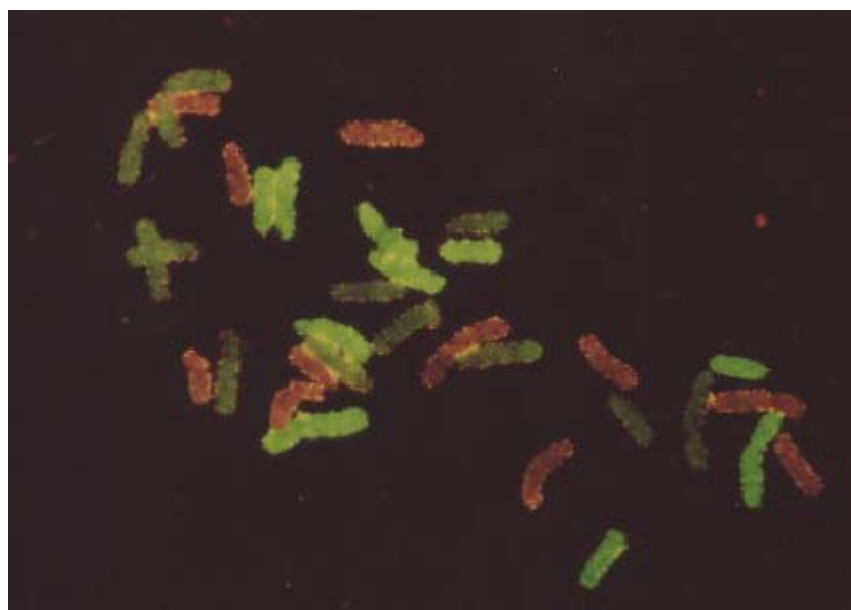
5.5. Kruisingsprogramma's 1996 en 1997

De resultaten het kruisingsprogramma van 1996 werd besproken in het vorige halfjaarlijkse verslag. Het grootste deel van het embryo-rescuiue materiaal werd dit jaar uitgeplant. Er kwamen met name van de LLO-hybriden zelfs al enkele nummers direct in bloei. De enige ON-hybride (oriental x *L. nepalense*) werd niet uitgeplant, maar direct in vitro verdubbeld.

Het kruisingsprogramma van dit jaar (1997) was volledig gericht op terugkruisingen met tetraploid soortkruisingsmateriaal (met herstelde fertiliteit). Als moeders werd een sortiment tetraploide *L. longiflorum*-nummers, Aziatische, enkele LA's en Orientalrassen gebruikt. Als vader fungeerden diverse AA, OO, LD, LO, LLO, LA, LCA, LB en OA-nummers. Indien voldoende goede zaaddozen verkregen werden, werd naast het embryoreddingswerk in vitro ook zaden in vivo uitgezaaid. Hiervan blijkt inmiddels een deel goede kiemkracht te vertonen (zie Tabel 1).



Figuur 1: GISH-kleuring van hybride 901122-1 (ALA). Groen zijn de longiflorum-chromosomen, blauw die van de Aziat. Witte pijltjes duidt op de introgressie-punten.



Figuur 2: Multicolour-GISH-kleuring van een OLA-hybride (942653-1): lichtgroen zijn de longiflorum chromosomen, donkergroen die van de aziat en rood die van de oriental.

5.6. Geslaagde kruisingscombinaties

Een groot aantal nieuwe hybriden kwamen dit jaar in bloei gekomen. In totaal kwamen ruim **90 OA-hybriden** in bloei. In het vorige verslag werden enkele typerende nummers afgebeeld. De variatie in bloemkleur en in bloemtekening variatie blijkt veel groter te zijn dan verwacht. Vrijwel alle nummers zijn op de oog steriel, een enkel nummer zou enigen fertilitiet kunnen hebben. Volgend jaar zullen alle nummers nogmaals opgeplant worden om eventuele fertiliteit op te sporen. Naast wat in het vorige half jaarlijkse verslag genoemd is, kwamen verder nog enkele *L. longiflorum* x *L. lankongense* hybriden in bloei. Heel interessant waren ten slotte enkele LLO-hybriden (*longiflorum* x [*longiflorum* x *rubellum*]): deze planten bloeiden in het eerste jaar rechtstreeks uit weefselkweek met een volledige *longiflorum* habitus en roze, lichtroze en bijna witte *longiflorum*-type bloemen. Dit materiaal kwam goed op lengte en ook de bloemvorm zag er zeer aantrekkelijk uit.

6. Publikaties en lezingen

7. Plannen eerste helft 1998

7.1. Resultaten van het onderzoek

Januari- juni 1998

- * Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas
 - * In vitro polyploidisatie van geselecteerde OA-nummers
 - * Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek en uitplanten in de kas.
 - * Beoordeling Fusarium-toets soortkruisingsmateriaal.
 - * Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de bedrijven.
 - * Uitvoering embryoreddingstechnieken bij het uitgevoerde kruisingsprogramma 1997
 - * In-situ hybridisatie experimenten.
-
- * In vitro polyploidisatie van geselecteerde OA-nummers
 - * Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek en uitplanten in de kas.
 - * Beoordeling Fusarium-toets soortkruisingsmateriaal.
 - * Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de bedrijven.
 - * Uitvoering embryoreddingstechnieken bij het uitgevoerde kruisingsprogramma 1997 en inventarisatie van de resultaten.

Tabel 1. Resultaten van het kruisingsprogramma 1997: De gemaakte kruising (het type: AA= tetra aziaat, L=longiflorum, O=oriental, D=dauricum, C=conclor, B=bulbiferum, H=henryi, SD=sargentiae x davidii), het bestoven bloemen (aant bl) , het aantal ingezette zaadknoppen (aant zaadkn), het aantal gekiemde zaadknoppen per 1 november (kiem) en het aantal in vivo verkregen zaden (zaden)met de kieming per 1 november (++)

Type kr	aant bl	zaadkn	kiem	zaden	kieming
AA-ALA	48				
AA-ALD	114			62	
AA-LBLA	9				
AA-LCA	42			82	+
AAAA	83	113	2	1953	++
AALA	153			22	
AALB	12				
AALD	191	211	1	512	++
AALO	26				
AAOA	16				
AASD	14				
ALA-LA	6	7	0		
ALA-LCA	5	1	0		
ALA-LO	13				
ALA-SD	2				
ALAA	12				
ALALO	12				
ALD-LO	12				
BLH-OO	7			8	
L-LLO	12				
LA-ALA	15				
LA-LAA	2				
LA-LCA	11			8	
LA-SD	2	69	0		
LAA-LA	3				
LAAA	9	226	0	423	+
LALA	41	157	2	177	+
LALB	1				
LALD	22	63	8	510	++
LALO	12	150	0		
LASD	6			1	
LBLA-SD	2				
LBLO	10				
LCA-ALD	4				
LCA-LCA	7			74	
LCA-LO	4				
LCA-SD	2				
LD-LBLA	1				
LD-LCA	1			11	
LD-LO	11	722	1		
LDA-LD	2	31			
LDAA	3			25	++
LDALO	12				
LDLD	1	231	3		
LDLO	2				
LDSD	4				
LHCLO	1				
LHLO	1			5	
LL-AA	7				
LL-ALA	26				
LL-ALALD	8				
LL-LBLA	1				

LL-LCA	19	95	15		
LL-LLO	1				
LLAA	35	20	1		
LLLA	39	84	7		
LLLD	57	144	14	47	+++!
LLLHC	4				
LLLL	1			21	
LLLO	275	1210	22		
LLO	31	779	16	3	
LLO-LL	2	284	0		
LLO-LLO	5	689	0		
LLSD	13	91	0		
LOL	7	334	0		
LOLL	7				
LOLO	25	5	0	11	
LOO	1	133	0		
LOOO	8	3	0		
O-LLO	1	172	0		
OAAA	3				
OAHLH	5			16	
OAQ	3		1		
OAOO	3	169	0		
OLH	4				
OLO	63	989	0		
OOA	20	547	0		
OOAH	6				
OOHC	49				
OOLH	23				
OOLO	94	98	0	61	
OOOA	12	187	0		
OOOO	55			97	
OOSD	12				
OSD	3	449	0		
SD-LCA	1	156	5		
SDOO	2				
Totaal	1912	8619	98	4129	

CPRO-DLO

vertrouwelijk

In vitro technieken ten behoeve
van het doorbreken
kruisingsbarrières binnen het
geslacht *Lilium* (lelie) II

1998

Halfjaarlijks verslag

Juni

Halfjaarlijks verslag, periode 1/01/98-1/06/98

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer CPRO-DLO projectnummer: 2.080.016

3. Algemeen

Personele inzet

Ing. H. Meijer
 Ing. B. van Kronenburg- van de Ven
 A. van Dijken
 Dr. J.M. van Tuyl
 Dr. H.M.C. van Holsteijn

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)
 S. Bottema
 N. van Buggenum
 H. Imanse
 Ir. A. Vletter
 Ir. D. van Kleinwee
 P.J. Kos
 Ing. K. Laan
 Ir. A. Peterse
 C. Randag
 Ir. A. van Voorst

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekeresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Overdracht van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

De eerste helft van het nieuwe leliesoortkruisingsproject is ongemerkt snel voorbij gegaan. Het eindverslag van 'lelie in vitro 1' is verstuurd en het eerste commerciële product, de LLR-hybride 961003-27 heeft voor een veelbelovende start gezorgd. Met hulp van een Deense studente Susanne Villemoes is vrij veel onderzoek verricht aan de overgebleven LLR-hybriden. De Zuid-Koreaanse gastmedewerker Ki-Byung Lim heeft zich op het genomisch in situ hybridisatie onderzoek gestort, waarbij in eerste instantie ook de LLR-populatie model stond. Verder werkte in deze periode LUW-student Ronald Snijder aan de inventarisatie van de OA-hybriden (allen onder geheimhouding).

5.2. Chromosoomverdubbeling

Naast de serie van direct na de eerste bloei geselecteerde OA-hybriden en de bij Iribov ingezette nummers zijn nog eens 31 genotypen in vitro behandeld om genetisch zo breed mogelijk chromosoomverdubbelde OA's te verkrijgen. In totaal zijn inmiddels van 31OA-nummers tetraploïden verkregen. Daarnaast is van 22 nummers in vivo materiaal behandeld. De resultaten hiervan zullen in de loop van dit jaar beschikbaar komen.

Van één tetra-LO (960067) zal tijdens de juni vergadering in vitro-materiaal aan de bedrijven beschikbaar worden gesteld. In december 1998 zullen enkele tetra OA's volgen.

5.3. Bestudering LLR-hybriden

De 961003 en 961004 populatie (*L. longiflorum* x (*L. rubellum* x *L. longiflorum*) = LLR), waarvan vorig jaar reeds enkele hybriden bloeiden (zie Fig. 1 en 2) kregen dit jaar extra aandacht. De eigenschappen van deze hybriden werden zoveel mogelijk vatsgelegd (zie Tabel 1). Er werd gekeken naar trekduur, plantlengte, aantal knoppen, bloemgrootte, bloemkleur, geur, houdbaarheid en fertiliteit. Wat de fertiliteit van deze triploïden betreft bleek het pollen visueel wel heel vitaal maar liet de kiemkracht te wensen over. De vrouwelijke fertiliteit bleek na terugkruising met *longiflorum* en *oriental* juist vrij goed en reeds enkele honderden embryo's, waarvan de eerste reeds kiemen, zijn in vitro gezet. In Tabel 2 staat aangegeven welke bestuivingen met het LR en LLR materiaal zijn uitgevoerd. Bij alle gemaakte combinaties was het zeer opvallend dat juist in de leeg en bruin uitziende zaden, de embryo's zaten. Van de kruising LLR X L is het eerste embryo al gekiemd. Ook tetraploïde *rubellum*-hybriden (LLLR) zijn onderweg.

5.4. Botrytis-toets

Met behulp van blad-topjes zijn enkele Botrytis-toetsingen in het laboratorium uitgevoerd. De voorlopige resultaten van deze toets laten zien dat de Aziaten 'Connecticut King' en 'Mont Blanc' vatbaar zijn, terwijl de orientals 'Acapulco', 'Expression' en 'Stargazer' juist een sterk resistente

reactie vertonen. In een vergelijkende toets met 20 OA-hybriden bleek de variatie in gevoeligheid te variëren van zeer vatbaar tot zeer resistent (zie Fig. 3). Dit opent belangrijke perspectieven.

5.5. Bestudering van introgressie

Met behulp van genomische *in situ* hybridisatie (GISH) kunnen chromosomen van verschillende soorten zichtbaar gemaakt worden. Deze techniek ontwikkelt zich snel en ons doel was om de genomen van *longiflorum*, *aziaat* en *oriental* afzonderlijk zichtbaar te kunnen maken, zodat recombinatie van deze genomen onderling (in bepaalde genotypen) aangetoond kan worden. Er is vorig jaar gestart een serie *L. longiflorum* x Aziatische hybriden (LA) die 2n-pollen produceren en waarvan 2 volgende generaties beschikbaar waren. De resultaten hiermee waren veelbelovend. Dit jaar werd doorgegaan met de *L. longiflorum* x *L. rubellum* hybriden. Ook hier konden de chromosomen van *L. longiflorum* en van *L. rubellum* goed afzonderlijk zichtbaar gemaakt worden. Recombinatie werd hier nog niet aangetoond. Het zou kunnen dat dit bij mitotische tetraploïden minder eenvoudig gaat dan met de meiotische (2n-producerende) LA's.

5.6. Kruisingsprogramma's 1997 en 1998

De resultaten het kruisingsprogramma van 1997 werden reeds besproken in het vorige halfjaarlijkse verslag. Het grootste deel van het embryo-rescue materiaal werd dit jaar uitgeplant. Tabel 3 geeft een overzicht van alle verkregen kruisingscombinaties en welke reeds uitgeplant zijn.

Het kruisingsprogramma van dit jaar (1998) was, gericht op terugkruisingen met tetraploïd soortkruisingsmateriaal (met herstelde fertiliteit). Als moeder werd een sortiment tetraploïde *L. longiflorum*-nummers, Aziaten, enkele LA's en Orientalrassen gebruikt. Als vader fungeerden diverse AA, OO, LD, LO, LA en OA-nummers. Er is vooral veel aandacht besteed aan de OA-hybriden. Alle OA's werden/worden afzonderlijk getest op mannelijke en vrouwelijke fertiliteit. Er werden (tot nu toe) 8 hybriden gevonden met enige mannelijke fertiliteit (kiemkracht 1-5 %). Alle hybriden worden als moeder gebruikt. De resultaten hiervan zijn nog niet beschikbaar (zie Tabel 2). De eerste vier bloeiende tetraploïde OA's bleken geen tot geringe pollenfertiliteit te bezitten.

5.7. Geslaagde kruisingscombinaties

Een groot aantal nieuwe hybriden kwam dit jaar in bloei. Allereerst kwam een groot aantal **OA-hybriden** in bloei. De variatie in bloemvorm, kleur en fertiliteit wordt in kaart gebracht. De eerste Oriental x *L. hansonii* en Oriental x *L. pardalinum* hybride kwamen in bloei, waarmee is bewezen dat kruisingen met

alle secties van het geslacht *Lilium* mogelijk zijn. Nadat vorig jaar de eerste LLR-kruisingen in bloei kwamen was het nu de beurt aan de OLR-combinaties, waaruit blijkt dat met de LO/LR naar beide ouders teruggekruist kan worden.

6. Publikaties en lezingen

*** Deelname aan het 19th International Eucarpia Symposium 'Improvement of ornamental plants' 27-31 July Angers, France:**

Poster en artikel:

G.I. Karlov, L.I. Khrustaleva, Ki-Byung Lim, H. Meijer & J. M. van Tuyl

Genomic in situ hybridization (GISH) study of interspecific hybrids of lily

* Vakbladartikel sept/okt Bloembollencultuur

7. Plannen tweede helft 1998, Juli- december 1998

* Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit en op kruisbaarheid met tetraploid materiaal (selectie van de beste geniteurs) en toepassing van embryo-rescue methoden

* In vitro en in vivo polyploidisatie van met name geselecteerde OA-nummers

* Selectie en opkweek van tetraploide OA's

* Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 1997 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.

* Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de bedrijven.

* In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.

* Ontwikkeling en toepassing van Botrytis-resistentie toetsing m.b.v. bladtopjes van OA-hybride-materiaal.

Tabel 1: Overzicht van de variatie van diverse eigenschappen in de LLR-populatie. Het betreft 1 tak per nummer, waarbij de bloem grootte, de houdbaarheid per bloem en de geur gemiddeld is over alle bloemen.

	Bolmaat	Plant lengte	# Bloemen	Bloemgrootte	Trekduur	Houdbaarheid	Geur
	cm	cm		cm	dagen	dagen	
961003-1	16	114	5	15	74	8,0	11,8
961003-2	14	101	5	14.9	72	7,6	9
961003-3	9	76	2	15.5	76	9,5	10,5
961003-4	11	78	3	16.2	78	8,7	5,7
961003-6	10	75	2	16.5	73	7,5	10,5
961003-7	12	87	3	16.5	68	9,0	5,3
961003-10	15	79	5	14.5	77	10,0	8
961003-11	9	45	1	14.5	78	9,0	6
961003-13	19	88	6	15.9	70	7,8	4,8
961003-14	13	93	4	15.8	73	8,3	8,3
961003-15	10	72	1	15	73	9,0	7
961003-18	15	87	5	14.7	77	9,2	8,4
961003-21	8	59	1	21	75	10,0	1
961003-22	12	70	3	15.3	70	8,3	7,7
961003-23	24	105	7	12.5	75	7,7	9,7
961003-24	10	85	4	15.8	74	8,0	5
961003-25	9	68	2	14.8	77	9,0	9,5
961003-26	10	78	3	16.3	78	9,0	7
961003-28	14	75	7	13.6	77	9,4	5,7
961003-29	11	90	4	14.6	77	9,0	7,3
961003-30	13	82	3	13.8	80	11,3	4
961003-36	9	71	2	15.3	82	8,5	12
961003-40	11	64	3	14.7	76	8,0	3,7
961003-43	13	80	3	16.2	75	8,0	7
961003-44	11	77	4	14.6	72	8,3	5,8
961003-47	12	80	3	15.3	76	10,0	7
961004-1	12	72	2	16.3	74	9,0	10
961004-4	14	78	2	15.5	75	10,2	4,5
961004-6	9	73	5	14.8	79	10,0	8,8

Fig. 1. Nummer 961003-1

Fig. 2. Nummer 961003-43

Tabel 2. Aantal bestoven bloemen, verdeeld over 3 onderdelen van het in 1998 uitgevoerde soortkruisingsprogramma, t.w. de OA-kruisingen, de *L. longiflorum* x *L. rubellum* kruisingen en de overige kruisingen verdeeld over de diverse "typen" soortkruisingen.

	overig	long x rub	OA	Totaal
AA-OA			22	22
AALA-OA			8	8
L-LLR		102		102
L-LO	21			21
L-LR		57		57
LA-LD	1			1
LA-LO	17			17
LA-OA			2	2
LA-SD	1			1
LD-LD	29			29
LD-LO	2			2
LL-LLR		25		25
LL-LO	53			53
LL-LR		131		131
LLR-L		65		65
LLR-LL		9		9
LLR-LLR		76		76
LLR-O		20		20
LO-AA	4			4
LO-AALA	9			9
LO-LA	1			1
LO-LD	3			3
LO-LL	5			5
LO-LO	15			15
LO-LR	1			1
LO-O	4			4
LO-OA	1			1
LO-OO	18			18
LO-SD	3			3
LR-L		5		5
LR-LL		6		6
LR-LO	2			2
LR-LR		4		4
O-LLR		24		24
O-LO	15			15
O-OA			6	6
O-OHa	2			2
OA-AA	3		504	507
OA-LA			1	1
OA-LO	7		6	13
OA-OA			3	3
OA-OO			44	44
OHa-LO	1			1
OLR-OO	1			1
OO-LO	37			37
OO-LR	4			4
OO-OA			28	28
OO-OO	6			6
OO-SD	1			1
Totaal	267	524	624	1415

Tabel 3. De aantallen gekiemde embryo's uit het in 1997 uitgevoerde kruisingsprogramma en het aantal koud gezette / uitgeplante bolletjes verdeeld over de diverse "typen" soortkruisingen.

	gekiemd koud	
AALD	1	1
LAAA	1	1
LALA	7	4
LALD	11	8
LD-LO	2	1
LDLD	10	4
LL	12	8
LL-LCAA	17	10
LLAA	1	
LLLLA	12	7
LLLD	21	14
LLLO	37	18
LLLR	35	22
LLO	7	3
LLR-LL	4	
LROO	2	
OLO	64	22
OSD	2	
SD-LCAA	6	2
Totaal	252	127

Tabel 4. Kruisingen gemaakt met de LLR- hybriden.

	aantal bloemen bestoven	aantal bloemen afgestorven	aantal geisoleerde embryo's	aantal geisoleerde embryozakken	aantal bloemen ov-plak	aantal geisoleerde zaadknoppen
LLR X LLR	76	9	19	13	1	220
LLR X LL	9					
LLR X L	65		394	241	2	965
LLR X O	20		57	38		145
L X LLR	102	99			1	
LL X LLR	15	14		7		
O X LLR	24					

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken
kruisingsbarrières 1
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag

Halfjaarlijks verslag, periode 1/06/98-1/12/98

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer CPRO-DLO projectnummer: 2.080.016

3. Algemeen

Personele inzet

Ing. B. van Kronenburg- van de Ven
A. van Dijken
Dr. J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)
S. Bottema
N. van Buggenum
H. Imanse
Ir. A. Vletter
Ir. D. van Kleinwee
P.J. Kos
Ing. K. Laan
Ir. A. Peterse
C. Randag
Ir. A. van Voorst

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekeresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Overdracht van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

In de tweede helft van het eerste jaar van het nieuwe leliesoortkruisingsproject hebben de 11 leliebedrijven zich verenigd in de commanditaire vennootschap SLV, waardoor het maken van afspraken (zoals het sluiten van een overeenkomst) veel eenvoudiger wordt. De Zuid-Koreaanse gastmedewerker Ki-Byung Lim heeft zich verder verdiept in het genomisch in situ hybridisatie onderzoek. Met medewerking van de LUW-student Ronald Snijder heeft er een uitgebreide inventarisatie van de OA-hybriden plaats gevonden.

5.2. Chromosoomverdubbeling

Naast de serie van direct na de eerste bloei geselecteerde OA-hybriden en de bij Iribov ingezette nummers zijn nog eens 31 genotypen in vitro behandeld om genetisch zo breed mogelijk chromosoomverdubbelde OA's te verkrijgen. In totaal zijn inmiddels van 310A-nummers tetraploiden verkregen. Daarnaast is van 22 nummers in vivo materiaal behandeld. De resultaten hiervan zullen in de loop van dit jaar beschikbaar komen.

Van één tetra-LO (960067) zal tijdens de juni vergadering in vitro-materiaal aan de bedrijven beschikbaar worden gesteld. In december 1998 zullen enkele tetra OA's volgen.

5.3. Bestudering OA-hybriden

-Bloemkleur: zie Fig. 4.2

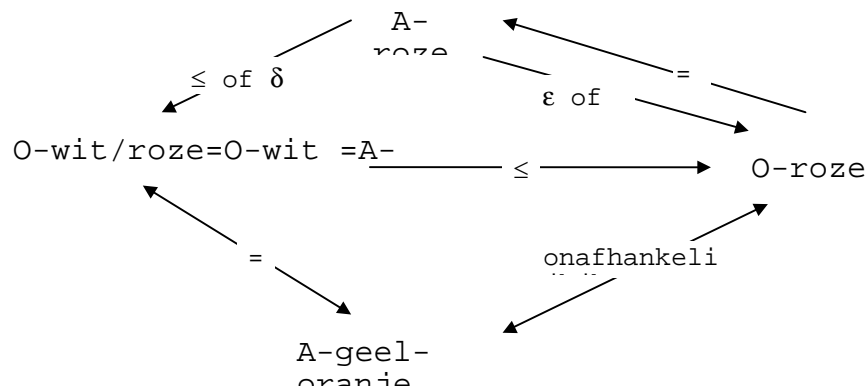


Fig. 4.2. Schema van hypothetische bloemkleur-fenotype-overerving bij OA. A=Aziatisch, O=Oriëntal. '=' = codominant, '≤' = co-dominant of dominant, 'δ' = overdominant

-De bloemgrootte (knopgrootte) van OA-hybriden is intermediair aan de bloemgrootte (knopgrootte) van Aziaten en Oriëntals.

3.2.2 Bloemgrootte

Bloemgrootte is belangrijk voor een sierplant als lelie. Hoe groter de bloem, hoe groter de sierwaarde van de betreffende plant. De OA-hybriden varieerden aanzienlijk ten aanzien van de bloemgrootte. De kwantificering van de bloemgrootte is gedaan door de knopgrootte te meten, zoals in 2.2 is uitgewerkt.

De knopgrootte van OA-hybriden is intermediair ten opzichte van Aziatische hybriden en Oriëntal-hybriden. De knoppen van de gebruikte Aziatische ouders uit Tabel 3.6 zijn gemiddeld 8,1 cm, de knoppen van de gebruikte Oriëntals zijn gemiddeld 12,6 cm. De gemiddelde knopgrootte van alle OA-hybriden zit daar met 9,9 cm tussenin. De knoppen van OA-hybriden varieerden van 13,7 cm (bij 951301-3) tot 6,5 cm (bij 952534-2).

Het is interessant om te weten of ouders met relatief grote knoppen ook nakomelingen geven met relatief grote knoppen. Fig. 3.10 geeft een overzicht van de gemiddelde lengte van de knoppen van alle halfsib-families van 'Connecticut King'.

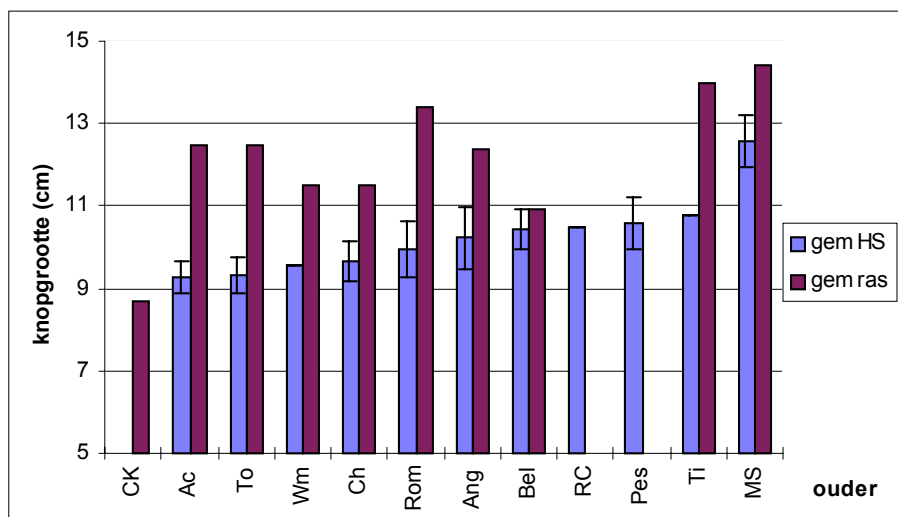


Fig. 3.10. Knopgrootte in cm van half-sib-families van 'Connecticut King', van de moeders en van 'Connecticut King'. De gebruikte afkortingen zijn als in Tabel 3.6. RC=Royal Class.

'Merostar' heeft met 14,4 cm de grootste knoppen. Zijn nakomelingschap heeft ook de grootste knoppen. Echter, 'Romero Star' heeft op twee na de grootste knoppen, echter zijn half-sib-familie heeft een knopgrootte met gemiddelde knopgrootte. De conclusie is dat er wel samenhang bestaat, maar dat deze niet groot is. De lage correlatie-coëfficiënt van 0,62 van knopgrootte van de moeder en gemiddelde knopgrootte van de half-sib-familie geeft dit ook aan.

-De aanwezigheid van kleuren in blos, band, stijl, filament en stempel erft waarschijnlijk simpel mendeliaans over.

-Spikkeling van Aziaten en Oriëntals kan elkaar complementeren en in OA-hybriden zeer sterk uitsplitsen.

- De kleur van stijl en filamenten is, indien aanwezig bij OA-hybriden, net als bij azaitische hybriden, gekoppeld aan de kleur van het bloemdek.

-Het zogenaamde nectargootje is niet geschikt als systematisch kenmerk voor OA-hybriden.

3.2.9 Geur

De eigenschap 'geur' is, net als de eigenschap 'pollenkleur', niet uitgewerkt. Het bleek namelijk uiterst moeilijk om deze eigenschap consequent waar te nemen. De intensiteit van geur bleek sterk afhankelijk van het weer en de leeftijd van de bloem. Een net geopende bloem ruikt zwakker dan een ruim geopende bloem, die op zijn beurt weer sterker ruikt dan een uitbloeiende bloem. Bij zonnig weer is de geur echter weer sterker dan op een regenachtige dag.

Om geur goed te beoordelen zouden in een geconditioneerde ruimte waarnemingen gedaan moeten worden aan bloemen van gelijke leeftijd. In de kas, zoals bij dit onderzoek, was dit dus niet mogelijk.

Bovendien is de eigenschap 'geur' op zich al een lastige eigenschap om waar te nemen. Vooral de geur van Aziaten is zeer lastig. De meesten hebben geen geur en als die wel aanwezig dan is het een zeer subtiele, ietwat muffige geur. Daar komt bij dat geur moeilijk te omschrijven valt. Gedetailleerder waarnemen dan 'zoet en zwaar' als 'Acapulco' is moeilijk.

Zeker is dat er variatie bestaat bij OA-hybriden ten aanzien van geur. Sommige hadden heel duidelijk geen geur en sommige roken als een Oriëntal. Maar sommigen roken zeer aangenaam (o.a. 951847-1 = 'Primerio' x 'Mont Blanc'), niet zwaar als een Oriëntal en niet half afwezig als een Aziaat, maar precies en goed daar tussenin. Anderen hadden ook een intermediaire geur, maar stonken (o.a. 942580-1 (= 'Expression' x 'Connecticut King')).

-De mannelijke en vrouwelijke fertiliteit van OA-hybriden is zeer laag of nul. De vorming van ongereduceerde mannelijke gameten erft waarschijnlijk over van 'Mont Blanc' naar zijn OA-hybriden.

3.2.11 Mannelijke fertiliteit van OA-hybriden

Alle OA-hybriden zijn beoordeeld op mannelijke en vrouwelijke fertiliteit. De hybriden werden beoordeeld op pollenkieming, het uiterlijk van het pollen en deels

op het uiterlijk van de anthere en de hoeveelheid pollen per anthere. De resultaten van 27 OA's zijn overzichtelijk weergegeven in Tabel 3.13

Tabel 3.13. Het kiemingspercentage, het uiterlijk van het pollen (percentage volle pollenkorrels), het uiterlijk van de anthere (mate van verschrompeling) en de hoeveelheid pollen in de antheren van verschillende OA-nummers met ploëdie en ouders; gesorteerd op kiemingspercentage. De gebruikte afkortingen van de ouders zijn als in Tabel 3.6. verder: Starf= 'Starfighter', Sis = 'Sissi', Mir= 'Mirella', Lan= 'Lanzarote'

* = zeer weinig volle korrels, meestal relatief groot

**= variabel voor verschillende bloemen

c = alle kiemende pollenkorrels liggen bij elkaar.

lege cel= niet waargenomen

ouders	2n=	nummer	% volle pollenkorrels	kiemings%	uiterlijk anthere	hoeveelheid pollen
Ac x San	2x	951584-1	25-50	5	half	weinig
To x CK	2x	952059-9	50	1	niet	weinig
MS x GS	2x	952400-1	50	1	niet	weinig
Ex x CK	4x	950224	75	1	niet	veel
Ti x MB	2x	951884-2	50	0-1**	niet-half**	veel-weinig**
Bel x MB	2x	962134-7	50	1	niet	weinig
Sis x Mir	2x	962433-1	50-75	1	niet	veel
Ti x Mon	2x	951381-5	25	1	wel	weinig
Starf x Lan	2x	962328-1	25	1		
Ang x MB	2x	952521-1	0-75**	0-1**	niet	veel-zeer weinig**
Pes x CK	2x	951486-2	75	0,5	niet	weinig
To x CK	2x	952059-3	0*	0,5		
Ang x BrB	2x	952527-2	0*-75**	0-0,5**	half	weinig
Ex x CK	2x	942584-1		0,1	wel	weinig
Ex x GS	2x	952458-1	0*	0,1		
Ac x MB	2x	951802-3	0*	0,1	opent slecht	zeer weinig
Ex x CK	4x	950220		0,1	niet	veel
MS x CK	2x	951289-1	0*	0,1	niet	weinig
To x CK	2x	952059-8	0*-25	0,1	half	weinig
Ch x CK	2x	942587-1	0*-25	0		
MS x CK	2x	951301-5	0*	0		
Ex x MB	2x	951815-1	0	0		
Bel x GS	2x	951447-3	0*	0		
Ex x CK	2x	951479-3	0*	0	half	weinig
Ang x CK	2x	952534-1	0*-25	0		
To x CK	2x	952059-4	50	0		
Rom x CK	2x	952377-4	25-75**	0		

Tabel 3.14 geeft weer hoe de verdeling van hybriden met kiemend pollen is over de OA-populatie. Het kiemingspercentage varieert van 5% tot 0%. 76 van de 90 hybriden waarvan het pollen bekeken is, had niet-kiemend pollen (84%) Zeven hybriden hebben pollen met meer dan 1% kieming (7%).

Tabel 3.14. Aantallen hybriden met verschillende mate van pollenkieming. x= niet of zeer slecht openende anthere. niet wg.=niet waargenomen

kiemings%	aantal
5	1
1	6
0,5	2
0,1	5
0	76
x	11
niet wg.	25
totaal	126

De OA-hybriden met (deels) kiemend pollen lijken van diverse afkomst te zijn. Er kunnen geen ouders aangewezen worden die opvallende veel fertiliteit in OA-hybriden geven. Alleen 'Mont Blanc' komt relatief vaak voor bij de ouders (zie Tabel 3.13). 'Mont Blanc' vormt ongereduceerde mannelijke gameten. Dit is een indicatie dat de vorming van ongereduceerde gameten paternaal overerft in OA-hybriden.

Het is uiteraard interessant om te weten of het uiterlijk van de anthere samenhangt met het kiemingspercentage van het pollen. Dan zouden hybriden niet per stuk te hoeven worden getoetst op pollenkieming, maar dan zouden fertiele genotypen morfologisch onderscheidbaar zijn.

Deze samenhang blijkt, indien aanwezig, laag te zijn. Bijvoorbeeld, nummer 950220 heeft zeer goed uitziende antheren met veel pollen, maar geen pollenkieming. Daarentegen hebben 951584-1, 952059-9, 952400-1 en 962134-7 redelijk kiemend pollen (1-5%), maar slecht uitziende antheren met weinig pollen. Toch hebben sommige hybriden redelijk goed uitziende antheren met veel pollen, dat redelijk kiemt (1%).

Het aantal volle pollenkorrels lijkt wel samen te hangen met het kiemingspercentage. Alle nummers met redelijk kiemend pollen hebben pollen met zo rond de 50% volle pollenkorrels. Nummers met slecht tot niet-kiemend pollen hebben pollen met weinig volle pollenkorrels (0-25%). Uitzondering is 952377-4, die een hoog percentage volle pollenkorrels heeft, maar niet-kiemend pollen.

Het kiemingspercentage van een hybride hoeft niet constant te zijn. 951884-2, 952521-1 en 952527-2 vertoonden namelijk variatie in pollenkieming in de tijd. De oorzaak hiervan is onbekend. Hybriden die pollenkieming vertoonden, waren, indien mogelijk, meerdere malen getoetst op pollenkieming. Het zou dus kunnen dat hybriden die aanvankelijk niet-kiemend pollen hadden en dus niet verder zijn bekeken, uiteindelijk bloemen maakten waarvan het pollen wel kiemt. Dit zou betekenen dat enkele fertiele genotypen niet gevonden zijn.

Er waren elf hybriden waarvan de antheren niet of zeer slecht openen. De oorzaak hiervan is onbekend.

Geen van de tetraploïde OA-hybriden was duidelijk mannelijk fertiel. Twee (950220 en 950224 =tetra ('Expression' x 'Connecticut King')) hadden een zeer laag pollenkiemingspercentage van 0,1%. Alle andere tetra OA's die beoordeeld waren (950222, 950239, 950245 (tetra Ex x CK), 950248 (tetra MS x CK), 960053, 950151, 960066, 960067 (tetra Ang x CK)) gaven geen pollenkieming.

3.2.12 Pollenbuisgroei in de stijl bij verschillende combinaties met OA

Alle OA-hybriden zijn teruggekruist met tetraploïde Aziaat 'tetra Orlito'. Dit is gedaan om de vrouwelijke fertiliteit van de OA-hybriden te bepalen. Dit zal worden behandeld in 3.2.13. Ook zijn sommige OA-hybriden teruggekruist met tetraploïde Oriëntal-hybriden. OA-hybriden waarvan het pollen een kieming gaf van $\geq 1\%$ zijn teruggekruist op diploïde en tetraploïde Oriëntals en op diploïde en tetraploïde Aziaten.

Van enkele van deze kruisingen is gekeken hoe de pollenbuisdoorgroei was in de stijl. De resultaten daarvan staan weergegeven in Tabel 3.15. Het nut van deze toets is om een indicatie te krijgen van pré-fertilisatie barrières van combinaties met OA. Door het lage aantal bekeken stijlen is deze toets te beschouwen als een indicatie van de pollenbuisdoorgroei bij de verschillende combinaties.

Tabel 3.15. Aantal waargenomen pollenbuizen op twee stijlhoogtes bij kruisingen van diploïde OA (OA) (OAxAAAA: resp. 951486-1, 951801-1, 951439-1, 942817-1, 951592-2, 950239; OAxOOOO: 951584-1; AAAAxOA: 951584-1; OOOOx OA: 952059-9, 951584-1, 952400-1), tetraploïde Aziaat (AAAA) (=tetraploïde 'Orlito') en tetraploïde Oriental (OOOO) (=tetraploïde 'Stargazer'). *)= aantal pollenbuizen op 95% van de stijl.

vader	moeder					
	OA		AAAA		OOOO	
stijlhoogte	halverwege	snijvlak	halverwege	snijvlak	halverwege	snijvlak
OA			3	1	1; 10; 10	0; 4; 1
AAAA	40; 100; 100;	40*; 15;				
	100; 10; 80	15; 30;				
		4; 30				
OOOO	pollenbuizen tot vlak onder stempel					

Bij alle kruisingen is een overdadige hoeveelheid pollen op de stempel gebracht. De terugkruisingen waarbij diploïde OA werd teruggekruist met tetraploïde 'Orlito' als vader hebben allen een pollenbuisdoorgroei van 10-40 pollenbuizen bij het einde van de stijl.

De enkele terugkruising waarbij diploïde OA werd teruggekruist met tetraploïde Oriëntal als vader geeft totale remming van de pollenbuizen vlak onder de stempel.

De terugkruisingen waarbij diploïde OA is gebruikt als vader geven zeer weinig pollenbuisdoorgroei (1-10 pollenbuizen bij het einde van de stijl). Of dit te wijten is aan een lage fertiliteit van het pollen (1-5% kieming), dus een lage intiële hoeveelheid pollenbuizen of aan een remming in de stijl of allebei, is niet te zeggen.

De conclusie is dat de combinatie OA X AAAA geen absolute pré-fertilisatie barrières in de stijl kent, zoals bij OA x OOOO het geval lijkt te zijn. Of er andere pré-fertilisatie barrières bestaan en of er postfertilisatie barrières bestaan bij deze combinatie is pas te zeggen als bekend is hoeveel embryo's gevormd zijn (zie 3.2.13).

Om te bepalen of de combinatie met OA als vader congruent is met tetraploïde Oriëntal of tetraploïde Aziaat, moeten meer stijlen bekeken worden. Er is in ieder geval geen totale remming in de stijl. Dus in de stijl bestaan geen absolute congruentie-barrières.

3.2.13 Vrouwelijke fertiliteit van OA-hybriden

In deze paragraaf staan de resultaten van de bestuivingsexperimenten waarbij alle OA's zijn bestoven met tetraploïde 'Orlito' als vader.

Van alle geogoste vruchten was het resultaat voor zover (oktober 1998) één kiemende embryo. Deze was van de kruising (CSM) 950220 (=tetraploïde 'Expression' x 'Connecticut King') x tetraploïde Orlito.

3.2.14 Botrytis-toets

Een *Botrytis*-toets is uitgevoerd bij 20 OA-hybriden en hun ouders (2.2.3).

Resultaten

De DSS-waarden (disease severity score) van de Oriëntals zijn lager dan de DSS-waarden van de Aziatische hybriden. 'Acapulco' en 'Expression' zitten namelijk met een waarde van 1,5 en 2,0 duidelijk onder 'Connecticut King' en 'Mont Blanc', met respectievelijk 3,4 en 3,9. De OA-hybriden zitten met DSS-waarden van 1,6 (bij 952400-1) tot 5,0 (951479-2) niet onder de Oriëntals, maar wel boven de Aziatische hybriden. Drie OA-hybriden hebben namelijk een hogere DSS-waarde dan Aziatische hybriden, te weten 951802-1, 951953-1 en 951479-2 met resp. 4,3; 4,3 en 5,0 (zie Tabel 3.16). Alle andere OA-hybriden zitten tussen 'Expression' en 'Acapulco' in.

Tabel 3.16. DSS-waarde voor *Botrytis elliptica*-aantasting van 'Acapulco', 'Expression', 'Connecticut King' en 'Mont Blanc' en van 20 OA-hybriden, vijf dagen na inoculatie. De OA-hybriden zijn gesorteerd op hun herkomst. De gebruikte afkortingen zijn als in Tabel 3.6.

nummer	herkomst	DSS	nummer	herkomst	DSS
Ac	Oriëntal	1,5	952530-3	Ex x BrB	3,3
Ex	Oriëntal	2,0	942817-1	Ex x CK	2,4

CK	Aziaat	3,4	951479-1	Ex x CK	2,6
MB	Aziaat	3,9	951479-2	Ex x CK	5,0
951835-3	Ac x CK	3,6	953521-1	Ex x CK	2,2
951802-1	Ac x MB	4,3	953508-1	Ex x LR	3,3
951802-3	Ac x MB	3,5	952381-5	MS x GS	2,4
951953-1	Ang x CK	4,3	952400-1	MS x GS	1,6
951407-9	Bel x CK	3,1	951502-1	Pes x CK	2,5
951447-3	Bel x GS	2,3	951518-8	Rom x CK	1,7
952088-1	Ex x AR	3,8	951598-1	Rom x CK	3,1
952530-2	Ex x BrB	2,0	952059-9	To x CK	2,6

Fig. 3.15 laat duidelijk zien dat de DSS-waarden van de OA-hybriden continu verdeeld zijn. Er zijn geen duidelijke groepen aan te wijzen. DSS-waarden van OA-hybriden in Fig. 3.15 stijgen gestaag van 1,5 tot 5,0.

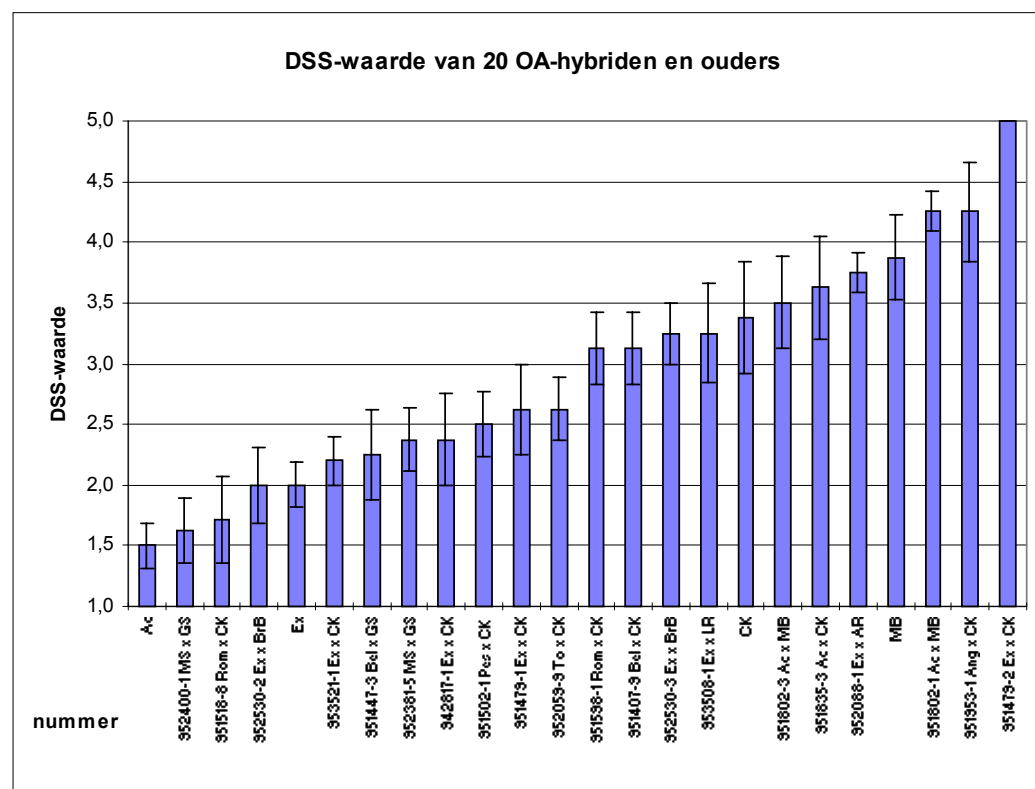


Fig. 3.15. DSS-waarde voor *Botrytis elliptica* van 'Acapulco', 'Expression', 'Connecticut King', 'Mont Blanc' en van 20 OA-hybriden vijf dagen na inoculatie. De herkomst van de hybriden is gegeven. Gebruikte afkortingen zijn als in Tabel 3.6.

Analyse

Dit stuk onderzoek is indicatief. Het belang ervan was om een idee te krijgen van het nivo en de verdeling van resistentie voor *Botrytis elliptica* bij OA-hybriden.

De gevonden verdeling van DSS-waarden lijkt op een continue verdeling. Dit geeft aan dat vatbaarheid of resistentie van een genotype niet bepaald wordt door een simpel mechanisme, maar dat er waarschijnlijk meerdere genen in het spel in het spel zijn. Als het een simpel mechanisme zou zijn geweest, zouden er slechts enkele nivo's van resistentie bij de OA-hybriden te zien zijn.

Opmerkelijk is dat nakomelingen van dezelfde combinatie sterk kunnen verschillen in DSS-waarde. Vier zaailingen van 'Expression' x 'Connecticut King' hebben respectievelijk een DSS-waarde van 2,2; 2,4; 2,6 en 5,0. Dit kan duiden op één of meer hoofdgenen.

Het nivo van de resistentie van de OA-hybriden voor *Botrytis elliptica* ligt tussen dat van de Oriëntals en Aziaten in. Sommige hybriden bereiken een zelfde nivo als de Oriëntals, sommige een zelfde nivo als de Aziaten. Ook zijn enkele OA-hybriden vatbaarder dan de Aziaten.

-*Botrytis*-resistentie splitst uit in OA.

5.4. Botrytis-toets

Met behulp van blad-topjes zijn enkele Botrytis-toetsingen in het laboratorium uitgevoerd. De voorlopige resultaten van deze toets laten zien dat de Aziaten 'Connecticut King' en 'Mont Blanc' vatbaar zijn, terwijl de orientals 'Acapulco', 'Expression' en 'Stargazer' juist een sterk resistente reactie vertonen. In een vergelijkende toets met 20 OA-hybriden bleek de variatie in gevoeligheid te variëren van zeer vatbaar tot zeer resistent (zie Fig. 3). Dit opent belangrijke perspectieven.

5.5. Bestudering van introgressie

Met behulp van genomische *in situ* hybridisatie (GISH) kunnen chromosomen van verschillende soorten zichtbaar gemaakt worden. Deze techniek ontwikkelt zich snel en ons doel was om de genomen van longiflorum, aziaat en oriental afzonderlijk zichtbaar te kunnen maken, zodat recombinatie van deze genomen

onderling (in bepaalde genotypen) aangetoond kan worden. Er is vorig jaar gestart een serie *L. longiflorum* x Aziatische hybriden (LA) die 2n-pollen produceren en waarvan 2 volgende generaties beschikbaar waren. De resultaten hiermee waren veelbelovend. Dit jaar werd doorgedaan met de *L. longiflorum* x *L. rubellum* hybriden. Ook hier konden de chromosomen van *L. longiflorum* en van *L. rubellum* goed afzonderlijk zichtbaar gemaakt worden. Recombinatie werd hier nog niet aangetoond. Het zou kunnen dat dit bij mitotische tetraploïden minder eenvoudig gaat dan met de meiotische (2n-producerende) LA's.

5.6. Kruisingsprogramma's 1997 en 1998

De resultaten het kruisingsprogramma van 1997 werden reeds besproken in het vorige halfjaarlijkse verslag. Het grootste deel van het embryo-rescue materiaal werd dit jaar uitgeplant. Tabel 3 geeft een overzicht van alle verkregen kruisingscombinaties en welke reeds uitgeplant zijn.

Het kruisingsprogramma van dit jaar (1998) was, gericht op terugkruisingen met tetraploïd soortkruisingsmateriaal (met herstelde fertiliteit). Als moeder werd een sortiment tetraploïde *L. longiflorum*-nummers, Aziaten, enkele LA's en Orientalrassen gebruikt. Als vader fungeerden diverse AA, OO, LD, LO, LA en OA-nummers. Er is vooral veel aandacht besteed aan de OA-hybriden. Alle OA's werden/worden afzonderlijk getest op mannelijke en vrouwelijke fertiliteit. Er werden (tot nu toe) 8 hybriden gevonden met enige mannelijke fertiliteit (kiemkracht 1-5 %). Alle hybriden worden als moeder gebruikt. De resultaten hiervan zijn nog niet beschikbaar (zie Tabel 2). De eerste vier bloeiende tetraploïde OA's bleken geen tot geringe pollenfertiliteit te bezitten.

5.7. Geslaagde kruisingscombinaties

Een groot aantal nieuwe hybriden kwam dit jaar in bloei. Allereerst kwam een groot aantal **OA-hybriden** in bloei. De variatie in bloemvorm, kleur en fertiliteit wordt in kaart gebracht.

De eerste Oriental x *L. hansonii* en Oriental x *L. pardalinum* hybride kwamen in bloei, waarmee is bewezen dat kruisingen met alle secties van het geslacht *Lilium* mogelijk zijn. Nadat vorig jaar de eerste LLR-kruisingen in bloei kwamen was het nu de beurt aan de OLR-combinaties, waaruit blijkt dat met de LO/LR naar beide ouders teruggekruist kan worden.

6. Publikaties en lezingen

* Deelname aan het 19th International Eucarpia Symposium
'Improvement of ornamental plants' 27-31 July Angers, France:

Poster en artikel:

G.I. Karlov, L.I. Khrustaleva, Ki-Byung Lim, H. Meijer & J. M. van Tuyl

Genomic in situ hybridization (GISH) study of interspecific hybrids of lily

* Vakbladartikel sept/okt Bloembollencultuur

7. Plannen eerste helft 1999

* Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit en op kruisbaarheid met tetraploid materiaal (selectie van de beste geniteurs) en toepassing van embryo-rescue methoden

* In vitro en in vivo polyploidisatie van met name geselecteerde OA-nummers

* Selectie en opkweek van tetraploide OA's

* Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 1997 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.

* Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de bedrijven.

* In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.

* Ontwikkeling en toepassing van Botrytis-resistentie toetsing m.b.v. bladtopjes van OA-hybride-materiaal.

Tabel 2. Aantal bestoven bloemen, verdeeld over 3 onderdelen van het in 1998 uitgevoerde soortkruisingsprogramma, t.w. de OA-kruisingen, de *L. longiflorum* x *L. rubellum* kruisingen en de overige kruisingen verdeeld over de diverse ``typen'' soortkruisingen. Verder het aantal gekiemde zaadknoppen/embryo's tot 1/12/98.

	overig	long x rub	OA	Totaal	Kiem
AA-OA			22	22	1
AALA-OA			8	8	
L-LLR		102		102	
L-LO	21			21	3
L-LR		57		57	17
LA-LD	1			1	
LA-LO	17			17	
LA-OA			2	2	
LA-SD	1			1	
LD-LD	29			29	3
LD-LO	2			2	
LL-LLR		25		25	1
LL-LO	53			53	3
LL-LR		131		131	17
LLR-L		65		65	76
LLR-LL		9		9	60
LLR-LLR		76		76	
LLR-O		20		20	3
LO-AA	4			4	1
LO-AALA	9			9	
LO-LA	1			1	
LO-LD	3			3	
LO-LL	5			5	
LO-LO	15			15	22
LO-LR	1			1	
LO-O	4			4	
LO-OA	1			1	
LO-OO	18			18	2
LO-SD	3			3	
LR-L		5		5	
LR-LL		6		6	
LR-LO	2			2	9
LR-LR		4		4	3
O-LLR		24		24	
O-LO	15			15	10
O-OA			6	6	
O-OHa	2			2	71?
OA-AA	3		504	507	1
OA-LA			1	1	
OA-LO	7		6	13	
OA-OA			3	3	
OA-OO			44	44	
OHa-LO	1			1	
OLR-OO	1			1	2
OO-LO	37			37	14
OO-LR	4			4	
OO-OA			28	28	8?
OO-OO	6			6	1
OO-SD	1			1	
Totaal	267	524	624	1415	328

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken
kruisingsbarrières 1
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag

Halfjaarlijks verslag, periode 1/06/98-1/12/98

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer CPRO-DLO projectnummer: 2.080.016

3. Algemeen

Personele inzet

Ing. B. van Kronenburg- van de Ven
A. van Dijken
K.B. Lim
Dr. J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)
S. Bottema
N. van Buggenum
H. Imanse
Ir. A. Vletter
Ir. D. van Kleinwee
P.J. Kos
Ing. K. Laan
Ir. A. Peterse
C. Randag
Ir. A. van Voorst

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekeresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

In de tweede helft van het eerste jaar van het nieuwe leliesoortkruisingsproject hebben de 11 leliebedrijven zich verenigd in de commanditaire vennootschap SLV, waardoor het maken van afspraken (zoals het sluiten van een overeenkomst) veel eenvoudiger wordt. De Zuid-Koreaanse gastmedewerker Ki-Byung Lim heeft zich verder verdiept in het genomisch in situ hybridisatie onderzoek. Met medewerking van de LUW-student Ronald Snijder heeft er een uitgebreide inventarisatie van de OA-hybriden plaats gevonden. Vanuit zijn doctoraal verslag zijn de belangrijkste passages overgenomen in dit halfjaarlijks verslag

5.2. Bestudering OA-hybriden

In Tabel 7 en 8 zijn de gegevens opgenomen voor de diverse kenmerken, waarvoor de OA's bestudeerd zijn. De belangrijkste resultaten worden hier kort besproken t.w. bloemkleur (5.2.1), bloemgrootte (5.2.2), geur (5.2.3), manlijke fertiliteit (5.2.4), pollenbuisdoorgroei (5.2.5), vrouwelijke fertiliteit (5.2.6) en Botrytis-resistentie (5.2.7).

5.2.1. De bloemkleur

Er zijn veel verschillende combinaties gemaakt, die allen bekeken zijn. Samengevat heeft dit geleid tot fig. 1, waar schematisch de hypothetische bloemkleur-fenotype-overerving bij OA's is weergegeven.

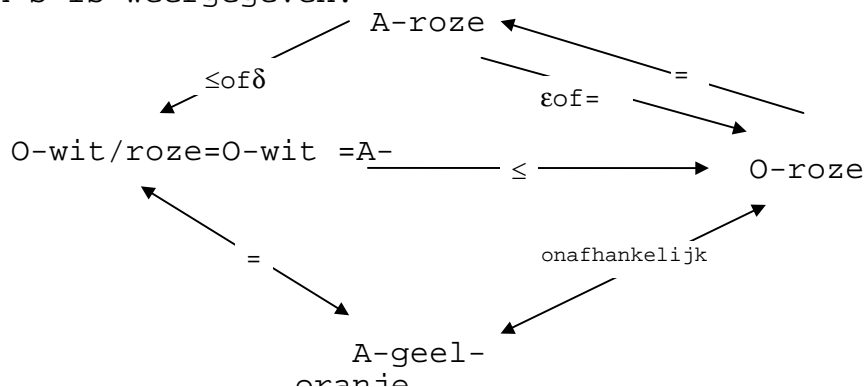


Fig. 1. Schema van hypothetische bloemkleur-fenotype-overerving bij OA. A=Aziatisch, O=Oriëntal. '=' = codominant, '≤' = co-dominant of dominant, 'δ' = overdominant

5.2.2 Bloemgrootte

De OA-hybriden varieerden aanzienlijk ten aanzien van de bloemgrootte. De kwantificering van de bloemgrootte is gedaan door de knopgrootte te meten.

De knopgrootte van OA-hybriden is intermediair ten opzichte van Aziatische hybriden en Oriëntal-hybriden. De knoppen van de gebruikte Aziatische ouders zijn gemiddeld 8,1 cm, de knoppen van de gebruikte Oriëntals zijn gemiddeld 12,6 cm. De

gemiddelde knopgrootte van alle OA-hybriden zit daar met 9,9 cm tussenin. De knoppen van OA-hybriden varieerden van 13,7 cm (bij 951301-3) tot 6,5 cm (bij 952534-2).

Het is interessant om te weten of ouders met relatief grote knoppen ook nakomelingen geven met relatief grote knoppen. Fig. 2 geeft een overzicht van de gemiddelde lengte van de knoppen van alle halfsib-families van 'Connecticut King'.

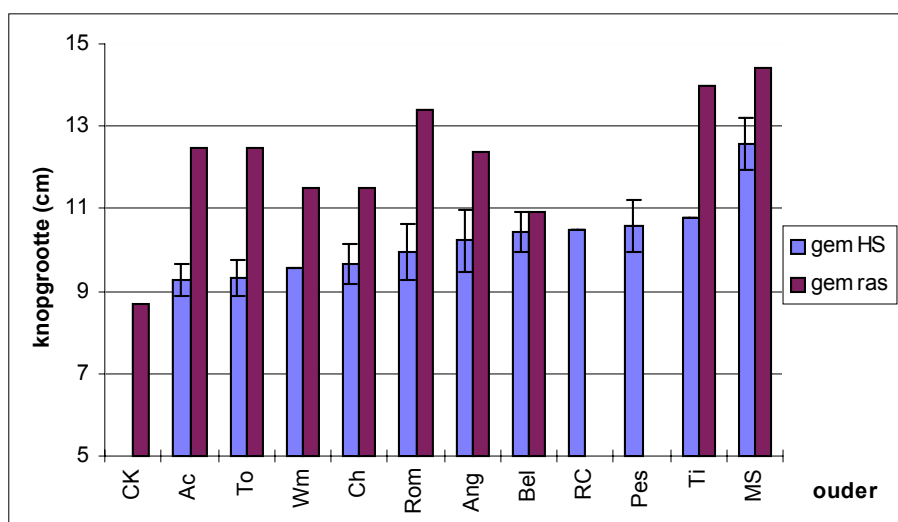


Fig. 2. Knopgrootte in cm van half-sib-families van 'Connecticut King' (CK), van de moeders en van 'Connecticut King'. RC=Royal Class.

'Merostar' heeft met 14,4 cm de grootste knoppen. Zijn nakomelingschap heeft ook de grootste knoppen. Echter, 'Romero Star' heeft op twee na de grootste knoppen, echter zijn half-sib-familie heeft een knopgrootte met gemiddelde knopgrootte. De conclusie is dat er wel samenhang bestaat, maar dat deze niet groot is. De lage correlatie-coëfficiënt van 0,62 van knopgrootte van de moeder en gemiddelde knopgrootte van de half-sib-familie geeft dit ook aan.

5.2.3 Geur

De eigenschap 'geur' is, net als de eigenschap 'pollenkleur', niet uitgewerkt. Het bleek namelijk uiterst moeilijk om deze eigenschap consequent waar te nemen. De intensiteit van geur bleek sterk afhankelijk van het weer en de leeftijd van de bloem. Een net geopende bloem ruikt zwakker dan een ruim geopende bloem, die op zijn beurt weer sterker ruikt dan een uitbloeiende bloem. Bij zonnig weer is de geur echter weer sterker dan op een regenachtige dag.

Om geur goed te beoordelen zouden in een geconditioneerde ruimte waarnemingen gedaan moeten worden aan bloemen van gelijke leeftijd. In de kas, zoals bij dit onderzoek, was dit dus niet mogelijk.

Bovendien is de eigenschap 'geur' op zich al een lastige eigenschap om waar te nemen. Vooral de geur van Aziaten is zeer lastig. De meesten hebben geen geur en als die wel aanwezig dan is het een zeer subtiele, ietwat muffige geur.

Daar komt bij dat geur moeilijk te omschrijven valt. Gedetailleerder waarnemen dan 'zoet en zwaar' als 'Acapulco' is moeilijk.

Zeker is dat er variatie bestaat bij OA-hybriden ten aanzien van geur. Sommige hadden heel duidelijk geen geur en sommige roken als een Oriëntal. Maar sommigen roken zeer aangenaam (o.a. 951847-1 = 'Primero' x 'Mont Blanc'), niet zwaar als een Oriëntal en niet half afwezig als een Aziaat, maar precies en goed daar tussenin. Anderen hadden ook een intermediaire geur, maar stonken (o.a. 942580-1 (= 'Expression' x 'Connecticut King')).

5.2.4 Mannelijke fertiliteit van OA-hybriden

Alle OA-hybriden zijn beoordeeld op mannelijke en vrouwelijke fertiliteit. De hybriden werden beoordeeld op pollenkieming, het uiterlijk van het pollen en deels op het uiterlijk van de anthere en de hoeveelheid pollen per anthere. De resultaten van 27 OA's zijn overzichtelijk weergegeven in Tabel 1

Tabel 1. Het kiemingspercentage, het uiterlijk van het pollen (percentage volle pollenkorrels), het uiterlijk van de anthere (mate van verschrompeling) en de hoeveelheid pollen in de antheren van verschillende OA-nummers met ploïdie en ouders; gesorteerd op kiemingspercentage. Starf= 'Starfighter', Sis = 'Sissi', Mir='Mirella', Lan='Lanzarote'

* = zeer weinig volle korrels, meestal relatief groot

**= variabel voor verschillende bloemen

c = alle kiemende pollenkorrels liggen bij elkaar.

lege cel= niet waargenomen

ouders	2n=	nummer	% volle pollenkorrels	kiemings%	uiterlijk anthere	hoeveelheid pollen
Ac x San	2x	951584-1	25-50	5	half	weinig
To x CK	2x	952059-9	50	1	niet	weinig
MS x GS	2x	952400-1	50	1	niet	weinig
Ex x CK	4x	950224	75	1	niet	veel
Ti x MB	2x	951884-2	50	0-1**	niet-half**	veel-weinig**
Bel x MB	2x	962134-7	50	1	niet	weinig
Sis x Mir	2x	962433-1	50-75	1	niet	veel
Ti x Mon	2x	951381-5	25	1	wel	weinig
Starf x Lan	2x	962328-1	25	1		
Ang x MB	2x	952521-1	0-75**	0-1**	niet	veel-zeer weinig**
Pes x CK	2x	951486-2	75	0,5	niet	weinig
To x CK	2x	952059-3	0*	0,5		
Ang x BrB	2x	952527-2	0*-75**	0-0,5**	half	weinig
Ex x CK	2x	942584-1		0,1	wel	weinig
Ex x GS	2x	952458-1	0*	0,1		
Ac x MB	2x	951802-3	0*	0,1	opent slecht	zeer weinig
Ex x CK	4x	950220		0,1	niet	veel
MS x CK	2x	951289-1	0*	0,1	niet	weinig

To x CK	2x	952059-8	0*-25	0,1	half	weinig
Ch x CK	2x	942587-1	0*-25	0		
MS x CK	2x	951301-5	0*	0		
Ex x MB	2x	951815-1	0	0		
Bel x GS	2x	951447-3	0*	0		
Ex x CK	2x	951479-3	0*	0	half	weinig
Ang x CK	2x	952534-1	0*-25	0		
To x CK	2x	952059-4	50	0		
Rom x CK	2x	952377-4	25-75**	0		

Tabel 2 geeft weer hoe de verdeling van hybriden met kiemend pollen is over de OA-populatie. Het kiemingspercentage varieert van 5% tot 0%. 76 van de 90 hybriden waarvan het pollen bekeken is, had niet-kiemend pollen (84%). Zeven hybriden hebben pollen met meer dan 1% kieming (7%).

Tabel 3. Aantallen hybriden met verschillende mate van pollenkieming. x= niet of zeer slecht openende anthere. niet wg.=niet waargenomen

kiemings%	aanta
1	1
5	1
1	6
0,5	2
0,1	5
0	76
x	11
niet wg.	25
totaal	126

De OA-hybriden met (deels) kiemend pollen lijken van diverse afkomst te zijn. Er kunnen geen ouders aangewezen worden die opvallende veel fertiliteit in OA-hybriden geven. Alleen 'Mont Blanc' komt relatief vaak voor bij de ouders. 'Mont Blanc' vormt ongereduceerde mannelijke gameten. Dit is een indicatie dat de vorming van ongereduceerde gameten paternaal overerft in OA-hybriden.

Het is uiteraard interessant om te weten of het uiterlijk van de anthere samenhangt met het kiemingspercentage van het pollen. Dan zouden hybriden niet per stuk te hoeven worden getoetst op pollenkieming, maar dan zouden fertiele genotypen morfologisch onderscheidbaar zijn.

Deze samenhang blijkt, indien aanwezig, laag te zijn. Bijvoorbeeld, nummer 950220 heeft zeer goed uitziende antheren met veel pollen, maar geen pollenkieming. Daarentegen hebben 951584-1, 952059-9, 952400-1 en 962134-7 redelijk kiemend pollen (1-5%), maar slecht uitziende antheren met weinig pollen. Toch hebben sommige hybriden redelijk goed uitziende antheren met veel pollen, dat redelijk kiemt (1%).

Het aantal volle pollenkorrels lijkt wel samen te hangen met het kiemingspercentage. Alle nummers met redelijk kiemend

pollen hebben pollen met zo rond de 50% volle pollenkorrels. Nummers met slecht tot niet-kiemend pollen hebben pollen met weinig volle pollenkorrels (0-25%). Uitzondering is 952377-4, die een hoog percentage volle pollenkorrels heeft, maar niet-kiemend pollen.

Het kiemingspercentage van een hybride hoeft niet constant te zijn. 951884-2, 952521-1 en 952527-2 vertoonden namelijk variatie in pollenkieming in de tijd. De oorzaak hiervan is onbekend. Hybriden die pollenkieming vertoonden, waren, indien mogelijk, meerdere malen getoetst op pollenkieming. Het zou dus kunnen dat hybriden die aanvankelijk niet-kiemend pollen hadden en dus niet verder zijn bekeken, uiteindelijk bloemen maakten waarvan het pollen wel kiemt. Dit zou betekenen dat enkele fertiele genotypen niet gevonden zijn.

Er waren elf hybriden waarvan de antheren niet of zeer slecht openden. De oorzaak hiervan is onbekend.

Geen van de tetraploïde OA-hybriden was duidelijk mannelijk fertiel. Twee (950220 en 950224 =tetra ('Expression' x 'Connecticut King')) hadden een zeer laag pollenkiemingspercentage van 0,1%. Alle andere tetra OA's die beoordeeld waren (950222, 950239, 950245 (tetra Ex x CK), 950248 (tetra MS x CK), 960053, 950151, 960066, 960067 (tetra Ang x CK)) gaven geen pollenkieming.

5.2.5 Pollenbuisgroei in de stijl bij verschillende combinaties met OA

Alle OA-hybriden zijn teruggekruist met tetraploïde Aziaat 'tetra Orlito'. Dit is gedaan om de vrouwelijke fertiliteit van de OA-hybriden te bepalen. Dit zal worden behandeld in 5.2.6. Ook zijn sommige OA-hybriden teruggekruist met tetraploïde Oriëntal-hybriden. OA-hybriden waarvan het pollen een kieming gaf van $\geq 1\%$ zijn teruggekruist op diploïde en tetraploïde Oriëntals en op diploïde en tetraploïde Aziaten.

Van enkele van deze kruisingen is gekeken hoe de pollenbuisdoorgroei was in de stijl. De resultaten daarvan staan weergegeven in Tabel 4. Het nut van deze toets is om een indicatie te krijgen van pré-fertilisatie barrières van combinaties met OA. Door het lage aantal bekeken stijlen is deze toets te beschouwen als een indicatie van de pollenbuisdoorgroei bij de verschillende combinaties.

Tabel 4. Aantal waargenomen pollenbuizen op twee stijlhoogtes bij kruisingen van diploïde OA (OA) (OAxAAAA: resp. 951486-1, 951801-1, 951439-1, 942817-1, 951592-2, 950239; OAx0000: 951584-1; AAAAxOA: 951584-1; 0000x OA: 952059-9, 951584-1, 952400-1), tetraploïde Aziaat (AAAA) (=tetraploïde 'Orlito') en tetraploïde Oriental (0000) (=tetraploïde 'Stargazer'). *)= aantal pollenbuizen op 95% van de stijl.

vader		moeder				
	OA	AAAA		0000		
stijlhoog	halverwe	snijvla	halverwe	snijvla	halverweg	snijvl

te	ge	k	ge	k	e	ak
OA			3	1	1; 10; 10	0; 4; 1
AAAA	40; 100; 100; 100; 10; 80	40*; 15; 15; 30; 4; 30				
O000	pollenbuizen tot vlak onder stempel					

Bij alle kruisingen is een overdadige hoeveelheid pollen op de stempel gebracht. De terugkruisingen waarbij diploïde OA werd teruggekruist met tetraploïde 'Orlito' als vader hebben allen een pollenbuisdoorgroei van 10-40 pollenbuizen bij het einde van de stijl.

De enkele terugkruising waarbij diploïde OA werd teruggekruist met tetraploïde Oriëntal als vader geeft totale remming van de pollenbuizen vlak onder de stempel.

De terugkruisingen waarbij diploïde OA is gebruikt als vader geven zeer weinig pollenbuisdoorgroei (1-10 pollenbuizen bij het einde van de stijl). Of dit te wijten is aan een lage fertiliteit van het pollen (1-5% kieming), dus een lage intiële hoeveelheid pollenbuizen of aan een remming in de stijl of allebei, is niet te zeggen.

De conclusie is dat de combinatie OA X AAAA geen absolute pré-fertilisatie barrières in de stijl kent, zoals bij OA x O000 het geval lijkt te zijn. Of er andere pré-fertilisatie barrières bestaan en of er postfertilisatie barrières bestaan bij deze combinatie is pas te zeggen als bekend is hoeveel embryo's gevormd zijn (zie 3.2.13).

Om te bepalen of de combinatie met OA als vader congruent is met tetraploïde Oriëntal of tetraploïde Aziaat, moeten meer stijlen bekeken worden. Er is in ieder geval geen totale remming in de stijl. Dus in de stijl bestaan geen absolute congruentie-barrières.

5.2.5 Vrouwelijke fertiliteit van OA-hybriden

In deze paragraaf staan de resultaten van de bestuivingsexperimenten waarbij alle OA's zijn bestoven met tetraploïde 'Orlito' als vader.

Van alle geoogste vruchten was het resultaat voor zover (oktober 1998) één kiemende embryo. Deze was van de kruising (CSM) 950220 (=tetraploïde 'Expression' x 'Connecticut King') x tetraploïde Orlito.

5.2.6 Botrytis-toets

Een *Botrytis*-toets is uitgevoerd bij 20 OA-hybriden en hun ouders. De DSS-waarden (disease severity score) van de Oriëntals zijn lager dan de DSS-waarden van de Aziatische hybriden. 'Acapulco' en 'Expression' zitten namelijk met een waarde van 1,5 en 2,0 duidelijk onder 'Connecticut King' en

'Mont Blanc', met respectievelijk 3,4 en 3,9. De OA-hybriden zitten met DSS-waarden van 1,6 (bij 952400-1) tot 5,0 (951479-2) niet onder de Oriëntals, maar wel boven de Aziatische hybriden. Drie OA-hybriden hebben namelijk een hogere DSS-waarde dan Aziatische hybriden, te weten 951802-1, 951953-1 en 951479-2 met resp. 4,3; 4,3 en 5,0 (zie Tabel 5). Alle andere OA-hybriden zitten tussen 'Expression' en 'Acapulco' in.

Tabel 5. DSS-waarde voor *Botrytis elliptica*-aantasting van 'Acapulco', 'Expression', 'Connecticut King' en 'Mont Blanc' en van 20 OA-hybriden, vijf dagen na inoculatie. De OA-hybriden zijn gesorteerd op hun herkomst.

nummer	herkomst	DSS	nummer	herkomst	DSS
Ac	Oriëntal	1,5	952530-3	Ex x BrB	3,3
Ex	Oriëntal	2,0	942817-1	Ex x CK	2,4
CK	Aziaat	3,4	951479-1	Ex x CK	2,6
MB	Aziaat	3,9	951479-2	Ex x CK	5,0
951835-3	Ac x CK	3,6	953521-1	Ex x CK	2,2
951802-1	Ac x MB	4,3	953508-1	Ex x LR	3,3
951802-3	Ac x MB	3,5	952381-5	MS x GS	2,4
951953-1	Ang x CK	4,3	952400-1	MS x GS	1,6
951407-9	Bel x CK	3,1	951502-1	Pes x CK	2,5
951447-3	Bel x GS	2,3	951518-8	Rom x CK	1,7
952088-1	Ex x AR	3,8	951598-1	Rom x CK	3,1
952530-2	Ex x BrB	2,0	952059-9	To x CK	2,6

Fig. 3 laat duidelijk zien dat de DSS-waarden van de OA-hybriden continu verdeeld zijn.

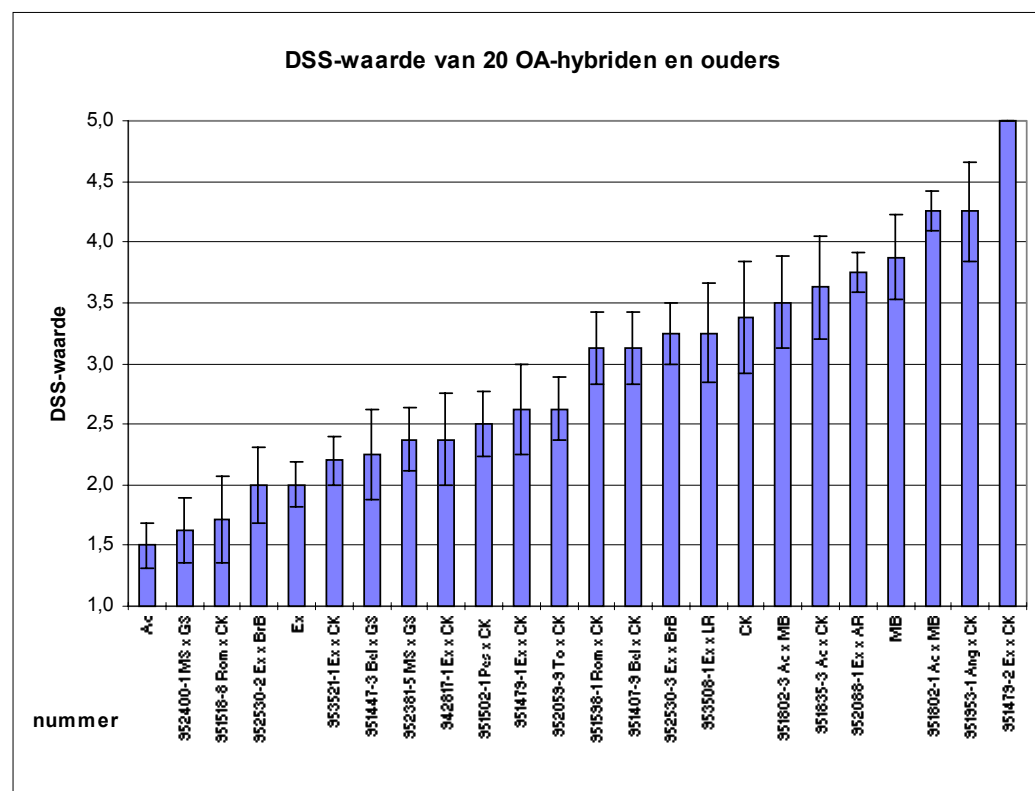


Fig. 3. DSS-waarde voor *Botrytis elliptica* van 'Acapulco', 'Expression', 'Connecticut King', 'Mont Blanc' en van 20 OA-hybriden vijf dagen na inoculatie. De herkomst van de hybriden is gegeven. Dit stuk onderzoek is indicatief. Het belang ervan was om een idee te krijgen van het nivo en de verdeling van resistentie voor *Botrytis elliptica* bij OA-hybriden.

De gevonden verdeling van DSS-waarden lijkt op een continue verdeling. Dit geeft aan dat vatbaarheid of resistentie van een genotype niet bepaald wordt door een simpel mechanisme, maar dat er waarschijnlijk meerdere genen in het spel in het spel zijn. Als het een simpel mechanisme zou zijn geweest, zouden er slechts enkele nivo's van resistentie bij de OA-hybriden te zien zijn.

Opmerkelijk is dat nakomelingen van dezelfde combinatie sterk kunnen verschillen in DSS-waarde. Vier zaailingen van 'Expression' x 'Connecticut King' hebben respectievelijk een DSS-waarde van 2,2; 2,4; 2,6 en 5,0. Dit kan duiden op één of meer hoofdgenen.

Het niveau van de resistentie van de OA-hybriden voor *Botrytis elliptica* ligt tussen dat van de Oriëntals en Aziaten in. Sommige hybriden bereiken een zelfde nivo als de Oriëntals, sommige een zelfde nivo als de Aziaten. Ook zijn enkele OA-hybriden vatbaarder dan de Aziaten.

5.3. Kruisingsprogramma 1998

Het kruisingsprogramma van dit jaar (1998) was, gericht op terugkruisingen met tetraploid soortkruisingsmateriaal (met herstelde fertiliteit). Als moeder werd een sortiment tetraploide *L. longiflorum*-nummers, Aziaten, enkele LA's en Orientalrassen gebruikt. Als vader fungeerden diverse AA, OO, LD, LO, LA en OA-nummers. Er is vooral veel aandacht besteed aan de OA-hybriden. Alle OA's werden/worden afzonderlijk getest op mannelijke en vrouwelijke fertiliteit. Er werden 7 hybriden gevonden met een mannelijke fertiliteit (kiemkracht 1-5 %, zie Tabel 2). Alle hybriden zijn als moeder gebruikt. De resultaten zijn verwerkt in Tabel 6. De eerste vier bloeiende tetraploide OA's bleken geen tot geringe pollenfertiliteit te bezitten.

5.4. Uitgifte van materiaal

Het volgende materiaal zal tijdens de begeleidingscommissie vergadering beschikbaar gesteld worden aan het SLV:

* **LLR/LR-hybriden:** 961003-27 (het verkochte nummer) gegroeid uit weefselkweek, en 4 nummers uit schub 961003-6, 961003-7, 961003-8, 950039 (de vader van de 961003 serie)

* **OA-hybriden:** 5 nummers waarvan 11 weefselkweekpotten gemaakt zijn;

2 diploiden 942172-1 en 951301-5 en 3 tetraploiden 970104 (tetra 951301-2), 970107 (tetra 952530-1) en 970113 (tetra 951502-1)

* **Getetraploidiseerd rassenmateriaal:**

Beatrix (940232, 940235, 940277); Meribel (940238, 940239, 940240);

Banita (940241, 940242, 940243); Gran Sasso (940260, 940261, 940264);
 Mont Martre (940268, 940271); Regata (940247) en San Marco (940266).

6. Publikaties en lezingen

Lim, Ki-Byung, G. I. Karlov, L.I. Khrustaleva, J.H. De Jong & J.M. Van Tuyl 1998. Introgression of Interspecific Hybrids of Lily using Genomic In Situ Hybridization (GISH). Lezing en Acta Hortic publikatie, EUCARPIA 19th International Symposium - Improvement of ornamental plants, 23-30 july 1998 Angers, France.

Karlov, G.I., L.I. Khrustaleva, K.B. Lim & J.M. Van Tuyl, 1998 Homoeologous recombination in 2n-gamete producing interspecific hybrids of Lilium (Liliaceae) studied by genomic in situ hybridization (GISH)
 Genome in press

Snijder, R.C. 1998
 Veredeling van Lilium: OA-hybriden en 2n-gameten
 Afstudeervak LUW, 71 pp + bijlagen

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

Van Tuyl, J.M., A. Van Dijken, Hai-Shan Chi, Ki-Byung Lim, S. Vиллемoes & B.C.E. Van Kronenburg, 1998. Breakthroughs in interspecific hybridization of lily. Lezing en poster en Acta Hortic publikatie EUCARPIA 19th International Symposium - Improvement of ornamental plants, 23-30 july 1998 Angers, France

7. Plannen eerste helft 1999

* Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit en op kruisbaarheid met tetraploid materiaal (selectie van de beste geniteurs) en toepassing van embryo-rescue methoden

* In vitro en in vivo polyploidisatie van met name geselecteerde OA-nummers

* Selectie en opkweek van tetraploide OA's

* Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 1997 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.

- * Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de bedrijven.
- * In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.
- * Ontwikkeling en toepassing van Botrytis-resistentie toetsing m.b.v. bladtopjes van OA-hybride-materiaal.

Tabel 6. Aantal bestoven bloemen, verdeeld over 3 onderdelen van het in 1998 uitgevoerde soortkruisingsprogramma, t.w. de OA-kruisingen, de *L. longiflorum* x *L. rubellum* kruisingen en de overige kruisingen verdeeld over de diverse ``typen'' soortkruisingen. Verder het aantal gekiemde zaadknoppen/embryo's tot 1/12/98.

	overig	long x rub	OA	Totaal	Kiem
AA-OA			22	22	1
AALA-OA			8	8	
L-LLR		102		102	
L-LO	21			21	3
L-LR		57		57	17
LA-LD	1			1	
LA-LO	17			17	
LA-OA			2	2	
LA-SD	1			1	
LD-LD	29			29	3
LD-LO	2			2	
LL-LLR		25		25	1
LL-LO	53			53	3
LL-LR		131		131	17
LLR-L		65		65	76
LLR-LL		9		9	60
LLR-LLR		76		76	
LLR-O		20		20	3
LO-AA	4			4	1
LO-AALA	9			9	
LO-LA	1			1	
LO-LD	3			3	
LO-LL	5			5	
LO-LO	15			15	22
LO-LR	1			1	
LO-O	4			4	
LO-OA	1			1	
LO-OO	18			18	2
LO-SD	3			3	
LR-L		5		5	
LR-LL		6		6	
LR-LO	2			2	9
LR-LR		4		4	3
O-LLR		24		24	
O-LO	15			15	10
O-OA			6	6	
O-OHa	2			2	71?
OA-AA	3		504	507	1
OA-LA			1	1	
OA-LO	7		6	13	
OA-OA			3	3	
OA-OO			44	44	
OHa-LO	1			1	
OLR-OO	1			1	2
OO-LO	37			37	14
OO-LR	4			4	
OO-OA			28	28	8?
OO-OO	6			6	1
OO-SD	1			1	
Totaal	267	524	624	1415	328

Tabel 7. Beoordeling van alle ouders van OA-hybriden op de gebruikte kenmerken. Bloemgrootte in cm, spikkeling in %. Ac='Acapulco', Ang='Angora', AR='Au Revoir', Bel='Belpasso', Ch='Cherry Blossom', 'Ex=Expression', MS='Merostar', Rom='Romero Star', Sar='Sar', SM='San Marco', Ti='Time Out', To='Touch', WM='Woodriff's Memory', Ar='Au Revoir', BrB='Bright Beauty', CK='Connecticut King', GS='Gran Sasso', LR='Lady Rosa', MB='Mont Blanc', Mon='Montreux', Orl='Orlito', San='Sancerre', 'Az'= Aziatische hybriden in algemeen, 'Or' = Oriëntal hybriden in algemeen. l.=licht, l.l.=zeer licht, d.=donker, or=oranje, gr=groen, rp=roodpaars.

ras	bloem	bloemg	spikk	rand	zweem	band	blos	pollen	stempel	stijl	filame	gootj	opmerkingen
	kl	r									nt	e	
Ac	roze	12,5	40			d.roz	d.roze	or	paars	l.gr	l.l.gr	-	
Ang	wit	12,4	65					d.or	kl.loos	l.l.gr	l.l.gr	-	papil kleurloos
Bel	roze	10,9	55			d.roz		d.or	l.rp	l.gr	l.l.gr	-	
Ch	wit	11,5	50		roze n.	geel		l.or	paars	l.gr-	l.l.gr	-	
Ex	wit	13,5	65						kl.loos	l.gr-	wit-	-	papil kleurloos
MS	rp	14,4	60	wit		d.roz	d.roze	d.or	d.lila	l.gr	l.gr	-	
Pes	roze		40				wit	d.or	halfdonk	gr	l.gr	-	
Rom	roze	13,4	65	wit		roze	roze	d.or	rp	l.gr-	wit-	-	
Sar	roze		30			geel		oranje	d.paars	gr-	l.gr-gr	-	
SM	wit		50			(geel	geel	or	l.l.viol	d.gr	l.l.gr	-	
Ti	wit	14	65			geel		d.or	d.paars	l.gr-	l.l.gr	-	papillen geel
To	wit	12,5	50		roze			d.or	kl.loos	l.gr-	l.l.gr	-	papil kleurloos
WM	l.roze	11,5	50					l.or	d.roze	l.gr	l.l.gr	-	
AR	wit		30		l.l.ro			d.or	rp			-	
BrB	d.geel		25					bruin	paars	or-	l.	+	
CK	geel	8,7	0				l.or	l.or	kl.loos	l.geel	l.geel	+	
GS	or	8,7	75					orbrui	l.l.rp	or	or	+	
LR	roze-		25				(gelig		donker	or	or	+	
MB	creme	6,5	20					l.or	l.rp	l.l.gr	wit	+	snel wit
Mon	vuilro	8,5	25					l.brui	l.rp	l.gr	wit-	+	verkleurend
Orl	ze	7,8	5					l.brui	l.l.rp	or-br	or	+	
San	wit		0					donker	donker	wit	wit	+	
Az	wit,ro	6 - 9	0 -			nooit	divers	or tot	diverse	div,	div,	+	kleine papillen,
	ze,		80				e	bruin		afh.	afh.		(bijna) geurloos
	geel,									van	van		
	or,									bloem	bloem		
	rood												
Or	wit,	11 -14	10 -			geel,	divers	l.or	diverse	l.groe	lichter	-	prominente
	roze		80			roze	e	tot		n-	dan	-	pappillen,
								bruin		d.groe	stijl		sterke geur
										n			

Tabel 8. Gedetailleerd overzicht ten aanzien van de waarnemingen aan de OA-hybrididen.

wit x wit																			
moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr . (1)	bl.gr . (2)	spikk .	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin g	stempel	stijl	filament	ge go ur ot je	opmerkingen		
Ang	MB	952521-1	wit	8,1	10,9	50	0	0	0	0	0 or	0,01	kl.loos+ r	l.gr	wit	A	0 a)		
Ch	San	951854-1	wit		11,1	75	0	0	0	0	0 or-geel	x	rp	l.gr	l.l.geel- gr	-	-	stempel var	
Ex	MB	951815-1	wit	10,8	0	55	0	0	l.l.geel	0	0 or-ro	--	kl.loos	gr	wit	I	-		
Ex	AR	952088-2	geel	10,5	0	45	0	0	0	0	0 or-br	--	l.bruin	gr-br	l.l.geel- gr	O	-		
To	MB	951839-1	wit	8,5	0	50	roze	0	0	0	0 or-br	--	kl.loos	l.geel- gr	wit	0	-	naar randen roze	
To	MB	951839-3	wit	10,5	0	45	0	0	0	0	0 br	--	kl.loos	l.gr	wit	0	-		
To	MB	951918-3	wit	6,7	0	0	0	0	0	0	0 ro-br	--	kl.loos	l.gr	wit	O	-		
To	AR	952043-3	wit	6,7	0	5	0	0	0	0	0	0	l.rp	l.gr	l.l.gr	A	0		
To	San	951883-1	wit	7,3	0	5	0	0	0	0	0 or.br	0	kl.loos	gr	l.l.gr	-	+		
Ti	MB	951884-2	wit	10,1	9	65	0	0	0	cremegroen	d.or	0,01	0	l.gr	wit	O	-	var mooi pollen/kieming	
SM	MB	951801-1	wit	9	0	35	0	0	0	l.rp	0	--	rp	l.gr	l.l.gr	I	+/	stempel var.	
SM	MB	951801-4	wit	7,8	0	40	0	0	0	l.rp	d.or	--	bruin	l.l.gr	wit	-	+/		
a) sommige bloemen mooi pollen, dan kieming																			
roze x wit																			
Ac	MB	951802-1	l.roze		11	45	0	0	0	roze	or-ro	--	d.paars	l.gr	wit	I	+/		
Ac	MB	951802-3	l.roze		7.5 (3)	25	0	0	rp	rp	0	0,001	kl.loos	gr-rp	wit	-	+	kleine stempel	
Ac	San	951584-1	l.l.roze	9,2	0	20	0	d.rp	d.rp	0	ro-br	0,05	l.rp	gr	wit	O	+/		
Ac	San	951584-2	l.l.roze	9,3	9,3	20	0	rp	rp	0	br	--	l.rp	gr	l.gr	I	-		
Ac	San	951584-3	l.l.roze	9,5	0	20	0	rp	rp	0	br	--	l.rp	gr	wit	O	+/		
Bel	MB	962134-6	wit	9,6	10,2	40	0	0	l.rp	l.rp	l.br	--	kl.loos	gr+l.rp	l.l.gr	I	-		
Bel	MB	962134-7	creme- wit	8,8	0	65	0	0	0	rp (<)	br	0,01	kl.loos	gr-ro	l.l.gr	I	-		
Rom	MB	951598-1	wit		9,5	65	0	0	0	roze (<)	0	--	rp	l.gr	wit	I	-	band var.	
Sar	MB	951590-2	vuil roze	7,8	0	40	0	l.rp	rp	0	l.br	--	kl.loos	gr	wit	I	-		
Rom	AR	952328-3	roze	6,4	0	30	wit	0	0	0	or	0	paars	l.gr		0	A	-	b)
b) stempel zeer paars; papil kl.loos; misvormd																			

wit x roze																			
Ang	Mon	952534-1	wit	9,1	0	35	0	roze	0	groenig	viesbr	--	kl.loos	gr	wit	A	+/-		
Ang	Mon	952534-2	wit	6,5	0	20	0	0	0	l.l.groen	0	x	x	kl.loos	gr	wit	A	-	
Ex	Mon	951464-1	vuil rp	11,3	0	40	0	0	0	0	l.br	--	bruin+gr	gr-rp	wit	O	-		
Ex	Mon	952473-1	wit	12,5	11,9	25	0	0	0	0	or-ro	--	l.rp	l.rp	l.gr	O	+		
Ex	Mon	951437-1	wit	11	0	35	0	roze	0	0	d.or	--	kl.loos	gr	wit	I	-		
Ex	Mon	951494-1	l.geel	8,5		25				geel	geel	x	x	kl.loos	l.gr-gr	wit	0	+	papil kl.loos
To	Mon	951405-2	rp		0	40	0	0	0	0	d.geel	--	kl.loos+	gr-rp	l.l.gr	I	-		
To	Mon	951405-5	rp	11	0	45	0	0	0	0	l.br	0	l.groen	rp-gr	l.l.roze	0	+		
Ti	Mon	951381-1	rp	7,7	0	45	0	0	0	0	d.br	0	l.groen+	rp	l.rp	O	+/-		
Ti	Mon	951381-5	wit	7,9	0	35	0	roze	0	0	d.br	0,01	kl.loos	l.l.gr	wit	O	-		
roze x roze																			
Ac	Mon	951468-1	l.roze	8,7	9	30	wit	0	d.rp	d.rp	or	0	l.bruin+	gr	wit	I	+		
Ac	Mon	951525-1	rp	9,8	10	35	0	0	0	0	0	--	bruin	l.gr	l.l.l.gr	O	-		
Bel	Mon	951382-1	rp	9,5	0	45	0	0	0	0	l.br	--	geelgroen	l.l.groen-gr	l.vuilroz	-	-		
Bel	Mon	951438-2	rp	12,3	0	30	0	0	d.roze	d.ro	0	0	l.paars	gr-rp	l.gr-rp	-	+/-		
wit x oranje																			
moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr	bl.gr	spikk	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin	stempel	stijl	filament	ge	go	opmerkingen	
				(1)	(2)											ur	ot		
																je			
Ang	GS	952492-1	geel	11,2	0	35	0	0	0	0	or	--	l.rp	l.geelg	l.l.geel-	-	+/-	zuiver geel, misv.	
Ang	GS	952492-4	g/o	12	0	45	0	groen	0	0	or-ro	--	l.rp	gr-or	l.l.gr-or	O	+	papil kl.loos	
Ch	GS	951497-3	or	9,7	0	60	0	0	0	0	zwart	--	d.bruin	br-or	l.or	O	+		
Ex	GS	952458-1	l.l.or		10,3	60	0	0	l.or	l.or	or	0,001	l.rp	gr	l.g/o	-	+/-		
Ex	GS	952458-2	l. g/o	10,3	10,3	50	0	0	0	l.g/o	0	0	l.g/o	l.gr-br	l.g/o	-	+		
Ti	GS	952414-1	l.or	10	11	50	0	0	0	0	or	--	paars	or	l.or	0	+		
To	GS	951404-1	g/o	9,2	0	55	0	0	0	0	x	x	roze	g/o-o	l.g/o	A	+/-		
Ang	Orl	951588-3	l.geel	10,7	9,7	40	0	0	0	0	ro	--	rp	gr	l.l.geel	I	+/-		

wit x
oranje

geel

moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr (1)	bl.gr (2)	spikk .	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin g	stempel	stijl	filament	ge go ur ot je	opmerkingen	
Ex	CK	942580-1	l.geel		0	0	0	0	(geel)	(geel)	0	--	kl.loos	l.l.gr	l.l.gr	I -	misv. of 942180-1???	
Ex	CK	942584-1	geel	9,5	10	50	0	0		0	0 or	0,001	kl.loos	l.gr	wit	I +/-		
Ex	CK	942584-2	wit	9,1	9,3	5	0	0		0	0 or	--	kl.loos+	l.gr	wit	- -		
Ex	CK	942817-1	l.geel	12	11,6	45	0	0		0	0 or	--	kl.loos	l.gr	l.l.geel	O +/-		
Ex	CK	942818-1	l.l.geel	9		35	0	0		0	0 or	--	kl.loos	l.l.gr	wit	I -		
Ex	CK	942818-2	d.geel	10,5	0	40	0	0	or-ro	0	0 ro-br	0	kl.loos	l.gr	l.l.geel	0 +		
Ex	CK	951479-1	wit	10,3	10,5	40	0	0	creme	l.groen	0 ro-br	--	kl.loos	l.gr	wit	- +		
Ex	CK	951479-2	geel	10,7	10,4	25	0	0		0	0 ro-br	--	kl.loos	l.gr	wit	I -		
Ex	CK	951479-3	geel	10,3	10,9	20	0	0		0	0 d.or	--	kl.loos	l.gr	l.l.gr	O -		
Ex	CK	951935-1	l.geel	8,7	0	40	0	0		0	0 ro-br	0	geel-gr	l.gr	l.l.geel	I -		
Ex	CK	952383-3	geel	11,4	11,8	80	0	0	rood	0	0 br	--	kl.loos	l.gr	wit	A +		
Ex	CK	952483-1	wit	10,8	0	45	1	l.gee	0	0 l.l.geel	or	--	l.l.brui	l.l.brui	l.gr	I +		
Ex	CK	952483-2	l.l.geel	9,4	9,8	20	0	0	l.geel	l.geel	x	--	kl.loos	l.gr	l.geel-gr	- -	papil kl.loos	
Ex	CK	962483-3	wit	8	0	50	0	0	roze	0	0	--	geel-gr	l.gr	l.l.groen	0 -	misvormd	
Ex	CK	953521-1	l.geel	10,1	0	5	0	0		0	geel-gr	--	kl.loos+	l.gr	l.l.l.gr	0 -		
Ex	CK	951151-3	l.geel	11	0	45	1	geel	0	0	0 l.br	--	kl.loos	l.gr	wit	- 0		
Ex	CK	951151-4	l.l.geel	9,5	0	60	1	l.gee	0	l.geel	0 or-br	--	kl.loos	l.gr	wit	- +/-		
Ex	CK	951428-1	geel	10,9	0	35	0	0		0	0	--	kl.loos	l.gr	l.l.geel	- -		
Ex	CK	951515-1	geel	10,5	0	45	0	0	or-ro	0	0	0	kl.loos	l.gr	l.l.geel-	- +		
Ex	CK	951515-2	l.geel	9,7	0	40	0	0		0	0 paars	--	misv	l.gr	wit	I +		
Ex	CK	942715-1	l.geel	10,4	0	55	0	0	geel	0	0 br	--	l.l.rp	l.gr	l.l.geel-	- -		
Ang	CK	942713-5	geel	9,2		50	0	0	or-ro	0	0 or	--	l.violet	gr	l.gr	- +/-		
Ang	CK	951953-1	geel	11,1	9,7	55	0	0	rood	0	0 groenig cremegeel	--	kl.loos	l.gr	l.l.gr	O -	zweem var	
Ang	CK	952533-3	geel	8,7	9,7	10	0	0		0	0	--	l.rp	gr	l.l.gr	- +/-		
Ang	CK	952533-4	geel	11,9	0	65	0	0		0	0 or	--	kl.loos	l.gr- geel	l.l.geel	I +/-		
To	CK	952059-2	geel	9,5	0	65	0	0	rood	0	0 x	x	kl.loos+	l.l.gr	l.l.geel	I +		
To	CK	952059-3	geel	9,5	11,2	30	0	0		0	0 or-br	--	kl.loos	l.geel- gr	l.l.geel- gr	O -		
To	CK	952059-4	geelgroe n	9	0	65	0	0	geel	0	0 br	--	l.l.rp+r gr	l.geel- gr	l.geel-gr	O +		
To	CK	952059-6	geel	7,5	0	60	0	0	rodig	0	0	0	l.rp	l.gr	l.l.geel-	- +	zeer zwak genotype	
To	CK	952059-8	l.geel	10,7	0	60	0	0		0	geel	br	0,001	kl.loos	l.gr- geel	l.l.l.gee l	I +	
To	CK	952059-9	geelgroe n	9,8	0	60	0	0	rodig	0	0 or- bruin	0,01	kl.loos+	l.gr	l.geel-gr	O +	zweem var., mooi pollen	

Ti	CK	952063-10	1.geel	10,8	0	50	0	0	0	geel	ro-br	--	0 l.gr (ro)	1.1.geel	I	0		
Ch	CK	942587-1	geel	9	0	35	0	0	0	ro-bruin ($<$)	or	--	kl.loos	1.gr	1.1.gr	I	-	
Ch	CK	952494-1	geel	10,2	0	50	1 bruinr o	0	0	0	0 or-br	--	kl.loos	gr-ro	1.1.geel	I	+/-	
Ch	CK	952496-1	geel	11,1	0	40	0	0	0	0	0 or-br	--	kl.loos	1.gr	1.1.geel- gr	A	+	
Ch	CK	952496-2	1.g/o	9,7	0	80	0	0	0	0	0 or-ro	--	l.rp	or-gr	1.1.gr	O	+	voor helft papil kl.loos
Ch	CK	942626-3	wit	8,3	0	5	0	1.roz e	creme	0	ro-br	--	kl.loos	1.gr	wit	0	-	

wit x or-roze

moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr (1)	bl.gr (2)	spikk	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin	stempel g	stijl	filament	ge ur	go ot je	opmerkingen
To	LR	951901-1	roze	10,8	0	30	0	0	0	0	0 ro-br	--	zwart	gr	1.roze	I	+	
To	LR	951901-2	rp	9,7	8,7	35	0	0	0	0	0 or	--	wit	rp-gr	1.rp	-	+/-	papil kl.loos
Ex	LR	951934-2	rp	8,2	0	50	0	0	0	0	0 or	--	paars	l.gr	1.rp	A	+	halfdubbel
Ex	LR	951934-4	rp	9,3	0	50	0	0	0	0	oranjig	--	rp	gr-rp	1.rp	A	+	papil kl.loos
Ex	LR	953508-1	rp	11,4	11,1	35	0	0	0	0	0 br	--	paars	gr-rp	vuilroze	I	+	papil kl.loos

wit x
g/o

Ang	BrB	952527-2	1.or		9,7	55	0	0	0	0	0 or	0,005	rp	gr-or	1.1.or	I	-	kieming variabel!	
Ex	BrB	951833-1	1.1. g/o	11,2	12,3	75	0	0	0	0	rodig		ro-br	0 paars	gr	1.1.gr	I	-	
Ex	BrB	952525-1	1.1.geel	10,5	10,5	45	0	0	0	0	cremegroe n	x	l.rp	gr	1.1.gr	I	+/-		

roze x
g/o

Ac	BrB	951820-1	rood	9,4	9,7	55	0	0	0	0	d.ro	br	--	l.bruin	gr	1.1.or	-	+	or. punten, bloem cupvorm
----	-----	----------	------	-----	-----	----	---	---	---	---	------	----	----	---------	----	--------	---	---	------------------------------

roze x geel

moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr (1)	bl.gr (2)	spikk	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin	stempel g	stijl	filament	ge ur	go ot je	opmerkingen	
Ac	CK	951835-1	1.or	8,2	0	30	0	0	0	0	or-ro	ro-or	0	kl.loos+ r	1.gr	1.1.geel	I	+	gele strot
Ac	CK	951835-3	or-roze	9,4	8,4	15	0	0	0	0	0	0	--	wit	1.gr	1.1.gr	I	0	cup-vormige bloemen
Ac	CK	952418-1	or-ro	9,4	0	0	geel	0	0	0	d.or-ro	or	0	kl.loos	1.geel- l.gr	1.1.geel	-	-	gele bloembladpunten
Bel	CK	951152-2	geelroze	10,1	0	35	0	0	0	rp	rp($<$)	br	--	kl.loos	1.gr	1.1.gr	I	+/-	
Bel	CK	951407-9	or-ro	11,4	0	30	geel	0	ro	d.ro	ro-br	--	kl.loos	1.gr	1.1.gr	O	-		

Bel	CK	951870-2	rp	9,8	0	50	geel	0	0 d.rp	l.or	0 l.rp	gr	l.l.geel	I -	
Wm	CK	951439-1	roze	12,1	0	40	0	0	0 rp	or	-- kl.loos+	l.gr	wit	O -	
Wm	CK	951814-1	rp	7	0	5	0	0	0	0 or	0 l.groen	gr	wit	I -	misvormd
Pes	CK	951486-1	or-roze	10,5	11,1	40	0	0	ro-or	ro	l.br	-- kl.loos+	l.gr	l.l.geel-	O +/- gele strot
Pes	CK	951486-2	or-roze, roze verkleure nd	11,7	0	25	0	0	or-rp	d.or-rp	or	0,005 kl.loos	l.gr	l.l.gr	0 +/- gele strot, wit verkleurend
Pes	CK	951486-4	geel	12,2	35	0	0	0	var	or-ro	x kl.loos	l.gr	l.l.geelg	I -	papil kl.loos
Pes	CK	951502-1	l.or	9,5	0	30	geel	0	0 d.rood	l.br	0 kl.loos	gr-ro	l.l.gr-	0 +	
Rom	CK	951313-2	l.or	9,7	0	25	geel	0	d.or-ro	d.ro	x	0 kl.loos+	wit-	wit	O +/-
Rom	CK	951462-1	or-roze	11,1	25	geel	0	0	d.ro	0	0 kl.loos	l.gr	or-	l.l.geel	I -
Rom	CK	951518-4	geel	11,7	11,9	35	0	0	rodig	rodig	ro	-- l.l.rp	l.gr	l.l.geel	A +
Rom	CK	951518-5	geel	11,4	0	40	0	0	rodig	0	0 ro	x kl.loos	gr-geel	wit	A + zweem var.
Rom	CK	951518-6	l.geel	9,7	9,6	45	0	0	0 geel	br	-- l.rp	l.gr	l.l.geel	A -	
Rom	CK	951518-8	creme, l.roze	0	55	0	groen	0	0	0 or	0 kl.loos+	l.gr	wit	I -	
Rom	CK	952377-1	l. roodrp	11,8	0	75	geel	0	d.ro	(d.ro)	l.br	0 paarsbr	wit-	l.l.geel-	I +/-
Rom	CK	952377-2	l.rp	8,5	0	40	geel	0	rp	d.ro	or	-- kl.loos	grbr	gr	I +/-
Rom	CK	952377-4	geel	6,9	0	55	0	0	0	0	0	-- rp	wit-gr (ro)	wit	I +/-
Rom	CK	942615-2	l.geel	10,5	0	30	0	0	0	0 x	x kl.loos	l.gr	l.l.geel	A +/-	misvormd, veel spikkels

roze x
or

moeder	vader	zaailing													
Bel	GS	951447-2	roze	9,8	0	70	g/o	0	rp	rp	l.br	-- l.bruin	g/o	g/o	- +/- papil kl.loos
Bel	GS	951447-3	l.or	11	0	65	0	0	d.or	rp	d.br	-- bruin	gr-br	l.or	I +/-

rp x wit

moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr (1)	bl.gr (2)	spikk	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin g	stempel	stijl	filament	ge go ur ot je	opmerkingen
MS	MB	951592-2	wit	10	0	70	0	creme	0	0	0 ro-or	0 l.l.bruin	l.gr	wit	- +/-		
MS	MB	952530-1	roze	6,8	7,1	15	0	0	d.rp	d.rp	l.br	-- l.l.rp	l.gr	wit	I -	misvormd	
MS	MB	952530-2	zeer l.roze	10,8	0	55	0	0	0	0	0 l.br	0 kl.loos	l.gr	wit	O 0		

MS	MB	952530-3	l.l.roze	8,2	9,7	40 wit	0 rp	rp	or-br	-- kl.loos	l.gr	wit	0 +				
rp x geel																	
moeder	vader	zaailing	bl.kl.	bl.gr (1)	bl.gr (2)	spikk .	rand	zweem	band	blos	pollen	kiemin g	stempel	stijl	filament	ge go ur ot je	opmerkingen
MS	CK	951289-1	ro-rp			13	50 geel	0	0 d.rp	l.br	0,001 rp	ro-gr	l.l.geel	A	+		
MS	CK	951301-3	or-ro	13,7		0	40 geel	0	0 d.ro	x	x kl.loos	l.gr	l.l.geel	I	+/	"bird of paradise"bloemv	
MS	CK	951301-4	or-d.ro	13,5	12,5		40 geel	0	d.ro	d.ro	or-br	-- kl.loos	l.gr	l.l.geel-	0	+/	"bird of paradise"bloemv
MS	CK	951301-5	geel	12	10,1		50	0	0 geelgroe n	0 br	-- rp	paars- gr	l.gr	-	+		
MS	CK	952381-1	l.l.geel			0	25	0	0	0 rp (<)	x	x l.rp	l.rp	te kort	0	+	misvormd
MS	CK	952381-5	geel	11,1	11,4		15	0	0	0	0 ro-br	-- l.rp	l.gr	l.l.gr	-	-	a)
a) vruchtbeg. in vruchtbeg.' rare vergroeiing.vgl paprika																	
rp x oranje																	
moeder	vader	zaailing															
MS	GS	952400-1	l.or	11,7	10,5		85	0	0 or	0 bruin	0,01 l.bruin	gr-or	l.or	I	0 var.	spikkel binnen kloon	
rp x roze																	
moeder	vader	zaailing															
MS	Mon	951379-1	d.vuilro ze	12,5		0	35 wit	0	rp	rp	br	0 paars	l.gr	wit	0	-	mooi pollen

Halfjaarlijks verslag

In vitro technieken ten behoeve van het
doorbreken van kruisingsbarrieres binnen het
geslacht *Lilium* (lelie) II

In opdracht van SLV

Jaap van Tuyl, Bernadette van Kronenburg, Ki-Byung
Lim, Ingrid Maas, Takejiro Takamura, Hye-Kyung Rhee
en Jan Matijssen

Halfjaarlijks verslag, periode 1/12/98-1/06/99

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer CPRO-DLO projectnummer: 2.080.016

3. Algemeen

Personele inzet

B.C.E. van Kronenburg- van de Ven
 J. Matijssen
 K.B. Lim
 H.K. Rhee
 Ingrid Maas
 T. Takamura
 J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)
 S. Bottema
 N. van Buggenum
 H. Imanse
 Ir. A. Vletter
 Ir. D. van Kleinwee
 P.J. Kos
 Ing. K. Laan
 Ir. A. Peterse
 C. Randag
 W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Ruim een jaar na de start van het nieuwe leliesoortkruisingsproject hebben de 11 leliebedrijven, verenigd in de commanditaire vennootschap SLV, het contract m.b.t. het project getekend.

De Zuid-Koreaanse gastmedewerker Ki-Byung Lim heeft zich verder verdiept in het genomisch in situ hybridisatie onderzoek en zal dit verder uitbreiden voor een promotieonderzoek. De Japanse gastmedewerker Dr. T. Takamura, een onderscheiden onderzoeker m.b.t. veredelingsonderzoek van gele Cyclamen, heeft zich bezig gehouden met de fertiliteit van de OA-hybrididen.

5.2. Nieuwe hybrididen via Internet

Als proef werden dit voorjaar voor het eerst via E-mail 7 foto's naar de bedrijven gestuurd. Van 4 bedrijven was (nog) geen E-mail-adres beschikbaar (Bottema, Laan, Bischoff en Testcentrum; deze bedrijven zullen de gegevens op diskette aangereikt krijgen). De voordelen van dit systeem is de eenvoud, de snelheid, de kwaliteit van het foto-materiaal (is veel beter dan afgedrukt materiaal) en de archivering die via de computer veel eenvoudiger is. De figuur van het GISH-onderzoek is tezamen met de concept publicatie nog op de normale manier bijgevoegd (wij zien graag uw opmerkingen bij de publicatie tegemoet). Op deze wijze zou het gehele verslag snel en simpel verstuurd kunnen worden. Voorwaarde is uiteraard dat iedereen aangesloten is op internet en de E-mail elke dag opent. De mail luidde aldus:

Aan de lelieveredelingsbedrijven

Hierbij als experiment via de E-mail een serie plaatjes van nieuwe leliehybrididen, die recentelijk in bloei gekomen zijn. Graag reactie wat jullie er van vinden. Van enkele bedrijven heb ik nog geen E-mail adres (Bottema, Laan, Bischoff, Testcentrum), zij ontvangen de informatie op diskette.

```
99051003 OA  962289 1 Kissproof x Lanzarotte
99052711 LLLR 972378 1 tetra Longi x tetra LR
99052012 OA  962380 1 Starfigter x Montreux
99052014 OA  967252 1 Aruba x Lanzarotte
99052017 LLO 972488 1 Longi 771017 x tetra LO 942077-2 (960068)
99052025 LOLO 950226  tetra LO (771017 x Stargazer)
99052027 OA  967243 1 Expression x Lanzarotte
```

Jaap M. van Tuyl
Head of Bulbous Plants Section
DLO-Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (CPRO-DLO)
P.O. Box 16 6700 AA, Wageningen
The Netherlands
tel 31-317-477329
fax 31-317-416513
E-mail J.M.vantuyl@cpro.dlo.nl
Website <http://www.cpro.dlo/oc/bulb.htm>

Naast deze hybriden zijn nog enkele zeer interessante OA, LLO en LLLLO hybriden in bloei gekomen, die via een volgende mail-zending, indien U het daar tijdens de vergadering mee eens bent, verstuurd kunnen worden.

5.3 Mannelijke fertiliteit van OA-hybriden

Dit jaar zijn/worden alle OA-hybriden beoordeeld op mannelijke en velen op vrouwelijke fertiliteit. De hybriden werden beoordeeld via pollenkieming en het uiterlijk van het pollen. De resultaten kwamen goed overeen met die van vorig jaar. Opvallend was opnieuw dat de fertiliteit tussen bloemen en takken van hetzelfde nummer sterk kan verschillen. De nummers met een fertiliteit van meer dan 1% staan vermeld in onderstaande Tabel 1.

Tabel 1. Fertiliteit OA-hybriden, genotypen met meer dan 1% pollen kieming.

CPRO. No.	Plant No.*	% pollen kieming	Note
950224 (4x)	-	0.1-46	In many flowers, 1-5%; Good flower
952400-1	1**	1.3-7	In many flowers, about 3%; Good flower
951502-1	1	0.1-5	In many flowers, 1-2%; Good flower
951502-1	2***	0-2	In many flowers, about 0.1-1%; Good flower
950225(4x)	all	0.3-3	In many flowers, about 1%; Good flower
952059-9	4	0.3-1.7	In many flowers, about 1%
951584-3	2	0.3-1.3	
951381-5	1	0.3-1.3	
952381-5	-	0-1.3	

* The plants were numbered from label, 1,2,3, etc in the plants with the same CPRO number.

** In plant No.2 of 952400-1, the germination ability is much lower than No.1. Usually, the pollen germination percentage in No.2 was about 0.3%.

*** The germination ability of pollen in 951502-1 varied with plants. In plant No.2, the ability is lower than No. 1.

5.4 Polyploidisatie OA-hybriden

Inmiddels zijn 3 jaar productie van OA-hybriden (94,95,96) grotendeels in bloei gekomen en is een overzicht te geven van de tetraploiden-productie van de beste hybriden. In Tabel 3 is hiervan een overzicht gegeven. Van bijna 60 nummers zijn inmiddels tetra's gemaakt. Volgend jaar zal op grote schaal met tetra OA's en fertiele diploide OA's gewerkt kunnen worden. Dit jaar zullen alleen de geselecteerde OA's nog aangehouden worden (ca. 70 nummers).

5.5 Kruisingsprogramma 1998/1999

De resultaten van het kruisingsonderzoek van 1998 staan weergegeven in Tabel 2. Het nodige is reeds uitgeplant, de rest gaat eind dit jaar koud.

Dit jaar is opnieuw op zo uitgebreid mogelijke schaal het OA-materiaal onderzocht op fertiliteit. Kruisingen zijn gemaakt vooral richting orientals. De tetraploide LO's zijn in alle richtingen onderzocht op kruisbaarheid (di/tetra Longi, orientals, aziaten). De eerste terugkruisingen op tetra-niveau (LLLO, LLLR) kwamen voorzichtig in bloei en zijn op kruisbaarheid getest. Tot 1 juni zijn ruim 1600 bloemen bestoven.

5.6 *Botrytis*-toets

De *Botrytis*-toetsingen van soortkruisings-, collectie- en ingezonden materiaal m.b.v. de bladtoets zijn in volle gang. De eerste resultaten zien er goed uit (tot 2 juni zijn reeds 400 nummers getoetst). De verschillen, die vorig jaar gevonden werden, zijn opnieuw duidelijk. De resultaten, die nog verwerkt moeten worden, volgen in het volgende halfjaarverslag.

6. Publicaties en lezingen

1. Karlov, G.I., L.I. Khrustaleva, K.B. Lim & J.M. Van Tuyl, 1999
Homoeologous recombination in 2n-gamete producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic in situ hybridization (GISH)
Genome, in press.
2. Lim, Ki-Byung, J. Hans de Jong, J.D. Chung, M.S. Ramanna, B.C.E. van Kronenburg & Jaap M. van Tuyl,
Introgression of *Lilium rubellum* chromosomes into *L. longiflorum*: a study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies by genomic *in situ* hybridization, in preparation (bijgevoegd voor eventuele opmerkingen).
3. Van Tuyl, J.M. 1999
Interspecific hybridization of bulbous crops, current development and future trends of the bulb cultivar assortment. Lecture International Symposium on development of Bulb Flower Industry, 14-15 jan 1999, Taichung, Taiwan.

7. Plannen tweede helft 1999

- * Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit en op kruisbaarheid met tetraploid materiaal (selectie van de beste geniteurs) en toepassing van embryo-rescue methoden
- * In vitro en in vivo polyploidisatie van met name geselecteerde OA-nummers, selectie tetraploide nummers
- * Selectie en opkweek van tetraploide OA's

- * Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 1998 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- * Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de SLV.
- * In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.
- * Ontwikkeling en toepassing van Botrytis-resistentie toetsing m.b.v. bladtopjes van soortkruisings-materiaal.

Tabel 2. Overzicht kruisingsresultaten 1998

	koud	dood	totaal
	-----	-----	-----
AA-LO			1
L-LLR			
L-LO	2		3
L-LR	13		17
LD-LD			5
LL-LLR			1
LL-LO		2	2
LL-LR	5	1	18
LLR-L		16	67
LLR-LL	17	6	53
LLR-LLR			1
LLR-O			3
LO-AA			1
LO-LO	7		23
LR-LO	7		11
LR-LR	4		6
O-LO	3		13
O-O (Ha)	48	7	123
OA-AA			2
OLR-OO	1		1
OO-LO	4	3	16
OO-OA	2	2	13
Totaal	113	37	380

Tabel 3. Overzicht aantal tetraploïden per ingezette OA-hybride.

moeder	Uitgeplant	nog in vitro	dood
942172 1	6	-	-
942180 1	4	-	1
942584 2	2	-	1
942587 1	2	-	-
942615 2	2	4	-
942626 1	-	-	5
942713 1	1	-	-
942713 4	4	-	-
942726 1	4	-	-
942743 1	-	-	3
942811 1	6	-	-
942815 2	-	-	4
942817 1	7	-	-
942818 1	4	-	2
951301 4	-	1	1
951301 5	7	-	2
951305 1	1	-	-
951405 2	2	-	-
951407 9	4	3	1
951434 1	-	-	2
951447 2	-	2	1

951462 1	6	-	-
951464 1	1	-	-
951469 2	2	2	-
951479 2	2	-	-
951492 1	1	1	1
951502 1	6	-	-
951515 1	-	-	2
951518 4	1	1	-
951518 6	5	2	2
951584 1	3	1	1
951588 3	1	-	-
951592 3	2	1	-
951802 3	5	-	-
951815 1	-	1	-
951901 1	1	-	-
951914 1	6	1	-
951934 1	3	-	2
952059 9	-	1	-
952063 1	-	-	2
952088 2	4	-	1
952377 1	1	-	-
952400 1	-	1	2
952414 1	-	3	-
952462 1	2	1	-
952483 1	-	1	2
952492 2	1	-	-
952530 1	6	1	1
952533 4	2	-	-
952533 6	1	1	-
953508 1	3	-	-
962449 2	-	1	-
967252 1	-	1	-
	121	31	39

**Planning/in
bewerking**

952063-10

952527-1

967241-1

967251-1

962289-1

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken ^{Vertrouwelijk}
kruisingsbarrières
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag



December 1999

Halfjaarlijks verslag, periode 1/06/99-1/12/99

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer CPRO-DLO projectnummer: 2.080.016

3. Algemeen

Personele inzet

K.B. Lim
Ingrid Maas
J. Matijssen
H.K. Rhee
T. Takamura
J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)
S. Bottema
N. van Buggenum
H. Imanse
Ir. A. Vletter
Ir. D. van Kleinwee
P.J. Kos
Ing. K. Laan
Ir. A. Peterse
C. Randag
W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Bij dit verslag zijn ook de resultaten van de Botrytis-toetsingen die aan de totale lelie-collectie inclusief de hybriden behorend tot dit project en de door de 11 bedrijven ingestuurde nummers toegevoegd.

De Zuid-Koreaanse gastmedewerker Ki-Byung Lim heeft zich verder verdiept in het genomisch in situ hybridisatie onderzoek en zal dit verder uitbreiden voor een promotieonderzoek. De Japanse gastmedewerker Dr. T. Takamura, een onderscheiden onderzoeker m.b.t. veredelingsonderzoek van gele Cyclamen, heeft zich bezig gehouden met polyploidisatie en de fertiliteit van de OA-hybriden.

5.2. Informatie via internet

Het is duidelijk dat alle informatie (foto's verslagen) die per E-mail verstuurd kan worden, de communicatie versneld en vereenvoudigd. Enkele bedrijven hebben echter nog geen aansluiting op internet, waardoor het nog niet goed mogelijk is om voor alle informatieverspreiding in te voeren.

5.3 Fertiliteit van OA-hybriden

Dit jaar zijn alle OA-hybriden beoordeeld op mannelijke en velen op vrouwelijke fertiliteit. Zoals vermeld in het vorige verslag zijn slechts enkele genotypen gevonden die enig kiemkrachtig pollen produceerden. Deze zijn gebruikt in kruisingen met diploide orientals. De nummers met een fertiliteit van meer dan 1% en het resultaat bij het terugkruisingen met orientals (aantal gekiemde embryo's of zaadknoppen), zijn vermeld in onderstaande Tabel 1. Wat betreft de vrouwelijke fertiliteit, hiervoor zijn bijna 900 bloemen bestoven met diploide orientals. Tot nu toe zijn van 2 combinaties enkele zaadknoppen gekiemd. Inmiddels heeft het GISH-onderzoek ons duidelijk gemaakt dat voor een echte introgressie 2n-gameten van essentieel belang zijn.

Tabel 1. Manlijke fertiliteit OA-hybriden: genotypen met meer dan 1% pollen kieming en het resultaat met terugkruisingen op orientals.

CPRO. No.	% pollen kieming	Aantal gekiemden
--------------	---------------------	------------------

950224 (4x)	0.1-46	6
952400-1	1.3-7	10
951502-1	1.1-5	59
950225(4x)	0.3-3	0
952059-9	0.3-1.7	0
951584-3	0.3-1.3	1
951381-5	0.3-1.3	0
952381-5	0-1.3	0

5.4 Polyploidisatie OA-hybriden

Takejiro Takamura heeft onderzoek verricht naar de efficiëntie van polyploidisatie. Gebruikt werd oryzaline en Surflan (40% oryzaline) in diverse concentraties. Hieruit bleek dat 0.003% oryzaline in het algemeen het hoogste aantal polyploïden oplevert. Surflan bleek even efficiënt als oryzaline. Dit jaar werden veel nieuwe OA en LO tetraploïden verkregen. Een bijgewerkte lijst is bijgevoegd (tabel 3).

5.5 Kruisingsprogramma 1999

Dit jaar is opnieuw op zo uitgebreid mogelijke schaal het OA-materiaal onderzocht op fertiliteit. Kruisingen zijn gemaakt vooral richting orientals. De tetraploïde LO's zijn in alle richtingen onderzocht op kruisbaarheid (di/tetra longi, orientals, aziaten). De eerste terugkruisingen op tetra-niveau (LLLO, LLLR) kwamen voorzichtig in bloei en zijn op kruisbaarheid getest. Totaal werden ruim 2200 bloemen bestoven. In Tabel 2 zijn de kiemingsresultaten (verwerkt tot 1 november) samengevat. Hieruit blijkt dat goede resultaten bereikt zijn met tetraploïde LO-hybriden (OLO, LLLO, OOLO, LALO). Materiaal hiervan (960068, 960069, 960076, 960078) zal dit najaar beschikbaar gesteld worden. Verder is opvallend dat 2 OA-vaders (zie Tabel 1) al 69 kiemende plantjes hebben opgeleverd. Het hybride-karakter van deze hybriden is echter nog niet vastgesteld!

5.6 Botrytis-toets

Zie bijgevoegd verslag.

6. Publicaties en lezingen

1. Karlov, G.I., L.I. Khrustaleva, K.B. Lim & J.M. Van Tuyl, 1999 Homoeologous recombination in 2n-gamete producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic in situ hybridization (GISH)

Genome 42(4): 681-686

2. Lim, Ki-Byung, J. Hans de Jong, J.D. Chung, M.S. Ramanna, B.C.E. van Kronenburg & Jaap M. van Tuyl, Introgression of *Lilium rubellum* chromosomes into *L. longiflorum*: a study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies by genomic *in situ* hybridization, submitted for Chromosome Research.

3. Lim, Ki-Byung, M.S. Ramanna, E. Jacobsen & Jaap M. van Tuyl, A novel type of meiotic nuclear restitution detected interspecific lily hybrids by genomic *in situ* hybridization, in preparation

7. Plannen eerste helft 2000

- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit en op kruisbaarheid met tetraploïd materiaal (selectie van de beste geniteurs) en toepassing van embryo-rescue methoden. I
- In vitro en in vivo polyploidisatie van met name geselecteerde OA-nummers, selectie tetraploïde nummers.
- Selectie en opkweek van tetraploïde OA's
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 1999 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- Vermeerdering halfmateriaal t.b.v. de SLV.
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.

Tabel 2. Het totaal aantal gekiemde embryo's/zaadknoppen/embryozakken (Kiem), met de inzet: het aantal ingezette embryo's (Em_a), het aantal zaadknoppen en het aantal embryozakken bij alle kruisingen van een bepaald type (typ).

-----	Kiem	Em_a	Zk_a	Ez_a
-----	-----	-----	-----	-----
AA OA	0	10		3
L LO	0	37		
L LR	4	5		1
L zelf	31	66	112	6
LA AA	7	40		8
LA LA	0	11		1
LA LL	3	16		1
LA LO	6	5		14
LA LR	0			2
LA OO	0	10		
LASD LA	20	21		11
LASD OO	0			4
LL LL	38	36	30	8
LL LO	40	41	63	11
LLLO LL	0	3		
LLLO LR	1	12	266	
LLR OO	0	1		2
LO LL	1	1	171	
LO O	0	0	326	1
LO OO	0	0	225	1
LR AA	1			1
LR LL	9	2	7	2
LR LO	4	4		35
O LO	187	244	168	385
O O	6	6		
O OA	54	85	913	166
O OO	86	90	36	12
OA O	16	2	2174	162
OA OO	0	2	64	
OO LO	31	39	63	26
OO OA	0			1
OO OO	27	26	35	5
Totaal	574	1265	8213	2678

Tabel 3. Overzicht aantal tetraploïden per ingezette OA-hybride, waaraan toegevoegd de in 1999 verkregen tetraploïde OL/LO en OP-hybriden.

"Moeder"	Uitgeplant	in vitro	dood
942172	1	6	-
942180	1	4	-
942584	2	2	-
942587	1	2	-
942615	2	2	4
942713	1	1	-
942713	4	4	-
942726	1	4	-
942743	1	-	-
942811	1	6	-
942815	2	-	-
942817	1	7	-

942818 1	4	-	2
951301 4	-	1	1
951301 5	7	-	2
951305 1	1	-	-
951405 2	2	-	-
951407 9	6	1	1
951434 1	-	-	2
951447 2	-	2	1
951462 1	6	-	-
951464 1	1	-	-
951469 2	2	2	-
951479 2	2	-	-
951492 1	1	1	1
951502 1	6	-	-
951518 4	1	1	-
951518 6	6	1	2
951584 1	3	1	1
951588 3	1	-	-
951592 3	2	1	-
951802 3	5	-	-
951815 1	-	1	-
951901 1	1	-	-
951914 1	6	1	-
951934 1	3	-	2
952059 9	-	1	-
952063 1	-	-	2
952088 2	4	-	1
952377 1	2	1	-
952400 1	-	8	2
952414 1	2	15	-
952462 1	2	1	-
952483 1	-	1	2
952492 2	1	-	-
952527 2	1	1	-
952530 1	6	1	1
952533 4	2	-	-
952533 6	2	0	-
953508 1	3	-	-
962449 2	6	1	-
967241 1	-	9	-
967252 1	-	4	-
	135	60	39
OL-LO 1999			
962730 1		3	
942143 3		2	
942165 3		15	
OP 1999			
962753 2		4	
962763 1		5	
962773 1		2	

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken ^{Vertrouwelijk}
kruisingsbarrières
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag



Juni 2000

Halfjaarlijks verslag, periode 1/12/99-1/06/00

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer Plant Research International 6600012 (2.080.016)

3. Algemeen**Personele inzet**

K.B. Lim
Ingrid Maas
J. Matijssen
(J.H. Lim, A.M. Quinones)
J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)
S. Bottema
K. de Buck
H. Imanse
Ir. A. Vletter
Ir. D. van Kleinwee
P.J. Kos
Ing. K. Laan
Ir. A. Peterse
C. Randag
W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgpriject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
 4. Ter beschikking stellen van materiaal.
-

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Ki-Byung Lim heeft het grootste deel van zijn proefschrift over het genomisch in situ hybridisatie onderzoek bij lelie afgerond en hoopt op 27 november te promoveren. Alle bedrijven zullen natuurlijk een uitnodiging krijgen. Jin-Hee Lim, een Koreaanse gastmedewerkster en Ana Maria Quinones, een Equadoriaanse gastmedewerkster hebben bijgedragen aan de uitvoering van de werkzaamheden.

Naar aanleiding van een bijeenkomst van de SLV is het volgende voorstel voor vermeerdering van project-materiaal in eigen beheer door SLV:

Van het (bloei)bare te bezichtigen materiaal van het soortkruisingsproject zal ieder jaar voor de bedrijven een overzichtslijst worden samengesteld. Alle SLV-deelnemers kunnen hierop aantekeningen maken. Hieruit kan in het najaar door SLV een selectie gemaakt worden van nummers die vervolgens beschikbaar gesteld zullen worden om door SLV in eigen beheer doorvermeerderd te worden.

Tijdens de kijkmiddagen (wo 12 april, di 25 april, wo 10 mei, di 23 mei en di 6 juni), die goed bezocht werden, zijn deze lijsten uitgedeeld. In dit verslag is de "geschoonde" lijst met materiaal en de gemeten fertiliteit toegevoegd. Tijdens de te houden vergadering op 15 juni zal in een beamerpresentatie, het meest bijzondere materiaal gepresenteerd worden.

5.2. Informatie via internet

Het is duidelijk dat alle informatie (foto's verslagen) die per E-mail verstuurd kan worden, de communicatie versneld en vereenvoudigd. Alle bedrijven hebben nu aansluiting op internet, waardoor het nu mogelijk voor alle informatieverspreiding. Dit verslag komt dan ook eerst in digitale vorm, tijdens de vergadering zal voor iedereen nog een echt verslag klaar liggen.

5.3 Fertiliteit van OA-hybriden

Dit jaar zijn alle OA-hybriden opnieuw beoordeeld op mannelijke en velen op vrouwelijke fertiliteit. In bijgaande plantlijst staat de gevonden fertiliteit aangegeven. De resultaten van voorgaande jaren werden bevestigd: slechts enkele nummers met enige (nogal variërende fertiliteit). De twee beste nummer 952400-1 en 951502-1 werden in meer detail onderzocht. Er zijn meiotische preparaten gemaakt (nog niet bekeken) en het pollen is nauwkeuriger bekeken. Het is nu zeer waarschijnlijk dat we met haploid en niet met 2n-pollen te maken hebben en dat betekent geen recombinatie tussen O- en A-chromosomen. Er zijn de nodige bestuivingen met dit pollen uitgevoerd, waarvan we de resultaten eerst nog af zullen wachten, voordat verdere conclusies getrokken worden. Ook zijn de een groot aantal diploide OA's op moederlijke fertiliteit onderzocht door bestuivingen met oriental en aziat-vaders. Dit materiaal is ingezet mbv ovarium-plak-methode.

5.4 Polyploidisatie OA-hybriden, fertiliteit tetra's.

Er zijn nog enkele OA's geselecteerd en behandeld om tetraploïden te verkrijgen. Dit zijn een groot aantal tetraploïde OA's in bloei gekomen. Het blijkt dat de verschillen tussen tetra's afkomstig van dezelfde OA klein zijn. Vijf nummers hadden een zekere fertiliteit (0-10%), terwijl 1 nummer (alle tetra's afkomstig van 951301-5) een zeer goede fertiliteit te zien gaf. Dit betekent een belangrijke doorbraak, uiteraard indien hiermee hybriden verkregen kunnen worden. De eerste zaadzetting wijst hier echter wel op.

5.5 Kruisingsprogramma 2000

Dit jaar is opnieuw op zo uitgebreid mogelijke schaal het OA-materiaal onderzocht op fertiliteit. Kruisingen zijn gemaakt in alle richtingen met fertiel OA-materiaal: AOA, AAOA, OOA, OOOA, LOOA, OAOA, OAO, OAA.

De eerste LOLR en LOLO-doorkruisingen zijn in bloei gekomen en blijken een goede fertiliteit te hebben in tegenstelling tot LLLO, LLLR en LLLD-hybriden. De eerste populatie OLO-hybriden (zie voorpagina) kwam in bloei.

6. Publicaties en lezingen

1. Lim, Ki-Byung, J. Hans de Jong, J.D. Chung, M.S. Ramanna, B.C.E. van Kronenburg & Jaap M. van Tuyl, 2000

Introgression of *Lilium rubellum* chromosomes into *L. longiflorum*: a study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies by genomic *in situ* hybridization, Chromosome Research. (bijgevoegd)

2. Lim, Ki-Byung, M.S. Ramanna, E. Jacobsen & Jaap M. van Tuyl,

IMR: a novel type of meiotic nuclear restitution detected interspecific lily hybrids by genomic *in situ* hybridization, submitted TAG

3. Lim, Ki-Byung, M.S. Ramanna, J.H de Jong, E. Jacobsen & Jaap M. van Tuyl,

Indeterminate meiotic restitution (IMR) leads to unusual chromosome constitution in 2n-gametes: a GISH analysis of BC₁ sexual polyploids of lily, submitted TAG.

7. Plannen tweede helft 2000

- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit, maken van kruisingen en toepassing van embryo-rescue methoden.
- In vitro en in vivo polyploidisatie van geselecteerde OA-nummers, selectie tetraploïde nummers.
- Inductie van 2n-gameten in steriele LO en OA-hybriden d.m.v. injectie in knoppen
- Selectie en opkweek van tetraploïde OA's
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 1999 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- Overdracht van door SLV geselecteerd halfmateriaal.
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.

Monsternr.	Moeder	LIJST SOORTKRUISINGEN 11 BEDRIJVEN						7/6/00	% Fertility	
		Vader	Kas	bed	regel	Ploidie	Type			
951301 5	940319 Merostar	950012 CK	6	1	1	di	OA	NG	bu	
951914 1	940312 Rom Star	940326 Lady Rosa	6	1	4	di	OA	NG	bu	
951934 1	940320 Expression	940326	6	1	7	di	OA	NG	bu	
953508 1	940320	940326	6	1	10	di	OA	NG	bu	
942172 1	Angora	Conn. King	6	1	13	di	OA	NG		
942587 1	Cherry Blossum	Conn. King	6	1	13	di	OA	NG		
942615 2	Royal Class	Conn. King	6	1	15	di	OA	NG		
942713 4	940022 Angora	920155	6	1	15	di	OA	NG		
942726 1	Expression	Conn. King	6	1	17	di	OA	NG		
942811 1	Angora	Conn. King	6	1	17	di	OA	NG		
942817 1	Expression	Conn. King	6	1	19	di	OA	NG		
942818 1	Expression	Conn. King	6	1	19	di	OA	NG		
942818 2	Expression	Conn. King	6	1	21	di	OA	NG		
951301 4	Mero Star	Conn. King	6	1	21	di	OA	NG		
951347 1	Touch	Conn. King	6	1	23	di	OA	NG		
951405 2	Conn. King	Montreux	6	1	23	di	OA	NG		
951407 9	Belpasso	Conn. King	6	1	25	di	OA	NG		
951428 1	Expression	Conn. King	6	1	25	di	OA	NG		
951428 2	Expression	Conn. King	6	1	27	di	OA	NG		
951437 1	Expression	Montreux	6	1	27	di	OA	NG		
951447 3	940328 Belpasso	940043	6	1	29	di	OA	NG		
951462 1	940312	950012	6	1	29	di	OA	NG		
951464 1	940320	940003 Montreux	6	1	31	di	OA	NG		
951468 1	950069 Angora	940003	6	1	31	di	OA	NG		
951469 2	940328	950012 CK	6	1	33	di	OA	NB		
951479 1	940320	950012	6	1	33	di	OA	NG		
951479 2	940320	950012	6	1	35	di	OA	NG		
951479 4	940320	950012	6	1	35	di	OA	NG		
951492 1	940307 Time Out	950012	6	1	37	di	OA	NG		
951497 3	950065 Cherry BI	940043 Gran Sasso	6	1	37	di	OA	NG		
951502 1	940023 Pesaro	950012	6	1	39	di	OA	3<5		
951502 3	940023	950012	6	1	41	di	OA	NG		
951515 1	940320	950012	6	1	41	di	OA	NG		
951518 4	940312	950012	6	1	43	di	OA	NB		
951518 6	940312	950012	6	1	43	di	OA	NG		
951584 1	950065	940003	6	1	45	di	OA	5<8		
951584 2	950065	940003	6	1	45	di	OA	NG		
951584 3	950065	940003	6	1	47	di	OA	NG		
951590 2	950008 Sartre	950013 MB	6	1	47	di	OA	NG		
951598 1	940312	950013	6	1	49	di	OA	NG		
951802 1	950069	950013	6	1	49	di	OA	NG		
951802 3	950069	950013	6	1	51	di	OA	NG		
951815 1	940320	950013	6	1	51	di	OA	NG		
951833 1	940320	940327	6	1	53	di	OA	NG		
951835 1	950069	950012	6	1	53	di	OA	NG		

951835 3	950069	950012	6	1	55	di	OA	NG	
951836 1	950069	940313	6	1	55	di	OA	NG	
951839 4	940311 Touch	950013	6	1	57	di	OA	NG	
951839 5	940311	950013	6	1	57	di	OA	NG	
951847 2	940028	950013	6	1	59	di	OA	NG	
951884 2	940307	950013	6	1	59	di	OA	NG	
951901 1	940311	940326	6	1	61	di	OA	NG	-
951901 2	940311	940326	6	1	61	di	OA	NG	
951934 4	940320	940326	6	1	63	di	OA	NG	++
951935 1	940320	950012	6	1	63	di	OA	NG	
951935 2	940320	950012	6	1	65	di	OA	NG	
952059 3	940311	950012	6	1	65	di	OA	NG	
952059 9	940311	950012	6	1	67	di	OA	NG	-
952088 2	940320	940309 Au revoir	6	1	67	di	OA	NG	
952377 1	940312	950012	6	1	69	di	OA	NG	
952381 5	940319	950012	6	1	69	di	OA	NG	0<5
952383 3	940320	950012	6	1	71	di	OA	NG	
952414 1	940307	940043	6	1	71	di	OA	NG	
952400 1	940319	940043	6	1	73	di	OA	NG	3<80
952458 1	940320	940043	6	1	75	di	OA	NG	
952462 1	940061 San Marco	Con King	6	1	75	di	OA	NG	--
952472 1	940328	940043	6	1	77	di	OA	NG	
952473 1	940320	Montreux	6	1	77	di	OA	NG	
952483 1	940320	950012	6	1	79	di	OA	NG	
952492 2	940022	940043	6	1	79	di	OA	NG	
952494 1	950065	950012	6	1	81	di	OA	NG	
952496 1	940320	950012	6	1	81	di	OA	NG	
952527 2	940022	940327	6	1	83	di	OA	NG	
952530 1	940319	950013	6	1	83	di	OA	NG	
952533 4	940022	950012	6	1	85	di	OA	NG	
952534 2	940022	950013	6	1	85	di	OA	NG	
953521 1	940320	950012	6	1	87	di	OA	NG	
962120 1	960032	960029 CK	6	1	89	di	OA	NG	
962127 1	940312	960026 MB	6	1	89	di	OA	NG	
962127 1	940312	960026	6	1	90	di	OA	NG	
962127 1	940312	960026	6	1	91	di	OA	NG	
962134 4	960005 Belpasso	960026	6	1	91	di	OA	NG	
962134 9	960005	960026	6	1	93	di	OA	NG	
962141 2	960033 Miami	960026	6	1	93	di	OA	NG	
962244 1	960011 Actrice	960019	6	1	95	di	OA	NG	
962254 2	960015	960019 Lanzarote	6	1	95	di	OA	NG	
962276 1	950253	960019	6	1	97	di	OA	NG	
962289 1	960003	960019	6	1	97	di	OA	NG	
962295 1	960013	960027 Montreux	6	1	99	di	OA	NG	
962328 1	950252 Starfighter	960019	6	1	99	di	OA	NG	
962328 2	950252	960019	6	1	100	di	OA	NG	
962355 3	950250 Sissi	960027	6	1	100	di	OA	NG	
962328 1	950252	960019 CK	6	1	101	di	OA	NG	

962328 2	950252	960019	6	1	101	di	OA	NG
962328 3	950252	960019	6	1	101	di	OA	NG
962380 1	950252	960027	6	1	103	di	OA	NG
962380 1	950252	960027	6	1	103	di	OA	NG
962389 1	940320	960027	6	1	103	di	OA	NG
962416 1	950250	960019	6	1	105	di	OA	NG
962433 1	950250	940313	6	1	105	di	OA	<1.0
962438 1	960014 Merostar	960029	6	1	107	di	OA	NG
962445 3	950250	960029	6	1	107	di	OA	NG
962448 1	950250	960027	6	1	107	di	OA	NB
962449 3	950250	960019	6	1	109	di	OA	NG
967113 1	950252	960009	6	1	109	di	OA	NB
967241 1	960015	960019	6	1	111	di	OA	NG
967243 1	940320	960019	6	1	111	di	OA	NG
967252 1	960017 Aruba	960019	6	1	115	di	OA	NB
967254 1	960017	960029	6	1	115	di	OA	NG
967254 4	960017	960029	6	1	117	di	OA	NG
969013 7	Casa Blanca	Mont Blanc	6	1	117	di	OA	NG
969013 10	Casa Blanca	Mont Blanc	6	1	117	di	OA	NG
969013 11	Casa Blanca	Mont Blanc	6	1	117	di	OA	NG
969013 12	Casa Blanca	Mont Blanc	6	1	119	di	OA	NG
969028 1	Gelria	Conn. King	6	1	119	di	LA	NG
969023 2	Casa Blanca	Conn. King	6	1	121	di	OA	NG
950149	942811 1		6	1	123	tetra	OAOA	NG
950151	942811 1		6	1	123	tetra	OAOA	NG
950153	942817 1		6	1	123	tetra	OAOA	<1.0
950153	942817 1		6	1	125	tetra	OAOA	NG
950218	942811 1		6	2	2	tetra	OAOA	NG
950219	942811 1		6	2	2	tetra	OAOA	NG
950220	942817 1		6	2	2	tetra	OAOA	NG
950220	942817 1		6	2	4	tetra	OAOA	NG
950221	942817 1		6	2	6	tetra	OAOA	NG
950222	942817 1		6	2	8	tetra	OAOA	NG
950222	942817 1		6	2	10	tetra	OAOA	NG
950223	942817 1		6	2	10	tetra	OAOA	<1.0
950223	942817 1		6	2	14	tetra	OAOA	
950224	942817 1		6	2	22	tetra	OAOA	<4
950224	942817 1		6	2	22	tetra	OAOA	<4.0
950225	942817 1		6	2	24	tetra	OAOA	1<10
950237	942180 1		6	2	24	tetra	OAOA	NG
950239	942180 1		6	2	26	tetra	OAOA	NG
950241	942587 1		6	2	26	tetra	OAOA	NG
950241	942587 1		6	2	28	tetra	OAOA	NG
950245	942818 1		6	2	28	tetra	OAOA	<1.0
950245	942818 1		6	2	30	tetra	OAOA	<1.0
950247	942818 1		6	2	33	tetra	OAOA	NG
950248	942713 1		6	2	35	tetra	OAOA	NG
950248	942713 1		6	2	38	tetra	OAOA	NG

960051	942713 4		6	2	40	tetra	OAOA	NG
960051	942713 4		6	2	40	tetra	OAOA	NG
960052	942713 4		6	2	42	tetra	OAOA	NG
960053	942713 4		6	2	42	tetra	OAOA	NG
960053	942713 4		6	2	42	tetra	OAOA	NG
960054	942713 4		6	2	44	tetra	OAOA	NG
960054	942713 4		6	2	44	tetra	OAOA	NG
960066	942587 1		6	2	46	tetra	OAOA	NG
960066	942587 1		6	2	50	tetra	OAOA	NG
960081	942818 1		6	2	52	tetra	OAOA	NG
970101	942726 1		6	2	52	tetra	OAOA	NG
970104	951301 5		6	2	54	tetra	OAOA	NG
970105	951301 5		6	2	54	tetra	OAOA	10<80
970110	952530 1		6	2	56	tetra	OAOA	NG
970111	952530 1		6	2	56	tetra	OAOA	NG
970112	951934 1		6	2	56	tetra	OAOA	NB
970113	dood		6	2	56	tetra	OAOA	NB
970114	953521-1		6	2	58	tetra	OAOA	NG
970115	951462 1		6	2	58	tetra	OAOA	NB
970120	921072 1		6	2	58	tetra	LCAN	NG
970121	921072 1		6	2	60	tetra	LCAN	NG
970123	951301 5		6	2	60	tetra	OAOA	0<80
970128	951914 1		6	2	60	tetra	OAOA	NG
970129	951934 1		6	2	62	tetra	OAOA	1<10
970136	951934 1		6	2	64	tetra	OAOA	NB
970139	962773 1		6	2	64	tetra	ONON	NB
981004	951407 9		6	2	64	tetra	OAOA	NG
981028	953521 1		6	2	64	tetra	OAOA	NG
981029	951301 5		6	2	66	tetra	OAOA	>80
981030	951914 1		6	2	66	tetra	OAOA	NG
981102	942584 2	Expr x CK	6	2	68	tetra	OAOA	NB
981104	942584 2		6	2	68	tetra	OAOA	NB
981106	951492 1		6	2	68	tetra	OAOA	NB
981108	951588 3		6	2	68	tetra	OAOA	NB
981111	952533 4		6	2	70	tetra	OAOA	NB
981112	952533 4		6	2	70	tetra	OAOA	NG
981113	952377 1		6	2	70	tetra	OAOA	NG
981128	952492 2		6	2	70	tetra	OAOA	
981129	951518 4		6	2	72	tetra	OAOA	NG
991103	951301 5		6	2	72	tetra	OAOA	>80
991105	951301 5		6	2	74	tetra	OAOA	>80
991106	951914 1		6	2	74	tetra	OAOA	NG
991107	951914 1		6	2	80	tetra	OAOA	NG
991108	951914 1		6	2	82	tetra	OAOA	NG
991109	942172 1		6	2	86	tetra	OAOA	
991110	953508 1		6	2	88	tetra	OAOA	<1.0
991112	953508 1		6	2	90	tetra	OAOA	5<10
972488 1	771017	960068	6	2	93	tri	LLO	<1.0

972488 2	771017	960068	6	2	93	tri	LLO	<2.0
972488 4	771017	960068	6	2	95	tri	LLO	NG
972488 5	771017	960068	6	2	95	tri	LLO	<1
982566 1	771017	960068	6	2	97	tri	LLO	NG
982566 2	771017	960068	6	2	97	tri	LLO	NG
962756 1	960003	89172 pardalimum	6	2	99	di	OP	NG
962757 2	960017	89172	6	2	99	di	OP	NG
962771 1	950252	89172	6	2	101	di	OP	NG
972006 1	960034 Gelria	940303	6	2	106	tri	LLR	NG
972006 3	960034	940303	6	2	106	tri	LLR	NG
972006 6	960034	940303	6	2	108	tri	LLR	NG
972007 1	960034	940303	6	2	108	tri	LLR	NG
941030 1	771017	920164 Stargazer	6	2	111	di	LO	NG
942077 2	901275 SQ	940029 Acapulco	6	2	111	di	LO	NG
942077 9	901275	940029 Acapulco	6	2	113	di	LO	NG
942077 10	901275	940029 Acapulco	6	2	113	di	LO	NG
942077 17	901275	940029 Acapulco	6	2	113	di	LO	NG
942102 2	940059	940023 Pesaro	6	2	115	di	LO	NG
951535 1	940059	940061	6	2	117	di	LO	NG
951537 1	901226	87264	6	2	117	tetra	LLOO	
962554 4	771017	960019 Lanzarotte	6	2	119	di	LA	NG
962554 7	771017	960019	6	2	119	di	LA	NG
942141 2	940061 San Marco	Gelria	6	2	121	di	OL	NG
942141 3	940061 San Marco	Gelria	6	2	121	di	OL	
942165 1	940061 San Marco	Gelria	6	2	123	di	OL	
942165 3	940061 San Marco	Gelria	6	2	123	di	OL	
942165 5	940061 San Marco	Gelria	6	2	125	di	OL	
962730 1	940320	940059 Lorina	6	2	129	di	OL	NG
962730 2	940320	940059	6	2	129	di	OL	
962814 1	960016 Wisdom	960028 SQ	6	2	129	di	OL	
962823 1	950263 Angora	960028	6	3	1	di	OL	
967134 1	950263	960009	6	3	3	di	OL	
950213	941030 1		6	3	7	tetra	LOLO	0<10
950214	941030 1		6	3	7	tetra	LOLO	<5.0
950226	941030 1		6	3	9	tetra	LOLO	<5.0
950227	942077 1		6	3	9	tetra	LOLO	<30.0
950228	942077 1		6	3	11	tetra	LOLO	NG
950230	942077 1		6	3	11	tetra	LOLO	
950232	942165 1		6	3	13	tetra	LOLO	
960058	942165 1		6	3	13	tetra	LOLO	
960060	942165 1		6	3	13	tetra	LOLO	>80
960061	942165 1		6	3	13	tetra	LOLO	
960063	942165 1		6	3	15	tetra	LOLO	
960064	942165 1		6	3	17	tetra	LOLO	
960068	942077 2		6	3	17	tetra	LOLO	NG
960069	942077 2		6	3	19	tetra	LOLO	
960070	942077 2		6	3	19	tetra	LOLO	>80
960076	942077 1		6	3	19	tetra	LOLO	30

960077	942077 1		6	3	21	tetra	LOLO	
960078	942077 1		6	3	21	tetra	LOLO	
972054 2	90239	950211	6	3	23	tetra	LLLR	
972108 1	85842 1	950210	6	3	23	tetra	LLLR	
972108 6	85842 1	950210	6	3	23	tetra	LLLR	
972418 1	901226	960068	6	3	25	tetra	LLLO	NG
972552 1	90239	960070	6	3	25	tetra	LLLO	NG
972561 1	85842 1	960069	6	3	25	tetra	LLLO	NG
972561 3	85842 1	960069	6	3	27	tetra	LLLO	NG
972728 1	960167 Primero	950232	6	3	27	tri	OLO	NG
972728 13	960167 Primero	950232	6	3	29	tri	OLO	
972728 14	960167 Primero	950232	6	3	29	tri	OLO	
972728 22	960167 Primero	950232	6	3	29	tri	OLO	
972728 8	960167 Primero	950232	6	3	29	tri	OLO	
972728 26	960167 Primero	950232	6	3	31	tri	OLO	NG
972728 28	960167 Primero	950232	6	3	31	tri	OLO	
972728 32	960167 Primero	950232	6	3	31	tri	OLO	
972728 35	960167 Primero	950232	6	3	33	tri	OLO	NG
972728 36	960167 Primero	950232	6	3	33	tri	OLO	
972728 38	960167 Primero	950232	6	3	33	tri	OLO	
972728 39	960167 Primero	950232	6	3	35	tri	OLO	NG
972728 40	960167 Primero	950232	6	3	35	tri	OLO	
972728 46	960167 Primero	950232	6	3	35	tri	OLO	
972728 49	960167 Primero	950232	6	3	37	tri	OLO	NG
972728 50	960167 Primero	950232	6	3	37	tri	OLO	
972728 51	960167 Primero	950232	6	3	39	tri	OLO	NG
972728 53	960167 Primero	950232	6	3	39	tri	OLO	
972729 1	960167 Primero	950232	6	3	39	tri	OLO	
972729 2	960167 Primero	950232	6	3	41	tri	OLO	NG
972729 4	960167 Primero	950232	6	3	41	tri	OLO	NG
972730 1	970006 Acapulco	950232	6	3	43	tri	OLO	
972730 4	970006 Acapulco	950232	6	3	43	tri	OLO	NG
942645 1	940044 Opus One	88542 69	6	3	45	tri	OLA	
942646 1	940041 Merostar	88542 69	6	3	47	tri	OLA	
942653 1	940061 San MArco	88542 69	6	3	49	tri	OLA	
972074	85710 1	950181	6	3	51	tetra	AALD	
972323	85914	940247	6	3	51	tetra	AALD	
972075	950322	950181	6	3	53	tetra	AALD	
972076	950323	950181	6	3	53	tetra	AALD	<5
972143	960021	942036 1	6	3	55	tetra	LALA	<2
972296	940323	920111	6	3	55	tetra	AALD	
972157	940322	951070 1	6	3	57	tetra	LA LCAA	
972243	951070 1	952016 1	6	3	57	tetra	LALA	
942036 1	901015 2	940063	6	3	59	tetra	LLAA	>80
972154	85989	951070 1	6	3	59	tetra	LA LCAA	>80
942036 2	901015 2	940063	6	3	61	tetra	LALA	
961030 2	960021	942036	6	3	61	tetra	LALA	
961030 3	960021	942036	6	3	63	tetra	LALA	

972143	960021	942036 1	6	3	63	tetra	LALA	
972143 1	960021	942036 1	6	3	65	tetra	LALA	
972143 2	960021	942036 1	6	3	65	tetra	LALA	
972143 4	960021	942036 1	6	3	67	tetra	LALA	
972143 5	960021	942036 1	6	3	67	tetra	LALA	
972148 1	85842 1	942036 1	6	3	69	tetra	LLLA	
972154	85989	951070 1	6	3	69	tetra	LALA	
972149 1	90239	942036 1	6	3	71	tetra	LLLA	
972285 1	90239	952016 1	6	3	71	tetra	LLLA	
972285 2	90239	952016 1	6	3	73	tetra	LLLA	
972285 3	90239	952016 1	6	3	73	tetra	LLLA	
931119 13	89314 11	891893 3	6	3	83	tetra	LDAA	10
931242 1	89315 23	85989	6	3	83	tetra	LDAA	
931242 2	89315 23	85989	6	3	85	tetra	LDAA	
940130	89314 11		6	3	85	tetra	LDLD	80
940132	89305 4		6	3	87	tetra	LDLD	80
940134	89315 12		6	3	87	tetra	LDLD	
940207	89315 19		6	3	89	tetra	LDLD	
940209	89315 19		6	3	89	tetra	LDLD	
940211	89315 19		6	3	91	tetra	LDLD	
940292	89314 11		6	3	91	tetra	LDLD	40
940299	89315 11		6	3	93	tetra	LDLD	
950181	89315 6		6	3	93	tetra	LDLD	40<80
952016 1	901015 32	85989	6	3	95	tetra	LLAA	NG
952016 2	901015 32	85989	6	3	95	tetra	LLAA	NG
952016 3	901015 32	85989	6	3	97	tetra	LLAA	NG
952016 4	901015 32	85989	6	3	97	tetra	LLAA	<3.0
966003	940244	940252	6	3	99	tetra	O000	
966004	940252	940244	6	3	99	tetra	O000	
966006 2	87264	940244 T Acapulco	6	3	101	tetra	O000	
966006 8	87264	940244 T Acapulco	6	3	101	tetra	O000	
966006 10	87264	940244 T Acapulco	6	3	101	tetra	O000	
966006 12	87264	940244 T Acapulco	6	3	103	tetra	O000	
966007 1	87264	940252 T Pesaro	6	3	103	tetra	O000	
966007 4	87264	940252 T Pesaro	6	3	105	tetra	O000	
966007 6	87264	940252 T Pesaro	6	3	105	tetra	O000	
966007 9	87264	940252 T Pesaro	6	3	107	tetra	O000	
966007 10	87264	940252 T Pesaro	6	3	107	tetra	O000	
966007 11	87264	940252 T Pesaro	6	3	107	tetra	O000	
966009 2	940056	940252 T Pesaro	6	3	109	tetra	O000	
966029 1	87264	940253 T Musc	6	3	109	tetra	O000	
972388	87264	940249 T Cherry Bl	6	3	127	tetra	O000	
940057	Cassandra		6	3	127	tetra	O000	
940266	940061 San Marco		6	3	127	tetra	O000	>80
940282	940027 Cherry Bl		6	4	2	tetra	O000	
940288	940029 Acapulco		6	4	2	tetra	O000	
940290	940044 Opus One		6	4	4	tetra	O000	
940307	Time Out		6	4	4	tetra	O000	

950067	Angora		6	4	6	tetra	O000	
950159	Starfighter		6	4	6	tetra	O000	
950113	891470 longi x mart		6	4	8	tetra	Lmart	
952513	950065 Cherry Bl	940318 Fidelity	6	4	8	di	OAdt	
950250	Sissi		6	4	8	tetra	O000	
960113	940307 Time out		6	4	10	tetra	O000	
960114	Starfighter		6	4	10	tetra	O000	
966006 13	87264	940244	6	4	10	tetra	O000	
966006 17	87264	940244	6	4	10	tetra	O000	
966007 4	87264	940252	6	4	12	tetra	O000	
966007 10	87264	940252	6	4	12	tetra	O000	
966029 1	940300	940253 T Musc	6	4	12	tetra	O000	
940116	921250 3 Gelria x rub		6		potten	tetra	LRLR	5
940117	921250 3		6		potten	tetra	LRLR	
940118	921250 3		6		potten	tetra	LRLR	
940125	921018 1Gelria x bulbiferum		6		potten	tetra	LBLB	NG
940126	921018 1		6		potten	tetra	LBLB	NG
940303	921250 4		6		potten	tetra	LRLR	5
950039	921250 1		6		potten	tetra	LRLR	NG
950118	921250 1		6		potten	tetra	LRLR	>70
961003 1	950009 SQ	950039 Gelria x rub	6		potten	tri	LLR	
961003 14	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 15	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 2	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 20	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 21	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 22	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 24	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 26	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 27	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 3	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 30	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 34	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 34	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 44	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 44	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 50	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 53	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 54	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 56	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 57	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 58	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 59	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 6	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 60	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 67	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 69	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961003 7	950009	950039	6		potten	tri	LLR	

P

P

961003 8	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961004 1	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961004 10	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961004 4	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961004 6	950009	950039	6		potten	tri	LLR	P
961004 8	950009	950039	6		potten	tri	LLR	
961004 9	950009	950039	6		potten	tri	LLR	

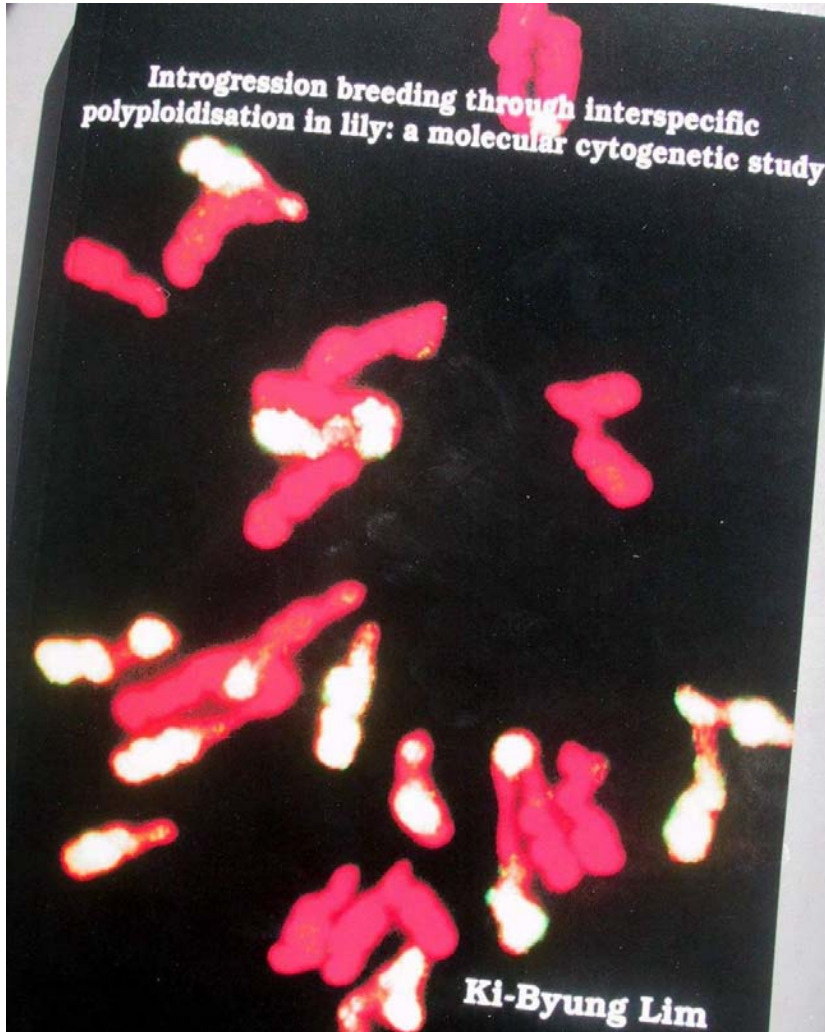
OUDERRASSEN 1994-2000								
940001	GELRIA		C=longi				di	
940002	CONNECTICUT KING		A=aziaat				di	
940003	MONTREUX		A				di	
940004	PROMINENCE		A				di	
940005	MONT BLANC		A				di	
940006	SNOW QUEEN		C				di	
940007	HARMONY		A				di	
940008	STERLING STAR		A				di	
940009	ORLITO		A				di	
940010	BRIGHT BEAUTY		A				di	
940011	STARGAZER		B=oriental				di	
940012	ESTHER		A				di	
940013	AVIGNON		A				tetra	
940014	MONA 4N		A				tetra	
940015	PRONTO		A				di	
940016	BEATRIX		A				di	
940017	MERIBEL		A				di	
940018	BANITA		A				di	
940019	JAMAICA		B				di	
940022	ANGORA		B				di	
940023	PESARO		B				di	
940024	MIURO		B				di	
940025	NOVE CENTO		A				tetra	
940026	REGATA		B				di	
940027	CHERRY BLOSSOM		B				di	
940028	PRIMERO		B				di	
940029	ACAPULCO		B				di	
940040	EXPRESSION		B				di	
940041	MEROSTAR		B				di	
940042	ROYAL CLASS		B				tri	
940043	GRAN SASSO		A				di	
940044	OPUS ONE		B				di	
940056	4N DAME BLANCHE		B				tetra	
940058	MONA		B				di	
940059	LORINA		B				di	
940061	SAN MARCO		B				di	
940062	MONT MARTRE		B				di	
940063	PRATO		B				tetra	
940064	ANAI ANAIS		B				di	

940090	KYOTO		B			di		
940091	DAME BLANCHE		B			di		
940092	STARGAZER		B			di		
940306	WHITE AMERICAN		C			di		
940307	TIME OUT		B			di		
940309	AU REVOIR		E			tri		
940310	STARFIGHTER		B			di		
940311	TOUCH		B			di		
940312	ROMERO STAR		B			di		
940313	Mirella		A			di		
940314	VIRGINIA		C			di		
940315	MOUNT EVEREST		C			di		
940316	CASTELLO		A			tetra		
940317	AVITA		A			di		
940318	FIDELITY		A			tri		
940319	MERO STAR		B			di		
940320	EXPRESSION		B			di		
940326	Lady Rosa		A			di		
940327	Bright Beauty		A			di		
940328	Belpasso		B			di		
940329	Woodriff's Memory		B			di		
950008	SARTRE		B			di		
950009	SNOW QUEEN		C			di		
950010	GELRIA		C			di		
950011	STARGAZER		B			di		
950012	CONNECTICUT KING		A			di		
950013	MONT BLANC		A			di		
950014	ORLITO		A			di		
950015	ANTON GEESINK		B			di		
950061	LOUVRE		B			di		
950062	WOODRIFF'S MEMORY		B			di		
950063	MONTRACHET		B			di		
950064	ACAPULCO		B			di		
950065	CHERRY BLOSSOM		B			di		
950066	PRIMERO		B			di		
950067	ANGORA 4N		B			tetra		
950068	ANGORA		B			di		
950069	ACAPULCO		B			di		
950070	ACAPULCO		B			di		
950071	SPINOZA		B			di		
950072	LOUVRE		B			di		
950250	Sissi		B			di		
950252	Starfighter		B			di		
960001	TOMPOUCE		B			di		
960002	GRAN SASSO		A			di		
960003	KISSPROOF		B			di		
960004	BELLISSIMO		B			di		
960005	BELPASSO		B			di		

960006	BERLIN		B			di		
960007	SEMPRE AVANTI		B			di		
960008	AVELINO		B			di		
960009	CARTHAGO		B			di		
960011	ACTRICE		B			di		
960012	ANGELO		B			di		
960013	AUBADE		B			di		
960014	MEROSTAR		B			di		
960015	TENERIFE		B			di		
960016	WISDOM		B			di		
960017	ARUBA		B			di		
960018	DEVOTION		B			di		
960019	LANZAROTE		A			di		
960020	ROYAL STAR		E			tri		
960021	Washington		B			tri		
960022	WHITE ELEGANSE		C			di		
960023	CASABLANCA		B			di		
960024	ACAPULCO		B			di		
960025	OLYMPIC STAR		B			di		
960026	MONT BLANC		A			di		>70
960027	MONTREUX		A			di		
960028	SNOW QUEEN		C			di		
960029	CONN KING		A			di		
960031	MIRELLA		A			di		
960032	BERNINI		B			di		
960033	MIAMI		B			di		
960034	GELRIA		C			di		
970002	Snow Queen		C			di		
970006	Acapulco		B			di		
991056	White Fox		C			di		>70
001050	Pausini		C			di		
001051	White American		C			di		
001057	La Mancha		B			di		>80
001063	All Round		LA			tri		
001064	London		A			tri		
001065	Gran Sasso		A			di		>80
001066	Navonna		A			tri		NG
001070	Aerobic		LA			tri		
001071	Fangio		LA			tri		NG
001072	Nomade		LA			tri		NG
001076	White heaven		C			di		>80
001078	Lorina		C			di		>80
001099	Lanzarotte		A			di		>80
001100	Con king		A			di		
001101	Gelria		C			di		
001104	Snow Queen		C			di		

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken ^{Vetrouwelijk}
kruisingsbarrières
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag



december 2000

Halfjaarlijks verslag, periode 1/6/99-1/12/00

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer Plant Research International 6600012 (2.080.016)

3. Algemeen

Personele inzet

K.B. Lim
Ingrid Maas
J. Matijssen
J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

Ing. P.C. Schenk (voorzitter)

S. Bottema

K. de Buck

H. Imanse

Ir. A. Vletter

Ir. D. van Kleinwee

P.J. Kos

Ing. K. Laan

Ir. A. Peterse

C. Randag

W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
 4. Ter beschikking stellen van materiaal.
-

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Ki-Byung Lim heeft op 27 november zijn proefschrift over het genomisch in situ hybridisatie onderzoek bij lelie verdedigd (zie ook bijlage van het persbericht van Plant Research International naar aanleiding daarvan). Het deed ons goed dat 7 lelieveredelaars aanwezig waren! Een belangrijk onderzoek, waarop nog veel teruggegrepen zal worden en waarop naar we verwachten nog veel vervolg aan gegeven zal worden.

In augustus werd er deelgenomen aan het 8e Bloembollensymposium in Kaapstad, Zuid-Afrika. Enkele presentaties zijn opgenomen in het verslag.

De aanstelling van Ingrid Maas loopt eind dit jaar af. Volgend jaar zullen een Koreaanse en een Nederlandse studente de groep komen versterken.

5.2 Kruisingsprogramma 2000

In totaal werden 682 gekiemde embryos's verkregen uit 18 "typen" kruisingscombinaties. Dit is bereikt na bestuiving van 2740 bloemen en 70 verschillende typen kruisingscombinaties (Tabel 1).

De belangrijkste doorbraak van dit jaar is het verkrijgen van diverse fertiele tetraploide OA's waardoor A OA en OA A combinaties (met respectievelijk 291 en 21 gekiemde embryo's) met succes gemaakt konden worden. De A OA-combinatie is samengesteld uit 2 typen gameten, en wel afkomstig van diploïde en van tetraploide OA's. In het vorige verslag is reeds vermeld dat enkele OA's fertiel pollen produceren (951502-1, 952400-1 en 951584-1), die of n of 2n-gameten zouden produceren. Omdat alle O OA hybriden verkregen met pollen van deze hybriden diploïd bleken en de kruisingen A OA wel echte triploïde hybriden blijken te zijn, mag verondersteld worden dat n en 2n pollen beide voorkomen, welke selectief bevrucht worden door de O en A moeder (zie Tabel 2).

Een andere belangrijke doorbraak is het gebruik van Cafeïne voor de inductie van kunstmatige chromosoomverdubbeling (zie 5.5). Indien dit algemeen werkzaam is en bovendien in een meiotsch stadium, waarbij recombinatie reeds heeft plaats gevonden (dit wordt komend jaar met GISH onderzocht), heeft dit belangrijke consequenties.

Tabel 2. Resultaat van de flowcytometrische analyse van enkele OA-hybriden.

PRI MB-No	Moeder	Vader	Genome samenstelling	Ploidie niveau
002188-9	001065	970123 (4x)	A OA	3x
002147-61	001065	981029 (4x)	A OA	3x
002531-10	001096	952400-1 (2x)	A OA	3x
002461	966029 23	950227 (4x)	OO OA	4x
992226-3	991025	951502-1 (2x)	O OA	2x
992755-33	991024	951502-1 (2x)	O OA	2x
002387-1	966029-8	991110 (4x)	LO OA	4x

5.3 Polyploidisatie OA-hybriden, fertiliteit tetra's.

Pollenkiemingsbepalingen werden uitgevoerd zoveel mogelijk hybriden. De resultaten van de meest interessante genotypen die dit jaar zijn getest zijn in Tabel 3 weergegeven.

Tabel 3. Pollen fertiliteit (%) van divers hybride materiaal op kunstmatig voedingsmedium.

Access no.	Type	Pollen fertiliteit	Access no.	Type	Pollen fertiliteit
940116	LLRR	30	972154	LLAA	50
940130	LLDD	70	972296	LLDD	10
940292	LLDD	40	981004	OOAA	7
940299	LLDD	5	981020	OOAA	80
940303	LLRR	30	981023	OOAA	80
942036	LLAA	45	981029	OOAA	80
950118	LLRR	70	981103	OOAA	80
950153	OOAA	<1	991105	OOAA	80
950213	LLOO	50	991112	OOAA	7
950214	LLOO	22	88542 24	LA	1
950220	OOAA	5	88542 52	LA	5
950221	OOAA	5	88542 69	LA	5
950222	OOAA	10	88542 80	LA	7
950223	OOAA	1	942036 2	LLAA	80
950224	OOAA	4	951502 1	OA	3
950225	OOAA	1-10	951584 1	OA	10
950227	LLOO	80	952016 4	LLAA	3
950232	LLOO	80	952047 1	LLAA	<1.0
950245	OOAA	1	952381 5	OA	5
960060	LLOO	80	952400 1	OA	4<80
960070	LLOO	80	972143 1	LLAA	2
960076	LLOO	70	972488 1	LLO	1
960078	LLOO	5	972488 2	LLO	2
970105	OOAA	80	972488 5	LLO	<1
970123	OOAA	80	972552 2	LLLLO	<1
970128	OOAA	1	981047	OOAA	30
970129	OOAA	10	982566 1	LLO	1
972076	AALD	5	982696 1	LLOO	40
			982696 6	LLOO	70

5.4 Kunstmatige meiotische chromosoomverdubbeling

De OA hybride 951301-5 werd gebruikt voor een experiment, waarbij een 0.3% cafeïne oplossing werd geïnjecteerd in bloemknoppen variërend in lengte van 15 mm tot 45 mm. Tijdens de bloei werd de fertiliteit van elke anthere getest en de individuele bloemen werden bestoven met stuifmeel van een Aziaat of Oriental. In enkele bloemen werd goed fertiel pollen gevonden. Twee van de 125 bloemen waren volledig fertiel en hadden een fertiliteit van 60% (o.a. bloem No 5-5 zie Tabel 4). In enkele andere gevallen was een deel van de antheren fertiel. Het stuifmeel van een van deze bloemen (5-5) bestoven op 23 bloemen leverde 36 hybriden op.

Tabel 4. Resultaten van de cafeïne behandeling op de fertiliteit van pollen en eicellen.

Type	Bloemknop grootte (mm)	Bestoven bloemen	Aantal			
			Gezette vrucht- Beginsels	Embryo's in vitro	Embryo zakken in vitro	Embryo's gekiemd
OA A	17 – 45	104	67	6	47	9
OA O	15 – 48	100	0	0	0	0
A OA	5-5 pollen	15	15	47	16	36
O OA	5-5 pollen	8	0	0	0	0

5.5 Uitgifte materiaal

Naar aanleiding van een bijeenkomst van de SLV is het volgende voorstel voor vermeerdering van project materiaal in eigen beheer door SLV:

Van het (bloei) te bezichtigen materiaal van het soortkruisingsproject zal ieder jaar voor de bedrijven een overzichtslijst worden samengesteld. Alle SLV-deelnemers kunnen hierop aantekeningen maken. Hieruit kan in het najaar door SLV een selectie gemaakt worden van nummers die vervolgens beschikbaar gesteld zullen worden om door SLV in eigen beheer doorvermeerderd te worden. In overleg met Dick van Kleinwee is na de vorige vergadering de selectie van alle bedrijven op een rij gezet. In Tabel 5 is het resultaat hiervan. Aangeven is welke nummers door welke bedrijven aangevraagd zijn en of deze beschikbaar zijn. Een "v" betekent: slechts een bol voor alle bedrijven beschikbaar, in vitro vermeerderen; "vv" betekent slechts enkele schubben beschikbaar, dit gebruiken voor in vitro vermeerdering of achten tot volgend jaar?

6. Publicaties en lezingen

Lim, Ki-Byung

Introgression breeding through interspecific polyploidisation in lily: a molecular cytogenetic study. PhD-thesis, 27-11-2000, 120 pp.

Ki-Byung Lim & J.M. Van Tuyl

Identification of parental chromosomes and detection of ribosomal DNA sequences in interspecific hybrids of *Lilium* revealed by multicolor in situ hybridization
Poster, VIII International Symposium on flowerbulbs, August 2000 South Africa.

Jaap M. Van Tuyl, Ingrid W.G.M. Maas & Ki-Byung Lim.

Introgression in interspecific hybrids of lily. Lecture, VIII International Symposium on flowerbulbs, August 2000 South Africa (zie bijlage).

7. Plannen eerste helft 2001

- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit, maken van kruisingen en toepassing van embryo-rescue methoden.
- Inductie van 2n-gameten in steriele LO en OA-hybriden d.m.v. injectie in knoppen
- Selectie en opkweek van tetraploïde OA's
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 2000 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie (o.a. i.v.m. mogelijke recombinatie de via injectie met cafeïne verkregen hybriden).

Tabel 1. Overzicht van de kruisingen gemaakt in 2000, waarbij aangegeven het type kruising, het aantal bloemen bestoven en het aantal gekiemde embryo's verkregen.

Type kruising	bl	Kiem
A LD	12	64
A O	6	
A OA	237	291
AA AALO	5	
AA OA	82	21
AALO L	4	
ALA OA	10	
L L	3	
L LD	5	
L LLO	7	
L LO	19	43
L LR	36	7
L O	6	
LA A	20	1
LA L	19	
LA O	2	
LA OA	22	1
LALD OA	4	
LD A	43	
LD AAL	6	
LD L	13	
LL A	8	
LL LO	32	
LL O	4	77
LLLO LO	6	
LLLO LOLR	4	
LLLO O	3	
LLLO OO	1	
LLO OO	10	
LO	9	
LO AALO	7	
LO LLO	8	
LO LOLR	7	9
LO LR	15	3
LO O	64	
LO OA	48	4
LO OO	11	
LOLO LO	2	
LR L	10	
LR O	20	

Type kruising	bl	Kiem
LR OO	1	
LRLO LO	3	
LRLO OO	8	
O A	4	
O L	6	
O LALO	3	
O LO	28	4
O LOLR	1	
O OA	283	47
OA A	257	21
OA AA	6	
OA LO	4	
OA O	724	
OA O	7	
OA OA	183	
OA OO	137	
OLA OO	3	
OLO LO	4	
OLO LR	9	
OLO O	22	
OLO OO	4	
OO A	11	
OO L	7	
OO LO	61	67
OO LOLR	1	
OO O	10	14
OO OA	62	5
OOO A	6	1
OP A	4	
OP OO	3	
Totaal	2740	682

Tabel 5: UITGIFTE december 2000, verklaring zie 5.5 (pag. 6)

Nummer	B.T.	Bot	DeJo	Ima	La	San	Tes	V&H	Bos	Wer	Zant	Tot	Vitro
981129				1								1	Vv
982567-6				1				1		1		3	Vv
970129				1					1			2	V
942165-3	1			1	1				1	1		5	V
952381-5	1		1				1	1				4	V
967113-1	1		1					1	1			4	V
982566-2	1				1							2	V
970101					1							1	V
950153		1										1	
950181									1			1	
950223		1										1	
950224		1										1	
950245		1										1	
950213/214		1	1	1			1	1	1			6	
970105/123, 981029, 991105		1		1		1	1	1	1	1	1	7	
960060		1		1		1	1		1		1	6	
960070						1	1					2	
960076			1									1	
960081	1			1								2	
972076									1			1	
972154									1			1	
991103				1		1					1	3	
991106				1					1		1	3	
991112			1	1			1	1	1	1	1	7	
942165-1										1		1	
942817-1	1											1	
950227, 950228								1				1	
951301-5								1				1	
951502-1		1			1	1	1	1				5	
951584-1						1	1	1				3	
951934-4				1								1	
952400-1	1	1	1		1	1	1	1		1		8	
952534-2					1							1	
961003-1					1							1	
961003-24					1							1	
961004-6					1							1	
962120-1			1									1	
962134-9			1									1	
962289-1	1				1							2	
962328-1					1							1	
962756-1	1		1									2	
969023-2	1											1	
972007-1					1							1	
972143-1								1				1	
972418-1	1											1	
972561-1	1			1	1							3	
972728-26										1		1	
981030, 970128				1							1	2	
Eindtotaal	12	10	8	14	13	7	9	12	11	7	6	109	

VIII International Symposium on flowerbulbs, August 2000, South Africa**Introgression in interspecific hybrids of lily**

Jaap M. van Tuyl, Ingrid W.G.M. Maas and Ki-Byung Lim
Plant Research International
Business Unit Genetics and Breeding
P.O. Box 16 6700 AA, Wageningen,
The Netherlands
Tel: +31-317-477329
Fax: +31-317-418094
E-mail J.M.vantuyl@plant.wag-ur.nl

Abstract

In order to introduce new desirable characters into the cultivar assortment of lily a range of interspecific crossing barriers has to be overcome. By using various pollination and embryo rescue techniques pre- and postfertilization barriers were overcome and a range of wide interspecific lily hybrids between species and cultivars from the different sections of the genus *Lilium* could be made. Important breakthroughs include the development of the LA- (*L. longiflorum* × Asiatic hybrids), the LO- (*L. longiflorum* × Oriental hybrids) and the OA- (Oriental × Asiatic hybrids) hybrids.

In general wide interspecific lily hybrids show F₁-sterility. Using somatic chromosome doubling techniques (mitotic polyploidization) tetraploids with restored fertility can be produced from these diploid hybrids. An alternative method is the use of unreduced (or 2n) gametes (meiotic polyploidization), which are rarely found in some hybrids. Introgression of alien chromosome segments from donor species into recipient cultivar through backcrossing of F₁ hybrid was studied using *in situ* hybridization techniques (GISH). Mitotic polyploidization showed no homoeologous recombinations between the parental genomes whereas meiotic polyploidization detected many. The use of 2n-gametes seems to be the most promising way for the introgression of desirable characters.

Keywords: *Lilium*, interspecific hybrids, introgression, meiotic, mitotic polyploidization, Genomic *in situ* hybridization (GISH).

1. Introduction

Interspecific crossing barriers need to be overcome in order to introduce new characters such as resistances, flower shape and colour, from wild species into the cultivar assortment of lily. Lily appeared to be a suitable model plant for studying interspecific crossing barriers. For overcoming pre- and post-fertilization barriers a range of techniques have been

developed. Barriers that occur before fertilization, such as inhibition of pollentube growth in the style can be overcome by using pollination techniques, as the cut style method, the grafted-style method and the in vitro isolated ovule pollination technique (Asano & Myodo, 1977ab; Van Tuyl et al., 1991).

Post-fertilization barriers can occur during stages of hybridization (e.g. firstly during the development of the hybrid embryo) and can be circumvented by in vitro pollination and/or rescue methods as embryo, ovary-slice and ovule culture (Asano, 1980; Van Tuyl et al., 1991; Okazaki et al. 1994). A second type of post-fertilization barrier can be found after raising the hybrid, manifesting itself in interspecific hybrids that show F₁-sterility. Using mitotic (chromosome doubling) and meiotic polyploidization techniques amphidiploids with restored fertility can be produced from these diploid hybrids (Van Tuyl et al., 1992; Van Tuyl, 1993). The third post-fertilization barrier is a lack of introgression, caused by absence of recombination in cases when amphidiploid interspecific hybrids are used. Genomic in situ hybridization techniques offer an insight into the parental genome composition and homologous recombination breakpoints (Karlov et al. 1999, Lim et al. 2000). This paper describes some recent results of our interspecific hybridization research and the possibilities of introgression.

2. Plant material

Lilium hybrids and species which were used from the collection of Plant Research International (former CPRO-DLO) and are derived from different sections (between brackets) of the genus *Lilium*: *L. longiflorum* (Leucolirion), *L. henryi* (Leucolirion or Archelirion), *L. canadense* (Pseudolirium), *L. bulbiferum*, *L. dauricum* (Sinomartagon), *L. candidum* (Lilium), *L. rubellum* (Archelirion), *L. martagon* (Martagon), Asiatic hybrids (Sinomartagon) and Oriental hybrids (Archelirion).

Three diploid (2n=2x=24) 2n-gametes producing interspecific hybrids (**LA**) of *L. longiflorum* (**L**) ‘Gelria’ × Asiatic hybrid (**A**) ‘Whilito’ as well as their backcross progenies (**ALA**) were used. All F₁-hybrids were known to produce fertile 2n-pollen ranging from 0.1% up to 15%. The Asiatic hybrid ‘Montreux’ was used to produce to produce backcross progenies.

Because F₁-hybrids of *L. longiflorum* ‘Gelria’ × *L. rubellum* (**LR**) showed absolute sterility, mitotic polyploidization was performed by in vitro treatment of oryzalin. The selected amphidiploid (**LLRR**) plants resulting from artificial chromosome doubling were used as male parent in the back-cross with *L. longiflorum* ‘Snow Queen’ (2n=2x=24) and over a hundred BC₁ plants were obtained (Lim et al. 2000). BC₁ plants were selected and pollinated with tetraploid (**LLLL**) *L. longiflorum* to produce BC₂ individuals.

3. Methods

3.1. Pollination methods: The cut-style method (CSM) and the grafted style method (GSM) have been most frequently used. CSM: the style was cut with a razor blade 0-2 mm above the ovary, stigmatic fluid was applied followed by pollen. GSM: pollen was deposited on compatible stigma and after one day the style with germinating pollen was cut 1-2 mm above the ovary and attached to an ovary of the incongruent mother plant (Van Tuyl et al., 1991).

3.2. In vitro methods: Ovary culture, ovule and embryo culture and chromosome doubling are applied as previously described (Van Tuyl et al., 1991, 1992).

3.3. Pollen tube penetration: Pollen tube penetration in the ovules: 5-10 days after pollination ovaries are used. One or two carpels, with the ovules attached to the placenta, are de-stained in a mixture of water, glycerol and lactic acid (1:2:1) and subsequently stained in a solution of 1% aniline blue in the same mixture before being de-stained again. Penetration was observed using a light microscope (Janson et al., 1994).

3.4 Chromosome doubling: Mitotic chromosome doubling was carried out by treating in vitro bulb scales with 0.001% oryzalin and detecting by flowcytometric DNA-measurements (Van Tuyl et al. 1992; van Tuyl and Boon, 1997).

3.5 Chromosome preparation: Chromosomes were prepared by squashing fixed cells onto clean microscope slides. The method was modified from that of Karlov et al. (1999). Well-squashed preparations were dipped for a few seconds in liquid nitrogen and, after taking off the cover slip, dehydrated in a graded ethanol series (70, 95, and 100%) and air dried. The best slides were used for GISH-work.

3.6 DNA probes: Total genomic DNA was isolated from *in vitro* young leaves of *L. longiflorum* and labeled with digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim) by nick translation according to the manufacturers instructions. Sheared herring sperm DNA was used for block DNA instead of *L. rubellum* DNA as a counterpart of *L. longiflorum*.

3.7 In situ hybridization: Genomic *in situ* hybridization was performed according to Khrustaleva and Kik (1998) with some modifications. Chromosome preparations were pretreated with RNase A (100 µg/mL) and pepsin (5 µg/mL), fixed with 4% ρ -formaldehyde for 10 minutes, dehydrated in an ethanol series and air dried. The hybridization mixture contained 50% deionized formamide, 10% (w/v) sodium dextran sulfate, 2 \times SSC, 0.25% (w/v) SDS, 1.25-2.5 ng/µl genomic probe DNA, and 25 ng/µl herring sperm DNA. The mixtures were denatured for 10 min. at 70 °C and then directly placed on ice for over 10 minutes. 44 µL of hybridization mixture was applied on each slide. Slides were denatured at 80 °C for 10 minutes and hybridised for overnight at 37 °C in a humid chamber. Slides were washed for 15 minutes in 2 \times SSC, for 30 minutes in 0.1 \times SSC at 42 °C, followed by 5 minutes in buffer 1 (0.1 M Tris-Hcl with 0.15 M NaCl, pH 7.5). Digoxigenin-11-dUTP was

detected with 20 µg/mL anti-Dig-FITC (fluorescein isothiocyanate; Boehringer Mannheim) and 20 µg/mL rabbit-anti-sheep-FITC. Biotin-16-dUTP was detected with 4 µg/mL streptavidin-Cy3, 10 µg/mL biotinylated-antistreptavidin, and 4 µg/mL streptavidin-Cy3. The preparations were counterstained with 1 µg/mL DAPI and 4 µg/mL PI (propidium iodide).

4. Results and discussion

In Figure 1 a simplified crossing polygon is presented of the genus *Lilium*, while a complete crossing polygon is published elsewhere (Van Tuyl et al. 2000). The most important crosses between *L. longiflorum* and the Asiatic hybrids and the Oriental hybrids are presented. The cross is unidirectional in case of the LA and the OA hybrids, but appears bi-directional in case of the LO-hybrids. More than 10.000 flowers were pollinated to produce these 3 groups of hybrids. The LA-combination resulted in approximate of one hybrid per 2 pollinated flowers, the LO-combination one in four and the OA-combination one in ten. However, the percentage of hybrids per pollinated flower appeared to be genotype dependent in all cases.

The hybrids, obtained after intersectional crosses, are produced by using the cut- style method in combination with embryo culture or with ovary-slice and ovule culture. It has not been proven that by using the grafted style method other combinations can succeed in producing other combinations than after using the cut style method, but the number of hybrid embryos obtained per ovary substantially increased in some combinations with the GSM-method. The grafted style method's problem, however, is that the pollen tubes are often not able to enter the style of the mother ovary because of inadequate attachment of the styles.

Restoration of F₁-sterility by doubling the number of chromosomes was successfully performed in the following crosses: *L. henryi* x *L. candidum*, *L. longiflorum* x Asiatic hybrids, *L. longiflorum* x *L. candidum*, *L. longiflorum* x *L. concolor*, *L. longiflorum* x *L. henryi*, *L. longiflorum* x *L. rubellum*, *L. longiflorum* x Oriental hybrids, *L. longiflorum* x *L. dauricum* and Oriental x Asiatic hybrids. In all these F₁-hybrids (except the OA-hybrids) the restoration was found in most autodiploids. Using these tetraploids backcrossings were performed on Asiatic and Oriental hybrids and *L. longiflorum*. An interesting backcross appeared to be *L. longiflorum* x (*L. longiflorum* x *L. rubellum*), resulting in a triploid population that showed all characters of a pink longiflorum. The characteristics were intermediate between *L. longiflorum* and *L. rubellum*. These triploids were backcrossed to *L. longiflorum* for introgression of the pink colour. An investigation into the possible introgression of characteristics from one species to the cultivated one was performed in the LR-hybrids by in situ hybridization techniques. A total absence of homoeologous recombinations was demonstrated in all 9 hybrids (Fig. 2b) (Lim et al. 2000). There was, however, a segregation of chromosomes in the BC2 (LLLR 2n=42, 43, 44), in which 6, 7 or 8 chromosomes of *L. rubellum* were retained with three sets of *L. longiflorum* (Fig. 2c). In

general it can be concluded that due to preferential pairing of the parental chromosomes (Fig. 2c) crossovers between parental chromosomes will not occur.

In case of the **LA**-hybrids, some fertility in a number of cases was found in the diploid F_1 's, caused by $2n$ -gametes occurring in the pollen or pollen mother cells. When investigating this material using GISH-techniques, there was clear evidence for homoeologous chromosome association and recombination at metaphase I and anaphase I stages of microsporogenesis (Fig. 2d). The occurrence of such genetic recombination in **LA**-hybrids was also convincingly proven by the analysis of chromosome composition of BC_1 (**ALA**) and BC_2 progenies. (Fig. 2ef.) (Karlov et al. 1999; Lim et al. 2000). This recombination is highly important for introgression of specific characters from donor to recipient cultivars. It has been shown that by using $2n$ -gametes, as in **LA**-hybrids, sexual polyploid progenies can be produced with the addition of complete alien chromosomes as well as recombinant chromosome segments of variable sizes.

In the near future polyploid *Lilium*-hybrids originated from a range of different genotypes (*L. longiflorum*, *L. henryi*, *L. rubellum*, Asiatic hybrids, Oriental hybrids), which previously could not be combined or recombined, will open up a whole range of new and promising possibilities for innovating the lily assortment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the 11 Dutch lily breeding companies, who supported this research.

References

- Asano, Y., 1980. Studies on crosses between distantly related species of lilies. IV. The culture of immature hybrid embryos 0.3 - 0.4 mm long. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49:114-118.
- Asano, Y., and Myodo, H., 1977a. Studies on crosses between distantly related species of lilies. I. For the intrastylar pollination technique. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 46:59-65.
- Asano, Y., and Myodo, H., 1977b. Studies on crosses between distantly related species of lilies. II. The culture of immature hybrid embryos. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 46:267-273.
- Janson, J., Reinders, M.C., Valkering, A.G.M., Van Tuyl, J.M., and Keijzer, C.J., 1994. Pistil exudate production and pollen tube growth in *Lilium longiflorum* Thunb. Annals of Botany 73: 437-446.
- Karlov, G.I., Khrustaleva, L.I, Lim, K.B., and Van Tuyl, J.M., 1999. Homoeologous recombination in $2n$ -gamete producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic in situ hybridization (GISH). Genome 42(4): 681-686.
- Khrustaleva, L.I. and Kik, C., 1998. Cytogenetic studies in the bridge cross *Allium cepa*

- × (*A. fistulosum* × *A. roylei*). Theor Appl Genet 96: 8 – 14.
- Lim, Ki-Byung, Chung, J.D., Van Kronenburg, B.C.E., Ramanna, M.S., De Jong, J.H., and Van Tuyl, J.M. 2000. Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L. longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F₁ hybrid, BC₁ and BC₂ progenies. Chromosome Res. 8(2): 119-125.
- Okazaki, K., Asano, Y., and Oosawa, K., 1994. Interspecific hybrids between *Lilium* 'Oriental hybrid and *L.* 'Asiatic' hybrid produced by embryo culture with revised media. Breeding Science 44: 59-64.
- Van Creij, M.G.M., Van Raamsdonk, L.W.D., and Van Tuyl, J.M., 1993. Wide interspecific hybridization of *Lilium*: preliminary results of the application of pollination and embryo-rescue methods. *The lily yearbook of the North American Lily Society* 43:28-37.
- Van Tuyl, J.M., 1993. Survey of research on mitotic and meiotic polyploidization at CPRO-DLO. *The lily yearbook of the North American Lily Society* 43:10-18.
- Van Tuyl, J.M., Van Diën, M.P., Van Creij, M.G.M., Van Kleinwee, T.C.M., Franken, J., and Bino, R.J., 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Science 74: 115-126.
- Van Tuyl, J.M., Meijer, H., and Van Diën, M.P., 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in in-vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. Acta Hort. 325:625-630.
- Van Tuyl, J.M., Chi, H.S., Van Kronenburg, B.C.E., and Meijer, B., 1997. Interspecific lily hybrids: a promise for the future. Acta Hort. 430: 539-544
- Van Tuyl, J.M., and Boon, E., 1997. Variation in DNA-content in the genus *Lilium*. Acta Hort. 430: 829-835.
- Van Tuyl, J.M., A. Van Dijken, A., Chi, H.S., Lim, K.B., Villemoes S., and Van Kronenburg, B.C.E., 2000. Breakthroughs in interspecific hybridization of lily. Acta Hort. 508: 83-88.

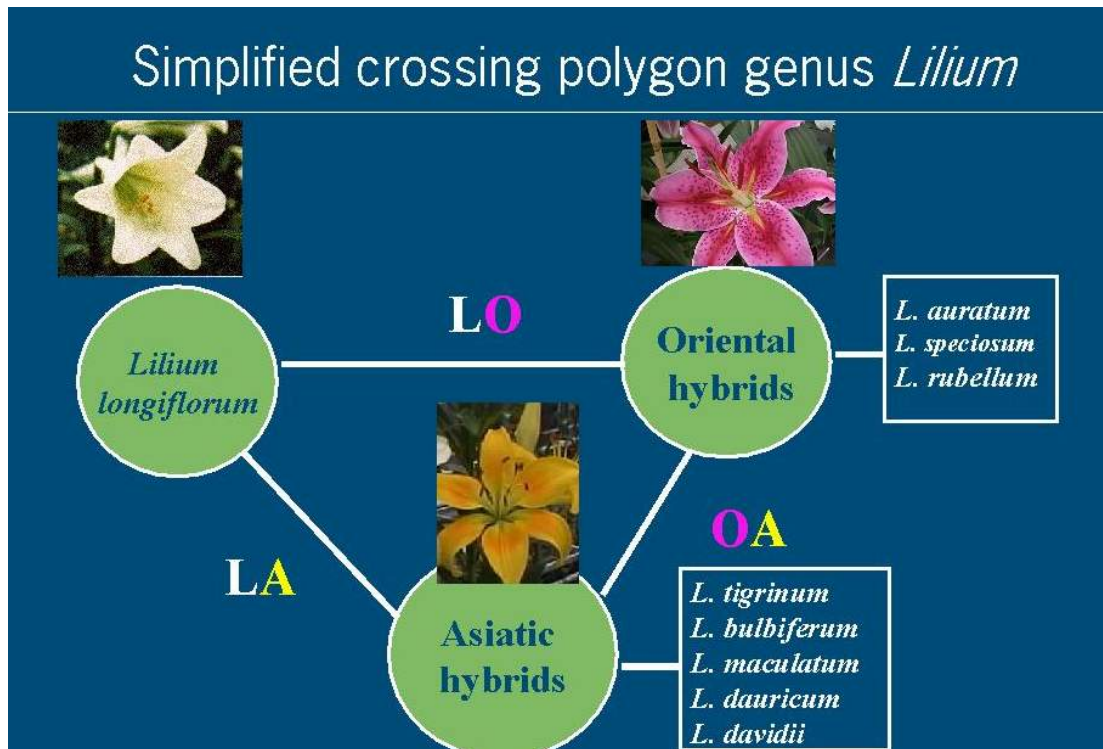


Fig. 1. A simplified crossing polygon of the most important lily hybrid groups (L=*L. longiflorum*, A=Asiatic, O=Oriental) in the genus *Lilium*, resulting in wide interspecific hybrids (LA, LO and OA-hybrids).

Fig. 2. Genomic in situ hybridization of mitotic chromosomes of the F₁, BC₁ and BC₂ plants of the **LR**- and the **LA**-hybrids. (a) The meiotic chromosomes of BC₁ (**LLR**) with 12 bivalents (yellow fluorescence) indicating *L. longiflorum* and 12 univalents (red fluorescence) representing *L. rubellum*. (b) 36 Chromosomes of the BC₁ plant 961003-27 without any recombinations. *L. longiflorum* (yellow fluorescence) and *L. rubellum* (red fluorescence). (c) Aneuploid BC₂ plant 982211-27 from backcrossing of the BC₁ (**LLR**) to 4x *L. longiflorum* (**LLL**R). Thirty six (three sets) of *L. longiflorum* (yellow fluorescence) with 8 *L. rubellum* chromosomes (red fluorescence). (d) The meiotic chromosomes of LA 88542-52 in metaphase I with 2 bivalents indicating chromosome association of *L. longiflorum* (yellow) and Asiatic (red) (e) 36 Chromosomes of the **ALA** plant 921238-1 with three recombinations. *L. longiflorum* (yellow fluorescence) and *L. rubellum* (blue fluorescence). (c) Aneuploid BC₂ plant 997139-2 (2n=30) from backcrossing of the BC₁ (**ALA**)-hybrids to diploid Asiatic. 5 chromosomes of *L. longiflorum* (green fluorescence) and 25 Asiatic chromosomes including 2 recombinant chromosomes.

Persbericht / nr. 2000-18, 24 november 2000

Plant Research International vindt nieuw genetisch mechanisme

Eigenschappen van wilde soorten kunnen in de toekomst waarschijnlijk sneller bij cultuurgewassen worden ingekruist. Dat blijkt uit het proefschrift waarop

Ki-Byung Lim, Koreaanse medewerker van Plant Research International, 27 november hoopt te promoveren aan de Wageningen Universiteit. Lim ontdekte dat nakomelingen van kruisingen tussen twee lelietypen speciaal stuifmeel maken met tweemaal zo veel chromosomen als normaal. De planten kunnen met dit speciale stuifmeel combinaties van eigenschappen van de ouders aan hun nageslacht doorgeven. In dit stuifmeel blijken de eigenschappen van de twee oudertypes namelijk *gerecombineerd* te worden via een tot nu toe onbekend mechanisme.

Lim ontdekte het nieuwe mechanisme met behulp van een speciale techniek voor de kleuring van chromosomen. Bij dit mechanisme treedt in nakomelingen van de kruising tussen twee plantensoorten, recombinatie van eigenschappen van de ouders op. Lim onderzocht een leliehybride, die ontstaan is uit een kruising van twee lelietypen (*Lilium longiflorum* en een Aziatische hybride). Die lelie bleek levensvatbaar stuifmeel te produceren met het dubbele aantal chromosomen van normaal stuifmeel. De verdeling van de chromosomen bij de celdelingen die betrokken zijn bij de productie van dit stuifmeel, gebeurde op een manier die nog niet eerder was aangetoond.

Bij één van de celdelingen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van dit stuifmeel – de meiose- ontstaan chromosomen die combinaties zijn van stukken chromosoom van de twee lelietypen. Dat gebeurt door natuurlijke recombinatie. Daarnaast worden de verschillende chromosomen van de beide oorspronkelijke ouders (*Lilium longiflorum* en een Aziatische hybride) niet, zoals dat normaal gebeurt, gelijkelijk, maar ongelijk over de nieuwe cellen verdeeld. Dat gebeurt doordat er soms een chromosoom van de ene ouder geëlimineerd wordt, en gecompenseerd wordt door een chromosoom van de andere ouder.

Lim deed deze ontdekking dankzij een speciale chromosoomkleuring. Bij deze kleuring krijgen de chromosomen van de twee ouders ieder een eigen kleur. Zodoende is onder de microscoop te zien van welke ouder de chromosomen afkomstig zijn, en of er stukken tussen de chromosomen zijn uitgewisseld.

De vinding van Lim kan belangrijke consequenties hebben voor het gebruik van eigenschappen van wilde planten bij de ontwikkeling van nieuwe rassen van cultuurgewassen.

Nakomelingen van kruisingen tussen wilde soorten en cultuurgewassen zijn vaak grotendeels of geheel steriel. Daardoor kunnen ze niet gebruikt worden voor verdere veredeling. De nakomelingen van dit type kruisingen worden daarom zó behandeld dat planten ontstaan die in alle cellen het dubbele aantal chromosomen heeft. Deze zogenaamde polyploïde planten maken wel goed stuifmeel. Uit eerder onderzoek was al gebleken dat in dit geval géén DNA-uitwisseling plaatsvindt tussen de chromosomen van de ouders.

Een van de consequenties daarvan is dat alle eigenschappen het gemiddelde zullen zijn van de twee ouders. Als er wél DNA-uitwisseling plaats zou vinden, zouden er tussen de nakomelingen planten zitten die sommige eigenschappen van de ene ouder, en sommige eigenschappen van de andere ouder hebben. Dat zou voor een veredelaar veel beter zijn omdat hij rassen wil ontwikkelen met eigenschappen uit de wilde soort, zoals resistentie tegen ziekten en plagen, en eigenschappen van de cultuursoort, zoals opbrengst en kwaliteit.

Lim heeft nu aangetoond dat de uitwisseling van DNA wel degelijk plaats vindt, en juist in de 'gewone', niet genetisch verdubbelde, nakomelingen van de kruising tussen twee soorten. Sommige van deze planten maken namelijk bruikbaar stuifmeel met het dubbele aantal chromosomen. Hier zorgt de plant zelf voor de chromosoomverdubbeling, door een afwijkende celdeling te laten plaatsvinden in het proces waarbij stuifmeel ontstaat.

Veredelaars kunnen met dit bijzondere stuifmeel kruisingen maken waarvan het nageslacht betere combinaties van eigenschappen bezit. Zij kunnen dan effectiever de goede nakomelingen en uiteindelijke rassen selecteren.

Voor meer informatie: Erik Toussaint, tel. (0317) 47 70 17, privé (0317) 41 68 84,
mobiel 06 51 56 59 49.

Opvraagbare illustraties:

- lelie (wit met bruine stippen) waarbij het stuifmeel is gevonden met het nieuwe genetische mechanisme
- microscoopfoto met daarop rode en oranje chromosomen, ieder van één lelietype

Halfjaarlijks verslag



juni 2001

Halfjaarlijks verslag, periode 1/06/01-1/12/01

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer Plant Research International 6600012

3. Algemeen

Personele inzet

K.B. Lim
M.Y. Chung
J. Matijssen
J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

P.C. Schenk (voorzitter)
S. Bottema
K. de Buck
A. van der Velde
A. Vletter
D. van Kleinwee
P.J. Kos
K. Laan
A. Peterse
C. Randag
W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgpriject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

In januari is de Koreaanse studente Mi-Young Chung het team komen versterken. De kijkmiddagen werden zeer goed bezocht, gemiddeld 10-15 personen.

Een nieuwe ontwikkeling is de website van het lelie-project, waar de nieuwste hybriden direct te zien zijn. Nog niet iedereen heeft zijn weg daarheen gevonden.

Een overzicht van cafeïne-experimenten van dit jaar en vorig jaar zijn door Lim in het engels gerapporteerd (5.3).

5.2 Opplanting 2001, fertiliteit en kruisingen 2001

Naar tevredenheid van iedereen is dit jaar opnieuw een planlijst samengesteld die tijdens de kijkmiddagen gebruikt kon worden om het opgeplante materiaal te beoordelen. Een bijgewerkte lijst is in dit verslag opgenomen. De pollenkiemingspercentages van de belangrijkste hybriden (bijgewerkt tot 8 juni) zijn ook in deze lijst opgenomen. Er zijn inmiddels een achttal tetraploide OA's met een goede fertiliteit gevonden. Dit zijn op dit moment:

Diploid	Ouders	Tetra
942817-1	Expression x Con King	950220 e.a.
951301-5	Expression x Con King	970104 e.a.
953508-1	Expression x Lady Rosa	991112 e.a.
951462-1	Romero Star x Con. King	981023 e.a.
951584-1	Acapulco x Sancerre	991013
951407-9	Pesaro x Con. King	981004 e.a.
951479-2	Expression x Con King	981011 e.a.
952088-2	Expression x Au Revoir	981056 e.a.

Dit materiaal is gebruikt in kruisingen met diploide Aziaten en Orientals. We hebben het idee dat embryo-rescue in een vroeg stadium moet gebeuren.

Diverse LO x LO en LO x LR zaailingen hebben gebloeid en vertonen een zeer goede fertiliteit. Enkele bijzondere hybriden waren dit jaar de Longiflorum x Canadense en de Longiflorum x lankongense die op tetraploid niveau beide fertiliteit vertoonden.

5.3 Overcoming F₁ sterility by Caffeine treatment in OA's (exp. 2000)

Material and methods

F1 interspecific hybrids between Oriental and Asiatic hybrid (OA hybrid=951301-5, 2n=2x=24) were used for overcoming F1 sterility by Caffeine treatment. Bulbs of F1 hybrids were planted in the greenhouse and grown as standard condition for lily growth and development. When the plants showed flower buds, the cap of the flower buds were cut and treated with caffeine solution. Caffeine solution was injected with different flower bud stages and concentrations to define the best stage and concentration. The range of flower buds size were used from 15 to 48 mm in length with 0.3% of Caffeine. 0.1, 0.3 and 0.7 % of Caffeine (1,3,7-Trimethylxanthine; Sigma, Cat No. C0750) were injected to the different range of flower bud stages. After injection, plants were kept in the same growing condition. The fertile pollen was pollinated to both Oriental and Asiatic hybrids cultivars as male parent, and normal Oriental and Asiatic hybrids pollen were pollinated onto the stigma treated flowers reciprocally. About 45-50 days after pollination embryo were rescued and placed on the culture media.

Pollen fertility and stainability from every anther were checked by placing on the artificial germination medium and staining with Lacto-phenol fuchsin. Pollen was observed under the microscope and counted stainability, and large (2n-gamete) and small one (n-gamete).

Results

Table 1. Treatment of Caffeine onto the anther and ovary in Asiatic hybrid lily "Connecticut King" which crossed after treatment with pollen of Asiatic hybrid "Montreux" and ploidy level of F₁ hybrid.

Concs (%)	Flower bud (cm)	Percentage of flower bud survived		Pollen germination (%)	No. of plants derived	Ploidy level	
		7 DAP	35 DAP			2x	3x
0.3	1.0 – 1.5	77.1	34.3	0.0	0.0	-	-
	1.6 – 2.0	91.7	50.0	1.5	28	25	3
0.6	1.0 – 1.5	68.8	0.0	-	0.0	-	-
	1.6 – 2.0	80.6	0.0	-	0.0	-	-
0.9	1.0 – 1.5	59.6	0.0	-	0.0	-	-
	1.6 – 2.0	87.5	0.0	-	0.0	-	-

This is preliminary results of 1999

Table 2. Number of plants derived from backcrossing (002684-) between OA hybrid after Caffeine treatment and Asiatic hybrid 'Lanzarote'.

Caffeine treatment (%)	Flower bud length (mm)	No. of flower buds treated	Fertilization and embryo rescue		
			Successful ovaries (%)	No. of embryo formed	No. of hybrid plants obtained
Control	-	24	13 (54)	2	2
0.1 %	16 - 18	5	4 (80)	1	0
	19 - 21	5	1 (20)	1	0
	22 - 24	4	2 (50)	0	0
	25 - 40	4	3 (75)	0	0
0.3 %	16 - 18	9	4 (44)	1	0
	19 - 21	4	2 (50)	2	2
	22 - 24	5	4 (80)	2	1
	25 - 40	4	2 (50)	2	2
0.5 %	16 - 18	2	1 (50)	0	0
	19 - 21	3	3 (100)	0	0
	22 - 24	7	4 (57)	1	1
	25 - 40	5	3 (60)	0	0

Table 3. Pollen germination classified by pollen size after Caffeine treatment (5-5 flower).

Genome	Large	Small	Total	Average
951301-5	284/557	3/84	287/641	44.8 %

Table 4. Pollen stainability stained by Lactophenol-Fuchsin of OA hybrid '951301-5'.

Treatment	Stained	Unstained	Total	Viability (%)
Control	8	808	816	1.0
5-5 flower	276	81	357	77.3

Table 5. Number of plants derived from egg cells of OA hybrid after treatment with 0.3% Caffeine and fertilized with hybrids belonging to different sections.

Crosses	Treated flower bud length (mm)	No. of treated buds	Fertilization and number of progeny after pollination with Asiatic hybrid			
			Successful ovaries	Embryo	Endosperm	No of plant derived
002685 (OA A cross)	Control	15	7 (47)	0	9	0
	16 - 19	14	7 (50)	1	11	1
	20 - 23	38	17 (45)	11	36	4
	24 - 27	7	2 (29)	2	3	0
	30 - 33	13	3 (23)	0	3	0
	34 - 37	12	4 (33)	4	17	4
	38 - 41	11	5 (45)	2	6	1
002682 (OA O cross)	Control	8	0	0	0	0
	16 - 19	17	0	0	0	0
	20 - 23	20	0	0	0	0
	24 - 27	8	0	0	0	0
	30 - 33	11	0	0	0	0
	34 - 37	9	0	0	0	0
	38 - 41	24	0	0	0	0

Table 6. Crossing compatibility between Asiatic and Oriental hybrids with Caffeine treated OA hybrid

Type of crosses	No of flowers used	No of successful flowers	No of embryos formed	No of plant regenerated
002687= A OA = 001099 × 951301-5	24	19	279	256
002686= A OA = 001100 × 951301-5	14	11	25	24
002684, -5= OA A = 951301-5 × 001099	154	61	30	16
002688= O OA = 001102 × 951301-5	20	0	0	0
002683= OA O = 951301-5 × 001102	88	0	0	0

Table 7. The genome analysis of backcross progenies derived from caffeine treated OA hybrid, which used both as female and male parent.

Crosses	Access no.	DNA content and ploidy level	Chromosome number	From female		From male	
				O (O/A) ^z	A (A/O) ^z	O (O/A) ^z	A (A/O) ^z
OA × A	002684-1	3x	36	12	12	-	12
A × OA	002687-2	3x	36	-	12	12	12
	002687-9	3x	36	-	12	12	12
	002687-10	3x	36	-	12	12	12
	002687-17	3x	36	-	12	12	12
	002687-18	3x	36	-	12	12	12
	002687-20	3x	36	-	12	12	12

002687-23	3x	36	-	12	12	12
002687-27	3x	36	-	12	12	12
002687-35	3x	36	-	12	12	12
002687-38	3x	36	-	12	12	12
002687-44	3x	36		12	12	12

^Z O and A represent Oriental and Asiatic chromosomes. (O/A) and (A/O) indicate Oriental chromosome recombinant with Asiatic chromosome segment(s) and Asiatic chromosome recombinant with Oriental chromosome segment(s).

5.4. Induction of 2n-gametes by treatment of temperature fluctuation and chemicals (exp. 2001).

Experiment title	Month 2001											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Induction of 2n-gametes by treatment of temperature fluctuation and chemicals												

Introduction

Material and methods

PRI number	No of bulbs available	Group
951305-1	285	C
951462-1	12	B
951934-1	45	C
951914-1	60	C
952530-1	160	C
952521-1	30	B
953508-1	15	A
952059-1	16	A
952400-1	14	A
951502-1	14	A

Experimental scheme

<Experiment 1> Treatment of Temperature fluctuation and Caffeine treatment

- Material: Group C
- Planting: 26 January (WK 4)
- Treatment: Temperature range 13C → 28C → 13C→28C, 16D/8N
- Start temperature treatment : From WK 12 till WK 17

- Temperature treatment time: 5 weeks

Photoperiod	DAY		NIGHT	
Time duration	8 hrs	8 hrs	4 hrs	4 hrs
Temperature	13 C	28 C	13 C	28 C

- Table. List of materials and description of the temperature fluctuation treatment.

PRI number	Total number of bulbs for treatment	Control	Temperature only		Temp + Caffeine (FB)	
			PMC (Early treat.)	EMC (Late treat.)	PMC (15-25mm)	EMC (40-70mm)
951914-1	33 (11 pots)	3 (1 pot)	6 (3 pots)	6 (3 pots)	9 (2 pots)	9 (2 pots)
952530-1	33 (11 pots)	3 (1 pot)	6 (3 pots)	6 (3 pots)	9 (2 pots)	9 (2 pots)
951301 5	33 (11 pots)	3 (1 pot)	6 (3 pots)	6 (3 pots)	9 (2 pots)	9 (2 pots)
951934-1	33 (11 pots)	3 (1 pot)	6 (3 pots)	6 (3 pots)	9 (2 pots)	9 (2 pots)

- Treatment for PMC : 23 March 2001 (Wk 12) → until microsporogenesis finished.
- Treatment for EMC : 20 April 2001 (Wk 16) → until megasporogenesis finished.

Crossing scheme

<Experiment 2> Treatment of Caffeine and Oryzalin

- Material: Group A, B and C
- Planting: in pot, WK22 (late May)
- Treatment: injection 0.3 % Caffeine, 0.001 % Oryzalin or combination

*** Plant the rest of all material of OA-hybrids in pots for this experiment.

Results

Table 1. The results of Caffeine and temperature on artificial meiotic polyploidization.

Genotype	Flower No.	Treatment	Number of pollen counted	No of pollen germinated	% of germination
951503-1	214	T+C	-	-	<60%
951914-1	557	T+C	265	8	3.01
951914-1	558	T+C	304	14	4.60
951914-1	569	T	126	32	25.39
?	620	?	317	27	12.35
951914-1	655	T	317	27	8.51
951914-1	864	T	314	9	2.87
951914-1	865	T	346	12	3.47
951914-1	874	T+C	262	12	4.58
951914-1	875	T+C	299	16	5.35

951914-1	901	T	358	10	2.79
951914-1	903	T	331	7	2.11
951914-1	927	?	320	7	2.19
951914-1	942	T	379	8	2.11
951934-1	684	T	227	5	2.20
951934-1	731	T	436	9	2.06
951934-1	742	T	258	35	13.56
951934-1	754	T+C	538	41	7.62

5.5 Website

Om resultaten snel beschikbaar te hebben voor de bedrijven is een website opgezet met daarop foto's van de diverse nieuwe hybriden uit de diverse hybride-groepen, informatie over de kijkmiddagen, het GISH-onderzoek en diverse links. Het adres is:

<http://users.raketnet.nl/vantuyl/lelieproject/>

Er is een toegangsnaam/paswoord toegevoegd (lelie-research / lilium).

Tijdens de halfjaarlijkse bijeenkomst zal het een en ander nog eens toegelicht worden.

5.6 Uitgifte materiaal

Naar aanleiding van de uitgifte van materiaal van het soortkruisingsproject, zoals dat vorig jaar is verlopen, wordt voorgesteld om dat dit jaar op een gelijksoortige wijze te laten verlopen, waarbij voorgesteld wordt om onderscheid te maken in een deel gezamenlijke te kiezen nummers (bv 8) en een ander deel specifiek per bedrijf te kiezen nummers (bv 4). De bijgewerkte overzichtslijst van dit jaar is bijgevoegd.

6. Publicaties en lezingen

Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl.

Comparison of homologous recombination frequency between mitotic and meiotic polyploidization in BC1 progeny of interspecific lily hybrids. Proc Eucarpia Melle July 2001.

7. Plannen tweede helft 2001

- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit, maken van kruisingen en toepassing van embryo-rescue methoden.
- Inductie van $2n$ -gameten in steriele OA-hybriden d.m.v. injectie in knoppen (juni opplanting)
- Selectie en opkweek van tetraploïde OA's
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 2001 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie (o.a. i.v.m. mogelijke recombinatie de via injectie met cafeïne verkregen hybriden).

Plantlijst 2001

Planten kas6							27/02/01
Type	Monster nr.	Naam	Moeder	Vader	BI	pl	pollenk.
OA	951502 1		940023	950012	v	9	NG
OA	951584 1		950065	940003	v	8	NG
OA	952059 9		940311	950012	v	9	
OA	952400 1		940319	940043	v	8	
OA	952521 1		940022	950013	v	9	
OA	962433 1		950250	940313	v	5	
OA	962141 2		960033	960026	o	6	
OA	962243 1		950250	960019	v	3	
OA	962328 1		950252	960019	v	2	NG
OA	962328 2		950252	960019	v	1	
	962386 1		960014	960027	v	1	
OA	962380 1		950252	960027	v	6	
OA	962424 1		960017	960019	x	1	
OA	962432 1		960011	960009	x	2	
OA	962438 1		960014	960029	v	3	
OA	962438 3		960014	960029	v	2	
OA	962445 4		950250	960029	v	1	
OA	962445 5		950250	960029	v	2	
OA	962448 1		950250	960027	x	2	
OA	962449 1		950250	960019	x	5	
OA	967242 2		960015	960009	v	2	
OA	967243 1		940320	960019	v	6	
OA	969013 3		Cassa Blanca	Mont Blanc	v	3	NG
OA	969013 6		Cassa Blanca	Mont Blanc	v	2	
OA	969013 8		Cassa Blanca	Mont Blanc	v	3	
OA	969013 10		Cassa Blanca	Mont Blanc	v	3	
OA	969013 12		Cassa Blanca	Mont Blanc	v	4	NG
OA	969013 19		Cassa Blanca	Mont Blanc	v	3	NG
OA	969023 1		Gelria	Conn. King	v	6	NG
OA	969023 2		Cassa Blanca	Conn. King	v	6	NG
OAOA	950151		942811 1		v	1	
OAOA	950153		942817 1		v	4	
OAOA	950216		942180 1		x	2	
OAOA	950218		942811 1		x	3	
OAOA	950219		942811 1		v	6	
OAOA	950220		942817 1		v	5	0-20
OAOA	950221		942817 1		v	5	
OAOA	950222		942817 1		v	4	NG
OAOA	950223		942817 1		v	5	NG
OAOA	950224		942817 1		v	5	0-80

OAOA	950225		942817 1		v	5	NG
OAOA	950237		942817 1		v	6	50
OAOA	960052		942713 4		v	2	
OAOA	950239		942180 1		x	1	
OAOA	950241		942180 1		v	5	NG
OAOA	950245		942818 1		v	5	NG
OAOA	950247		942713 4		v	5	
OAOA	950248		942713 4		v	5	
OAOA	960051		942713 4		v	5	
OAOA	960053		942713 4		v	5	
OAOA	960054		942713 4		v	5	
OAOA	960066		942180 1		v	6	NG
OAOA	960081		942818 1		x	2	
OAOA	970104		951301 5		v	1	80
OAOA	970104		951301 5		v	2	
OAOA	970101		942726 1		v	3	
OAOA	970105		951301 5		v	2	80
OAOA	970105		951301 5		v	3	
OAOA	970106		951592 3		x	1	
OAOA	970109		952530 1		v	10	
OAOA	970110		952530 1		v	3	
OAOA	970111		952530 1		v	3	
OAOA	970112		951934 1		v	1	
OAOA	970113		942726 1?			1	
OAOA	970113		942726 1			1	
OAOA	970114		942726 1			1	NG
OAOA	970115		951462 1		v	1	
LCAN	970120		921072 1		v	5	10-60%
LCAN	970121		921072 1		v	4	NG
OAOA	970123		951301 5		v	2	80
LCAN	970130		921072-1		v	1	10
OAOA	970128		951914 1		v	5	NG
OAOA	970129		951934 1		x	2	
OAOA	970131		942726 1		x	4	NG
OAOA	970132		942726 1		v	2	
LCAN	970133		921072 1		v	8	NG
OAOA	970135		951914 1		x	1	
OAOA	970136		951934 1		c	1	
OAOA	970139		962773 1		c	3	
OAOA	981003		951407 9		c	1	
OAOA	981004		951407 9		c	1	50-70
OAOA	981004		951407 9		c	6	
OAOA	981007		951407-9		c	2	3-5
OAOA	981010		951479 2		c	3	50-70
OAOA	981011		951479 2		c	6	5-80
OAOA	981013		951584 1		c	6	5-80
OAOA	981014		952059 9		x	1	
OAOA	981022		951462 1		x	2	

OAOA	981020		951462 1		v	2	
OAOA	981021		951462 1		v	6	50-80
OAOA	981023		951462 1		v	3	80
OAOA	981024		951462 1		v	3	5
OAOA	981025		953521 1		v	6	
OAOA	981026		953521 1		v	6	
OAOA	981030		951914 1		v	1	NG
OAOA	981030		951914 1		v	1	
OAOA	981027		953521 1		v	3	NG
OAOA	981028		953521 1		v	3	
OAOA	981028		953521 1		v	3	
OAOA	981029		951301 5		v	3	80
OAOA	981029?		951301 5		v	1	
OAOA	981044		951518 6		x	2	
OAOA	981047		951584 1		x	4	
OAOA	981055		952088 2		v	2	
OAOA	981056		952088 2		v	8	80
OAOA	981059		952088 2		v	1	80
OAOA	981064		952462 1		x	1	
OAOA	981065		952462 1		x	1	
OAOA	981071		952533-6			2	
OAOA	981073		942615 2		x	1	
OAOA	981074		Casa Blanca		v	6	
OAOA	981075		Casa Blanca			1	
OAOA	981078		Casa Blanca			2	
OAOA	981081		942615-2			1	
OAOA	981087		951518 6		1	1	NG
OAOA	981089		951518 6			1	
OAOA	981090		951518 6		2	1	5
OAOA	981091		951802 3		3	5	
OAOA	981104		942584 2		v	3	NG
OAOA	981095		951802 3		x	6	
OAOA	942709 1		Long x lankongense		v	2	NG
OAOA	942709 1		Long x lankongense		v	3	
OAOA	981106		951914 1		v	3	NG
OAOA	981106		951914 1		v	1	
OAOA	981108		951588 3		1	1	
OAOA	981108		951588 3		x	2	
OAOA	981111		952533 4		x	1	
OAOA	981111		952533 4		x	3	
OAOA	981112		952533 4		x	3	
OAOA	981112		952533 4			1	
OAOA	981113		952377 1		v	2	
OAOA	981116		951464 1			1	
OAOA	981128		952492 2		v	2	NG
OAOA	981128		952492 2		v	4	
OAOA	981129		951518 4		x	1	
OAOA	991102		951301 5		v	5	60

OAOA	991103		951301 5		v	5	80
OAOA	991105		951301 5		v	6	80
OAOA	991106		951914 1		v	5	NG
OAOA	991107		951914 1		v	5	NG
OAOA	991108		951914 1		v	5	NG
OAOA	991110		953508 1		v	6	8-50
OAOA	991112		953508 1		v	3	10-50
OAOA	991109		942172 1		v	5	
LOLO	950040		921250 4		v	2	
LOLO	950213		941030 1		x	2	
LOLO	950214		941030 1		v	2	NG
LOLO	950228		942077 1		v	2	
LOLO	950226		941030 1		v	5	NG
LOLO	950227		942077 1		v	5	50
LOLO	950230		942077 1		v	5	
LOLO	950232		942165 1			8	
LOLO	960060		942165 1		x	5	
LOLO	960060		942165 1		x	1	
LOLO	960061		942165 1		x	8	
LOLO	960063		942165 1		x	6	
LOLO	960064		942165 1			6	
LOLO	960068		942077 2		v	6	20-60
LOLO	960069		942077 2		v	4	
LOLO	960070		942077 2		v	6	10-70
LOLO	960071		942077 1		v	3	
LOLO	960076		942077 1		v	2	80
LOLO	960076		942077 1		v	3	80
LOLO	960077		942077 1		v	4	20
LOLO	960078		942077 1		v	5	
LO	961537 1		901226	87264	v	5	
LR-LR	982291 1		940117	940303	x	1	
LR-LO	982567 1		950118	960076	x	2	80
LR-LO	982567 2		950118	960076	2	1	
LR-LO	982567 4		950118	960076	1	2	
LR-LO	982567 6		950118	960076	2	1	
LR-LO	982567 9		950118	960076	2	2	80
LO-LO	982615 1		940268	960069	3	6	
LO-LO	982615 2		940268	960069		2	
LO-LO	982696 1		960078	950232	2	3	80
LO-LO	982696 6		960078	950232	3	3	80
LO-LO	982696 7		960078	950232	2	3	80
LLR	961004 6		950009	950039		5	3
LLRXLL	972002 3		960028	940303		4	
LLR	972006 3		960034	940303		2	
LLR	972006 6		960034	940303		2	
LLR	972007 1		960034	940303	2	3	NG
LLLO	972054 2		90239	950211	2	2	NG
LLLO	972108 1		85842 1	950210	x	8	

LLLO	972108 2		85842 1	950210	x	1	
LLLO	972109 1		90239	950210	x	5	
LLLO	972114 2		85842 1	950210	x	3	
LLLO	972418 1		901226	960068	v	5	NG
LLO	972488 1		771017	960068	v	5	<1
LLO	972488 2		771017	960068	v	4	NG
LLO	972488 4		771017	960068	v	3	
LLO	972488 5		771017	960068	v	3	
LLLO	972552 1		90239	960070	v	4	NG
LLLO	972557 1		901226	960069	v	1	NG
LLLO	972561 1		85842 1	960069	v	5	
LLLO	972561 12		85842 1	960069	v	6	5
LLLO	972561 3		85842 1	960069	v	3	<1
LLLO	972561 4		85842 1	960069	v	5	NG
LLLO	972561 9		85842 1	960069	v	6	
OLO	972729 1		960167	950232		3	
OLO	972729 2		960167	950232		1	
OLO	972729 4		960167	950232		8	NG
OLO	972730 1		970006	950232		5	NG
OLO	972730 1		970006	950232		6	
OLO	972730 3		970006	950232		6	
OLO	972730 4		970006	950232		8	NG
LLRXLL	982211 12		961004	901015 67		1	
LLRXLL	982211 25		961004	901015 67		3	
LLRXLL	982211 26		961004	901015 67	1	1	NG
LLRXLL	982211 27		961004	901015 67	3	2	NG
LLRXLL	982211 41		961004	901015 67		3	
LLRXLL	982211 42		961004	901015 67		1	
LLRXLL	982211 7		961004	901015 67	1	2	NG
LLRXLL	982214 1		970002	940303		3	
LL-LR	982258 1		85842 1	940303	1	1	NG
LL-LR	982258 2		85842 1	940303		1	<1
LLRXLL	982275 11		961003 23	901015 69		4	
LLRXLL	982275 7		961003 23	901015 69		2	
LLRXLL	982275 2		961003 23	901015 69	2	1	NG
LLO	982566 2		771017	960068	v	3	25-60
OA	962134 3		960005	960026		2	NG
LRLR	940039					4	
O000	940057					2	
O000	940057					2	
LRLR	940116		921250 3			2	
LRLR	940117					5	20
O000	940266		940061			5	
O000	940282		940027			1	
O000	940288		940029			2	
O000	940290		940044			4	
LRLR	940303		921250 4			6	30
LRLR	940303		921250 4			pot 2	

OL	942165 3		940061	Gelria		3	
O000	950067					4	
O000	950067					pot 1	
LMLM?	950109		891470			12	
	950113		891470			1	
LRLR	950118		921250 1			3	
LRLR	950118					pot 1	
O000	950159					3	
LOLO	950214					pot 2	
O000	950250					5	
LOLO	960078		942077 1			5	70
OLR	962541 1		960024	940117		5	
OLR	962541 2		960024	940117		6	
OP	962756 1		960003	89172		2	
OP	962757 2		960017	89172		4	
OP	962763 1		940319	89172		1	
OP	962771 1		950252	89172		1	
OP?	962772 2		950250	89172		2	
TTOO	980092	Evans				3	
AALA	972154		85989	951070 1		6	80
LLLO	972418 1		901226	960068		3	NG
LLLO	972552 2		90239	960070		6	
TTOO	980093	Evans				5	0-80
TTOO	980094	Evans				6	
L-LR	982233 1		970002	940303		1	NG
OO-OA	983121 1		940282	951584 1	x	1	
OO-OA	983121 2		940282	951584 1	x	8	
LDLD	940130		89314 11			5	
LDLD	940132		89305 4			2	80
OLA	942646 1		940041	88542 69		3	NG
LDLD	940134		89315 12			8	
LDLD	940299		89315 11			6	80
OLA	942645 1		940044	88542 69		5	
OLA	942653 1		940061	88542 69		3	
LDLD	950181		89315 6			5	
LLAA	952016 1		901015 32	85989		5	NG
LLAA	952016 2		901015 32	85989		5	80
LLAA	952016 3		901015 32	85989		5	
LLAA	952016 4		901015 32	85989		5	
LALA	961030 2		960021	942036		5	4
LALA	961030 3		960021	942036		4	0-3
AALD	972075		950322	950181		5	15
LLLA	972148 1		85842 1	942036 1		4	
LLLA	972149 1		90239	942036 1		5	NG
LALA	972157		940322	951070 1		5	30-80
LLLD	972166 1		85842 1	950181		1	
LALA	972243		951070 1	952016 1		5	50
LLLA	972285 1		90239	952016 1		4	

LLLA	972285 2		90239	952016 1		5	
LLLA	972285 3		90239	952016 1		3	
LLLA	972285 4		90239	952016 1		6	
LA	88542 69		Gelria	Whilito			20
ALA	901122 1		78251 1	88542 24			bed3
ALA	921142 1		Con. King	88542 24			
OA	952400 1		940319	940043			
LA	962554 7		771017	960019			NG
OA	967241 1		960015	960019			
OA	967251 1		960016	960019			
OAOA	970127		951914 1		4		NG
OAOA	970134		951592 3				bed4
LLLO	972109 1		90239	950210			
LL-LLR	972645 2		88140	940117			
OAOA	981002		951407 9				
OAOA	981005		951407 9				
OAOA	981008		951447 2				
OAOA	981035		951447 2				
OAOO	981045		951518 6		1		
OAOA	981066		952462 1				
OAOA	981072		952533 6				
OAOO	981076		Casa Blanca				
OAOA	981079		952615 2		14		
LLRXLL	982211 1		961004	901015 67	1		
LLRXLL	982211 10		961004	901015 67	1		<1
LLRXLL	982211 15		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 17		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 19		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 21		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 23		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 25		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 29		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 31		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 33		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 34		961004	901015 67	3		
LLRXLL	982211 39		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 4		961004	901015 67			
LLRXLL	982211 9		961004	901015 67			
LL-LR	982230 2		901015 67	940303			
LL-LR	982249 1		85842 1	940303	2		
LL-LR	982258 2		85842 1	940303			<1
LLRXLL	982275 10		961003 23	901015 69			
LLRXLL	982275 2		961003 23	901015 69			NG
LLRXLL	982275 3		961003 23	901015 69			
LLRXLL	982275 4		961003 23	901015 69			
LLRXLL	982275 6		961003 23	901015 69	1		
LLRXLL	982275 8		961003 23	901015 69	5		NG
LL-LR	982288 1		90239	940117			

LL-LR	982288 4		90239	940117			
LL-LR	982288 5		90239	940117			
LL-LR	982288 6		90239	940117			
LR-LR	982303 2		940118	950040			
LDLD	982523 1		940207	961050 2			
LDLD	982523 3		940207	961050 2			
LDLD	982523 4		940207	961050 2			
OO-LO	982558 5		940282	960076			
OO-LO	982558 9		940282	960076			
O-LO	982562 2		970006	960076	2		
O-LO	982562 3		970006	960076	2		
O-LO	982587 1		970006	960078			
O-LO	982587 2		970006	960078			
OO-LO	982589 1		940290	960078	1		
OO-LO	982590 2		940282	960078			
O-OHAN	982598 18		950063 5	962161 1	2		pop
LO-LO	982614 2		950213	960069			
LO-LO	982615 3		940268	960069			
LO-LO	982674 1		950213	950232			
O-LO	982684 1		970006	950232			
O-LO	982684 4		970006	950232	1		
AA-LO	982687 1		980027	960070			
LO-LO	982696 12		960078	950232			80
OA-AA	983004 1		951590 2	85989			
OA-AA	983105 1		95220	85989			
OO-OA	983121 1		940282	951584 1	x		
OO-OA	983121 11		940282	951584 1	x		
OO-OA	983121 12		940282	951584 1	x		
OO-OA	983121 2		940282	951584 1	x		
OO-OA	983121 3		940282	951584 1	x		
OO-OA	983121 6		940282	951584 1	x		
OO-OA	983121 8		940282	951584 1	x		
OPOP	991113		962763 1				
OAOA	991116		952414 1		3		
OAOA	991117		952414 1				
OAOA	991120		967252 1				
LLANLLAN	991123		942709 1				
LLANLLAN	991127		942709 1				
LLANLLAN	991130		942709 1				
LLANLLAN	991138		942709 1				
LLANLLAN	991140		942709 1				
LLANLLAN	991142		942709 1				
LLANLLAN	991143		942709 1				
LLANLLAN	991144		942709 1				
LLANLLAN	991145		942709 1				
LLANLLAN	991146		942709 1		1		20-50
LLANLLAN	991147		942709 1				
LLANLLAN	991148		942709 1				

LLANLLAN	991149		942709 1				
LLANLLAN	991152		942709 1				
OPOP	991158		962763 1				
OPOP	991159		962763 1				
OAOA	991162		962449 2				
OAOA	991163		962449 2				
OAOA	991164		962449 2				
OAOA	991165		962449 2		2		
OAOA	991166		962449 2				
OAOA	991167		952527 2				
OAOA	991171		952414 1				
OLOL	991173		969019 1				
OLOL	991174		969019 1				
OAOA	991176		952377 1				
OHANOHAN	991180		962161 1				
OAOA	991182		952727 2				
OLOL	991184		962730 1				
OLOL	991185		962730 1		2		
OAOA	991187		952414 1				
OAOA	991188		952414 1		2		
OAOA	991189		952414 1				
OAOA	991190		952414 1				
OAOA	991191		952414 1		2		
LLAN	991192		942709 1				
LALA	991202		962532 3		3		
LALA	991205		962532 1				
LALA	991206		962532 1				
LALA	991207		962532 1				
LALA	991210		962532 1				
O000	991211		970056				
O000	991212		970056				
O000	991213		970056				
O000	991214		970056				
O000	991216		970056				
O000	991218		970056				
O000	991219		970056				
O000	991220		970056				
O000	991221		970056				
O000	991222		970056				
O000	991223		970056				
O000	991224		970056				
O000	991225		970056				
O000	991227		970056				
O000	991228		970056				
O000	991230		970056				
O000	991232		970056				
O000	991234		970056				
O000	991236		970056				

O000	991241		970056				
OAOA	991242		967241 1				
O000	991253		970056				
O000	991254		970056				
O000	991286		970056				
O000	991287		970056				
LOLO	991288		942165 3				
O000	991289		970056				
LOLO	991290		942165 3	2			30
LOLO	991291		942165 3	1			pot
LOLO	991292		942165 3				
LOLO	991293		942165 3	1			
LOLO	991294		942165 3				
LOLO	991297		LO97				
LOLO	991298		LO97	1			
LOLO	991299		LO97	2			
LOLO	991300		LO97				NG
LOLO	991302		LO97				30-50
LOLO	991303		LO97				NG
LOLO	991304		LO97				NG
LOLO	991305		LO97				
LOLO	991306		LO97				
LOLO	991307		LO97				
LOLO	991308		LO97	1			
LOLO	991310		LO97				
LOLO	991311		LO97				0-30
LOLO	991313		LO97	6			
LOLO	991314		LO97				
LOLO	991315		LO97				
LOLO	991316		LO97	6 V			
LOLO	991317		LO97	2 V			
LOLO	991318		LO97				
LOLO	991319		LO97				
LOLO	991320		LO97	3			
LALA	991321		LA97	10			
LALA	991322		LA97	4			
LOLO	991336		942165 3				
AAAA	991337		921425 1				
AAAA	991338		921425 1				
AAAA	991339		921425 2				
AAAA	991340		921425 2				
OAOA	991357		952400 1				
LALA	991373		962554 7				
LALA	991374		962554 7	4			40-80
OPOP	991413		962753 2				
OAOA	991414		967252 1				
OAOA	991415		967252 1				
OAOA	991416		967241 1				

LOLO	991417		962730 1				
OAOA	991418		967241 1				
OAOA	991420		967241 1				
OAOA	991421		967241 1				
OAOA	991423		967241 1				
LALA	991425		LA97 15				
LR LL	992007 5		940303	90239			
LR LL	992007 6		940303	90239			
LR LL	992007 7		940303	90239			
LR LL	992007 8		940303	90239			
LLLO-LR	992036 1		972552 2	940116			
LASD-LA	992076 10		972354	942036 2	5	blok1	3
LASD-LA	992076 11		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 11		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 13		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 15		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 16		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 2		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 3		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 4		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 6		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 7		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 8		972354	942036 2		blok1	
LASD-LA	992076 9		972354	942036 2		blok1	
LA-AA	992096 1		961030 2	85914		blok2	
LA-AA	992096 2		961030 2	85914		blok2	
LA-AA	992096 6		961030 2	85914		blok2	
LA-AA	992096 7		961030 2	85914		blok2	
LL	992143 1		966042	966041		niet	
LL	992143 2		966042	966041		niet	
LR-LO	992163 2		990116	950228			
O-LO	992188 1		980083	960069	2	blok3	
O-LO	992188 2		980083	960069		blok3	
O-LO	992188 3		980083	960069		blok3	
O-LO	992188 4		980083	960069		blok3	
O-LO	992188 5		980083	960069		blok3	
O-LO	992188 6		980083	960069		blok3	
O-LO	992195 4		991025	950070		blok4	NG
O-LO	992195 5		991025	950070		blok4	
O-LO	992195 6		991025	950070		blok4	
O-LO	992195 7		991025	950070		blok4	
O-LO	992195 8		991025	950070		blok4	
LL-LO	992250 4		901015 47	960076			
LL-LO	992252 11		901015 54	960076			
LL-LO	992254 1		901015 67	960076			
LL-LO	992287 3		921225 11	960076			
LL-LO	992287 4		921225 11	960076			
OO-LO	992294 2		940266	960078			

OO-LO	992294 4		940266	960078			
LL-LO	992298 2		960089	960078	1		
O-LO	992330 1		991020	960069	5		
O-LO	992330 2		991020	960069			
O-LO	992332 1		991020	960068			
O-LO	992333 1		991025	960068	4		60
O-LO	992333 2		991025	960068		blok6	
O-LO	992333 3		991025	960068		blok6	
O-LO	992333 4		991025	960068		blok6	
O-LO	992333 5		991025	960068		blok6	
O-LO	992333 6		991025	960068		blok6	
O-LO	992333 7		991025	960068		blok6	
O-LO	992333 8		991025	960068		blok6	
O-LO	992339 1		991020	950212		blok7	NG
O-LO	992339 10		991020	950212		blok7	
O-LO	992339 11		991020	950212		blok7	
O-LO	992339 12		991020	950212		blok7	
O-LO	992339 13		991020	950212		blok7	
O-LO	992339 6		991020	950212		blok7	
O-LO	992339 9		991020	950212		blok7	
OO-LO	992344 7		940266	960068			
OO-LO	992344 8		940266	960068			
OO-LO	992344 1/5		940266	960068			
O-LO	992417 10		991022	950061	9	blok8	
O-LO	992417 11		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 13		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 14		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 15		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 16		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 17		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 18		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 19		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 2		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 20		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 21		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 22		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 23		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 24		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 25		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 27		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 28		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 29		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 3		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 4		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 40		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 41		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 42		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 5		991022	950061		blok8	

O-LO	992417 8		991022	950061		blok8	
O-LO	992417 9		991022	950061		blok8	
O-OA	992670 1		991019	952400 1			
O-OA	992676 6		991023	951502 1			
O-OA	992677 1		991019	951502 1	1		

OUDERRASSEN 1994-2000				
940001	GELRIA		C=longi	di
940002	CONNECTICUT KING		A=aziaat	di
940003	MONTREUX		A	di
940004	PROMINENCE		A	di
940005	MONT BLANC		A	di
940006	SNOW QUEEN		C	di
940007	HARMONY		A	di
940008	STERLING STAR		A	di
940009	ORLITO		A	di
940010	BRIGHT BEAUTY		A	di
940011	STARGAZER		B=oriental	di
940012	ESTHER		A	di
940013	AVIGNON		A	tetra
940014	MONA 4N		A	tetra
940015	PRONTO		A	di
940016	BEATRIX		A	di
940017	MERIBEL		A	di
940018	BANITA		A	di
940019	JAMAICA		B	di
940022	ANGORA		B	di
940023	PESARO		B	di
940024	MIURO		B	di
940025	NOVE CENTO		A	tetra
940026	REGATA		B	di
940027	CHERRY BLOSSOM		B	di
940028	PRIMERO		B	di
940029	ACAPULCO		B	di
940040	EXPRESSION		B	di
940041	MEROSTAR		B	di
940042	ROYAL CLASS		B	tri
940043	GRAN SASSO		A	di
940044	OPUS ONE		B	di
940056	4N DAME BLANCHE		B	tetra
940058	MONA		B	di
940059	LORINA		B	di
940061	SAN MARCO		B	di
940062	MONT MARTRE		B	di
940063	PRATO		B	tetra
940064	ANAI ANAIS		B	di
940090	KYOTO		B	di
940091	DAME BLANCHE		B	di
940092	STARGAZER		B	di
940306	WHITE AMERICAN		C	di
940307	TIME OUT		B	di
940309	AU REVOIR		E	tri
940310	STARFIGHTER		B	di
940311	TOUCH		B	di

940312	ROMERO STAR	B			di
940313	Mirella	A			di
940314	VIRGINIA	C			di
940315	MOUNT EVEREST	C			di
940316	CASTELLO	A			tetra
940317	AVITA	A			di
940318	FIDELITY	A			tri
940319	MERO STAR	B			di
940320	EXPRESSION	B			di
940326	Lady Rosa	A			di
940327	Bright Beauty	A			di
940328	Belpasso	B			di
940329	Woodriff's Memory	B			di
950008	SARTRE	B			di
950009	SNOW QUEEN	C			di
950010	GELRIA	C			di
950011	STARGAZER	B			di
950012	CONNECTICUT KING	A			di
950013	MONT BLANC	A			di
950014	ORLITO	A			di
950015	ANTON GEESINK	B			di
950061	LOUVRE	B			di
950062	WOODRIF'S MEMORY	B			di
950063	MONTRACHET	B			di
950064	ACAPULCO	B			di
950065	CHERRY BLOSSOM	B			di
950066	PRIMERO	B			di
950067	ANGORA 4N	B			tetra
950068	ANGORA	B			di
950069	ACAPULCO	B			di
950070	ACAPULCO	B			di
950071	SPINOZA	B			di
950072	LOUVRE	B			di
950250	Sissi	B			di
950252	Starfighter	B			di
960001	TOMPOUCE	B			di
960002	GRAN SASSO	A			di
960003	KISSPROOF	B			di
960004	BELLISSIMO	B			di
960005	BELPASSO	B			di
960006	BERLIN	B			di
960007	SEMPRE AVANTI	B			di
960008	AVELINO	B			di
960009	CARTHAGO	B			di
960011	ACTRICE	B			di
960012	ANGELO	B			di
960013	AUBADE	B			di
960014	MEROSTAR	B			di

960015	TENERIFE		B			di
960016	WISDOM		B			di
960017	ARUBA		B			di
960018	DEVOTION		B			di
960019	LANZAROTE		A			di
960020	ROYAL STAR		E			tri
960021	Washington		B			tri
960022	WHITE ELEGANSE		C			di
960023	CASABLANCA		B			di
960024	ACAPULCO		B			di
960025	OLYMPIC STAR		B			di
960026	MONT BLANC		A			di
960027	MONTREUX		A			di
960028	SNOW QUEEN		C			di
960029	CONN KING		A			di
960031	MIRELLA		A			di
960032	BERNINI		B			di
960033	MIAMI		B			di
960034	GELRIA		C			di
970002	Snow Queen		C			di
970006	Acapulco		B			di
980027	Minstreel		A			di
980083	Acapulco		B			di
991013	Lyon		A			tetra
991016	White Fox		C			di
991020	Dame Blanche		B			di
991022	Sorbonne		B			di
991025	Le reve		B			di
991019	ACAPULCO		B			di
991031	Gelria		C			di
991032	SNOW QUEEN		C			di
991033	Con king		A			di
991034	Acapulco		B			di
991056	White Fox		C			di
001050	Pausini		C			di
001051	White American		C			di
001057	La Mancha		B			di
001063	All Round		LA			tri
001064	London		A			tri
001065	Gran Sasso		A			di
001066	Navonna		A			tri
001070	Aerobic		LA			tri
001071	Fangio		LA			tri
001072	Nomade		LA			tri
001076	White heaven		C			di
001078	Lorina		C			di
001099	Lanzarotte		A			di
001100	Con king		A			di

001101	Gelria		C			di
001104	Snow Queen		C			di

Lijst OA-Hybriden (laat opgeplant)

OA	951301 5		940319 Merostar	950012 CK		
OA	951914 1		940312 Rom Star	940326 Lady Rosa		
OA	951934 1		940320 Expression	940326		
OA	953508 1		940320	940326		
OA	942172 1		Angora	Conn. King		
OA	942587 1		Cherry Blossum	Conn. King		
OA	942615 2		Royal Class	Conn. King		
OA	942713 4		940022 Angora	920155		
OA	942726 1		Expression	Conn. King		
OA	942811 1		Angora	Conn. King		
OA	942817 1		Expression	Conn. King		
OA	942818 1		Expression	Conn. King		
OA	942818 2		Expression	Conn. King		
OA	951301 4		Mero Star	Conn. King		
OA	951347 1		Touch	Conn. King		
OA	951405 2		Conn. King	Montreux		
OA	951407 9		Belpasso	Conn. King		
OA	951428 1		Expression	Conn. King		
OA	951428 2		Expression	Conn. King		
OA	951437 1		Expression	Montreux		
OA	951447 3		940328 Belpasso	940043		
OA	951462 1		940312	950012		
OA	951464 1		940320	940003 Montreux		
OA	951468 1		950069 Angora	940003		
OA	951469 2		940328	950012 CK		
OA	951479 1		940320	950012		
OA	951479 2		940320	950012		
OA	951479 4		940320	950012		
OA	951492 1		940307 Time Out	950012		
OA	951497 3		950065 Cherry Bl	940043 Gran Sasso		
OA	951502 1		940023 Pesaro	950012		
OA	951502 3		940023	950012		
OA	951515 1		940320	950012		
OA	951518 4		940312	950012		
OA	951518 6		940312	950012		
OA	951584 1		950065	940003		
OA	951584 2		950065	940003		
OA	951584 3		950065	940003		
OA	951590 2		950008 Sartre	950013 MB		

OA	951598 1		940312	950013		
OA	951802 1		950069	950013		
OA	951802 3		950069	950013		
OA	951815 1		940320	950013		
OA	951833 1		940320	940327		
OA	951835 1		950069	950012		
OA	951835 3		950069	950012		
OA	951836 1		950069	940313		
OA	951839 4		940311 Touch	950013		
OA	951839 5		940311	950013		
OA	951847 2		940028	950013		
OA	951884 2		940307	950013		
OA	951901 1		940311	940326		
OA	951901 2		940311	940326		
OA	951934 4		940320	940326		
OA	951935 1		940320	950012		
OA	951935 2		940320	950012		
OA	952059 3		940311	950012		
OA	952059 9		940311	950012		
OA	952088 2		940320	940309 Au revoir		
OA	952377 1		940312	950012		
OA	952381 5		940319	950012		
OA	952383 3		940320	950012		
OA	952414 1		940307	940043		
OA	952400 1		940319	940043		
OA	952458 1		940320	940043		
OA	952462 1		940061 San Marco	Con King		
OA	952472 1		940328	940043		
OA	952473 1		940320	Montreux		
OA	952483 1		940320	950012		
OA	952492 2		940022	940043		
OA	952494 1		950065	950012		
OA	952496 1		940320	950012		
OA	952527 2		940022	940327		
OA	952530 1		940319	950013		
OA	952533 4		940022	950012		
OA	952534 2		940022	950013		
OA	953521 1		940320	950012		

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken ^{Vetrouwelijk}
kruisingsbarrières
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag

Fig 991165

november 2001

Halfjaarlijks verslag, periode 1/06/01-1/12/01

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer Plant Research International 6600012

3. Algemeen**Personele inzet**

K.B. Lim
M.Y. Chung
J. Matijssen
J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

P.C. Schenk (voorzitter)
S. Bottema
K. de Buck
A. van der Velde
A. Vletter
D. van Kleinwee
P.J. Kos
K. Laan
A. Peterse
C. Randag
W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgpriject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)
4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Opnieuw hebben enkele gastmedewerkers het team versterkt t.w. Yong-Mo Chung (maart-augustus 2001) uit Korea en Qianrui Tang (november 2001-september 2002).

De website van het lelie-project is verder uitgebreid. Nog niet iedereen heeft zijn weg daarheen gevonden.

Een overzicht van cafeïne/temperatuur-experimenten van dit jaar en vorig jaar zijn door Lim in het engels gerapporteerd (5.3; 5.4).

5.2 Kruisingen 2001

Er zijn met de nieuwe tetraploide OA-hybriden een reeks van kruisingen uitgevoerd.

Tabel 1 en 2 geven een beeld van de kruisingsactiteiten en het voorlopige resultaat ervan na embryo-rescue. In tabel 2 zijn de resultaten in diverse OA-combinaties, bij gebruik van diverse ouders eergegeven. Hieruit blijkt dat veel AOA, OAA en OAOA hybriden verkregen zijn uit de goed fertiele OA's (tabel hieronder). Maar ook van tetra OA's die als vader steriel zijn, kunnen als moeder veel een goede fertiliteit te zien geven (951914-1)

Diploid	Ouders	Tetra
942817-1	Expression x Con King	950220 e.a.
951301-5	Expression x Con King	970104 e.a.
953508-1	Expression x Lady Rosa	991112 e.a.
951462-1	Romero Star x Con. King	981023 e.a.
951584-1	Acapulco x Sancerre	991013
951407-9	Pesaro x Con. King	981004 e.a.
951479-2	Expression x Con King	981011 e.a.
952088-2	Expression x Au Revoir	981056 e.a.
962449 2	Sissi x Lanzarote	991165 (foto voorpagina)

Tabel 1. Overzicht van alle soortkruisingen gemaakt in 2001, gerangschikt naar type kruising (group OA AOA etc), met het resultaat na embryoreding (FI=aantal bloemen, Fail=geen zaadzetting, ovem=aantal vruchtbeginsel voor embryo en embryozakcultuur; Em/Es=aantal embryos/embryozakken; G-em=aantal gekiemde embryos/embryozakken; OVS=aantal vruchtbeginsels tbv zaadknopcultuur; ov=aantal zaadknoppen van OVS; OVO aantal vruchtbeginsels voor ovariumplakcultuur; ovu=aantal zaadknoppen OVO; G_Ov=aantal gekiemde zaadknoppen; G-tot=totaal aantal gekiemd).

Group	FI #	Fail	OvEm	Em #	Es #	G_em	OvS	Ov #	OvO	Ovu #	G_Ov	G_tot
A O	9		4	19	1				5	100		0
A OA	242	68	106	371	3	376	27	2700	39	292	97	485
AA OA	62	30	5	10	0	10	20	2000	6	2		15
AALA A	13											0
AALA ALA	6	5	1	0	0							0
ALA LA	7	7										0
L LO	7	2					5	500	2	47	20	20
L LRLO	3						3	300				1
L O	11											0
LA AA	15		14	0	0							0
LA LA	2	1										0
LA O	4											0
LCan LL	5	3					2	200				0
LCan O	21	15					3	300				0
LD A	9	2	2	14	0	26			5	250	37	65
LD LL	2											0
LL LLR	11	11										0
LL LO	12	5					1	100	3	18	1	1
LL LRLO	23	11					8	800	4	62		5
LL O	52	46					6	600				1
Llank L	3	3										0
LLLO LR	6	4					2	200				0
LLLO O	3	2										0
LLO O	5		4	0	0							0
LLR LL	9	1	8	39	15	29						29
LLR LO	5	5	2	36	0	17						17
LLR LR	4	3					1	100				0
LLR O	1	1										0
LML	4		4	0	0							0
LM LR	3		3	0	0							0
LO L	2	2										0
LO LL	18	4	5	2	0	2			2	30	4	6
LO LO	16	5	6	59	32	29	5	500				29
LO LRLO	4		6	0	0							0
LO O	72	44	20	0	0		1	100	3	13		0
LO OA	21	13	7	1	3				1	3		0
LO OLO	5		5	0	0							0
LO OO	29	20	7	0	0							0
LO OT	10	2	6	0	0				2	103		0
LOLR	2		2	0	0							0
LOLR O	1	1										0

LR LL	2	2										0
LR LO	5	5										0
LR O	22	21										0
LRLO LO	3		3	0	0							0
LRLO O	4	2	3	0	0							0
O A	3						3	300				0
O Lcan	4	2	1	0	0							0
O LLLO	21	16	4	7	6	4						4
O LO	93	31	47	2	6	1	5	500	4	71	2	3
O LR	11	4	3	4	0		2	200	1	23		0
O OA	176	26	67	7	0	4	75	7500	5	33		4
O OLO	10		10	2	0							0
OO OO	1	3	1	60						52	28	28
O OO	1								1	100	1	1
O OT	10	1	9	71	6					30	9	9
OA A	153	20	50	301	61	290	54	5400	22	216	1	298
OA AA	782	311	115	0	0		100	9625	214	568	2	4
OA O	315	239	30	9	0	7	36	3600				7
OA OA	74	14	48	252	22	125	3	300	7	36	2	127
OA OO	97	54	14	16	0		19	1900	1			0
OL O	4		4	0	0							0
OLO LLLO	1											0
OLO LO	3		3	0	0							0
OLO O	5	5										0
OLO OO	3		2	0	0							0
OLR LOLR	5	1	4	0	0							0
OLR O	13	13										0
OO LO	2		2	1	0							0
OO LOLR	2		2	0	0							0
OO O	1						1	100				0
OO OA	4		4	0	0							0
OO OLO	2		2	0	0							0
OO OT	7	1	6	41	13	4						4
OT LO	2		1	15	0							0
O O	4		2	4								0
Grand Total	2584	1087	654	1343	168	924	382	37825	327	2049	204	1163

Tabel 2. Overzicht OA-kruisingen, effect van diverse vaders.

A OA	991103	92
	951914 1	79
	951934 1	7
	981004	14
	981011	9
	981013	4
	981056	5
	991103	247
	991112	28
A OA Total		485
AA OA	951914 1	2
	951934 1	3
	991165	10
AA OA Total		15
O OA	981004	3
	981011	1
O OA Total		4
OA A	011039	264
	011040	27
	011057	7
OA A Total		298
OA AA	85989	4
OA AA Total		4
OA O	011030	6
	011032	1
OA O Total		7
OA OA	981013	97
	981023	2
	981024	11
	991110	16
	991112	1
OA OA Total		127
Grand Total		940

5.3 Overcoming F₁ sterility by Caffeine treatment in OA's (exp. 2000)

Vervolg experimenten in juni-verslag besproken. De OA als moeder leverde weinig planten op, maar er werd wel homoeologe recombinatie gevonden (zie foto!)

Fig. 1. 002685-6 (OA A) derived from caffeine treated OA female crossed with Asiatic hybrid pollen showed 4 homoeologous recombinant chromosomes.

Figuur 1. Een GISH-plaatje van een OxA-hybride na cafeïne-behandeling, met bij de pijltjes recombinatieplaatsen.

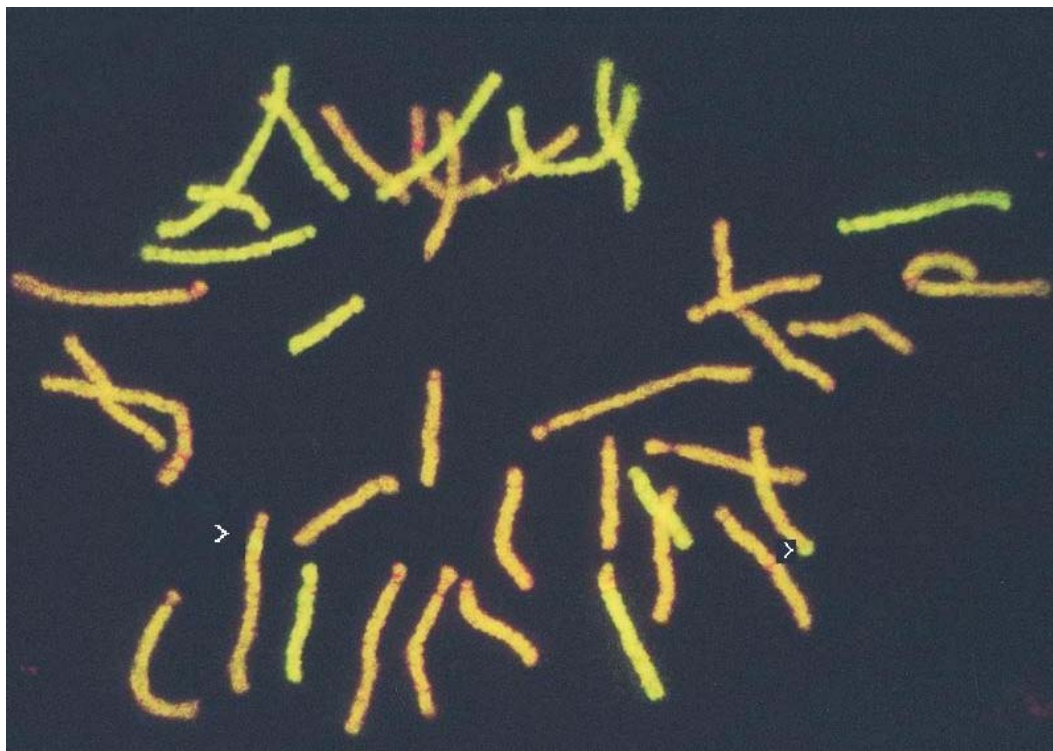


Table 3. Number of plants derived from egg cells of OA hybrid after treatment with 0.3% Caffeine and fertilized with hybrids belonging to different sections.

Crosses	Treated flower bud length (mm)	No. of treated buds	Fertilization and number of progeny after pollination with Asiatic hybrid			
			Successful ovaries	Embryo	Endosperm	No of plant derived
002685 (OA A cross)	Control	15	7 (47)	0	9	0
	16 – 19	14	7 (50)	1	11	1
	20 – 23	38	17 (45)	11	36	4
	24 – 27	7	2 (29)	2	3	0

	30 – 33	13	3 (23)	0	3	0
	34 – 37	12	4 (33)	4	17	4
	38 – 41	11	5 (45)	2	6	1
002682	Control	8	0	0	0	0
(OA O cross)	16 – 19	17	0	0	0	0
	20 – 23	20	0	0	0	0
	24 – 27	8	0	0	0	0
	30 – 33	11	0	0	0	0
	34 – 37	9	0	0	0	0
	38 – 41	24	0	0	0	0

Table 4. Crossing compatibility between Asiatic and oriental hybrids with Caffeine treated OA hybrid

Type of crosses	No of flowers used	No of successful flowers	No of embryos formed	No of plant regenerated
002687= A OA = 001099 × 951301-5	24	19	279	256
002686= A OA = 001100 x 951301-5	14	11	25	24
002684, -5= OA A = 951301-5 × 001099	154	61	30	16
002688= O OA = 001102 × 951301-5	20	0	0	0
002683= OA O = 951301-5 × 001102	88	0	0	0

Table5. The genome analysis of backcross progenies derived from caffeine treated OA hybrid, which used both as female and male parent.

Crosses	Access no.	DNA content and ploidy level	Chromosome number	From female		From male	
				O (O/A) ^z	A (A/O) ^z	O (O/A) ^z	A (A/O) ^z
OA × A	002684-1	3x	36	12	12	-	12
	002684-3	3x	36	12 (0)	12 (0)	-	12
	002684-4	3x	36	12 (0)	12 (2)	-	12
	002685-6	3x	36	12 (2)	12 (2)	-	12
A × OA	002687-2	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-9	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-10	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-17	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-18	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-20	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-23	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-27	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-35	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-38	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)
	002687-44	3x	36	-	12 (0)	12 (0)	12 (0)

^z O and A represent Oriental and Asiatic chromosomes. (O/A) and (A/O) indicate Oriental chromosome recombinant with Asiatic chromosome segment(s) and Asiatic chromosome recombinant with Oriental chromosome segment(s).

5.4. Induction of 2n-gametes by treatment of temperature fluctuation and chemicals.

Vervolg van het experiment, dit jaar uitgevoerd in een klimaatkamer (D 16 H13/28; N 8H 13/28), waarbij een deel van de bloemen met 0.3 % Caffeine werd behandeld (zie ook het vorige halfjaarlijkse verslag).

Results

Table shows pollen germination frequency of F1 OA interspecific hybrids after Caffeine and temperature fluctuation treatment. In total 707 flowers were treated with Caffeine or temperature fluctuation and 25 flowers showed some extent of pollen fertility which could use as pollen parent for BC1 progeny. It is about 3.5% of treated flowers showed fertility, which means that it has possibility to recover fertility of a flower from every 2.4 plants. This figure seems that it is very successful of fertility restoration from absolute sterile plants directly in F1 hybrids. The fertility of restored flowers varied from below 1 % to maximum 25% indicating that depending on the stage of meiosis and condition of the flower during treatment it could be varied in results. Indeed we have very much successful crossing results from using restored pollen and we have made 95 BC1 plants from A OA, OA AA and AA OA crosses. The pollen staining was much higher than pollen germination ratio indicating that indeed restoration of pollen viability was clearly higher enough but with unknown reason pollen germination rate was decreased.

Because we treated both male and female organ of the flower either with temperature only or temperature and caffeine, the frequency of fertility restoration was different. To restore fertility from female gametes it is very difficult as has shown in Table 7. However, some viable pollen derived from treated flower gave many progenies. Although the amount of fertile pollen was small, it was enough to make number of crosses.

We made several different crosses such as different ploidy level of counterpart as male or female parent. OA pollen could be used as male to diploid Asiatic and tetraploidy Asiatic. In this case OA pollen had better results crossing with diploid Asiatics rather than tetraploid (Table 8/9). This result is similar to different ploidy crosses with normal pollen.

Table 6. Pollen germination (%) from Temperature and Caffeine treatment in F₁ interspecific OA hybrids.

Genotype	Flower No.	Treatment	Bud size (mm)	Number of pollen		Germination (%)
				counted	Germinated	
951914-1	933	T	-	252	4	<1.0
951914-1	942	T	-	379	8	2.1
951914-1	945	T	-	300	5	<1.0
951914-1	569	T	-	126	32	25.4
951914-1	620	T	-	317	27	12.6
951914-1	655	T	-	317	27	8.5
951914-1	864	T	-	314	9	2.9
951914-1	865	T	-	346	12	3.5
951914-1	901	T	-	358	10	2.8
951914-1	903	T	-	331	7	2.1
951914-1	926	T	-	367	7	1.9
951914-1	927	T	-	320	7	2.2
951914-1	874	T+C	39	262	12	4.6
951914-1	875	T+C	41	299	16	5.4
951914-1	212	T+C	18	317	17	5.4
951914-1	557	T+C	25	265	8	3.0
951914-1	558	T+C	22	304	14	4.6
951914-1	929	T+C	46	355	2	<1.0
951934-1	684	T	-	227	5	2.2
951934-1	678	?	-	310	5	1.6
951934-1	731	T	-	436	9	2.1
951934-1	742	T	-	258	35	13.6
951934-1	754	T+C	24	538	41	7.7

Table 7. Results of Caffeine and Temperature fluctuation at the time of flower bud stage of F₁ OA hybrids. (Fl=aantal bloemen, Fail=geen zaadzetting, ovem=aantal vruchtbeginsel voor embryo en embryozakcultuur; Em/Es=aantal embryo/embryozakken; G-em=aantal gekiemde embryo/embryozakken; OVS=aantal vruchtbeginsels tbv zaadknopcultuur; ov=aantal zaadknoppen van OVS; OVO aantal vruchtbeginsels voor ovariumplakcultuur; ovu=aantal zaadknoppen OVO; G_Ov=aantal gekiemde zaadknoppen; G-tot=totaal aantal gekiemd).

	Treatment	Fl_#	Fail	OvEm	Em_#	Es_#	G_em	OvS	Ov_#	G_ovu	OvO	Ovu_#	G_Ov	G_tot
OA as Female	Control	65	14	16	0	0	0	18	1800	1	20	51	0	1
	T	463	142	69	0	0	0	65	6418	1	149	446	1	2
	T+C	244	148	27	0	0	0	17	1407	0	45	71	1	1
OA as Male	Control	34	10	14	0	0	0	0	0	0	8	2	2	2
	T	93	52	22	63	0	62	18	1800	8	5	11	3	73
	T+C	44	15	13	12	0	13	7	700	1	4	0	2	16
Total		943	381	161	75	0	75	125	12125	11	231	581	9	95

Table 8. Summary of the crossing with fertile pollen from OA and different ploidy level of male and female parent. (Fl=aantal bloemen, Fail=geen zaadzetting, ovem=aantal vruchtbeginsel voor embryo en embryozakcultuur; Em/Es=aantal embryos/embryozakken; G-em=aantal gekiemde embryos/embryozakken; OVS=aantal vruchtbeginsels tbv zaadknopcultuur; ov=aantal zaadknoppen van OVS; OVO aantal vruchtbeginsels voor ovariumplakcultuur; ovu=aantal zaadknoppen OVO; G_Ov=aantal gekiemde zaadknoppen; G-tot=totaal aantal gekiemd).

Group	Type	Fl_#	Fail	Ov Em	Em_#	Es_#	G_em	Ov S	Ov_#	G_ovu	Ov O	Ovu_#	G_Ov	G_tot
OA AA	N	22	1	14	0	0		9	900	2	5	42	2	4
A OA		58	2	30	75	0	75	11	1100	4	12	13	7	86
AA OA		24	14	0	0	0	0	9	800	5				5
Total		127	31 (24%)	44	75		75	37	3600	16	17	55	9	95

Table 9. List of crossing made from fertile pollen of F1 interspecific OA hybrids after caffeine and Temperature fluctuation.

Cross	Female	Male	Group	Ty	Fl_#	Fai l	OvEm	Em_#	Es_#	G_e m	OvS	Ov_#	G_o vu	OvO	Ovu_#	G Ov	G t ot	Seed	Remark s
2019	952530	1 85989	OA AA	N	7		14	0	0		5	500	1				1	Control	
2024	951934	1 85989	OA AA	N	11						4	400	1				1	T	
2026	951301	5 85989	OA AA	N	2	1								1	9	1	1	T+C	
2027	951301	5 85989	OA AA	N	2									4	33	1	1	T	
2059	980072	951914	1 A OA	N	9	3	6	5	0	5							5	T+C	Fl#557
2075	980072	951914	1 A OA	N	1	3	7	42	0	42							42	T	Fl#655
2115	980072	951934	1 A OA	N	7		1	1	0		4	400	2	2	10	2	4	T	Fl#731
2119	980072	951934	1 A OA	N	2		1	3	0	3	1	100					3	T+C	Fl#754
2133	011055	951914	1 A OA	N	5		1	1	0	2				2	0	2	4	T+C	Fl#875
2134	980072	951914	1 A OA	N	5		4	3	0	3	1	100					3	T+C	Fl#875
2140	980072	951914	1 A OA	N	5		4	18	0	18							18	T	Fl#865
2143	011055	951914	1 A OA	N	6		2	0	0		5	500	2				2	T	Fl#864
2168	980072	951914	1 A OA	N	4		2	2	0	2							2	T	Fl#901
2170	011055	951914	1 A OA	N	6	2	2	0	0					2	1	1	1	T	Fl#903
2188	011055	951914	1 A OA	N	8	2								6	2	2	2	Cont1	Fl#942
2108	85989	951934	1 AA OA	N	7	4					3	300	3				3	T	Fl#742
2135	85989	951914	1 AA OA	N	5	4					1	100	1				1	T+C	Fl#875
2141	85914	951914	1 AA OA	N	5	2					2	200					0	T	Fl#865
2142	85707	1 951914	1 AA OA	N	6	4					2	200	1				1	T	Fl#865
Total					943	381	161	75	0	75	125	12125	11	231	581	9	95		

5.5 Website

Om resultaten snel beschikbaar te hebben voor de bedrijven is een website opgezet met daarop foto's van de diverse nieuwe hybriden uit de diverse hybride-groepen, informatie over de kijkmiddagen, het GISH-onderzoek en diverse links. Het adres is:

<http://users.raketnet.nl/vantuyl/lelieproject/> of <http://lelie.netmenu.nl>

Er is een toegangsnaam/paswoord toegevoegd (lelie-research / lilium).

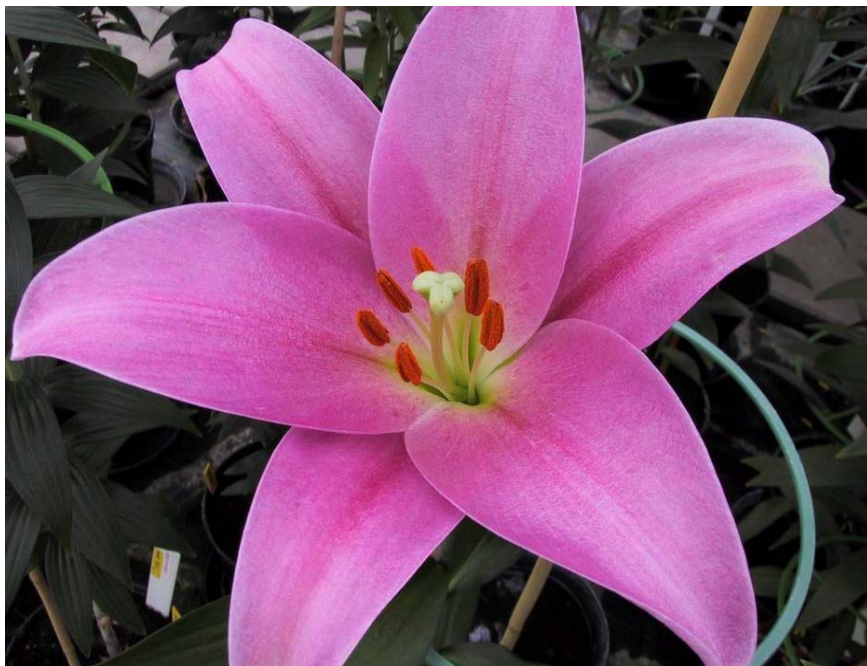
Tijdens de vorige halfjaarlijkse bijeenkomst is het een en ander nog eens toegelicht. Ook aan de uitgiftenummers is apart aandacht besteed. Hieronder zijn de inlog-pagina en de uitgiftepagina weergegeven.

Beste lelieveredelaars,

Om een ongeoorloofd gebruik van de website van het lelieproject te voorkomen, verzoek ik U voor het inloggen steeds een (blanco) mail naar mij (jaapvantuyl@hetnet.nl of j.m.vantuyl@plant.wag-ur.nl) te sturen.

ENTER USERNAME :

ENTER PASSWORD :



UITGIFTE 2001



[1841a.JPG](#)



[2703.jpg](#)

OA (Expression x Con King) en (Bel Paso x Con king)



[2518.JPG](#)



[2707.JPG](#)

OA (Expression x Au Revoir) en (Romero star x Con king)



LOLR 982567-9



[813a.JPG](#)

LOLR (Gelria x *L. rubellum*) x (Snow Queen x Acapulco)



LO-tetra: San Marco x Gelria



LoCan x LoCan

[2091a.JPG](#)

Gelria x *L. canadense rubrum*

5.6 Uitgifte materiaal

De uitgifte van dit jaar bestaat uit 7 nummers die elk bedrijf krijgt met enkele nummers specifiek gekozen per bedrijf. De gezamenlijke lijst ziet er als volgt uit:

OAOA 991102 Expression X Connecticut King
OAOA 981004 Bel Paso x Connecticut King
OAOA 981056 Expression x Au revoir
OAOA 981023 Romero Star x Connecticut King
LOLR 982567-9 (Gelria x rubellum) x (Snow Queen x Acapulco)
LOLO 991290 San Marco x Gelria
LCanLCan 970130 Gelria x L. canadense rubrum

Voor de bedrijven apart is het volgende aangevraagd:

Bischoff Tulleken:

950109 L. longiflorum x L. martagon
991146 L. longiflorum x L. lankongense

Sande:

981010 OAOA Expression x Connecticut King
950109 L. longiflorum x L. martagon

De Jong Lelies:

972552-1 LLLO tetra L. longiflorum x (L. longiflorum x Acapulco)
972730-4 OLO Acapulco x (San Marco x Gelria)

Van den Bos:

962541-1 OLR Acapulco x (Gelria x rubellum)
982696-1 LOLO (L. longiflorum x Acapulco) x (San Marco x Gelria)

Van de Wereld:

972561-1 LLLO tetra L. longiflorum x (L. longiflorum x Acapulco)
972729-4 OLO Merostar x (San Marco x Gelria)

Laan:

981010 OAOA Expression x Connecticut King
991110 OAOA Expression x Lady Rosa

6. Publicaties en lezingen

- Lim, K.-B., M.S. Ramanna, JH De Jong, E. Jacobsen & J.M. Van Tuyl, 2001. Indeterminate meiotic restitution (IMR): a novel type of meiotic nuclear restitution detected interspecific lily hybrids by GISH. TAG 103: 219-230 (see enclosed reprint).
- Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl 2001. Comparison of homologous recombination frequency between mitotic and meiotic polyploidization in BC1 progeny of interspecific lily hybrids. Proc Eucarpia Melle july 2001; Acta Hort 552: 65-72.
- Ki-Byung Lim, Jannie Wennekes, 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. Genome 44: 911-918.

7. Plannen eerset helft 2002

- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit, maken van kruisingen en toepassing van embryo-rescue methoden.
- Inductie van $2n$ -gameten in steriele OA-hybriden d.m.v. injectie in knoppen (juni opplanting)
- Selectie en opkweek van tetraploïde OA's
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 2001 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie (o.a. i.v.m. mogelijke recombinitie de via injectie met cafeïne verkregen hybriden).

9. In vitro technieken voor soortkruisingen bij lelie =Lelie-3

Plannen 2003-2007

Uitgangspunten:

Lelie-1 1994-1997 4 jaar 11 bedrijven + SENTER subsidie

Lelie-2 1998-2002 5 jaar SLV + verkoop roze longiflorum

(budget 2001: Dfl 196.806,- = ca 89.000 Euro)

De ontwikkelde technieken van project Lelie-1 en Lelie-2 zijn voor vervolgonderzoek beschikbaar; De ontwikkelde leliehybriden van project Lelie-1 en Lelie-2 zijn eveneens voor vervolgonderzoek beschikbaar. De intellectuele eigendomsrechten, behalve kwekersrecht, in het kader van Lelie-1 en Lelie-2 ontwikkelde materialen, technieken en expertise behoren toe aan PRI.

Verzoek om exclusiviteit voor OA-onderzoek >> prijskaartje ca 40.000,- Euro per jaar (afhankelijk van de voorwaarden).

Financiering 2003-2007

1. Basis-financiering SLV 58.000 Euro per jaar (3% inflatiecorrectie)
2. Benodigd budget 125.000 Euro per jaar
3. Verkoop hybriden uit project aan derden?
 - Extra financiering 50.000 euro per jaar, 1 hybride per jaar te kiezen
 - Verkoop na voorselectie aan het hele vak 2 nummers a 100.000 Euro
4. Subsidie Prduktschap Tuinbouw (PT), kennis moet dan direct vrij beschikbaar
5. Subsidie Provincie Noord-Holland? Max 50 %, in het kader van biologische teelten > volledig richting ziekteresistentie
6. Contrafinanciering PRI/DWK 50.000,- Euro?

Inhoud project

1. Opkweek (vitro/kas) en beoordeling/test materiaal in pijplijn
2. Introgressie fertiliteit en kruisbaarheid OA's reciprook AOA / OOA
3. Introgressie ziekteresistentie: virus, Botrytis en Fusarium-resistentie binnen OA-groep
4. Ontwikkeling nieuwe hybriden met resistenties uit andere species
5. Toepassing moleculaire merkers
6. Ontwikkeling nieuwe technieken o.a. m.b.v. GISH (o.a. preferentiele paring en bevruchting, geïnduceerde meiotische verdubbeling)

10. Notulen bijeenkomst begeleidingscommissie leliesoortkruisingen.**Datum: 14-06-2001**

Aanwezig: P. Schenk (Bischoff Tulleken Lelies B.V.) (voorzitter); S. Bottema (Gebr. Bottema); K. de Buck (Vanden Bos/Lybelmex B.V.); P.J. Kos (Worldbreeding B.V.); A. van de Velde (H.P. Imanse veredeling B.V.); D. van Kleinwee (De Jong Lelie); K. Laan (Laan Flora); K.-B. Lim; J. Matijssen (Plant Research International); A. Peterse (Testcentrum); C. Randag (Sande B.V.); J.M. van Tuyl (Plant Research International); W. de Wit & P. de Vries (Trior Lelie B.V., Gebr. Van Zanten); A. Vletter (Vletter en den Haan) en voor agendapunt 2 Monique van Wordragen (ATO) en Robert Hall (PRI)

1. Opening.

De voorzitter heet iedereen welkom en geeft het woord aan Monique van Wordragen voor agendapunt 2.

2. Presentatie samenwerkingsverband ATO-PRI: de irisklok, genomics voor het meten van bloemveroudering bij iris

Met behulp van DNA-chips (een methode om snel de activiteit van honderden genen te bepalen) zijn bij iris sets genen gevonden die actief zijn in diverse stadia van bloemveroudering bij iris. Dit onderzoek kan leiden tot snelle toetsen om de inwendige kwaliteit van bloemen en bollen te bepalen. Er zijn diverse vragen, die deels beantwoord worden. Voor een vervolgdiscussie verwijst de voorzitter naar Stiverbol (sectie lelie) waar enkele malen per jaar onderzoeks-presentaties gegeven worden.

3. Mededelingen

Geen mededelingen

4. Verslag bijeenkomst 22 december 2000

In de notulen staat: 9 december 2000 moet zijn: dit moet zijn: notulen 9 december 1999

5. Bespreking van het halfjaarlijks verslag

- Piet Schenk merkt op pag. 2 van het verslag dat bij de begeleidingscommissie de titulatuur niet correct is. Hij stelt voor voortaan alle titels weg te laten.
- Bij 5.2 wordt het idee van de vroege embryo-rescue in OA-kruisingen toegelicht: de barrières bij terugkruisingen met OA's zijn richting Aziaten en orientals verschillend. In het eerste geval is geen cut-style nodig in het tweede geval wel. In beide gevallen lijkt vroege embryo-redding noodzakelijk.
- De bij 5.2 genoemde LO x LO kruisingen zijn tetra x tetra kruisingen
- Lim licht onderdeel 5.3 toe. Lacto phenol-fuchsine is een kleurstof voor pollen om de vitaliteit te bepalen. Tabel 1 is nog een proef uit het eerste werk met cafeïne. Hieruit blijkt dat concentraties hoger dan 0.3% te hoog zijn. In de vervolggelaxperimenten is gewerkt met 0.1, 0.3 en 0.5% (tabel 2). Hier blijkt 0.3% de beste resultaten op te leveren. In het geval dat de met cafeïne behandelde OA 951305-1 als moeder gebruikt is, blijken er uit cafeïne-injecties bij 2 knopstadia embryo's verkregen worden (bij ca 20 mm en 35 mm, tabel 2 en 5). Het eerste stadium ligt voordat de meiose in de eicellen plaats vindt en veroorzaakt daarom een mitotische verdubbeling, terwijl het tweede stadium tijdens de meiose is. In het laatste geval zouden 2n-gameten kunnen ontstaan waar recombinitie heeft plaats gevonden. Met stuifmeel afkomstig van 1 bloem na cafeïne-behandeling zijn veel bestuivingen gemaakt op Aziaten en orientals. De laatste groep leverde niets op (cut-style was nodig geweest), terwijl de eerste 272 plantjes heeft opgeleverd (tabel 6). In een tiental onderzochte planten afkomstig uit dit experiment is geen recombinitie aangetoond (tabel 7). In 5.4 zijn de cafeïne en temperatuurfuctuatie behandelingen van op de vorming van 2n-gameten beschreven. De voorlopige resultaten met 4 OA's hebben een 20-tal bloemen opgeleverd die fertiliteit lieten zien. Dit werd vooral bij 1 genotype (951914-1) gevonden. Er lijken dus duidelijke verschillen tussen genotypen te bestaan. In het najaar worden nog enkele cafeïne-experimenten uitgevoerd. Conclusies komen in volgende halfjaar verslag.

- De website (5.5) van het lelieproject wordt door Jaap gedemonstreerd. Er zijn momenteel een 6-tal pagina's gemaakt met informatie over de kijkmiddagen, OA's De paswoord-beveiliging bleek na een tussentijdse update verdwenen, maar dit is inmiddels weer verholpen. Het initiatief wordt toegejuicht. Op- en aanmerkingen zijn welkom!
 - Het voorstel voor de uitgave van materiaal (5.6) wordt geaccepteerd. Jaap komt met een serie nummers voor elk bedrijf, waarna via Dick van Kleinwee er door de bedrijven maximaal 4 worden toegevoegd.
-

6. Toelichting website

De website (5.5) van het lelieproject wordt door Jaap gedemonstreerd. Er zijn momenteel een 6-tal pagina's gemaakt met informatie over de kijkmiddagen, OA's De paswoord-beveiliging bleek na een tussentijdse update verdwenen, maar dit is inmiddels weer verholpen. Het initiatief wordt toegejuicht. Op- en aanmerkingen zijn welkom!

7. Rondvraag en sluiting

- Carlo vraagt of bedrijven discreet willen omgaan met het verzamelen van stuifmeel tijdens de kijkmiddagen (met name indien meerder personen per bedrijf aanwezig zijn)
- Dick vraagt wat te doen met de vorig jaar uitgegeven nummers, die bij Iribov vermeerderd worden. Op 1 adres of ieder voor zich opkweken. Het laatste heeft de voorkeur.
- Kees Laan vraagt hoe lang Lim nog blijft, zeer waardevol medewerker. Zo lang mogelijk, maar in ieder geval tot eind volgend jaar.
- Piet Schenk stelt voor om tijdens de najaarsvergadering de intentie voor voortzetting van het project (na 2002) aan de orde te stellen. Jaap zal een kort voorstel schrijven.
- De voorzitter sluit de vergadering door eenieder aanwezig te bedanken voor zijn/haar aanwezigheid en inzet.

Datum volgende vergadering: 13 december 2001 Om 14.00 uur op PRI.

Jaap van Tuyl 15-6-2001

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken ^{Vetrouwelijk}
kruisingsbarrières
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag

juni 2002

Halfjaarlijks verslag, periode 1/12/01-1/06/02

1. Titel project: In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer Plant Research International 6600012

3. Algemeen**Personele inzet 2002**

K.B. Lim (tot januari 2002)

A. van Silfhout

Q. Tang

J. Matijssen

J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

P.C. Schenk (voorzitter)

S. Bottema

K. de Buck / Th. van Schie

A. van der Velde

A. Vletter

D. van Kleinwee

P.J. Kos

K. Laan

A. Peterse

C. Randag

W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgpriject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op *Fusarium* en *Botrytis*)

4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

Ki-Byung Lim is, met pijn in zijn hart, (helaas) in januari teruggekeerd naar Korea. Het leliesoortkruisingsonderzoek ligt hem zeer na aan het hart, maar hier ligt geen vaste baan voor hem in het verschieft en moest hij zijn toekomst wel veilig stellen in Korea. Van zijn werk zullen we de resultaten nog jaren merken. Alex van Silfhout is als assistent-onderzoeker toegevoegd aan het team. Twee studenten veredeling van Universiteit Wageningen hebben voor een afstudeeronderzoek lelie t.w. Femke Hoogervorst die het effect van hoge temperatuur op het doorbreken van kruisingsbarrières bij o.a. OA-kruisingen heeft onderzocht (november 2001-mei 2002) en Bram Lokker die onderzoek naar 2n-gameten productie bij OA-hybriden is gestart (mei – oktober 2002). Daarnaast is een PhD-student Rodrigo Barba Gonzalez geïnteresseerd om gedurende 4 jaar onderzoek te komen doen, in de voetsporen van Lim.. (zie 5.4)

In 2002, waarin de 2^e periode van het OA-onderzoek afloopt, zijn voorstellen voor een nieuwe project periode van 5 jaar ingediend. De resultaten die dit jaar te zien zijn, geven alle rede tot een snelle doorbraak naar commerciële OA-hybriden in de vorm van triploïde AOA of OOA-hybriden.

5.2 Resultaten 2002: bloei in OA vervolgekruisingen

De oogst van een aantal jaren zwoegen op zoek naar de beste methoden om met getetraploidiseerde OA's en OA's die 2n-gameten produceren nakomelingen te krijgen lijkt met succes bekroond te worden. De eerste golf van vooral AOA, maar ook OOA (en OAOA) is in bloei gekomen of staat bijna in bloei. Het betreft de volgende combinaties:

002687 AOA Lanzarotte x 951301-5 (Merostar x Con. King) door cafeïne behandeling geïnduceerd pollen! 40 triploïde planten met grote rode en rood-bruine, goed gevormde bloemen (zie website), hebben gebloeid, de fertiliteit varieerde van 0-75%, doorkruisen lijkt mogelijk. Meer planten komen nog in bloei in koude kas.

992682-1 OOA Sorbonne x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten, triploid 1 bloem

992738 OOA Time Out x 952400-1 2n-gameten, 2 triploïde hybriden, 1 plant bloeit met 5 bloemen.

In koude kas komen in bloei:

002147 AOA Gran Sasso x 981029 (tetra 951301-5 Merostar x Con. King)

002150 AAOA 85707-1 (tetra Az) x 981004 (tetra 951407-9 Bel Passo x Con. King)

002151 AOA Gran Sasso x 981004 (tetra 951407-9 Bel Passo x Con. King)

002188 AOA Gran Sasso x 970123 (tetra 951301-5 Merostar x Con. King)

002433 AOA Gran Sasso x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten

002531 AOA Gironde x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten GISH recombinatie

002526 AOA Lanzarote x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten

Wat is mislukt?
951502-1
OOA bottleneck

Wat komt er volgend jaar: veel AOA en OAOA-hybriden.

5.3. Onderzoekslijnen 2002

Fertiliteit

Nieuw pollenkiemingsmedium
Toets materiaal zie lijst in bijlage

Screening 2n-gameten

Gezien de resultaten die de laatste 2 jaar behaald zijn met 2n-gameten (zowel de stabiele, natuurlijk die in enkele nummers voorkomt als de geïnduceerde) is het van belang om hier veel nadruk op te leggen. De "collectie" met ca. 150 OA-klonen wordt dit jaar opnieuw gescreend op het voorkomen van 2n-gameten. De omstandigheden zijn wellicht gunstig voor het optreden van 2n-gameten (inductie door de grote temperatuurverschillen in dag en nacht temperatuur).

Inductie 2n-gameten

Inductie van 2n-gameten zal onderzocht worden met enkele steriele OA's die in een klimaatcel een wisseltemperatuur krijgen en met behulp van injectie van cafeïne.

Kruisingprogramma

De kruisingen van dit jaar richten zich op de toepassing van 2n-gameten, m.n. met het nummer 952400-1. Daarnaast wordt de fertiliteit van de AOA en de OOA-hybriden getest en wordt onderzocht in hoeverre met dit materiaal doorgekruist kan worden (richting O, A, OA?).

5.4 Vervolgonderzoek

In overleg met de bedrijven I gewerkt aan een voorstel voor vervolgonderzoek, waarvoor bij het Productschap Tuinbouw subsidie is aangevraagd (zie bijlage). Een beslissing over toekenning is nog niet gevallen. Daarnaast ligt er een voorstel voor een promotie-onderzoeker, Rodrigo Barba, die mogelijk (vanaf september dit jaar) 4 jaar onderzoek komt doen aan introgressie breeding bij OA-hybriden (zie voorstel)

Onderzoeksvoorstel PhD Rodrigo Barba:

Introgression breeding study of Oriental-Asiatic hybrids

In order to introduce new desirable characters in to the cultivar assortment of lily interspecific crosses can be done. Important characters are resistances (Botrytis, Fusarium, virus), flower shape and color, which can originate from wild lily species or other hybrid groups.

In lily wide interspecific hybrids show a high degree F_1 -sterility, which hampers introgression breeding seriously. Chromosome doubling techniques, artificial by treatment with antimetabolic compounds or natural by using unreduced gametes (meiotic polyploidization) can overcome F_1 -sterility. To study introgression of chromosome segments from donor species *in situ* hybridization techniques such as FISH and GISH proved to be very efficient.

The objective of this PhD-research is to prove introgression of Asiatic characters, like virus and Fusarium-resistance into the Oriental hybrid lily group. Important tools in this study are pollination- and embryo-rescue techniques in order to overcome pre- and post-fertilization barriers. To improve introgression meiotic polyploidization is most efficient, resulting in homoeologous recombination. The focus will be on the development of induced meiotic polyploidization techniques and increase of the frequency homoeologous recombination events

6. Publicaties en lezingen

Jaap Van Tuyl 2002. Technieken bij soortkruisingen met lelie als modelgewas
Lezing 12-4-2002 Studiekring PLantenveredeling Wageningen.

Takamura, T. KB Lim & JM Van Tuyl 2002. Effect of a new compound on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and Oriental hybrids lilies. Poster Eucarpia Gent July 2001; Acta Hort 572: 37-42

Jaap M. Van Tuyl, Ingrid W.G.M. Maas And Ki-Byung Lim 2002. Introgression in interspecific hybrids of lily. Acta Hort 570: 213-218 (VIII International Symposium on flowerbulbs, August 2000 South Africa).

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 85-103 (editor A. Vainstein), Kluwer Academic Publishers Dordrecht / Boston / London

Ki-Byung Lim & J.M. Van Tuyl 2002. Identification of parental chromosomes and detection of ribosomal DNA sequences in interspecific hybrids of *Lilium* revealed by multicolor *in situ* hybridization. Acta Hort 570: 403:408 (VIII International Symposium on flowerbulbs, August 2000 South Africa).

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.
Submitted TAG.

Evaluation of BC₂ progenies derived from 3x-2x and 3x-4x crosses of *Lilium* hybrids: a GISH analysis

K.B. LIM • M.S. RAMANNA • E. JACOBSEN • J.M. VAN TUYL

Ki-Byung Lim

National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon, Korea

M. S. Ramanna • Evert Jacobsen

Laboratory of Plant Breeding, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Jaap M. van Tuyl (✉)

Plant Research International, Business Unit Genetics and Breeding, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

Fax: +31 317 418094

E-mail: j.m.vantuyl@plant.wag-ur.nl

Abstract

An allotriploid (ALA, $2n=3x=36$) BC₁ plant was obtained by backcrossing a diploid F₁ interspecific hybrid (LA, $2n=2x=24$), derived from a *Lilium longiflorum* (L genome) and an Asiatic hybrid (A genome), to the latter parent. This allotriploid was backcrossed to a diploid Asiatic hybrid ($2n=2x=24$) and to an allotetraploid (LLAA, $2n=4x=48$) LA hybrid. A total of 25 plants of these crosses were examined for ploidy level and 12 individuals were analyzed for their genome constitution through genomic *in situ* hybridization (GISH). In most cases the progenies from the triploid-diploid ($3x-2x$) crosses consisted of aneuploids. Further more, there was evidence for the formation of near haploid ($x=12+2$) to triploid ($3x=36$) gametes in the allotriploid BC₁ plant. The progenies of triploid-tetraploid ($3x-4x$) cross also consisted of mostly aneuploids but in this case the triploid female parent had contributed predominantly near triploid ($2n$) gametes for the origin of BC₂ progenies. The different ploidy levels observed between $3x-2x$ and $3x-4x$ crosses are possibly caused by preferential fertilization or survival resulting in a different ratio of chromosome numbers between the embryo and endosperm. Though *Lilium* has tetrasporic, eight nucleate type of embryo sac formation (Fritillaria type), the observed difference between the progeny types in $3x-2x$ and $3x-4x$ crosses is comparable to that of observed in monosporic eight nucleate type (Polygonum type) that predominate in most genera of Angiosperm. An important feature of the genome constitution of the progenies was that the homoeologous recombinant chromosomes were transmitted intact from BC₁ to BC₂ progenies in variable numbers. In addition, there was evidence for the occurrence of new homoeologous recombinations in the triploid BC₁. Of the two euploids BC₂ plants one had originated through the parthenogenetic development of a $2n$ egg and the other had originated through indeterminate meiotic restitution (IMR).

Key words: *indeterminate meiotic restitution (IMR)* • *embryo-endosperm ratio* • *introgression breeding* • *interploidy cross* • *L. longiflorum* • *Asiatic hybrids*

7. Plannen tweede helft 2002

- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit, maken van kruisingen en toepassing van embryo-rescue methoden.
- Inductie van 2n-gameten in steriele OA-hybriden d.m.v. temperatuurschok en injectie in knoppen (juni opplanting)
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 2001 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas.
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.

7.1 Projectvoorstel vervolgonderzoek ingediend bij Produktschap Tuinbouw

1. Datum: 8 april 2002
2. Projecttitel: Doorbreking van kruisingbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie.
3. Onderzoek aangevraagd door: PRI & het gehele lelieveredelingsbedrijfsleven
4. Projectleider: J.M. van Tuyl
Adres: Droevendaalsesteeg 1
Tel.nr: 0317 477329
Fax nr: 0317 418094
E-mailadres: j.m.vantuyl@plant.wag-ur.nl
5. Overige uitvoerder(s):
6. Intern projectnummer (onderzoekinstelling): 6600012
7. Looptijd: 1-1-2003 – 31-12-2007
Totaal: 5 jaar
Begindatum: 1-1-2003
Einddatum: 31-12-2007
Tijdstip evt. go/no-go
beslismoment(en):

8. Gewassen: lelie

9. Probleemstelling:

De grootste kruisingsbarrière, waarin het leliebedrijfsleven al meer dan 10 jaar veel energie en (onderzoeks)geld steekt is die tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden. Deze beide hybridengroepen 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.

10. 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).

11. Te verwachten resultaten:

1. Inzicht en kennis van technieken om soortkruisingsbarrières te doorbreken (bestuivingstechnieken, embryo rescue, polyploidisatie, 2n-gameten, GISH, introgressie)
2. Inzicht en kennis van de vererving van de belangrijkste ziekten (lily mottle virus, Fusarium en Botrytis) in uitsplitsende 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).
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 gerealiseerd worden.

12. Bestaande kennis:

Het betreft hier een project dat al bijna 9 jaar loopt. In voorgaande projectperiode zijn reeds 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 hybridisatie-techniek goed te bestuderen (zie ref.). 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.

13. 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. oa. pollenbuiswaarnemingen, waarbij middels 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 ziektetoetsing worden vastgesteld.

Referenties:

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.

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 Wennekes, 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.

Van Tuyl, J.M. , M.P. van Diën, M.G.M. van Creijl, 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. (2001). Interspecific hybridization and introgression Chapter in: *Breeding for ornamentals "Classical and molecular approaches"* in press.

14. Beoordelingscriteria go/no-go beslismoment:

15. Kennisoverdracht:

Voorlichting en rapportage t.b.v. het bloembollen bedrijfsleven zal plaats vinden d.m.v. lezingen en artikelen in de vakpers.

16. Data rapportages: halfjaarlijks (juni/december)

17. Projectkosten excl. BTW (in Euro, inclusief kennisoverdracht, gespecificeerde begroting in bijlage)
Voor dit project is BTW verschuldigd, de kostenberekening voor PT is overeenkomstig de raamovereenkomst met DLO.

18. Financiering in Euro:

PT	372780
PT+bedrijven	680770

	2003	2004	2005	2006	2007
Gevraagde PT-bijdrage:	68.850	71.749	74.107	77.377	80.700
Bijdrage andere financiers:	58.000	59.740	61.550	63.400	65.300
Bijdrage in natura:	126.850	131.489	135.654	140.777	146.000

BIJLAGE:

Gespecificeerde begroting excl. BTW per uitvoerder in Euro (incl. uren x tarief en beschrijving materiaal en overige kosten)

2003

extern tarief:

150 uur sr-onderzoeker	150*129,81
200 uur ass	200*71,25
250 uur P&P	250*55,28

47.542

PT-tarief:

150 uur sr-onderzoeker	150*137,57
200 uur ass	200*75,50
250 uur P&P	250*58,71

50.413

labruimte	150*38,35	5.752
consumables		1.500
diversen		3.500
uitzendkrachten		7.100
kassen		11.043

totaal	126.850
--------	---------

idem voor de volgende jaren:

2004	131.489
2005	135.654
2006	140.777
2007	146.000

10. Notulen bijeenkomst begeleidingscommissie (13-12-2001)

Aanwezig: P. Schenk (Bischoff Tulleken Lelies B.V.) (voorzitter); S. Bottema (Gebr. Bottema); K. de Buck (Vanden Bos/Lybelmex B.V.); P.J. Kos (Worldbreeding B.V.); A. van de Velde (H.P. Imanse veredeling B.V.); K. Laan (Laan Flora); K.-B. Lim; E.N. van Loo (Plant Research International); A. Peterse (Testcentrum); C. Randag (Sande B.V.); J.M. van Tuyl (Plant Research International); W. de Wit & P. de Vries (Trior Lelie B.V., Gebr. Van Zanten); A. Vletter (Vletter en den Haan). Afwezig: D. van Kleinwee (De Jong Lelies)

1. Opening.

De voorzitter heet iedereen welkom bij de HoBaHo in Lisse. Robert van Loo, clusterleider ornamentals & nonfood crops, introduceert zich.

2. Mededelingen: Lim zal in februari vertrekken naar Korea.

3. Verslag bijeenkomst 13 juni 2001: Zonder opmerkingen goedgekeurd.

4. Bespreking van het halfjaarlijks verslag

Eenieder heeft tijdens de vergadering een ingebonden verslag met reprint van TAG-publikatie ontvangen.

In Tabel 1 ontbreekt een kolom. Jaap zal de volledige tabel nasturen (is reeds gebeurd). De nadruk ligt op OA-kruisingen zie Tabel 2.

Lim licht aan de hand van overheads 5.3 en 5.4 toe. Uniek is de recombinatie die is aangetoond na toepassing van cafeïne en temperatuurstress!

De website wordt buiten het seizoen niet geraadpleegd. Er zal nog mee worden doorgedaan.

5. Uitgifte 2001

De uitgifte (5.6) staat voor ieder bedrijf klaar (deels weefselkweek).

6. Bespreking voortzetting project na 2002

Piet Schenk leidt de discussie in: alle 11 bedrijven gaan in principe door, er zijn 2 bedrijven die mogelijk belangstelling zich bij de SLV te voegen t.w. Van der Salm en Boon. Inmiddels is Van der Salm afgehaakt. Over het inkoopbedrag is nog enige discussie. Dfl 50.000,- wordt als haalbaar gezien. Aan het verzoek (door het DB) om exclusiviteit van het OA-onderzoek is een prijskaartje gehangen. De voorwaarden die hieraan zitten zullen in een aangevulde versie voor half januari toegestuurd worden, zodat SLV zich hierover eind januari kan buigen. Ook de financiering door PRI is onder bepaalde voorwaarden, die in dit stuk genoemd zullen worden. Bij de inhoud zullen de kosten gespecificeerd worden.

7. Rondvraag en sluiting

Kees Laan vraagt of OT-hybriden een speciale bewaar temperatuur vragen? Geen van de aanwezigen heeft problemen vergeleken met orientals.

Datum volgende vergadering: 20 juni 2002 Om 14.00 uur op PRI.

Jaap van Tuyl 20-12-2001

In vitro technieken ten
behoefte van het
doorbreken
kruisingsbarrières
binnen het geslacht
Lilium (lelie) II

Halfjaarlijks verslag



November 2002

Inhoudsopgave

1.	Titel van het project	3
2.	Nummer van het project	3
3.	Algemeen	3
4.	Korte beschrijving van de doelstelling	3
5.	Voortgang van het project	4
	5.1 Algemeen	4
	5.2 Bloei in OA-vervolg kruisingen	4
	5.3 Screening 2n-gameten	5
	5.4 Inductie 2n-gameten	6
	5.5 Kruisingsprogramma	7
	5.6 GISH-onderzoek	10
	5.7 Vervolgonderzoek	11
	5.8 Uitgifte materiaal	11
6.	Publicaties en lezingen	12
7.	Plannen 1 ^e helft 2003	13
8.	Bijlagen	14
	Bijlage 1. Projectvoorstel gehonoreerd bij Productschap Tuinbouw	14
	Bijlage 2. Notulen bijeenkomst begeleidingscommissie 12-06-2002	19
	Bijlage 3. Agenda bijeenkomst begeleidingscommissie 12-12-2002	21

Halfjaarlijks verslag, periode 1/6/02-1/12/02**1. Titel project**

In vitro technieken ten behoeve van het doorbreken kruisingsbarrières binnen het geslacht *Lilium* (lelie) II

2. Nummer Plant Research International 6600012**3. Algemeen****Personele inzet 2002**

A.A. van Silfhout

S. Zhou (juni-november)

R. Barba Gonzalez (vanaf 7/11/2002)

J. Matijssen

J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie leliesoortkruisingen bestaat uit de volgende personen:

P.C. Schenk (voorzitter)

S. Bottema

Th. van Schie

A. van der Velde

A. Vletter

D. van Kleinwee

P.J. Kos

K. Laan

A. Peterse

C. Randag

W. de Wit

4. Korte beschrijving doelstelling project

Het doel van het project is het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Aziatische en Oriëntaal hybriden bij lelie, waardoor de introductie van belangrijke eigenschappen (resistenties tegen *Fusarium*, *Botrytis*, virus; houdbaarheid en sortimentsverbreding) mogelijk wordt. Dit heeft na vier jaar onderzoek geleid tot veel materiaal. Daarom is een vervolgproject gestart.

Het doel hiervan is het voor de lelieveredelingsbedrijven bruikbaar maken van het soortkruisingsmateriaal, dat binnen het voorafgaande project ontwikkeld werd.

Dit betekent:

1. Herstel van fertiliteit d.m.v. 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. Uitvoering van ziekteresistentieproeven (gericht op Fusarium en Botrytis)
4. Ter beschikking stellen van materiaal.

5. Voortgang van het project

5.1. Algemeen

De voortgang van het lelieproject is voorlopig voor een periode van 3 jaar verzekerd nadat ook PT het onderzoeksvoorstel heeft gehonoreerd (zie bijlage). Alex van Silfhout is als assistent-onderzoeker toegevoegd aan het team. In de tweede helft van dit jaar hebben ook weer enkele nieuwe gezichten gewerkt binnen het project, t.w. Shujun Zhou, met specifieke vaardigheden op GISH-gebied, Yvette Bakker die tijdelijk bij het embryo-rescue werk assisteerde en ook Rodrigo Barba Gonzalez de aangekondigde PhD is zijn werk gestart. Student veredeling van Universiteit Wageningen Bram Lokker, werkte aan onderzoek naar 2n-gameten productie bij OA-hybriden (mei – december 2002). Ten slotte is / zal de website een verandering ondergaan. Het adres wordt www.liliumbreeding.nl en zal aangehangen worden aan de eigen provider van PRI.

5.2 Bloei in OA vervolgekruisingen

Dit jaar hebben een flink aantal AOA en 2 OOA's, de eerste terugkruisingen met OA gebloeid. De fertiliteit werd getest en onderzocht werd of vervolgekruisingen mogelijk waren (zie 5.5). Op de website zijn enkele plaatjes van AOA en OOA's te vinden. Het betreft de volgende combinaties:

002687 AOA Lanzarotte x 951301-5 (Merostar x Con. King) door cafeïne behandeling geïnduceerd pollen! 60 triploïde planten met grote rode en rood-bruine, goedgevormde bloemen hebben gebloeid, de fertiliteit varieerde van 0-75%, doorkruisen lijkt mogelijk (zie tabel 5,6 en7).

992682-1 OOA Sorbonne x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten, triploid 1 bloem

992738-2 OOA Time Out x 952400-1 2n-gameten, 2 triploïde hybriden, 1 plant met 5 bloemen (steriel, antheren blijven gesloten).

In koude kas kwamen in bloei:

002147 AOA Gran Sasso x 981029 (tetra 951301-5 Merostar x Con. King)

002150 AAOA 85707-1 (tetra Az) x 981004 (tetra 951407-9 Bel Passo x Con. King)

002151 AOA Gran Sasso x 981004 (tetra 951407-9 Bel Passo x Con. King (-1 foto zie voorpagina)

002188 AOA Gran Sasso x 970123 (tetra 951301-5 Merostar x Con. King)

002433 AOA Gran Sasso x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten

002531 AOA Gironde x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten GISH recombinatie (zie 5.5. GISH).

002526 AOA Lanzarotte x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten.

5.3. Screening 2n-gameten

Gezien de resultaten die de laatste 2 jaar behaald zijn met 2n-gameten (zowel de stabiele, natuurlijke die in enkele nummers voorkomt als de geïnduceerde) is het van belang om hier veel nadruk op te leggen. De "collectie" met ca. 150 OA-klonen is dit jaar opnieuw gescreend op het voorkomen van 2n-gameten. De omstandigheden zijn wellicht gunstig voor het optreden van 2n-gameten (inductie door de grote temperatuurverschillen in dag en nacht temperatuur, zie 5.4). De resultaten waren verrassend: in totaal werd bij 13 OA-hybriden enige fertiliteit gevonden (zie Tabel 1). Dit stuifmeel werd in de meeste gevallen getest op bruikbaarheid door het te bestuiven op Aziaten of Orientals. In Tabel 2 zijn de resultaten (tot 15/11) hiervan weergegeven. Tien OA's hebben reeds 426 nakomelingen opgeleverd. Tot nu toe heeft alleen 952400-1 hybride planten opgeleverd. 951502-1 leverde 241 planten op. Dit nummer heeft eerder nakomelingen gegeven, die echter geen hybriden waren.

Tabel 1. Detectie van 2n pollen productie bij OA's in de "koude" kas

Mbnr	Ouders			Nieuw/ bekend	Kiemings- percentage (%)	Na- komelingen
	Oriental moeder	X	Aziaat vader			
951462-1	'Romero Star'	X	'Connecticut King'	nieuw	0 – 75	ja
951502-1	'Pesaro'	X	'Connecticut King'	bekend	0 – 100	ja
951584-1	'Acapulco'	X	'Sancerre'	bekend	5 – 90	ja
951584-2	'Acapulco'	X	'Sancerre'	nieuw	0 – 60	nee
952088-2	'Expression'	X	'Au Revoir'	nieuw	25	ja
952381-5	'Mero Star'	X	'Connecticut King'	nieuw	0 – 10	nee
952400-1	'Mero Star'	X	'Gran Sasso'	bekend	0 - 80	ja
952462-1	'San Marco'	X	'Connecticut King'	nieuw	20 – 50	ja
962119-1	'Acapulco'	X	'Connecticut King'	nieuw	0 – 40	ja
962120-1	'Bernini'	X	'Connecticut King'	nieuw	0 – 25	ja
962254-2	'Tenerife'	x	'Lanzarote'	nieuw	0 – 30	ja
962433-1	'Sissi'	X	'Mirella'	nieuw	0 – 75	ja
996052-1	'Acapulco'	X	'Connecticut King'	nieuw	2	nee

Tabel 2. Effect van fertiel stuifmeel (waarschijnlijk 2n-gameten) , afkomstig van diploide OA's na bestuiving op Aziaten, Orientals en OA's

Father	Group			Totaal
	A OA	O OA	OA OA	
951462-1	4			4
951502-1	221	14	6	241
951584-1	8	3		11
952088-2			1	1
952400-1	25	1	3	29
952462-1	39	8	6	53
962119-1	3			3
962120-1	1			1
962254-2	1			1
962433-1	86			86
Totaal	387	26	13	426

5.4. Inductie 2n-gameten

Inductie van 2n-gameten is onderzocht met enkele steriele OA's die in een klimaatcel een wisseltemperatuur kregen. De temperatuurwisseling wisselde in de nacht (8 uur) en tijdens de dag (16 uur) van 10 naar 30 °C. Het effect was duidelijk: gemiddeld ruim 2% van de bloemen bleek (enige) fertiliteit te vertonen (Tabel 3). Tussen de genotypen waren duidelijke verschillen.

Tabel 3. Resultaat van de “heat shock treatment” op de fertiliteit van 4 OA’s

OA-Mbnr	Totaal aantal bloemen (N)	Percentage geaborteerde knoppen (%)	Percentage of Steriele bloemen (%) ^a	Percentage of fertiele bloemen (%)
951301-5	340	8,82 (n=30)	88,82 (n=302)	2,35 (n=8)
951914-1	196	11,73 (n=23)	86,73 (n=170)	1,53 (n=3)
953508-1	91	3,30 (n=3)	96,70 (n=88)	0,00 (n=0)
951462-1	44	2,27 (n=1)	90,91 (n=40)	6,82 (n=3)
Totaal	671	8,49 (n=57)	89,42 (n=600)	2,09 (n=14)

^a Niet alle (i.e. 90 van de 671) bloemen konden getest worden

5.5. Kruisingsprogramma

De kruisingen van dit jaar richten zich op de toepassing van 2n-gameten, m.n. met het nummer 952400-1, waarmee reeds met succes AOA en OOA hybriden zijn verkregen, die bovendien recombinatie vertonen. Daarnaast is de fertiliteit van de AOA en de OOA-hybriden getest en wordt onderzocht in hoeverre met dit materiaal doorgekruist kan worden (richting O, A, OA). Totaal werden ruim 1500 bloemen gekruist en ruim 3000 embryos en embryozakken werden uitgerepareerd, waaruit tot nu toe ruim 1600 planten zijn ontstaan (Tabel 2 en 4). Opvallend zijn de resultaten met de AOA’s, die meer dan 500 nakomelingen opleverden. In de Tabellen 5-7 is de herkomst van deze hybriden in detail weergegeven.

Tabel 4. Totaal overzicht van de gekiemde planten (G tot) per 15/11 met de erbij behorende aantal bloemen (Fl), embryos (Em), embryozakken (Es) en zaadknoppen (Ov) exclusief de in tabel 1 genoemde planten afkomstig van 2n-gameten.

Group	Fl #	Em #	Es #	Ov #	G tot
A AOA	39	36	268	830	187
A OA	31	58	244	29	261
AOA A	27	70	449	818	236
AOA OA	18	25	134	0	104
LCan A	8	5	5	0	5
LCan LO	4				1
LO OT	1	2	1	0	1
O OA	4	0	1	0	1
O OT	2	0	27	62	5
OA A	21	13	94	135	37
OA OA	113	66	508	401	265
OAA A	1	0	16	0	14
OLO	2	0	32		30
OO LO	2	5	3	0	1
OO OA	3	0	1	70	1
OO OT	2	0	32	0	15
OT LO	7	2	9	14	3
OT OA	1	0	1	0	1
OT OO	1	15	37	0	52
OAA A	1				1
Totaal	288	297	1862	2359	1221

Tabel 5. Een overzicht van het aantal gekiemde planten (G-tot) van de A AOA-kruisingscombinatie met de er bijbehorende aantal bloemen (Fl), embryos (Em), embryozakken (Es) en zaadknoppen (Ov).

Male	Group	Fl #	Em #	Es #	Ov #	G tot
002687 1	A AOA	8	5	15	340	8
002687 2	A AOA	4	3	10	75	7
002687 4	A AOA	4	0	1	75	1
002687 8	A AOA	5	20	169	119	136
002687-10	A AOA	2	1	16	60	6
002687-21	A AOA	2	0	7	0	2
002687-23	A AOA	2	2	8	0	6
002687-27	A AOA	2	1	5	40	2
002687-28	A AOA	2	0	1	32	1
002687-30	A AOA	2	1	3	28	2
002687-32	A AOA	2	2	0	16	1
002687-32	A AOA	2	0	28	45	14
002687-33	A AOA	2	1	5	0	1
Totaal		39	36	268	830	187

Tabel 6. Een overzicht van het aantal gekiemde planten (G-tot) van de

AOA A-kruisingscombinatie met de er bijbehorende aantal bloemen (Fl), embryos (Em), embryozakken (Es) en zaadknoppen (Ov). Totaal waren 66 bloemen gekruist.

Female	Group	Fl #	Em #	Es #	Ov #	G tot
002147-12	AOA A	1	15	13	31	14
002147-13	AOA A	1	0	9	0	1
002147-15	AOA A	1	6	44	0	9
002147-16	AOA A	1	0	39	33	13
002147-17	AOA A	1	0	30	45	14
002147-19	AOA A	2	0	20	0	7
002147-56	AOA A	3	0	32	145	21
002149-1	AAOA A ^a	3	29	24	81	44
002433-1	AOA A	1	0	3	0	1
002531-12	AOA A	1	0	9	0	4
002531-12-2	AOA A	1	1	5	0	3
002531-3	AOA A	1	0	9	0	3
002687-10	AOA A	2	1	28	200	3
002687-11	AOA A	1	1	4	3	2
002687-12	AOA A	1	1	29	0	25
002687-13	AOA A	1	0	41	0	30
002687-26	AOA A	1	0	13	28	1
002687-28	AOA A	1	0	23	0	6
002687-29	AOA A	1	13	12	17	11
002687-36	AOA A	1	0	21	0	14
002687-37	AOA A	1	1	30	200	7
002687-38	AOA A	1	2	11	35	3
Totaal		28	70	449	818	236

^a Er is twijfel over het hybride karakter van de AAOA moeder

Tabel 7. Een overzicht van het aantal gekiemde planten (G-tot) van de AOA OA-kruisingscombinatie met de aantal embryos (Em) en embryozakken (Es).

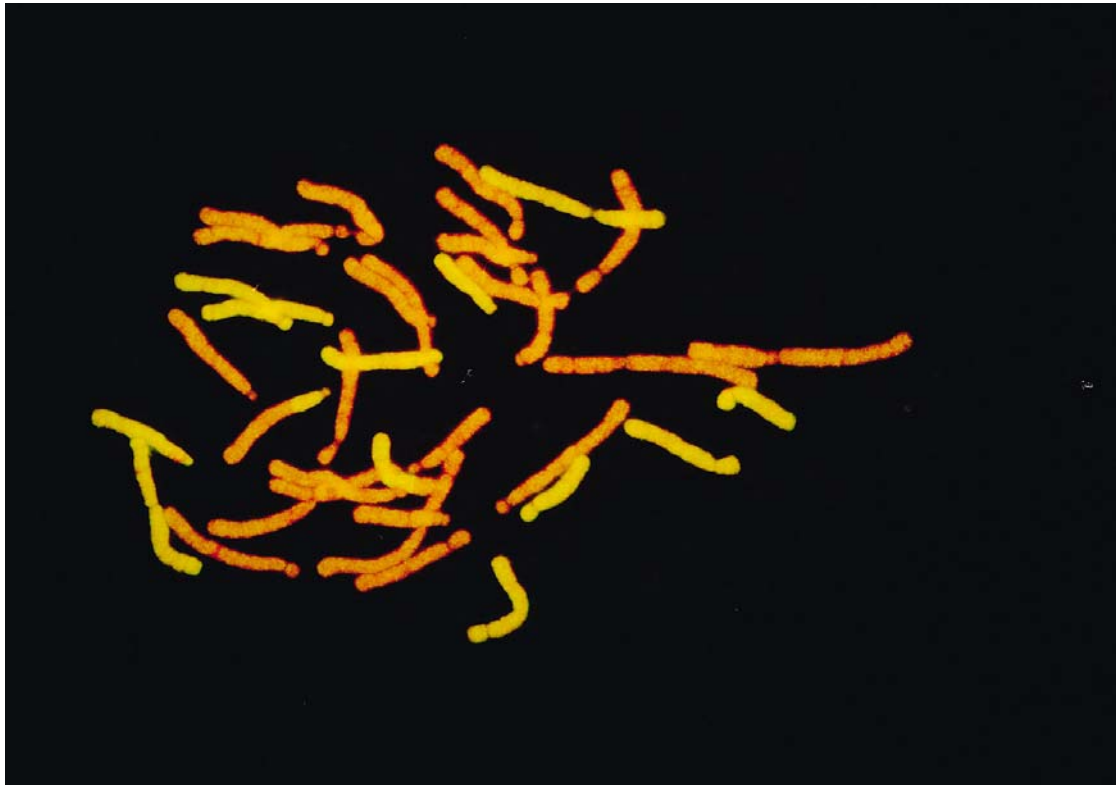
Female	Male	Group	Em #	Es #	G tot
002188-13	991112	AOA OA	15	21	27
002188-14	991112	AOA OA	0	2	1
002188-15	991112	AOA OA	0	26	15
002188-16	991112	AOA OA	0	18	11
002188-17	991112	AOA OA	4	0	4
002188-18	991112	AOA OA	0	8	6
002188-19	981022	AOA OA	2	18	11
002188-21	981022	AOA OA	0	10	9
002188-23	981022	AOA OA	2	0	2
002188-24	981022	AOA OA	0	4	2
002188-25	981022	AOA OA	2	26	15
002687 14	991112	AOA OA	0	1	1
Totaal			25	134	104

De tetraploide *L. longiflorum* x *L. canadense* blijkt opnieuw met aziaten goede zaadzetting te geven. Twee jaar geleden was dit ook al het geval. Eén van deze ALCan-hybriden heeft dit jaar gebloeid.

5.6. GISH-onderzoek

Er is een begin gemaakt met de chromosoomkleuringen van OA-kruisingen. Met name de uit 2n-gameten ontstane nakomelingen, waar recombinatie verwacht mag worden zijn als eerste bekeken. Van de kruising 002531 = Gironde x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) werden enkele nakomelingen onderzocht, nummer 12 bleek enkele fraaie recombinaties te vertonen (figuur 1).

Figuur 1. Een GISH plaatje van de triploïde AOA 002531-12 = Gironde x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) met enkele mooie gerecombineerde chromosomen (geel= oeroriental, oranje is aziaat).



5.7 Vervolgonderzoek

In overleg met de bedrijven is gewerkt aan een voorstel voor vervolgonderzoek, waarvoor bij het Productschap Tuinbouw subsidie is aangevraagd (zie bijlage 1). Een beslissing over toekenning is nog niet gevallen. Daarnaast is promotie-onderzoeker, Rodrigo Barba gearriveerd uit Mexico, die 3/4 jaar onderzoek komt doen aan “introgression breeding” bij OA-hybriden (zie ook het vorige halfjaar verslag).

5.8 Uitgifte materiaal

In overleg met Dick van Kleinwee, die contact heeft gehad met de andere bedrijven, zijn 10 nummers geselecteerd op basis van goede fertiliteit. Vijf nummers zijn in vitro gezet, maar helaas nog niet ver genoeg uitgegroeid om aan alle bedrijven mee te geven (deze volgen in het voorjaar). Nummer 002687-8 is in vitro uitgevallen en is daarom geschubd. Drie bedrijven hebben van de mogelijkheid gebruik gemaakt om nog 2 nummers extra te kiezen.

991107 OAOA (tetra 951914-1)
981013 OAOA (tetra 951584-1)
991357 OAOA (tetra 952400-1) in vitro
991303 LOLO (tetra LO97_korea)
970120 LCanLCan (tetra 921072-1)
002687-1 (AOA) in vitro
002687-8 (AOA) geschubd
002687-10 (AOA) in vitro
002687-13 (AOA) in vitro
002687-32 (AOA) in vitro

BT:
OOA 992682 in vitro
OA 962432-1

Sande:
OLO 992417
LLanLLan 991148

De Jong:
952400-1 (diploid)
771024 IS (botrytisresistent)

6. Publicaties en lezingen

Jaap van Tuyl 2002. Breeding and production of ornamental plants in The Netherlands. Lecture 21-10-2002 Intern Symp. Nanjing University, Jiangsu China

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 Liliium hybrids: a GISH analysis. TAG published online (Published online: 28 August 2002
<http://link.springer.de/link/service/journals/00122/contents/tfirst.htm>)

7. Plannen eerste helft 2003

- Inzetten van ziekte-toetsen (virus, Botrytis) van OA en AOA materiaal, om gericht naar een combinatie van ziekteresistentie en fertiliteit te kunnen werken
- Beoordeling nieuw hybride materiaal in de kas, test op fertiliteit, maken van kruisingen en toepassing van embryo-rescue methoden.
- Bestuderen van 2n-gameten in steriele OA-hybriden
- Opkweek nieuwe hybriden uit weefselkweek van het 2002 kruisingsprogramma en uitplanten in de kas
- Opplanting materiaal, organiseren kijkmiddagen
- In-situ hybridisatie experimenten voor de bestudering van introgressie.

Bijlage 1.**Projectvoorstel gehonoreerd bij Productschap Tuinbouw**

-
1. Datum: augustus 2002
 2. Projecttitel: Doorbreking van kruisingbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie.
 3. Onderzoek aangevraagd door: PRI & het gehele lelieveredelingsbedrijfsleven
 4. Projectleider: J.M. van Tuyl
Adres: Droevendaalsesteeg 1
Tel.nr: 0317 477329
Fax nr: 0317 418094
E-mailadres: j.m.vantuyl@plant.wag-ur.nl
 5. Overige uitvoerder(s):
 6. Intern projectnummer (onderzoekinstelling): 6600012
 7. Looptijd: 1-1-2003 – 31-12-2007
Totaal: 5 jaar
Begindatum: 1-1-2003
Einddatum: 31-12-2007
Tijdstip evt. go/no-go beslismoment(en): Medio 2005
 8. Gewassen: lelie
 9. Probleemstelling:

De grootste kruisingsbarrière, waarin het leliebedrijfsleven al meer dan 10 jaar veel energie en (onderzoeks)geld steekt is die tussen Aziatische en Oriëntal hybriden. Deze beide hybridengroepen 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.
 10. 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).

11. 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. Embryo rescue: 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 ddorgekruiste 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 word. 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 vervoloprogramma'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-hybriden, 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.

12. Bestaande kennis:

Het betreft hier een project dat al bijna 9 jaar loopt. In voorgaande projectperiode zijn reeds 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 hybridisatie-techniek goed te bestuderen (zie ref.). 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.

13. 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. oa. pollenbuiswaarnemingen, waarbij middels 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 ziektetoetsing worden vastgesteld.

Referenties:

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.

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 Wennekes, 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.

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.

14. Beoordelingscriteria go/no-go beslismoment:

- Aantoonbare resistenties in fertiel OA-materiaal, afkomstig van zowel Aziaat als Oriental achtergrond
- Behoorlijke aantallen nakomelingen uit fertiel OA-materiaal, met brede genetische achtergrond
- Aangetoonde introgressie via GISH in OA-materiaal
- Duidelijk uitzicht op doorbraak fertiliteit OA-hybriden
- Verbreding van de kennis m.b.t. doorbreken soortkruisingsbarrieres, ook toepasbaar bij andere bolgewassen.

15. Kennisoverdracht:

Voorlichting en rapportage t.b.v. het bloembollen bedrijfsleven zal plaats vinden d.m.v. lezingen en artikelen in de vakpers.

16. Data rapportages: halfjaarlijks (juni/december)

17. Projectkosten excl. BTW (in Euro, inclusief kennisoverdracht, gespecificeerde begroting in bijlage)
Voor dit project is BTW verschuldigd, de kostenberekening voor PT is overeenkomstig de raamovereenkomst met DLO.

18. Financiering in Euro:

PT 372780
PT+bedrijven 680770

	2003	2004	2005	2006	2007
Gevraagde PT-bijdrage:	68.850	71.749	74.107	77.377	80.700
Bijdrage andere financiers:	58.000	59.740	61.550	63.400	65.300
Bijdrage in natura:	126.850	131.489	135.654	140.777	146.000

Bijlage 2. Notulen bijeenkomst begeleidingscommissie (20-06-2002)

Aanwezig: P. Schenk (Bischoff Tulleken Lelies B.V.) (voorzitter); E. Hoogendijk (Bischoff Tulleken Lelies B.V.); (S. Bottema (Gebr. Bottema); Th. van Schie & H. Middelburg (Vanden Bos Breeding B.V.); P.J. Kos (Worldbreeding B.V.); A. van de Velde (H.P. Imanse veredeling B.V.); K. Laan (Laan Flora); A.A. van Silfhout; J. Matijssen; E.N. van Loo; J.M. van Tuyl (Plant Research International); A. Peterse (Testcentrum); C. Randag (Sande B.V.); W. de Wit (Gebr. Van Zanten); D. van Kleinwee (De Jong Lelies); **Afwezig:** A. Vletter (Vletter en den Haan BV).

1. Opening.

Na bezichtiging in de kas van de eerste bloeiende OOA werd de bijna voltallige vergadering door voorzitter P. Schenk geopend.

2. Mededelingen:

Na het vertrek van Lim is Alex van Silfhout als assistentonderzoeker aangetreden.

Het overlijden van Hans Sandbrink, begin jaren negentig onderzoeker moleculaire merkers lelie, en pas 43 jaar oud wordt gememoreerd.

3. Verslag bijeenkomst 13 december 2002: Naar aanleiding van punt 6. Bespreking voortzetting project na 2002, stelt de voorzitter de daar genoemde Dfl. 50.000 als mogelijk inkoopbedrag aan de orde. Algemeen werd dit een redelijk bedrag gevonden. Het nieuw toe te treden bedrijf is C. Steenvoorden BV. Alle kennis en materiaal zullen bij start van de nieuwe periode (1 januari 2003) dan ook ter beschikking komen van dit bedrijf.

4. Bespreking van het halfjaarlijks verslag

Het halfjaarlijkse verslag wordt puntsgewijs doorgelopen en toegelicht door ondergetekende.

De reden waarom de 2n-producerende OA 951502-1 nog geen hybriden heeft opgeleverd is nog niet helder. Dit in tegenstelling tot de 952400-1 die zowel OOA als AOA-hybriden heeft opgeleverd. Met eerstgenoemde waren geen AOA-combinaties gemaakt. Meer aandacht zal gericht worden op deze 2n-gameten producerende genotypen.

De Mexicaanse PhD-student die in September naar Wageningen zal komen, zal werken binnen het project, waarbij zijn salaris door de Mexicaanse overheid wordt betaald, en alleen de onderzoekskosten ten laste van het project zullen komen.

5. Presentatie: lelie als modelgewas soortkruisingen

De voordracht die voor de studiekring Plantenveredeling werd gegeven werd met een kleine uitbreiding en in verkorte vorm nogmaals gegeven.

6. Presentatie: Influence of high temperature treatments with a *semi in vitro* pollination technique in overcoming interspecific crossing barriers in *Lilium*

De presentatie van Doctoraal studente Femke Hoogervorst over haar afstudeer-onderzoek werd door ondergetekende gepresenteerd. De boodschap: 30 graden gedurende de eerste week na de bestuiving geeft de beste resultaten wat betreft het slagen van de OA-kruising Sorbonne x Connecticut King.

7. Bespreking voortzetting project na 2002

Piet Schenk licht het verloop toe: in overleg met PRI is een voorstel bij PT ingediend dat daar in eerste instantie positief is ontvangen en is aangehouden tot augustus. Het voorstel is voor advies ook naar Stiverbol gegaan.

Stiverbol adviseert positief, waarbij echter wel enkele randvoorwaarden werden gesteld o.a. t.a.v. de bijdrage aan de financiering van de bedrijven en de te verwachten revenuen. De vergadering verbaasde zich zeer over de stellingname van Stiverbol. Er zullen acties genomen worden om dit advies in zijn juiste proporties bij PT te presenteren. Jaap de Vries en andere leden van de PT-cie zullen worden benaderd.

8. Rondvraag en sluiting

Voorzitter Piet Schenk kondigt zijn vertrek als voorzitter van deze begeleidingsCie aan. Dit is ook de reden waarom 2 vertegenwoordigers van Bischoff bij deze vergadering aanwezig waren. In de december vergadering zal een nieuwe voorzitter bekend moeten zijn.

Datum volgende vergadering: 12 december 2002 Om 14.00 uur bij de HoBaHo in Lisse.

Jaap van Tuyl 21-06-2002

Bijlage 3

Uitnodiging bijeenkomst 12 december 2002

Dames en heren,

Graag nodig ik u uit voor de 20e bijeenkomst van de begeleidings-commissie van het leliesoortkruisingsonderzoek. Deze bijeenkomst vindt plaats op 12 december 2002 om 14.00 uur bij de HoBaHO in Lisse.

Bijgesloten (per Email) vindt u het halfjaarlijkse verslag. De notulen van de vorige vergadering zijn reeds in uw bezit, maar zijn hier ook bijgevoegd.

Agenda:

1. Opening
2. Mededelingen
3. Verslag vorige bijeenkomst 20 juni 2002
4. Bespreking van het halfjaarlijkse verslag
5. Presentatie doctoraal onderzoek Bram Lokker (2n-gameten bij OA-hybriden)
6. Uitgifte materiaal
7. Lelie collectie
8. Wisseling voorzitterschap
9. Rondvraag en sluiting

Met vriendelijke groet,

Jaap M. van Tuyl

1. Datum: juni 2003
2. Projecttitel: **Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie**
3. PT projectnummer: 11184
4. Intern projectnummer uitvoerder: 7600012.00
5. Projectleider: J.M. van Tuyl
Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel.nr: 0317 477329 0653362858
Fax nr: 0317 418094
E-mailadres: Jaap.vantuyl@wur.nl
6. Periode waarover wordt gerapporteerd: 1-1-2003 - 1-7-2003

7. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:
8. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

Op de website meer over het project <http://www.lilium.breeding.nl/project>

8.1. Algemeen

Personele inzet 2003

R. Barba Gonzalez
A.A. van Silfhout
J. Matijssen
J.M. van Tuyl

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
S. Bottema
M. Ceulemans
W.J. van Graas
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
H. Middelburg
C. Randag
A. van der Velde
A. Vletter
W. de Wit

8.2. Korte beschrijving doelstelling project

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).

8.3 Voortgang van het project

8.3.1 Algemeen

Het lelieproject gaat met bijdrage van PT zijn derde vervolgperiode. De rapportage is volgens het PT-format. De kassen op het terrein De Haaff worden voor het eerst gebruikt. In deze periode werd een bijdrage binnen het project geleverd door Carla Beers student veredeling van Universiteit Wageningen (Botrytis resistentie en 2n-gameten productie bij OA-hybriden (januari – augustus 2003) en Se-Jeong Kim (o.a. virusresistentie-onderzoek). De kijkmiddagen werden goed bezocht.

8.3.2 Bloei in OA vervolgekruisingen

Dit jaar zullen een flink aantal AOA, OOA en doorgekruiste tetraploïde OA's in bloei komen. Tijdens de kijkmiddagen hebben de bedrijven al kennis kunnen nemen van het zaailingmateriaal opgeplant in een warme kas, zoals aangegeven in onderstaande lijst. De populaties werden getest op fertiliteit en van een deel zijn Botrytis-toetsingen uitgevoerd (de Te 951301-5 x Gironde populaties). De fertiliteit blijkt sterk te variëren. Sommige doorgekruiste tetra OA's t.w. 012181 en 012304 bleken bijna 100% fertiliteit te vertonen, terwijl andere 014084 volledig steriel waren. De triploïde AOA en OOA-populaties bleken een per zaailing variërende fertiliteit te bezitten.

AOA	012022	Mont Blanc x Te 951301-5 (Merost x ConK)
OAA	012062	Te 951301-5 x Gironde
OAA	012063	Te 951301-5 x Gironde
OAA	012092	Te 951301-5 x Gironde
OAA	012105	Te 951301-5 x Gironde
AOA	012166	Amarone x te 951301-5
OAOA	012181	Te 951301-5 x Te 951462-1 (Rom x ConK)
OAOA	012304	Te 951301-5 x Te 951584-1 (Aca x Sancerre)
OAOA	014050	Te 951301-5 x Te 953508-1 (Expr x LadyR)
OAOA	014084	Te 951301-5 x Te 953508-1 (Expr x LadyR)
AOA	002687	Lanzarotte x Te 951301-5

In koude kas zullen nog een groot aantal triploïden in bloei komen, waarbij die afkomstig van de 2n-gameten producerende 952400-1, vanwege mogelijke recombinatie van A en O genoom zeer interessant zijn. Ook hier worden Botrytis-toetsingen uitgevoerd, waarbij de vergelijking van mitotisch met meiotisch verkregen AOA's gemaakt wordt. De populaties zijn:

- 002433 AOA** Gran Sasso x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten
- 002531 AOA** Gironde x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten
- 002526 AOA** Lanzarotte x 952400-1 (Merostar x Gran Sasso) 2n-gameten.

8.3.3 Screening 2n-gameten

Het 2n-gameten-onderzoek van vorig jaar, waarbij 10 2n-gametenproducerende OA's werden gevonden, heeft uiteindelijk ruim 450 nakomelingen opgeleverd (zie tabel 2, halfjaarverslag december 2002). Een deel van dit materiaal wordt gebruikt in het GISH-onderzoek om de mate van recombinatie tussen O en A-chromosomen te onderzoeken. Het ploïdie-niveau is bij enkele honderden onderzocht. Dit bleek grotendeels triploid, maar ook werden een aantal tetraploïden gevonden (met name waar Amarone als moeder werden gebruik).

8.3.4 Inductie van 2n-gameten

Vorige werden positieve resultaten verkregen met de inductie van 2n-gameten bij enkele steriele OA's die in een klimaatcel een wisseltemperatuur kregen. De temperatuurwisseling wisselde in de nacht (8 uur) en tijdens de dag (16 uur) van 10 naar 30 °C. Het effect was duidelijk: gemiddeld ruim 2% van de bloemen bleek (enige) fertiliteit te vertonen. Tussen de genotypen waren duidelijke verschillen. De proef werd laat in het seizoen uitgevoerd, waardoor weinig nakomelingen verkregen werden, die onderzocht kunnen worden op recombinatiefrequenties. Dit jaar wordt de proef vroeger in het seizoen herhaald.

8.3.5 Virusresistentie onderzoek

Navraag bij de lelieverdelers over de aanwezige resistenties in het huidige lelie-sortiment leverde helaas weinig concreets op. Voor kruisingsouders is dit jaar daarom gekozen voor Polyanne, Chainti en Connecticut King waarvan de virus en Fusarium-resistentie bekend is. In het ontwikkelde OA-materiaal is Connecticut King de belangrijkste bron van resistentie. In 8 OA's is tot nu toe fertiliteit gevonden. Daarom is het volgende materiaal gebruikt voor het virusresistentie-onderzoek: 951301-5 (MS x CK), 951462-1 (RS x CK), 942817-1, 942817-4 (Ex x CK), 952059-9 (Touch x CK), 942180-1 (Ex x CK), 981025 (Ex x CK), 002151 (GS x (BP x CK)), 002687, 002188, 012022, 012092 (zie website OA-AOA-OAA-OOA-OAOA hybriden).

Daarnaast zijn ook een aantal controle en nog onbekende rassen meegetoetst: Gironde, Hilde, Mirella, Dreamland, Chianti en diverse Longiflorum en Oriental-rassen.

Er is een veldtoets opgezet en er is een aanvang met een nauwkeurigere toets m.b.v. bladluizen.

1. Veldtoets:

Te toetsen genotypen worden om en om geplant met LMoV-zieke planten. Met Elisa worden aan het eind van het seizoen de te testen genotypen (OA en OA-nakomelingen) onderzocht op virus.

2. Toets met luizen:

Met bladluizen, die eerst op zieke planten en daarna op te infecteren planten worden gezet, kan preciezer de snelheid van virusoverdracht en daarmee de mate van resistentie worden bepaald.

8.3.6 Kruisingsprogramma 2002/2003

In 2002 is naast het werk met 2n-gameten (zie 8.3.3) veel aandacht besteed aan het onderzoek naar de kruisbaarheid van AOA en OOA-hybriden. Er werden met succes veel A x AOA, AOA x A en AOA x OA-kruisingen uitgevoerd. Het ploïdieniveau, flowcytometrisch bepaald, van deze nakomelingen varieerde bij de A x AOA combinaties van 2.2-2.8 en bij de AOA x OA-combinaties van 3.2-3.8.

8.3.5 GISH-onderzoek (Rodrigo Barba)

Male and female sterility in interspecific hybrids of lily is the mayor barrier that impossibilities the backcrossing of these hybrids and so forth the creation of new varieties of intersectional lily hybrids. Polyploidy is one way by which sterile interspecific hybrids may be fertile. Some chemicals has been used to induce polyploidy in lily hybrids. A diploid organism received one chromosome form the mother and the other from the father. Any gamete formed by this organism can only have either one or the other chromosome (fig 1a), however when there are more than one chromosome the possibilities of obtain the parental type decrease considerably (fig 1b). If there is exchange of genetic material

(crossing-over) maximum recombination is reached (fig 1c), which is necessary to introgress genes of interest into the new hybrids. Withal, intergenomic recombination is extremely decreased due to preferential chromosome pairing when chemicals have been used to induce poliploidy.

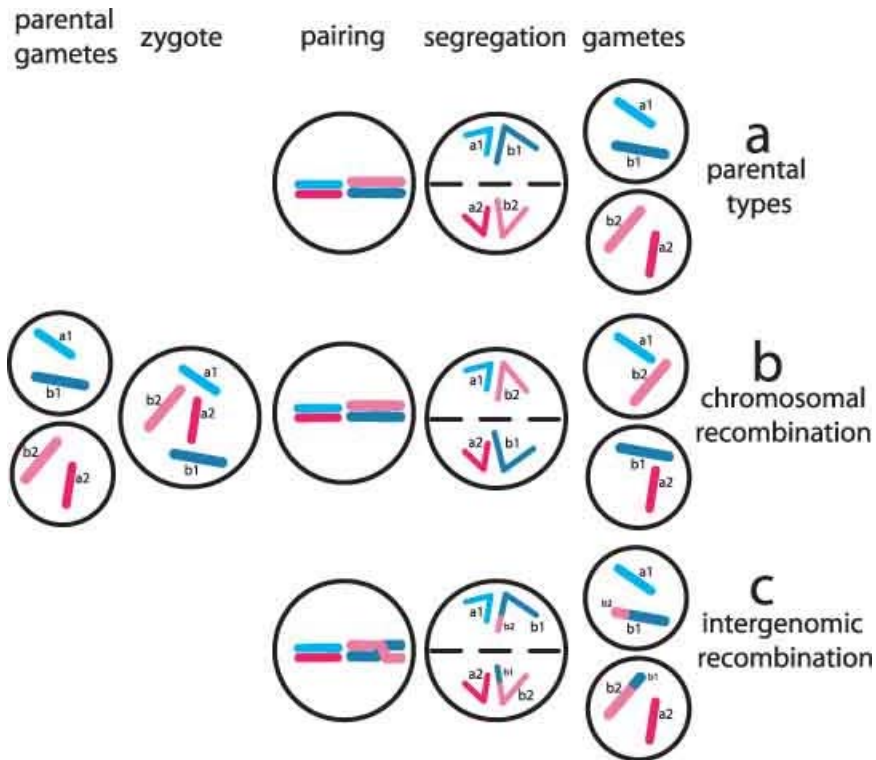


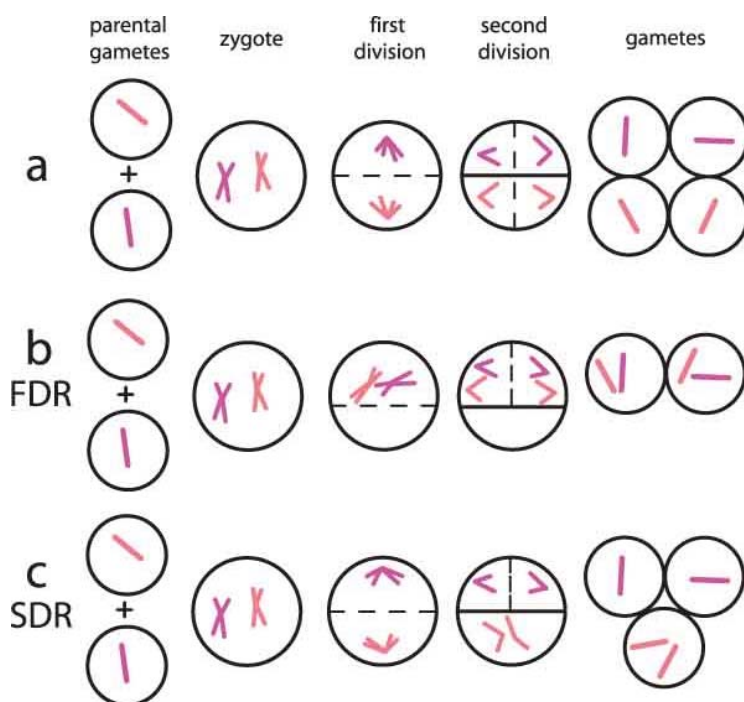
Fig 1. Summarised diagram of chromosomal recombination. (a) With one chromosome the chromosomal recombination is excluded if there is not crossing-over. (b) With more than one chromosome per genome different combinations may result in the gametes formed. (c) Maximum intergenomic recombination is achieved when there has been crossing-over among the chromosomes.

The mechanisms of 2n-gamete formation are classified due to their genetic consequences in two groups: the first division restitution (FDR) and the second division restitution (SDR). FDR 2n gametes comprise the non-sister chromatids of each homologous chromosome (fig 2b). SDR 2n gametes contain both sister chromatids of each parent, whereas the homoeologous sister chromatids will be included in the counterpart 2n gamete within a dyad (fig 2c).

Fig 2. Meiotic restitution mechanisms. (a) Four haploid cells form a tetrad, the result of a normal meiosis. (b) Two 2n gametes which comprises the two non-sister chromatids of the homologous chromosome are generated with FDR. (c) The sister chromatids of the homologous chromosomes are comprised in a dyad when SDR forms a 2n gamete.

Certain lily hybrids inter-specific lilies produce relatively high frequencies of 2n gametes. However, the 2n gametes production can be enhanced by heat treatments. Such hybrids offer the prospect of using diploid hybrid genotypes directly for introgression breeding without the need of mitotic chromosome doubling.

Anthers of an Asiatic hybrid and an already known 2n-gamete producer (951502-1) were examined in order to correlate the size of the anthers with the meiotic stage. Later, anthers of another known 2n gamete producer, an Oriental-Asiatic (OA) hybrid were collected. Two mechanisms of 2n-gamete production has been detected, the mechanisms correspond to FDR (fig 1a,b) and SDR (fig 1c).



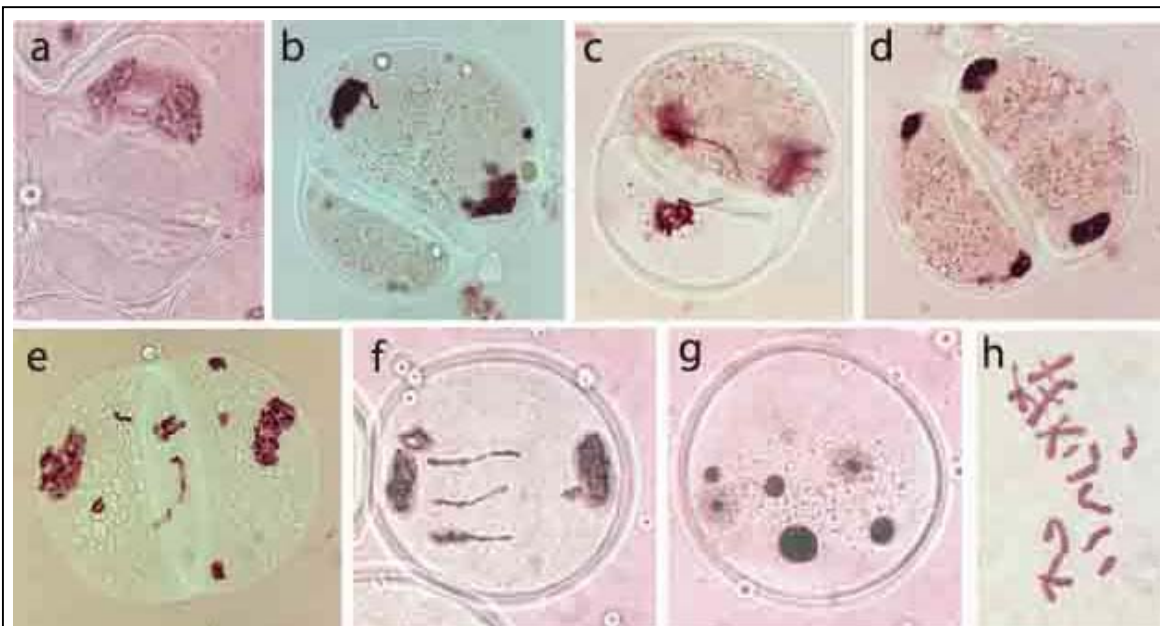


Fig 2. Abnormalities in PMCs. (a) FDR in the first meiotic division and (b) in the second meiotic division. (c) SDR in PMC in telophase II. (d) Normal tetrad. (e) Chromosome laggard result of the spindle malfunction. (f) Chromosome laggard in telophase II. (g) Multinucleated cell originated by the condensation of the chromosome laggards. (h) Twelve bivalents, the normal number of chromosome associations.

However, several abnormalities have been detected, such as chromosome bridges and laggards (fig 2c,e,f) which leads to multinucleated cells (fig 2g). All this abnormalities are some of the causes of pollen infertility due to an imbalance in the chromosome number in the resulting gametes. These alterations affect directly in a lack of chromosome pairing and spindle malfunction, the first gives orientation to the chromosomes and the second must pull the chromosomes to the opposite poles. Alterations were not found in all the pollen mother cells (PMCs) and normal chromosome pairing (fig 2h) and tetrad are found (fig 2d).

GISH analyses in the progeny of this OA hybrids suggests that FDR or a similar 2n-gamete mechanism is responsible for the 2n pollen, formation due to the presence of the non-sister chromatids of the homologous chromosomes (fig 3). Nevertheless the SDR is found, apparently the gametes resulting form this mechanism are sterile. Crossing over is also present, this can be seen in recombinant chromosomes among the OAs offspring (fig 3c,e,f,i) and in the OA itself when meiosis is taking place (fig 3g,h,j).

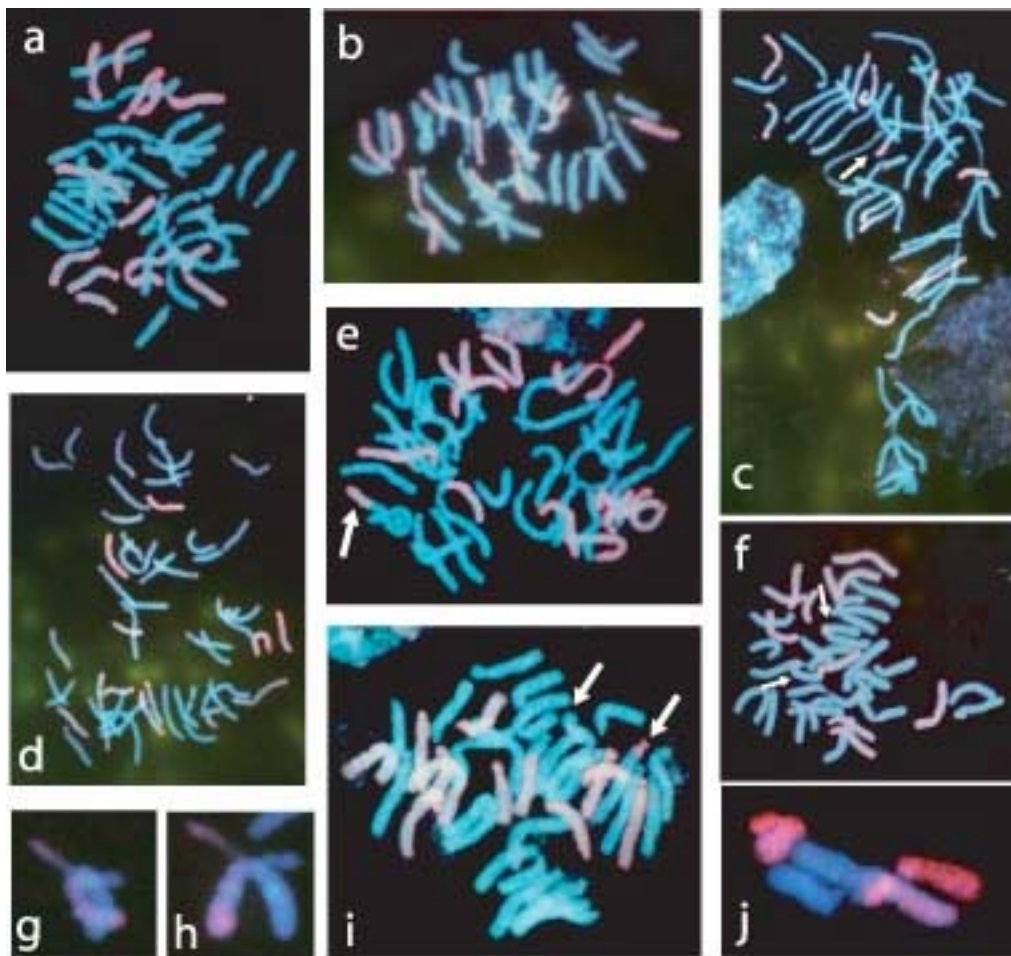


Fig 3. GISH analysis in mitotic cells of an OA offspring and meiotic chromosomes of an OA hybrid. Oriental chromosomes in pink and Asiatic chromosomes in blue. (a) 12 Oriental chromosomes and 24 Asiatic chromosomes in an AOA hybrid (022218-7 = Gironde x 952400-1). (b) Triploid AOA hybrid chromosomes with one set of Oriental chromosomes and two sets of Asiatic chromosomes. (022215-1 = 952400-1 x Mont Blanc) (c) AOA hybrid with a recombinant chromosome (arrow) (022219-2 = Mont Blanc x 952400-1). (d) Tetraploid AAOA hybrid, produced by the union of two 2n-gametes, one from the Asiatic hybrid and the other from the OA hybrid (022218-11). (e) Recombination in one of the chromosomes of the AOA hybrid (022218-4). (f) Two recombinant chromosomes in an AOA hybrid (012168-10 = Mont Blanc x 951914-1). (g) Meiotic chromosomal pairing of homologous chromosomes with two possible over-crossing sections (951502-1). (h) Meiotic chromosomal pairing with one recombination site (951502-1). (i) Two recombinant chromosomes in an AOA hybrid, each chromosome has the counterpart of the other (022217-3 = Gironde x 952400-1). (j) Chromosome pairing in a meiotic cell of an OA hybrid (951502-1).

8.4. Publicaties

Ki-Byung Lim, 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. *TAG* 106: 568-574.

Jaap M. Van Tuyl, Mi-Young Chung, Jae-Dong Chung & Ki-Byung Lim. 2003. Introgression studies using GISH in interspecific *Lilium* hybrids of *L. Longiflorum* x *Asiatic*, *L. Longiflorum* x *L. Rubellum* and *L. Auratum* x *L. Henryi*. *The lily yearbook of the NALS* 55 (2002).

9. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

- Stuifmeel van diverse tetraploïde OA en triploïde AOA, OAA welke tijdens de kijkmiddagen ter beschikking zijn gesteld
- Enkele publicaties in wetenschappelijke tijdschriften (zie 8.4)

10. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

- Het project loopt volgens planning

11. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

- beoordeling doorgekruist OA-materiaal, vaststelling fertiliteit
- uitvoering van ziekte toetsen (*Botrytis* en virus)
- uitvoering GISH-onderzoek gericht op vinden van recombinaties tussen O- en A-genoom en introgressie van resistenties
- onderzoek mechanismen 2n-gameet productie
- onderzoek beïnvloeding van 2n-gameet-productie
- uitvoering van toetskruisingen met nieuw OA materiaal gericht op inbreng van Virus en *Fusarium* en *Botrytis* resistentie

12. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

1. Datum: november 2003
2. Projecttitel: **Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie**
3. PT projectnummer: 11184
4. Intern projectnummer uitvoerder: 76000012.00
5. Projectleider: J.M. van Tuyl
 Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
 Tel.nr: 0317 477329 0653362858
 Fax nr: 0317 418094
 E-mailadres: Jaap.vantuyl@wur.nl
6. Periode waarover wordt gerapporteerd: 1-7-2003 - 1-12-2003

7. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:
8. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

Op de website meer over het project <http://www.liliumbreeding.nl/project>

8.1. Algemeen

Personele inzet 2003

R. Barba Gonzalez
 A.A. van Silfhout
 J. van Schaik
 J.M. van Tuyl
 M.S. Ramanna
 (K.B. Lim)

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
 S. Bottema
 M. Ceulemans
 W.J. van Graas
 E. Hoogendijk
 P.J. Kos
 K. Laan
 H. Middelburg
 C. Randag
 A. van der Velde
 A. Vletter
 W. de Wit

8.2. Korte beschrijving doelstelling project

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).

8.3 Voortgang van het project

8.3.1 Algemeen

In deze periode werd een bijdrage binnen het project geleverd door Carla Beers student veredeling van Universiteit Wageningen (Botrytis resistentie en 2n-gameten productie bij OA-hybriden (januari – oktober 2003) en Se-Jeong Kim (o.a. virusresistentie-onderzoek). De kijkmiddagen werden goed bezocht. Na een bezoek aan Ki-Byung Lim is aan Dr. M.S. Ramanna gevraagd het lelie 2n-gameten-onderzoek te willen ondersteunen als adviseur (zie ook 8.4).

8.3.2 Bloei in OA vervolgekruisingen

Dit jaar zijn een groot aantal AOA, OAA en doorgekruiste tetraploïde OA's in bloei gekomen. Tijdens de kijkmiddagen hebben de bedrijven kennis kunnen nemen van het zaailingmateriaal opgeplant in een warme kas en tunnel (voor lijsten zie de website). De populaties werden getest op fertiliteit en van een deel zijn Botrytis-toetsingen uitgevoerd (met name de Te 951301-5 x Gironde populaties). De fertiliteit blijkt sterk te variëren. Sommige doorgekruiste tetra OA's t.w. 012181 en 012304 bleken qua pollen 100% fertiliteit te vertonen, terwijl andere 014084 volledig steriel waren. Anderzijds bleek de fertiliteit als moeder soms zeer laag (012304). De triploïde AOA en OAA-populaties bleken een per zaailing variërende fertiliteit te bezitten. Op de website zijn van een aantal selecties foto's geplaatst.

8.3.3 Screening 2n-gameten

Het 2n-gameten-onderzoek van vorig jaar, waarbij 10 2n-gametenproducerende OA's werden gevonden, heeft uiteindelijk ruim 500 nakomelingen opgeleverd. Een deel van dit materiaal is/wordt gebruikt in het GISH-onderzoek om de mate van recombinatie tussen O en A-chromosomen te onderzoeken (zie 8.3.5). Het ploïdie-niveau is bij 260 nakomelingen onderzocht. Dit bleek grotendeels triploid, maar ook werden een 14-tal tetraploïden gevonden (met name waar Amarone als moeder werden gebruikt). Blijkbaar spelen 2n-eicellen hier ook een rol. De resultaten zijn inmiddels in een concept artikel vastgelegd.

8.3.4 Inductie van 2n-gameten

Voorgaande jaren werden positieve resultaten verkregen met de inductie van 2n-gameten bij enkele steriele OA's die in een klimaatcel een wisseltemperatuur kregen. De temperatuurwisseling wisselde in de nacht (8 uur) en tijdens de dag (16 uur) van 10 naar 30 °C. Vorig jaar was het effect duidelijk: gemiddeld ruim 2% van de bloemen bleek (enige) fertiliteit te vertonen. Tussen de genotypen waren duidelijke verschillen. De proef werd laat in het seizoen uitgevoerd, waardoor weinig nakomelingen verkregen werden. Dit jaar is de proef vroeger in het seizoen herhaald. De resultaten waren geringer dan vorig jaar. 0,8% van de bloemen vertoonde fertiliteit, waarbij 951462-1 met 3,4 % opnieuw het hoogste percentage 2n-gameten te zien gaf. Mogelijk is dit resultaat te wijten aan de gebruikte klimaatkamer, die de grote temperatuur fluctuaties niet kon realiseren.

8.3.5 Virusresistentie onderzoek

De kruisingsouders die dit jaar met name voor virusresistentie waren gekozen waren Polyanne, Chianti en Connecticut King waarvan de virus en Fusarium-resistentie bekend is. In 8.3.6 staan de resultaten met deze Aziaten in OA-kruisingen beschreven

Daarnaast zijn ook een aantal controle en nog onbekende rassen meegetoetst: Gironde, Hilde, Mirella, Dreamland, Chianti en diverse Longiflorum en Oriental-rassen.

Er is een veldtoets opgezet en er is een aanvang met een nauwkeurigere toets m.b.v. bladluizen.

1. Veldtoets:

De te toetsen genotypen zijn om en om geplant met LMoV-zieke planten. Met Elisa werd aan het eind van het seizoen een gedeelte van de genotypen (OA en OA-nakomelingen) onderzocht op virus. De 15 gemonsterde nummers bleken allen LSV te bevatten, in 2 monsters werd ook LMoV gevonden. Mogelijk heeft het LMoV langere tijd nodig om zich in de plant te vermeerderen. Volgend jaar zal opnieuw getoetst worden.

2. Toets met luizen:

Van de te toetsen genotypen (6 bollen per genotype; zie onderstaande tabel) werden 4 weken na planten van de bollen tien bladluizen op zieke planten en daarna op te infecteren planten geplaatst. De toets werd in de tijd herhaald (in mei en juni) Na 4 en 8 weken werden bladmonsters en na 12 weken bij het rooien van de bollen een schubmonster genomen om met Elisa de aanwezigheid van virus te bepalen. In de bladtoets kon vrijwel geen virus worden aangetoond. In de schubmonsters werd in de eerste proef bijna 20% LSV en 1,5% LMoV, in de tweede proef, waarbij de planten verder ontwikkeld waren was dit ruim 50% LSV en 1,5 % LMoV. Er zal volgend voorjaar opnieuw via een bladtoets naar een verdere aantasting gekeken worden.

Het aantal LSV en LMoV aantastingen in 2 experimenten met 12 genotypen, elk 6 bollen na met luizen besmet te zijn geweest

	I		II	
	LSV	LMoV	LSV	LMoV
Sorbonne	4		2	
Siberia	2		5	
Rialto			2	
Chianti	1		4	
Gironde			2	1
Polyanne	3		5	
Snow Queen			1	
Eurostar		1		
White Fox			1	
Te OA 951462-1			6	
Te OA 951301-5			4	
Te OA 953508-1	3		2	
totaal	13	1	34	1
percentage	19.7	1.5	51.5	1.5

8.3.6 Kruisingsprogramma 2003

De kruisingen die dit jaar gemaakt zijn hebben zich geconcentreerd op de volgende thema's:

- terugkruisingen met nieuwe AOA en OAA's gericht op virus-resistentie (Polyanne , Chianti en Connecticut King)
- kruisingen met 2n-gameten producerende OA's (ca 800 bloemen)
- terugkruisingen met doorgekruiste tetraploïde OA's (ca 600 bloemen)
- kruisingen met 2n-pollen geïnduceerd na warmteschokbehandeling (ca 700 bloemen)

Totaal werden ruim 3600 bloemen bestoven, die deels in vitro werden gebracht en deels normaal werden geoogst. Ruim 2500 embryo's en embryozakken en bijna 700 zaadknoppen werden in vitro gebracht. Dit heeft tot half november 727 gekiemde plantjes opgeleverd. Verrassend was de zaadopbrengst waarbij geen embryocultuur is toegepast: 1200 zaaddozen leverde 1137 zaden (met een embryo) op. Vorig jaar waren enkele zaaddozen (AOA x A) normaal geoogst en na uitzaai dit jaar werd uit ruim 20% van de zaden goede planten verkregen! De geslaagde combinaties staan in onderstaande tabel met de aantallen bestoven bloemen, de gekiemde embryo's en de zaden. Enkele opvallende resultaten:

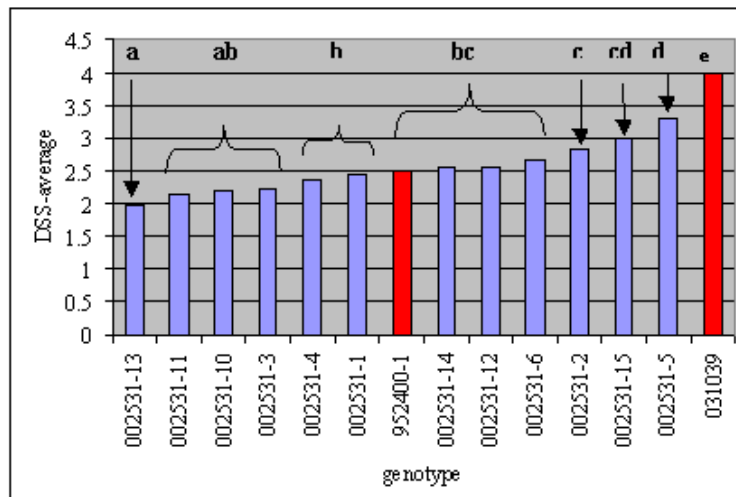
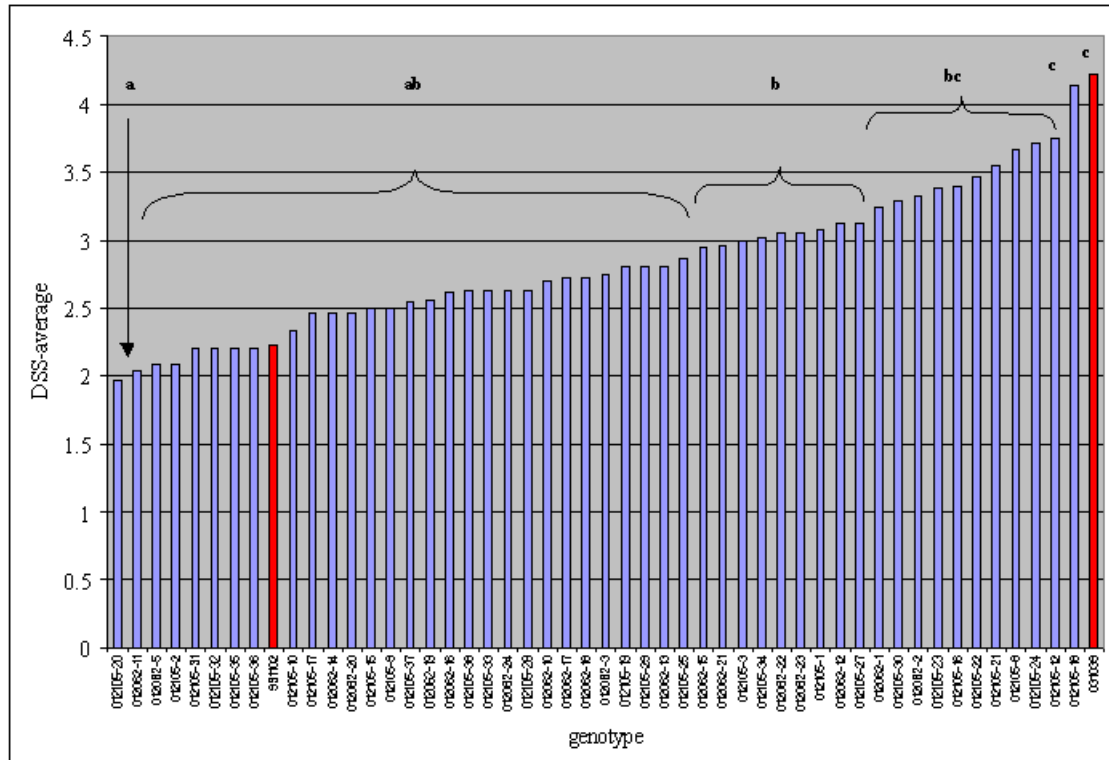
- 92 OOA's, vooral afkomstig van de doorgekruiste tetra OA 012304
- 13 LOOA en 16 LAOA, eveneens afkomstig van de doorgekruiste tetra OA 012304
- de belangrijkste kruisingsouders waren Polyanne en Connecticut King (als vader in 710 en als moeder aanwezig in 210 nakomelingen).

Type	Bloemen	Vitro	Zaden
A AOA	77	16	14
A OA	381	426	165
A OAA	45	5	
AOA A	518	48	670
AOA OA	168	44	2
LA OA	5	5	11
LO OA	8	13	
O OA	220	92	
OA A	880	30	21
OA AA	4	0	5
OA O	80	2	3
OA OA	924	30	7
OAA A	139	1	173
OAA OA	20	4	
OAA A	24	0	41
Totaal	3520	727	1137

8.3.7 Botrytis-toetsingen

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 Te 951301-5 x Gironde en bloeiden voor de eerste keer. Gironde is zeer vatbaar de Te 951301-5 resistent. De resistentie van de zaailingen varieerde van de vatbaarheid van Gironde tot resistentier dan Te 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 resistentier was dan

de OA. Onderstaande figuren afkomstig uit het onderzoeksverslag van Carla Beers illustreren het een en ander.



8.3.8 First division restitution (FDR) mechanisms which lead to recombination in the OA-hybrids 952400-1 and 951502-1

Most of the plants produce $2n$ gametes in different frequencies and probably all polyploid plants were originated from functioning $2n$ gametes (Harlan and De Wet, 1975). Such polyploids are the so-called sexual polyploids. The genus *Lilium* is not the exception and different meiotic restitution mechanisms have been identified such as first division restitution (FDR), second division restitution (SDR) in OA hybrids (previous report) and a third mechanism, indeterminate meiotic restitution (IMR) in LA hybrids (Lim *et al.*, 2001). The sexual polyploids are preferred over the mitotic doubled polyploids due to the presence of recombinant chromosomes in the sexual polyploids which is absent in the mitotic polyploids attributable to the preferential pairing of the homologous chromosomes. The importance of recombination in the chromosomes is the feasibility of introgress genes from one section into another.

Restitution mechanisms

Pollen mother cells (PMC) from the OA hybrid 951502-1 were investigated in order to find the mechanisms that result in $2n$ pollen. Now three mechanisms have been identified to produce unreduced pollen, FDR, SDR and analogous mechanism to FDR with the same genetic consequences (figs 1a-d). In the FDR the sister chromatids are segregated to the poles of the cell resembling a mitosis (fig 1a-c). In the analogous mechanism the sister chromatids are not segregated and the chromosomes remain in one pole of the cell as a result of a malfunction of the spindle and a cell wall separate the cell in two. One of the resulting cells contain the whole chromosome set and the other none of the chromosomes, in a second division the sister chromatids segregate (fig 1d). The resulting unreduced pollen in both cases comprises the non-sister chromatids of the homologous chromosomes.

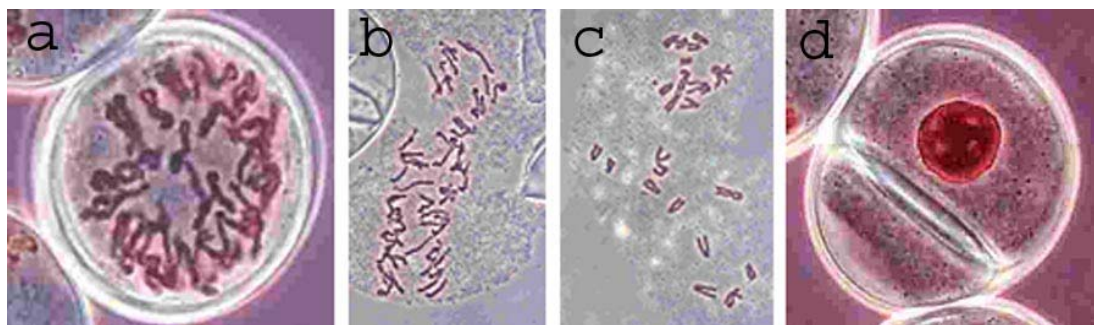


Figure 1. Two restitution mechanisms in PMC of 951502-1. a. FDR the separation of sister chromatids is evident. b. Segregation of the sister chromatids to the opposite poles of the PMC, resembling a mitosis. c. Squash preparation of a PMC in which the sister chromatids begin to segregate. d. Analogous mechanism of the FDR in which the complete set of chromosomes remains in one cell after a cell division.

Chromosome pairing frequency

Chromosome pairing is one of the advantages of unreduced gametes. The chromosome pairing in the OA hybrid 951502-1 and 952400-1 was investigated to know the frequency of bivalent formation (Table 1). There is a relative high frequency of bivalent formation that ranged from 1 - 6 in the case of 951502-1 (fig 2a-c) and 1 - 4 in 952400-1. The mean frequency in of both F_1 hybrids is rather similar however more observations in 952400-1 are needed. In some cases more than one chiasma could be

detected in a single chromosome (fig 2c) which indicates more than one recombination in a chromosome.

Table 1. Pairing frequency in 951502-1 and 952400-1.

F ₁	Obs.	12 _{II} 0 _I	11 _{II} 2 _I	10 _{II} 4 _I	9 _{II} 6 _I	8 _{II} 8 _I	7 _{II} 10 _I	6 _{II} 12 _I	5 _{II} 14 _I	4 _{II} 16 _I	3 _{II} 18 _I	2 _{II} 20 _I	1 _{II} 22 _I	0 _{II} 24 _I	Mean Frequency
951502-1	296	0	0	0	0	0	0	1	3	13	26	63	99	91	1.25 _{II} + 21.88 _I
952400-1	50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	13	14	19	1.06 _{II} + 21.49 _I

II = bivalent, I = univalent

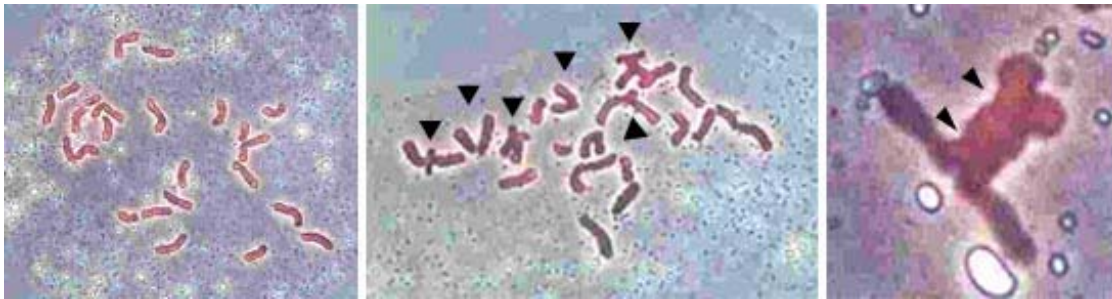


Figure 2. Chromosome pairing in 951502-1. a. 24 univalents. b. 6 univalents and 12 univalents. Arrows show the bivalents. c. bivalent with two chiasmata. Arrows show the possible recombination point.

Genomic *in situ* hybridization (GISH)

GISH was performed in several BC₁ progenies derived from two 2n gametes producers, 952400-1 and 951502-1 to detect the parental genomes and the recombinant chromosomes if were present. 30 BC₁ plants were analyzed, 18 have recombinant chromosomes of which 5 were derived from the OA hybrid 952400-1 and the other 13 were derived from the OA hybrid 951502-1 (Table 2). There is a difference in the recombinant number of chromosomes between the two parents, the progeny derived from 951502-1 has a high number of recombinant chromosomes and most of the plants have at least one recombinant chromosome (fig 3a-b).

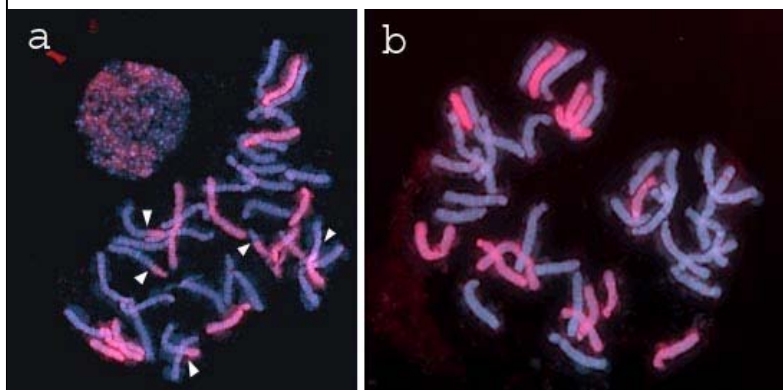


Figure 2. GISH in progeny derived from 951502-1. Pin⁺ fluorescence represent Oriental chromosomes and the blue fluorescence represent the Asiatic chromosomes. a. 022604-5 with 5 recombinant chromosomes (arrows). b. 022604-6 without recombinant chromosomes.

Table 2. Presence and number of recombinant chromosomes in the progeny from 952400-1 and 951502-1

Crossing Code	Parents		Recombination	Number of Recombinant Chromosomes
	Female	Male		
022215-1	952400-1	Mont Blanc	N	-
022217-1	Gironde	952400-1	Y	2
022217-2	Gironde	952400-1	N	-
022217-3	Gironde	952400-1	Y	2
022217-4	Gironde	952400-1	N	-
022217-5	Gironde	952400-1	Y	1
022218-1	Gironde	952400-1	N	-
022218-3	Gironde	952400-1	N	-
022218-4	Gironde	952400-1	Y	1
022218-5	Gironde	952400-1	N	-
022218-7	Gironde	952400-1	N	-
022218-10	Gironde	952400-1	N	-
022218-11	Gironde	952400-1	N	-
022219-2	Mont Blanc	952400-1	Y	1
022538-2	Amarone	951502-1	Y	5*
022538-4	Amarone	951502-1	Y	5
022538-6	Amarone	951502-1	Y	2
022544-2	991110	951502-1	N	-
022604-1	Gironde	951502-1	Y	1*
022604-2	Gironde	951502-1	Y	5*
022604-3	Gironde	951502-1	Y	3
022604-4	Gironde	951502-1	Y	2
022604-5	Gironde	951502-1	Y	5
022604-6	Gironde	951502-1	N	-
022604-7	Gironde	951502-1	Y	2
022604-9	Gironde	951502-1	Y	1
022604-10	Gironde	951502-1	N	-
022611-4	Gironde	951502-1	Y	3*
022631	991108	951502-1	Y	2
022643-3	Amarone	951502-1	Y	1

* Probably +1 recombinant chromosome, the recombination could be a thin band.

8.4. Publicaties

Rodrigo Barba-Gonzalez, Bram H. Lokker, Ki-Byung Lim, Muncote S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental x Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*) concept.

Carla Beers. Study of mitotic and meiotic derived BC1 progenies of OA Lily hybrids. MSc-thesis, 62 pp.

Ramanna, M.S. & E. Jacobsen 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement. A review. *Euphytica* 133: 3–18.

Van Tuyl, Jaap, Mi-Young Chung, Jae-Dong Chung & Ki-Byung Lim. 2003. Introgression studies using GISH in interspecific *Lilium* hybrids of *L. Longiflorum* x Asiatic, *L. Longiflorum* x *L. Rubellum* and *L. Auratum* x *L. Henryi*. *The lily yearbook of the NALS* 55 (2002): 17-22, 70-72.

Van Tuyl JM & Lim KB 2003. Interspecific hybridization and polyploidization as tools in ornamental plant breeding. *Acta Hort* 612: 13-22 (Proc 21th IS on classical/molecular breeding of ornamental plants).

Lim, K.-B., Tsai-Mu Shen, M.S. Ramanna & J.M. Van Tuyl, 2004. Occurrence of numerically unreduced gametes in *Lilium* hybrids and its relevance for breeding. *Breeding Science* in press.

9. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

- uitgifte van bolmateriaal

Type	Monsternr.	moeder	vader	grb	plg	wk bol
AOA	002687-1	001099 Lanz	951301 5			12
AOA	002687-8	001099 Lanz	951301 5	12		
AOA	002687-10	001099 Lanz	951301 5	12		
AOA	002687-13	001099 Lanz	951301 5	12		
AOA	002687-32	001099 Lanz	951301 5			12
AOA	002188	001065 GS	970123	36		
AOA	002147	001065 GS	981029	48		
AOA	002147-56	001065 GS	981029	36		
AOA	002526-2	GS	952400-1		24	
AOA	002531-12	001096 Gironde	952400-1		24	
OAOA	012304	Te 951301-5	Te 951584-1	36		
OAOA	991357	Te 952400-1			11	1

- Enkele publicaties in wetenschappelijke tijdschriften (zie 8.4)

10. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

- Het project loopt volgens planning

11. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

- Voortzetting resistentie toetsing (Botrytis en virus)
- Uitvoering Fusarium-resistentie-toets
- Uitvoering GISH-onderzoek gericht op vinden van recombinaties tussen O- en A-genoom en introgressie van resistenties; Bestudering van verschillende 2n-gameten producerende OA-hybriden
- Opkweek van embryocultuur materiaal afkomstig van OA-doorkruisingen, gericht op virus-, Fusarium en Botrytis resistentie
- Uitvoering van toetskruisingen met nieuw OA materiaal gericht op inbreng van Virus en Fusarium en Botrytis resistentie
- Deelname 9e International Symposium on Flower Bulbs Japan, 19-22 April, Niigata

12. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Nee

1. Datum: juni 2004

2. Projecttitel: **Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie**

3. PT projectnummer: 11184

4. Intern projectnummer uitvoerder: 76000012.00

5. Projectleider: J.M. van Tuyl
 Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
 Tel.nr: 0317 477329 0653362858
 Fax nr: 0317 418094
 E-mailadres: Jaap.vantuyl@wur.nl

6. Periode waarover wordt gerapporteerd: 1-12-2003 - 1-6-2004

7. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:
 8. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

Op de website meer over het project <http://www.liliumbreeding.nl/project>

8.1. Algemeen

Personele inzet 2004

R. Barba Gonzalez
 S. Zhou
 A.A. van Silfhout
 J. van Schaik
 J.M. van Tuyl
 M.S. Ramanna
 (K.B. Lim)

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
 S. Bottema
 M. Ceulemans
 W.J. van Graas
 E. Hoogendijk
 P.J. Kos
 K. Laan
 H. Middelburg
 C. Randag
 A. van der Velde
 A. Vletter
 W. de Wit

8.2. Korte beschrijving doelstelling project

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).

8.3 Voortgang van het project

8.3.1 Algemeen

In april zijn Jaap en Rodrigo naar het Internationale Congres voor bloembollenonderzoek in Japan, Niigata geweest. In mei dit jaar kwam Shujun Zhou vanuit China om onderzoek aan recombinatie m.b.v. GISH te gaan doen. In de zomerperiode zal MsC-studente Susana Vivar zich o.a. bezig houden met Botrytis-toetsen. Er zijn dit jaar opnieuw 4 kijkmiddagen gepland t.w. op 18 mei, 1 juni, 15 juni en 29 juni. De plantlijsten van het te bezichtigen materiaal staan op de website. Dit materiaal, inmiddels 5 bedden bloeit vanaf half juni.

8.3.2 Fusarium-toets (A)OA-materiaal

In de 1e week van mei werd een Fusarium-test ingezet met ruim 100 (A)OA-genotypen. In 3 herhalingen zijn 5 schubbolletjes in met Fusarium-besmette grond geplant. De gekozen nummers zijn in onderstaande lijst weergegeven. Het gaat om dezelfde mitotische en meiotische populaties waarvan vorig jaar de Botrytis-resistentie bepaald is (zie vorig verslag). Begin juli zal naar verwachting gescoord kunnen worden.

Tabel 1. Genotypen in de Fusarium-toets 2004

012062-1 OAA	124	012105-37 OAA	149	002531-12A AOA	174	952462-1 OA	199
012062-5 OAA	125	012105-38 OAA	150	002531-13 AOA	175	962119-1 OA	200
012063-8 OAA	126	992738-2 OOA	151	002531-15 AOA	176	962120-1 OA	201
012063-10 OAA	127	002122-1 AOA	152	002538-1 OAA	177	952400-1 OA	202
012063-14 OAA	128	002122 2 AOA	153	002538-2 OAA	178	951584 1 OA	203
012063-15 OAA	129	002122 3 AOA	154	012065-1 OAA	179	962433 1 OA	204
012063-19 OAA	130	002433-1 AOA	155	012022-6 OAA	180	951502 1 OA	205
012063-21 OAA	131	002433-1A AOA	156	012022-20 OAA	181	951462 1 OA	206
012092-4 OAA	132	002433-2 AOA	157	012062-7 OAA	182	951914 1 OA	207
012092-5 OAA	133	002526-1 AOA	158	012063-2 OAA	183	951301 5 OA	208
012092-12 OAA	134	002526-1A AOA	159	012063-3 OAA	184	031043 LL	209
012092-28 OAA	135	002526-4 AOA	160	012105-11 OAA	185	031043 LL	210
012092-29 OAA	136	002526-5 AOA	161	012105-20 OAA	186	991101 OAOA	211
012092-32 OAA	137	002526-6 AOA	162	012092-11 OAA	187	991102 OAOA	212
012092-33 OAA	138	002526-7 AOA	163	002687-114 AOA	188	012304-1 OAOA	213
012092-34 OAA	139	002531-1 AOA	164	002687-127 AOA	189	991435 OAOA	214
012092-35 OAA	140	002531-2 AOA	165	002687-132 AOA	190	021055 Con King	215
012092-36 OAA	141	002531-3 AOA	166	002687-147 AOA	191	031039 Gironde	216
012105-2 OAA	142	002531-4 AOA	167	031104 Merostar	192	031040 Amarone	217
012105-9 OAA	143	002531-5 AOA	168	031105 Expression	193	031042 Chianti	218
012105-10 OAA	144	002531-6 AOA	169	031106 Bels Paso	194	031028 Polyanne	219
012105-31 OAA	145	002531-10A AOA	170	031107 Pesaro	195	021055 Con King	220
012105-32 OAA	146	002531-11 AOA	171	031108 Sissi	196	980072 Mont lanc	221
012105-35 OAA	147	002531-11A AOA	172	031110 Lanzarote	197	031035 Siberia	222
012105-36 OAA	148	002531-12 AOA	173	952088-2 OA	198	031031 Sorbonne	223
						940260 GranSasso	224

8.3.3 Virus resistentie m.b.v. moleculaire toets

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 Project indirecte selectie: Eindrapportage](#)). Hieruit bleek dat 951301-5 en 952462-1 dit bandje niet hebben, maar 951462-1 en 951407-9 daarentegen wel. Zie kolom virus in tabel 2. De veldtoets moet deze resultaten nog wel bevestigen.

8.3.5 Virusresistentie onderzoek 2003

De toetsen van vorig jaar lopen nog door een bladtoets van het veldmateriaal, in mei uitgevoerd, toonde alleen LSV maar nog geen LMoV aan. De bladluizen/kooitjes proef is in de kas opgeplant en moet nog worden bemonsterd.

8.3.6 Kruisingsprogramma 2003/2004

De kruisingen die het afgelopen jaar gemaakt zijn reeds uitgeplant dan wel grotendeels koud gezet om uit planten. Een deel van het materiaal is normaal uitgezaaid, een redelijk tot goed deel blijkt namelijk ook zonder embryocultuur opgekweekt te kunnen worden. Zie tabel vorig verslag. Drie selecties zijn bij CERES in weefselkweek gezet om als kloon te beoordelen t.w. 012065-1, 012246-1 en 012248-1.

De nieuwe kruisingen die dit jaar gemaakt worden richten zich vooral op de OA-genotypen waarin in ieder geval virusresistentie aanwezig is. Zie R in tabel 2 (genotypen opgeplant in warme kas).

Tabel 2. Opplant OA-genotypen in warme kas, met uitkomst moleculaire virustest en de vastgestelde pollen fertiliteit.

Type	Monsternr.	Moeder	Vader	VirusR	Fertiliteit
OAOA	970115	Te 951462 1		R	75%
OAOA	981004	Te 951407 9		R	0-2%
OAOA	981010	Te 951479 2		?	100%
OAOA	981013	Te 951584 1		V	100%
OAOA	981020	Te 951462 1		R	100%
OAOA	981021	Te 951462 1		R	100%
OAOA	981025	Te 953521 1			0-1%
OAOA	981033	Te 951407 9		R	5%
OAOA	981047	Te 951584 1		V	100%
OAOA	991103	Te 951301 5		V	100%
OAOA	991104	Te 951301 5		V	100%
OAOA	991108	Te 951914 1		V	0
OAOA	991112	Te 953508 1		V	100%
AOA	002147 56	Gran Sasso	Te 951301-5	V	0
O OA	002338-4	Lombardia	Te 953508 1	V	0
AOA	002531 12	Gironde	952400 1	V	0
OA A	002538-2	952400 1	Gironde	V	0
OA A	002639-3	Te 942811 1	Con K	?	10-20%
OA A	002639-4	Te 942811 1	Con K	?	0
A OA	002686-1	Con K	Te 951301-5	?	0
AOA	002687 13	Lanzarote	Te 951301-5	V	0
AOA	002687 8	Lanzarote	Te 951301-5	V	50%
A OA	012022	Mont Blanc	Te 951301-5	V	0

A OA	012075	Mont Blanc	Te 951914 1	V	0
OA A	012112	Te 951301 5	Gironde	V	1-10%
A OA	012166	Amarone	Te 951301-5	V	0
OAOA	012181	Te 951301-5	Te 951462-1	R	100%
A OA	012248	Amarone x	te 951407 9	R	0
OAOA	012304	Te 951301-5	Te 951584-1	V	100%
A OA	014090	Mont blanc	951584- 1	V	25%
AA	021055	Con-King		R	100%
AA	041028	Polyanne		R	100%
OA	951462 1	Romerostar	Con K	R	0
OA	951502 1	Pesaro	Con K	?	0-100%
OA	952059 9	Touch	Con K	?	0
OA	952400 1	Merostar	Gran Sasso	V	0-20
OA	969023 2	Casa Blanca	Con K	?	0

8.3.7 Recombination, the clue to intogression

Some Asiatic hybrids carry resistance to *Fusarium* and some viruses, which are not present in the Oriental hybrids. In the other hand, some of them carry resistance to *Botrytis*. One of the goals of lily breeding has been the generation of a new group of hybrids containing the phenotypic characteristics of the Asiatic and the Oriental lilies as well as the resistances for these main diseases.

Only by the use of special pollination and embryo rescue techniques has been possible to generate hybrids among the three sections. However, in most of the cases these hybrids are sterile as in many other taxa. Fertility is recovered by chromosome doubling by chemicals such as oryzaline. One mayor drawback of this way of chromosome doubling is the lack of pairing of the homologous chromosomes and finally the absence of recombination in the chromosomes of the different sections.

An alternative to artificial chromosome doubling is the use of $2n$ gametes, which are present in few interspecific hybrids in low frequencies and lilies are not the exception. Such gametes originate by different mechanisms and with different genetic consequences. First division restitution is the most common mechanism among the distantly related hybrids such as the Oriental-Asiatic (OA) lily hybrids.

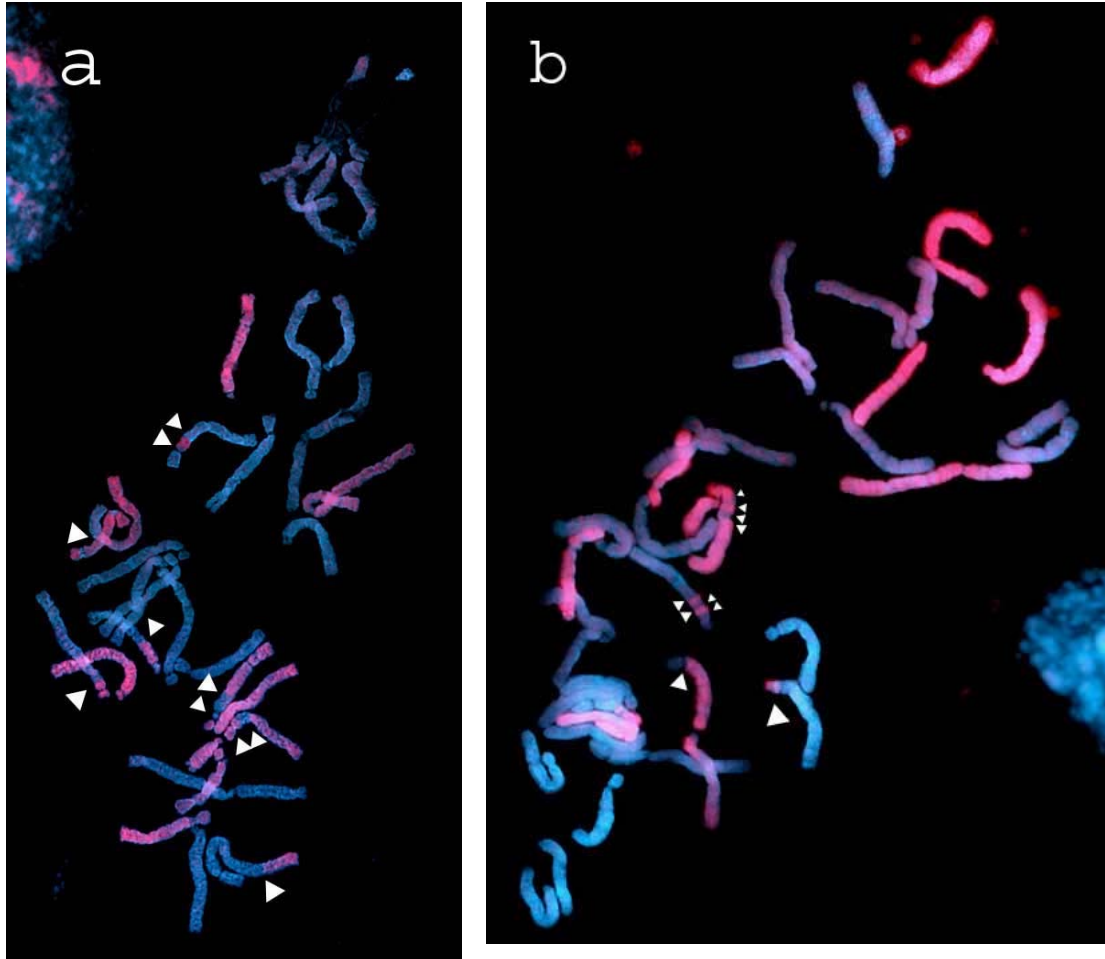
Hundreds of OA hybrids have been generated, only few of them produce $2n$ gametes, among which the fertility and recombination frequency of the OA hybrid 951502-1 is remarkable.

Progeny of different OA hybrids, such as 951502-1 and 952400-1 has been analyzed by GISH techniques (previous report) finding a higher number of recombinant chromosomes among the progeny of 951502-1. A deeper analysis of the pairing frequency in meiosis of both $2n$ gamete producers confirms the differences in the number of recombinant chromosomes among the progeny (table 3).

Table 3. Chromosome pairing frequency

F _I	Obs	12 _{II} 0 _I	11 _{II} 2 _I	10 _{II} 4 _I	9 _{II} 6 _I	8 _{II} 8 _I	7 _{II} 10 _I	6 _{II} 12 _I	5 _{II} 14 _I	4 _{II} 16 _I	3 _{II} 18 _I	2 _{II} 20 _I	1 _{II} 22 _I	0 _{II} 24 _I	Mean Frequency
951502-1	296	0	0	0	0	0	0	1	3	13	26	63	99	91	1.2 _{II} + 21.4 _I
952400-1	231	0	0	0	0	0	0	0	0	2	11	45	67	106	0.8 _{II} + 22.8 _I

Figure 1



Further analysis of the progeny by GISH has shown differences in the chromosome recombination frequency especially among the progeny of 951502-1.

Different number of recombinant chromosomes and in several cases more than one recombinant segment by chromosome has been found in the 022538 crosses. 022538-4 posses seven recombinant chromosomes (fig 1a), and 022538-9 have 4 recombinant chromosomes.

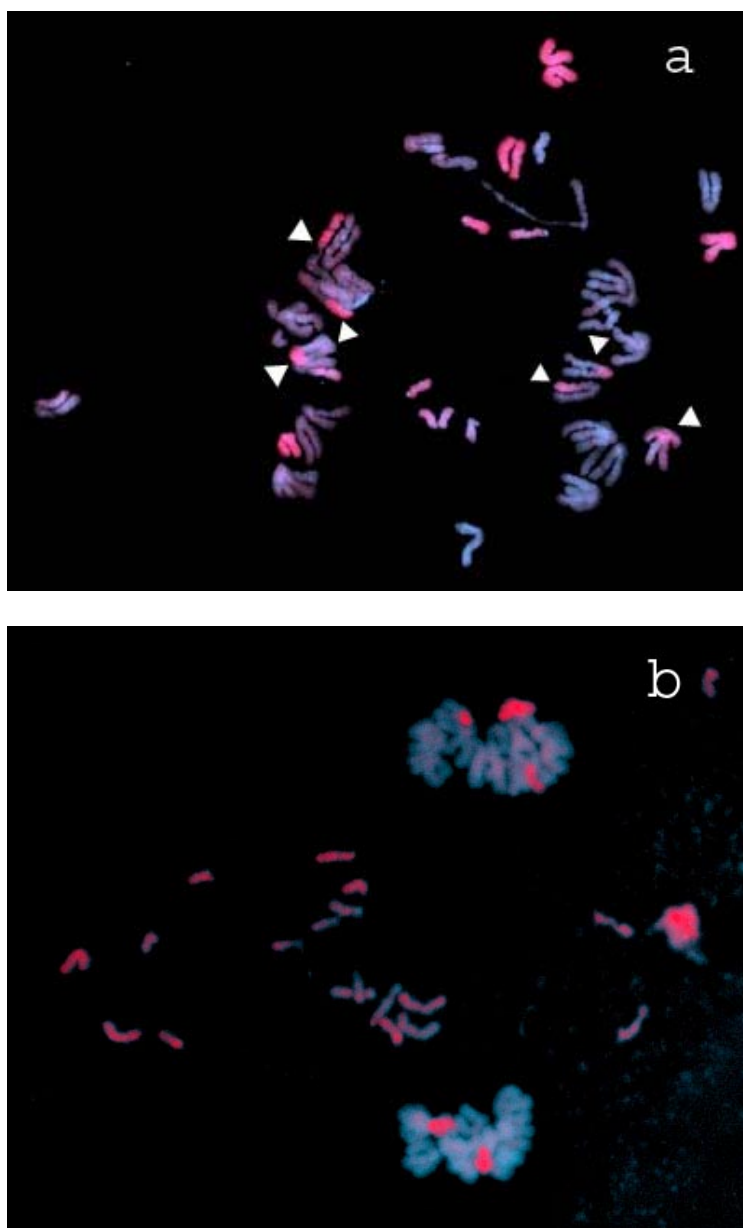
fig 1. GISH analysis of 951502-1 progeny. In blue the Asiatic chromosomes and in pink the Oriental chromosomes a) 002538-4 AOA hybrid with seven recombinant chromosomes (arrows); three of them has two breakpoints. B) 022538-9 AOA hybrid whit four recombinant chromosomes (arrows); two of them with four breakpoints.

The importance of recombination does not stop here; it goes further when more backcrosses are performed. When the meiosis occurs (the type of division that leads to the pollen grains and ovules) in these AOA hybrids some Oriental chromosomes will be lost or gained leading to aneuploid progeny (with chromosome number that is not exact multiple of the haploid number of chromosomes) due to preferential segregation of chromosomes.

The case of 002531-12 can be illustrated, an AOA hybrid derived from a cross with the *2n gamete* producer 952400-1. This AOA hybrid posses 3 recombinant chromosomes which can be distinguished in the anaphase I of meiosis (fig 2a) and later on in late anaphase these chromosomes are segregated to the poles, while the rest of chromosomes remain in the ecuator (fig 2b); these Oriental chromosomes are not segregated and when the cytokinesis (the division of a cell in two by the cell wall) concludes they will remain in any of the resulting cells in an unequal number, affecting the fertility of these pollen grains.

Fig 2. Meiosis in 002531-12. a) anaphase I segregation of chromosomes where is clear that the oriental chromosomes (pink) remain in the ecuator and only the recombinant ones (arrows) are segregated. b) late anaphase, in the ecuator the Oriental chromosomes (pink) which are not segregated, the Asiatic chromosomes (blue) has already reached the poles of the cell and begun to condensate and form two new nucleus.

Figure 2



8.4. Publicaties

Rodrigo Barba-Gonzalez, Bram H. Lokker, Ki-Byung Lim, Muncote S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl. Use of 2n gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental x Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). TAG accepted.

Lim, K.-B., Tsai-Mu Shen, M.S. Ramanna & J.M. Van Tuyl, 2004. Occurrence of numerically unreduced gametes in *Lilium* hybrids and its relevance for breeding. *Breeding Science* 54: 13-18.

Barba-Gonzalez, R., Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl. 2004. Use of 2n Gametes for inducing intergenomic recombination in lily hybrids. IXth International Symposium on Flower Bulbs, 19-22 April 2004, Niigata, Japan.

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. Poster IXth International Symposium on Flower Bulbs, 19-22 April 2004, Niigata, Japan.

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 x Asiatic lily hybrids. Poster IXth International Symposium on Flower Bulbs, 19-22 April 2004, Niigata, Japan.

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. IXth International Symposium on Flower Bulbs, 19-22 April 2004, Niigata, Japan.

9. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

- Enkele publicaties in wetenschappelijke tijdschriften (zie 8.4)

10. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

- Het project loopt volgens planning

11. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

- Voortzetting resistentie toetsing (Botrytis en virus)
- Vervolg Fusarium-resistentie-toets
- Uitvoering GISH-onderzoek gericht op vinden van recombinaties tussen O- en A-genoom en introgressie van resistenties; Bestudering van verschillende 2n-gameten producerende OA-hybriden
- Uitvoering van toetskruisingen met nieuw OA materiaal gericht op inbreng van Virus en Fusarium en Botrytis resistentie
- Opkweek van embryocultuur materiaal afkomstig van OA-doorkruisingen, gericht op virus-, Fusarium en Botrytis resistentie

12. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget?

- Nee

1. Datum: december 2004
2. Projecttitel: **Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytis-resistentie**
3. PT projectnummer: 11184
4. Intern projectnummer uitvoerder: 76000012.00
5. Projectleider: J.M. van Tuyl
 Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
 Tel.nr: 0317 477329 0653362858
 Fax nr: 0317 418094
 E-mailadres: Jaap.vantuyl@wur.nl
6. Periode waarover wordt gerapporteerd: 1-6-2004 - 1-12-2004

7. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:
8. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

Op de website meer over het project <http://www.liliumbreeding.nl/project>

8.1. Algemeen

Personele inzet 2004

R. Barba Gonzalez
 S. Zhou
 A.A. van Silfhout
 J. van Schaik
 J.M. van Tuyl
 M.S. Ramanna
 (K.B. Lim)

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
 S. Bottema
 M. Ceulemans
 (W.J. van Graas)
 E. Hoogendijk
 P.J. Kos
 K. Laan
 H. Middelburg
 C. Randag
 A. van der Velde
 A. Vletter
 W. de Wit

8.2. Korte beschrijving doelstelling project

Dit project heeft als doel om de laatste hindernissen in het gebruik van OA-hybriden voor de lieleveredeling 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).

8.3 Voortgang van het project

8.3.1 Algemeen

Naast de 4 geplande zijn er nog 2 extra kijkmiddagen t.w. op 6 en 13 juli in verband met de wat latere bloeitijd in de tunnel. MSc-studente Susana Vivar deed naar MSc-onderzoek aan uitsplitsende AOA-populaties waarbij o.a. naar bloemkeur en Botrytis-resistentie is gekeken. Graduate student Chad Miller van Cornell University versterkt het team gedurende een half jaar van oktober 2004 tot april 2005.

In het tweede halfjaar is veel aandacht uitgegaan naar een onderzoeksvorstel dat voor subsidie is ingediend bij SENTER. Hiermee kan een aanzienlijke uitbreiding op het huidige project plaats vinden. Het voorstel is getiteld innovatieve merkertechnieken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie (is op de website te vinden) en is erop gericht om de huidige ziekte-toetsen voor Fusarium, Botrytis en virus te vervangen door snelle en goedkope moleculaire merkertoetsen.

8.3.2 Fusarium-toets (A)OA-materiaal

In de 1e week van mei werd een Fusarium-test (met de isolaten 4 en 11) ingezet met ruim 100 (A)OA-genotypen. In 3 herhalingen zijn 5 schubbolletjes in met Fusarium-besmette grond geplant. De gekozen nummers zijn in onderstaande lijst weergegeven. Het gaat om dezelfde mitotische en meiotische populaties waarvan vorig jaar de Botrytis-resistentie bepaald is (zie vorig verslag). Begin juli is de toets beoordeeld. In onderstaande tabel zijn de resultaten gerangschikt naar hybridegroep en ziekte-index (mate van aantasting). Zoals verwacht zijn de Aziaten (lopend van 1.0-3.5) het meest resistent, waarbij Mont Blanc en Connecticut King weer het hoogst scoren. De Orientals, met een ziekte-index van 3.1-5.3 zijn vatbaar tot zeer vatbaar. Merostar is met 3.1 de meest resistente Oriental. Bij de OA's loopt de ziekte-index van 1.0 tot 4.5. De meest resistente OA is 951462-1, deze hybride is bovendien virusresistent en heeft goede fertiliteit op tetraploid niveau en maakt in geringe mate 2n-pollen. Dat betekent dat deze hybride een belangrijke geniteur is. De 2 hybriden die veel 2n-gameten produceren en waar veel onderzoek aan verricht is, 951502-1 en 952400-1 zijn helaas met een ziekte-index van 3.3 en 4.5 minder resistent. Dit weerspiegelt zich in de hogere vatbaarheid van de AOA populatie Lanzarote x 952400-1 met een ziekte-index die varieert van 1.9-5.9 (gemiddeld 3.5). Het belang van een hoge resistentie van de OA-ouder blijkt duidelijk uit de OAA-populatie 951301-5 x Gironde, deze populatie varieert van 1.1-5.6 (gemiddeld 2.0) met veel klonen die lager dan 1.5 scoren. Opvallend bij deze AOA en OOA populatie is dat de resistentie van de nakomelingen zowel resistentier als vatbaarder kan zijn dan de ouders, m.a.w. er treedt steeds transgressie op.

Tabel 1. Resultaten van de Fusarium-toets

Type	Ras/nummer	MbNo	index
AA	Mont Blanc	980072	1.1
AA	Con King	021055	1.1
AA	Gironde	031039	1.4
AA	Chianti	031042	1.5
AA	Pollyana	031028	1.9
AA	Lanzarotte	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 1301-5 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	991435	3.6
AOA	Gran Sasso x 952400	002433-1 A	3.5
AOA	Gran Sasso x 952400	002433-1	4.8
AOA	Gran Sasso x 952400	002433-2	5.0
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-12	1.9
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-6	2.0
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-5	2.3
AOA	Lanzarotte x 952400	002526-7	2.5
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-4	2.7
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-1	2.8
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-11 A	2.9
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-3	2.9
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-11	3.0
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-13	3.1
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-15	3.1
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-2	3.2
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-12 A	3.4
AOA	Lanzarotte x 952400	002531-10 A	3.7
AOA	Lanzarotte x 952400	002526-1 A	3.9

AOA	Lanzarote x 952400	002526-4	4.5
AOA	Lanzarote x 952400	002526-5	4.7
AOA	Lanzarote x 952400	002526-1	5.0
AOA	Lanzarote x 952400	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 x Gironde	002538-1	4.1
OAA	952400 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	992738-2	5.0

8.3.3 Virus resistentie m.b.v. moleculaire toets.

Opnieuw zijn met behulp van de “virus-merker” (de met de AFLP-techniek gevonden koppeling van LMoV-resistentie met een moleculair bandje [zie Project indirecte selectie: Eindrapportage](#)) een serie OA-hybriden onderzocht. Hieruit bleek dat nog enkele uit Connecticut King afkomstige OA's virusresistent zijn en enkele andere niet. Zie de nu bekende nummers Tabel 2.

Tabel 2. De met behulp van AFLP vastgestelde virusresistentie (R) in diverse OA-hybriden.

OA	951407 9	Bel Paso	Con K	R
OA	951479 2	Èxpression	Con K	R
OA	951462 1	Romerostar	Con K	R
OA	952059 9	Touch	Con K	R
OA	969023 2	Casa Blanca	Con K	R
OA	952377 1	Romerostar	Con K	R
OA	953521 1	Expression	Con K	V
OA	951301 5	Merostar	Con K	V
OA	951502 1	Pesaro	Con K	V
OA	952063 10	Time out	Con K	V
OA	962433 1	Sissi	Con K	V
A OA	012248	Amarone x	te 951407 9	R
OA/OA	012181	Te 951301-5	Te 951462-1	R

8.3.5 Virusresistentie onderzoek 2003

De toetsen van vorig jaar lopen nog door. Aan het einde van het seizoen was inmiddels een deel van het materiaal aangetast door LMoV.

8.3.6 Beoordeling materiaal

Tijdens de kijkdagen hebben de bedrijven het materiaal uit de kruisingsjaren 2002 en daarvoor beoordeeld en hebben interessante nummers gelabeld. Negen nummers zijn geschubd.

8.3.7 Kruisingsprogramma 2004

De nieuwe kruisingen die dit jaar gemaakt zijn hebben zich in het bijzonder gericht op die OA-geotypen waarin in ieder geval virusresistentie aanwezig is (Zie Tabel 2). Daarnaast gewerkt aan het verkrijgen van fertiele tetraploide OA's. Ten slotte zijn kruisingen gemaakt met de voor het eerst bloeiende AAOA's o.a. met 022271-1 een hybride waarvan met GISH is aangetoond dat er nog 1 Oriental chromosoom aanwezig is. Dit materiaal blijkt een vrij goede fertiliteit te bezitten. Tabel 3 geeft een overzicht van de tot 1 december verkregen embryoescue resultaten bij de diverse kruisingscombinaties.

8.3.8 Inductie van 2n-gameten

Opnieuw is getracht 2n-gameten in een steriele OA te verkrijgen. Materiaal van 951301-5 werd hiervoor gebruikt. De eerste uitkomsten zijn hoopgevend. In terugkruisingen met Aziaten werden in een beperkt aantal kruisingen meer dan 200 nakomelingen verkregen. Er zal zo snel als mogelijk is onderzocht worden of deze nakomelingen recombinante O/A chromosomen bezitten. In het najaar zijn een vervolgprouf nog eens een 8-tal OA's uitgeprobeerd. Ook deze resultaten zien er redelijk goed uit. Volgend jaar zal dit onderzoek grootschaliger worden voortgezet.

Tabel 3. Overzicht van de kruisingsresultaten bij de diverse kruisingscombinaties. Aangegeven zijn het aantal bestoven bloem (Fl#), het aantal in vitro gezette embryozakken en embryo's (Em# en Es#). Het aantal gekiemde embryo's (G-em) van uit de embryo's en in totaal (G-tot).

Groep	Fl_#	Em_#	Es_#	G_e m	G_to t
A AAOA	11	155	39	140	219
A AOA	116	37	50	53	56
AAOA AAOA	5	33	14	29	29
AAOA AOA	8	9	21	12	12
AOA A	217	177	420	149	157
AOA AAOA	8				0
AOA AOA	39	4	10	3	3
AOA O	23	1	6		0
AOA OA	771	190	335	197	223
L AOA	16				0
L OA	49		1	1	1
LO OA	68		36		0
LO OOA	9				0
O AAOA	16	9	3		0
O AOA	32				0
O OA	185	234	274	47	56
OA A	260	43	128	5	5
OA AAOA	21	9	41	8	9
OA AOA	126	5	21	4	4
OA OA	1362	47	388	79	79
OAA A	63				0
OAA AOA	3				0
OAA O	14				0
OAA OA	222	15	3	10	10
OAAA OA	2				0
OA O A	36				0
OO OA	24				0
OOA A	10		19		0
OOA OA	18				0
O A	34	6	17	2	2
Totaal	3768	974	1826	739	865

8.3.8 The mechanisms of segregation

Oriental-Asiatic (OA) lily hybrids are the most promising lily hybrids in lily breeding, due to the possibility to introgress the parental traits, such as, virus and *Fusarium* resistance from the Asiatic lily hybrids and the *Botrytis* resistance from the Oriental lilies into this new group.

The major drawback is the sterility of these hybrids. However, this has been overcome by doubling the chromosome number with chemicals (oryzalin) or using the $2n$ gametes that are produced naturally in some hybrids, together with embryo rescue techniques.

The use of $2n$ gametes is preferred to doubling the chromosome numbers, because due to autosyndetic pairing (pairing between the copies of each chromosome from the same origin i.e. Oriental with Oriental and Asiatic with Asiatic) there is no recombination between the different genomes in the latest case.

A detailed analysis in the meiosis of one of these OA hybrids and its progeny made possible the determination of the different mechanisms that lead to the formation of the so-wanted $2n$ gametes. These mechanisms are described as i) Post Metaphase I (PMI), in this case, the chromosomes do not present any orientation in the Pollen Mother Cell (PMC) and the chromatids of each chromosome come apart in the first division of meiosis (Fig. 1) when in a normal case the chromatids would divide until the second division of meiosis. This stage was also optimal for the detection of recombination with Genomic *In Situ* Hybridization (GISH)

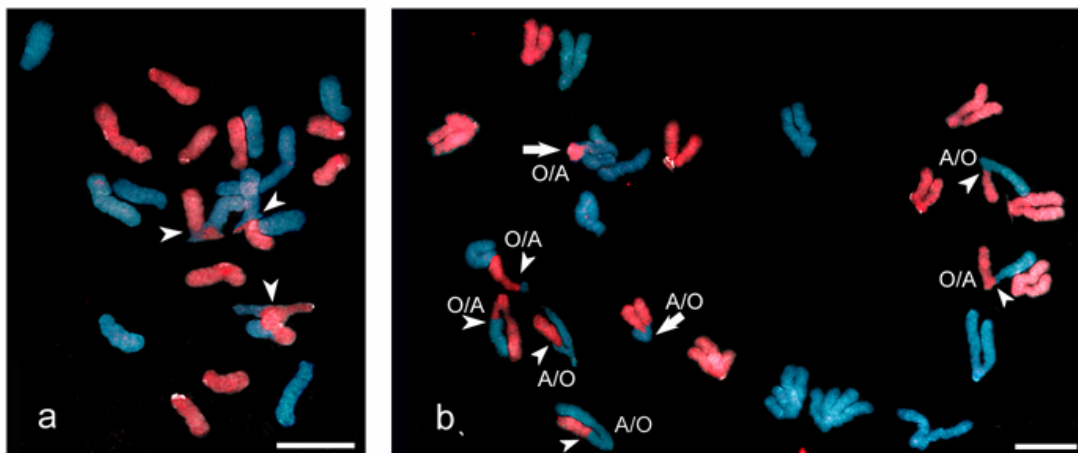


Figure 1. GISH analysis in the pollen mother cells of the Oriental –Asiatic lily hybrid 951502-1. **a.** Metaphase I stage, where the chromosomes do not have any orientation showing 3 bivalents (arrows) and 18 univalents. **b.** Post Metaphase I stage where the sister chromatids of each chromosome are clearly visible and coming apart, recombination took place in four chromosomes involving two chromatids of the homoeologous chromosomes in three cases (arrowheads) and involved both sister chromatids in another homoeologous chromosome (arrows)

Another detected mechanism was ii) Post Metaphase II, where the chromosomes adopt a position in the equatorial plane of the cell as in metaphase I (Fig. 2a), however, their chromatids are segregated at this time in an equivalent stage to that of metaphase II (Fig. 2 b-c).

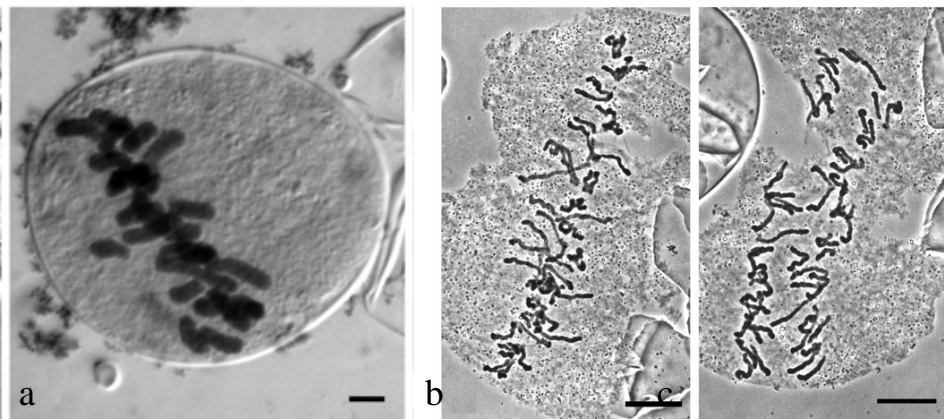


Figure 2. Microsporogenesis in the Oriental-Asiatic lily hybrid *951502-1*. **a.** Metaphase I stage, the chromosomes are oriented in the equatorial plane. **b.** Anaphase stage in Post Metaphase II, subsequent stage to a, the chromatids are clearly separating. **c.** Subsequent stage to b, the chromatids segregate to de poles as in anaphase II.

A third mechanism was found, iii) Asymmetrical cytokinesis. In this peculiar mechanism there is no segregation of chromosomes but the cytokinesis (physical division of the cell after the formation of cell walls) takes place, dividing the cell into two new cells, but one of this new cells does not have any chromosomes on it, and the other one have the complete set of chromosomes (Fig 3a). Latter, in a second division, the chromatids migrate to the poles (Fig. 3b) generating a triad, where two cells are constituted by one set of chromosomes each and the third with no chromosomes at all.

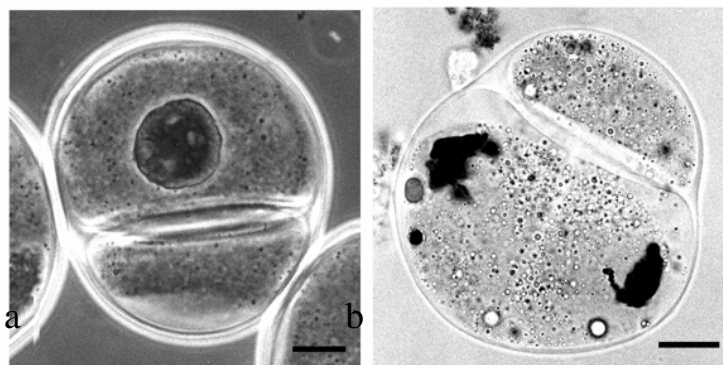


Figure 3. Asymmetrical cytokinesis in the Oriental-Asiatic lily hybrid *951502-1*. **a.** Cytokinesis took place but there was no chromosomal segregation. **b.** Subsequent stage to a, the chromatids have been segregated originating a triad, with two cells with a complete set of chromosomes each and a third cell with no chromosomes.

8.3.9 Analysis of FISH and GISH in the *951502-1* progeny

FISH analysis utilizing the 45s rDNA and a telomeric sequence (TTTAGGG) as probes allowed the identification of most of the chromosomes in the triploid progeny from 'Amarone' × *951502-1* (Fig. 4a). The probes were removed from the chromosomes and GISH analysis were performed to identify the recombinant chromosomes (Fig. 4b) and karyotypes were generated in order to know the chromosome composition of the distinct hybrids (Fig. 6).

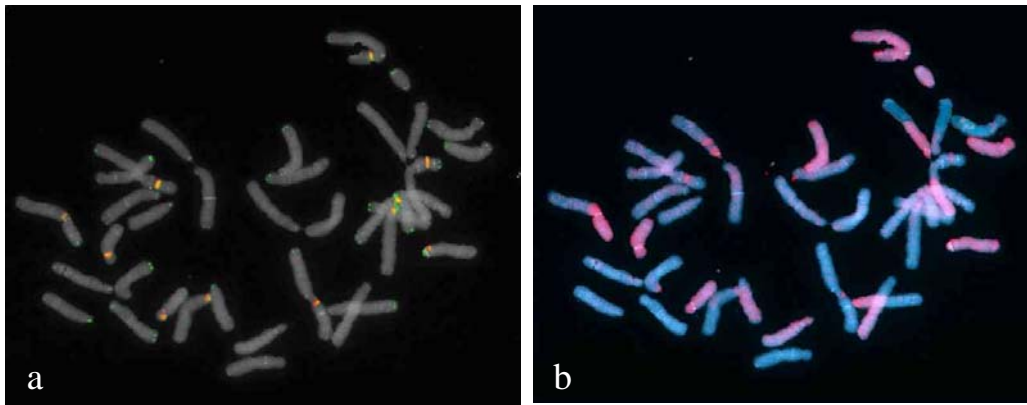


Figure 4. FISH and GISH analyses in the triploid hybrid 022538-1. **a.** FISH analysis, the orange signal corresponds to the 45s rDNA and the green signal corresponds to the telomeric sequence TTTAGGG. **b.** GISH analysis, the Oriental chromosomes are stained in pink and the Asiatic chromosomes are in blue.

The karyotype analysis showed that all the hybrids were constituted by non-recombinant and recombinant chromosomes in varying frequencies, product of the random segregation of the chromatids (Fig. 7). Different mechanisms of segregation of the chromatids took place in order to originate the different constitution of chromosomes. These mechanisms of segregation led to different genetic consequences such as First Division Restitution (FDR) and Intermediate Meiotic Restitution (IMR).

In the cases of *022538-1*, *022538-1*, *022538-8*, *022605-8* and *022605-40*, they are constituted by 12 Oriental chromosomes and 24 Asiatic chromosomes. The chromosome constitution of each hybrid varied with respect to the recombinant chromosomes and the segregation event. For some recombinant chromosomes, in the meiosis that preceded the formation of $2n$ pollen in *951502-1* (used as parent of these hybrids), the recombinant chromatids segregated together, resulting in the presence of both recombinant chromosomes being complementary to each other in the triploid hybrid (reciprocal product). In other cases a non-recombinant chromatid and a recombinant chromatid were segregated together, resulting in the presence of a non-recombinant chromosome and a recombinant chromosome in the triploid hybrid (non-reciprocal product).

There are important implications with regard to the different ways of the segregation of chromatids. When both recombinant chromatids segregate together in a pollen grain, in the resulting progeny, the genes contained in those recombinant chromosomes will not express different to those chromosomes without recombination, due to the presence of the complementary part of the chromosome in the homoeologous chromosome (Fig. 7). For those recombinant chromatids that are segregated together with a non-recombinant chromatid, is another situation, due to the recombinant segment, such recombinant segment can contain more or different genes and those genes can be expressed in a different way, specially in the case of homozygosis for a distal part of certain chromosome that can be achieved depending in the direction of the backcross, as is the case for some chromosomes of *022538-1*, *022538-3*, *022538-8*, *022605-8* and other non-reciprocal product which are homozygous for the distal part of the chromosome (Fig. 6).

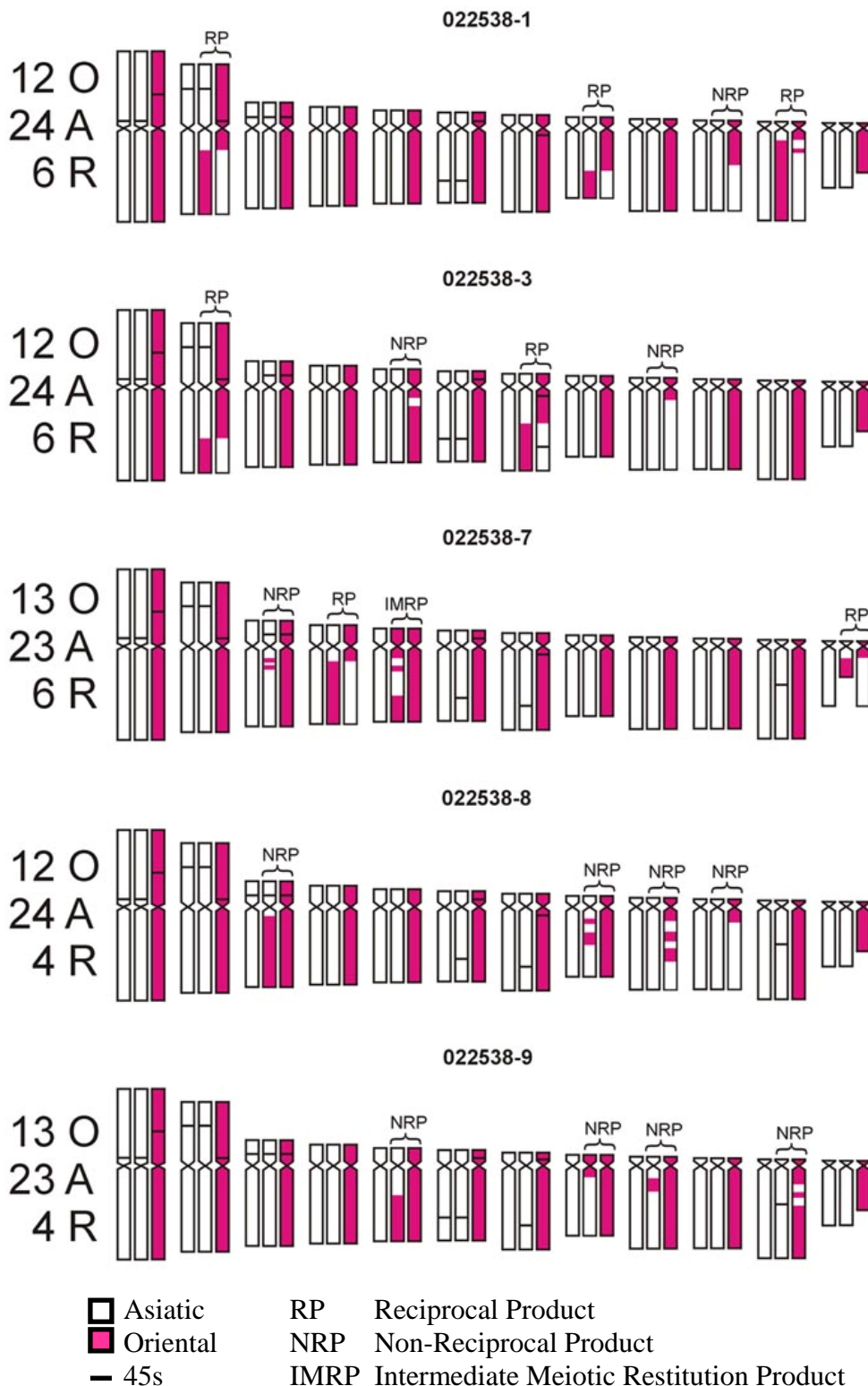


Figure 6. Ideogram of 10 triploid AOA hybrids with recombinant chromosomes. The Asiatic chromosomes are represented in white color and the Oriental chromosomes are in pink color. The bar represents the localization of the 45s signal. The numbers of chromosomes from different origin are in the left side of each ideogram. Being A the number of Asiatic chromosomes, O the number of Oriental chromosomes and R the number of Recombinant chromosomes in each hybrid. The kind of segregation of the chromatids is indicated by the abbreviations RP for Reciprocal Product, NRP for Non-Reciprocal Products and IMRP for the Intermediate Meiotic Restitution Product.

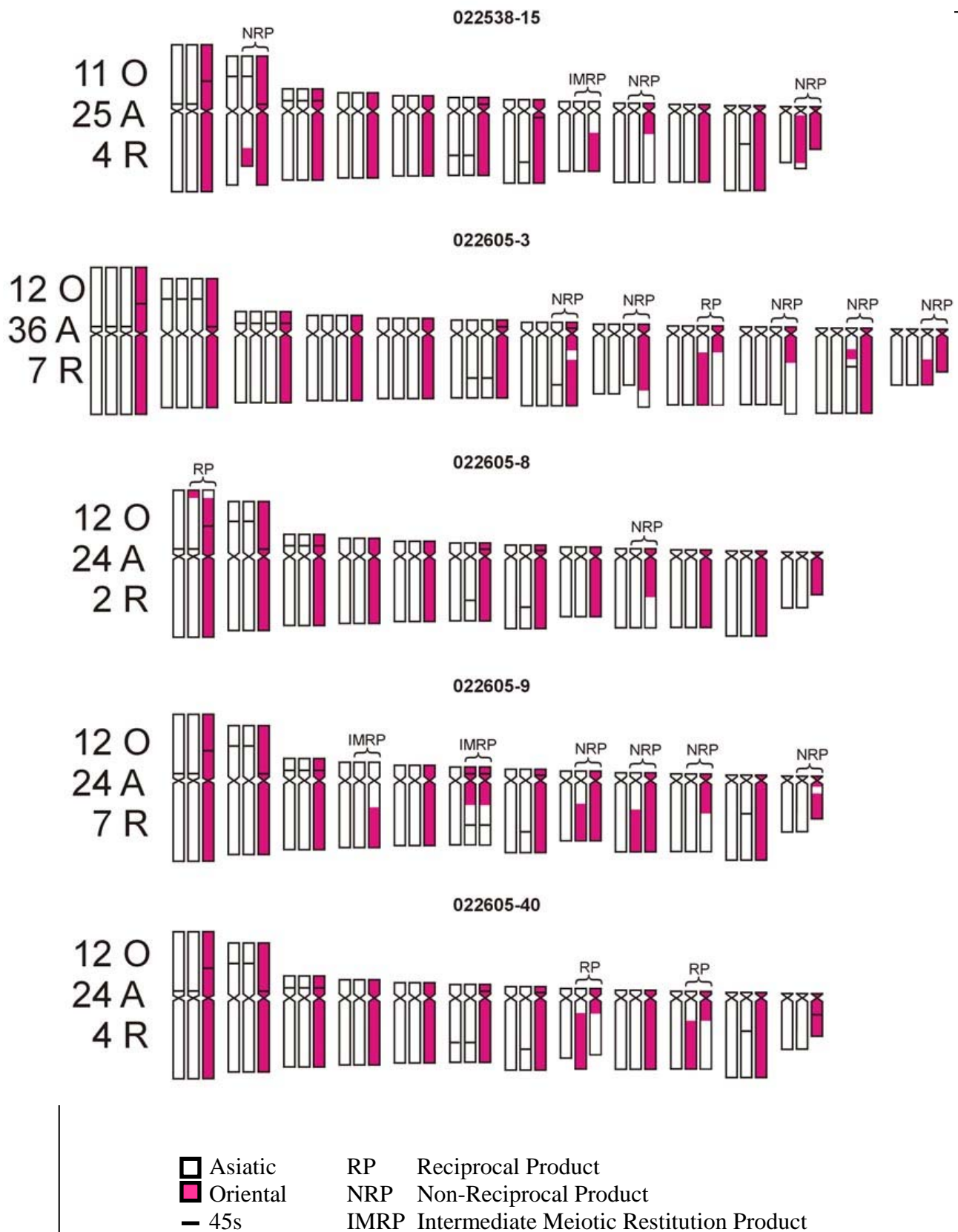
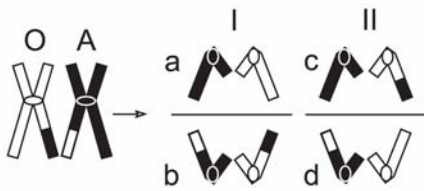


Figure 6 cont. Ideogram of 10 triploid AOA hybrids (fig. 10 The flowers of these hybrids) with recombinant chromosomes. The Asiatic chromosomes are represented in white color and the Oriental chromosomes are in pink color. The bar represents the localization of the 45s signal. The numbers of

chromosomes from different origin are in the left side of each ideogram. Being A the number of Asiatic chromosomes, O the number of Oriental chromosomes and R the number of Recombinant chromosomes in each hybrid. The kind of segregation of the chromatids is indicated by the abbreviations RP for Reciprocal Product, NRP for Non-Reciprocal Products and IMRP for the Intermediate Meiotic Restitution Product.

Random chromatid segregation of crossover products



Consequences of backcrossing

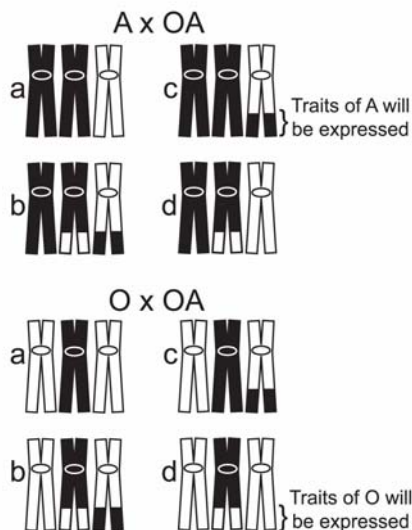


Figure 7. Random chromatid segregation scheme and its implication for the expression of either Asiatic or Oriental traits in subsequent backcrosses. Note: homozygosity can occur for the distal recombinant segment in the BC₁ progeny.

The cases of *022538-7* and *022538-9* are different; they are constituted by 13 Oriental chromosomes and 23 Asiatic chromosomes; *022538-15* has 11 Oriental chromosomes and 25 Asiatic chromosomes. This means that the segregation of the chromatids is not represented for any of the previous cases. These results suggest that in the meiosis that preceded the formation of the pollen grains in *951502-1* (used as parent for these progeny) both chromatids of a recombinant chromosome segregated together leading to a substitution of a chromosome (Fig. 8). *022605-9*, has 12 Oriental chromosomes and 24 Asiatic however, it has 3 two cases of substitution of a chromosome. This way of segregation of the chromatids has the genetic consequences of Intermediate Meiotic Restitution and the most important feature is the presence of homozygosity for the proximal part of the recombinant chromosome

It is important to consider that these different ways of segregation of chromatids can be random for each chromosome (Fig. 9), but they have different genetic consequences and this can be expressed as an important source of variation in lily breeding.

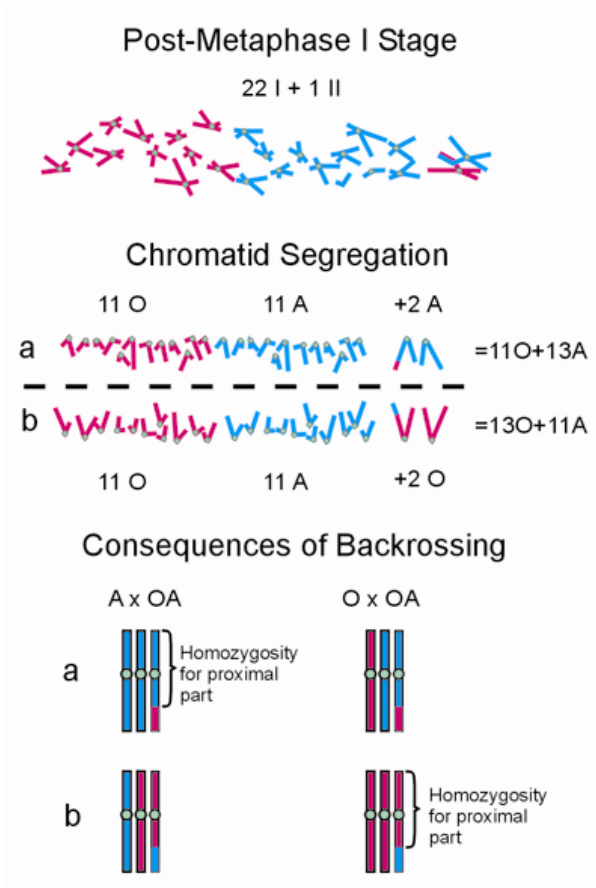


Figure 8. Chromatid segregation scheme after Post Metaphase I stage where segregation of two chromatids of the same pole occurs leading to Intermediate Meiotic Restitution and its implication for the expression of either Asiatic or Oriental traits in subsequent backcrosses. Note: homozygosity can occur for the proximal recombinant segment in the BC₁ progeny.

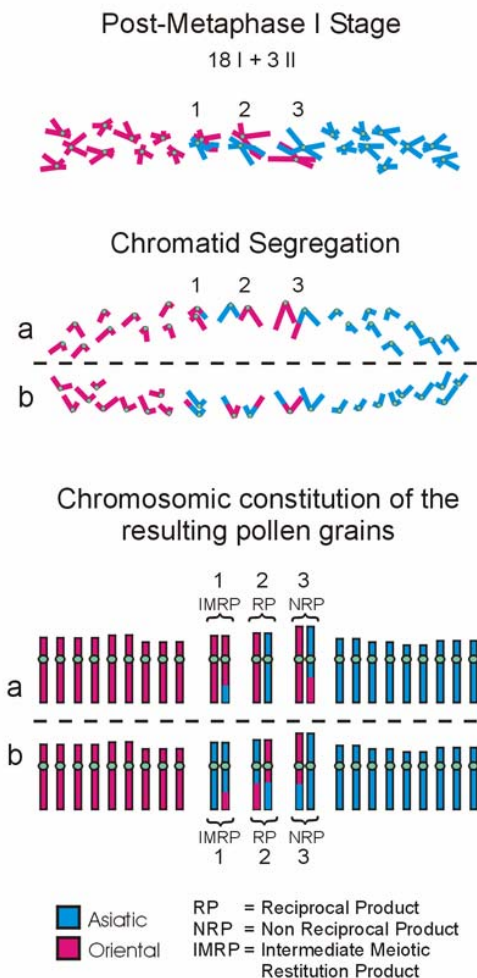


Figure 9. Schematic representation of three possible recombination events and three different ways of segregation of the sister chromatids with different genetic consequences

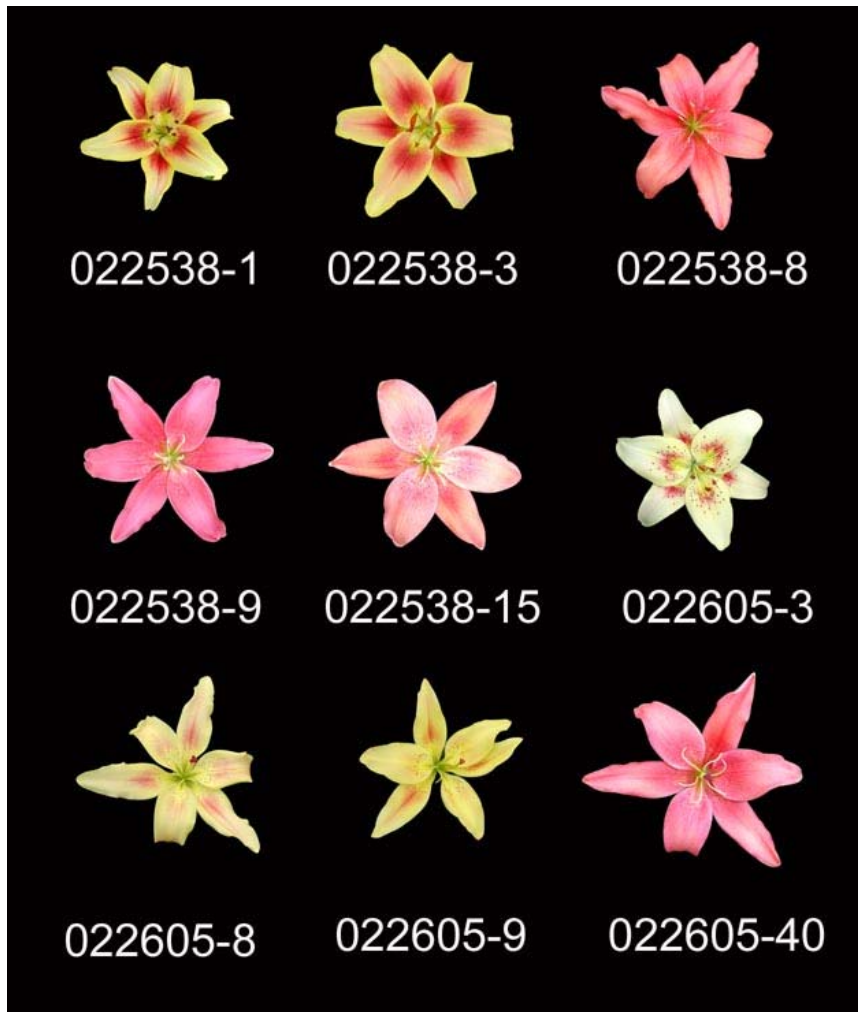


Figure 10. Phenotypic expression in the flowers of the triploid hybrids (AOA) resulting from the cross of 'Amarone' × 951502-1 (OA hybrid). Note all the variation accomplish by the use of $2n$ gametes

8.4 Publicaties

Rodrigo Barba-Gonzalez, Bram H. Lokker, Ki-Byung Lim, Muncote S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl. Use of $2n$ gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental x Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). Theor. Appl. Genet. 109:1125-1132.

R. Barba-Gonzalez, K-B. Lim, M. S. Ramanna, R. G. F. Visser & J. M. Van Tuyl. Occurrence of $2n$ gametes in the F1 hybrids of Oriental x Asiatic lilies (*Lilium*): relevance to intergenomic recombination and backcrossing. Submitted to Euphytica (see website).

9 Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

- Enkele publicaties in wetenschappelijke tijdschriften (zie 8.4)

10. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

- Het project loopt volgens planning

11. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

- Voortzetting resistentie toetsing
- Uitvoering GISH-onderzoek gericht op vinden van recombinaties tussen O- en A-genoom en introgressie van resistenties; Bestudering van verschillende 2n-gameten producerende OA-hybriden
- Onderzoek naar inductie van 2n-gameten bij een reeks steriel OA-hybriden
- GISH-onderzoek van hybriden afkomstig van geïnduceerde 2n-gameten
- Uitvoering embyorescue van gemaakte kruisingen
- Opkweek van embryocultuur materiaal afkomstig van OA-doorkruisingen, gericht op virus-, Fusarium en Botrytis resistentie

12. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget?

- Nee

1. Datum: juni 2005

2. Projecttitel: **Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytis-resistentie**

3. PT projectnummer: 11184

4. Intern projectnummer uitvoerder: 76000012.00

5. Projectleider: J.M. van Tuyl
 Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
 Tel.nr: 0317 477329 0653362858
 Fax nr: 0317 418094
 E-mailadres: Jaap.vantuyl@wur.nl

6. Periode waarover wordt gerapporteerd: 1-12-2004 - 15-06-2005

7. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:

8. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

Op de website meer over het project <http://www.liliumbreeding.nl/project>

8.1. Algemeen

Personele inzet 2005

R. Barba-Gonzalez
 S. Zhou
 A.A. van Silfhout
 J. van Schaik
 J.M. van Tuyl
 M.S. Ramanna
 C. Miller
 (K.B. Lim)

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
 S. Bottema
 M. Ceulemans
 N. Meiland
 E. Hoogendijk
 P.J. Kos
 K. Laan
 H. Middelburg
 C. Randag
 A. van der Velde
 A. Vletter
 W. de Wit

8.2.Korte beschrijving doelstelling project

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).

8.3 Voortgang van het project

8.3.1 Algemeen

Graduate student Chad Miller van Cornell University heeft het team gedurende een half jaar van oktober 2004 tot april 2005 versterkt. Hij heeft met name gewerkt aan de lachgas-experimenten. De inductie van 2n-gameten m.b.v. lachgas zou wel eens een grote doorbraak kunnen betekenen. Het laatste hoofdstuk van Rodrigo's proefschrift is hiervan het resultaat. Op 13 september hoopt Rodrigo zijn proefschrift te verdedigen. In juli zal de Chinese onderzoeker Dongshen Yin in ons team komen werken.

Het ingediende SENTER-onderzoeksvoorstel is in de eerste ronde niet hoog genoeg geëindigd om gehonoreerd te worden. In mei is het opnieuw ingediend. Half juli hopen we dit keer wel op honorering.

8.3.2 Fusarium-toets (A)OA-materiaal

Eind mei dit jaar werd een kleine Fusarium-toets ingezet met zowel klein plantgoed materiaal als met schubbolletjes. In tabel 1 zijn de ingezette nummers aangegeven.

vermeerdering veld			
OAA	012062-5	Te 951301-5	Gironde
OAA	012092-29	Te 951301-5	Gironde
OAA	012105-9	Te 951301-5	Gironde
OAA	012105-2	Te 951301-5	Gironde
OO	031108	Sissi	
AA	980072	MB	
AA	021055	CK	
LL	031043	WF	
Schub/wk			
OA	951462-1		
OA	969023-2		
OAOA	012181-3		
A OA	022538-12-1	021040	951502 1
A OA	022605	021040	951502 1
A OA	022605-17	021040	951502 1
A OA	022605-24	021040	951502 1
A OA	022605-27	021040	951502 1

A OA	022605-54	021040	951502 1
OAOA	014050-1	981029	991112
AOA A	022145-1	002687-38	021039
A OA	002531-12	001096 Gironde	952400 1
OA A	022004-4	991107	021040
OA	967243 1	940320	960019
OA	969023 1	Casa Blanca	Conn King
OA	951502 1	940023	950012
OA	952400 1	940319	940043
AOA	012046-1	011039	981056
AOA	012048-1	011040	981004
OAA	012065-1	991107	011040

In juli zal het materiaal worden opgerooid om de mate van resistentie vast te stellen. Materiaal van de nieuwe AOA- populatie (Amarone x 951502-1) met een hoog percentage recombinatie tussen A en O chromosomen, is vermeerderd, zodat hiermee in 2006 en 2007 ziekteproeven kunnen worden uitgevoerd.

8.3.3. Virusresistentie onderzoek

De toetsen van voorgaande jaren lopen nog door. Een Elisa-toets toonde dat ook van het vatbare materiaal slechts een deel na 2 seizoenen aangetast is door LMoV. Ook de LA-populatie die in het nieuwe merkeronderzoek is opgenomen is buiten opgeplant om de vatbaarheid of resistentie per genotype te bepalen.

8.3.4 Beoordeling materiaal

Het materiaal dat tijdens de kijkdagen van vorig jaar door de bedrijven is geselecteerd is vermeerderd via schubben. Het betreft de volgende nummers:

OAOA	014050-1	981029	991112
AOA OA	022301-1	002188-18	991112
AOA A	022145-1	002687-38	021039
A OA	022589-1	021040	952462 1
A OA	002531-12	001096	952400 1
OA A	012065-1	991107	011040
OA A	022004-4	991107	021040
OA A	022264-1	991112	011086
OA A	022373-1	981020	011092

Het meeste materiaal afkomstig van kruisingen van tetra 951301-5 is niet meer opgeplant. De beste nummers uit de Fusarium-proef van 2004 waren geschubd en zijn dit voorjaar in de warme kas opgeplant. Materiaal van 3 AOA-nummers die 2 jaar geleden door CERES in vitro werden gezet om te vermeerderen, werden afgeleverd en opgeplant bij PRI, De Jong Lelies en WorldBreeding.

8.3.5 Kruisingsprogramma 2005

De kruisingen die dit jaar gemaakt zijn hebben zich in het bijzonder gericht op (A)OA-genotypen die via lachgas behandeling fertiel hebben verkregen. (zie ook Tabel 8). Daarnaast is/wordt gewerkt aan het verkrijgen van fertiele tetraploide OA's.

8.3.6 Inductie van 2n-gameten

Materiaal van 951301-5 werd vorig jaar zomer gebruikt om het effect van lachgas op de inductie van 2n-gameten te onderzoeken. De uitkomsten waren verbluffend (zie 8.3.7.2). Dit jaar zijn de experimenten met allerlei materiaal opgezet. Tot nu toe vallen de resultaten nog wat tegen. Enkele oorzaken daarvoor zijn: het juiste knopstadium waarin behandeld moet worden en de juiste techniek van begassen. In tabel 2 zijn de resultaten tot nu toe opgesomd.

Tabel 2. Effect van lachgasbehandelingen, voorjaar 2005

Type	Monsternr	moeder	vader	onbeh. Fert.	2N beh. 24 uur - fert.
OAA	012092-4	Te 951301-5	Gironde	1 tot 5%	2%
OAA	012092-33	Te 951301-5	Gironde	0 TOT 5%	0 tot 50%
OAA	012092-36	Te 951301-5	Gironde	0 tot 1%	0 tot 2%
AOA	002531-1	001096	952400-1	10%	<1%
A OA	022612-1	021040	951502 1		10%
A OA	022612-10	021040	951502 1	10%	1 tot 10%
AOA	012046-1	011039	981056		10%
AOA	012048-1	011040	981004	1 tot 5%	1 tot 5%, meer pollen
OA	942615 2	Royal Class	Conn. King	0	0
OA	942726 1	Expression	Conn. King	0	0
OA	942818 2	Expression	Conn. King	0	1%
OA	951301 4	Mero Star	Conn. King	0	0
OA	951407 9	Belpasso	Conn. King	0	0
OA	951479 1	940320	950012	geen controle	0
OA	951479 2	940320	950012	geen controle	0
OA	951479 4	940320	950012	0	0
OA	951497 3	940065	940043	geen controle	0
OA	951935 2	940320	950012	0	0
OA	952377 1	940312	950012	geen controle	0
OA	952483 1	940320	950012	0	0
OA	952494 1	950065	950012	0	nog testen
OA	967113 1	950252	960009	0	0
OA	967243 1	940320	960019	0	0
OA	967252 1	960017	960019	0	0
OA	967254 1	960017	960029	0	geen 2n beh.
LA	969023 1	Mont Blanc	Conn. King	0	5%
OA	969023 2	Casa Blanca	Conn. King	10%	
OA	951502 1	940023	950012	0	75%
OA	952400 1	940319	940043	0	0
OA	951462 1	940312	950012	0	1 tot 10%
OA	951914 1	940312	940326	0	0

8.3.7 Introgression breeding and $2n$ gamete induction (Rodrigo Barba)

Longiflorum, Oriental and Asiatic lilies are most promising lily hybrids for cut-flower production. Interspecific hybrids from the Oriental and Asiatic groups are even more promising due to the resistance to *Botrytis* found in most of the Oriental hybrids and the resistance to *Fusarium* and some viruses found in most of the Asiatic hybrids. These resistances together with the ornamental traits from both groups make these Oriental \times Asiatic lily hybrids a really interesting group of hybrids.

The mayor drawback is the sterility of the F_1 hybrids. The sterility can be restored by somatic chromosome doubling and by the use of $2n$ gametes. Through the last years we have described the advantages of sexual polyploidization over mitotic polyploidization and the way that recombination can be achieved in the $2n$ gametes. The purpose of the present report is to illustrate how those recombinant chromosomes are transmitted to the next generations (BC_2).

We have selected a number of OA hybrids in which the fertility was restored in different ways: 1) through somatic polyploidization (chromosome doubling with oryzaline) ($4x$ -OA) and 2) by a selection of $2n$ gamete producers. These genotypes were crossed to Asiatic hybrids to obtain triploid progeny (AOAs). Even though, triploid hybrids shows low fertility in some cases, we were able to utilize them in further crosses: 1) to diploid Asiatic hybrids as both female and male parents to obtain A AOA and AOA A hybrids, respectively, 2) to tetraploid ($4x$ -OA) hybrids and 3) to other OA hybrids $2n$ gamete producers. In the last two cases AOA OA hybrids were obtained. A scheme of these crosses can be found in Figure 1.

As a result of the $2x - 3x$ and $3x - 2x$ crosses diploid and near diploid progeny was obtained (Table 3). In the case where triploid hybrids originated through $2n$ gametes, recombinant chromosomes were present and transmitted to the progeny (Table 4) as expected (Figure 2). The chromosome segregation was remarkable in these cases, without exception, the Asiatic chromosomes were 24 and the number of Oriental chromosomes varied from 1 to 8 (042627-1 to 7 in Table 2), this indicate that the Asiatic chromosomes were able to pair and formed bivalents and were segregated normally in the meiosis that led to pollen formation in the triploid hybrid, while the Oriental chromosomes did not paired and the univalent chromosomes were segregated randomly. In the triploid hybrids that originated through somatic chromosome doubling an unbalanced number of Asiatic chromosomes were found (Table 2), the progeny contained 24 and 27 Asiatic chromosomes and the Oriental chromosomes were missing with one exception (022171-1) (Figure 3a) where only one Oriental chromosome was present.

The $3x - 4x$ crosses were directed in three ways: 1) those in which the triploid hybrid originated through the use of $2n$ gametes and was crossed with a $4x$ -OA hybrid (Figure 1), 2) those in which the triploid hybrid was originated a $4x$ -OA and was crossed to another somatic doubled tetraploid (Figure 1) and 3) those progeny plants that originated through the cross of a triploid hybrid from $2n$ gametes and other $2n$ gamete (Figure 1).

In all cases the ploidy level of the progeny varied from near triploid to near pentaploid. In the first case, most of the progeny plants possessed one or two recombinant chromosomes (Table 4, Figure 3b).

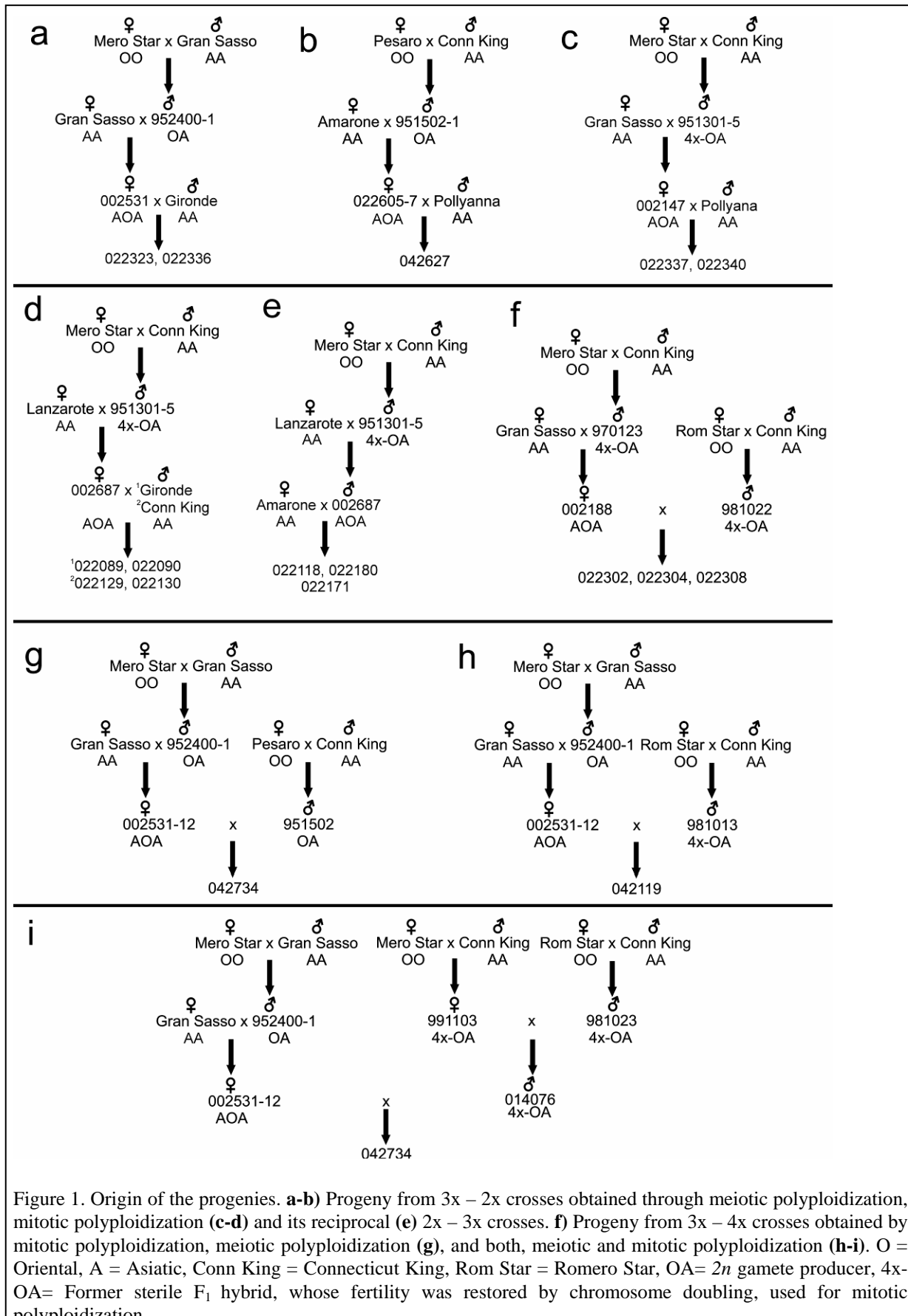


Figure 1. Origin of the progenies. **a-b**) Progeny from 3x – 2x crosses obtained through meiotic polyploidization, mitotic polyploidization (**c-d**) and its reciprocal (**e**) 2x – 3x crosses. **f**) Progeny from 3x – 4x crosses obtained by mitotic polyploidization, meiotic polyploidization (**g**), and both, meiotic and mitotic polyploidization (**h-i**). O = Oriental, A = Asiatic, Conn King = Connecticut King, Rom Star = Romero Star, OA= 2n gamete producer, 4x-OA= Former sterile F₁ hybrid, whose fertility was restored by chromosome doubling, used for mitotic polyploidization.

Table 3. DNA content, ploidy level and chromosome number of aneuploid progeny plants derived from 3x-2x, 2x-3x and 3x-4x crosses.

Cross	Genotype	Parents		DNA content	Ploidy C-level	Chromosome Number *
		Female	Male			
3x (MP) – 2x						
AOA × AA	022089-1	002687-12	'Gironde'	135.70	2.8	34 ^e
AOA × AA	022089-2	002687-12	'Gironde'	104.06	2.2	26 ^e
AOA × AA	022089-3	002687-12	'Gironde'	129.75	2.7	32 ^e
AOA × AA	022089-4	002687-12	'Gironde'	122.45	2.6	31 ^e
AOA × AA	022089-5	002687-12	'Gironde'	109.75	2.3	27 ^e
AOA × AA	022089-6	002687-12	'Gironde'	105.63	2.2	26 ^e
AOA × AA	022089-9	002687-12	'Gironde'	131.86	2.8	33 ^e
AOA × AA	022090-1	002687-13	'Gironde'	125.52	2.6	31 ^e
AOA × AA	022090-2	002687-13	'Gironde'	116.17	2.4	29 ^e
AOA × AA	022090-3	002687-13	'Gironde'	112.89	2.4	28 ^e
AOA × AA	022090-4	002687-13	'Gironde'	119.38	2.5	30 ^e
AOA × AA	022090-5	002687-13	'Gironde'	105.84	2.2	26 ^e
AOA × AA	022090-6	002687-13	'Gironde'	108.00	2.3	27 ^e
AOA × AA	022090-8	002687-13	'Gironde'	107.86	2.3	27 ^e
AOA × AA	022090-9	002687-13	'Gironde'	99.49	2.1	25 ^e
AOA × AA	022090-10	002687-13	'Gironde'	118.26	2.5	30 ^e
AOA × AA	022129-1	002687-29	'Conn King'	121.19	2.5	30 ^e
AOA × AA	022129-2	002687-29	'Conn King'	124.08	2.6	31 ^e
AOA × AA	022129-3	002687-29	'Conn King'	127.26	2.7	32 ^e
AOA × AA	022130-1	002687-36	'Conn King'	124.75	2.6	31 ^e
AOA × AA	022130-3	002687-36	'Conn King'	109.82	2.3	27 ^e
AOA × AA	022130-6	002687-36	'Conn King'	129.70	2.7	32 ^e
AOA × AA	022130-7	002687-36	'Conn King'	123.49	2.6	31 ^e
AOA × AA	022323-1	002531-3	'Gironde'	108.60	3.3	27 ^e
AOA × AA	022336-1	002531-12	'Gironde'	108.35	2.3	27 ^e
AOA × AA	022336-2	002531-12	'Gironde'	122.17	2.6	30 ^e
AOA × AA	022337-1	002147-12	'Pollyana'	107.79	2.2	27 ^e
AOA × AA	022337-2	002147-12	'Pollyana'	110.45	2.5	28 ^e
AOA × AA	022337-3	002147-12	'Pollyana'	139.68	2.9	35 ^e
AOA × AA	022337-4	002147-12	'Pollyana'	111.63	2.3	28 ^e
AOA × AA	022337-5	002147-12	'Pollyana'	116.79	2.5	29 ^e
AOA × AA	022340-1	002147-16	'Pollyana'	122.03	2.6	30 ^e
AOA × AA	022340-2	002147-16	'Pollyana'	111.77	2.3	28 ^e
AOA × AA	022340-3	002147-16	'Pollyana'	120.28	2.5	30 ^e
3x (2n) – 2x						
AOA × AA	042627-1	042605-7	'Pollyana'	103.78	2.1	26 ^e /25 ^o
AOA × AA	042627-2	042605-7	'Pollyana'	138.10	2.8	34 ^e /32 ^o
AOA × AA	042627-3	042605-7	'Pollyana'	120.35	2.4	30 ^e /31 ^o
AOA × AA	042627-4	042605-7	'Pollyana'	129.98	2.6	32 ^e /30 ^o
AOA × AA	042627-5	042605-7	'Pollyana'	114.67	2.3	29 ^e /29 ^o
AOA × AA	042627-6	042605-7	'Pollyana'	120.56	2.4	30 ^e /29 ^o
AOA × AA	042627-7	042605-7	'Pollyana'	127.08	2.5	32 ^e /32 ^o
AOA × AA	042627-8	042605-7	'Pollyana'	103.89	2.1	26 ^e
AOA × AA	042627-9	042605-7	'Pollyana'	129.91	2.6	32 ^e
AOA × AA	042627-10	042605-7	'Pollyana'	138.25	2.8	35 ^e
AOA × AA	042627-11	042605-7	'Pollyana'	114.56	2.3	29 ^e
AOA × AA	042627-12	042605-7	'Pollyana'	111.91	2.2	28 ^e
2x × 3x (MP)						
AA × AOA	022118-1	'Amarone'	022687-8	102.77	2.2	26 ^e
AA × AOA	022118-2	'Amarone'	022687-8	99.21	2.1	25 ^e /27 ^o
AA × AOA	022118-3	'Amarone'	022687-8	98.79	2.1	25 ^e
AA × AOA	022118-4	'Amarone'	022687-8	103.68	2.2	26 ^e /27 ^o
AA × AOA	022118-5	'Amarone'	022687-8	99.42	2.1	25 ^e
AA × AOA	022118-6	'Amarone'	022687-8	99.91	2.1	25 ^e
AA × AOA	022118-7	'Amarone'	022687-8	99.77	2.1	25 ^e /24 ^o
AA × AOA	022118-8	'Amarone'	022687-8	102.63	2.2	26 ^e /27 ^o
AA × AOA	022118-9	'Amarone'	022687-8	102.98	2.2	26 ^e
AA × AOA	022118-10	'Amarone'	022687-8	103.47	2.2	26 ^e

*^e – Expected chromosome number, ^o – Observed chromosome number

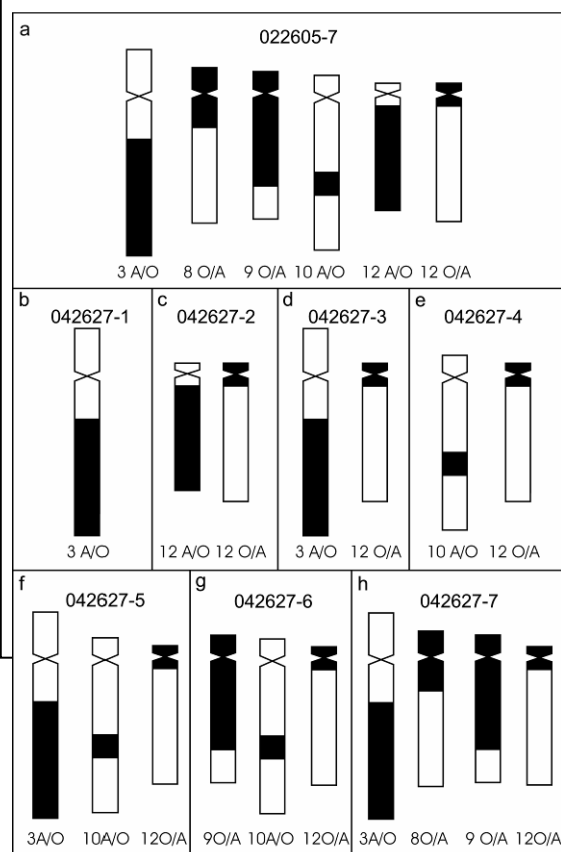
(MP) = Obtained through mitotic polyploidization
 (2n) = Obtained through 2n gametes

Table 3 cont. DNA content, ploidy level and chromosome number of aneuploid progeny plants derived from 3x-2x, 2x-3x and 3x-4x crosses.

Cross	Genotype	Parents		DNA Content	Ploidy C-level	Chromosome Number *
		Female	Male			
3x (MP) × 4x						
AOA × 4x-OA	022308-1	022188-25	981022	235.75	5.0	59 ^e
AOA × 4x-OA	022308-2	022188-25	981022	228.01	4.8	57 ^e / 49 ^o
AOA × 4x-OA	022308-3	022188-25	981022	166.92	3.5	42 ^e
AOA × 4x-OA	022308-4	022188-25	981022	233.10	4.9	58 ^e / 62 ^o
AOA × 4x-OA	022308-5	022188-25	981022	174.43	3.5	44 ^e
AOA × 4x-OA	022308-6	022188-25	981022	221.03	4.5	55 ^e
AOA × 4x-OA	022308-7	022188-25	981022	237.78	4.8	59 ^e
AOA × 4x-OA	022308-8	022188-25	981022	167.73	3.4	42 ^e / 44 ^o
AOA × 4x-OA	022308-9	022188-25	981022	179.24	3.6	45 ^e
AOA × 4x-OA	022308-10	022188-25	981022	182.66	3.7	46 ^e
3x (2n) × 4x						
AOA × 4x-OA	032971-1	002531-12	014076	178.02	3.6	44 ^e / 38 ^o
AOA × 4x-OA	032971-2	002531-12	014076	186.29	3.8	46 ^e / 46 ^o
AOA × 4x-OA	032971-3	002531-12	014076	149.59	3.0	37 ^e / 44 ^o
AOA × 4x-OA	032971-5	002531-12	014076	166.68	3.4	42
AOA × 4x-OA	032971-6	002531-12	014076	189.29	3.8	47
AOA × 4x-OA	032971-7	002531-12	014076	154.68	3.1	39
AOA × 4x-OA	032971-8	002531-12	014076	159.56	3.2	40
AOA × 4x-OA	032971-9	002531-12	014076	193.26	3.9	48
AOA × 4x-OA	042119-1	002531-12	981013	147.70	3.0	37
AOA × 4x-OA	042119-2	002531-12	981013	184.54	3.7	46
AOA × 4x-OA	042119-4	002531-12	981013	168.83	3.4	42 ^e / 42 ^o
AOA × 4x-OA	042119-5	002531-12	981013	175.79	3.5	44 ^e / 45 ^o
AOA × 4x-OA	042119-7	002531-12	981013	191.80	3.8	48 ^e / 49 ^o
AOA × 4x-OA	042119-8	002531-12	981013	187.47	3.7	47
3x (2n) × 2x**						
AOA × OA	042734-1	002531-12	951502-1	n.a.	n.a.	60 ^o
AOA × OA	042734-2	002531-12	951502-1	145.89	2.9	36 ^e / 38 ^o

*^e = Expected chromosome number, ^o = Observed chromosome number ** 2n gamete producer

(MP) = Obtained through mitotic polyploidization (2n) = Obtained through 2n gametes



In the second case, only two progeny plants possessed a single recombinant chromosome. The recombinant chromosomes obviously had originated in the triploid hybrid (Table 4, Figure 3c). In the third case, where the AOA hybrid had originated through 2n gametes and it was crossed with another 2n gamete producer, the higher frequency of recombinant chromosomes was found (7 in the case of 042734-2) (Table 4, Figure 3d).

Figure 2. Diagrammatic representation of the six recombinant chromosomes in the BC₁ allotriploid AOA (a) and its segregation to seven progeny plants (b-h). The

solid (black) parts of recombinant chromosomes represent the O genome chromatin, while the empty (white) ones - the A genome chromatin.

As it can be inferred from the ploidy levels in the progeny plants in all directions, it was clear that most of the progeny was originated by aneuploid pollen grains, however there was evidence that a few of them originated through euploid pollen grains ($2n = 2x = 24$ in 022118-7; 022180-2, $2n = 4x = 48$ in 022302-3 and $2n = 5x = 60$ in 042734-1). 042734-1 is an interesting case because it possesses 48 Asiatic chromosomes and 12 Oriental chromosomes (Figure 3e), a possible explanation is the triploid hybrid contributed with 36 Asiatic chromosomes and the $2n$ gamete producer parent contributed with 12 Asiatic and 12 Oriental chromosomes (Table 4). However, a certain explanation is not possible at this stage.

Table 5. Genomic composition of progeny plants derived from $3x - 2x$, $2x - 3x$ and $3x - 4x$ crosses. The number of recombinant chromosomes and the possible chromosome contribution of the parental gametes analyzed through GISH.

Cross (Triploid origin)	Genotype	Ploidy Level	Genome composition		Total number of recombinant chromosomes	Chromosome contribution of the gametes				
			O (O/A)	A (A/O)		♀		♂		
						O	A	O	A	
2x – 3x (MP)										
AA × AOA	022118-2	2x+3	-	27	-	12	-	15		
AA × AOA	022118-4	2x+3	-	27	-	12	-	15		
AA × AOA	022118-7	2x	-	24	-	12	-	12		
AA × AOA	022118-8	2x+3	-	27	-	12	-	15		
AA × AOA	022171-1	2x+1	1	24	-	12	1	12		
AA × AOA	022180-2	2x	-	24	-	12	-	12		
3x (2n) – 2x										
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		
3x (MP) – 4x-OA										
AOA × 4x-OA	022302-3	4x	22	26	-	14	10	12	12	
AOA × 4x-OA	022302-4	3x+9	18	27(1)	1	7	14	12	12	
AOA × 4x-OA	022302-5	3x+4	16	24	-	4	12	12	12	
AOA × 4x-OA	022304-1	3x+3	14	25	-	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	-	6	13	12	12	
AOA × 4x-OA	022304-4	3x+3	15	24	-	3	12	12	12	
AOA × 4x-OA	022308-2	4x+1	20	29	-	8	17	12	12	
AOA × 4x-OA	022308-4	5x+2	20	42	-	8	30	12	12	
AOA × 4x-OA	022308-9	3x+8	19	25	-	7	13	12	12	
3x (2n) – 4x-OA										
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	-	8	12	12	12	
AOA × 4x-OA	042119-4	3x+6	18	24	-	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+1	23(1)	26	1	11	14	12	12	
3x (2n) – 2x*										
AOA × OA	042734-1	5x	12(1)	48(1)	2	-	36	12	12	
AOA × OA	042734-2	3x+2	14(4)	24(3)	7	2	12	12	12	

* $2n$ gamete producer

(MP) = Obtained through mitotic polyploidization

(2n) = Obtained through $2n$ gametes

The number of recombinant chromosomes in the progeny obtained through the use of $2n$ gametes is a clear indication of the advantages of sexual polyploidization over mitotic polyploidization. Introgression of Oriental chromosomes and chromosome segments has been accomplished and furthermore, it is expected that those diploid and near diploid hybrids that possess Oriental chromosomes will lose them during the meiotic process. However, it is also expected that the Asiatic recombinant chromosomes (A/O) (Figure 2) will be kept in further crosses and in this way if there are Oriental genes of interest they may be retained and probably detected and followed when molecular markers will be available.

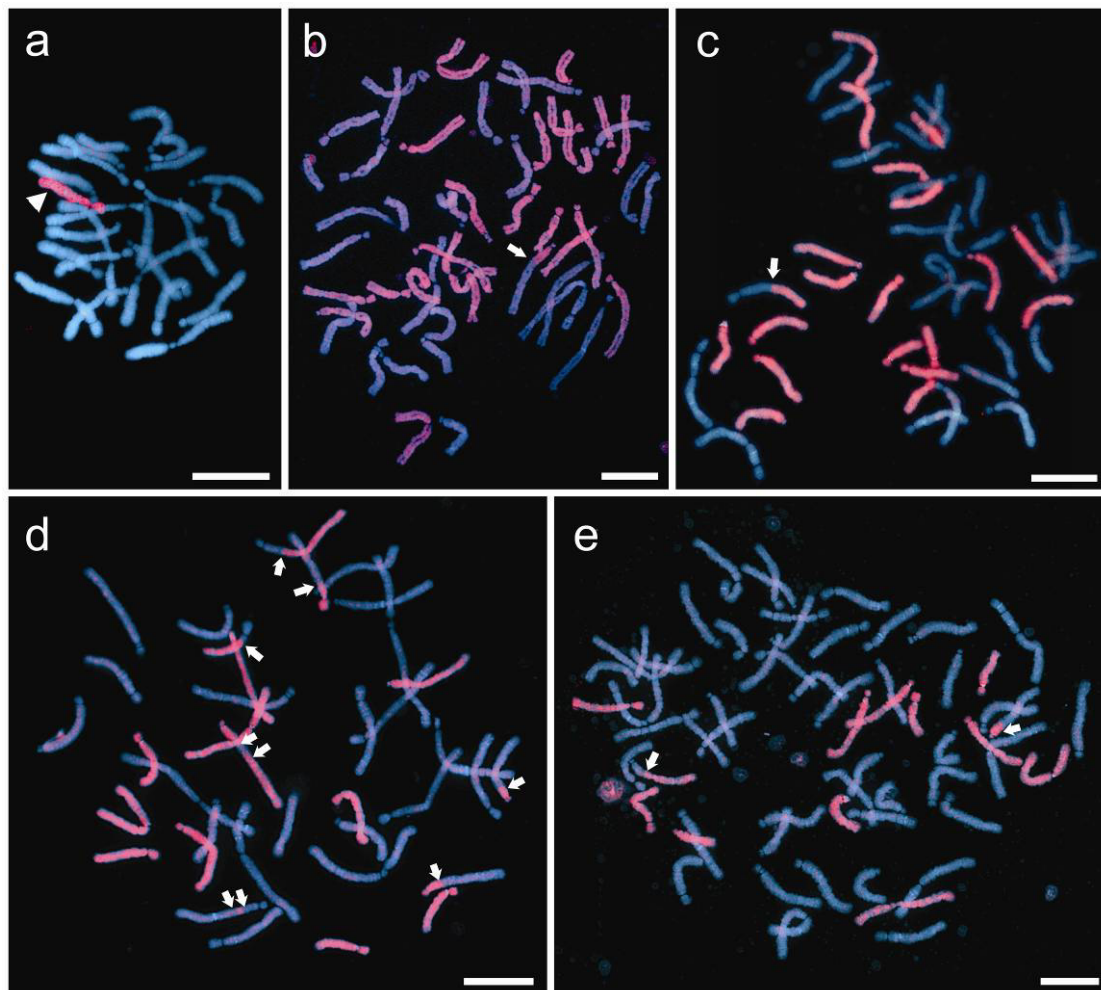


Figure 3. Chromosome detection of intergenomic recombination and chromosome constitution in five BC_2 progenies. In all cases, the biotin-labeled Oriental (O) DNA was detected with the Cy3-streptavidin system (pink fluorescence) and the Asiatic (A) DNA was counter-stained with DAPI (blue fluorescence). **a**) The near-diploid ($2x+1$) complement of 022171-1, showing 24 A + 1 O (arrowhead) chromosomes. **b**) The near-tetraploid ($4x+1$) complement of 042119-7, showing 26 A + 23 O and a recombinant chromosome (arrow). **c**) The near-tetraploid ($3x+9$) complement of 022302-4, showing 27 A + 18 O and a recombinant chromosome (arrow). **d**) The near-triploid ($3x+2$) complement of 042734-2, showing 24 A + 14 O with seven recombinant chromosomes (arrows). **e**) The pentaploid ($5x$) complement of 042734-1, showing 48 A + 12 O with two recombinant chromosomes (arrows). Bar represents 10 μm .

8.3.7.2 $2n$ gametes induction

Even though, the importance of $2n$ gametes has been recognized, the low number of $2n$ gametes that produce them is a limiting factor to use them routinely. In order to induce $2n$ gametes with the advantages of chromosome recombination it would be necessary to modify the meiotic process to lead it to nucleic restitution. This could be accomplished through the use of the so-called ‘spindle poisons’ such as colchicine, oryzaline and nitrous oxide (N_2O). The last one differs to the others because while the first two must be applied as an aqueous solution, N_2O it can be applied as gas. It can rapidly penetrate the plant tissues and its toxic effect, if any, will disappear when the plant is removed from the gas chamber, process that can not be accomplished when tissues are treated with solutions.

In view of this, we treated eight different genotypes of OA hybrids with N_2O . Two out of the eight genotypes were known to produce $2n$ gametes in low frequencies (951502-1 and 952400-1) while the rest were completely sterile when tested during at least three seasons (Table 6).

Table 6. Pollen germination percentage (range) per genotype under different N_2O treatments.

Genotype	N_2O Treatment		
	0h	24h	48h
951301-5	0	70 (0-95)	-
951502-1	7 (0-30)	15.3 (1-55)	73.75 (55-80)
951914-1	0	0	0
952059-9	0	0	21.3 (15-25)
952400-1	4.5 (0-35)	10.6 (0-30)	36.8 (5-60)
952521-1	1.1 (0-5)	0.5 (0-2)	1.1 (0-4)
962377-1	0	0	-
969023-2	0	5.7 (1-60)	-

The whole plants, containing flower buds ranging 0.5 to 1.0 cm were placed in a gas chamber and treated during 0h (untreated control) 24h and 48h with N_2O at a pressure of 5 bars.

The criteria that were used to determine the fertility were 1) the *in vitro* germination, where six out of the eight genotypes responded in a positive way to the N_2O treatment and the higher germination range was under 48h of treatment (Table 6). 2) Embryo formation after crossing the N_2O treated plants either as male or female parent to diploid Asiatic hybrids ($2n=2x=24$). Both male and female $2n$ gametes were induced in two genotypes (951301-5 and 969023-1) that were completely sterile before N_2O treatment (Table 7). In other two genotypes only $2n$ pollen was induced, in 951502-1, a known $2n$ gamete producer, the germination range of the pollen was increased from 0-35% in the untreated control to 55-80% in the 48h N_2O treatment (Table 6, Figure 4) and 28 embryos were obtained in a single pollination (Table 7). There was only one case (952400-1, Table 7) where embryos were formed when the OA hybrid was not treated, however this hybrid is a known $2n$ gametes producer.

In view of the success in restoring fertility and inducing $2n$ gametes the ploidy level of a population of 41 progeny plants obtained from the cross of 951301-5 treated with N_2O during 24h to the Asiatic lily hybrid 'Vivaldi' as both male and female parent was analyzed through flow cytometry. The results indicated that most of the progeny plants were triploid and seven were tetraploids. Probably originated by functioning $2n$ gametes from 'Vivaldi' (Table 8, Figure 6)).

Table 7. Number of embryos obtained (number of pollinated flowers) from crosses to Asiatic parents with OA hybrids treated during different times with N_2O .

Genotype	Used as	N2O Treatment		
		0h	24h	48h
951301-5	♀	*	32 (10)	-
		*	176 (19)	-
951502-1	♀	0 (2)	0 (1)	-
		0 (3)	7 (2)	28 (1)
952059-9	♀	-	0(1)	0 (1)
		0 (1)	-	1 (4)
952400-1	♀	3 (2)	0 (1)	0 (1)
		2 (5)	0 (4)	0 (1)
969023-2	♀	0 (3)	1 (10)	-
		0 (2)	28 (6)	-

Table 8. Ploidy level of progeny obtained from 951301-5 after N_2O treatment.

Parents		Cross	Number of progeny analyzed	Ploidy level of the progenies	
Female	Male			3x	4x
'Vivaldi'	951301-5	AA × OA	29	22	7
951301-5	'Vivaldi'	OA × AA	12	12	0

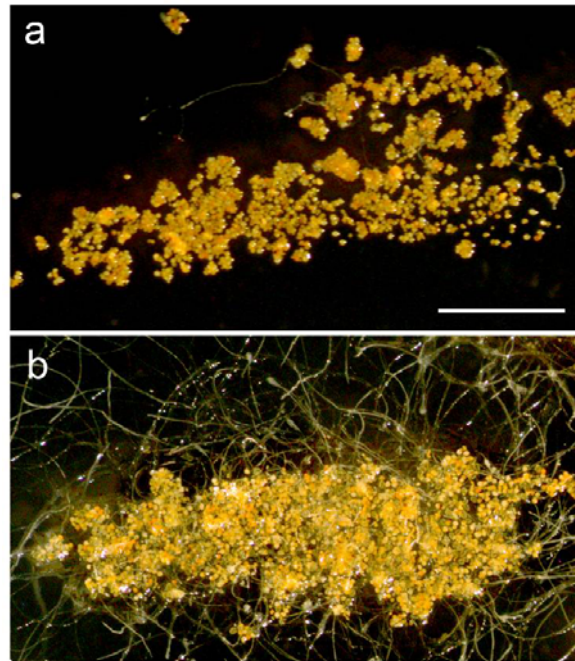


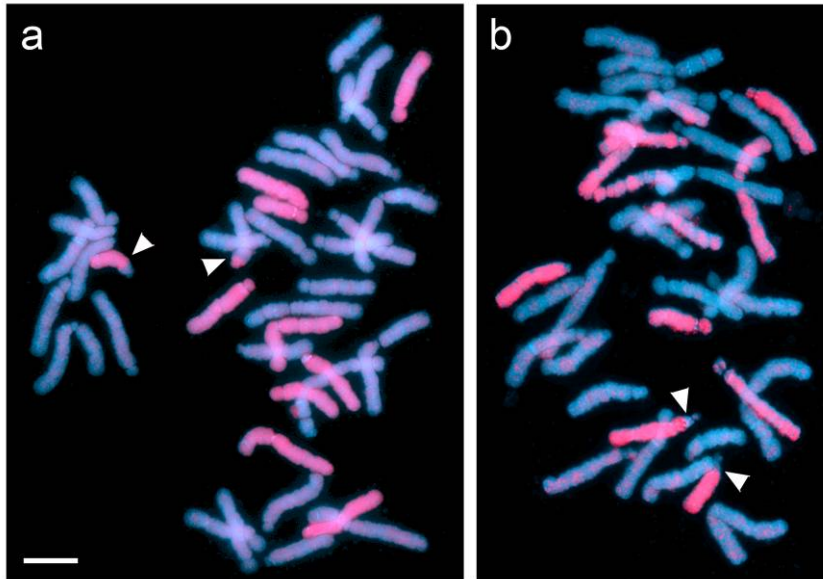
Figure 4. Germination of $2n$ pollen from the OA hybrid 951502-1. a. Untreated (0 h treatment). b. After 48 h of N_2O treatment. *Bar*: 0.5 cm.

Table 9. Genome composition and number of recombinant chromosomes in progenies obtained from the cross of N_2O treated OA hybrid 951301-5 to Asiatic (A) parent.

Genotype	Cross	Ploidy	Genome composition		Number of recombinant chromosomes
			O (O/A)	A (A/O)	
042923-1	AA × OA	3x	10	26(2)	2
042924-1	AA × OA	4x	12(1)	36(1)	2
042924-2	AA × OA	3x	12	24	0
042924-3	AA × OA	4x	12	36	0
042924-4	AA × OA	3x	12	24	0
042924-5	AA × OA	3x	12	24	0
042924-6	AA × OA	4x	13	35	0
042924-7	AA × OA	4x	12	36	0
042924-8	AA × OA	3x	12	24	0
042927-2	OA × AA	3x	12	24	0
042927-4	OA × AA	3x	12	24	0
042928-1	AA × OA	3x	12(1)	24	1

GISH analyses in 12 of the progeny plants demonstrated that first division restitution and indeterminate meiotic restitution mechanisms were responsible for the formation of $2n$ gametes in 10 and two cases respectively. Three progeny plants possess recombinant chromosomes (Figure 5), thus, it is obvious that they were originated by restitution mechanisms and not by pre- or post-meiotic doubling.

Figure 5. Chromosome complements of the BC₁ progenies from the cross of N₂O treated OA hybrid 951301-5



to Asiatic (A) parent showing a triploid ($2n=3x=36$) and a tetraploid ($2n=4x=48$) chromosome number. **(a)** Triploid chromosome complement of 042923-1, showing 10 Oriental and 26 Asiatic chromosomes with two recombinants (arrowheads). **(b)** Tetraploid chromosome complement of 042924-1, showing 12 Oriental and 36 Asiatic chromosomes with two recombinants (arrowheads). In both cases the biotin-labeled Oriental DNA was detected with the Cy3-streptavidin system (pink fluorescence) and Asiatic chromosomes were counter stained with DAPI (blue fluorescence). *Bar:* 10 μ m.

These results demonstrate that $2n$ gametes can be induced in sterile OA hybrids and the production can be increased in the OA hybrids that produce them in low frequencies. We have produced more than 700 OA hybrids, from which only a few produce $2n$ gametes, however, with N₂O treatments, any of them might react in a positive way to N₂O treatments.

8.3.8 Sexual polyploidization and introgression studies in LA-hybrids (Shujun Zhou)

A report from the activities from May 2004-february 2005 was sent to the contributing companies in March. (see attached LA_March2005.pdf). Only the most recent activities are summarized here:

1. A number of new progenies related with LA hybrids were obtained, some of them have grown in greenhouse. Based a primary analysis on these progenies, an interesting phenomenon was found in crosses between diploids and tetraploid). If tetraploids are male fertile, it is much easier to get progenies of $2x-4x$ than to get progenies of $4x-2x$. Why? Is it related with the ploidy level of endosperm, or other reasons? In order to find the reason, we will do more crosses between $2x-4x$, $4x-2x$, $4x-4x$, $5x-2x$, $5x-4x$, etc. Perhaps, it is very important to know the mechanism of megasporogenesis. However, it is quite difficult to study megasporogenesis of LA hybrids with different ploidy level. In order to dissolve this problem, we are going to analyse some endosperm ploidy levels with cytoflometry. If this works, the results will give us a clue to know lily megasporogenesis.

2. Chromosome painting on BC3 progenies (044501-044509) also gave us some interesting results (Figure 6). All the progenies are triploid ($2n=3x=36$) or near triploid. This means all the pentaploids (ALALA) only produced fertile $2x$ -pollen. More interestingly, the GISH results clearly showed that chromosomal complements in different pollens were quite different, not only in recombinant chromosomes, as well as in chromosome assortment. This gave us two interesting things to do:

1) Analyse the mechanism of $2x$ -pollen formation of pentaploids (997118-5, 8 and 12). We already collected their anthers. The results will come soon.

2) Compare the differences between BC1 and some BC3. They are all triploidy, but chromosomal complements are different. We hope to find some morphological traits related with chromosomal changes.



Figure 6. A hybrid from A x ALALA with recombinant chromosomes

8.4 Publicaties

Rodrigo Barba-Gonzalez, 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 x Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). Theor. Appl. Genet. 109:1125-1132.

R. Barba-Gonzalez, 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 x Asiatic lilies (*Lilium*): relevance to intergenomic recombination and backcrossing. Accepted in Euphytica.

R. Barba-Gonzalez, Alex A. Van Silfhout, M.S. Ramanna, R.G.F. Visser & J.M. Van Tuyl 2005

Utilization of allotriploid BC1 progenies of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) in introgression breeding - an assessment based on GISH analysis. Submitted to Chromosome Research.

R. Barba-Gonzalez, M.S. Ramanna, R.G.F. Visser & J.M. Van Tuyl 2005.

The Occurrence of 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 analyses. Submitted to Genome.

R. Barba-Gonzalez, C. Miller, M.S. Ramanna, & J.M. Van Tuyl 2005.

Nitrous oxide (N₂O) induces $2n$ gametes in sterile F1 hybrids between Oriental × Asiatic lily (*Lilium*) hybrids and leads to intergenomic recombination. Submitted to Euphytica.

Rodrigo Barba-Gonzalez, 2005.

The use of $2n$ gametes for introgression breeding in Oriental x Asiatic lilies. PhD-thesis, Wageningen University, 100 pp

9 Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

- Enkele publicaties in wetenschappelijke tijdschriften (zie 8.4)

10. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

- Het project loopt volgens planning

11. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

- Voortzetting Fusarium-resistentie toets
- Onderzoek naar inductie van 2n-gameten bij een reeks steriele OA-hybriden
- GISH-onderzoek van hybriden afkomstig van geïnduceerde 2n-gameten
- Uitvoering embyoescue van gemaakte kruisingen
- Opkweek van embryocultuur materiaal afkomstig van OA-doorkruisingen, gericht op virus-, Fusarium en Botrytis resistentie

12. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget?

- Nee

Tussentijdse rapportage

1. Datum:	7-12-2005
2. Projecttitel:	Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytis-resistentie
3. Projectnummer PT:	11184
4. Intern projectnummer:	76000012.00
5. Projectleider:	Jaap M. van Tuyl
Adres:	Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel:	0317 477329 0653362858
Fax:	0317 418094
Email:	Jaap.vantuyl@wur.nl

6. Gewas: (indien van toepassing): Lelie

7. Oorspronkelijke Looptijd project: 1-1-2003-3112-2005

9. Periode waarover wordt gerapporteerd: 15-6-2005 - 15-12-2005

10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11. Voortgang van het project

11.1 Algemeen

WUR-student Martin Beers zal van november - mei zijn afstudeerstudie binnen het project uitvoeren. Hij zal GISH-analyses van diverse AOA-hybriden gaan uitvoeren. Op 13 september heeft Rodrigo Barba zijn proefschrift met succes verdedigd. Intussen is hij teruggekeerd naar Mexico, waar hij vergelijkbaar onderzoek zal gaan opzetten voor o.a. Agave.

Het SENTER-onderzoeksvorstel dat in mei werd ingediend, werd als beste project in deze ronde gehonoreerd. De oorspronkelijke planning werd gezien de jaarplanning een jaar vooruitgeschoven. Als gevolg daarvan moest ook een nieuwe aanvraag voor PT-subsidie worden aangevraagd. Deze is inmiddels verleend. Het driejarige project zal 1-1-2006 van start gaan. Corine Anker, onderzoekscoördinator bloembollenonderzoek PT, zal voor de duur van het project zitting nemen in de begeleidingscommissie.

11.2 Fusariumtoets

De resultaten van de Fusarium-toets van dit jaar staan in onderstaande Tabel 1 vermeld. Opgenomen waren enkele AOA en OAA selecties, materiaal dat door bedrijven geselecteerd was en enkele nummers uit de AOA-populatie bestemd voor het nieuwe merkerproject. De ziekteindex was over het geheel genomen hoger dan in de vorige toets. De tetra 012181-3 die veel gebruikt is vanwege zijn hoge Fusarium en virusresistentie komt er weer als zeer resistent uit. Amarone blijkt een vrij hoge vatbaarheid door te geven.

Tabel 1. Resultaten Fusarium-toets

Type	MbNo.	Ziekteindex	Ouder(s)
OAA	012062-5	1.00	Te 951301-5 x Gironde
OAOA	012181-3	1.00	Te 951301-5 x te 951462-1
OAA	012092-29	1.05	Te 951301-5 x Gironde
OA	951462-1	1.30	Romero Star x Con. King
AA	021055	1.45	Con King
OA	969023-2	1.45	Casa Blanca X Con King
AA	980072	1.50	Mont Blanc
AOA A	022145	2.00	002787-28 x Gironde (Sel)
OA	951502 1	2.35	Pesaro x Con King
OAA	012105-2	2.50	Te 951301-5 x Gironde
OAA	012105-9	3.00	Te 951301-5 x Gironde
LL	031043	3.15	White Fox
AOA	022605-24	3.25	Amarone x 951502-1
AOA	012248-1 (574)	3.40	Amarone te x Te 981004 (Sel)
AOA	012246-1 (573)	3.69	Gironde x Te 952088-2 (Sel)
AOA	022605	3.70	Amarone x 951502-1
OA	967243 1	4.00	Expression x Lanzarote
OAA	012065-1 (575)	4.15	te 951914-1 x Amarone (Sel)
AOA	022538-12-1	4.15	Amarone x 951502-1
OAOA	014050	4.30	Te 951301-5 x te 951914-1 (Sel)
OO	031108	4.35	Sissi
AOA	022605-54	4.45	Amarone x 951502-1
AOA	022605-27	4.65	Amarone x 951502-1
OA	952400 1	4.65	Merostar x Gran Sasso
LA	969023 1	4.80	Gelria X Con King
AOA	002531-12	5.25	Gironde 952400-1 (Sel)
OAA	022004-4	6.00	te 951914-1 x Amarone (Sel)
AOA	022605-17	6.00	Amarone x 951502-1

11.3. Kruisingsprogramma 2005

In totaal werden ruim 2500 bloemen bestoven. Een deel werd in vitro gezet een een ander deel als zaad geogst. Tot 1 december 2005 waren ruim 116 embryos in vitro gekiemd. Daarnaast werden ruim 400 zaden geogst. Kruisingen waren dit jaar o.a. gericht op het verkrijgen van meer tetraploid fertiel materiaal. Dit heeft een tot nu toe een aantal gekiemde embryo's opgeleverd, zoals hieronder weergegeven.

Tabel 2. Diverse geslaagde OA x OA combinaties

MB-no	Moeder	Vader	Kiem
052114	951479-1	012181 2	1
052185	951462-1	022356 4	3
052333	981020	022255 6	4
052379	001313	981020	2
052414	022269 2	981010	3
052442	991110	012305	5
052485	014076	022356	5
052486	014074	991357-2	15
052804	012305	012181 2	2
052825	970115	014016	2
052948	952400-1	981021	2

Enkele andere opvallende resultaten zijn hieronder weergegeven. Het betreft een terugkruising op een Oriental een OAO wat tot nu toe zeer moeilijk bleek. Verder terugkruisingen op LOOA-hyriden en nakomelingen van 022171-1, een genotype met 25 chromosomen waarvan 1 Oriental. Ten slotte werden enkele OTOA hybriden verkregen. Het lijkt erop dat OA's kruisbaar zijn met diverse andere soorthybriden (LA, LO, OT).

Tabel 3. Bijzondere kruisingen met OA's

MB-no	Moeder	Vader	Type	Kiem
052151	051029	032185 1	O AOA	1
052316	032234 1	051073	LO OA A	3
052317	032234 3	051065	LO OA A	3
052422	012374	031039	OAO A	6
052507	051043	022171 1	L AAOA	29
052824	011222	012305	OT OA	9

Wat betreft de lachgasbehandelingen: de werking is opnieuw aangetoond. Er werden ruim 40 zaden/embryos uit deze behandelingen verkregen. Een overzicht van de zaadoogst per type kruising is weergegeven in Tabel 4. Vermeldingswaard zijn hierbij de combinaties OAA x O en de AOA x AAOA. Bij AAOA gaat het om 022171-1 een genotype met 25 chromosomen, waaronder 1 Oriental chromosoom.

Tabel 4. De zaadoogst per type kruising.

Type	Zaden
A AOA	19
A OA	133
AOA A	144
AOA AOA	4
AOA AAOA	8
AOA LD	2
AOA OA	24
LA A	6
OA A	61
OAA O	23
OAA A	8
Totaal	432

11.4 Beoordeling nieuw materiaal

Nieuw materiaal uit kruisingen gemaakt in 2002 en 2003 kwam voor het eerst in bloei. Het betreft deels kruisingen waar hoge Fusarium en virus resistentie gecombineerd werden en deels tetraploide OA-combinaties. Er werden een dertigtal planten geselecteerd die geschubd werden (zie onderstaande Tabel 5 en Fig. 1) .

Tabel 5. Selecties in nieuw beoordeeld materiaal

Type	Monsternr.	moeder	vader
A OA	032065-1	031040	012304-5
A OA	032095-3	011090	012304-11
A OA	032096-2	011094	012304-12
A OA	032185-4	031040	012304-6
A OA	032185-8	031040	012304-6
A OA	032185-9	031040	012304-6
A OA	032185-12	031040	012304-6
A OA	032185-16	031040	012304-6
A OA	032191-2	031028	012304-12
A OA	032247-2	031028	012304-12

A OA	032247-6	031028	012304-12
A OA	032263-2	031028	012181-12
A OA	032265-1	031040	012181-12
A OA	032265-2	031040	012181-12
A OA	032354-4	031042	012304-24
A OA	032354-10	031042	012304-24
A OA	032476-2	980072	012304-18
A OA	032476-5	980072	012304-18
AOA OA	032973-1	002536-1	012304
OA OA	036505-1	991435	014076
OA OA	022226-2	991112	991357
OA OA	022254-1	991112	991357
OA OA	022255-1	991110	991357
OA OA	022255-6	991110	991357
OA OA	022255-7	991110	991357
A OA	022604-2	021039	951502 1
OA A	022004-1-1	991107	021040
OA A	022203-1	952400-1	021039
OA A	022315-1	981024	011090

Fig.1 Een selectie ontstaan uit de kruising Pollyana x 012304-12



11.5 Introgressie 2n-gameten

Student Martin Beers zal in aansluiting op het werk van Rodrigo Barba divers OA-materiaal met behulp van GISH analyseren t.w.

1. Enkele terugkruisingspopulaties van het type AOA x AA, waarbij de AOA steeds een verschillend genotype uit de merkerpopulatie (022605) is. Het is belangrijk om na te gaan of hier ook veel O-chromosomen met recombinatie mee gaan in volgende generatie, zoals Rodrigo aantoonde.
2. Nakomelingen van 022171-1 (24 A en 1 O), wat gebeurt er met het O-chromosoom?
3. Nakomelingen van OA 969023-2 waarvan via lachgas een serie AOA zijn verkregen en waarvan we de recombinatie frequentie nog niet kennen.

11.6 Vermeerdering, uitgifte materiaal

De 3 AOA/OAA-hybriden die 2 jaar geleden geselecteerd werden en in vitro vermeerderd zijn werden dit jaar uitgeplant bij 2 bedrijven (De Jong Lelies en World Breeding) en op PRI. Deze selecties zullen (zo mogelijk) op de lilieshow op de keukenhof in 2006 gepresenteerd worden. Er is genoeg materiaal beschikbaar om aan alle bedrijven beschikbaar te stellen en om op te zetten voor de show.

Verder zal van enkele selecties die vorig jaar door de bedrijven geselecteerd werden en het afgelopen jaar geschubd zijn materiaal beschikbaar worden gesteld (Tabel 6).

Materiaal van de LA en de AOA populaties voor het nieuwe merkerproject werd voor vermeerderd.

Tabel 6. Bollen van de volgende nummers werden beschikbaar gesteld aan de deelnemende bedrijven

002531-12	A OA	001096	952400 1
012246-1 (573)	AOA	011039	981056
012248-1 (574)	AOA	011040	981004
012065-1 (575)	OAA	991107	011040
014050-1	OAOA	981029	991112
022301-1	AOA OA	002188-18	991112
022145-1	AOA A	002687-38	021039
022589-1	A OA	021040	952462 1

11.7 Sexual polyploidization and introgression studies in LA-hybrids (Shujun Zhou)

All the LA hybrids' male fertility was tested again. The result was similar to last year. Most of them were highly sterile; however, 041502 and 041519 had very good male fertility.

Some backcrosses and interploidy crosses were very successful. With embryo rescue, some progenies were obtained (Table 7).

Table 7: Crossing results of 2005 (fl=pollinated flowers; OV= # ovaries, ES= # embryosac, Em= # embryos, Germ= # germinated plants).

MB	Female	Male	Type	Fl	OV	ES	EM	Germ
054517	VHC29	980072	A A A	4		80		5
054522	051061	997118- 5	A A A A	2		2		2
054524	051066	997118- 8	A A A A	2		7		5
054525	051061	997118- 8	A A A A	2		3		3
054526	051023	997118- 12- 1	A A A A	2		17		10
054527	051066	997118- 12- 1	A A A A	2		1		1
054529	051066	997118- 12- 2	A A A A	2		4		3
054530	051066	997118- 12	A A A A	5		15		11
054534	vi val di	041513	A I A?	8		5		4
054536	vi val di	041502	A I A	7		34	1	49
054538	041564	vi val di	I A A	8		2		1
054541	041562	vi val di	I A A	7		42		8
054542	041563	vi val di	I A A	7		32		2
054544	041566	vi val di	I A A	4	13	8		3
054546	041556	997118- 8	I A A A A	6	10	7		1
054547	041557	997118- 8	I A A A A	4	15	6		1
054558	006001- 108	vi val di	I A A	7		10		2
054559	006001- 17	vi val di	I A A	10		13		1
054560	vi val di	041519	A I A	6		16		8
054561	vi val di	041524	A I A	5		28		12
054562	vi val di	041525	A I A	4		28	1	19
054563	vi val di	041530	A I A	4		20	1	15
054564	vi val di	041531	A I A	5		15		7
054565	vi val di	041532	A I A	5		30		20
054568	vi val di	006001- 60	A I A	7		9		6
t ot al								199

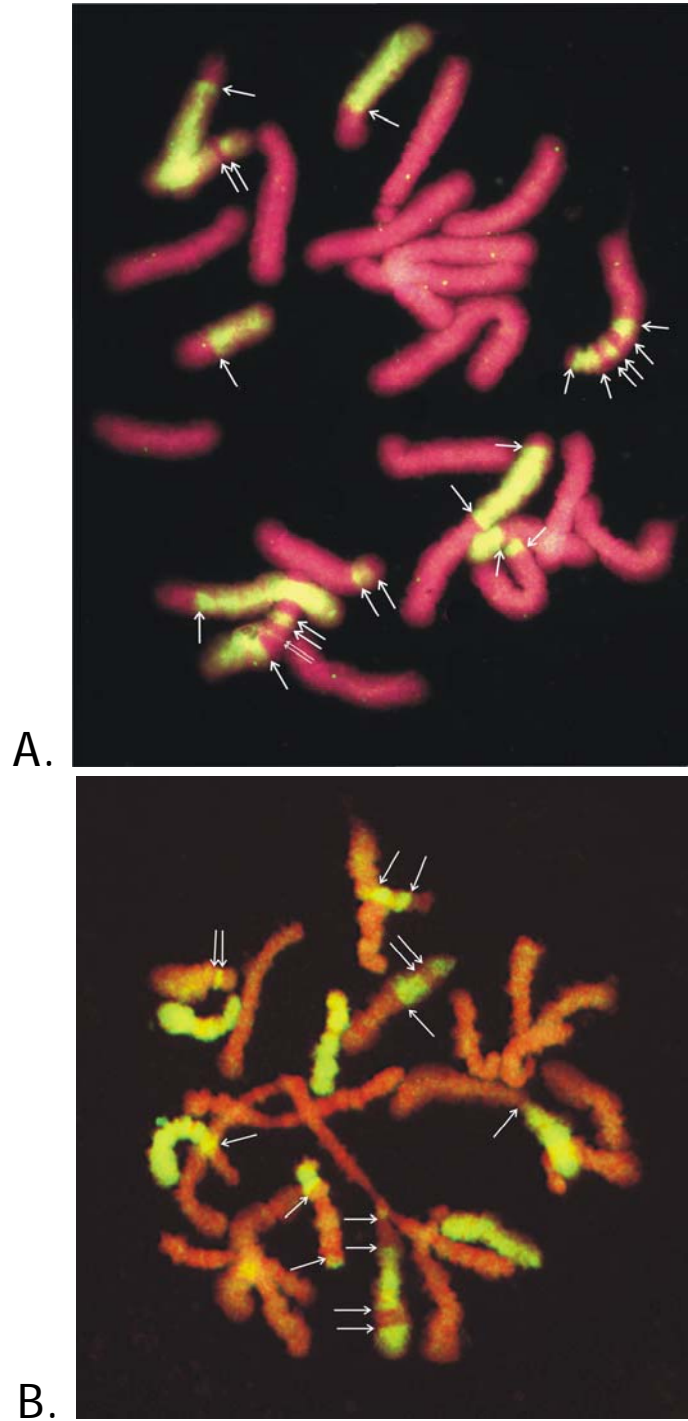
Especially interesting are two plants (054546 and 054547) from the cross LA x ALALA. Because LA produced 2n-egg and ALALA produced 2x-pollen normally, these two plants would be tetraploid and have many recombinant chromosomes. This material could be very important for introgression breeding.

The GISH results of new BC1 progenies are quite interesting (Table 8). These BC1 progenies not only appeared to be triploid, but diploid as well. The diploid BC1s were verified with GISH and could have better fertility than triploid BC1. These diploids have many recombinant chromosomes (Fig. 2). They can play an important role in introgression breeding of LA's.

Table 8: Chromosomal constitution of new BC1 progenies analysed with GISH.

MB	G-type	Par ents		Genome constitution Recomb. Chr					gamete type
		Female	Male	Chr number	L Chr	A Chr	A/L	L/A	
044511-1	LAA	LA	AA	24	3	21	2	1	n
044538-1	LAA	LA	AA	24	7	17	4	7	n
044538-3	LAA	LA	AA	24	4	20	4	2	n
044538-4	LAA	LA	AA	24	5	19	5	2	n
044539-1	LAA	LA	AA	36	12	24	1	1	FDR-2n
044595-4	ALA	AA	LA	36	12	24	0	0	FDR-2n
044601-3	ALA	AA	LA	36	11	25	0	1	IMR-2n
044601-4	ALA	AA	LA	36	12	24	1	1	FDR-2n
044601-5	ALA	AA	LA	35	11	24	0	1	
044601-6	ALA	AA	LA	37	12	25	1	2	
044638-1	ALA	AA	LA	36	11	25	1	0	IMR-2n
044638-2	ALA	AA	LA	36	10	26	2	0	IMR-2n
044638-3	ALA	AA	LA	36	10	26	3	1	IMR-2n
044638-4	ALA	AA	LA	36	12	24	0	0	FDR-2n

Fig. 2: GISH results from diploid BC1 progenies with many recombinant chromosomes, A= 044538-1 B= 044538-4



12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

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 x Asiatic lilies (*Lilium*): relevance to intergenomic recombination and backcrossing. *Euphytica*: 143: 67-73.

Barba-Gonzalez, R., Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl. 2004. Use of $2n$ Gametes for inducing intergenomic recombination in lily hybrids. *Acta Hort* 673: 161-166.

Barba-Gonzalez, R., 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., C. Miller, M.S. Ramanna, & J.M. Van Tuyl 2005. Nitrous oxide (N₂O) induces $2n$ gametes in sterile F1 hybrids between Oriental × Asiatic lily (*Lilium*) hybrids and leads to intergenomic recombination. *Euphytica*.(accepted)

Barba-Gonzalez, Rodrigo, 2005. The use of $2n$ gametes for introgression breeding in Oriental x Asiatic lilies. PhD-thesis, Wageningen University, 111 pp.

Van Tuyl, Jaap. M., Rodrigo Barba-Gonzalez, Alex A. Van Silfhout, Ki-Byung Lim & M.S. Ramanna. 2005. Meiotic polyploidization in five different interspecific *Lilium* hybrids. *Acta Hort* 673: 99-105.

12.2 Materiaal:

Bollen van de volgende nummers werden beschikbaar gesteld aan de deelnemende bedrijven

002531-12	A OA	001096	952400 1
012246-1 (573)	AOA	011039	981056
012248-1 (574)	AOA	011040	981004
012065-1 (575)	OAA	991107	011040
014050-1	OAOA	981029	991112
022301-1	AOA OA	002188-18	991112
022145-1	AOA A	002687-38	021039
022589-1	A OA	021040	952462 1

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.

Go/nogo criteria zijn gehaald

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

Het huidige project wordt afgesloten, een nieuw project: Innovatieve merkertechnieken t.b.v. resistentieveredeling bij lalie zal per 1-1-2006 van start gaan

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Nee

17. (Alleen in te vullen door afd Onderzoek PT).

Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

1. Datum: 28-06-2006
2. Projecttitel: Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechnieken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie)
3. Projectnummer PT: 12402
4. Intern projectnr: 3360100300
5. Projectleider: Jaap M. van Tuyl
Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel: 0317 477329 0653362858
Fax: 0317 418094
Email: Jaap.vantuyl@wur.nl
6. Gewas: (indien van toepassing): Lelie
7. Oorspronkelijke Looptijd project: 1-1-2006 - 31-12-2008
9. Periode waarover wordt gerapporteerd: 01-01-2006 - 01-07-2006
10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:

Website: <http://www.liliumbreeding.nl/project>

Personele inzet 2006

Martin Beers
T. Bleijenberg
M. Nadeem Khan
M.S. Ramanna
A.A. van Silfhout
J.M. van Tuyl
S. Zhou

G. Henken
A.W. van Heusden
C.G. van der Linden
M.P.W. van Kaauwen
H.J. Schouten
B.C.E. van der Ven
T.C.A.E. Wouters

H.K. Rhee

M. Ceulemans
A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
C.C. Anker
S. Bottema
M. Ceulemans
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
N. Meilland
H. Middelburg
C. Randag
A. van der Velde
A. Vletter
W. de Wit

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

Martin Beers, student plant breeding WUR, carried out his final thesis-research within the scope of this project (Introgression breeding through recombination in Oriental x Asiatic lily hybrids using $2n$ gametes -a GISH analysis). Nadeem Khan from Pakistan worked together with Martin Beers and will continue working for his PhD within this project.

Plant material of the LA-population (scale bulblets and large bulbs) was sent to NHRI, Korea in February. The *Fusarium* strains CPRO-Fol 4 and CPRO-Fol 11 and the *Botrytis elliptica* were sent to Korea in April.

Vletter & Den Haan was provided with bulbs of the AA and the AOA-population to perform *Botrytis*-testing. De Jong Lilies was provided with scale bulblets of the AOA-population for determining the level of resistance to *Fusarium oxysporum*.

11.2 Disease testing

In cooperation with Dr. Jan van Kan (department of Phytopathology, WUR) a test was carried out with culture filtrate of *Botrytis elliptica*. This test could serve as an alternative for the leaf-tip test with the *Botrytis* fungus. Two experiments were conducted, exp. 1 with 10, 30 and 100 times dilution of the culture filtrate and exp. 2 with 10 and 20 times dilution. Observations were done for a time interval of 3-5 days after infiltration of the solution on the backside of the leaf. In comparison a leaftip test with *Botrytis elliptica* spores was done. In table 1 the results are presented. The leaftip test was according to the earlier findings. It is concluded that with these

results a test with culture filtrate is not discriminating well enough between the genotypes. More research has to be done to develop a feasible test method.

Table 1. Results of the culture filtrate test and the leafiptest (LTT)

		Exp 1			Exp 2		LTT
		31-mrt	30	100	21-apr	20	
Cultivar	type	10	30	100	10	20	
Mont blanc	A				3.0	2.0	5.0
Orlito	A	5.0	2.3	3.8	3.0	2.2	3.7
CK	A	5.0	3.0	1.0	3.4	2.2	2.6
Pirate	A	4.8	2.8	1.0	3.7	3.2	3.3
Nello	A	3.5	2.3	1.3	3.4	3.4	2.2
Gelria	L	5.0	3.0	1.5	4.9	3.0	2.6
771024	L	2.5	1.0	1.0			2.1
White Fox	L	2.5	2.3	1.0	4.2	3.2	3.9
Sorbonne	O				3.0	2.7	1.0
Rialto	O	1.8	1.0	1.0	3.5	2.8	1.4
Le reve	O	2.8	1.0	1.0	3.5	2.5	1.8
Seedless	O	3.0	1.0	1.0	2.6	1.8	2.4
Concador	O	1.0	1.0	1.0	2.8	3.0	1.9

Mature bulbs of LA lilies were planted in NHRI greenhouse on 24th May. These plants will be used for the *Botrytis*-resistance test. Scales of LA lilies were planted 5 per pot for screening of *Fusarium oxysporum*. Results are not yet available.



Fig. 1 *Fusarium* Experiment at NHRI

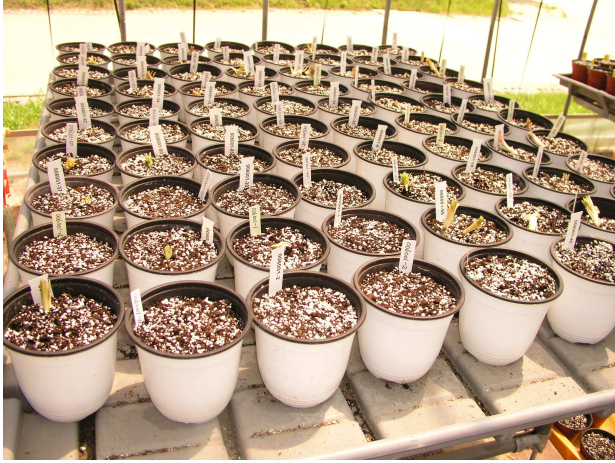


Fig.2 Bulbs planted for Botrytis exp. at

NHRI

Two Botrytis-leaf tests of the AA and the AOA-population were carried out in Rijnsburg by Vletter & Den Haan; Results have to be worked out. It appeared that a number of leaves did not give symptoms after inoculation. A Fusarium-test with scale bulblets of the AOA-population is going on by De Jong Lilies in Andijk.

The planning for the disease-testing is:

- Processing of the disease data

11.3 Marker analysis

DNA isolation

Young leaves were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For DNA isolation, leaf material was first grinded in a mortar and then DNA was isolated using the Qiagen DNA assay extraction kit according to the manufacturer's protocol.

NBS profiling

NBS profiling is a novel marker technique that produces multiple markers of which the majority is located in resistance genes or resistance gene analogs. In order to select the best primer-enzyme combinations, we have first tested a number of primer-enzyme combinations on DNA samples of the AA parents Connecticut and Orlito, and of a few individuals of the progeny. Most of the primer-enzyme combinations produced a marker pattern that would likely yield between 10-30 polymorphic markers in the population.

In addition, we tested a few changes to the original NBS profiling protocol to tailor the protocol to the large genome of lily. The first change would be to use methylation-sensitive restriction enzymes. It is a well-known fact that large parts of plant genomes (in particular the heterochromatic parts which are generally full of repeats and hardly contain active genes) are methylated. By using methylation-

sensitive enzymes, the euchromatin regions of the genome are preferentially cut, and the heterochromatin is largely ignored, which would effectively reduce the genome size amenable for NBS profiling considerably. We have used Msp I (limited methylation sensitivity) and Hpa II (highly methylation-sensitive) for NBS profiling with the NBS3 primer. The resulting NBS profile with Msp I produced more than 20 polymorphic markers, indicating that for NBS profiling in lily, methylation-sensitive enzymes may have added value. Another possible improvement would be to decrease the total number of bands in the profile, which may increase the number of scorable polymorphic bands. A first test with more selective primers indeed appeared to be an improvement over the original primers.

The best-performing primers were NBS6 and NBS3, so we decided to first use these on a progeny of 95 individuals. For three primer-enzyme combinations the gels have been run and the data is collected. 130 polymorphic bands were identified and scored. Mapping of these markers is in progress. Gels for another five primer-enzyme combinations have been run, and scoring is in progress. We estimate to be able to identify and score at least an additional 80 markers within the next couple of weeks from these gels.

The planning for NBS-profiling is:

- To produce more markers using additional primer-enzyme combinations on the AA population. We estimate to have more than 200 scorable polymorphic markers within a few months.
- Score the additional markers and collect the data in a binary matrix
- Map all the markers on the existing genetic linkage map of the AA population
- Identify markers that are linked to TBV or Fusarium resistance.

DArT

DArT (Diversity Array Technology) is a modern marker technology, based on micro-arrays. This technology allows screening hundreds of markers simultaneously.

- For DArT we took the DNA of the parents Connecticut King and Orlito as a starting point. This DNA had to be cut by restriction enzymes into fragments. A selection of about 20,000 of these fragments should be amplified (PCR). The genome size of lily is about 40 Gbp, which is extremely large. The genome size is approximately 200 larger than the model plant *Arabidopsis thaliana*. Taking this into consideration we decided to cut the DNA with the restriction enzyme PstI and a frequently cutting enzyme (MseI, TaqI, MvaI, or MspI), and cutting additionally with the enzyme HindIII. A selection of fragments was amplified, i.e. we amplified fragments that had PstI restriction sites at both ends, without a restriction site of one of the other enzymes within the fragment. However, the PCR appeared to perform poorly. After changing the PstI-adaptor, this PCR problem was solved. Then, we

evaluated these combinations of enzymes. The results indicate that the combination PstI – MseI and the combination PstI - TaqI are most promising. Libraries were created of 1536 (4x 384) fragments of DNA from both the parents Connecticut King and Orlito using the enzyme combinations PstI – MseI and PstI – TaqI. Printing of the slides can start now.

The planning for DArT is:

- Print these DNA fragments on slides, giving micro-arrays.
- Test the number DNA fragments that behave as a marker between the two parents, by comparing the micro-arrays results after hybridization with DNA from the parent Connecticut King with the results of hybridization with Orlito. This will be done for both libraries of fragments.
- Expand the library that gives the largest number of markers between the two parents. Print the large library of DNA fragments on slides, giving new micro-arrays.
- Screen the progeny of Connecticut King x Orlito on these micro-arrays. Screen all fragments for possibly marker behavior. Score all markers. The scoring and analysis will be performed by means of the software DartSoft.
- Create genetic linkage maps (chromosome maps), and find markers for resistance to TBV or Fusarium.

11.4 GISH-analysis of the AOA-population

Rodrigo Barba analyzed for his PhD-thesis 10 genotypes of the AOA-population Amarone x OA 951502-1 (Barba et al 2005; Genome 48: 884-894). This analysis was continued both by Rodrigo in Mexico and at PRI by WUR-student Martin Beers and the new PhD-student Nadeem Khan in 2006. 64 greenhouse grown genotypes of the population were introduced in vitro culture.

Of 12 genotypes the ploidy level, genomic composition and number of recombinant chromosomes was determined (Table 2). Out of 12 plants that were analyzed, 11 triploid and 1 tetraploid was found (table 2). By GISH it was possible to identify the chromosomes of the parental genomes and also the recombinant segments. Within the 11 triploids most genotypes contain 12 O and 24 A chromosomes, except for one remarkable genotype in where one extra Asiatic chromosome was present (022605-30). This is therefore called an aneuploid (3x+1). Also two triploid genotypes were found which seemed to have a lower number of A chromosomes (022605-41, 022605-44), but unfortunately the exact number of A chromosomes could not yet be determined and it could therefore not be said whether these are aneuploid triploids. Also one tetraploid (022605-10) has been found and originated due to a 2n egg cell. This genotype contained 12 O and 36 A chromosomes as expected. From the 12 plants, 10 plants possessed recombinant chromosomes (table 2) with a varying number from 1 to 8 recombinant chromosomes in different genotypes.

Table 2 The ploidy level, genomic composition and number of recombinant chromosomes of the AOA-progeny plants analyzed through GISH.

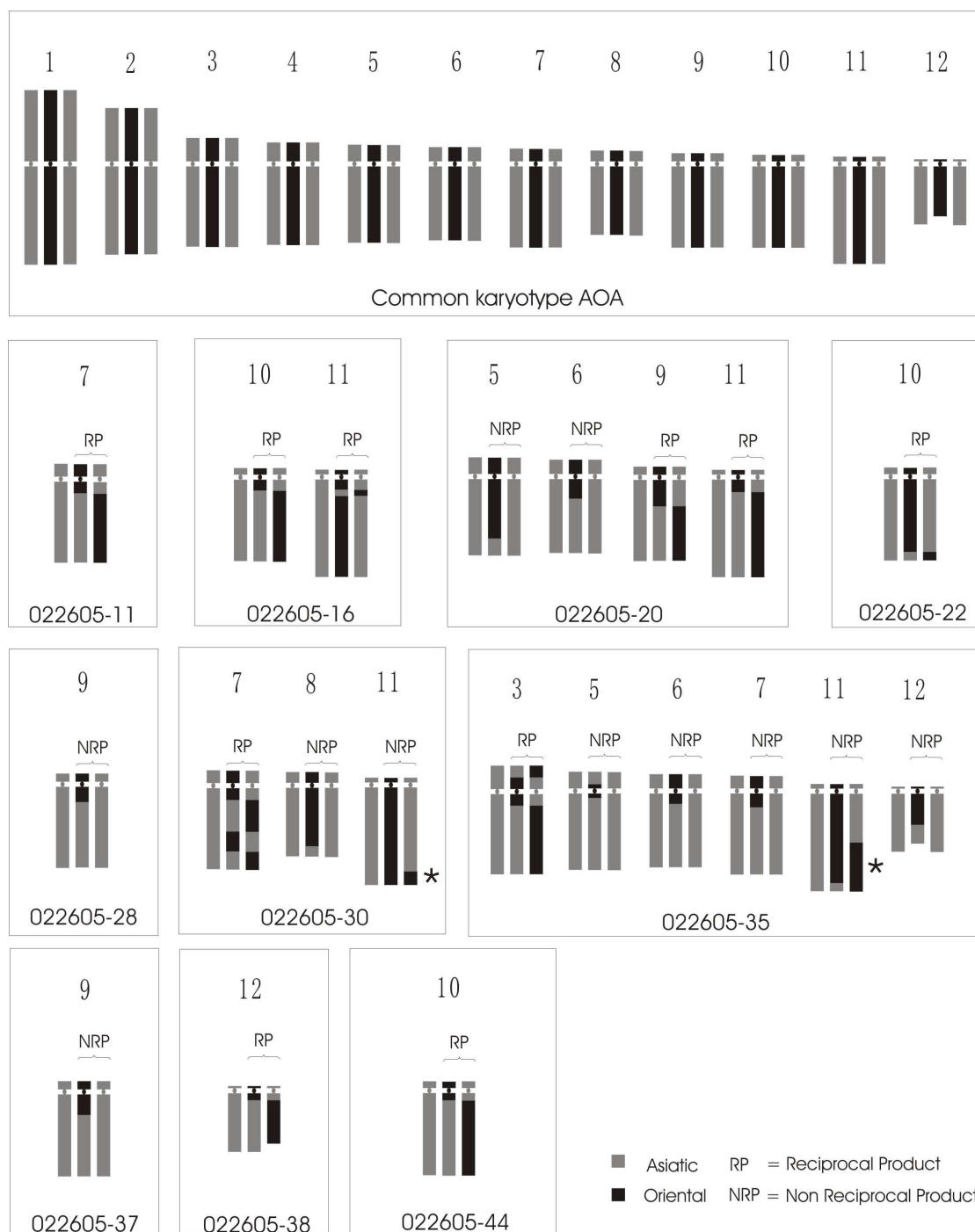
Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant chromosomes
		Female	Male		O (⁰ / _A)	A (^A / ₀)	
2x – 2x (2n)							
AA x OA	022605-10	021040	951502-1	4x	12	36	0
AA x OA	022605-11	021040	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
AA x OA	022605-16	021040	951502-1	3x	12(2)	24(2)	4
AA x OA	022605-20	021040	951502-1	3x	12(4)	24(2)	6
AA x OA	022605-22	021040	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
AA x OA	022605-28	021040	951502-1	3x	12(1)	24	1
AA x OA	022605-30	021040	951502-1	3x+1	12(2)	25(2)	4
AA x OA	022605-35	021040	951502-1	3x	12(6)	24(2)	8
AA x OA	022605-37	021040	951502-1	3x	12(1)	24	1
AA x OA	022605-38	021040	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
AA x OA	022605-41	021040	951502-1	3x	12	22?	0
AA x OA	022605-44	021040	951502-1	3x	12(1)	22?(1)	2

? = could not yet be confirmed

The plants have been analyzed for the restitution method that has occurred based upon the GISH results. Also karyotypes have been made (fig. 3). In here, the A chromosome obtained from the female parent is shown at the left side and the O and A chromosomes obtained from the OA hybrid used as male parent are shown in the middle and the right side of the karyotype. According to the GISH results, all the BC₁ plants have been obtained through FDR mechanism. This is based upon the fact that almost all plants have received full complement of 12 O + 24 A. All plants have received 12 individual O + A chromosomes from the 2n gametes of the OA hybrids. This was found in all the plants except for genotypes 022605-10 (4x) and 022605-30 (3x+1). For genotype 022605-10 (4x), 12 O + 36 A have been found, where it received 12 O + 12 A from the OA hybrid, but also the full 24 A from the diploid Asiatic cultivar due to a 2n egg cell. Because of the unaltered chromosome number, also a FDR must have happened. Genotype 022605-30 (3x+1) also originated as a result of FDR. In here, 1 bivalent probably lagged behind and did not separate normally during anaphase II (fig. 4) resulting in a 2n+1 and 2n-1 gamete. In this case the 2n+1 gamete fused with the haploid Asiatic gamete resulting in a 3x+1 plant.

For genotype 022605-41 and 022605-44 it was unfortunately not yet possible to determine the number of Asiatic chromosomes and it could therefore not be said which restitutional mechanism has occurred.

Fig. 3 Common karyotype of BC₁ (AOA) and 10 BC₁ progeny plants showing recombinant chromosomes.



Another confirmation for FDR is that with a single crossover and FDR being the mechanism the non-sister chromatids may consist of reciprocal products (O/A ; A/O), or non-reciprocal products ($O, A/O$ or $A, O/A$). When IMR would have occurred, reciprocal recombination products can not be found. In 8 out of 10 plants with recombinant chromosomes 1 or more of these reciprocal recombination products (marked as RP in fig. 3) were found and have therefore been obtained through FDR. Other cases have a combination of $A, O/A$. Furthermore, in most of the plants the recombinant chromosomes had single crossovers, but there were also cases of double crossovers (022605-16 and 022605-35) and even triple crossovers (022605-30) (fig. 3). Most likely these were two

strand crossovers, but this can not be confirmed from the analysis of somatic chromosomes alone.

The planning for GISH is:

- Continue of GISH and FISH--analysis of the AOA-population

11.6 Soortkruisingen

Kruisingsprogramma 2006

In het programma van dit jaar werd gebruik gemaakt van divers materiaal dat door de bedrijven beschikbaar is gesteld. Dit betrof moderne Orientals, goede diploïde Aziaten, OT en opstaande trompetten. Alles met het doel dit te combineren met de meeste fertiele en resistente OA's (Tabel 3).

Tabel 3. Nieuw leliemateriaal ten behoeve van het kruisingsprogramma 2006.

MbNo	Type	Naam	Herkomst
031104	OO	Merostar	Ouders OA
031105	OO	Expression	Ouders OA
031106	OO	Bel Paso	Ouders OA
031107	OO	Pesaro	Ouders OA
031108	OO	Sissi	Ouders OA
061037	OT	Belladonna	Steenvoorden
061038	OT	Manissa	Steenvoorden
061052	OO	Curly	Steenvoorden
061053	OO	Tessa	Steenvoorden
061055	AA	Soleil	Steenvoorden
013028	OT	Georgette	Steenvoorden
061018	OO	Vespucci	VB Bos
061021	OO	Lombardia	VB Bos
061084	OO	El Santo	Mak
061082	OO	Carmina	Mak
061083	OO	Tropical	Mak
061080	OO	Akemi	De Jong
061081	OO	Magic Pearl	De Jong
061085	AA	Black Out	Mak
061087	OT	Shocking	Worldbreeding
79209 1	AA	Orlito	mol merker
011085	AA	Grand Cru	mol merker
011086	AA	Chianti	mol merker
011087	AA	Pollyanna	mol merker

011090	AA	Dreamland	mol merker
011092	AA	Sarina	mol merker
011093	AA	Cordelia	mol merker
011094	AA	Jolanda	mol merker
061068	OO	Sumatra	Sande
061069	OO	Corvara	Sande
061070	OO	Aranal	Sande
061071	OO	Sapporo	Sande
061072	OO	Nairobi	Sande
061073	OO	Top White	Van Zanten
061074	OO	Rodina	Van Zanten
061075	OO	Activa	Van Zanten
061076	OO	Barbossa	Vletter
061077	AA	Amatrice	Vletter
061078	AA	Mariandel	Vletter
061079	AA	Visconti	Vletter
011219	OT		Evans
011220	OT		Evans
011221	OT		Evans
011222	OT		Evans
061086	OT	Shocking	World breeding
061087	OO	9810323 1	Testcentrum
061088	OO	9810000139	Testcentrum
061089	OO	9810408 3	Testcentrum
061090	AA	98215 3	De Jong
061091	AA	98218 4	De Jong
061092	AA	99211 1	De Jong
061093	AA	99220 20	De Jong
061094	AA	99251 1	De Jong
061095	AA	01220 3	De Jong
061096	AA	01230 1	De Jong
061099	TT	30127-1	Testcentrum
061097	TT	3000-117	Testcentrum
061098	TT	30145	Testcentrum
061241	LTT	Eastern Morning	Ronald
061242	OTT	Northern Carillon	Ronald
061243	ATT	Silky Belles	Ronald
061244	OTT	Silk Road	Ronald
061245	OTT	82-3-1	Ronald

Er zijn al honderden kruisingen gemaakt, maar over het resultaat valt nog weinig te zeggen. Wat betreft de lachgasbehandelingen: diverse OA's zijn behandeld. Speciaal 969023-2 en 951462-1 2 OA's die soms 2n-gameten maken, en bijzonder groeikrachtig en resistent zijn, zijn behandeld. Van

951462-1 werden van 126 behandelde bloemen 8 bloemen gevonden met een pollen-fertiliteit variërend van 12-35%. Voor 969023-2 werden 124 bloemen onderzocht, hier bleken 21 bloemen een goede fertiliteit (10-75% pollenkieming) te hebben verkregen. Het goede stuifmeel is uitgebreid gebruikt bij de bestuivingen.

Beoordeling nieuw materiaal

Nieuw materiaal uit kruisingen gemaakt in 2002 en 2003 kwam voor het eerst in bloei in 2005. Het betreft deels kruisingen waar hoge Fusarium en virus resistentie gecombineerd werden en deels tetraploide OA-combinaties. Er werden een dertigtal planten geselecteerd die geschubd werden (zie onderstaande Tabel 4). Enkele nummers worden tevens getest op Fusarium-resistentie. Dit materiaal komt momenteel in de tunnelkas (bed 3) in bloei. Het is een zwaar gewas dat goed is te beoordelen.

Tabel 4. Selecties in nieuw beoordeeld materiaal 2005

Type	Mb nr.	moeder	vader
A OA	032065-1	031040	012304-5
A OA	032095-3	011090	012304-11
A OA	032096-2	011094	012304-12
A OA	032185-4	031040	012304-6
A OA	032185-8	031040	012304-6
A OA	032185-9	031040	012304-6
A OA	032185-12	031040	012304-6
A OA	032185-16	031040	012304-6
A OA	032191-2	031028	012304-12
A OA	032247-2	031028	012304-12
A OA	032247-6	031028	012304-12
A OA	032263-2	031028	012181-12
A OA	032265-1	031040	012181-12
A OA	032265-2	031040	012181-12
A OA	032354-4	031042	012304-24
A OA	032354-10	031042	012304-24
A OA	032476-2	980072	012304-18
A OA	032476-5	980072	012304-18
AOA OA	032973-1	002536-1	012304
OA OA	036505-1	991435	014076

OA OA	022226-2	991112	991357
OA OA	022254-1	991112	991357
OA OA	022255-1	991110	991357
OA OA	022255-6	991110	991357
OA OA	022255-7	991110	991357
A OA	022604-2	021039	951502 1
OA A	022004-1-1	991107	021040
OA A	022203-1	952400-1	021039
OA A	022315-1	981024	011090

Daarnaast komen voor het eerst een behoorlijk aantal OOA-hybriden in bloei. In de plantlijst die vanaf de website www.liliumbreeding.nl te downloaden is, zijn alle verkregen nakomelingen uit het OA-programma van de jaren 1995-2004 te vinden.

Vermeerdering, uitgifte materiaal

De 3 AOA/OAA-hybriden die 3 jaar geleden geselecteerd werden en in vitro vermeerderd zijn werden dit jaar door 5 bedrijven in bloei gebracht om op de keukenhof te showen. Helaas kwam het materiaal bij de meeste bedrijven te laat in bloei. In de stand van Mak-Breeding was wel een mooie vaas met 2 AOA's te zien. Al het plantgoed is opgeplant bij de Jong Lelies en kan volgend jaar opnieuw getest worden. Het valt te overwegen om een groter aantal zaailingen uit jaargang 2003 op te zetten voor de keukenhof show (bij welk bedrijf zou deze opplanting plaats kunnen vinden?).

Planning soortkruisingsactiviteiten

- Uitvoering kruisingsprogramma
- Onderzoek kruisingsmogelijkheden OA-hybriden met diverse andere hybriden
- Onderzoek doorbreking OOA-barriere
- Opkweek en beoordeling materiaal
- Uitvoering embryo-rescue
- Onderzoek inductie 2n-gameten

11. 7 Sexual polyploidization and introgression studies in LA-hybrids

This year writing of the PhD-thesis by Shujun Zhou was almost a full time work. Chapter 2, 3, 4 and 5 are almost ready. For the introduction and discussion the first draft is ready. A PDF of the thesis as far as ready on this moment you can find on our website. Please read it and give your comments!

Chapter 5 present new data which will be presented during the meeting. The abstract of this chapter is as follows:

Interploid crosses among lily diploid Asiatic cultivars (AA: $2n=2x=24$), Longiflorum cultivars (LL: $2n=2x=24$), allotriploids (ALA or LAA: $2n=3x=36$), allotetraploids (LALA: $2n=4x=48$) and allopolyploids (ALALA: $2n\approx 5x\approx 60$) and intraploid crosses of allotetraploid selfing were made in the present research. With normal pollination and embryo rescue, 11 progenies of $2x-3x$ and nine of $3x-2x$ were obtained from 8 and 9 fruits respectively. In the same way, 125 progenies of $2x-4x$ and two of $4x-2x$ were obtained from 18 and 17 fruits respectively; and 114 progenies of $2x-5x$ (BC3) were obtained from 47 fruits. No plants were obtained from 8 fruits of $5x-2x$ and 5 fruits of $4x-4x$ crosses. Because *Lilium* has tetrasporic eight-nucleate embryo sacs (Fritillaria type), the diploid, triploid, tetraploid, and pentaploid lilies produce tetraploid, hexaploid, octaploid and decaploid polar nuclei in their embryo sacs respectively. Considering the results of lily crosses, we suggested that tetraploid polar nuclei be ideal for lily endosperm development, hexaploid acceptable, but octaploid or higher not ideal for endosperm development probably due to higher DNA content in them. Eight progenies of $2x-3x$, seven of $3x-2x$ (BC2) and 39 of $2x-5x$ (BC3) were analyzed with flow cytometry. Most of BC2 progenies were diploid, and most BC3 triploid. Five diploid BC2 and seven triploid BC3 progenies were analyzed with genomic in situ hybridization. Some Longiflorum chromosomes or their segments remained in the BC2 progenies. This implied that some specific Longiflorum traits could be introgressed into an Asiatic cultivar. Most of BC3 progenies were pseudoeuploid and less aneuploid. Both the pseudoeuploids and the aneuploids might contribute to phenotypic variability and increase the chance for selecting new lily cultivars or breeding materials.

Planning of activities:

- Finish PhD-thesis
- Continue recombination research at diploid level

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

R. Barba-Gonzalez, Chad T Miller M.S. Ramanna, & J.M. Van Tuyl 2006
Nitrous oxide N₂O induces 2n gametes in sterile F1 hybrids of Oriental x Asiatic lilies (Lilium) and leads to intergenomic recombination. Euphytica in press.

Rodrigo Barba-Gonzalez, Chad T. Miller , M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2006
Induction of 2n gametes for overcoming F1-sterility in lily and tulip. Acta Hortic in press
XXII Eucarpia Meeting -Section Ornamentals SanRemo, September 2006.

Martin Beers, 2006. Thesis report, Introgression breeding through recombination in Oriental x Asiatic lily hybrids using 2n gametes -a GISH analysis, November 2005 – May 2006, 34 pp.

Jaap van Tuyl et al. 2006. Eindrapportage PT11184, Doorbreking van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische hybriden t.b.v. van introgressie van virus, Fusarium en Botrytisresistentie, 34 pp.

Shujun Zhou, 2006. Polyploidization & introgression breeding with interspecific hybrids of Longiflorum x Asiatic (*Lilium*), draft PhD-thesis, 85 pp.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.
no/nogo criteria zullen dit jaar, zoals het er nu uitziet, gehaald worden

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:
Zie 11.2

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.
Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).
Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

1. Datum: 08-12-2006
2. Projecttitel: Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechneken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie)
3. Projectnummer PT: 12402
4. Intern projectnr: 3360100300
5. Projectleider: Jaap M. van Tuyl
Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel: 0317 477329 0653362858
Fax: 0317 418094
Email: Jaap.vantuyl@wur.nl
6. Gewas: (indien van toepassing): Lelie
7. Oorspronkelijke Looptijd project: 1-1-2006 - 31-12-2008
9. Periode waarover wordt gerapporteerd: 01-07-2006 - 15-12-2006
10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:

Website: <http://www.liliumbreeding.nl/project>

Personele inzet 2006

An An
Martin Beers
T. Bleijenberg
Laurent Gouere
M. Nadeem Khan
M.S. Ramanna
A.A. van Silfhout
J.M. van Tuyl
S. Zhou

G. Henken
A.W. van Heusden
C.G. van der Linden
M.P.W. van Kaauwen
H.J. Schouten
B.C.E. van der Ven
T.C.A.E. Wouters

H.K. Rhee

M. Ceulemans
A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
C.C. Anker
S. Bottema
M. Ceulemans
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
N. Meilland
H. Middelburg
C. Randag
A. van der Velde
A. Vletter
W. de Wit

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

Laurent Gouere, a French student, did an intership-research within the scope of this project. He carried out some *Botrytis* tests and made crosses in the AOA-population. An An, a student from Han-University (Nijmegen), started in October his thesis work. Lu Zhang, a Chinese visiting scientist arrived in November to do research in our group for one year.

11.2 Disease testing

LA-population

At NHRI in South Korea the first *Fusarium*- and *Botrytis* tests were carried out. 86 genotypes of the LA-population were planted in *Fusarium*-infected soil. After 3 months the symptoms were observed. Because of import problems, the bulbs arrived too late and the experiment could not be done as was needed (Fig.1). In quite a number of genotypes the control was infected as well. Next year the experiment will be repeated. For the same reason also only 45 genotypes were tested for *Botrytis*-resistance. At PRI the LA-population was grown in a field-test for LMoV-resistance. Of 76 genotypes which were tested with Elisa 11% was infected by LMoV and 76% by LSV. Next year the population will be tested again.

AA-population

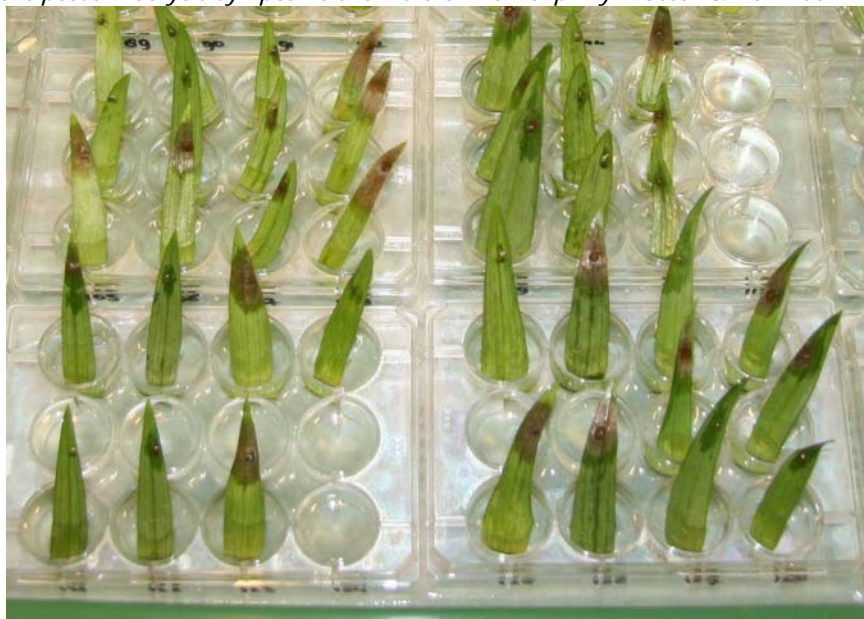
The AA-population was tested with the *Botrytis*-tip test by Vletter & Den Haan. Two tests were carried (17/5 and 2/6) with 4 replications (of 3 leaves as far as

enough material was available. The symptoms were observed 2 times. In the second experiment a high number of leaves did not give any symptoms. The condition of the *Botrytis elliptica* is essential in these tests but this is very difficult to control. Next year the experiments will be repeated.

Fig. 1 Fusarium symptoms with index 1-6.



Fig.2 A leafiptest: Botrytis symptoms are visible in an exp. By Vletter & Den Haan



AOA-population

De Jong Lilies carried out a Fusarium-test with the AOA-population. Four replications of 4 scale bulblets were planted in Fusarium-diseased soil.

The score ranged from 2 (Connecticut King the resistant control) to 5 (the most infested genotypes). The tests will be repeated next year.

This population was tested using the Botrytis-tip test by Vletter & Den Haan. Two tests were carried out (17/5 and 2/6) with 4 replications (of 3 leaves). The symptoms were observed 2 times. The variation between the replications and between the 2 tests was considerable. Next year when more material will be available the experiments will be repeated on a larger scale.

11.3 Marker analysis

DNA isolation

DNA of the AxA population (Connecticut King x Orlito) was collected earlier. Using the same protocol, plant material of the L x A (Longiflorum x Connecticut King) was collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For DNA isolation, leave material was first grinded in a mortar and then DNA was isolated using the Qiagen DNAeasy extraction kit according to the manufacturer's protocol.

NBS profiling

NBS profiling is a molecular marker technique that produces multiple markers in resistance genes and resistance gene analogs.

We tested the optimal primer-enzyme combinations using the AA parents and a limited number of progeny. Primers NBS3 and NBS6 turned out to produce suitable marker patterns. Additional markers may be added by using NBS1 or NBS2, and possibly NBS5. However, it should be noted that NBS2 patterns will partly overlap with NBS3 patterns, and NBS5 patterns with NBS6 marker patterns. .

AA population

A population of 90 individuals of the AA population was analyzed with NBS profiling using NBS3 and NBS6 primers in combination with several restriction enzymes (Mse I, Alu I, Taq I, Hae III, and Rsa I). In addition, we also used the methylation-sensitive restriction enzyme Msp I in combination with NBS3. The profiles contained a large number of bands, with between 15-60 scorable polymorphic markers (NBS6 consistently produced more scorable markers than NBS3, with the best performing combination was NBS6/Mse I (close to 60 markers in a single profile, see Figure 1). We have scored in total 278 markers for the AA population.

LA population

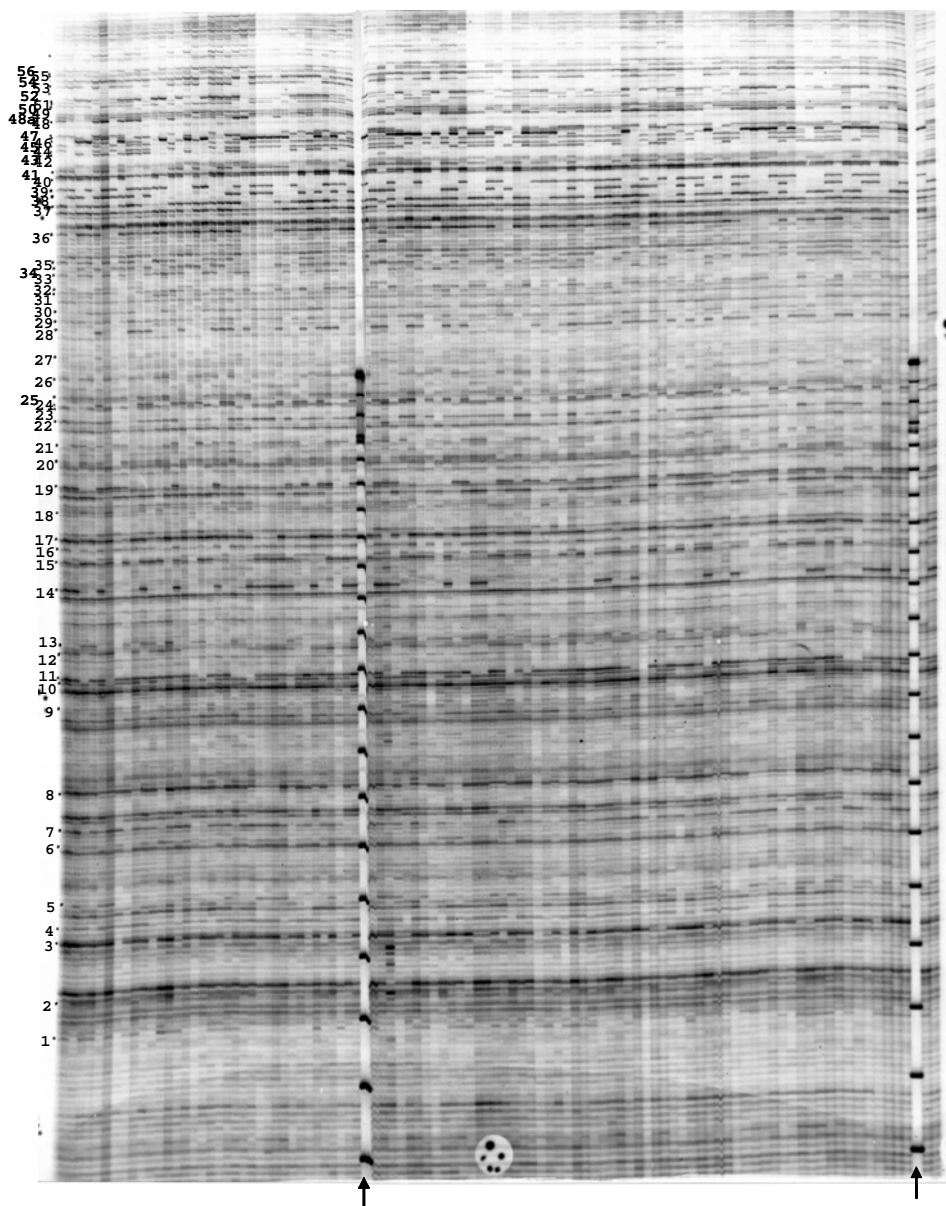
For NBS profiling with the LA population we used the same set of primer-enzyme combinations used for the AA population. The profiles were comparable to the profiles of the AA population, and await scoring. We expect to have close to 200 markers mapped in this population within the next few months.

The planning for NBS profiling:

- Score LA population profiles

- Create genetic linkage maps for the LA population (chromosome maps), and find markers for resistance to TBV or Fusarium.
- Convert the NBS profiling markers that are closely linked to resistance to TBV and Fusarium QTLs into easy-to-use markers for practical breeding.

Fig. 1. NBS profile (NBS6/Mse) of AA population: markers that are scored for mapping are indicated with dots/numbers on the left side. The lanes indicated by the arrows at the bottom are size markers (the longest band of the marker being 330bp).



DArT

Results

DArT (Diversity Array Technology) is a modern marker technology, based on micro-arrays. This technology allows screening hundreds of markers simultaneously.

As indicated in our previous report, we used DNA of the parents Connecticut King and Orlito as a starting point. We have cut this DNA with the enzyme Pst I, The Pst fragments were digested with a frequent cutting enzyme. We choose Pst I as enzyme as it cuts preferentially in non-methylated gene-rich areas. This gives especially marker in the vicinity of genes, and less in repetitive non-coding DNA areas. In order to reduce the number of Pst fragments to a manageable amount, and to increase the chance of finding markers, only Pst fragments that did not contain a recognition site of the frequent cutting enzyme were amplified. As frequent cutters we tested four enzymes (Mse I, Taq I, Mva I, or Msp I). Fragments were amplified with a length of approximately 100-800 base pairs. The results indicated that the combinations Pst I - Mse I and Pst I - Taq I are the most promising. Therefore we proceeded with these two combinations.

The Pst I - Mse I and Pst I - Taq I digested DNA fragments of Connecticut King and Orlito were individualized by insertion into a bacterial vector, and plated onto agar plates. For Connecticut King $2 \times 384 = 768$ clones were picked after cutting with Pst I and Mse I. The same number of clones was picked after cutting the Connecticut King DNA with Pst I and Taq I. We did the same for Orlito. This yielded totally $4 \times 768 = 3072$ fragments.

The inserts in the clones were amplified by PCR and printed individually on glass slides, resulting in genotyping micro-arrays.

The micro-arrays were used to fingerprint the progeny of the CK x Orlito mapping population. For this, genomic DNA from the progeny was isolated, and digested with PstI - MseI or PstI - TaqI. Pst fragments lacking a frequent cutter site (MseI, or TaqI) were amplified and labeled with a fluorescent label. The labeled PCR products were hybridised to the micro-arrays. Presence of a fragment in the progeny that is also present in one or both of the parents is indicated by a positive hybridization signal on the slide.

The majority of the spots showed a hybridization signal for all plants of the progeny, but other spots showed hybridization for some plants, but not for others. The latter ones are the molecular markers.

This approach yielded in total 338 markers. This means that 11% of the spots were polymorphic markers. For the enzyme combination PstI - MseI, 7% of the spots was polymorphic, and in case of Pst I - Taq I 14% was polymorphic. The combination Pst I - Taq I therefore produced twice the number of markers compared to the combination Pst I & Mse I.

The reproducibility of the DArT method was evaluated by repeating hybridizations on different slides, using DNA from one individual, starting each time from cutting this DNA with the enzymes. The reproducibility at the used quality thresholds was 98.9 %. This was based

on observations on six micro-arrays. This implies an error rate of 0.55 % on the average, which is low.

The planning for DArT:

- Extend the library of Pst I - Taq I DNA fragments, using DNA from all parents of the populations that have to be genotyped in this project.
- Print these DNA fragments on new slides, giving new micro-arrays. Include also the Pst I – Taq I fragments that were made in 2006 (see above).
- Screen all populations on these micro-arrays. Identify the markers.
- Create genetic linkage maps (chromosome maps), and find markers for resistance to TBV or Fusarium.
- Convert the DArT markers that are closely linked to resistance to TBV and Fusarium into easy-to-use markers for practical breeding.

Mapping

We have collected AFLP marker data of the AA population in a previous project (584 markers in total), of which one was linked to TBV resistance. We have used this mapping data to compare the results of the DArT and NBS profiling marker data. From the original 100 plants in the population we have isolated DNA from 91 plants for NBS profiling and DArT. NBS profiling marker data were collected for 90 plants of the progeny, and for DArT 72 plants were genotyped. Including AFLP, we now have a total of 1179 markers available for mapping (see table 1).

Table 1. Overview of markers for mapping

	NBS profiling	DArT	AFLP	total
CK markers	53	62	186	301
Orlito markers	111	86	195	392
Shared markers	102	182	203	487
Total	266	330	584	1180
skewed	38	28	92	158
Used for mapping	228	302	492	1022

A first rough mapping exercise was done using all the markers together using Joinmap mapping software. 33 linkage groups were produced by Joinmap. This is far more than the number of chromosomes in lily (12). However, it must be noted that the lack of suitable bridge markers will not allow the integration of Orlito and CK chromosomes. In addition, the lily chromosomes are expected to be very large, and it is very well possible that marker density is not high enough to enable the formation of linkage groups that cover the full chromosomes.

The larger linkage groups are filled with 138 NBS profiling markers, 280 AFLP markers and 181 DArT markers.

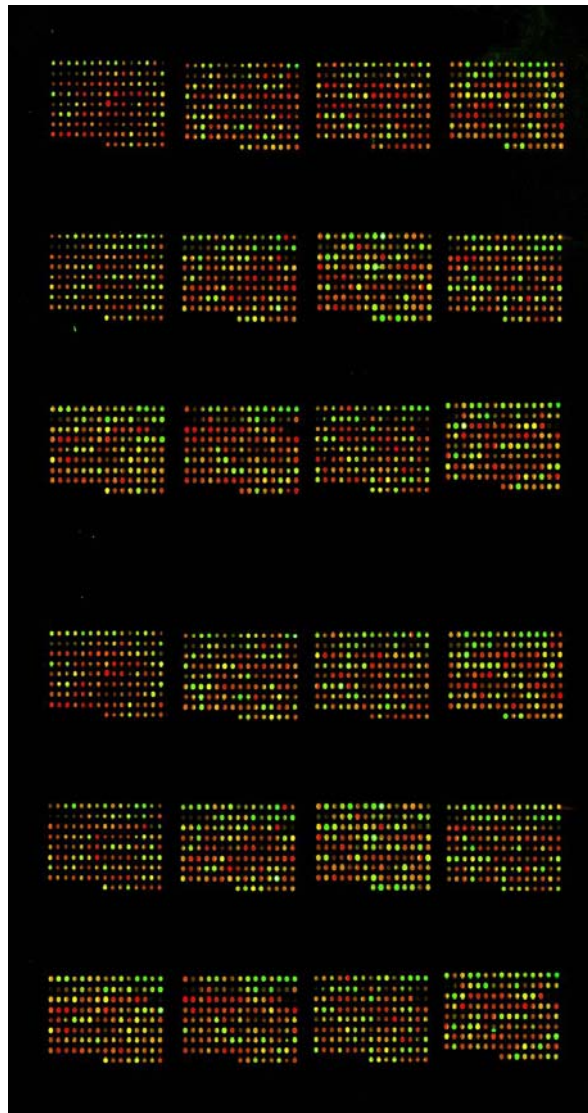


Figure 2.
An example of a DArT array image of lily, after hybridisation with Cy3 labeled DNA of one plant and Cy5 labeled DNA of reference DNA for correction of the amount of printed DNA on the slide.

A remarkable observation is that especially for the NBS profiling markers, only limited clustering is observed. Several pairs of (nearly) identical markers are identified, but the percentage of paired markers is similar to AFLP and DArT, where a larger percentage of clustering was anticipated because of the known clustering of R-genes in other species. Detailed analysis of the NBS markers and their mapping position is needed to confirm the mapping positions and the limited clustering.

The molecular marker analysis using DArT and NBS Profiling has resulted in a marker that is potentially closer to TBV resistance than any other available marker. In addition, several new markers in existing QTLs have been identified, and one new QTL was found.

Table 2 summarizes features for NBS Profiling and DArT.

We conclude that both marker technologies performed well in 2006 in lily. Therefore, we propose to continue with both technologies.

Table 2: Side-by-side comparison of NBS Profiling and DArT

Feature	NBS Profiling	DArT
Prior DNA sequence information required?	No	No
Number of markers (mapped) in 2006 (AA population), based on same financial input for both technologies	266	330
Marker characteristics	Targeted to resistance gene like sequences	Random, genome wide, some emphasis on non-methylated coding areas.
Reproducibility	?	98,9%
Costs	No starting costs, costs per marker constant.	Higher input costs. Costs per marker decreases significantly at increasing numbers of plants (> 100) and increasing numbers of markers per slide (> 100).
Conversion to easy-to-use marker	Depends on marker characteristics	Fast start compared to AFLP/NBS profiling, because the DNA sequence of the fragment can easily be obtained
Mapping characteristics:		
Clustering	No clustering over the linkage groups in lily observed	Weak clustering in lily observed
New markers for TBV resistance	One new marker identified	No new marker identified
New markers for Fusarium resistance	One new NBS marker identified in one known Fusarium QTL.	Totally 8 new DArT markers identified in three known QTLs and one new QTL for Fusarium resistance.

11.4 GISH-analysis of the AOA-population

To study the recombination frequency in the next generation, crosses were made between all the AOA's of the marker population with an Asiatic and an OA-father. For a part of the crosses embryo culture was performed and for the rest normal seed harvest took place. More than 400 seeds were harvested. Up till now 26 plants are grown in vitro after embryo culture. Most interesting are the 9 plants derived from 022605-9. This genotype was analyzed before and possessed 7 recombinant chromosomes originated from different restitution mechanisms both FDR and IMR.

The planning for GISH is:

- Continue of GISH and FISH--analysis of the AOA-population
- GISH-analysis of BC2-progenies (AOA x A)

11.5 Soortkruisingen

Kruisingsprogramma 2006

In het programma van dit jaar werd gebruik gemaakt van divers materiaal dat door de bedrijven beschikbaar is gesteld. Dit betrof moderne Orientals, goede diploïde Aziaten, OT's en opstaande trompetten. Alles met het doel dit te combineren met de meeste fertiele en resistente OA's. De nadruk lag vooral op het verkrijgen van meer OOA's. Alleen voor deze combinatie werden al bijna 1600 bloemen bestoven.

Tabel 3 geeft een overzicht van de verschillende combinaties die gemaakt zijn met het resultaat (aantal embryo's, aantal embryozakken, aantal gekiemden en het aantal verkregen zaden). Opvallend zijn het grote aantal reeds gekiemde OOA's (299 en 127 zaden) en de eerste geslaagde terugkruisingen met OOA's. Ook het relatief grote aantal gekiemde OTOA's is bijzonder te noemen. In Tabel 4 staan de meest succesvolle OA-vaders waarmee OOA werden verkregen. Het is bijzonder dat in deze OAOA's (met name 012181 en 014078) een hoge graad van virus en Fusarium-resistentie aanwezig is. Tabel 5 geeft de invloed van de Orientals moeder weer. Sumatra, Curly en Sissi leveren relatief de meeste OOA's.

Tabel 3. Overzicht van alle gemaakte OA-combinaties, het aantal verkregen embryo's (em) embryozakken (ez), het aantal gekiemden en het aantal geogste zaden.

Type	# bl	# em	# ez	# kiem	zaden
A OA	1155	2	6	5	2005
AOA OA	36	12	37	12	18
O OA	1597	226	1612	299	127
OA A	529	1	84	1	118
OA O	409			0	
OA OA	147			0	
OA OO	362			0	
OO OA	13		21	2	8
OOA OA	171	22	134	33	
OOA OO	36			0	
OOA T	22		24	0	
OOA TT	11			0	
OT O	12	3	34	6	
OT OA	245	26	269	59	6
T OA	62	3	21	8	
TT OA	25	8	75	13	
	4840	303	2353	450	2293

Tabel 4. De tetraploide OA-vaders die in kruisingen met 27 Oriental-rassen (tabel 5) geresulteerd hebben in OOA-hybriden.

Moeder	# bl	# kiem	voorouders	
012181	295	49	951301-5	951462-1
012304	124	69	951301-5	951584-1
014078	140	104	951301-5	951462-1
022356	269	42	951301-5	952400-1
	828	264		

Tabel 5. Het Oriental assortiment dat gebruikt is om OOA-hybriden te verkrijgen. Het aantal bestoven bloemen en het aantal verkregen gekiemde OOA's is weergegeven.

Oriental	# bl	# kiem
9810000139	18	0
9810323 1	30	0
9810408 3	21	0
Activa	58	7
Akemi	58	24
Aranal	67	7
Barbossa	34	0
Bel Paso	54	19
Carmina	46	5
Corvara	140	16
Curly	26	18
El Santo	44	6
Expression	46	3
Lombardia	60	10
Magic Pearl	62	0
Merostar	85	25
Nairobi	8	0
Pesaro	77	15
Rodina	69	11
Sapporo	174	3
Sissi	56	30
Sumatra	98	63
Tessa	88	3
Top White	44	9
Tropical	65	22
Vespucci	7	0
	1535	296

Tabel 6. De OT-hybriden en het verkregen aantal geslaagde kruisingen met OA's.

Moeder	Bl_#	Kiem_em	Kiem	Planten	Zaden
OT-Evans	54	14	22	24	4
Belladonna	60	16	16	17	2
Manissa	62	18	18	18	
Shocking	38				
OTT-Ronald	31	3	3	2	
Totaal	245	51	59	61	6

Beoordeling nieuw materiaal

Nieuw materiaal uit kruisingen gemaakt in 2002, 2003 en 2004 kwam voor het eerst in bloei in 2006. Het betreft deels kruisingen waar hoge Fusarium en virus resistentie gecombineerd werden en deels tetraploide OA-combinaties. In overleg en samen met de bedrijven werden 40 selecties gemaakt die geschubd werden (zie Tabel 7). Enkele nummers worden tevens getest op Fusarium-resistentie. Veelbelovend waren enkele **oranje** (fig. 5) en de eerste gele OOA.

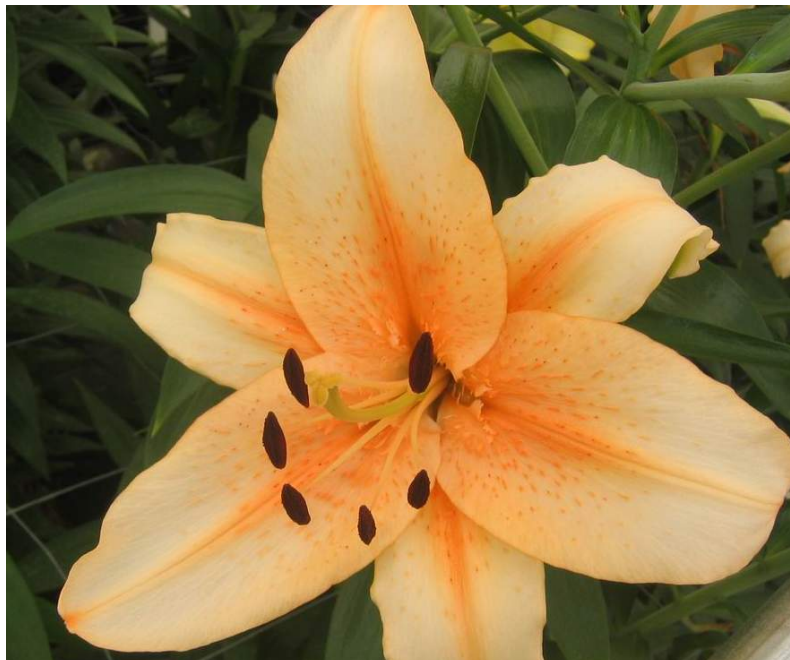


Fig. 5. Oranje OOA-hybride, 022243-7

Tabel 7. Diverse OA-selecties, vermeerderd voor uitgifte en vervolgonderzoek.

Monsternr.	Type	Moeder	Vader	selecties	Bedr. sel.
042142-1	AOA OA	012248-4	012304	X	
042017-1	AOA A	002147-56	021055	X	
042667-1	AOA OA	022538-4	951502-1		X
042667-2	AOA OA	022538-4	951502-1		X
042667-3	AOA OA	022538-4	951502-1		X
042790-1	AOA OA	022554-2	951584-1		X
042899-1	AOA OA	022229-47	951502-1	X	
032095-5	A OA	011090	012304-11	X	
032182-1-1	A OA	031028	012304-5	X	
032185-16-1	A OA	031040	012304-6	X	
032247-8	A OA	031028	012304-12	X	
032247-13	A OA	031028	012304-12	X	X
032263-1-1	A OA	031028	012181-12	X	X
032263-4	A OA	031028	012181-12	X	X
032263-5	A OA	031028	012181-12	X	
032264-1	A OA	021039	012181-12	X	X
032264-6	A OA	021039	012181-12	X	X
032265-4	A OA	021040	012181-12	X	
032354-13	A OA	031042	012304-24	X	
032601-1	A OA	031028	962119-1	X	X
032640-1	A OA	011086	951502-1	X	
032659-1	A OA	920147	951502-1	X	
032971-5	AOA OA	002531-12	014076	X	
032973-1	AOA OA	002536-1	012304	X	
036505-1	OA OA	991435	014076	X	
022607-1	A OA	021040	951462 1	X	
022243-5	O OA	021033	991357	X	
022243-7	O OA	021033	991357	X	
022243-8	O OA	021033	991357	X	
022643-9	O OA	021033	991357	X	
022243-10	O OA	021033	991357	X	
022243-11	O OA	021033	991357	X	
022243-12	O OA	021033	991357	X	
002526-5	A OA	001099	952400-1		X
012066-1	OA A	991106	011040	X	
032376-4	O OA	031031	012304-24	X	
012374-1	OA O	991110	111030	X	
022269-5	OA OA	991110	011091	X	
022626-3	OA OA	991112	951502 1	X	X
022255-2	OA OA	991110	991357		X

Vermeerdering, uitgifte materiaal

De 3 AOA/OAA-hybriden die 3 jaar geleden geselecteerd werden en in vitro vermeerderd zijn werden dit jaar door 5 bedrijven op kleine schaal in bloei gebracht om op de keukenhof te showen. Er was echter te weinig materiaal om dit goed te doen. Al het plantgoed is opgeplant bij de Jong Lelies, waardoor nu bijna 4000 bollen beschikbaar zijn om in het voorjaar van 2007 opnieuw een test te laten plaats vinden (zie Tabel 8). Ook zijn nog enkele honderden AOA zaailingen uit jaargang 2003 daarvoor beschikbaar. Bij welk bedrijf zouden deze opplantingen plaats kunnen vinden?

Tabel 8. Aantal geogste bollen van de 3 in weefselkweek vermeerderde AOA's, gesorteerd in de diverse bolmaten en het aantal gevonden dubbelneuzen (DN).

MB	Herkomst	-8	8/10	10/12	12/14	14/16	16/18	18/+	totaal	DN
012246-1	PRI	715	68	70	58	48	49	51	1059	18
012248-1	PRI	585	125	59	67	57	43	19	955	14
012065-1	PRI	703	120	162	196	157	76	31	1445	45
012246-1	De Jong	1354	139	145	105	46	23	9	1821	18
012248-1	De Jong	1080	341	136	146	96	52	25	1876	4
012065-1	De Jong	1006	164	174	184	125	65	46	1764	6
012246-1	World Breed	1700	125	110	119	113	88	71	2326	79
012248-1	World Breed	1693	385	118	211	216	121	48	2792	9
012065-1	World Breed	250	79	111	248	309	366	342	1705	53
		9086	1546	1085	1334	1167	883	642	15743	

Planning soortkruisingsactiviteiten

- Opkweek en beoordeling materiaal
- Uitvoering GISH onderzoek met OOA-materiaal
- Uitvoering van kruisingsprogramma met focus op OOA
- Onderzoek doorbreking OOA-barriere.

11.6 Intergenomic recombination and introgression breeding in Longiflorum x Asiatic lilies (thesis Shujun Zhou)

Shujun Zhou finished his PhD-thesis. He will defend his thesis on March 27 at 13.30. From the LA's which produced haploid pollen more crosses were made in order to select more diploid LA A's. Up till now around 80 plants are obtained. A ploidy test is not yet carried out.

Planning of activities:

- Finish PhD-thesis
- Continue recombination research at diploid level

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

R. Barba-Gonzalez, Chad T Miller M.S. Ramanna, & J.M. Van Tuyl 2006
Nitrous oxide N₂O induces 2n gametes in sterile F1 hybrids of Oriental x Asiatic lilies (Lilium) and leads to intergenomic recombination. Euphytica 148: 303-309.

R. Barba-Gonzalez, Alex A. Van Silfhout, M.S. Ramanna, R.G.F. Visser & J.M. Van Tuyl 2006. Progenies of allotriploid Oriental x Asiatic lilies (Lilium) examined by GISH analysis. Euphytica 151: 243-250.

Rodrigo Barba-Gonzalez, Chad T. Miller, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2006. Induction of 2n gametes for overcoming F1-sterility in lily and tulip. Acta Horti 714: 99-106 (XXII Eucarpia Meeting -Section Ornamentals SanRemo, 11-15 September 2006).

Shujun Zhou, 2006/2007. Intergenomic recombination and introgression breeding in Longiflorum x Asiatic lilies (*Lilium*), draft PhD-thesis, 100 pp.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.
no/nogo criteria zullen na 1 jaar beoordeeld worden, de huidige resultaten liggen ter beoordeling

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:
Zie 11.2

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).

Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

- | | |
|---|--|
| 1. Datum: | 08-12-2006 |
| 2. Projecttitel: | Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechneken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie) |
| 3. Projectnummer PT: | 12402 |
| 4. Intern projectnr: | 3360100300 |
| 5. Projectleider: | Jaap M. van Tuyl
Adres: Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel: 0317 477329 0653362858
Fax: 0317 418094
Email: Jaap.vantuyl@wur.nl |
| 6. Gewas: (indien van toepassing): | Lelie |
| 7. Oorspronkelijke Looptijd project: | 1-1-2006 - 31-12-2008 |
| 9. Periode waarover wordt gerapporteerd: | 01-07-2006 - 15-12-2006 |
| 10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd: | |

Website: <http://www.liliumbreeding.nl/project>

Personele inzet 2006

An An
Martin Beers
T. Bleijenberg
Laurent Gouere
M. Nadeem Khan
M.S. Ramanna
A.A. van Silfhout
J.M. van Tuyl
S. Zhou

G. Henken
A.W. van Heusden
C.G. van der Linden
M.P.W. van Kaauwen
H.J. Schouten
B.C.E. van der Ven
T.C.A.E. Wouters

H.K. Rhee

M. Ceulemans
A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)

C.C. Anker

S. Bottema

M. Ceulemans

E. Hoogendijk

P.J. Kos

K. Laan

N. Meilland

H. Middelburg

C. Randag

A. van der Velde

A. Vletter

W. de Wit

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

Laurent Gouere, a French student, did an intership-research within the scope of this project. He carried out some *Botrytis* tests and made crosses in the AOA-population. An An, a student from Han-University (Nijmegen), started in October his thesis work. Lu Zhang, a Chinese visiting scientist arrived in November to do research in our group for one year.

11.2 Disease testing

LA-population

At NHRI in South Korea the first *Fusarium*- and *Botrytis* tests were carried out. 86 genotypes of the LA-population were planted in *Fusarium*-infected soil. After 3 months the symptoms were observed. Because of import problems, the bulbs arrived too late and the experiment could not be done as was needed (Fig.1). In quite a number of genotypes the control was infected as well. Next year the experiment will be repeated. For the same reason also only 45 genotypes were tested for *Botrytis*-resistance. At PRI the LA-population was grown in a field-test for LMoV-resistance. Of 76 genotypes which were tested with Elisa 11% was infected by LMoV and 76% by LSV. Next year the population will be tested again.

AA-population

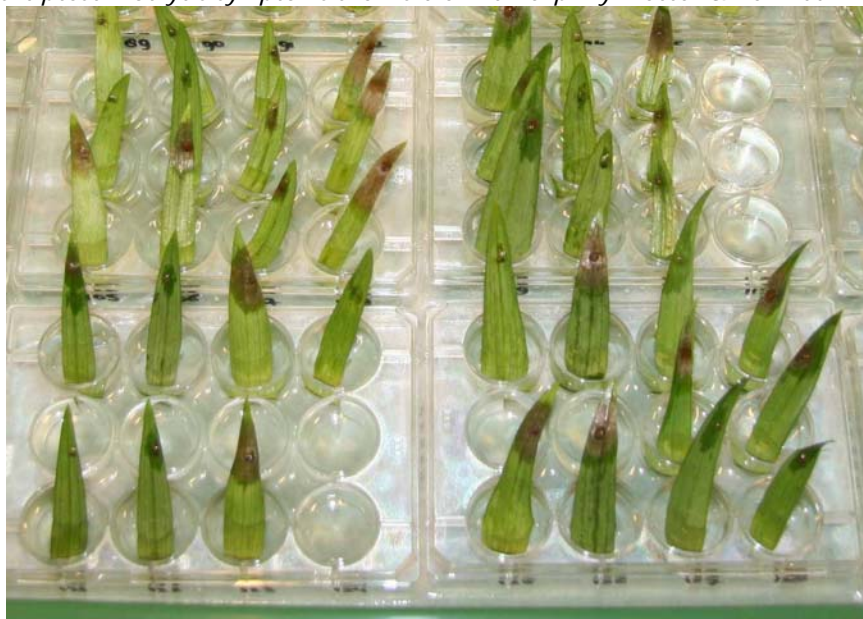
The AA-population was tested with the *Botrytis*-tip test by Vletter & Den Haan. Two tests were carried (17/5 and 2/6) with 4 replications (of 3 leaves as far as

enough material was available. The symptoms were observed 2 times. In the second experiment a high number of leaves did not give any symptoms. The condition of the *Botrytis elliptica* is essential in these tests but this is very difficult to control. Next year the experiments will be repeated.

Fig. 1 Fusarium symptoms with index 1-6.



Fig.2 A leafiptest: Botrytis symptoms are visible in an exp. By Vletter & Den Haan



AOA-population

De Jong Lilies carried out a Fusarium-test with the AOA-population. Four replications of 4 scale bulblets were planted in Fusarium-diseased soil.

The score ranged from 2 (Connecticut King the resistant control) to 5 (the most infested genotypes). The tests will be repeated next year.

This population was tested using the Botrytis-tip test by Vletter & Den Haan. Two tests were carried out (17/5 and 2/6) with 4 replications (of 3 leaves). The symptoms were observed 2 times. The variation between the replications and between the 2 tests was considerable. Next year when more material will be available the experiments will be repeated on a larger scale.

11.3 Marker analysis

DNA isolation

DNA of the AxA population (Connecticut King x Orlito) was collected earlier. Using the same protocol, plant material of the L x A (Longiflorum x Connecticut King) was collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For DNA isolation, leave material was first grinded in a mortar and then DNA was isolated using the Qiagen DNAeasy extraction kit according to the manufacturer's protocol.

NBS profiling

NBS profiling is a molecular marker technique that produces multiple markers in resistance genes and resistance gene analogs.

We tested the optimal primer-enzyme combinations using the AA parents and a limited number of progeny. Primers NBS3 and NBS6 turned out to produce suitable marker patterns. Additional markers may be added by using NBS1 or NBS2, and possibly NBS5. However, it should be noted that NBS2 patterns will partly overlap with NBS3 patterns, and NBS5 patterns with NBS6 marker patterns. .

AA population

A population of 90 individuals of the AA population was analyzed with NBS profiling using NBS3 and NBS6 primers in combination with several restriction enzymes (Mse I, Alu I, Taq I, Hae III, and Rsa I). In addition, we also used the methylation-sensitive restriction enzyme Msp I in combination with NBS3. The profiles contained a large number of bands, with between 15-60 scorable polymorphic markers (NBS6 consistently produced more scorable markers than NBS3, with the best performing combination was NBS6/Mse I (close to 60 markers in a single profile, see Figure 1). We have scored in total 278 markers for the AA population.

LA population

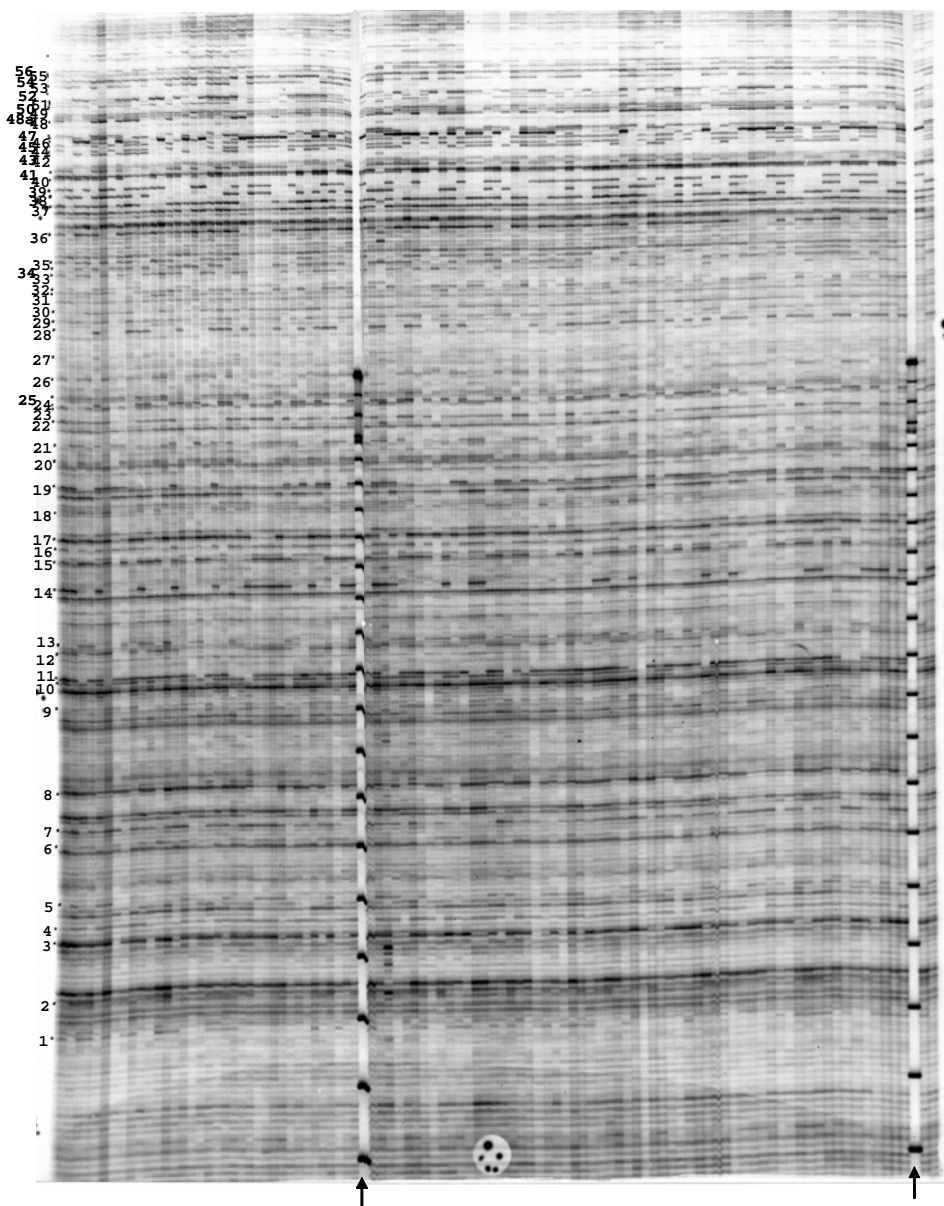
For NBS profiling with the LA population we used the same set of primer-enzyme combinations used for the AA population. The profiles were comparable to the profiles of the AA population, and await scoring. We expect to have close to 200 markers mapped in this population within the next few months.

The planning for NBS profiling:

- Score LA population profiles

- Create genetic linkage maps for the LA population (chromosome maps), and find markers for resistance to TBV or Fusarium.
- Convert the NBS profiling markers that are closely linked to resistance to TBV and Fusarium QTLs into easy-to-use markers for practical breeding.

Fig. 1. NBS profile (NBS6/Mse) of AA population: markers that are scored for mapping are indicated with dots/numbers on the left side. The lanes indicated by the arrows at the bottom are size markers (the longest band of the marker being 330bp).



DArT

Results

DArT (Diversity Array Technology) is a modern marker technology, based on micro-arrays. This technology allows screening hundreds of markers simultaneously.

As indicated in our previous report, we used DNA of the parents Connecticut King and Orlito as a starting point. We have cut this DNA with the enzyme Pst I, The Pst fragments were digested with a frequent cutting enzyme. We choose Pst I as enzyme as it cuts preferentially in non-methylated gene-rich areas. This gives especially marker in the vicinity of genes, and less in repetitive non-coding DNA areas. In order to reduce the number of Pst fragments to a manageable amount, and to increase the chance of finding markers, only Pst fragments that did not contain a recognition site of the frequent cutting enzyme were amplified. As frequent cutters we tested four enzymes (Mse I, Taq I, Mva I, or Msp I). Fragments were amplified with a length of approximately 100-800 base pairs. The results indicated that the combinations Pst I - Mse I and Pst I - Taq I are the most promising. Therefore we proceeded with these two combinations.

The Pst I - Mse I and Pst I - Taq I digested DNA fragments of Connecticut King and Orlito were individualized by insertion into a bacterial vector, and plated onto agar plates. For Connecticut King $2 \times 384 = 768$ clones were picked after cutting with Pst I and Mse I. The same number of clones was picked after cutting the Connecticut King DNA with Pst I and Taq I. We did the same for Orlito. This yielded totally $4 \times 768 = 3072$ fragments.

The inserts in the clones were amplified by PCR and printed individually on glass slides, resulting in genotyping micro-arrays.

The micro-arrays were used to fingerprint the progeny of the CK x Orlito mapping population. For this, genomic DNA from the progeny was isolated, and digested with PstI - MseI or PstI - TaqI. Pst fragments lacking a frequent cutter site (MseI, or TaqI) were amplified and labeled with a fluorescent label. The labeled PCR products were hybridised to the micro-arrays. Presence of a fragment in the progeny that is also present in one or both of the parents is indicated by a positive hybridization signal on the slide.

The majority of the spots showed a hybridization signal for all plants of the progeny, but other spots showed hybridization for some plants, but not for others. The latter ones are the molecular markers.

This approach yielded in total 338 markers. This means that 11% of the spots were polymorphic markers. For the enzyme combination PstI - MseI, 7% of the spots was polymorphic, and in case of Pst I - Taq I 14% was polymorphic. The combination Pst I - Taq I therefore produced twice the number of markers compared to the combination Pst I & Mse I.

The reproducibility of the DArT method was evaluated by repeating hybridizations on different slides, using DNA from one individual, starting each time from cutting this DNA with the enzymes. The reproducibility at the used quality thresholds was 98.9 %. This was based

on observations on six micro-arrays. This implies an error rate of 0.55 % on the average, which is low.

The planning for DArT:

- Extend the library of Pst I - Taq I DNA fragments, using DNA from all parents of the populations that have to be genotyped in this project.
- Print these DNA fragments on new slides, giving new micro-arrays. Include also the Pst I – Taq I fragments that were made in 2006 (see above).
- Screen all populations on these micro-arrays. Identify the markers.
- Create genetic linkage maps (chromosome maps), and find markers for resistance to LMoV or Fusarium.
- Convert the DArT markers that are closely linked to resistance to TBV and Fusarium into easy-to-use markers for practical breeding.

Mapping

We have collected AFLP marker data of the AA population in a previous project (584 markers in total), of which one was linked to TBV resistance. We have used this mapping data to compare the results of the DArT and NBS profiling marker data. From the original 100 plants in the population we have isolated DNA from 91 plants for NBS profiling and DArT. NBS profiling marker data were collected for 90 plants of the progeny, and for DArT 72 plants were genotyped. Including AFLP, we now have a total of 1179 markers available for mapping (see table 1).

Table 1. Overview of markers for mapping

	NBS profiling	DArT	AFLP	total
CK markers	53	62	186	301
Orlito markers	111	86	195	392
Shared markers	102	182	203	487
Total	266	330	584	1180
skewed	38	28	92	158
Used for mapping	228	302	492	1022

A first rough mapping exercise was done using all the markers together using Joinmap mapping software. 33 linkage groups were produced by Joinmap (Fig.3). This is far more than the number of chromosomes in lily (12). However, it must be noted that the lack of suitable bridge markers will not allow the integration of Orlito and CK chromosomes. In addition, the lily chromosomes are expected to be very large, and it is very well possible that marker density is not high enough to enable the formation of linkage groups that cover the full chromosomes.

The larger linkage groups are filled with 138 NBS profiling markers, 280 AFLP markers and 181 DARt markers.

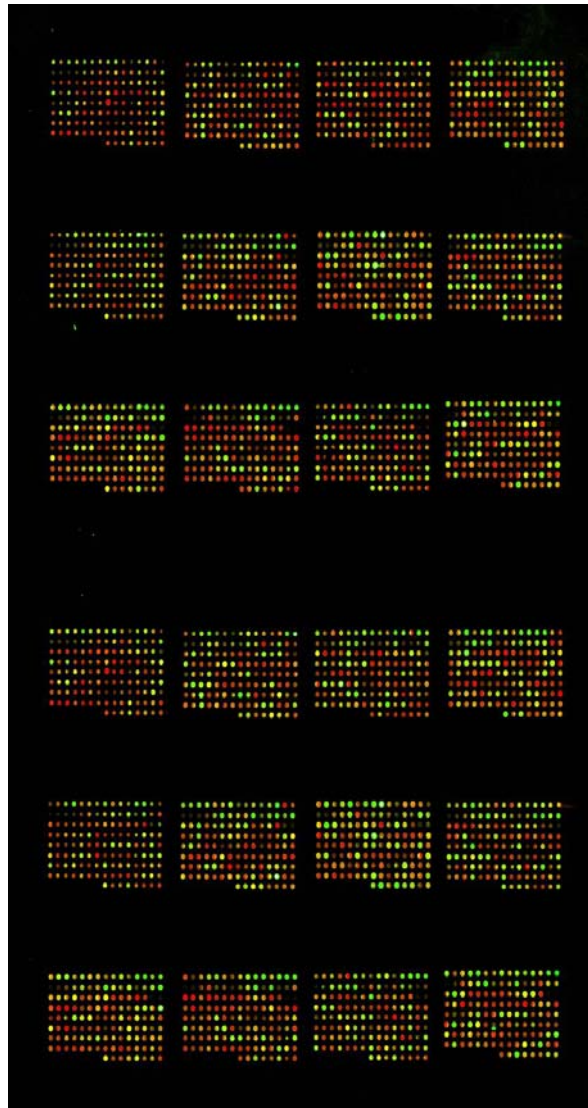


Figure 2.
An example of a DArT array image of lily, after hybridisation with Cy3 labeled DNA of one plant and Cy5 labeled DNA of reference DNA for correction of the amount of printed DNA on the slide.

A remarkable observation is that especially for the NBS profiling markers, only limited clustering is observed. Several pairs of (nearly) identical markers are identified, but the percentage of paired markers is similar to AFLP and DARt, where a larger percentage of clustering was anticipated because of the known clustering of R-genes in other species.

Detailed analysis of the NBS markers and their mapping position is needed to confirm the mapping positions and the limited clustering.

The molecular marker analysis using DArT and NBS Profiling has resulted in a marker that is potentially closer to TBV resistance than any other available marker. In addition, several new markers in existing QTLs have been identified, and one new QTL was found.

Table 2 summarizes features for NBS Profiling and DArT.

We conclude that both marker technologies performed well in 2006 in lily. Therefore, we propose to continue with both technologies.

Table 2: Side-by-side comparison of NBS Profiling and DArT

Feature	NBS Profiling	DaRT
Prior DNA sequence information required?	No	No
Number of markers (mapped) in 2006 (AA population), based on same financial input for both technologies	266	330
Marker characteristics	Targeted to resistance gene like sequences	Random, genome wide, some emphasis on non-methylated coding areas.
Reproducibility	?	98,9%
Costs	No starting costs, costs per marker constant.	Higher input costs. Costs per marker decreases significantly at increasing numbers of plants (> 100) and increasing numbers of markers per slide (> 100).
Conversion to easy-to-use marker	Depends on marker characteristics	Fast start compared to AFLP/NBS profiling, because the DNA sequence of the fragment can easily be obtained
Mapping characteristics:		
Clustering	No clustering over the linkage groups in lily observed	Weak clustering in lily observed
New markers for TBV resistance	One new marker identified	No new marker identified
New markers for Fusarium resistance	One new NBS marker identified in one known Fusarium QTL.	Totally 8 new DArT markers identified in three known QTLs and one new QTL for Fusarium resistance.

11.4 GISH-analysis of the AOA-population

To study the recombination frequency in the next generation, crosses were made between all the AOA's of the marker population with an Asiatic and an OA-father. For a part of the crosses embryo culture was performed and for the rest normal seed harvest took place. More than 400 seeds were harvested. Up till now 26 plants are grown in vitro after embryo culture. Most interesting are the 9 plants derived from 022605-9. This genotype was analyzed before and possessed 7 recombinant chromosomes originated from different restitution mechanisms both FDR and IMR.

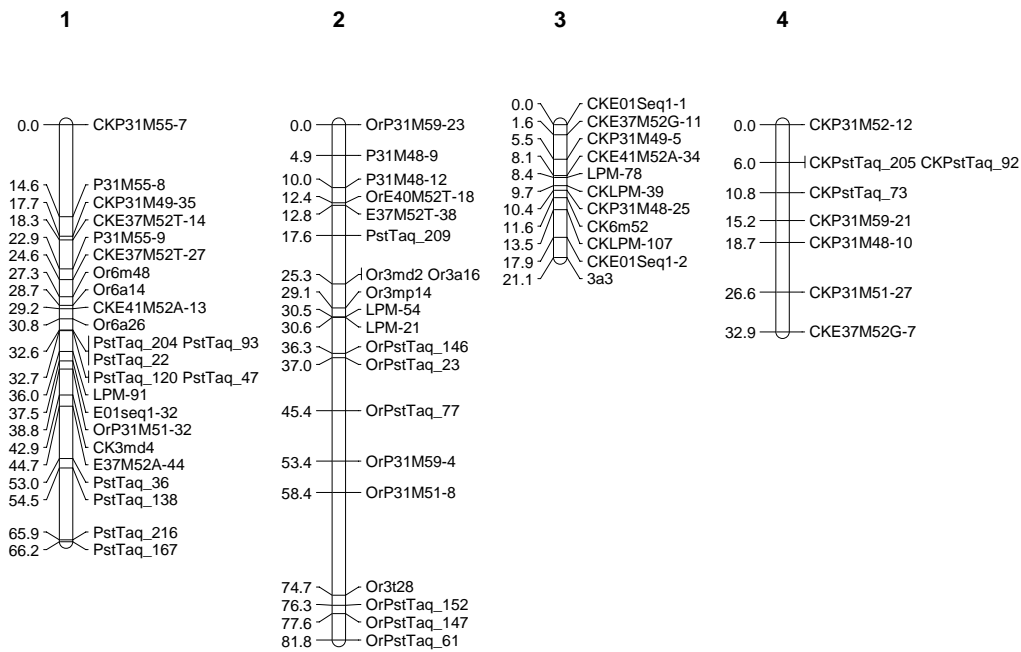
The planning for GISH is:

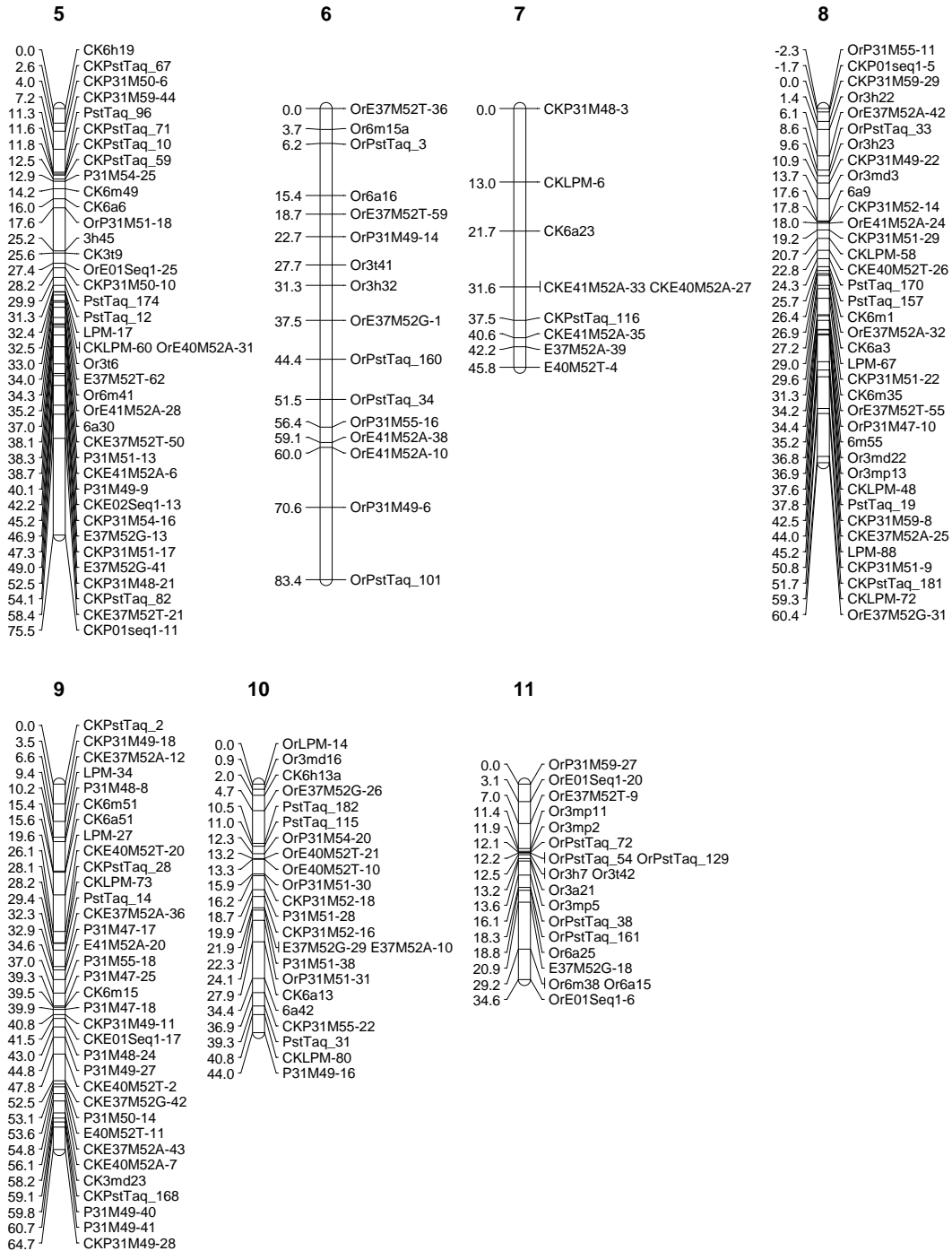
- Continue of GISH and FISH--analysis of the AOA-population
- GISH-analysis of BC2-progenies (AOA x A)

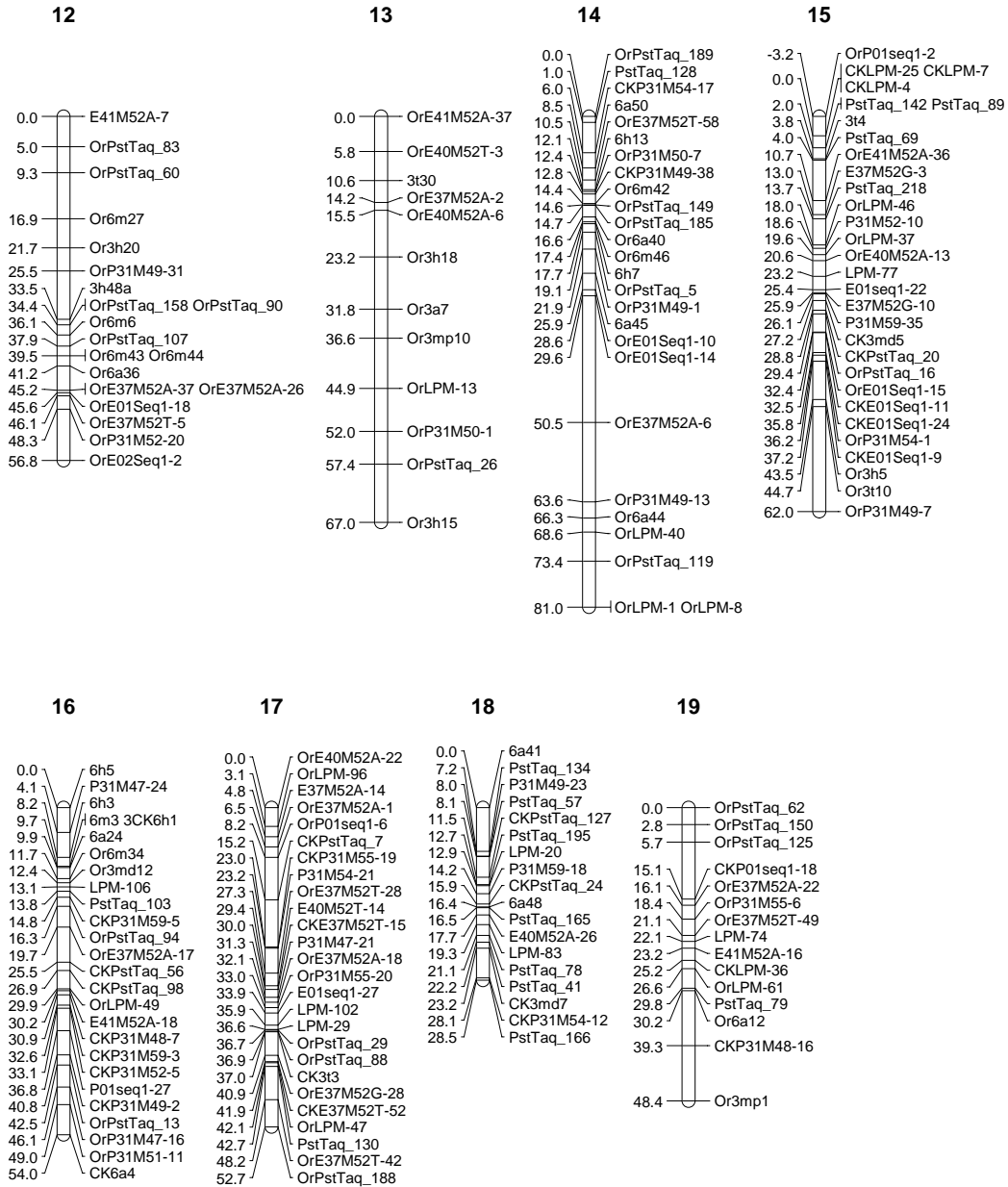
Conclusions

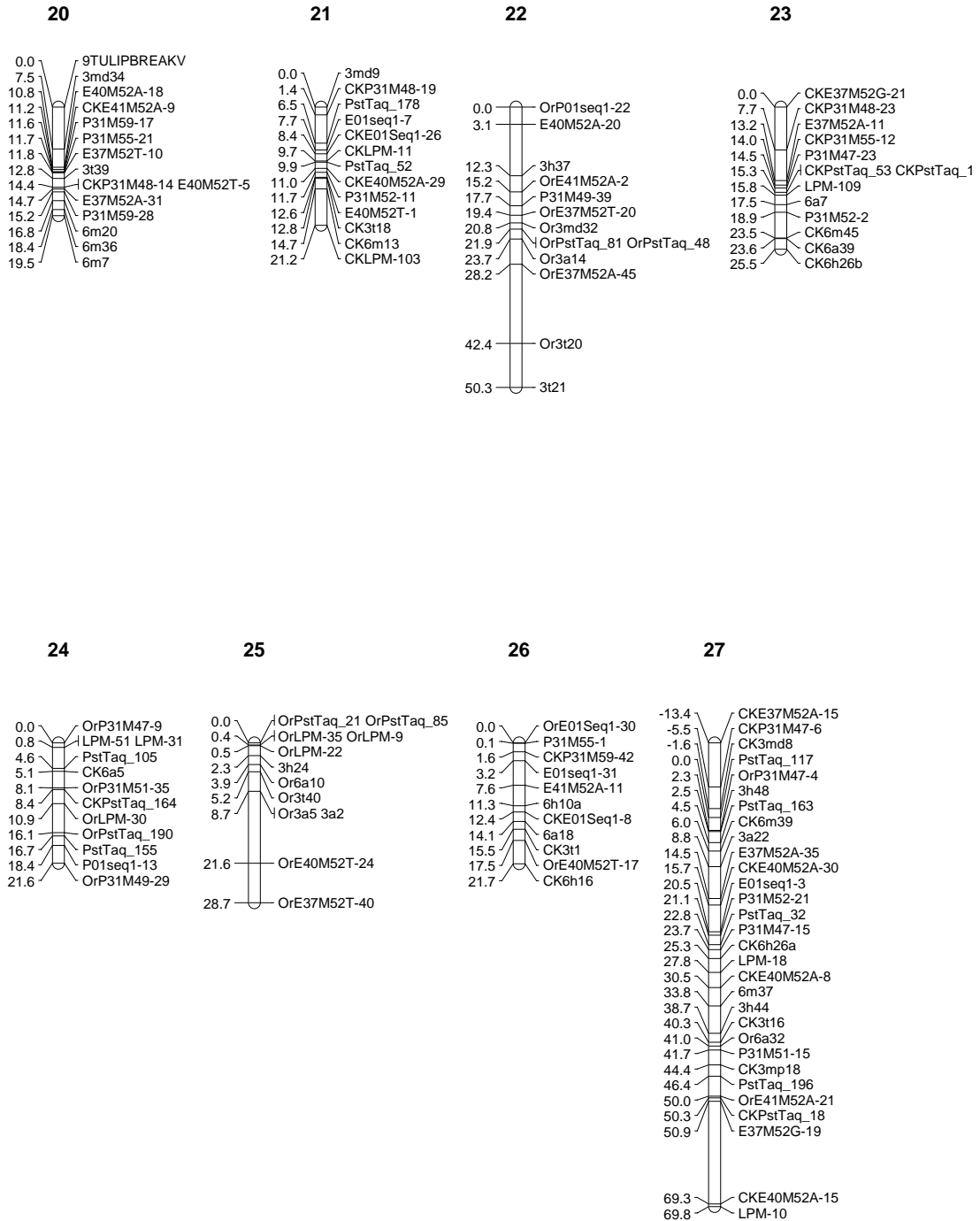
- Go / no go: at least 200 new markers should be generated.
- In total 338 (DArT) + 278 (NBS) = 616 new markers are generated.
- No apparent clustering
- One new NBS marker at known locus for virus resistance
- One new NBS marker at known QTL for Fusarium resistance
- Eight new DArT markers in known QTL's for Fusarium resistance
- One new DArT marker in new QTL for Fusarium resistance
- Proposal: continue with DArT and NBS profiling.

Figure 3. Preliminary joint map of lily with all markers derived from AFLP, NBS and DArT. The markers segregate from Connecticut King (CK) or Orlito (OR) or both parents. The NBS markers are coded with md or m, the DArT marker with PstTaq or LPM. The Virus resistance gene is mapped on linkage group 20, the QTL's for Fusarium-resistance on linkage groups 4, 5, 22, 24, and 26.

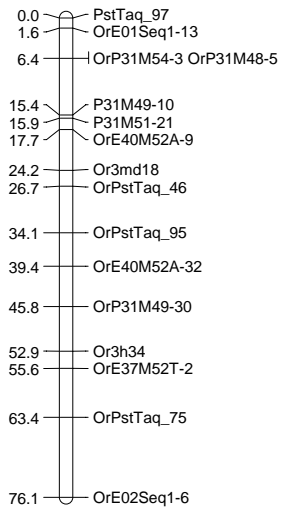




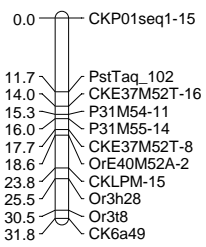




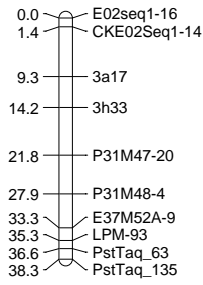
28



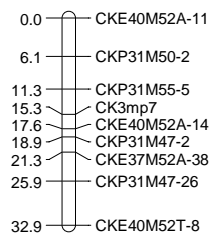
29



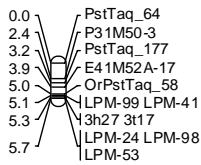
30



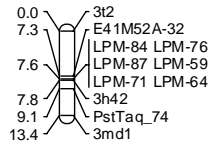
31



32



33



12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

R. Barba-Gonzalez, Chad T Miller M.S. Ramanna, & J.M. Van Tuyl 2006
Nitrous oxide N₂O induces 2n gametes in sterile F1 hybrids of Oriental x Asiatic lilies (*Lilium*) and leads to intergenomic recombination. *Euphytica* 148: 303-309.

R. Barba-Gonzalez, Alex A. Van Silfhout, M.S. Ramanna, R.G.F. Visser & J.M. Van Tuyl 2006. Progenies of allotriploid Oriental x Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. *Euphytica* 151: 243-250.

Rodrigo Barba-Gonzalez, Chad T. Miller, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2006. Induction of 2n gametes for overcoming F1-sterility in lily and tulip. *Acta Horti* 714: 99-106 (XXII Eucarpia Meeting -Section Ornamentals SanRemo, 11-15 September 2006).

Shujun Zhou, 2006/2007. Intergenomic recombination and introgression breeding in Longiflorum x Asiatic lilies (*Lilium*), draft PhD-thesis, 100 pp.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.
no/nogo criteria zullen na 1 jaar beoordeeld worden, de huidige resultaten liggen ter beoordeling

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

Zie 11.2

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).

Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

- | | |
|--|--|
| 1. Datum: | 21-06-2007 |
| 2. Projecttitel: | Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechnieken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie) |
| 3. Projectnummer PT: | 12402 |
| 4. Intern projectnr: | 3360100300 |
| 5. Projectleider: | Jaap M. van Tuyl |
| Adres: | Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen |
| Tel: | 0317 477329 0653362858 |
| Fax: | 0317 418094 |
| Email: | Jaap.vantuyl@wur.nl |
| Website: | http://www.liliumbreeding.nl/project |
| 6. Gewas: (indien van toepassing): | Lelie |
| 7. Oorspronkelijke Looptijd project: | 1-1-2006 - 31-12-2008 |
| 9. Periode waarover wordt gerapporteerd: | 15-12-2006 - 15-06-2007 |

10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:

Personele inzet 2007

PRI

An An

T. Bleijenberg

Gabriela Dunner

G. Henken

A.W. van Heusden

C.G. van der Linden

M.P.W. van Kaauwen

M. Nadeem Khan

Jeronimo Herrera

M.S. Ramanna

A.A. van Silfhout

H.J. Schouten

B.C.E. van der Ven

Marie Verzaux

J.M. van Tuyl

J.H. Vossen

T.C.A.E. Wouters

L. Zhang

S. Zhou

RDA

H.K. Rhee

Bedrijven

M. Ceulemans

A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
C.C. Anker
S. Bottema
M. Ceulemans
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
N. Meilland
H. Middelburg
C. Randag
R.C. Snijder
A. van der Velde
A. Vletter

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

An An, Gabriela Dunner, Marie Verzaux and Jeronimo Herrera are students from China, Chili, France and Colombia and did research within the scope of this project. Lu Zhang, a Chinese visiting scientist arrived in November to do research in our group for one year. Shujun Zhou finished his PhD-thesis. He defended his thesis on March 27 and returned to China.

11.2 Disease testing

LA-population

At NHRI in South Korea a repeat of the *Fusarium* and *Botrytis* tests are carried out. At PRI the LA-population was grown in a field-test for LMoV-resistance. Of 71 genotypes which were tested with Elisa 25% was infected by LMoV and 69% by LSV. Next year the population will be tested again.

AA-population

The AA-population was tested with the Botrytis-tip test by Vletter & Den Haan. Two tests were carried. De Jong Lelies is performing a *Fusarium* test.

AOA-population

The AOA-population has been screened for *Fusarium* and *Botrytis* susceptibility in 2006 and 2007. The results of 2006 are evaluated.

Fusarium

After corrections for the overall differences between repetitions we can divide the scores of Fusarium susceptibility in different classes (Table 1).

Table 1

Average Disease score	Number of OAO plants in class
0 - 0.5	
0.5 – 1	
1 – 1.5	1
1.5 – 2	2
2 – 2.5	4
2.5 – 3	5
3 – 3.5	22
3.5 – 4	26
4 - 4.5	27
4.5 -5	9
> 5	4

The difference between genotypes is significantly higher as within genotypes. The heritability is 0.78 and the least significant difference is 0.97. These results show that there is a significant segregation of the level of Fusarium resistance in the AOA population. According to the history of the AOA population it is expected that this segregation is due to resistance genes originating from Amarone.

Botrytis

The level of Botrytis resistance has been scored by two persons in four repetitions and every repetition was the average of inoculations on three leaf tips. After a statistical analysis of the different repetitions per person (so in total four different analysis) the following results were obtained (Table 2).

Table 2

Person	Repetition	Heritability (h^2)	I.s.d. (least significant difference)
1	1	0.70	1.15
1	2	0.62	0.95
2	1	0.55	0.91
2	2	0.63	1.05

Also for susceptibility to Botrytis there is a significant segregation in the AOA population. Also here it is expected that this segregation is due to segregation of the resistance in Amarone. As soon as the data of 2007 are also available we will do the final analysis.

11.3 Marker analysis

DNA isolation

DNA of the AxA population (Connecticut King x Orlito) was collected earlier. Using the same protocol, plant material of the L x A (Longiflorum x Connecticut King) was collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For DNA isolation, leave material was first grinded in a mortar and then DNA was isolated using the Qiagen DNAeasy extraction kit according to the manufacturer's protocol.

NBS profiling

AA population:

One NBS profile band, originating from the CK parent, was tightly linked to virus resistance. In order to produce a PCR marker, the band will be isolated and sequenced. The band has an estimated length of over 600 bp. Conditions are currently being optimized to improve the separation and extraction efficiency of such a big marker band.

LA population:

Ten primer enzyme combinations (PE's) were analyzed in the LA population. Most gels showed too many polymorphic bands and no comprehensive marker patterns could be found. Only three gels showed an acceptable pattern and a total of 38 markers could be scored. The high amount of bands could be caused by the huge genome size of lily and would therefore be inherent to this experiment.

This can, however, not be the only reason since acceptable gels were produced for the AA population. An alternative explanation could be a suboptimal DNA quality. The DNA isolation was therefore repeated and new gels will be done with the same PE's to test if the new batch of DNA is of higher quality. We intend to produce a similar number of markers as generated for the AA population.

DArT

DArT (Diversity Array Technology) is a modern marker technology, based on micro-arrays. This technology allows screening hundreds of markers simultaneously.

DART uses a combination of restriction enzymes that cut the DNA. In 2006 different enzyme combinations were evaluated. It appeared that for lily out of the combinations tested, the combination of the two enzymes PstI and TaqI gave the best results. Therefore we used these two enzymes. New DNA was isolated from the parent Connecticut King, and cut with PstI. To the ends of the fragments, small double stranded DNA fragments, so called adapters, were attached. These adapters were used later as annealing sites for the primers for amplification. As second step, the fragments were cut with the frequent cutting enzyme TaqI. A fraction of the fragments did not contain any TaqI site, and therefore were not cut. These fragments had still PstI adapters at both ends. These fragments were amplified by means of PCR, using primers that annealed to the PstI adapters. The mentioned TaqI cut was needed to reduce the enormous amount of DNA fragments with PstI adapters at **both** sides to a manageable number. Further, the TaqI digestion increased the chance of finding polymorphism in the DNA, leading to markers.

The following steps will be:

1. Individualizing amplified fragments by means of transformation into *E. coli*
2. Printing these fragments on glass slides
3. Adding also the marker fragments of 2006 onto the slides
4. Hybridizing amplified DNA of approximately 100 individuals of the LA population onto the slides. The same for approximately 100 individuals of the AA population.
5. Scanning the glass slides
6. Analyzing the images for marker analysis
7. Making genetic linkage maps, including the NBS-profiling markers
8. Looking for linkage with disease resistance

Mapping

Genetic linkage map

Although over 1000 markers have been generated and a preliminary map is presented in the last progress report. It is still obvious that about 40% of the markers do not end up in linkage groups and that the number of linkage groups exceeds the number of chromosomes in lily (n=12).

Since the available methods for the construction of linkage maps still evolve we decided to ask the very experienced Hans Jansen (PRI dept. Biometris) to have a fresh look at the data. This process is ongoing. The first results with the new methods do not deviate too much in the grouping of markers but the new algorithms and new approach end up with higher genetic distances resulting in large linkage groups. It is also striking that there is not a high level of clustering of markers. This can be a technical problem such as missing values but since the reproducibility is very high we do not expect that. The biological reason for this phenomenon is not clear.

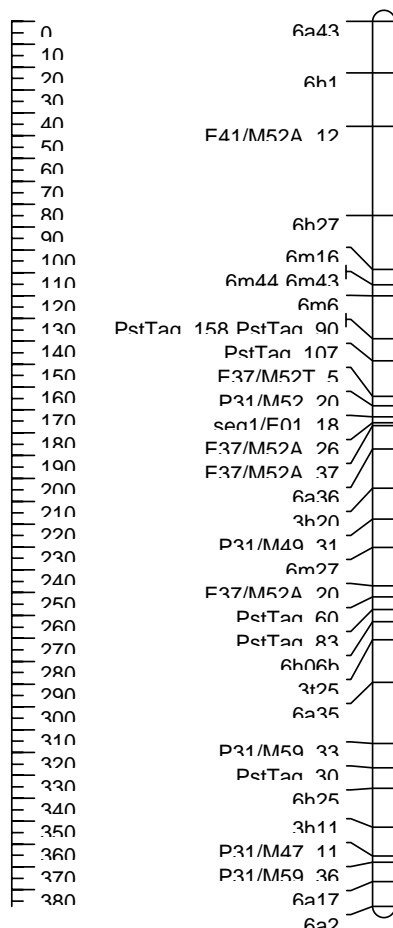


Figure 1.

Figure 1 shows an example of one of the linkage groups of the Orlito parent (DaRT PstTaq or LPM, AFLP E41/M52A etc, NBS 6a43 etc).

After finishing the new genetic map Hans Jansen will also use this map to do the linkage analysis (QTL-mapping for Fusarium and Botrytis resistance). The results of the disease screenings of 2007 will be included.

Conclusions:

Linkage groups can be constructed but even with > 1000 markers the number of linkage groups is not

limited to 12. This is probably due to the huge genome of lily and the (deviating) recombination events in this specific Asiatic hybrid cross ((Connecticut King x. (Connecticut King x Pirate)).

In literature a few mapping studies have been done in lily (Abe et al. TAG 2002 105: 1175-1182), in this study a cross between two Asiatic hybrid lily cultivars (Montreux and Connecticut King) was used. Although Abe et al. had only a limited number of markers they also ended up with many linkage groups (119 markers in 24 linkage groups for the Connecticut King parent). Maybe GISH-studies can give a clue about the explanation of the difficulties to make linkage groups (see chromosome mapping page 15). We can still analyze the data further and do the QTL-mapping but we think it is not needed to determine more markers in this population because we do not believe that doubling the number of markers will give more information.

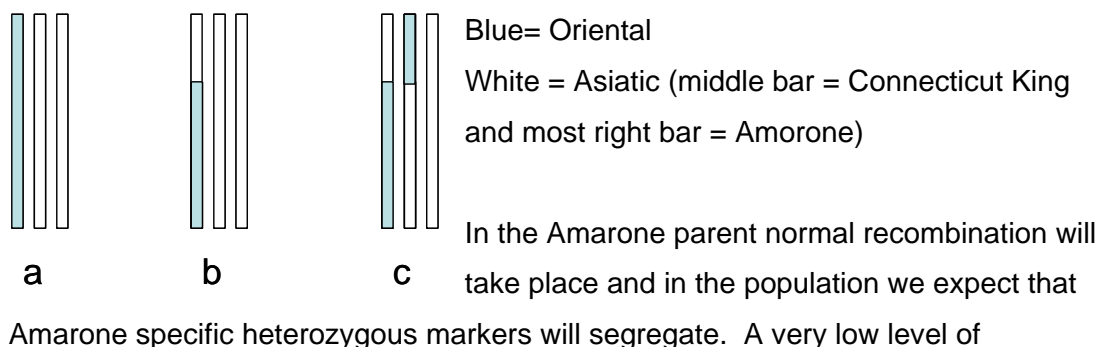
AOA population

GISH-analysis

To study the recombination events GISH studies were performed in the AOA population. This will give an estimation of the frequency of recombination in this population. The results will also show the feasibility to do marker analysis in this AOA population.

Can we look for associations between markers and traits (QTL mapping) in an AOA lily population?

Figure 2



recombination will take place in the Connecticut King x Oriental hybrid. GISH analysis of the triploid progeny plants can in principle give the following results (see figure 2)

- a: no recombination between Connecticut King and Oriental
- b: non reciprocal recombination, nulliplex with a Asiatic specific chromosome segment or a Oriental chromosome fragments present in 2 of the 3 chromosomes.
- c: reciprocal recombination

Only the non-reciprocal recombinants (NRP) can be distinguished with markers. So far we see that about 80% of the AOA population has recombinant chromosomes with on average two non-reciprocal products per plant. This means that in total 160 NRP can be expected. This is a low level compared to tomato where in an F2 100 plants where you expect about 2400 recombination events.

Theoretically if a resistance gene is present on a chromosome arm of CK and it is present in the OA hybrid only a very limited number of individuals of the AOA progeny will not have that resistance gene ($160: 12(\text{chromosome number}) : 2(\text{chromosome arms}) : x(\text{depends on position on chromosome})$ 0-7 plants will not have the resistance gene. This depends also whether the recombination events are distributed evenly over the chromosomes. Overall this means that the detection of significant associations between markers and traits will be very unlikely.

Of course the segregating heterozygous markers (traits) of Amarone can be mapped in a AOA population. However, any resistance gene that is homozygous present in Amarone will be present in the whole AOA population.

Conclusion:

We will not start with extensive marker determinations in this population. Because of the population structure we will analyze this population with a number of AFLP primer combinations. In this way we hope to determine in how many genotypes Oriental or Connecticut King specific markers (which are also present in the OA hybrid) are segregating. This will also give some insight how random the recombination events take place.

LA-population

Since we have three populations (AA, AOA and LA) and we want to stop with extra marker generation for AA and we think the AOA is not the right population for marker analyses (at least as long we do not focus on resistance factors from Amaranone) we intend to focus on the LA population. Connecticut King is one of the parents of this cross and the donor of resistance factors to Botrytis and Fusarium. Therefore we plan to use only Connecticut King markers as DArT markers. NBS markers for both parents of the cross will be generated. In this way we will more concentrate on finding markers in Connecticut King linked to the resistance factors.

11.4 GISH Analysis of LAA, LALA, ALALA and AOA populations

Shujun Zhou finished his PhD-thesis. He defended his thesis on March 27. From the LA's which produced haploid gametes more crosses were made in order to select more diploid LAA's. This material has been analyzed using GISH.

Ploidy levels of BC₁ and BC₂ progeny

All BC₁ (LA x AA), BC₂ (ALA x LA) and LA x LA plants have been analyzed with GISH for their ploidy level, the number of chromosomes from L and A genomes and the number of recombinant chromosomes. Out of 23 BC₁ plants (LAA) that were analyzed, 17 triploid and 6 diploid were found (Table 1). By GISH it was possible to identify the chromosomes of the parental genomes and also the recombinant segments (Fig. 1). Within the 17 triploids BC₁ most genotypes contain 12 L and 24 A chromosomes, except two remarkable genotypes in which there is one Longiflorum chromosome has been replaced by an extra Asiatic chromosome (066960-6, -20). While in 6 diploid BC₁ plants analyzed, one genotype (066960-17) contains three extra L chromosomes with a total of 9 recombinant chromosomes. Also one diploid genotypes was found which seemed to have a lower number of L chromosomes (066994-8), but unfortunately the exact number of L and A chromosomes could not be determined yet and it could therefore not be said whether there is an aneuploid diploid condition in this genotype.

Seven BC₂ plants where both parents are supposed to contribute $2n$ gametes have also been analysed through GISH. It was found that three genotypes are tetraploid with 24+24 L and A chromosomes. However, one genotype tetraploid genotype (064525-13) has 25 L and 23 A chromosome composition. The other four genotypes (064525-8, -14, -15 and -18) have an aneuploid condition with +5, -1, -3 and +1 respectively (Table 3).

Until now two BC₂ ALA LA genotypes analysed through GISH. It was found that one genotype is pentaploid with 18 L and 42 A chromosomes while the other genotype is aneuploid ($5x-4$) having 20 L and 36 A chromosomes (Table).

GISH has also been used to continue the study with the plants from the AOA molecular marker population. During present study a total of eleven genotypes have been analysed. All the genotypes are triploid (12 O and 24 A) as expected due to contribution of $2n$ gametes from male parents (OA). However, the frequency of recombination differs in various genotypes varying from 2 to 9 (Table 3).

Table 3. The ploidy level, genomic composition and number of recombinant chromosomes of the progeny plants from 2x-2x (2n+n), 3x-2x and 2x-2x (2n-2n) crosses analysed through GISH.

2x-2x (2n-n)							
Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		L (^L / _A)	A (^A / _L)	
LA x AA	062035-1	041560	061092	3x	12 (4)	24 (2)	6
LA x AA	062035-2	041560	061092	3x	12(3)	24(3)	6
LA x AA	062071-1	041560	061091	3x	12(8)	24(4)	12
LA x AA	062071-2	041560	061091	3x	12(9)	24(5)	14
LA x AA	062074-1	041560	061085	3x	12(8)	24(6)	14
LA x AA	062074-2	041560	061085	2x	5(2)	19(3)	5
LA x AA	062074-3	041560	061085	3x	12(4)	24(4)	8
LA x AA	066960-2	045143	031110	3x	12(3)	24(1)	4
LA x AA	066960-5	045143	031110	2x	9(4)	15(2)	6
LA x AA	066960-6	045143	031110	3x	11(5)	25(2)	7
LA x AA	066960-8	045143	031110	3x	12(4)	24	4
LA x AA	066960-12	045143	031110	3x	12(4)	24(2)	6
LA x AA	066960-13	045143	031110	3x	12(5)	24(3)	8
LA x AA	066960-14	045143	031110	3x	12(2)	24(1)	3
LA x AA	066960-17	045143	031110	2x	9(6)	15(3)	9
LA x AA	066960-20	045143	031110	3x	11(5)	25(3)	8
LA x AA	066994-3	041560	051073	3x	12(8)	24(6)	14
LA x AA	066994-11	041560	051073	3x	12(8)	24(5)	13
LA x AA	066828-5	045143	051072	2x	4(3)	20(3)	6
LA x AA	066995-1	041560	031040	3x	12(5)	24(3)	8
LA x AA	066963-2	045143	031039	2x	9(4)	15(1)	5
LA x AA	066963-8	045143	031039	3x	12(3)	24(1)	4
2x-2x (2n-2n)							
LA x LA	064525-7	041556	041502	4x	21(3)	22(2)	5
LA x LA	064525-8	041556	041502	4x+5	28(3)	25(2)	5
LA x LA	064525-13	041556	041502	4x	25(3)	23(1)	4
LA x LA	064525-14	041556	041502	4x-1	24(2)	23(1)	3
LA x LA	064525-15	041556	041502	4x-3	21(2)	24	2
LA x LA	064525-18	041556	041502	4x+1	22	27(1)	1
LA x LA	064536-2	041548	041502	4x	23 (1)	24	1
3x-2x							
ALA x LA	066836-13	621238-1	041510	5x	18(5)	42(4)	9
ALA x LA	066836-45	621238-1	041510	5x-4	20(5)	36(1)	6

AOA (2x-2x)

Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		O (^O / _A)	A (^A / _O)	
AA x OA	022538-16	Amarone	951502-1	3x	12(5)	24(4)	9
AA x OA	022538-17	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
AA x OA	022605-12	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
AA x OA	022605-18	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(2)	4
AA x OA	022605-21	Amarone	951502-1	3x	12(4)	24(2)	6
AA x OA	022605-24	Amarone	951502-1	3x	12(3)	24(2)	5
AA x OA	022605-25	Amarone	951502-1	3x	12(3)	24(2)	5
AA x OA	022605-27	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
AA x OA	022605-34	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(2)	4
AA x OA	022605-39	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(1)	3
AA x OA	022605-46	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(3)	5

All 23 BC₁ plants have been obtained by sexual polyploidization. From the 23 BC₁ plants, all plants (100%) possessed recombinant chromosomes (Table 1) with a varying number from 2 to 14 recombinant chromosomes in different genotypes. A notable feature was found when 041560 was used as female parent and crossed with either 061085, 061091 or 051073 gave the maximum no of recombinant chromosomes (13-14) with three or more cross-over per chromosome. On the other hand 041543 gave the maximum recombinant chromosomes (10) when crossed with 031110 as male counter part. It was also found that this combination also gives diploid progeny with maximum recombination chromosomes as in case of genotype 066960-17. The other genotypes of the same population are under investigation to see the behaviour of different chromosomes in the genotypes.

In case of LA x LA all the plants analysed were obtained through bisexual polyploidization. It was found that out of 7 genotypes all plants (100%) have recombinant chromosomes varying from 1-5 in different genotypes. Similarly two ALA x LA genotypes (066836-13, -45) contain 9 and 6 recombinant chromosomes respectively (table). The further genotypes from both LA x LA and ALA x LA populations are under investigation.

All 11 BC₁ plants from AOA population have been obtained by sexual polyploidization. All these 9 BC₁ plants (100%) possessed recombinant

chromosomes (Table 1) with a varying number from 2 to 9 recombinant chromosomes in different genotypes.

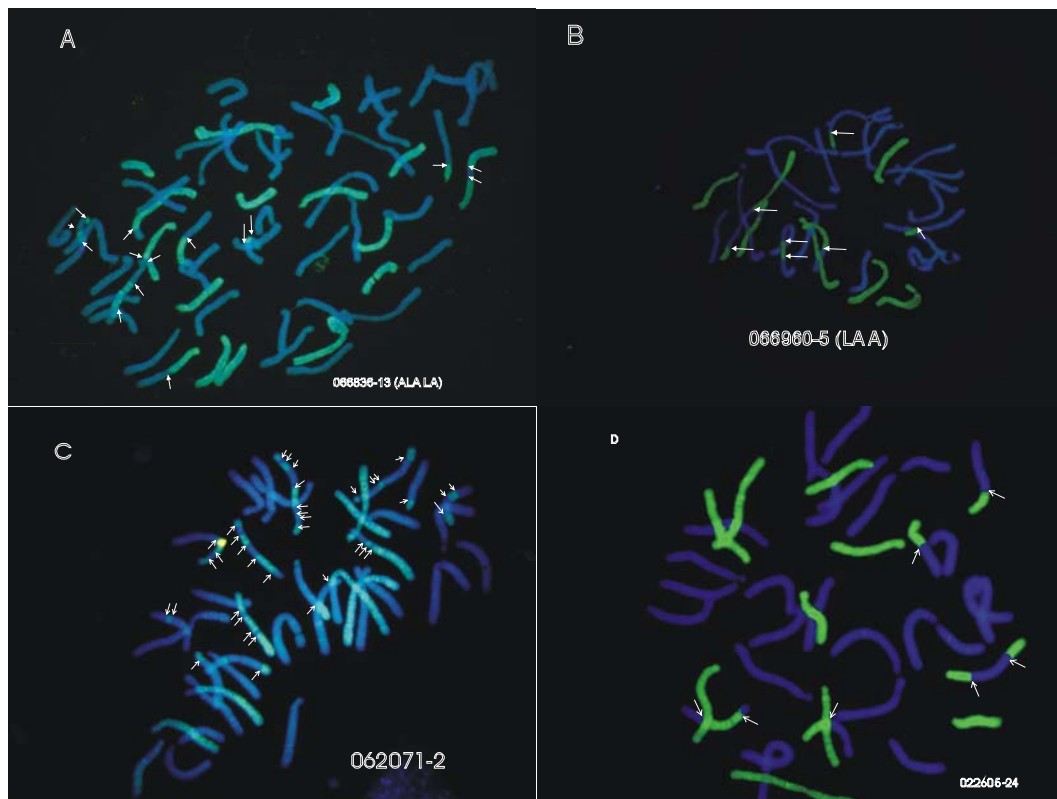


Fig. 3 BC₁ and BC₂ progenies. Longiflorum/Oriental DNA is detected with FITC signal (parrot green) and the Asiatic DNA is counterstained with DAPI (blue). The arrows indicate recombinant segments and the recombinant chromosomes.

- (A) the pentaploid 066836-13 showing 18 L and 42 A chromosomes
- (B) the diploid BC₁ 066960-5 showing 9 L + 15 L with 6 recombinant chromosomes
- (C) the triploid 062071-2 showing 12 L + 24 A with 14 recombinant chromosomes
- (D) the triploid 022605-24 showing 12 O + 12 A with 5 recombinant chromosomes

Chromosome recombination mapping

Efforts are being made to develop a chromosomal recombination map on the basis of GISH analysis. The break point on each chromosome have been taken into consideration and used as markers (Fig. 4). This data provide critical estimates of recombination frequencies and recombination hotspots amongst the three genomes of lily (AA, LL and OO).

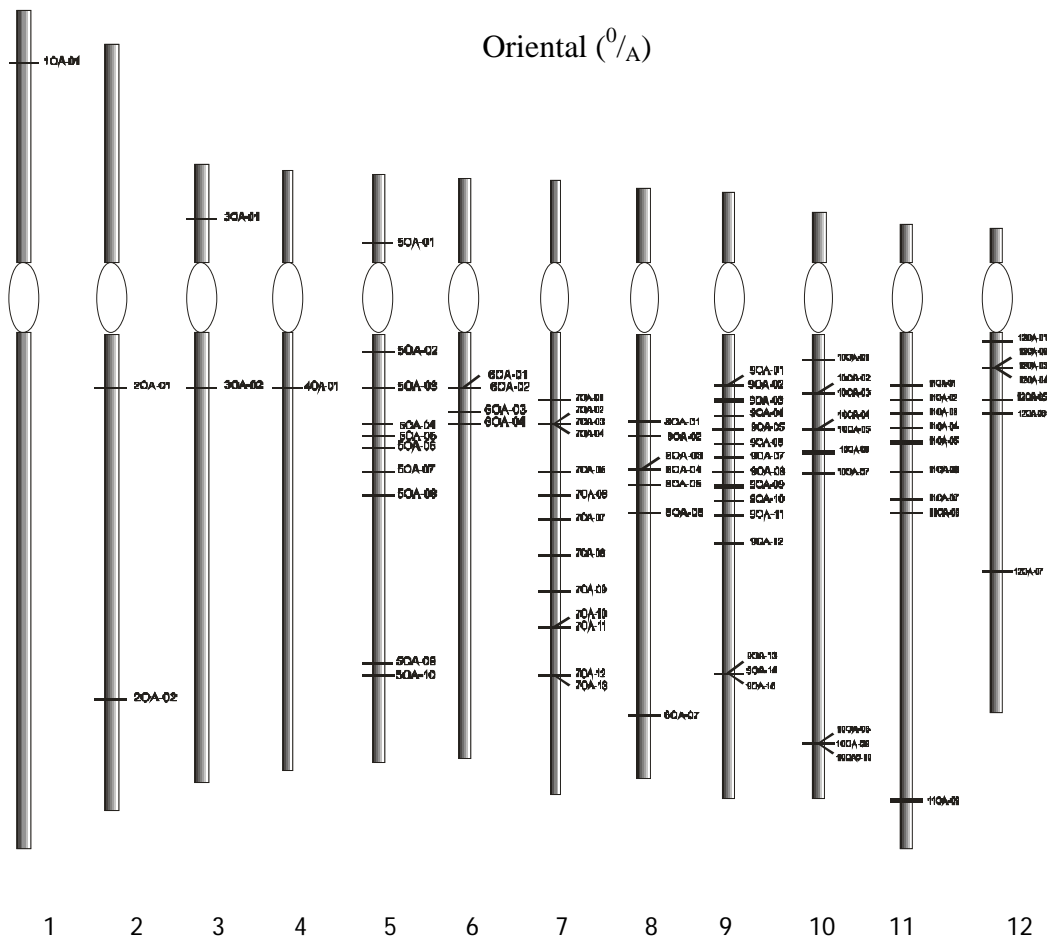


Fig. 4 Chromosome recombination map for the Oriental genome

The planning for GISH is:

- Continue of GISH and FISH--analysis of the AOA-population
- Continue recombination mapping
- FISH analysis of the virus resistance gene when a primer is available from the NBS-profiling of the AA-population.

11.5 Soortkruisingen

Kruisingsprogramma 2007

In het beperkte programma van dit jaar werd gebruik gemaakt van divers materiaal dat door de bedrijven vorig jaar beschikbaar is gesteld. Dit betrof moderne Orientals, goede diploïde Aziaten, OT's en opstaande trompetten. Alles met het doel dit te combineren met de meeste fertiele en resistente OA's. De nadruk ligt vooral op het verkrijgen van meer OOA's. Van de kruisingen gemaakt in 2006 werd reeds een reeks van goed groeiende OOA's en OAOT's embryoplanten uitgeplant in de kas.

Beoordeling nieuw materiaal

Nieuw materiaal uit kruisingen gemaakt in 2002, 2003, 2004 en 2005 kwam voor het eerst in bloei in 2007. Het betreft deels kruisingen waar hoge Fusarium en virus resistentie gecombineerd werden en deels tetraploïde OA-combinaties. Interessant zijn een reeks van AOA x OA nakomelingen die deels door Rodrigo waren geanalyseerd (zie chromosoomaantallen in de plantlijst). Hier bevonden zich ook enkele pentaploïden onder (o.a. 022308—4 en -7) die een goede pollen fertiliteit vertoonden. Naar verwachting zijn dit goede vaders voor terugkruisingen op diploïde aziaten en orientals om weer triploïde nakomelingen op te leveren

In overleg met de bedrijven werden 40 selecties geschubd en dit voorjaar in het veld uitgeplant (zie Tabel 4).

Tabel 4. Diverse OA-selecties, vermeerderd voor uitgifte en vervolgonderzoek.

Monsternr.	Type	Moeder	Vader	selecties	Bedr. sel.
042142-1	AOA OA	012248-4	012304	X	
042017-1	AOA A	002147-56	021055	X	
042667-1	AOA OA	022538-4	951502-1		X
042667-2	AOA OA	022538-4	951502-1		X
042667-3	AOA OA	022538-4	951502-1		X
042790-1	AOA OA	022554-2	951584-1		X
042899-1	AOA OA	022229-47	951502-1	X	
032095-5	A OA	011090	012304-11	X	
032182-1-1	A OA	031028	012304-5	X	
032185-16-1	A OA	031040	012304-6	X	
032247-8	A OA	031028	012304-12	X	
032247-13	A OA	031028	012304-12	X	X
032263-1-1	A OA	031028	012181-12	X	X
032263-4	A OA	031028	012181-12	X	X
032263-5	A OA	031028	012181-12	X	
032264-1	A OA	021039	012181-12	X	X
032264-6	A OA	021039	012181-12	X	X
032265-4	A OA	021040	012181-12	X	
032354-13	A OA	031042	012304-24	X	
032601-1	A OA	031028	962119-1	X	X
032640-1	A OA	011086	951502-1	X	
032659-1	A OA	920147	951502-1	X	
032971-5	AOA OA	002531-12	014076	X	
032973-1	AOA OA	002536-1	012304	X	
036505-1	OA OA	991435	014076	X	
022607-1	A OA	021040	951462 1	X	
022243-5	O OA	021033	991357	X	
022243-7	O OA	021033	991357	X	
022243-8	O OA	021033	991357	X	
022643-9	O OA	021033	991357	X	
022243-10	O OA	021033	991357	X	
022243-11	O OA	021033	991357	X	
022243-12	O OA	021033	991357	X	
002526-5	A OA	001099	952400-1		X
012066-1	OA A	991106	011040	X	
032376-4	O OA	031031	012304-24	X	
012374-1	OA O	991110	111030	X	
022269-5	OA OA	991110	011091	X	
022626-3	OA OA	991112	951502 1	X	X
022255-2	OA OA	991110	991357		X

Vermeerdering, uitgifte materiaal

De 3 AOA/OAA-hybriden die 3 jaar geleden geselecteerd werden en in vitro vermeerderd zijn werden dit jaar opnieuw door diverse bedrijven in bloei gebracht en zijn deels op de keukenhof geshowd. Er was voldoende materiaal om dit goed te doen. De bollen waren bij de Jong Lelies uit plantgoed opgekweekt. Ook werden nog enkele honderden AOA zaailingen uit jaargang 2003 daarvoor beschikbaar gesteld. Deze werden bij Sande, Van Zanten, Imanse en Laan in bloei gebracht en deels geshowd op de keukenhof. De bedrijven zelf kunnen tijdens de halfjaarvergadering hun ervaring toelichten.

Planning soortkruisingsactiviteiten

- Opkweek en beoordeling materiaal
- Uitvoering GISH onderzoek met divers OA-materiaal
- Uitvoering van een beperkt kruisingsprogramma met focus op OOA en OTOA.

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

Barba-Gonzalez, Rodrigo, Ki-Byung Lim, Shujun Zhou, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl 2007. Interspecific hybridization in lily: the use of 2n gametes in interspecific lily hybrids. Chapter in: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues, Global Science Books, in press

Lim, Ki-Byung, Rodrigo Barba-Gonzalez, Shujun Zhou, M. S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl 2007. Interspecific Hybridization In Lily (*Lilium*): Taxonomic And Commercial Aspects Of Using Species Hybrids In Breeding. Chapter in: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues, Global Science Books, in press.

Zhou, Shujun 2007. Intergenomic recombination and introgression breeding in Longiflorum x Asiatic lilies (*Lilium*), PhD-thesis, 27-3-2007, 110 pp.

Zhou, Shujun, Rodrigo Barba-Gonzalez, Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna & Jaap M. Van Tuyl 2007. Interspecific hybridization in lily (*Lilium*): Interploidy crosses involving interspecific F1 hybrids and their progenies. Chapter in: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: advances and topical issues, Global Science Books, in press.

Zhou, Shujun, M.S. Ramanna, Richard G.F. Visser & Jaap M. van Tuyl, 2007. Genome composition of triploid lily cultivars derived from sexual polyploidization of Longiflorum x Asiatic hybrids (*Lilium*). Submitted to Euphytica.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):
Op schema

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:
Zie 11

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.
Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).
Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

1. Datum:	06-12-2007
2. Projecttitel:	Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechneken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie)
3. Projectnummer PT:	12402
4. Intern projectnr:	3360100300
5. Projectleider:	Jaap M. van Tuyl
Adres:	Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel:	0317 477329 0653362858
Fax:	0317 418094
Email:	Jaap.vantuyl@wur.nl
Website:	http://www.liliumbreeding.nl/project
6. Gewas: (indien van toepassing):	Lelie
7. Oorspronkelijke Looptijd project:	1-1-2006 – 31-12-2008
9. Periode waarover wordt gerapporteerd:	15-06-2007 – 03-012-2007
10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:	

Personele inzet 2007

PRI

T. Bleijenberg
 G. Henken
 Jeronimo Herrera
 A.W. van Heusden
 C.G. van der Linden
 M.P.W. van Kaauwen
 M. Nadeem Khan
 M.S. Ramanna
 A.A. van Silfhout
 H.J. Schouten
 B.C.E. van der Ven
 J.M. van Tuyl
 J.H. Vossen
 T.C.A.E. Wouters
 Songlin Xie
 L. Zhang

RDA

H.K. Rhee

Bedrijven

M. Ceulemans
 A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
C.C. Anker (PT)
S. Bottema
M. Ceulemans
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
N. Meilland
H. Middelburg
C. Randag
R.C. Snijder
A. van der Velde
A. Vletter

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

Jeronimo Herrera and Songlin Xie are students from Colombia and China and did research within the scope of this project. Lu Zhang, a Chinese visiting scientist did till November research in our group for one year.

11.2 Disease testing

LA-population

At NHRI in South Korea a repeat of the *Fusarium* and *Botrytis* tests were carried out.

AA- and AOA population

The AOA and the AA-population was tested with the Botrytis-tip test by Vletter & Den Haan. Two tests were carried. The *Fusarium*-test by De Jong Lelies was not successful.

11.3 Marker analysis

DNA isolation

DNA of the AA population, Connecticut King (CK) x Orlito (OR), was collected earlier.

For the LA population, CK x White Fox (WF), we previously reported that problems were encountered with the quality of the isolated DNA. Therefore new leaf material was collected and DNA was isolated again. It turned out that the DNA yield was very low and tests have been performed to isolate DNA from more plant material without losing DNA quality. The quality appeared to be sufficient since distinct marker patterns were observed in an NBS profiling gel. The new DNA isolate is used for the DART experiments.

NBS profiling

AA population:

As reported previously, an NBS profile marker, originating from the CK parent, was linked to TBV resistance. The band was also present in the OR parent and showed a 3:1 segregation in the population, as is expected for an ab x ab segregation type. The band was very faint, estimated to be 600 base pairs in size and was closely migrating to other bands in the upper part of the gel. In order to produce a PCR marker, the band had to be excised without contamination. Therefore conditions were optimized to improve the separation and labeling efficiency of the marker band. A gel was produced in which the marker was nicely separable from neighboring bands. Because of the ab x ab segregation not only the band from CK but also the band from Or could be excised and sequenced. The bands were just over 600 bp in size. In the sequence traces we could still find some contaminating sequence. The reason for that is under investigation. Despite the contaminating sequence

we could find several sequence polymorphisms between the parents. One polymorphism can probably be used to develop a CAPS marker since an HpaII site is predicted to be absent in OR and present in CK. BLASTn analysis of the sequence shows no homologous sequences in the database. tBLASTx analysis did show no hits with NBS-LRR genes. We did find at least 100 imperfect matches in the fully sequenced genome of grapevine, suggesting that this marker is present in multiple copies in the grapevine genome.

Using a set of primers derived from the NBS profile band, we will study the copy number of the marker in lily and its suitability as a PCR marker.

LA population:

As reported previously 38 NBS profile markers were identified in the CK x White Fox (WF). Ten primer enzyme combinations (PE's) were analyzed in the LA population. The low number of markers was probably caused by the quality of the isolated DNA. It was therefore proposed to isolate new DNA and to repeat the NBS profile gels. Due to the poor quality of the first set of NBS profile gels and due to the huge number of DART markers to be produced, the project unfortunately ran out of resources and it was decided to postpone the NBS-profiling of the LA population.

DArT

DArT (Diversity Array Technology) is a modern marker technology, based on micro-arrays. This technology allows screening hundreds of markers simultaneously.

The DNA of Connecticut King was cut with the restriction enzymes PstI and TaqI. As reported in our previous report, this combination of enzymes showed good results in lily. The fragments with PstI sites at both ends,

without a TaqI site in between, were amplified (= multiplied) by means of PCR. Out of these thousands of different amplified fragments, 16 x 384 fragments were isolated, and printed on slide. This includes the fragments that yielded markers during the earlier test (see previous report). Each fragment was printed two times per slide. This yielded micro-arrays with $2 \times 16 \times 384 = 12.288$ spots. Each spot contained a fragment of Connecticut King DNA. The size of these fragments was between 200 and 2000 basepairs.

From 101 genotypes of the population LA-006001 (White Fox x Connecticut King) DNA was isolated. This DNA was cut with PstI and TaqI. The fragments with PstI sites at both ends, without a TaqI site in between, were amplified by means of PCR, and labeled with a fluorescent dye. These fluorescent fragments were brought onto the micro-arrays, one genotype per micro-array. The DNA fragments from the genotype that were inherited from Connecticut King, bounded to the same printed fragment on the slide, and showed there the fluorescent colour. If the genotype had not inherited a spotted fragment from Connecticut King nor a very similar fragment from White Fox, than that specific spot did not show the fluorescent colour. After hybridisation of the fluorescent DNA of the genotype onto the micro-array, the slides were scanned with a camera. The images were analyzed per spot for presence or absence of the fluorescent signal. This yielded approximately 500 markers.

Mapping

DArT Lily LA-population

We have decided to focus only on markers specific for *Connecticut King* since the resistances originate from *Connecticut King*. Using the DArT technology we prepared 16 plates with 384 probes.

We genotyped in total 101 genotypes of the population LA-006001 (White Fox x Connecticut King), five duplos were added and of each parent two samples were taken.

Results:

In total 528 markers were scored, regrettably due to a technical failure only 84 of the 101 genotypes could be analyzed. We added, as a control, five mysterious duplos (see table 1).

Table 1. Percentage identical duplos in 7 control numbers

Two identical genotypes	Number of discrepancies in 528 markers	Percentage identical
A – 4	8	98.5
B – 33	3	99.4
C – 52	4	99.2
D – 68	68 not analyzed	
E – 92	92 not a good sample	(70 x present; 239 x 0; 220 missing)
ConKing - ConKing	9	98.3
White Fox – White Fox	14	97.3

in total 43764 data points were collected, missing values were 2696 (+/- 6%).

A number of clones had a level of similarity, some might be the same genotype but we have seen that real duplos have >97% the same markers (Table 2)

Table 2. Percentage similarity between different clones.

Individual1	Individual2	Similarity
24	28	0.985
50	53	0.975
23	29	0.971
19	20	0.962
56	27	0.948
20	74	0.942
12	79	0.939
63	15	0.927
3	64	0.925
49	71	0.925
7	82	0.919
81	16	0.916
18	82	0.914
56	83	0.910
17	21	0.908
49	81	0.908
14	16	0.906
51	84	0.902
79	83	0.900

At the moment we don't have an explanation why so many pairs of individuals are so similar.

In general there are not many markers that segregate very skewed in either direction (too many bands or too few bands, skewness in about 6% of the markers).

Since the data are very recent it is only possible to make a first analysis of the data. In JoinMap linkage groups are formed and the markers which do not fit in e put aside and have to be analyzed one by one. We looked only at the easy markers (markers which end up in a linkage map without problems). This analysis gives the backbone of the map; things will change but not very substantial.

A total of 329 markers (of the 528) end up in this backbone map (only groups of 10 markers or more) and the beautiful thing is these 329 markers are in only 13 linkage groups !! See table 3

Table 3. Number of ConKing linkage groups with more than 10 markers

Linkage Group	No. of markers
1	61
2	39
3	22
4	17
5	16
6	12
7	13
8	11
9	46
10	32
11	25
12	24
13	11
Total number of markers	329

Further analyses will show whether two smaller linkage groups might fit together and that we end up on the expected 12 linkage groups.

Conclusion:

The choice we made to generate only markers for one of the parents in a lily cross and the reasonable number of markers has led to the first good lily genetic linkage map ever, worldwide. It will be necessary to genotype the missing 16 genotypes in order to optimal exploit this dataset.

11.4 Cytogenetic analysis of LAA, LALA, and AOA populations

GISH Analysis of LA Hybrids

33 BC₁ (LA x AA) plants have been analyzed with GISH for their ploidy level, the number of chromosomes from L and A genomes and the number of recombinant chromosomes. 18 triploid ($2n=3x=36$) and 15 diploid ($2n=2x=24$) or near diploids were found (Table 1). By GISH it was possible to identify the chromosomes of the parental genomes and also the recombinant segments (Fig. 1). Within the 18 triploids BC₁ most genotypes contain 12 L and 24 A chromosomes, except four remarkable genotypes. Two of them (062071-2, -3) contain an extra Longiflorum chromosome while in the rest of the two genotypes (066960-6, -20) one Longiflorum chromosome has been replaced by an extra Asiatic chromosome. However, the frequency of recombination differs in various genotypes varying from 2 to 20 chromosomes per genotype (Table 1). 15 diploid or near diploid BC₁ plants have been analyzed, indicating the presence of functional haploid (n) gametes in F1 LA hybrids. However, the number of L chromosomes ranges from 3 to 10 in different genotypes (Table 4). Similarly the percentage of L genome contents varies from 8.8 to 36 in different genotypes and more data is still under investigation to check out the real mechanism of this deviation in genome contents.

Seven BC₂ plants where both parents are supposed to contribute $2n$ gametes have also been analyzed through GISH. It was found that three genotypes are tetraploid with 24+24 L and A chromosomes. However, one tetraploid genotype (064525-13) has 25 L and 23 A chromosome composition. The other four genotypes (064525-8, -14, -15 and -18) have an aneuploid condition with +5, -1, -3 and +1 respectively (Table 5).

GISH has also been used to study the plants from AOA molecular marker population. During present study a total of 19 genotypes have been analyzed. All the genotypes are triploid (12 O and 24 A) except one tetraploid

(022605-4). The triploid progeny was expected due to contribution of $2n$ gametes from male parents (OA). However, the frequency of recombination differs in various genotypes varying from 2 to 9 (Table 6).

Table 4. The ploidy level, genomic composition and number of recombinant chromosomes of the progeny plants from LA population analyzed through GISH.

Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		L ($^L/A$)	A ($^A/L$)	
LA x AA	062035-1	041560	061092	3x	12 (4)	24 (2)	6
LA x AA	062035-2	041560	061092	3x	12(3)	24(3)	6
LA x AA	062071-1	041560	061091	3x	12(8)	24(4)	12
LA x AA	062071-2	041560	061091	3x	12(9)	24(5)	14
LA x AA	062074-1	041560	061085	3x	12(8)	24(6)	14
LA x AA	062074-2	041560	061085	2x	5(2)	19(3)	5
LA x AA	062074-3	041560	061085	3x	12(4)	24(4)	8
LA x AA	062704-5	041560	061085	2x	6(4)	12(4)	8
LA x AA	065051-2	024004-5	061095	3x	12(3)	24(3)	6
LA x AA	065051-3	024004-5	061095	2x	3(3)	21(2)	5
LA x AA	065051-5	024004-5	061095	2x	3(2)	21(3)	5
LA x AA	065051-6	024004-5	061095	2x	7(6)	17(3)	9
LA x AA	066960-2	045143	031110	2x	9(5)	15	5
LA x AA	066960-6	045143	031110	3x	11(5)	25(2)	7
LA x AA	066960-8	045143	031110	3x	12(4)	24	4
LA x AA	066960-12	045143	031110	3x	12(4)	24(2)	6
LA x AA	066960-13	045143	031110	3x	12(5)	24(3)	8
LA x AA	066960-14	045143	031110	3x	12(2)	24(1)	3
LA x AA	066960-15	045143	031110	2x	8(2)	16(1)	3
LA x AA	066960-16	045143	031110	3x	12(4)	24(4)	8
LA x AA	066960-17	045143	031110	2x	8(4)	16(3)	7
LA x AA	066960-20	045143	031110	3x	11(5)	25(3)	8
LA x AA	066828-5	045143	051072	2x	4(3)	20(3)	6
LA x AA	066963-2	045143	031039	2x	9(4)	15(1)	5
LA x AA	066963-8	045143	031039	3x	12(3)	24(1)	4
LA x AA	066994-1	041560	051073	2x	6(3)	18(4)	7
LA x AA	066994-2	041560	051073	2x	4(4)	20(5)	9
LA x AA	066994-3	041560	051073	3x	13(11)	25(9)	20
LA x AA	066994-5	041560	051073	2x	7(5)	17(4)	9
LA x AA	066994-6	041560	051073	2x+3	7(4)	20(4)	8
LA x AA	066994-7	041560	051073	2x+3	7(3)	20(4)	7
LA x AA	066994-11	041560	051073	3x	12(8)	24(5)	13
LA x AA	066994-12	041560	051073	3x	12(7)	24(5)	12
LA x AA	066995-1	041560	031040	3x	12(5)	24(3)	8

Table 5. BC2 Progeny plant analyzed by GISH

Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		L (^L / _A)	A (^A / _L)	
LA x LA	064525-7	041556	041502	4x	21(3)	22(2)	5
LA x LA	064525-8	041556	041502	4x+5	28(3)	25(2)	5
LA x LA	064525-13	041556	041502	4x	25(3)	23(1)	4
LA x LA	064525-14	041556	041502	4x-1	24(2)	23(1)	3
LA x LA	064525-15	041556	041502	4x-3	21(2)	24	2
LA x LA	064525-18	041556	041502	4x+1	22	27(1)	1
LA x LA	064536-2	041548	041502	4x	23 (1)	24	1

Table 6. The ploidy level, genomic composition and number of recombinant chromosomes of the progeny plants from AOA population analyzed through GISH.

Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		O (^O / _A)	A (^A / _O)	
A x OA	022605-2	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
A x OA	022605-4	Amarone	951502-1	4x	12	36	0
A x OA	022605-5	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
Ax OA	022605-12	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
A x OA	022605-18	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(2)	4
A x OA	022605-19	Amarone	951502-1	3x	12(3)	24(3)	6
A x OA	022605-21	Amarone	951502-1	3x	12(4)	24(2)	6
A x OA	022605-23	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(4)	6
A x OA	022605-24	Amarone	951502-1	3x	12(3)	24(2)	5
A x OA	022605-25	Amarone	951502-1	3x	12(3)	24(2)	5
A x OA	022605-27	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2
A x OA	022605-31	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24	2
A x OA	022605-32	Amarone	951502-1	3x	12	24	0
A x OA	022605-34	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(2)	4
A x OA	022605-36	Amarone	951502-1	3x	12(3)	24	2
A x OA	022605-39	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(2)	4
A x OA	022605-46	Amarone	951502-1	3x	12(2)	24(3)	5
A x OA	022538-16	Amarone	951502-1	3x	12(5)	24(4)	9
A x OA	022538-17	Amarone	951502-1	3x	12(1)	24(1)	2

All 33 LA BC₁ plants have been obtained by sexual polyploidization. From the 33 BC₁ plants, all plants (100%) possessed recombinant chromosomes (Table 1) with a varying number from 2 to 20 recombinant chromosomes in different genotypes. A notable feature was found when 041560 was used as

female parent and crossed with either 061085, 061091 or 051073 gave the maximum no of recombinant chromosomes (13-20) with up to 8 break points per chromosome. On the other hand 041543 gave the maximum recombinant chromosomes (10) when crossed with 031110 as male counter part. It was also found that both these combination also give diploid progenies with up to maximum of 9 recombination chromosomes as in case of genotype 066994-2;-6;-7 (Table 1)

All 18 BC₁ plants from AOA population have been obtained by sexual polyploidization. 17 of these BC₁ plants are triploid while one tetraploid (0220605-4) genotype was found. This genotype didn't have any recombination at all. Out of 17 triploids 16 (94%) possessed recombinant chromosomes (Table 4) with a varying number from 2 to 9 in different genotypes.

Karyotype analysis of BC1 diploids

Karyotyping is being done on 20 different BC1 diploid LA hybrids (Fig. 3) and based on these results analytical breeding in allopolyploids using lily hybrids will be illustrated. In analytical breeding crops at diploid level are selected for superior traits and then the optimal ploidy level could be achieved by using $2n$ gametes. This method is possible in genotypes producing both n and $2n$ gametes. So in LA population some genotypes are able to produce n gametes so it could be possible to carry out analytical breeding in interspecific lily hybrids.

Construction of cytological recombination maps in three genomes of *Lilium* based on GISH analysis.

Chromosomal recombination maps were constructed for three genomes of lilies (*Lilium*) analyzed by GISH technique (Fig. 4). For this purpose, the

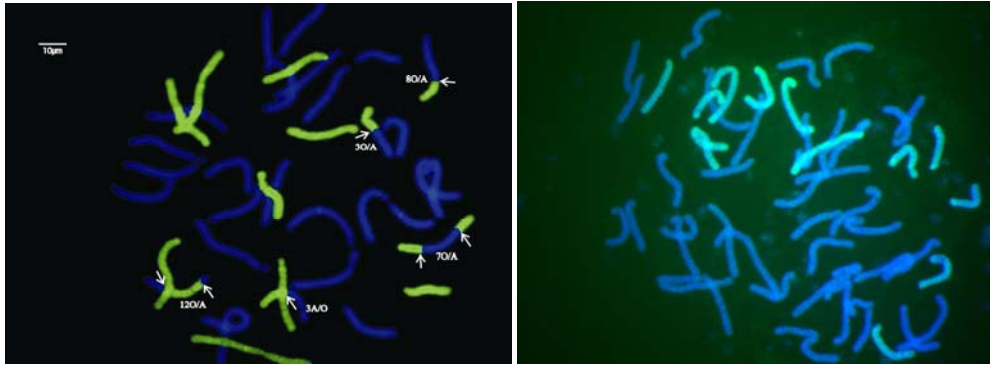


Fig. 2 Both BC₁ triploid and tetraploid OA hybrids. Oriental DNA is detected with FITC signal (parrot green) and the Asiatic DNA is counterstained with DAPI (blue). The arrows indicate recombinant segments and the recombinant chromosomes

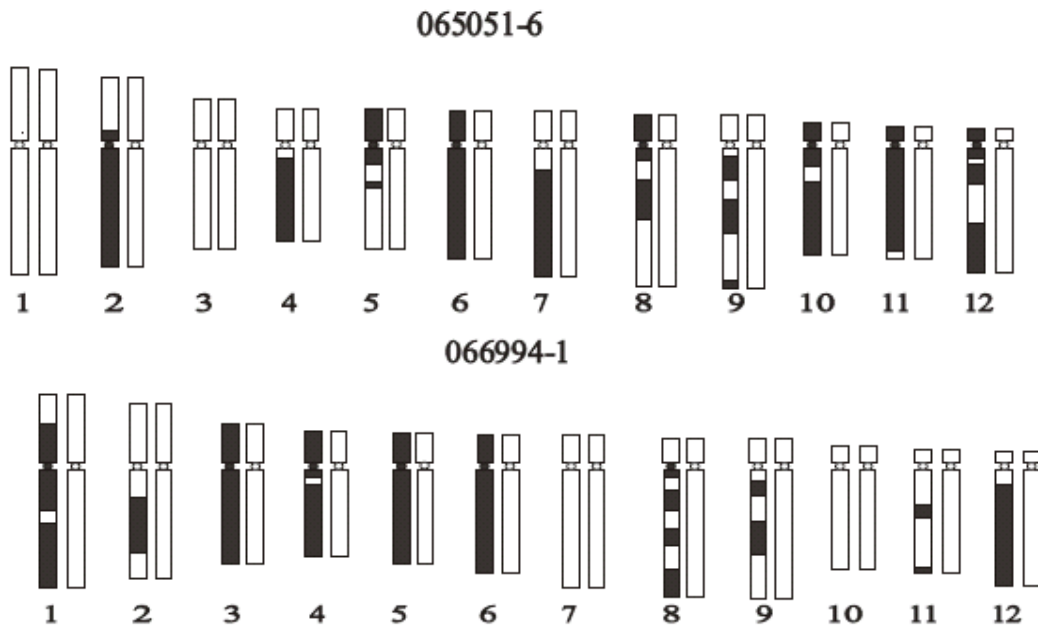


Fig. 3 Karyotype of 2 LA BC₁ diploid hybrids

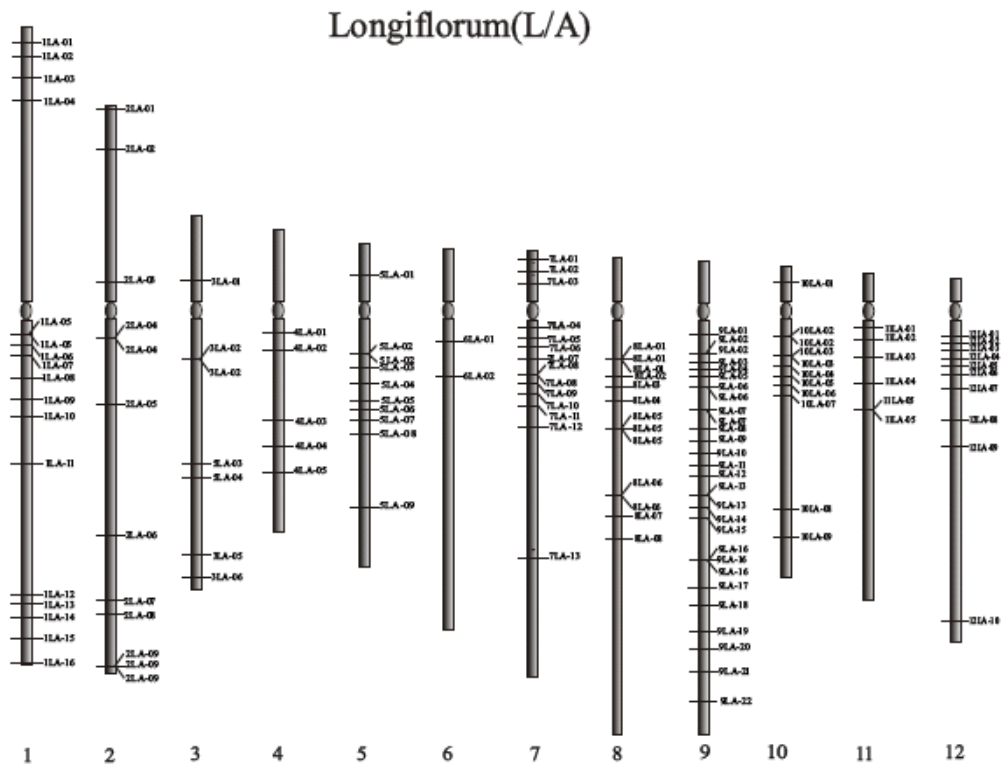


Fig. 4 Recombination map of Longiflorum (L/A) based on break points analyzed with GISH

11.5 Soortkruisingen

Kruisingsprogramma 2007

In het beperkte programma van dit jaar werd gebruik gemaakt van divers materiaal dat door de bedrijven vorig jaar beschikbaar is gesteld. Dit betrof moderne Orientals, goede diploïde Aziaten, OT's en opstaande trompetten. Alles met het doel dit te combineren met de meeste fertiele en resistente OA's. De nadruk ligt vooral op het verkrijgen van meer OOA's. Het resultaat tot nu toe staat weergegeven in onderstaande Tabel 7. De slaging is met 346 OOA en 117 OTOA's weer beter dan in 2006. Verder vallen de 85 TOA's op. In 2008 zullen de eerste OTOA in bloei komen, ook de eerste OOA's het door de bedrijven in 2006 aangeleverde sortiment komen dan in bloei. Verreweg de meeste komen in 2009 en 2019.

Tabel 7. Resultaten kruisingsprogramma 2007 (aantal ingezette ovaria OvEm, embryozakken Es_#, Embryos Em_#, zaadknoppen Ov_# en gekiemde embryos G_em).

Group	OvEm	Es #	Em #	Ov #	G_em
AOA OA	31	69	40		68
ATT OA	6	41		1	9
LA A	38	414	73	84	72
O OA	379	2891	71	63	346
OA A	19	195	12	20	52
OA OA	22	70			7
OAA OA	3	9	1		1
OO OA	30	143	6		10
OT O	5	25			1
OT OA	104	860	19	5	117
OT OT	1	20			1
OTT OA	12	93	5		6
T O	2	6			1
T OA	54	294	3		85
TT OA	7	65	1	30	10
Totaal	725	5272	231	203	786

Beoordeling nieuw materiaal

De bedrijven hebben in het materiaal uit de jaargangen 2001, 2002, 2003, 2004 en 2005 in totaal 36 selecties gemaakt die inmiddels geschubd zijn. Het betreft divers materiaal AOA, AOA x OA OOA tetraploide OA-combinaties (Tabel 8).

Tabel 8. Vermeerderde selecties 2007.

Type	MBnr	Moeder	Vader
A OA	022604-2	021039	951502 1
A OA	032185-12	031040	012304-6
A OA	052126-1	031028	012305
A OA	052126-2	031028	012305
A OA	052326-1	980072	022255 6
A OA	059043-1	051063	951502-1
AOA OA	022308-4-1	022188 25	981022
AOA OA	032969-2	002531-11	012305
AOA OA	032971-5	002531-12	014076
AOA OA	032971-6-1	002531-12	014076
AOA OA	032971-9-1	002531-12	014076
AOA OA	042109-1	002147-56	981013
AOA OA	042157-1	014090	991103
AOA OA	042887-1	022229-2	951502-1
AOA OA	042893	022229-47	951502-1
AOA OA	042893-1	022229-47	951502-1
LA OA	032092-1	031041	012304-8
O OA	022243-26	021033	991357
O OA	042131-1	041031	012304
O OA	042131-2	041031	012304
O OA	046506-1	031033	012304
OA A	012066-1	991106	011040
OA A	022203-1	952400-1	021039
OA OA	014074-1	991101	981023
OA OA	014078-1	991105	981023
OA OA	022224-4+5	991110	991357
OA OA	022226-2	991112	991357
OA OA	022226-4	991112	991357

Type	MBnr	Moeder	Vader
OA OA	022239-1	991116	991357
OA OA	022254-3	991112	991357
OA OA	036505-1	991435	014076
OA OA	036505-2	991435	014076
OA OA	042071-1	991104	981020
OA OA	042369-1	991111	022356
OA OA	042423-1	981006	012304
OAA A	022335-2	002122-3	021039

Vermeerdering, uitgifte materiaal

De 3 AOA/OAA-hybriden zijn bij De Jong vermeerderd (zie Tabel 9). Er is weer voldoende materiaal voor de Keukenhof, ook kunnen geïnteresseerde bedrijven plantgoed ontvangen. Overleg tijdens de vergadering.

Tabel 9. Overzicht oogst AOA/OAA materiaal.

	Monsternr.	Herkomst	-6	6-8	8-10	10-12	12/14	totaal
2170	012246-1 (573)	PRI	1150	1000	68	300	82	2600
2171	012248-1 (574)	PRI	750	1425	456	186	199	3016
2172	012065-1 (575)	PRI		1150	200	154	125	1629
2173	012246-1 (573)	De Jong	2000	2350	336	307	217	5210
2174	012248-1 (574)	De Jong	1300	1200	2100	380	425	5405
2175	012065-1 (575)	De Jong	400	900	200	260	170	1930
2176	012246-1 (573)	World Br	1500	3300	630	335	377	6142
2177	012248-1 (574)	World Br	1750	3830	828	700	355	7463
2178	012065-1 (575)	World Br	200	250	60	30	79	619

		14/16	16/18	18/+	totaal	dubbeln	% DN
2170	012246-1 (573)	53	54	49	156	13	5.50%
2171	012248-1 (574)	89	66	36	191	4	1%
2172	012065-1 (575)	73	103	138	314	108	25%
2173	012246-1 (573)	139	113	154	406	16	3%
2174	012248-1 (574)	289	183	131	603	15	1.50%
2175	012065-1 (575)	116	107	144	367	185	35%
2176	012246-1 (573)	123	109	164	396	28	4%
2177	012248-1 (574)	340	200	144	684	10	1%
2178	012065-1 (575)	68	65	122	255	200	60%

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

M. Nadeem Khan, M. S. Ramanna, Richard G. F. Visser And Jaap M Van Tuyl 2007
Towards the construction of chromosome maps in *Lilium* based on recombination points analyzed with GISH, poster.

M. Nadeem Khan, M. S. Ramanna, Shujun Zhou, Rodrigo Barba-Gonzalez, Richard G. F. Visser and Jaap M Van Tuyl. Construction of chromosomal recombination maps of three genomes of lilies (*Lilium*) based on GISH analysis, TAG, in preparation.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

Op schema

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

Before the 15th of January 2008 all evaluations and association studies between markers and disease scorings will be finished and then it will be decided whether additional disease scorings in 2008 will be necessary.

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).

Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

1. Datum:	16-06-2008
2. Projecttitel:	Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechnieken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie)
3. Projectnummer PT:	12402
4. Intern projectnr:	3360100300
5. Projectleider:	Jaap M. van Tuyl
Adres:	Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel:	0317 481085 0653362858
Fax:	0317 418094
Email:	Jaap.vantuyl@wur.nl
Website:	http://www.liliumbreeding.nl/project
6. Gewas: (indien van toepassing):	Lelie
7. Oorspronkelijke Looptijd project:	1-1-2006 – 31-12-2008
9. Periode waarover wordt gerapporteerd:	1-1-2008 – 15-06-2008
10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:	

Personele inzet 2008

PRI

P. Arens
T. Bleijenberg
A.W. van Heusden
M.P.W. van Kaauwen
M. N. Khan
M.S. Ramanna
A. Shahin
A.A. van Silfhout
B.C.E. van der Ven
J.M. van Tuyl
J.H. Vossen
T.C.A.E. Wouters
S. Xie

RDA

H.K. Rhee

Bedrijven

M. Ceulemans
A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
C.C. Anker (PT)
S. Bottema
M. Ceulemans
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
N. Meilland
H. Middelburg
R.C. Snijder
A. van der Velde
A. Vletter

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

Two new PhD-students started their work in our team: Arwa Shahin is from the University of Damascus, Syria and Songlin Xie is from China. Three bachelor students from Larenstein were also active in the project (Yan Zhe, Li Dan, Tang Xiaoyi).

11.2 Disease testing

LA-population

At PRI and at NHRI in South Korea the *Fusarium* and *Botrytis* tests will be carried out. The LMoV test is continued.

AA- population

The different *Botrytis* test carried out by Vletter & Den Haan did not correlate very well with each other. Possibly the variation in *Botrytis* resistance is too small in this population. A major problem is to obtain a well sporulating,

pathogenic *Botrytis elliptica* strain. The Fusarium-test with the AA-population will be repeated this year at PRI.

11.3 Marker analysis

Mapping of resistance genes

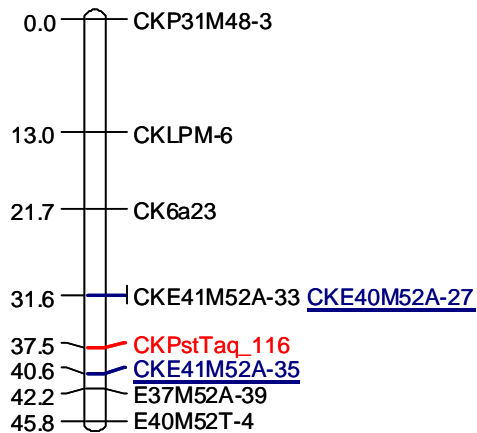
Since we have genetic linkage maps of two different crosses we looked for common markers in the two linkage groups. A total of 24 common markers were found. This number is too low to get a good impression of the correspondence between the two genetic linkage maps. Nevertheless, in all cases where linked common markers were found in the AA-population they were also linked in the LA-population.

More common markers would be needed to get a good idea about the correspondence between the two linkage maps. Since we will not determine more DArT markers in the AA population or AFLP-markers in the LA-population, we will not get an overall view but incidentally we can use the common markers.

Four QTLs for *Fusarium* resistance have been identified in the AA population and the best linked AFLP markers are known. The presence of new DArT markers make it possible to screen in the LA population for DArT markers linked to common DArT markers.

Two examples of AA linkage groups with DArT markers:

AA7



LA11

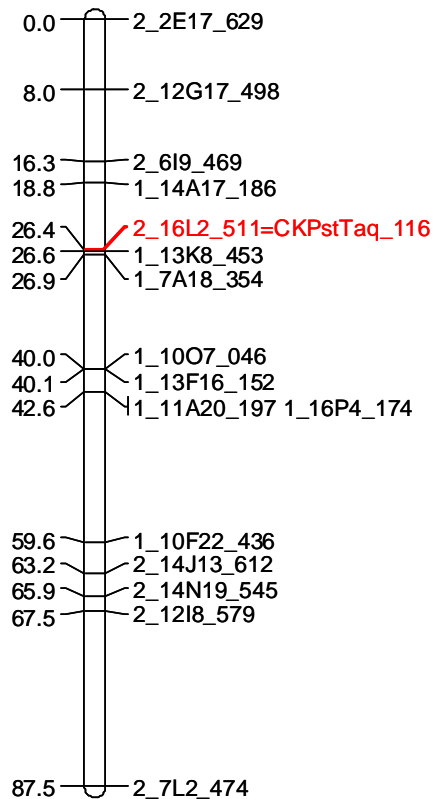


Figure 1. AA7 = linkage group 7 of AA population, LA11 = linkage group 11 of LA population.

AA7 is known to harbor a Fusarium QTL with CKE40M52A-27 and CKE41M52A-35 as peak markers (the highest significance, markers in blue). CKPstTaq_116 is a common marker. This marker is linked to the two peak markers and can be converted, however if this is not successful we can also choose the linked DArT markers of the LA11 linkage group (e.g. 1-13K8_453).

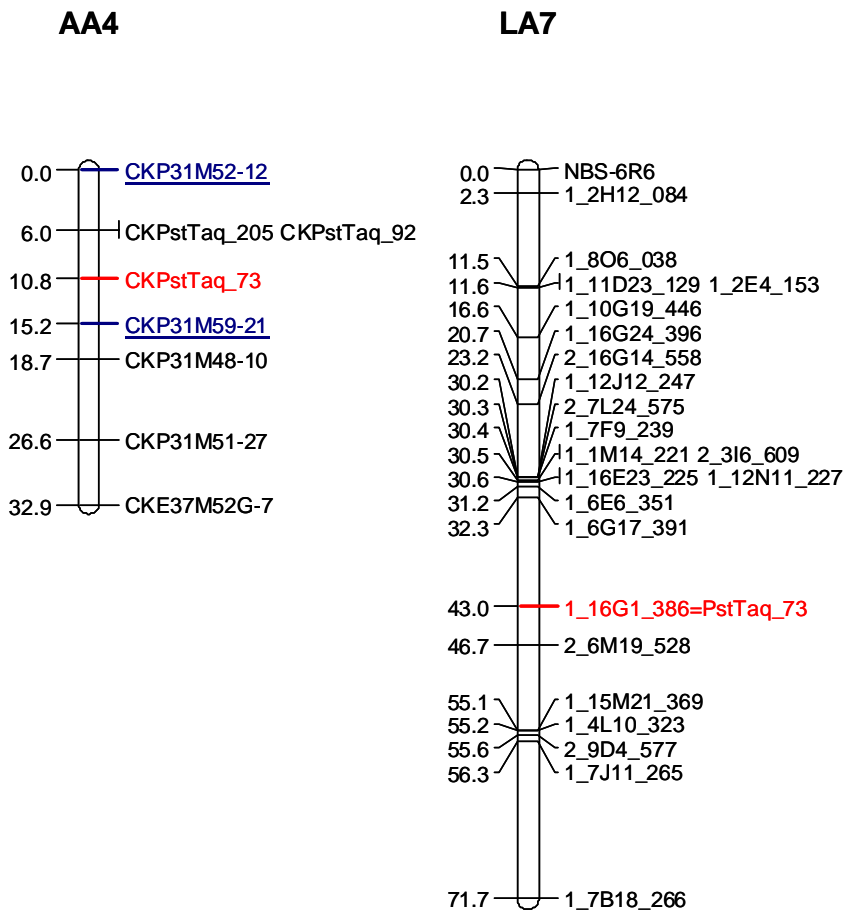


Figure 2. AA4 = linkage group 4 of AA population, LA7 = linkage group 7 of LA population.

LG4 of the AA is known to harbor a Fusarium QTL with CKP31M52-12 and CKP31M59-21 as peak markers (the highest significance). CKPstTaq_73 is a common marker. This marker is linked to the two peak markers and can be converted, however if this is not successful we can also choose the linked DArT markers of the LA7 linkage group (e.g. 2_6M19_528). Actually, the markers CKPstTaq_205 and _92 are also in the QTL region identified and an attempt has been made to convert these markers (see below).

Two examples of linkage groups in the AA population with a putative Fusarium QTL. AA26 with as peak markers P31M55-1 and E41M52A-11. No

DArT markers are present. The NBS-profile markers of AA26 were not determined in the LA population. Without this there is no link between the two maps and no DArT markers can be chosen for conversion. This is the same for linkage group AA11, only AFLP markers are in this group and no AFLP markers have been determined in the LA population.

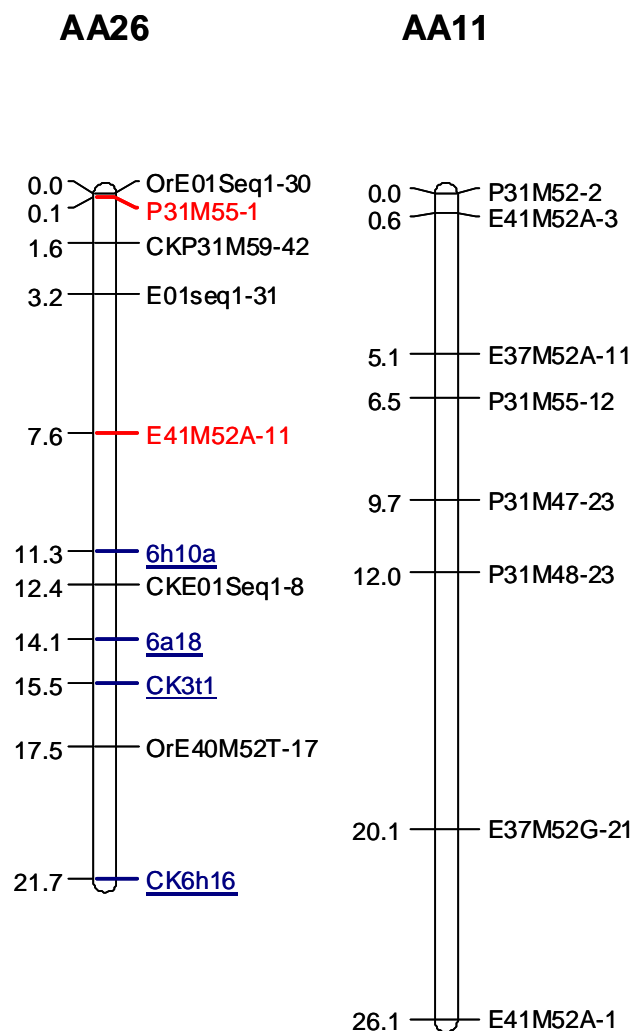


Figure 3.
Two linkage groups with putative Fusarium QTLs.

NBS profiling

AA population:

As reported previously, a NBS profile marker (NBS3Md34) originating from the CK parent, linked to LMoV resistance, was isolated and sequenced. The first 520 base pairs of the marker showed strong homology to repeated sequences from grapevine (over one hundred copies). The remaining 100 base pairs did not show significant homology to any sequence in the databases. Because the marker might be multicopy in lily as well, we first tested the copy number using Q-PCR. Four primers were designed targeting a lily gene that is expected to be present in single copy (the LLP12 gene that is part of the conserved cell cycle machinery). These primers are used to amplify amplicon SC1 and SC2 (Table1). Fourteen additional primers were designed to produce seven different amplicons dispersed over the NBS3Md34 marker (Figure 4, Table 1, M1 till M7). The Ct values produced by the primers targeting the marker sequence were 2 till 10 cycles shorter than the single copy control. This showed that the primer pairs amplified fragments that we present in 4 till 1000 copies in the genome (Table 1). This shows that like in grape vine this sequence is present in high copy numbers. Despite the high copy number, a few primer pairs (M1 and M3) amplified a limited number of copies. These primers, however, could not be used directly for the production of a CAPS marker since the amplicons produced in Q-PCR are too short. We designed additional primers on the 3' end of the marker and in combination with primers at the 5' end to produce larger amplicons (>500 bp). Although Q-PCR is not very accurate with larger amplicons (M8, 9,10 in table 1), we also tested the larger amplicons in Q-PCR and found that M8 and M10 amplicons were probably suited for conversion into a CAPS marker since the copy numbers was 4 and 6 respectively. On each amplicon 28 restriction enzymes were tested and four polymorphisms between the

parents were selected for testing on the population. Unfortunately, however, none of the polymorphisms segregated indicating that the polymorphisms were homozygous or still representing too many copies. It is concluded that this marker is not a suited candidate for additional attempts to produce a PCR marker for LMoV resistance.

Table 1: Copy number of NBS profile marker in CK as determined by Q-PCR

<u>Amplicon</u>	<u>Size (bp)</u>	<u>Ct value (cycles)</u>	<u>Copynumber</u>
SC 1	88	25.0	1.5
SC 2	160	25.5	1
M 1	86	23.6	4
M 2	109	17.7	256
M 3	128	22.5	8
M 4	151	22.0	12
M 5	89	16.6	512
M 6	134	19.9	32
M 7	102	15.8	1024
M 8	555	23.0	4
M 9	548	22.1	8
M10	523	22.6	6

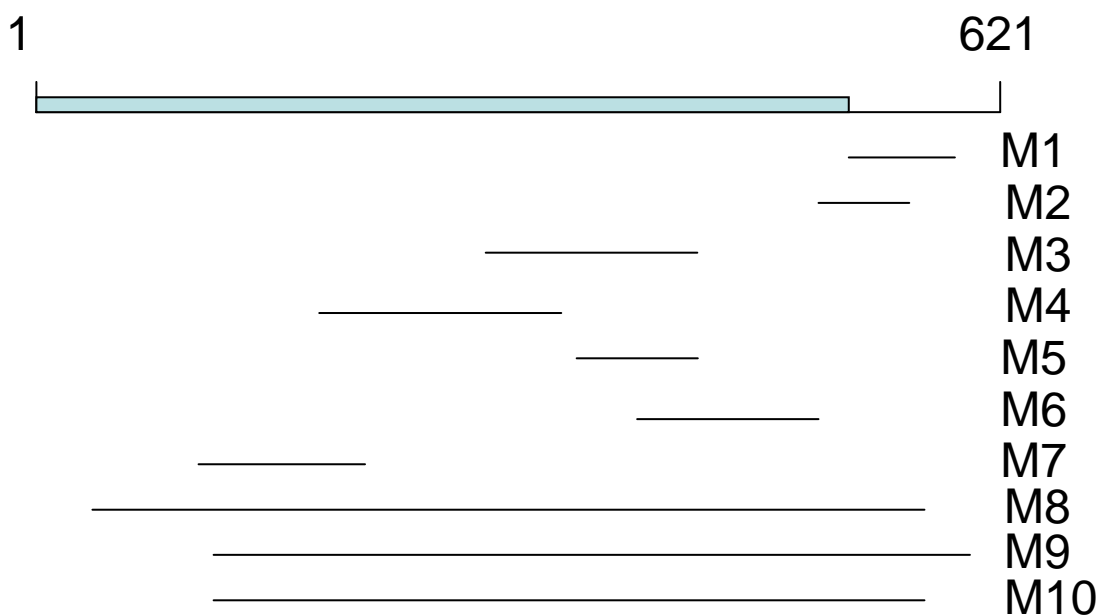


Figure 4: Schematic representation of the NBS3Md34 marker DNA sequence. Without the primers, 621 nucleotides of marker sequence were found. Region homologous to *Vitis vinifera* genome is indicated in blue box. The positions of the amplicons as described in Table 1 are indicated underneath.

LA population:

In the AA population some NBS markers were linked to LMoV resistance, As reported above the conversion of one of them was not successful. Another linked NBS marker, NBS-6MAA7 (no conversion was attempted) was scored both in the AA as the LA population. Since the resistance in both populations originates from Connecticut King it is expected that linked markers in the AA population are also linked in the LA population. The LMoV scores in the LA population are far from complete but the vast majority of susceptible plants identified so far do not contain the NBS-6MAA7 marker. These data together strongly suggest that NBS-6MAA7 is also linked to TBV in the LA population as can be expected. Therefore we examined the linkage group with NBS-6MAA7 in the LA population for the presence of DArT markers. Two closely linked DArT markers were identified: 1_15D8_125 and 1_9C7_374 (figure 5). Because it is easier to convert a DArT marker than to convert an NBS profile marker, 1_15D8_125 and 1_9C7_374 are selected for conversion into a PCR marker.

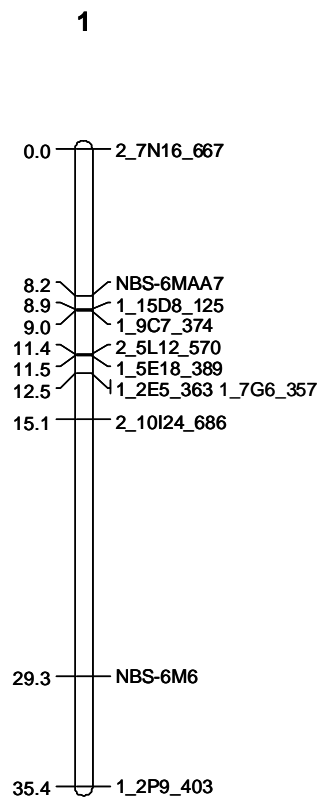


Figure 5: Linkage map of NBS profile markers and DArT markers in the LA population.

Conversion of DArT markers in PCR markers

In the AA population, 4 QTLs for *Fusarium* and one for TBV were detected and localized on linkage maps based on AFLP markers. Recently, NBS and DArT markers were added to this AFLP map and new linkage groups were constructed (PT-Senter map, 2006/2A). Additionally, the LA population was mapped using DArT markers.

During the first half of 2008, the work was focused on converting three DArT markers related to the most significant QTL for *Fusarium* resistance which is located on linkage group 5 of the AA map in 2002 and linkage group 4 in the AA map of 2006 (Fig. 6).

The three DArT markers are: CKPstTaq_73, CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205.

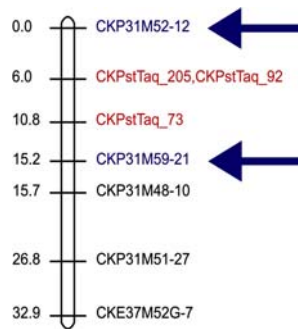


Fig 6: Linkage group 4

These three were picked up and used for colony PCR and then for sequencing (by using M13 primers). For example the sequence of fragment CKPstTaq_73 is:

- **CKPstTaq_73: (748 bp)**

```
TGCAGTAACAACCTCAATTAACGTATATCAGAATAATTAATAATGATTTT
GAAAGTCAGGTA TATGTTTATTGACGGCGACCAGTCAGGTCACAACA
AATGGTAGTAAACAGAATTTAATCATTGTATGACCAGTAAGTTCCTGA
TATTCTGCTATGAGCACAGAGA TGCCCTCATCTTTCAACATCAAATGT
ATCCCAACTCTGATTATCAAAATTCAATTTAAATTTGAATGCCGAAAG
AAATTTATGTGCTTACGTTGCCGCAATAGCAACCTTGCTTTCACGG
TCCCACTTTGCTTGCTCCCTTCGTGTCGGTACTGGCCTCCATCTTGG
TGTTGCAACACCAACAGGACTCTGAATATATAGTTTTCATGGACCAAA
ATTTAGTTGATTTGAACACAAAATATTATGGGTGTTACATCTCTTGAAT
CATAAAGTACAATGACAATTTTATGCTAAAAATATCCAGTTGATCAGA
AGAAAACGTTATTGCGTAACGGTCCGAGAATAAACATAAAACAATAAT
AAAGCAATCCCTGAAATATACTTAATAAAAAGATACTCCATAGATGCA
CAAATACAAAGAACTGAAACATGTCCTTCCGAAATGTCCCAACCGA
AACTGATAAGATTAGGCCGAAGTCTAAGGCATGAGTTTGGACTTGCCG
TATTTGAAAAAGAGAGGTCAAACCTTACGGAAAACTTATTCCGGGGC
ATCGTATGTAGGCTCCATAGCGGTTTTCTGCA
```

Forward and reverse primers were designed for each of these fragments. Next, these primer combinations were tested in CK, Orlito and White Fox:

name primer (max 20 char)	sequence (in 5'----> 3' order)
CKPstTaq_92_1D17_F_1	GTGGAAAGACTGATCCAGG
CKPstTaq_205_2J06_R_1	GTGGTAAGACTGACCATCT
CKPstTaq_92_1D17_R1	GGATGATCCCATCTGATTAC
CKPstTaq_205_2J06_F_1	GAATGAACCCATCTAACTAT
CKPstTaq_73_1B23_F_1	TATGTTTATTGACGGCGACCAG
CKPstTaq_73_1B23_R_1	AAGTTTTCCGTAAGTTTGACCTCT
CKPstTaq_73_1B23_F_2	TGCCCTCATCTTTCAACATCA
CKPstTaq_73_1B23_R_2	TTTTCAAATACGGCAAGTCCA
CKPstTaq_73_1B23_R_3	TTTCAGGGATTGCTTTATTATTGT

- CKPstTaq_73: primers amplified in the three parents (not specific)
- CKPstTaq_92: primers specific to CK and it amplifies two bands (one main of expected length).
- CKPstTaq_205: is specific to CK.

The two specific PCR markers were used to test AA and LA populations (Fig 7/8).

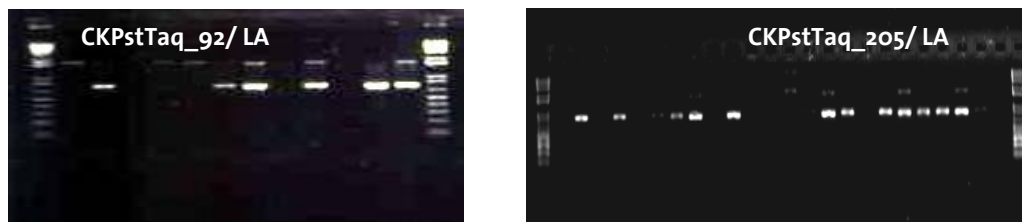


Fig 7/8. Segregation of CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 in LA population

Results:

Marker	CKPstTaq_92	CKPstTaq_205
Population 96 individuals		
LA population	45 bands	40 bands
AA population	Not specific	49 bands

- Linkage maps of AA: the three DArT markers are there and they almost segregate similarly.
- CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 have almost the same sequence with some SNPs and deletion parts, it suggested to be repetitive DNA.
- Linkage maps of LA: only CKPstTaq_73 is mapped, but not CKPstTaq_92 or CKPstTaq_205 other DArT markers are present (see above under mapping of resistance genes) .
- In LA and AA populations:
 1. CKPstTaq_73 doesn't show differences in segregation between the three parents.
 2. CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 are present in CK only but not in WF or Orlito.
 3. CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 tested in 96 offspring of LA population (45 and 40 bands respectively).
 4. CKPstTaq_205 but not CKPstTaq_92 segregate in AA population (49 out of 96 individuals show bands).

Next steps:

More efforts should be concentrated on

- CKPstTaq_92 to get polymorphism in AA population. CKPstTaq_92 in addition to CKPstTaq_205 will be used in combining linkage groups with cytogenetic map of AA and LA hybrids.
- CKPstTaq_73 to get polymorphic segregation pattern as the other two fragments. Sequencing of the CK, Or and WF specific alleles and designing new primers.
- DArT and other markers linked to the remaining Fusarium-QTLs will be converted in the same way.

11.4 Cytogenetic analysis of LA-progenies

GISH Analysis of LA Hybrids with functional $2n$ gametes

GISH (Genomic *in situ* Hybridization) has been applied to analyse BC1 (LA x AA) plants for their ploidy level, the number of chromosomes from L and A genomes and the number of recombinant chromosomes. A total of 25 BC1 plants (LAA) have been analysed. All of them were triploid ($2n=3x=36$). By GISH it was possible to identify the chromosomes of the parental genomes and also the recombinant segments. In a majority of the triploid BC1 progeny plants, 12 chromosomes of the L genome and 24 of the A genome were clearly identified (Table 2). This indicated that F1 LA hybrid contributed functional $2n$ gametes to its progeny plants. However, there are five remarkable genotypes with an unusual distribution of either the L or A genome. Two of them (062071-2, 066994-3) contain an extra Longiflorum chromosome while in the rest of the three genotypes (066960-6, 066960-20, 066828-2) one Longiflorum chromosome has been replaced by an extra Asiatic chromosome. The frequency of recombination differs in various genotypes varying from 2 to 20 chromosomes per genotype (Table 2).

Table 2. The genomic composition and number of recombinant chromosomes of the progeny plants from LA population analysed through GISH

Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		L ^(L/A)	A ^(A/L)	
LA x AA	062035-1	041560	061092	3x	12 (4)	24 (2)	6
LA x AA	062035-2	041560	061092	3x	12(3)	24(3)	6
LA x AA	062071-1	041560	061091	3x	12(8)	24(4)	12
LA x AA	062071-2*	041560	061091	3x	13(9)	23(5)	14
LA x AA	062074-1	041560	061085	3x	12(8)	24(6)	14
LA x AA	062074-3	041560	061085	3x	12(4)	24(4)	8
LA x AA	062074-4	041560	061085	3x	12(7)	24(7)	14
LA x AA	065051-2	024004-5	061095	3x	12(3)	24(3)	6
LA x AA	066828-2*	041543	051072	3x	11	25(1)	1
LA x AA	066828-4	041543	051072	3x	12(1)	24(1)	2
LA x AA	066960-4	045143	031110	3x	12(4)	24(3)	7
LA x AA	066960-6*	045143	031110	3x	11(5)	25(2)	7
LA x AA	066960-8	045143	031110	3x	12(4)	24	4
LA x AA	066960-12	045143	031110	3x	12(4)	24(2)	6
LA x AA	066960-13	045143	031110	3x	12(5)	24(3)	8
LA x AA	066960-14	045143	031110	3x	12(2)	24(1)	3
LA x AA	066960-16	045143	031110	3x	12(4)	24(4)	8
LA x AA	066960-20*	045143	031110	3x	11(5)	25(3)	8
LA x AA	066963-5	045143	031039	3x	12(6)	24(3)	9
LA x AA	066963-8	045143	031039	3x	12(3)	24(1)	4
LA x AA	066994-3*	041560	051073	3x	13(11)	25(9)	20
LA x AA	066994-4	041560	051073	3x	12(5)	24(5)	10
LA x AA	066994-11	041560	051073	3x	12(8)	24(5)	13
LA x AA	066994-12	041560	051073	3x	12(7)	24(5)	12
LA x AA	066995-1	041560	031040	3x	12(5)	24(3)	8

GISH analysis of LA Hybrids with functional 2n gametes from both parents

11 BC2 plants of which both parents were supposed to have contributed 2n gametes have also been analysed by GISH. It was found that 6 genotypes were tetraploids (2n=4x=48) indicated the contribution of 2n gametes from both parents. The other five genotypes (064525-8, -14, -15,-18 and 064534-

1) have an aneuploid condition with +5, -1, -3, +1 and -1 respectively (Table 3).

Table 3 BC2 LA hybrids indicating bilateral sexual polyploidization

Cross	Genotype	Parents		Ploidy level	Genome composition		Number of recombinant Chromosomes
		Female	Male		L (^L /A)	A (^A /L)	
LA x LA	064525-7	041556	041502	4x	21(3)	22(2)	5
LA x LA	064525-8	041556	041502	4x+5	28(3)	25(2)	5
LA x LA	064525-9	041556	041502	4x	22(2)	26(3)	5
LA x LA	064525-13	041556	041502	4x	25(3)	23(1)	4
LA x LA	064525-14	041556	041502	4x-1	24(2)	23(1)	3
LA x LA	064525-15	041556	041502	4x-3	21(2)	24	2
LA x LA	064525-16	041556	041502	4x	25(4)	23(1)	4
LA x LA	064525-18	041556	041502	4x+1	22	27(1)	1
LA x LA	064525-20	041556	041502	4x	25(3)	23(4)	7
LA x LA	064534-1	041546	041502	4x-1	22(4)	25(6)	10
LA x LA	064536-2	041548	041502	4x	23 (1)	24	1

GISH analysis of LA Hybrids with functional *n* gametes; an illustration of analytic breeding in lilies

By backcrossing the diploid ($2n=2x=24$) F1 interspecific hybrid between Longiflorum x Asiatic lilies (LA hybrid) to Asiatic parents, 24 diploids ($2n=2x=24$) or near diploids plants have been produced. Among BC1 diploid plants, 21 had the expected 24 chromosomes and three were aneuploid ($2x-1$, $2x + 2$ or $2x + 3$). Because the Asiatic parent was used for backcrossing, the number of A genome chromosomes (chromosomes of which the centromere was of Asiatic genome) predominated in the BC1 progenies and varied from 15 to 23 (Table 3). On the other hand, the chromosomes with the centromere of the L genome varied from only one (044602-2) to nine (066960-2 and 066963-2) (Table 4). There were obviously two types of recombinant chromosomes in all cases. Those with a centromere of Asiatic chromosome with a recombinant segment of Longiflorum, indicated as A/L, and *vice versa*, i.e., L/A (Table 3 and Fig. 1a, b and c). In all, there were 71 L/A and 86 A/L types of recombinant chromosomes found. Taking the total length of both A

and L chromosomes in the BC1 progenies, the percentages of each genome present in the BC1 progenies was estimated (Table 4). The percentage of L genome deviated from the expected (25%) and it varied from 3.3% (044602-2) to as high as 32.5% (066960-15), nearly a 10 fold variation. In order to estimate the number and types of recombinant chromosomes and the lengths of recombinant segments, the karyotypes of some of the BC1 progenies are shown in Fig 9. It was found that a considerable amount of Longiflorum genome was transmitted from LA hybrids to BC1 progenies.

Table 4. Genome composition of BC1 (diploid and aneuploid) LA hybrids and the number of recombinant chromosomes among different genotypes

Cross	Genotype Code	Ploidy level	Genome composition		Genome percentage		No of recombinant chromosomes
			L ^(L/A)	A ^(A/L)	L (%)	A (%)	
LAA	044511-1	2x	3(1)	21(2)	12.55	87.45	3
LAA	044538-1	2x	7(6)	17(4)	25.37	74.62	10
LAA	044538-2	2x	7(6)	17(3)	28.6	71.4	10
LAA	044538-3	2x	4(3)	20(4)	23.03	76.96	7
LAA	044538-4	2x	5(2)	19(5)	24.32	75.67	7
LAA	062704-2	2x	4(2)	20(4)	25.6	74.63	6
LAA	062704-5	2x	6(4)	18(4)	16	84	8
LAA	065051-3	2x	3(3)	21(2)	8.81	91.18	5
LAA	065051-5	2x-1	3(2)	20(3)	17.80	82.20	5
LAA	065051-6	2x	7(6)	17(3)	27.5	72.5	9
LAA	066828-5	2x	5(4)	19(2)	15.2	84.8	6
LAA	066960-2	2x	9(5)	15	26.88	73.11	5
LAA	066960-15	2x+2	7(2)	19(1)	32.52	67.47	3
LAA	066960-17	2x	8(4)	16(3)	31.88	68.11	7
LAA	066960-22	2x	5(5)	19(4)	13.9	86	9
LAA	066963-2	2x	9(5)	15	28.9	71.09	5
LAA	066963-7	2x	7(3)	17	25.2	74.8	3
LAA	066994-1	2x	6(3)	18(4)	27.81	72.18	7
LAA	066994-2	2x	4(4)	20(5)	29.28	70.72	9
LAA	066994-5	2x	7(5)	17(4)	21	79	9
LAA	066994-6	2x+3	7(4)	20(4)	35.9	64.1	8
LAA	066994-7	2x+3	7(3)	20(4)	24.37	75.63	7
LAA	066994-10	2x	6(3)	18(4)	26.2	73.8	7
ALA	044602-2	2x	1(1)	23(2)	3.34	96.66	3

All 25 LA BC1 plants have been obtained by sexual polyploidization. From the 25 BC1 plants, all plants (100%) possessed recombinant chromosomes (Table 1) with a varying number from 2 to 20 recombinant chromosomes in different genotypes. A notable feature was found when 041560 was used as female parent and crossed with 061085, 061091 or 051073 gave the maximum no of recombinant chromosomes (13-20). On the other hand 041543 gave the maximum recombinant chromosomes (10) when crossed with 031110 as male counter part.

It was found that some F1 LA hybrids produced functional haploid gametes. In such genotypes a large number of Longiflorum chromosomes were transmitted to the BC1 progenies from LA hybrids. It was also found that the diploid progenies have a maximum of 10 recombinant chromosomes as shown in some genotypes (Table 4). The occurrence of diploid plants in the BC progenies of LA hybrids has opened the prospects of analytic breeding in lilies. In this approach, the selection of superior genotypes can be carried out at the diploid level and polyploid forms are synthesized from superior diploid parents.

Karyotype analysis of BC1 diploids

Karyotyping is being done on all 24 different BC1 diploid LA hybrids (Fig. 11) and based on these results analytical breeding in allopolyploids using lily hybrids will be illustrated.

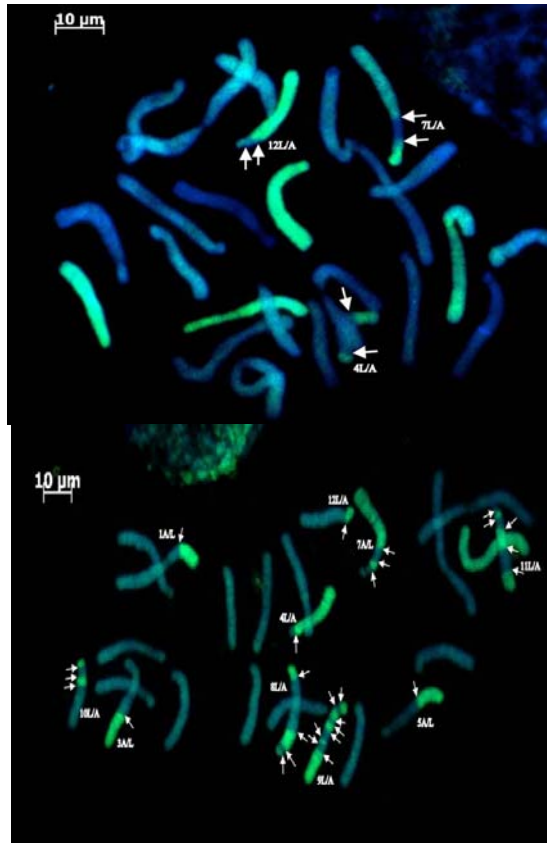
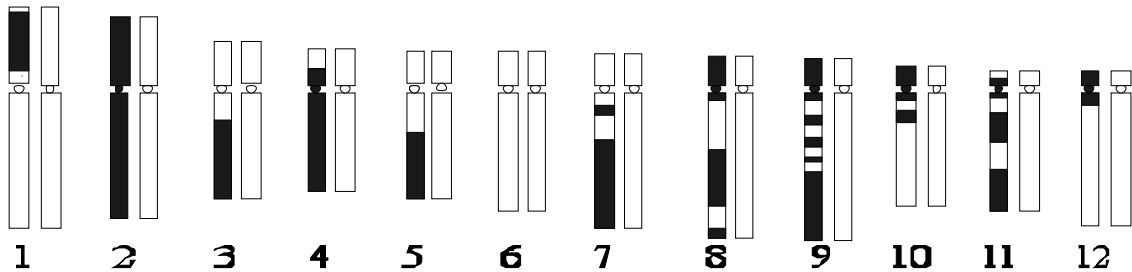


Fig. 11. BC1 diploid LA hybrids. Longiflorum DNA is detected with FITC signal (parrot green) and the Asiatic DNA is counterstained with DAPI (blue). The arrows indicate recombinant segments and the recombinant chromosomes

044538-2



066994-7

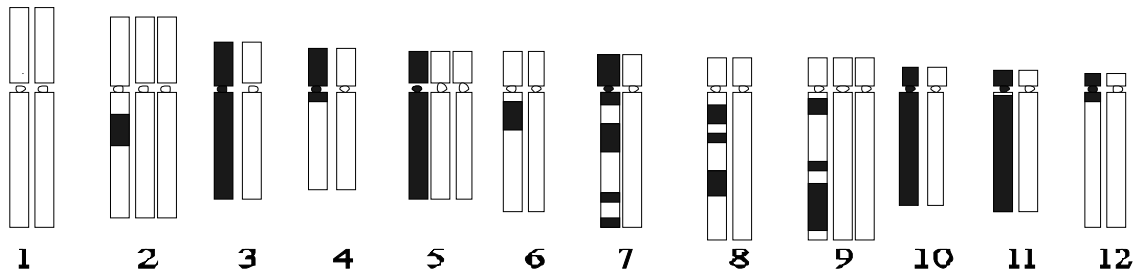


Fig. 12. Karyotype of LA BC1 diploid and aneuploid hybrids

Analysis of BC2 LA progenies

Three diploid BC1 genotypes were pollinated using Asiatic pollen. A total of 17 flowers were pollinated. From the 17 pollinated flowers only one embryo could be rescued. The progeny obtained by crossing LAA (044538-2) as mother with an Asiatic (051073) as father. Ploidy level of the germinated individual was determined by flow cytometry and the number of chromosomes was confirmed by GISH. In total 24 chromosomes were identified making this individual diploid ($2n=2x=24$). From GISH it was also possible to determine 10 break points distributed in 6 chromosomes, two of them containing Longiflorum centromeres (Fig. 14). Compared to BC1 the BC2 generation is expected to contain 12.5 % of the donor genome (L) rather than 25%. In table 4 a comparison in the genomic composition, number of recombinant chromosomes and break points of both the BC1 and its progeny (BC2) has been given. The BC1 shows a greater percentage of L- genome than what is expected (28.5% compared to the expected 25 %), also it has 28 breaking points with 7 chromosomes showing Longiflorum centromeres. Even though it shows more than the expected percentage of the L- genome, its progeny shows only 9% which is lower than the expected 12.5%.

Table 5 Relative Asiatic to Longiflorum genomic composition of the BC2 individual compared to its mother (BC1)

Backcross	Code	Ploidy	Genome %		No. of chromosomes		Number of recombinant chromosomes	No. of breaking points
			Asiatic	Longiflorum	A ^(A/L)	L ^(L/A)		
BC1	044538-2	2x	72	28	17(4)	7(6)	10	28
BC2	074373-1	2x	91	9	22(4)	2(2)	6	10

With the karyotype of both the mother and the progeny it is possible to determine new recombination events that took place during the meiosis resulting in new gametes (Fig. 12). The results indicated the presence of new recombination events and loss of some recombinant chromosomes due to the segregation of the chromosomes during meiosis. Chromosomes 1, 3, 5 and 12 show the same break points as in the mother BC1. Finally chromosomes 8 and 11 showed new recombination event; where a segment of Longiflorum in each of the chromosomes was lost. The results indicate that new recombination events are present in subsequent backcrosses, and most important that the break points can take place in both the short and long arm of the chromosomes.

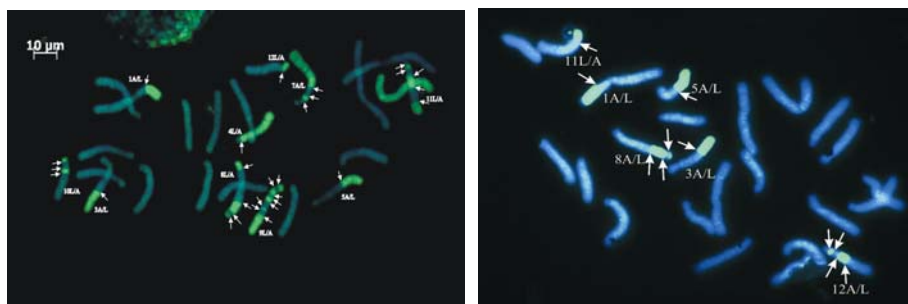


Fig. 13 A GISH picture represents the diploid LAA BC1 044538-2 and its progeny; diploid LAAA BC2 074373-1. Longiflorum DNA is detected with FITC signal (parrot green) and the Asiatic DNA is counterstained with DAPI (blue). The arrows indicate recombinant segments and the recombinant chromosomes

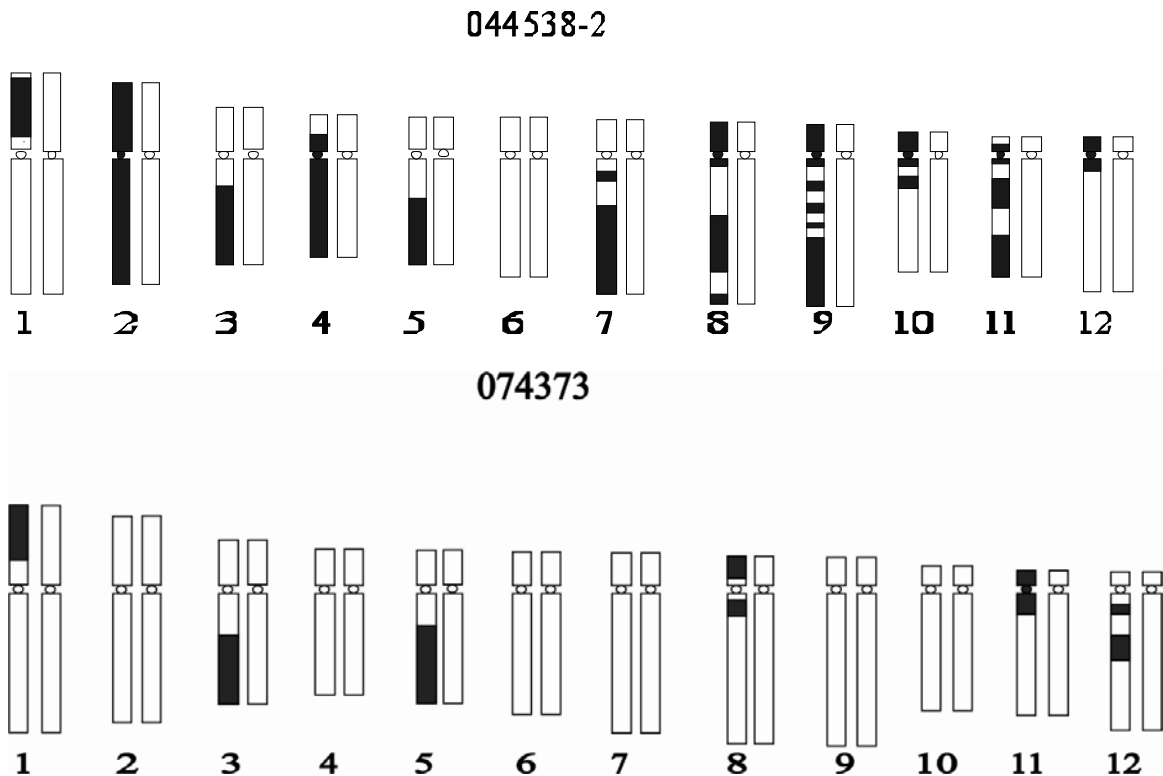


Fig. 14. A comparison of the karyotypes of the diploid LAA BC1 044538-2 and its progeny; diploid LAAA BC2 074373-1. Asiatic segments are represented in white, while Longiflorum are in black.

DArT Marker data: Evaluation of data (LA population)

In order to construct the genetic map of LA population we focussed on markers only present in one parent (Connecticut King) and not present in the other parent (White Fox). Such an approach should give only markers that segregate in a 1:1 ratio. Viewing the results this approach has led to a good quality linkage map. By using information from both the AA as well as the LA population the two maps can be linked together which can improve the quality of the maps. A total of 688 markers data set is available and 535 good markers have been mapped on 14 linkage groups. Some representative

clones marked on different linkage groups are shown in Fig.15. With FISH techniques an attempt will be made to link the small linkage groups to the large linkage groups and also make a physical link to the chromosomes and available GISH data. For this purpose some markers of higher size (>2kb) have been selected Fig. 16 and attempts are made to probe them on chromosomes in various hybrids by FISH technique.

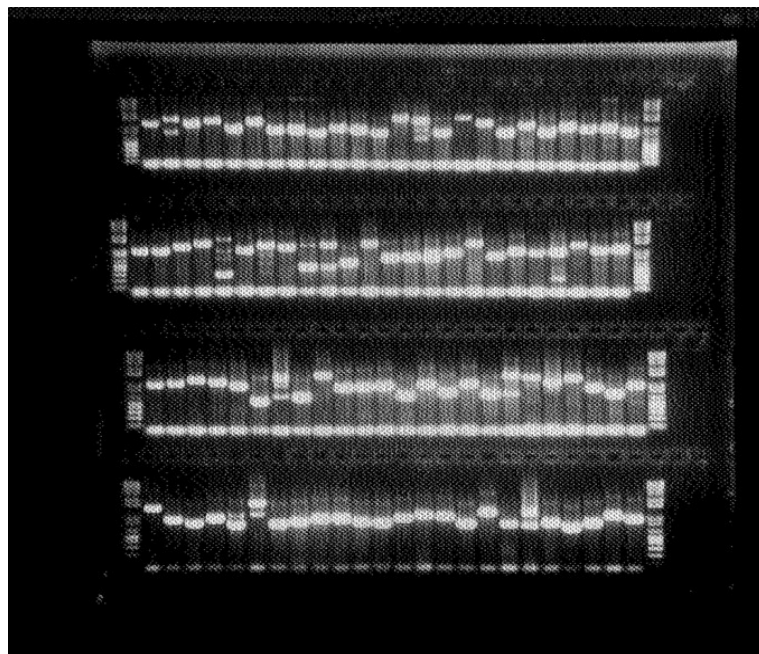


Fig. 15 Clones with DArT markers mapped on different linkage groups

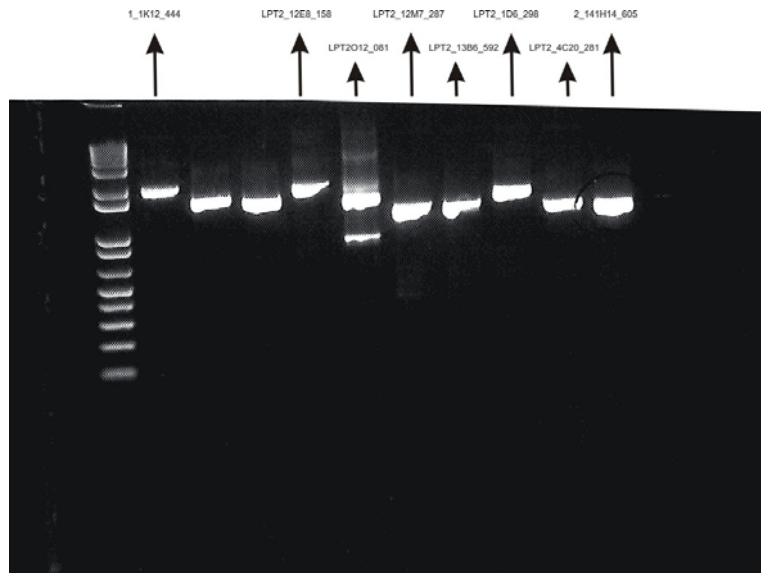


Fig. 16. DArT markers from various linkage groups selected to be probed on chromosomes by FISH

11.5 Soortkruisingen

Kruisingsprogramma 2007

Het beperkte programma van afgelopen heeft toch nog ruim 800 gekiemde embryo's opgeleverd, waarvan het merendeel OOA (321), OTOA (127) en TOA(87). Het grootste deel hiervan is inmiddels uitgeplant en zal naar verwachting in 2009 en 2010 op waarde te beoordelen zijn. In een eventueel vervolg project zou dit materiaal weer ingebracht kunnen worden.

Dit jaar zal de eerste TOA in bloei komen.

Uitgifte van materiaal

In de tunnel zijn ruim 1000 OA-hybriden ter bezichtiging opgeplant.

Daarnaast zijn ruim 80 nummers, geselecteerd in 2005, 2006 en 2007, vermeerderd en komen in aanmerking voor uitgifte na rooi in de herfst.

Discussie vervolg onderzoek

Een discussie over vervolgonderzoek is vorig jaar gestart, maar heeft nog niet geleid tot een onderzoeksvoorstel, omdat de bedrijven het nog niet eens zijn over de richting van het onderzoek. Er is wel een algemeen idee gelanceerd in een email van 17 maart jl. waarbij een basis voor de lelie genetica is voorgesteld (raamwerk moleculaire merkers t.b.v. alle commerciële leliehybriden). Hierbij wordt het idee gelanceerd om met codominante SSR en SNP merkers gebaseerd op genen (EST) te gaan werken. Met deze merkers kan een 'raamwerk' worden gebouwd waarmee gegevens vanuit de verschillende hybriden aan elkaar gekoppeld kunnen worden. Dit type merkers kunnen in een TTlgg-vervolgproject worden ontwikkeld. Ook nieuwe eigenschappen zoals bladluis- en aaltjes resistentie kunnen hieraan toegevoegd worden. Daarnaast kunnen FISH en GISH technieken worden gebruikt om de verschillende genomen (A, L, O, T) te onderscheiden en om resistentie merkers zichtbaar te maken op de chromosomen en moleculaire linkage groups te koppelen aan de individuele chromosomen. Tegelijkertijd kan het concept van "analytic breeding" verder uitgewerkt worden. Bij tulp is inmiddels een TTlgg-project gebaseerd op deze technieken gehonoreerd.

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

M. Nadeem Khan, Shujun Zhou, M.S. Ramanna, Paul Arens, Jeronimo Herrera, Richard G. F. Visser and Jaap M. Van Tuyl Analytic breeding in allopolyploids: An illustration from Longiflorum × Asiatic hybrid lilies (*Lilium*). Submitted to Euphytica.

Rodrigo Barba-Gonzalez, Ki-Byung Lim, Shujun Zhou, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2008. Interspecific hybridization in lily: the use of 2n gametes in interspecific lily hybrids. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition, Volume 5), Teixeira da Silva JA (Ed), Global Science Books, Isleworth, UK,138-145

Ki-Byung Lim, Rodrigo Barba-Gonzalez, Shujun Zhou, M. S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2008. Interspecific Hybridization In Lily (*Lilium*): Taxonomic And Commercial Aspects Of Using Species Hybrids In Breeding. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition, Volume 5), Teixeira da Silva JA (Ed), Global Science Books, Isleworth, UK, pp 146-151

Shujun Zhou, Rodrigo Barba-Gonzalez, Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna And Jaap M. Van Tuyl 2008. Interspecific hybridization in lily (*Lilium*): Interploidy crosses involving interspecific F₁ hybrids and their progenies. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition, Volume 5), Teixeira da Silva JA (Ed), Global Science Books, Isleworth, UK, pp 152-156.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).

Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.

Tussentijdse rapportage

1. Datum:	11-12-2008
2. Projecttitel:	Innovative molecular breeding techniques for resistance breeding in lily (Innovatieve merkertechneken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie)
3. Projectnummer PT:	12402
4. Intern projectnr:	3360100300
5. Projectleider:	Jaap M. van Tuyl
Adres:	Droevendaalse steeg 1, 6708 PB Wageningen
Tel:	0317 481085 0653362858
Fax:	0317 418094
Email:	Jaap.vantuyl@wur.nl
Website:	http://www.liliumbreeding.nl/project
6. Gewas: (indien van toepassing):	Lelie
7. Oorspronkelijke Looptijd project:	1-1-2006 – 31-12-2008
9. Periode waarover wordt gerapporteerd:	15-6-2008 – 31-12-2008
10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:	

Personele inzet 2008

PRI

P. Arens
 T. Bleijenberg
 A.W. van Heusden
 M.P.W. van Kaauwen
 M.N. Khan
 M.S. Ramanna
 A. Shahin
 A.A. van Silfhout
 B.C.E. van der Ven
 J.M. van Tuyl
 J.H. Vossen
 T.C.A.E. Wouters
 S. Xie

RDA

H.K. Rhee

Bedrijven

M. Ceulemans
 A. Vletter

De begeleidingscommissie van het project bestaat uit de volgende personen:

A. Peterse (voorzitter)
C.C. Anker (PT)
S. Bottema
M. Ceulemans
E. Hoogendijk
P.J. Kos
K. Laan
N. Meilland
H. Middelburg
R.C. Snijder
A. van der Velde
A. Vletter

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

11.1 General

For continuation of the project a proposal entitled “Bridging the genomes in lily: creating an EST mapping framework for introgression breeding” was submitted to TTIGG. The proposal was granted for a period of 4 years (1-1-2009 – 31-12-2012). Except 2 all the companies joined the new project. All marker data developed in this project will be incorporated in the mapping framework of the new project.

11.2 Disease testing

At PRI a *Fusarium* test was carried out with the LA- and a part of the AA-population. The LMoV test was also continued.

11.3 Marker analysis

Conversion of molecular markers linked to *Fusarium* and LMoV (Arwa Shahin)

11.3.1 Converting markers linked to LMoV resistance:

This resistance had been mapped previously on LG 20 of the AA population and the nearest marker is a NBS marker at 7.5 cM. Several attempts had been done previously to convert this NBS marker into a PCR marker but unfortunately this effort did not succeed. Another NBS marker (NBS-6MAA7) was found to be linked to LMoV resistance and it was scored in both populations (AA and LA). The susceptible plants of the LA populations do not have this marker, so it was suggested that NBS-6MAA7 is linked to LMoV resistance in the LA population although at this moment the virus resistance data is not finalized yet. In the LA population, two DArT markers (1-9C7-374 and 1_15D8_125) associate with this NBS marker in less than 1 cM (Fig.1).

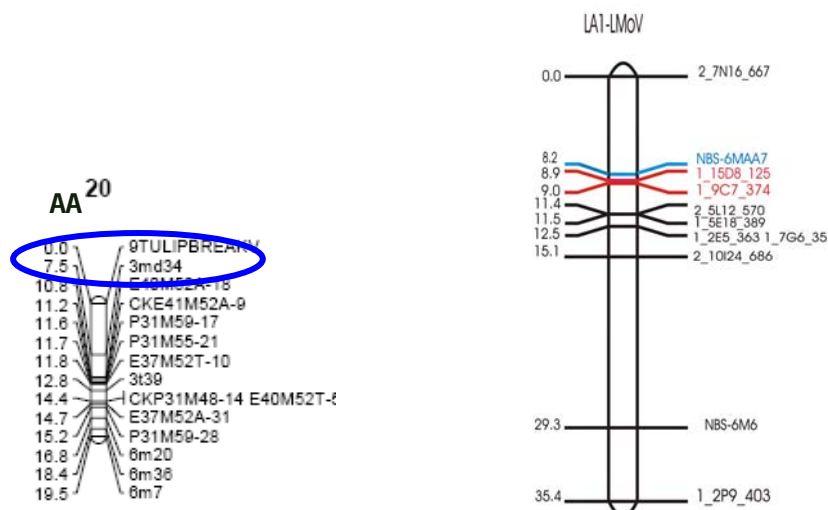


Fig. 1. The LGs that contains the NBS markers linked to LMoV resistance in AA and LA populations.

In the second half of 2008, we concentrated our work on converting these two DArT markers trying to find a PCR marker that can be used later on in MAS breeding, and by doing so we can have the marker in the LA population even before the disease test finishes.

9C7-374 DArT marker:

This colony passed several treatments up till its sequence could be retrieved (656pb):

GGCTTTATTGGTAAAATGTTCTAAGGCAGAGATATGGGATCGTGAGCTGTTGAATCCTTGGGCTCATCACACATGG
TCTGGGATAAAGAAAGAATTGAGCACATTGAAACATTAAGGGAGCATAAACTGTCCATCAAAGCAGGTTTCTCT
TGTCAGACAAAAGTAAGAGTTGTACAGGTGTCCATGGGCCAAATAAGAACAGGGAAAGAAAATATTTTTAAAAG
AGTTGCACGATATTTATGGTCTGTGGGACCTTCCATGGATCATTGGGGGAGACTTCAATACCATTAGACACACTGA
GGAGAAAACAGGAGCCTGGAAAATCAATAAAAGCATGATGAACTTCAACAAGATTATACAACATACTGCATTACA
AGAGCTGGAGATGAAGGGKGGGGGGGGGACTCCACTTGGATAAACAAAGATCCAACCCTATTCTATGCAAACCTG
GACAGGTCTTTATAATGAGTCTATGGCGAACAAATTGGCCAGAGTAGAATGCCTGTGTTGCCAAAATCACATCA
GATCACAACCCAAATACTTGTGCGAAGGATAGAAAAACATCAAAGAAAACATCCATTGAGAACGTTCTCTCAT
GGTTTCTTAACCCTGGAATTGACAGTAAATGGAACCATGGTGAAATCATGTTCAAAGCTCTGG

Based on this sequence, a primer combination was designed and tested in the three parents. This combination generated bands in all three parents (Fig. 2).

TBV-9C7-F4	AGCACATTGAAACATTAAGGGAGCATA
TBV-9C7-R4	GATTTTGGGCAACACAGGCATTCTACT



Fig. 2. The amplification of F4R4 for the three parents at Tm= 55.

Therefore, we sequenced the fragments of the three parents trying to find some SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) that can be used in designing primers specific for the resistant parent CK that can also distinguish the two alleles of this cultivar. By comparing the sequence of 9C7 as a DArT marker with the sequence of this fragment in CK, Or and WF we can conclude that:

- CK has two alleles
- Or has two alleles
- WF has one which is different from CK and Or alleles.

For that, specific primers combinations were designed according to the sequence of the DArT marker.

CK-9C7-F1	AAAGAGTTGCACGATATTTATGGTCTGTAG
CK-9C7-R1	CTCATTATAAGGACCCTGTCCAGTTTGCAT
CK-9C7-R2	CTCATTATAAGGACCCTGTCCAGTTTGC
CK-9C7-F2	AGAGTTGCACGATATTTATGGTCTGAGG

These primer combinations (F1R1, F1R2, F2R1 and F2R2) were tested in CK, Or and White Fox. The combination CK-9C7-F1 & CK-9C7-R1 gives

polymorphic segregation in LA population. The segregation pattern is similar to the once of the DArT marker except 3 differences. So, out of 96 offspring 93 have the same pattern of segregation. However, we should say here that, some faint bands appeared which might be the other allele or a repetitive DNA. For that, we should try to improve the condition of this PCR reaction either by producing more mismatch in the primer trying to make it more specific or by making the reaction conditions more specific (e.g. using Hot start polymerase or a higher annealing temperature).

1_15D8_125 DArT markers:

We couldn't sequence this colony (maybe due to contamination reasons), another attempt will carry on later to deal with this challenge if needed.

Conclusion:

The resistance to LMoV has been found to be monogenetic, so by finding the correct marker that is linked to this resistance we will be able to use it directly for breeding aspects.

The two DArT markers that we have right now are in repulsion phase. They have exactly the opposite pattern of segregation in the LA population (Table.1). Conversion of one of these two will be enough. To confirm our result, we should wait until the LMoV test of LA population finishes and compare it with the segregation pattern of these two DArT marker.

LA pop	06001	06001	06001	06001	06001	06001	06001	16001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	6001	
Converted_9C7	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	
LPT2_9C7_374	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	X	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
LPT2_15D8_125	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	

Table 1. The segregation pattern of the: converted 9C7, 9C7 DArT and 15D8 DArT respectively.

11.3.2 Converting *Fusarium* QTLs

11.3.2.1 First QTL

During the first half of 2008, the work was focused on converting three DArTs markers related to the most significant QTL for *Fusarium* resistance which is located on linkage group 4 of the AA population (map 2006; Fig.3). The three DArT markers CKPstTaq_73, CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 were localized within this QTL and by comparing the AA with the LA genetic map

we can find that CKPstTaq_73 DArT is a common marker between the two populations which localized on LG7 of the LA genetic map.

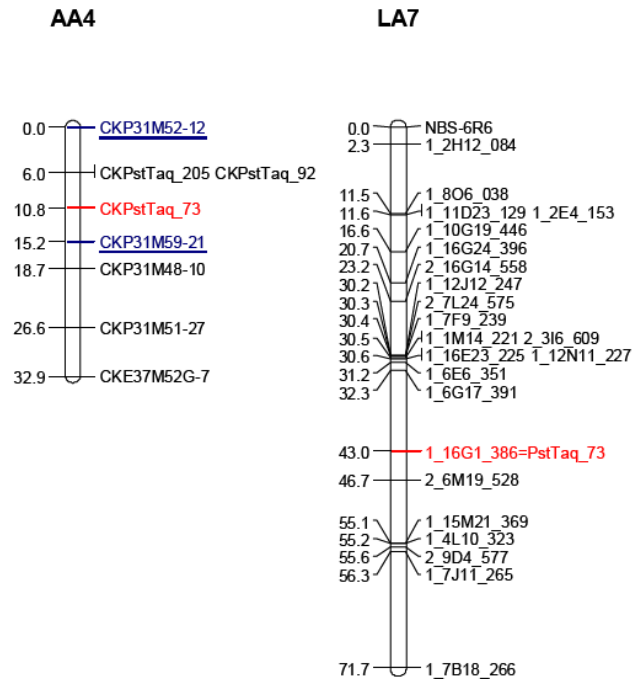


Fig 3. LG4 and LG7 of AA and LA population respectively.

In the first part of this year we successfully converted the CKPstTaq_205 DArT marker for use in both the AA and LA populations. Compared to the original DArT marker data it gave exactly the same pattern of segregation in the AA population and few differences in the LA population. Additionally, the CKPstTaq_92 DArT marker could be converted for use in the LA population but also showed a few differences (9 out of 96) compared to the DArT marker scores of CKPstTaq_73 in the LA population. However, these differences can be explained by the fact that we compare their segregation with the segregation of the CKPstTaq_73 DArT marker which was the only marker of these three in the LA population. In the AA population, there is around 5 cM between the CKPstTaq_73 DArT marker and the other two DArT markers. So, we expected to have the same distance in LA population and that explain the few differences between the segregation of the converted CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 with the segregation of the CKPstTaq_73 DArT in the LA population. In the table 2, we can see that CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 have the same segregation pattern in the AA population which is exactly the same as the one of the converted marker in this population. While CKPstTaq_73 show some differences which illustrate the 5 cM distance between them on the AA genetic map.

nerker	PstTaq_73	PstTaq_92	PstTaq_205	clone3 PCR
91338-1	0	0	0	0
91338-100	0	0	0	0
91338-11	0	0	0	0
91338-12	1	X	X	1
91338-13	0	0	0	0
91338-18	1	1	1	1
91338-19	1	1	1	1
91338-20	1	1	1	1
91338-21	0	0	0	0
91338-22	1	0	0	0
91338-23	1	1	1	1
91338-24	0	0	X	0
91338-25	1	X	X	1
91338-26	1	1	1	1
91338-27	1	1	1	1
91338-3	1	1	1	1
91338-30	1	1	1	1
91338-31	1	1	1	1
91338-32	0	0	0	0
91338-33	1	0	0	0
91338-34	1	1	1	1
91338-35	0	0	0	0
91338-36	1	1	1	1
91338-37	0	0	0	0
91338-38	1	1	1	1
91338-39	0	0	0	0
91338-4	0	0	0	0
91338-42	0	0	0	0
91338-43	0	0	0	0
91338-45	0	0	0	0
91338-46	0	0	X	0
91338-47	1	1	1	1
91338-48	0	1	1	1

Table 2. The segregation of CKPstTaq_73, CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 compared with the converted CKPstTaq_205 (clone 3) marker in the AA population.

Continued work with CKPstTaq_73:

As we do not know the exact position of the QTL locus between the three DArT markers and want to have as many closely linked markers as possible for this important QTL locus (e.g. markers on both sides), we continued our effort to convert CKPstTaq_73. Two primer combinations (F1R1 and F2R2) showed promising results in the three parents. No amplification was found for WF whereas a band was found in CK and Or (Fig.4).

name primer (max 20 char)	sequence (in 5'----> 3' order)
CKPstTaq_73_1B23_R_3	TTTCAGGGATTGCTTTATTATTGT
CKPstTaq_73_1B23_F_1	TATGTTTATTGACGGCGACCAG
CKPstTaq_73_1B23_R_1	AAGTTTTCCGTAAGTTTGACCTCT
CKPstTaq_73_1B23_F_2	TGCCCTCATCTTTCAACATCA
CKPstTaq_73_1B23_R_2	TTTTCAAATACGGCAAGTCCA

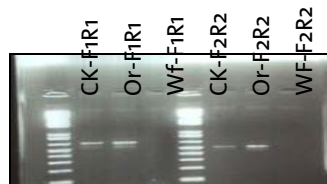


Fig.4. F1R1 and F2R2 in the three parents.

The sequences of CK and Or in addition to the sequence of the DArT marker were compared. Since CK and Or have the same two alleles, specific primers were designed (according to the sequence of DArT marker that presents the allele linked to resistance) trying to amplify the DArT marker allele only. By doing so, the progenies that have the resistance allele will amplify a band while it will be absent in the susceptible progenies that have the second allele of CK.

CK-1B23-F1	GAATGCCGAAAGAAATTTATGTGCTTAGG
CK-1B23-F2	TGCTTACGTTGCCGCAATAGGAA
CK-1B23-F3	AACCTTGCTTTACGGTCCCACCTTGC
CK-1B23-F4	TGCTTTCACGGTCCCACCTTGC
CK-1B23-R1	GTTTCGGTTGGGACATTTCGGAAGG
CK-1B23-R2	GTTTTATGTTTATTCTCGGACCGTTACGC

By using the combination (CKPstTaq_73_1B23_R with CK-1B23-F2), we can find segregation in the LA population. The segregation pattern is not exactly the same as the segregation pattern of the DArT marker. We still

find some differences (7/96 different), so some more effort will be done to solve this point.

Type	Genotype	converted- 92	converted- 205	Converted-73	DArT -73
LA	006001-1	0	0	0	0
LA	006001-2	1	1	1	1
LA	006001-3	0	0	0	0
LA	006001-4	1	1	1	1
LA	006001-5	1	1	1	
LA	006001-6	1	1	1	1
LA	006001-7	1	1	1	1
LA	006001-8	1	1	1	
LA	006001-9	0	1	0	
LA	006001-10	0	0	0	0
LA	006001-12	1	1	1	1
LA	006001-13	0	0	0	0
LA	006001-14	0	0	0	0
LA	006001-15	0	0	0	0
LA	006001-16	1	1	1	1
LA	006001-17	0	0	0	0
LA	006001-18	1	1	1	1
LA	006001-20	0	0	0	1
LA	006001-21	0	0	0	1
LA	006001-22	0	0	0	0
LA	006001-23	0	0	0	0
LA	006001-24	0	0	1	1
LA	006001-30	0	0	0	0
LA	006001-31	1	1	0	0
LA	006001-32	0	0	0	0
LA	006001-33	1	1	0	1
LA	006001-34	0	0	0	0
LA	006001-35	1	1	1	1
LA	006001-36	0	0	0	0
LA	006001-37	1	1	0	0
LA	006001-38	0	0	0	0
LA	006001-39	1	1	1	1
LA	006001-40	0	0	0	0

Table 3. The segregation of the converted CKPstTaq_73, CKPstTaq_92 and CKPstTaq_205 compared with the segregation of DArT CKPstTaq_73 marker.

11.3.2.2. Second QTL of *Fusarium* resistance

The second QTL of *Fusarium* resistance in Lily has been located on the 7th linkage group of the AA population between two AFLP markers and one DArT marker (CKPstTaq_116) located within this QTL. Comparing data from AA with LA genetic maps shows that two other DArT markers associated with CKPstTaq_116 on Linkage group 11 in the LA genetic map which are: 1_13K8_453 and 1_7A18_354 (Fig.5). These three were sequenced.

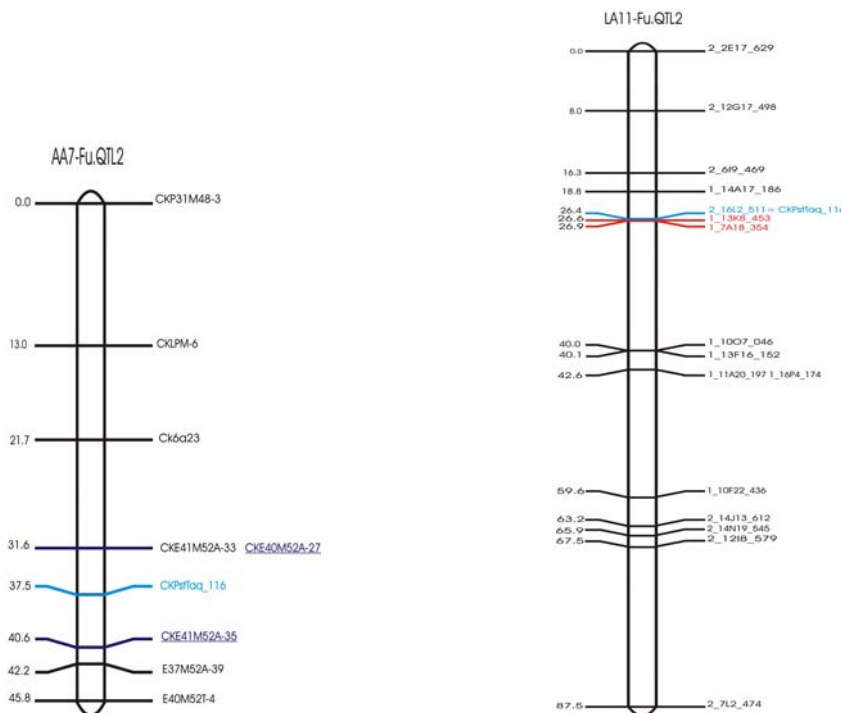


Fig. 5. LG 7 of AA population compared with LG11 of LA population.

The sequence data showed that the three DArT markers have the same sequence except for one SNP which we think is related to the PCR reaction that has been carried out when DArT markers were produced, additionally all three markers have the same segregation pattern (table.4). For that one primer combination was designed:

Fu-QTL2-F	TTGGACCCCTGTAACATAAC
Fu-QTL2-R	GCACGGCTCAAACATAAA

Dart of QTLs	006001-22	006001-23	006001-24	006001-30	006001-31	006001-32	006001-33	006001-34	006001-35	006001-36	006001-37	006001-38	006001-39
16L2_511	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	X	
7A18_354	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	
13K8_453	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	

Table 4: The segregation pattern of 16L2, 7A18 and 13K8 in LA population.

Since this primer combination amplified monomorphic bands in the LA population (Fig. 6), the bands of CK and WF were sequenced. The sequence data showed that CK is homo and WF is heterozygote. Trying to find differences between the two alleles of CK and the other parent WF, we applied a genome walking approach.

Genome walking

The goal here is to walk outside the fragment from both sides trying to find additional sequence data and going over the PstI restriction site (The restriction enzyme used in early steps to produce the DArT library, Fig 6). For this restriction enzymes are used that make cuts at different places compared to PstI. We expect to find differences in the additional sequence of the three parents at the PstI site.

According to the Genome Walking protocol we applied three PCR reactions using an adaptor primer on one side, (adaptor ligated to restriction enzyme fragments of genomic DNA) and three consecutively used primers specific for the DArT sequence on the other side (Fig. 6).

Preparing Genomic DNA Library for CK:

By using 4 different blunt enzymes which are:

- DraI: TTT/AAA
- EcoRV: GAT/ATC
- SspI: AAT/ATT
- SmaI: CCC/GGG

Restriction/Ligation reaction was applied, incubated at 37°C for 6 hrs, then stored at -20 °C. Three PCR reactions were run using the nested primers which mentioned in the table.5.

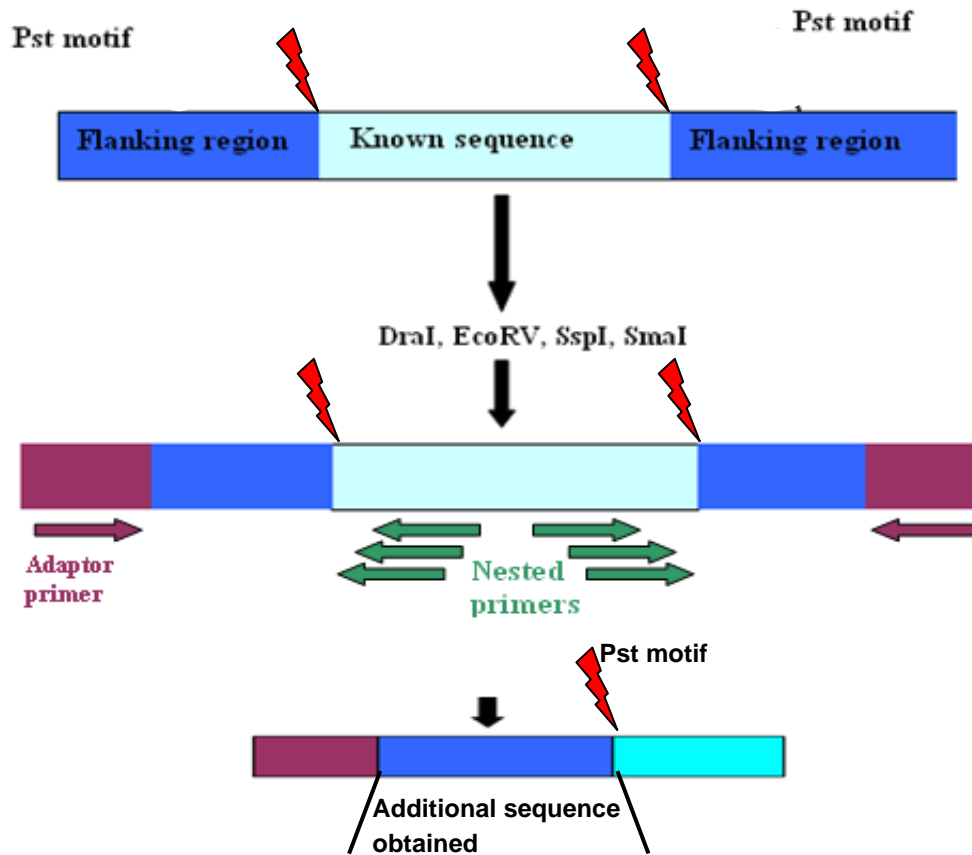
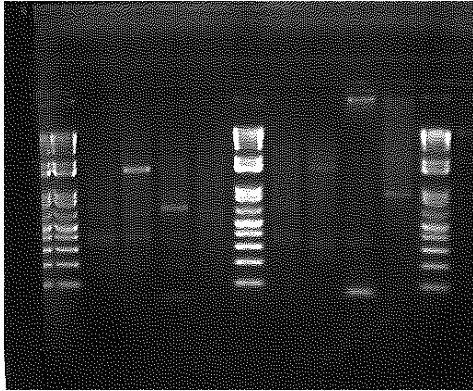


Fig. 6. Steps in the genome walking.

» Name	Length	Tm	GC	Sequence
» adapter-Pr1	25	56.5 °C	44.0 %	GTTTACTCGATTCTCAACCCGAAAG
adapter-Pr2	26	57.7 °C	42.3 %	GTTTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA
Nested-13K8(490)-F1	28	57.8 °C	35.7 %	TCATAGGTTTGCAGTTTTATGCTGAAGT
» Nested-13K8(634)-F2	25	56.1 °C	44.0 %	GCCGTGCTATTGTAATGTTTGAGAG
» Nested-13K8(757)-F3	25	58.8 °C	44.0 %	TCAATCTGCAATTACGGCTGTCACT
» Nested-16L2(376)-R1	28	59.3 °C	39.3 %	CATTGTATTGTTAGCTTTTGGGCATAGG
Nested-16L2(150)-R2	29	56.8 °C	27.6 %	CAAGAAATTGGTATTCAAAATAACAATGG
Nested-16L2(123)-R3	29	57.8 °C	24.1 %	ACAATGGCATTTAATTGAAAATTTTCACT

Table 5. The nested forward and reverse primers.

The resulted band patterns were not specific enough (Fig.7), therefore single specific bands were isolated, cleaned and then sent to be sequenced.



DraI Nested-F1	EcoRV Nested-F1	SmaI Nested-F1	SspI Nested-F1
DraI Nested R1	EcoRV Nested R1	SmaI Nested R1	SspI Nested R1

Fig. 7. The resulted bands of the three PCR reactions

We obtained around 150 bp more from the reverse direction. Next, new reverse primers were designed and used with the nested-R1 primer to amplify the same fragment in all three parents and these fragments were then sequenced. By doing so, we have the additional 150 bp in Or and WF as well as in CK. Comparing these sequences, we could be able to find some differences in that part between the three parents. We designed specific primers for CK in that part and we hope by using these new primers that they will differentiate between the two alleles of CK and are specific for CK and do not amplify in Or and WF as well, to have a segregation which look like the segregation of original DArT marker.

11.4 Cytogenetic analysis of LA- and OA-progenies

Summary PhD-thesis Nadeem Khan: A molecular cytogenetic study of intergenomic recombination and introgression of chromosomal segments in lilies (*Lilium*).

Chapter 1 **Introduction.**

This chapter includes general introduction about lilies, their classification, introgression breeding, molecular cytogenetic studies, introgression breeding and ploidy manipulation and innovative molecular breeding techniques i.e., molecular and physical mapping of *Lilium* genome.

Chapter 2 **Production of haploid (*n*) gametes in Longiflorum × Asiatic hybrid lilies (*Lilium*) and their application in introgression breeding.** (*Published online in Euphytica*)

This chapter includes the data from LA BC1 diploids. Here F1 Longiflorum × Asiatic (LA) hybrids were backcrossed with Asiatic parents to get BC1 population. Genomic *in situ* hybridization (GISH) was performed to study the intergenomic recombination, the amount of introgression and karyotype composition. A total of 28 BC1 progeny plants were analysed cytogenetically. Based on these findings the prospects of analytic breeding in allopolyploids have been discussed.

Chapter 3 **Construction of chromosomal recombination maps of three genomes of lilies (*Lilium*) based on GISH analysis** (Accepted for publication in Genome)

In this chapter chromosomal recombination maps were constructed for three genomes of lily (*Lilium*) using GISH analyses. For this purpose, the backcross (BC) progenies of two diploid ($2n=2x=24$) interspecific hybrids of

lily, viz., Longiflorum × Asiatic (LA) and Oriental × Asiatic (OA) were used. The potential significance of these cytological maps as prerequisite for developing molecular cytogenetic maps and their usefulness in breeding is discussed.

Chapter 4 Relevance of unilateral and bilateral sexual polyploidization in relation to intergenomic recombination and introgression in *Lilium* species hybrids.

This chapter details the analysis of BC plants in different interspecific (LA and OA) hybrids in lilies. Sexual polyploids were induced in diploid ($2n = 2x = 24$) interspecific F1 hybrids of Longiflorum × Asiatic (LA) and Oriental × Asiatic (OA) *Lilium* hybrids by backcrossing to Asiatic parents as well as by sib-mating of the F1 LA hybrids. The BC1 progenies were triploid, with few exceptions and the progenies from sib-mating were tetraploid or near tetraploids. Genomic *in situ* hybridization (GISH) was applied to assess the intergenomic recombination in the BC1 populations of LA and OA hybrids obtained after unilateral sexual polyploidization (Fig. 8) In case of LA hybrids, LA × AA and reciprocal (AA × LA) crosses a total of 62 plants were analyzed. These plants originated from the formation of $2n$ gametes either as $2n$ eggs or $2n$ pollen. Similarly 52 plants from BC1 populations of OA hybrids were also analyzed. Most of these BC1 OA hybrids comprised of triploid plants which originated through functional $2n$ pollen from the diploid OA hybrid genotype (952400-1). In both type of crosses, a majority of the progenies had originated through the First Division Restitution (FDR) mechanism of functional $2n$ gamete formation either with or without a cross over. However, there were 9 genotypes in LA × AA and its reciprocal cross where Indeterminate Meiotic Restitution (IMR) was the mechanism of $2n$ gamete formation. Similarly 4 genotypes were found in OA hybrids which originated

from IMR $2n$ gametes. Based on GISH analyses the total amount of introgression of the Longiflorum and Oriental genomes into the Asiatic genome was determined. Most of the LA hybrids exhibited recombination and the amount of recombination was higher in LA hybrids as compared to OA hybrids. Intergenomic recombination was also estimated in the progeny of sib-mated LA hybrids. In this case both parents had contributed gametes with the somatic number of chromosomes (i.e., $2n-2n$). This population consisted of 23 plants and originated through bilateral sexual polyploidization. GISH analysis was applied on 16 plants of this population. Based on these results the nature of interspecific lily hybrids obtained from uni- and bilateral sexual polyploidization leading to allotriploid and allotetraploid formation in interspecific lily hybrids is discussed in the context of introgression and mapping.

Chapter 5. Genetic mapping of F1 LA hybrids using Diversity Arrays Technology (DArT) and integration of genetic maps with physical maps using FISH

This chapter reports Diversity Array Technology (DArT) and the development of molecular linkage maps in LA population based on DArT markers. A total of 382 DArT markers have been mapped on 14 linkage groups spanning 1327 cM. As a result, a large number of these DArT markers with a range of size are available to map on certain chromosomes in interspecific *Lilium* hybrids with FISH. This approach was not successful yet.

Chapter 6. General discussion

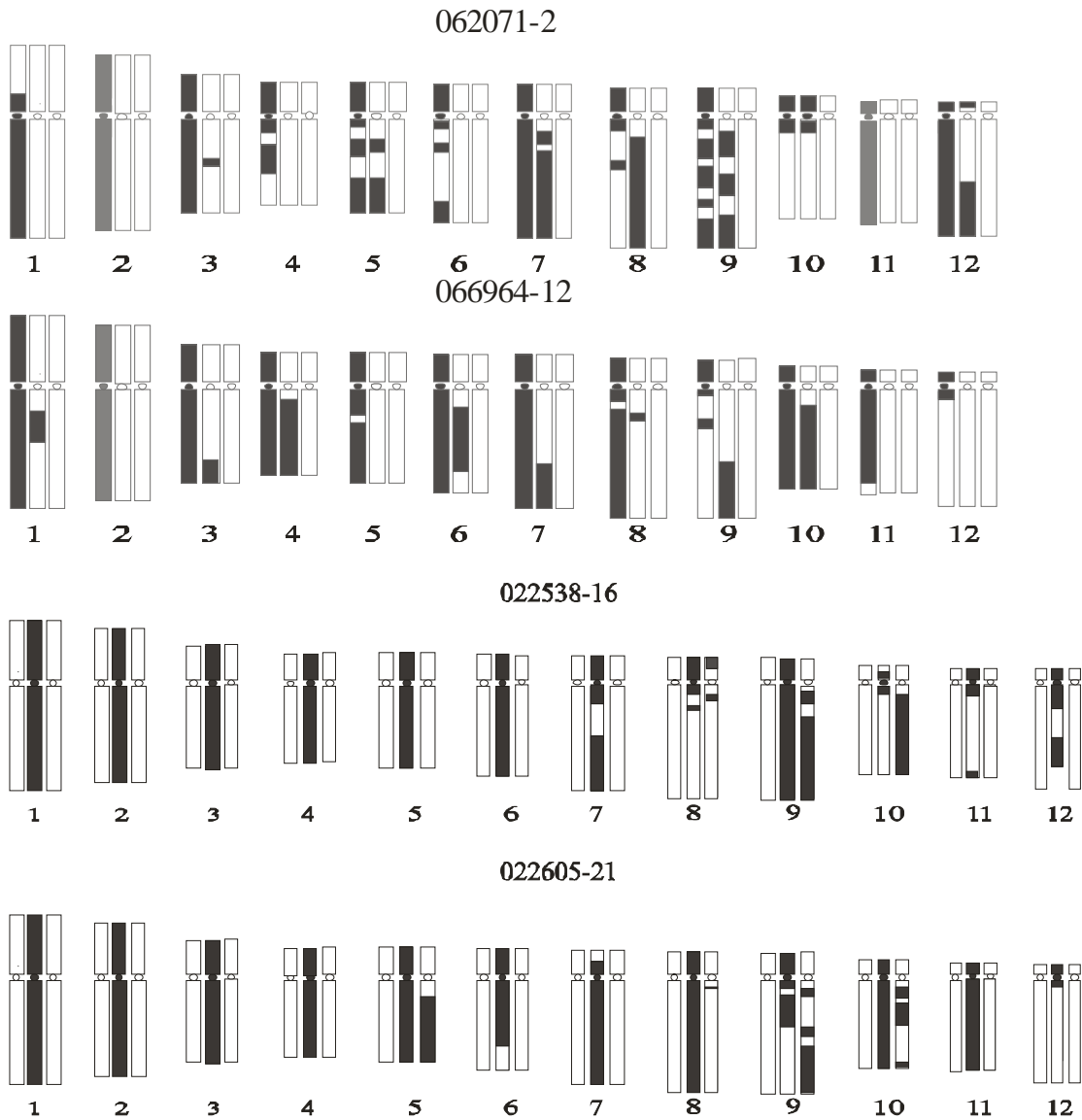


Fig. 8. Karyotype analysis of BC1 LA (062071-2, 066994-12) and OA (022538-16, 022650-21). The black colour represents the L- and O- genomes in both types of crosses while white colour is for A- genome.

11.5 Soortkruisingen

Uitgifte van materiaal

Gedurende het onderzoek is het materiaal ontwikkeld tijdens het project steeds ter bezichtiging opgeplant. Er volgt nog een nasleep van de kruisingen uit 2006 en 2007. Dit zal in het nieuwe project verder gevolgd kunnen worden. Op basis van selecties gemaakt in 2005, 2006 en 2007 zal er in op 18 december na afloop van de vergadering voor alle bedrijven een pakket met materiaal klaar staan met die nummers waarvan voldoende materiaal beschikbaar is gekomen (Tabel 8). Een deel van het materiaal zal ook in het nieuwe project ingezet gaan worden.

Vervolg onderzoek

Het idee om met codominante SNP merkers gebaseerd op genen (EST) te gaan werken is uitgewerkt in een 4-jarig TTIGG voorstel (Bridging the genomes in lily: creating an EST mapping framework for introgression breeding). Er zal een raamwerk van moleculaire merkers worden gebouwd op basis van gensequenties t.b.v. alle commerciële leliehybriden. In eerste instantie zullen virus (LSV en LMoV) en bladluis resistentie in een groot aantal genotypen bestudeerd worden. Alle leliegroepen zullen hierbij vertegenwoordigd zijn.

Tabel 8. Uitgifte OA-materiaal, december 2008.

Group	Cross	Female	Male	# bollen
A OA	002526-5	001099	952400-1	1
OA A	012066-1	991106	011040	1
OA A	022203-1	952400-1	021039	5
OA OA	022224-4+5	991110	991357	6
OA OA	022226-2	991112	991357	1
OA OA	022255-7	991110	991357	2
OAA A	022335-2	002122-3	021039	2
A OA	032065-1	031040	012304-5	1
A OA	032095-3	011090	012304-11	1
A OA	032096-2	011094	012304-12	1
A OA	032185-12	031040	012304-6	13
A OA	032185-8	031040	012304-6	1
A OA	032185-9	031040	012304-6	1
A OA	032191-2	031028	012304-12	3
A OA	032263-1-1	031028	012181-12	3
A OA	032263-2	031028	012181-12	1
A OA	032263-4	031028	012181-12	3
A OA	032264-1	021039	012181-12	2
A OA	032264-6	021039	012181-12	2
A OA	032265-1	021040	012181-12	2
A OA	032265-2	021040	012181-12	3
A OA	032354-10	031042	012304-24	2
A OA	032354-4	031042	012304-24	1
A OA	032476-2	980072	012304-18	1
A OA	032601-1	031028	962119-1	2
AOA OA	032969-2	002531-11	012305	7
AOA OA	032971-5	002531-12	014076	1
AOA OA	032971-6-1	002531-12	014076	1
AOA OA	032971-9-1	002531-12	014076	3
AOA OA	032973-1	002536-1	012304	2
OA OA	036505-1	991435	014076	4
OA OA	042071-1	991104	981020	1
AOA OA	042109-1	002147-56	981013	6
O OA	042131-2	041031	012304	1
AOA OA	042157-1	014090	991103	1
AOA OA	042667-2	022538-4	951502-1	3
AOA OA	042790-1	022554-2	951584-1	1
AOA OA	042887-1	022229-2	951502-1	3
AOA OA	042893	022229-47	951502-1	2
AOA OA	042893-1	022229-47	951502-1	1

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

12.1 Publicaties:

M. Nadeem Khan¹, Shujun Zhou, M.S. Ramanna¹, Paul Arens¹, Jeronimo Herrera¹, Richard G. F. Visser¹ and Jaap M. Van Tuyl¹, 2008 Analytic breeding in allopolyploids: An illustration from Longiflorum x Asiatic hybrid lilies (*Lilium*). Euphytica accepted, online

Arwa Shahin, Paul Arens, Martijn Van Kaauwen, Sjaak Van Heusden, M. S. Ramanna And Jaap M.van Tuyl 2008. Molecular cytogenetic approach for transferring genes of Fusarium resistance in lily. Plant breeding research day 2008

M. Nadeem Khan, Rodrigo Barba-Gonzalez, M. S. Ramanna, Richard G. F. Visser And Jaap M. Van Tuyl 2008. Construction of chromosomal recombination maps of three genomes of lilies (*Lilium*) based on GISH analysis. Genome accepted.

12.2 Materiaal: zie Tabel 8.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Nee

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).

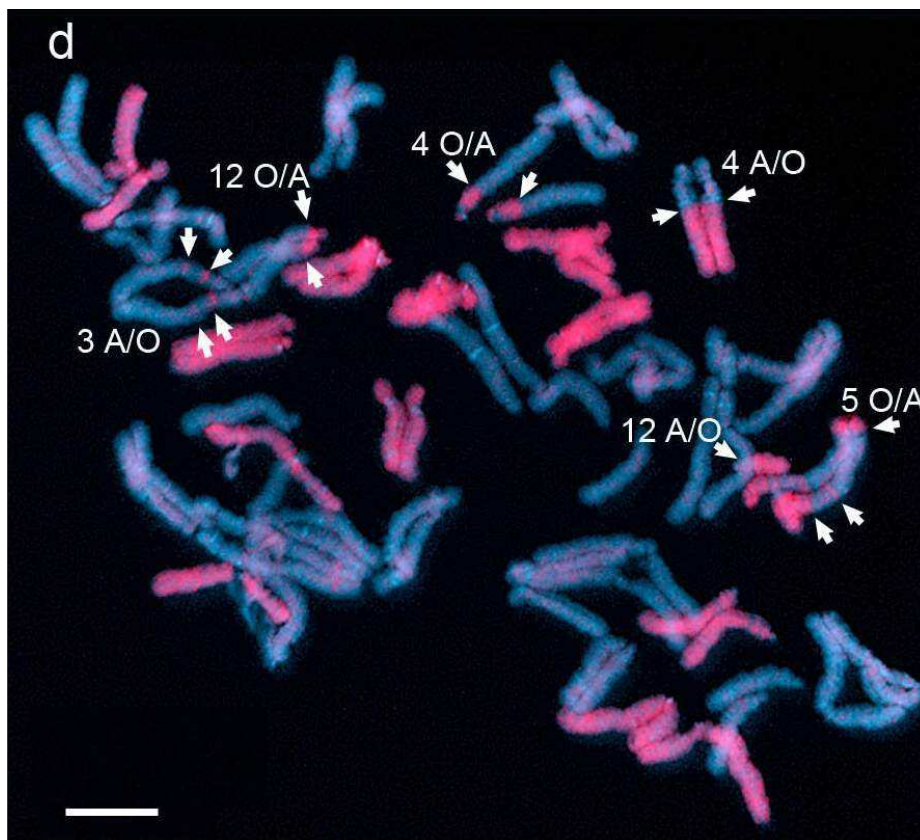
Opmerkingen van de onderzoekscoördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.



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

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-profyling 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.

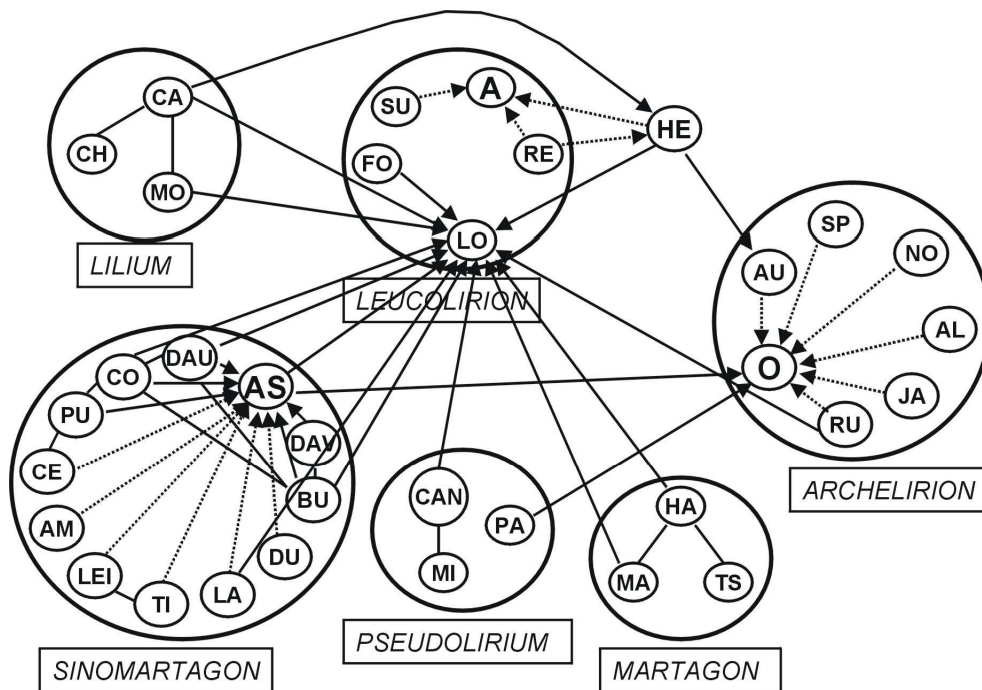


Fig.1. Een kruisingsveelhoek van het geslacht *Lilium*.

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 vervolgprogramma'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-hybriden, 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 Aziat 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

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

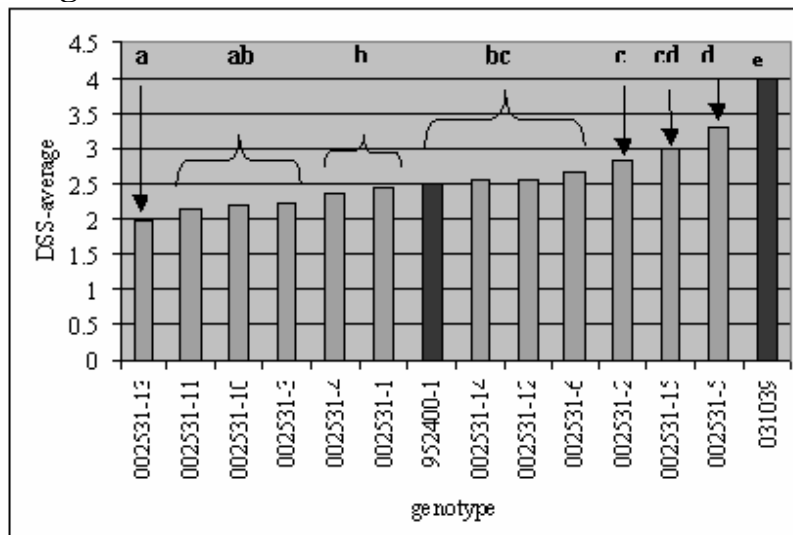
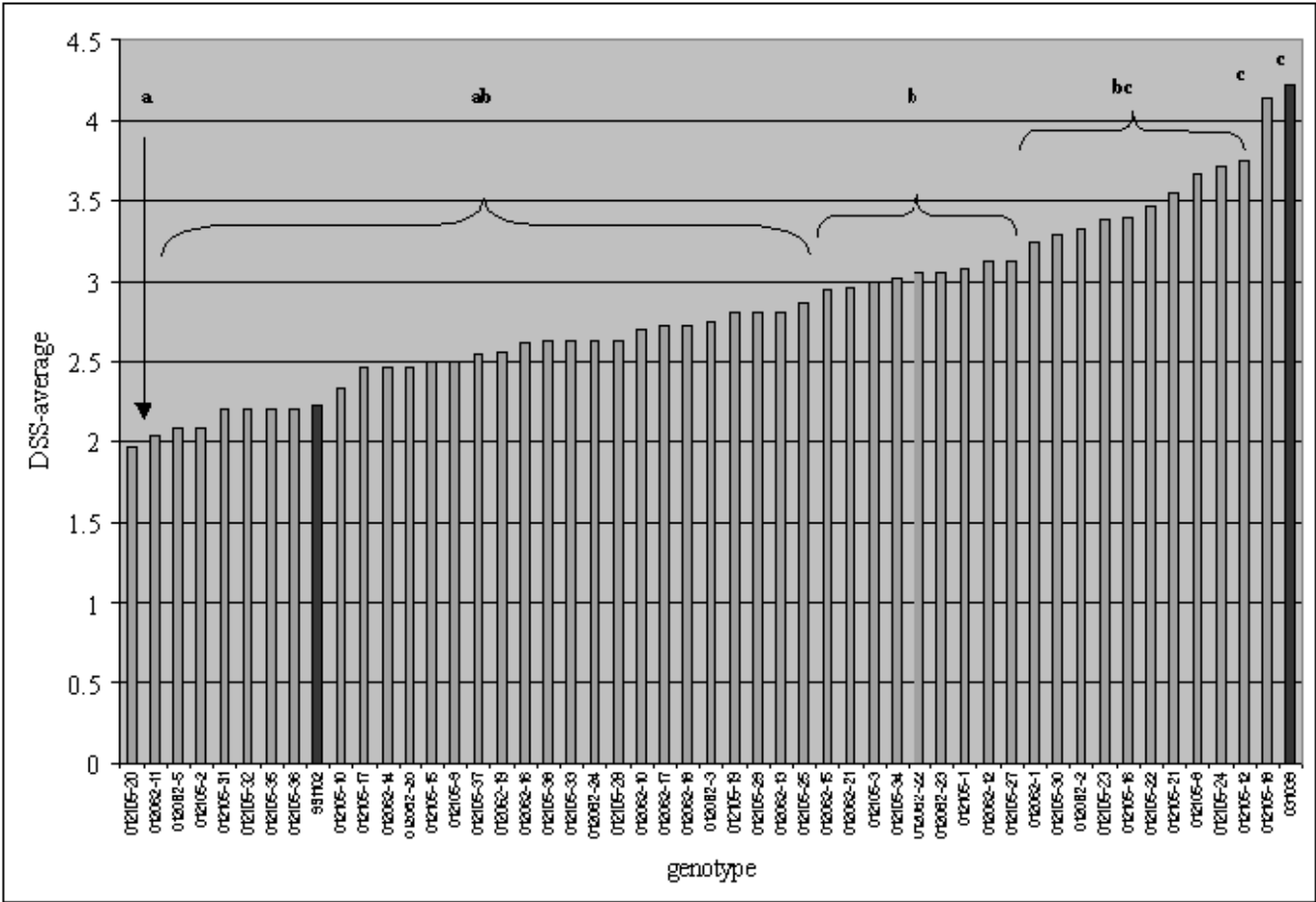


Fig. 3. Botrytis resistentie in een mitotisch verkregen OAA-populatie (951301-5 x Gironde). Zwarte balken: ouders; grijze balken: diverse nakomelingen.

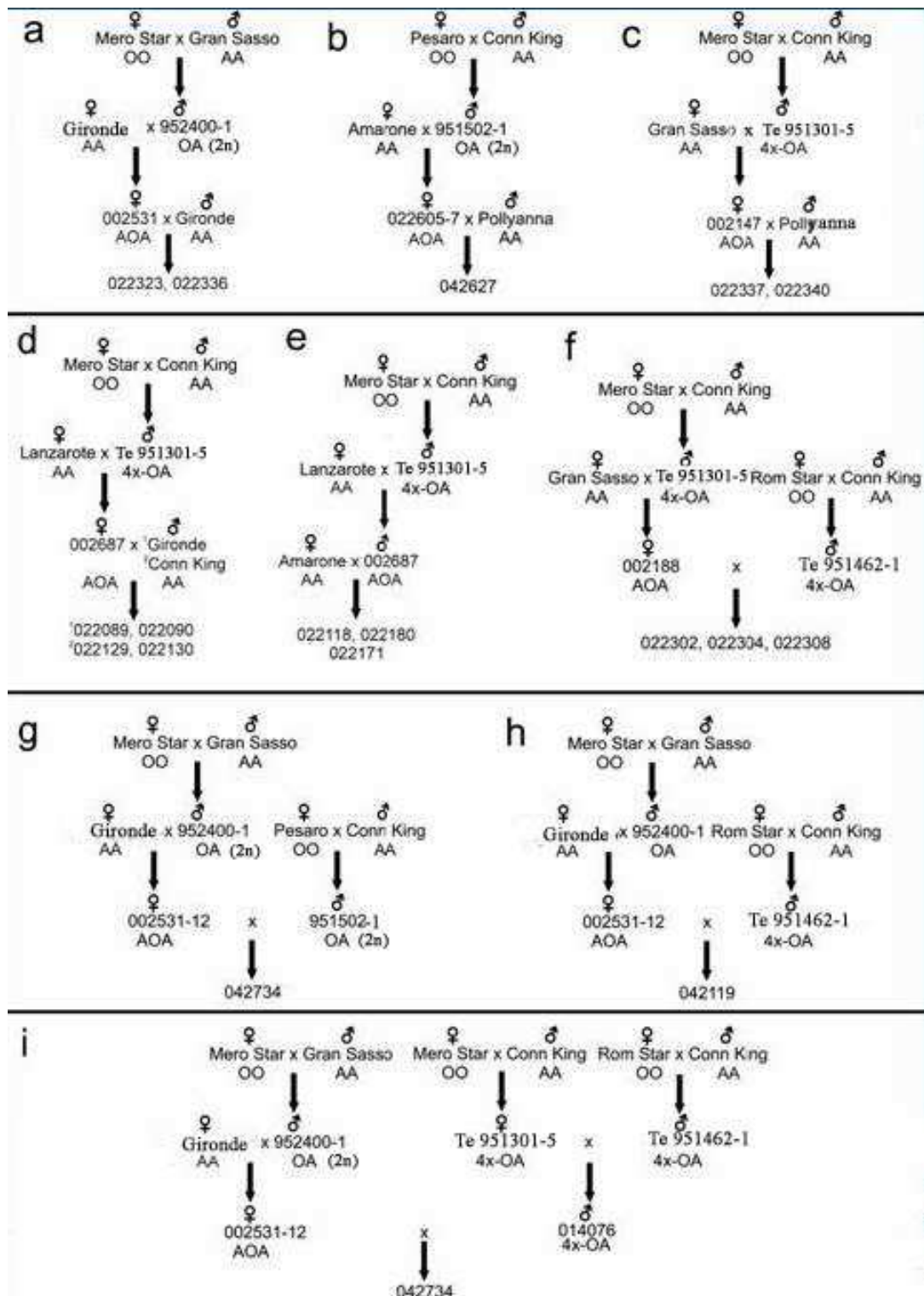


4.4. OA-vervolgkruisingen

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).

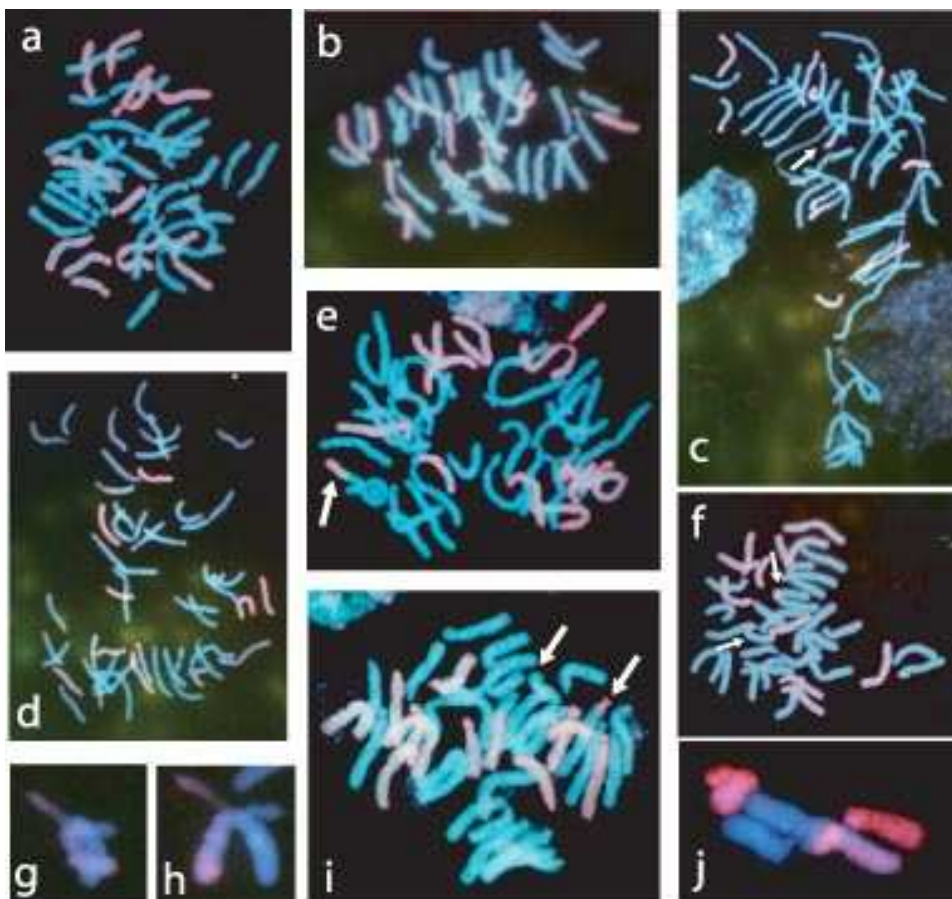


Fig. 6. De BC1-populatie 022538/022605 Amarone x 951502-1, waarin een grote uitsplitsing in bloemkleur waarneembaar is.

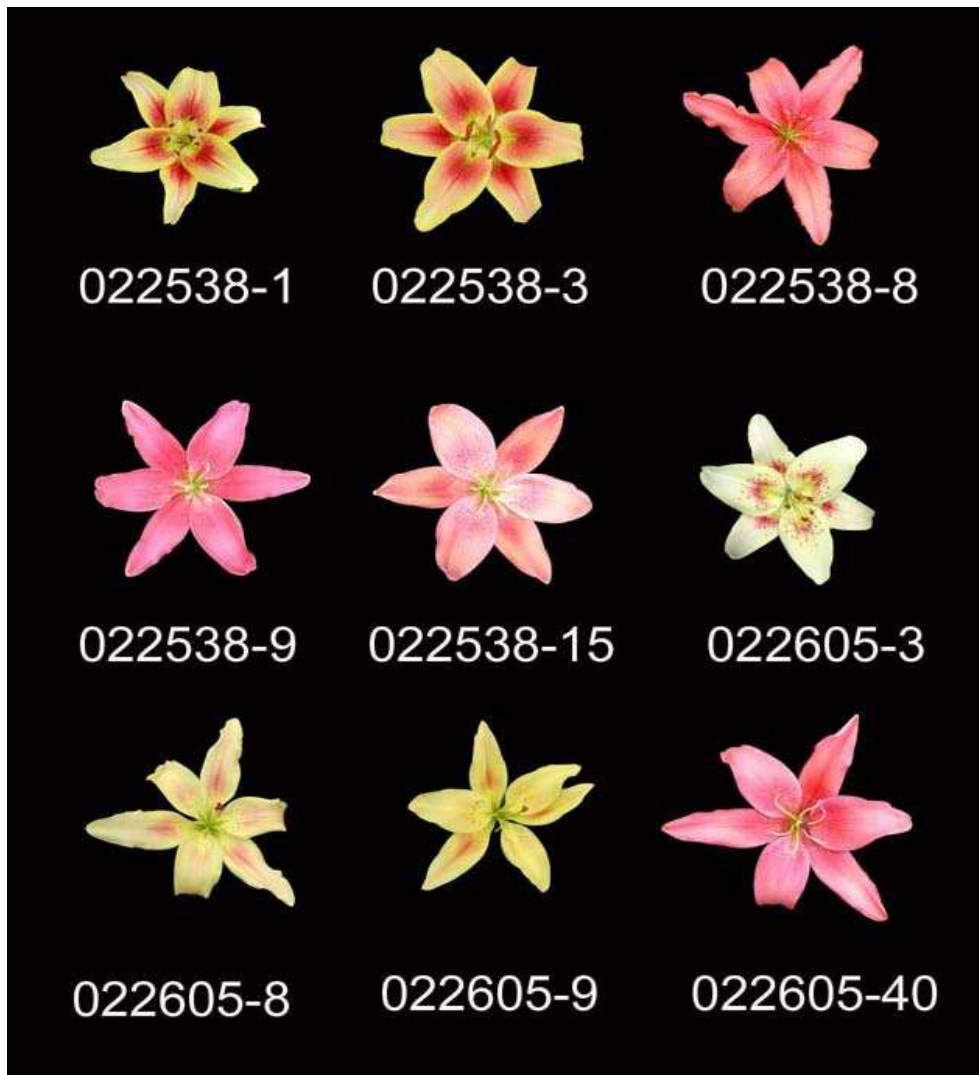


Fig. 7. Ideogrammen van 5 BC1-nakomelingen, waarin zichtbaar de recombinante chromosomen en de 45S- rDNA-banden. De reciproke en niet-reciproque producten van recombinante chromosomen zijn aangegeven met RP en NRP. Zuster centromeren zijn aangegeven met SC (dit duidt op het IMR-mechanisme). Wit is Aziat,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

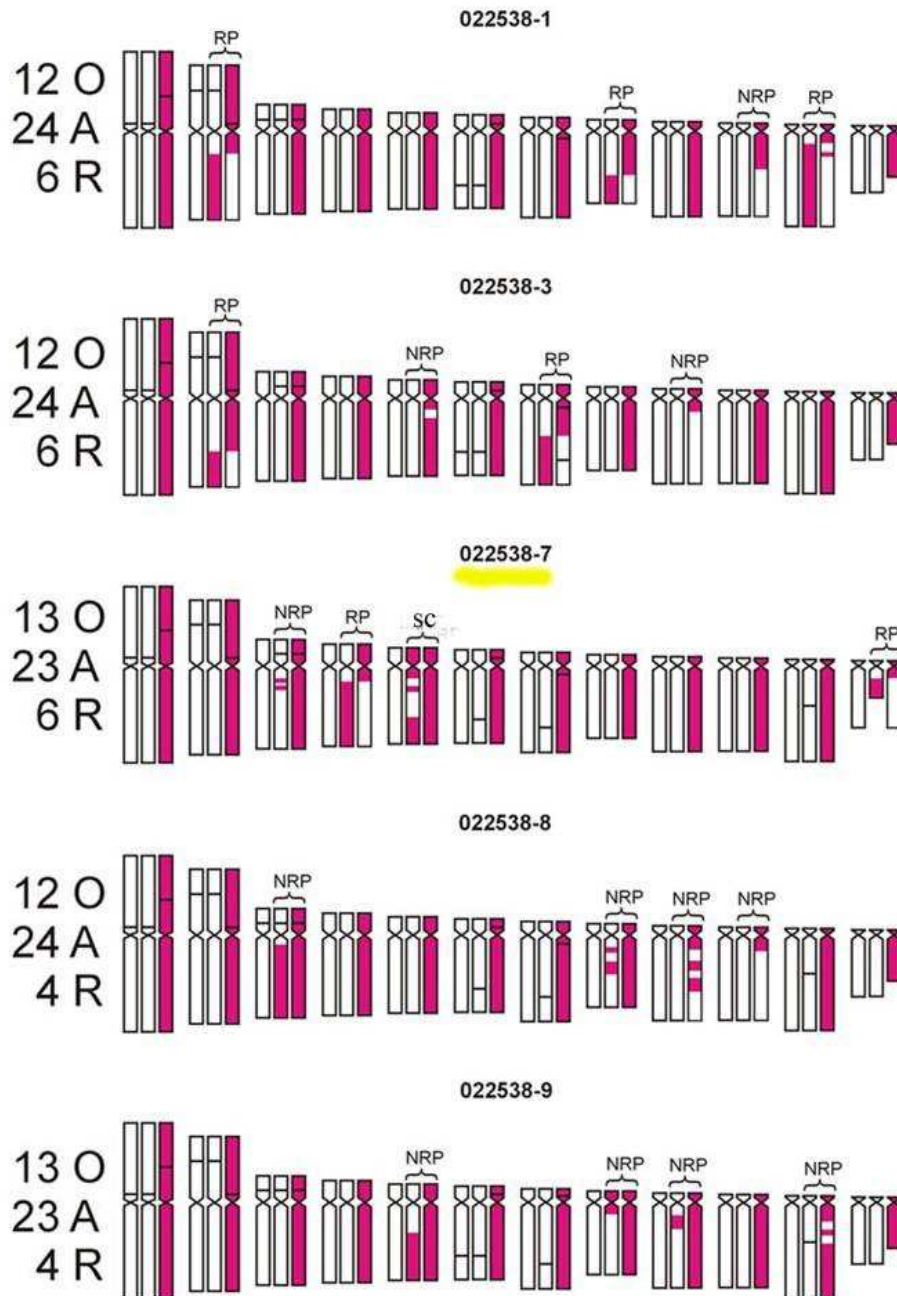
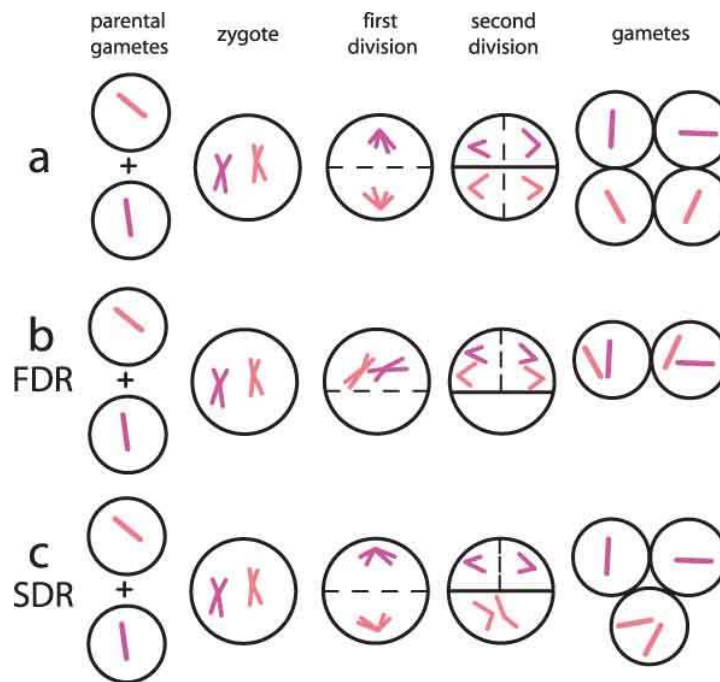


Fig 8. Meiotische restitutie mechanismen. (a) Vier haploide cellen vormen een tetrade, het resultaat van een normale meiose. (b) Twee $2n$ gameten die de twee “non-sister” chromatiden van de homologe chromosomen bevatten, zijn gevormd via het FDR-mechanisme. (c) De zuster chromatiden van de homologe 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	
2x – 3x (MP)										
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		
3x (2n) – 2x										
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	
3x (MP) – 4x-OA										
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	
3x (2n) – 4x-OA										
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	
3x (2n) – 2x*										
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.

Mb-NUMMER	Type	MOeder	Vader	Jaar
991107	OAOA	Te 951914-1		2003
981013	OAOA	Te 951584-1		2003
991357	OAOA	Te 952400-1		2003
002687-1	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
002687-8	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
002687-10	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
002687-13	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
002687-32	AOA	Lanzarote	Te 951301-5	2003
002531-12	AOA	Gironde	952400-1	2005
012246-1 (573)	AOA	Gironde	981056	2005
012248-1 (574)	AOA	Amarone	981004	2005
012065-1 (575)	OAA	991107	Amarone	2005
014050-1	OAOA	981029	991112	2005
022301-1	AOA OA	002188-18	991112	2005
022145-1	AOA A	002687-38	Gironde	2005
022589-1	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 N2O 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 Horti* 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 Horti* 673: 453-456.
- Van Tuyl JM & Lim KB 2003. Interspecific hybridization and polyploidization as tools in ornamental plant breeding. *Acta Horti* 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 Horti 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 vervolgcruisingen 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.

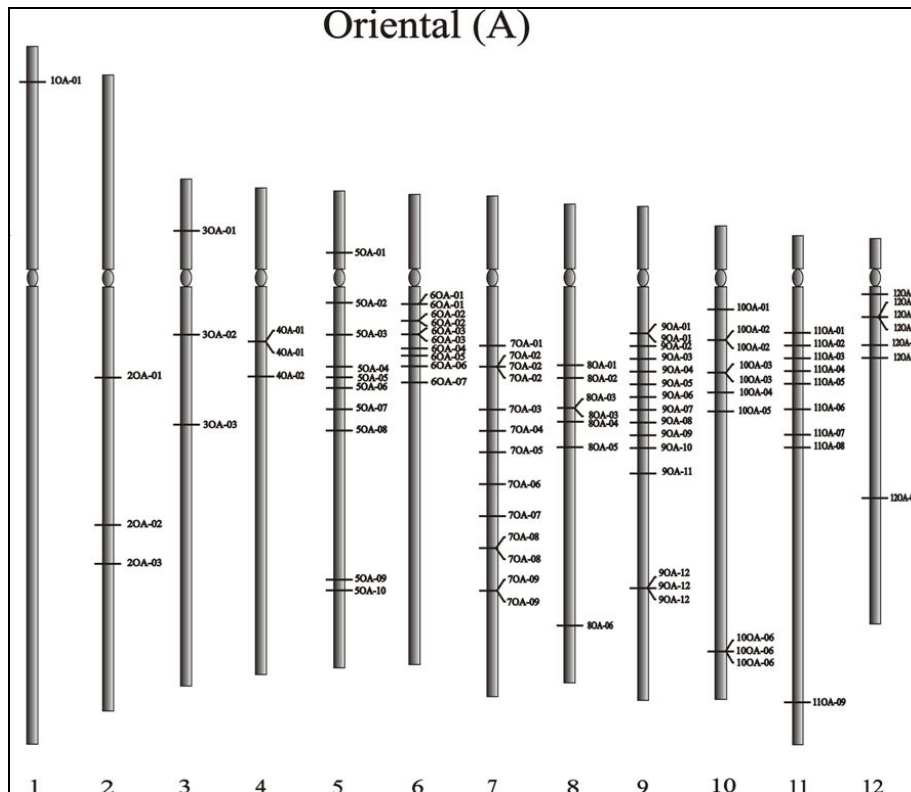
Van Tuyl, J.M., Th.P. Straathof, R.J. Bino & A.A.M. Kwakkenbos, 1988. Effect of three pollination methods on embryo development and seedset in intra- and interspecific crosses between seven *Lilium* species. Sex. Plant Reprod. 1(1988) 119-123.

- 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.



Eindrapportage PT12402

Innovatieve merkertekniken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie



Gegevens project:

Projectnummer PT: 12402

Projectnummer PRI: 33601003

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

Website: www.liliumbreeding.nl/project

Projectperiode 1-1-2006 - 31-12-2008

De begeleidingscommissie:

A. Peterse (voorzitter)

S. Bottema

M. Ceulemans

E. Hoogendijk

P.J. Kos

K. Laan

N. Meiland

H. Middelburg

C. Randag

A. van der Velde

A. Vletter

W. de Wit / R. Snijder

C.C. Anker (PT)

Projectmedewerkers:

P. Arens

T. Bleijenberg

A.A. van Silfhout

J.M. van Tuyl

M.S. Ramanna

H.K. Rhee

H. Schouten

M. van Kaauwen

J.H. Vossen

C.G. van der Linden

A.W. van Heusden

T.C.A.E. Wouters

B.C.E van der Ven

J. Herrera

S. Xie

Inhoudsopgave

Gegevens project	2
Inhoudsopgave	3
1. Samenvatting	4
2. Achtergrondinformatie	5
3. Korte beschrijving project	7
4. Resultaten	15
4.1 Merker analyse	15
4.2 Mapping	15
4.3. Merkerconversie	16
4.4. GISH en FISH onderzoek	21
4.5 Lijst van publikaties voortgekomen uit dit project	25
5. Conclusies	26
6. Referenties	27
7. Eindevaluatie	30

1. Samenvatting

De nieuwste moleculaire merker technieken (GISH en FISH chromosoomkleurings-technieken; NBS-profiling en DArT moleculaire merkertechnieken) zijn toegepast op lelie met als doel de overdracht van chromosoomfragmenten in kruisingen tussen verschillende leliehybriden (LA OA) te volgen, en in een vroeg stadium te selecteren op resistentie tegen *Fusarium*, *Botrytis* en virus. Hierdoor krijgt men inzicht in de vererving van resistenties in deze hybride-kruisingen, en kan men gericht en efficiënter veredelen

Met GISH is een groot aantal recombinatie gebeurtenissen geïdentificeerd die in verschillende LA en OA-hybriden werden verkregen met behulp van functionele $2n$ -gameten. Met behulp hiervan zijn recombinatie kaarten van de 3 *Lilium* genomen geconstrueerd. De BC nakomelingen van de LA-hybriden bestonden uit triploïde ($2n = 3x = 36$), diploïde ($2n = 2x = 24$) en enkele aneuploïde genotypen en die van de OA-hybriden bestonden hoofdzakelijk uit triploïde ($2n=3x=36$) en enkele aneuploïde genotypen. In de LA-hybriden werden 248 recombinatie plaatsen gelokaliseerd op de 12 verschillende chromosomen van elk genoom (L en A). Evenzo werden bij de OA-hybriden 116 recombinatie plaatsen gelokaliseerd op de 12 chromosomen van het O- en A-genoom. De afstand (in micrometer) van de recombinatie plaatsen tot de centromeren werd bepaald. Op basis van deze recombinatieplaatsen werden vier cytologische kaarten geconstrueerd. Omdat de Aziatische ouder in beide hybriden (LA en OA) aanwezig is, werden twee kaarten geconstrueerd voor het A-genoom aangeduid als Aziaat (L) en Aziaat (O) en één voor de Longiflorum (A) en Oriental (A) genomen. Er zijn duidelijke verschillen in de hoeveelheid recombinatie tussen de chromosomen wat consequenties heeft voor de introgressie veredeling van interessante eigenschappen vanuit de ene lelie sectie naar de andere lelie sectie. De moleculair genetische technieken GISH/FISH hebben getoond krachtige instrumenten te zijn voor de constructie van cytogenetische kaarten bij interspecifieke kruisingen in gewassen met grote genomen zoals lelie. Deze technieken zijn ook gebruikt voor de identificatie en integratie van genetische kaarten met chromosoomkaarten. FISH maakt het mogelijk om overgedragen chromosoomsegmenten of merkers te volgen in de nakomelingschappen.

De DArT genotypering is succesvol verlopen. DArT (Diversity Array Technology) is een op microarrays gebaseerde moleculaire merker techniek die variatie in DNA op enkele honderden loci simultaan kan detecteren zonder specifieke informatie van genoomsequenties. De DArT techniek werd aangepast voor LA-hybriden om efficiënt genetische kartering mogelijk te maken. De combinatie van de restrictie enzymen *PstI* + *TaqI* genereerde de hoogste frequentie van polymorfe genomische representaties voor een genotypen array. Genomische representaties van 88 F1 LA planten werden gebruikt om een DArT microarray samen te stellen. In totaal werden

687 DArT merkers ontwikkeld en 382 polymorfe merkers konden worden geplaatst op 14 koppelingsgroepen. De verkregen koppelingskaart met de 382 DArT merkers is 1328 cM (3.5cM/merker) lang. De resultaten onderstrepen de potentie van DArT als genetische techniek voor genoom karakterisering. Toepassing van de DArT techniek is een effectieve methode om genetische koppelingskaarten te construeren, speciaal in gewassen met grote genomen (zoals *Lilium*) waarvoor andere technieken minder bruikbaar zijn gebleken. Er zijn 5 merkers voor drie verschillende QTLs (voor *Fusarium* en virus resistentie) geconverteerd. Alle merkers waren afkomstig van de DArT aanpak.

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.

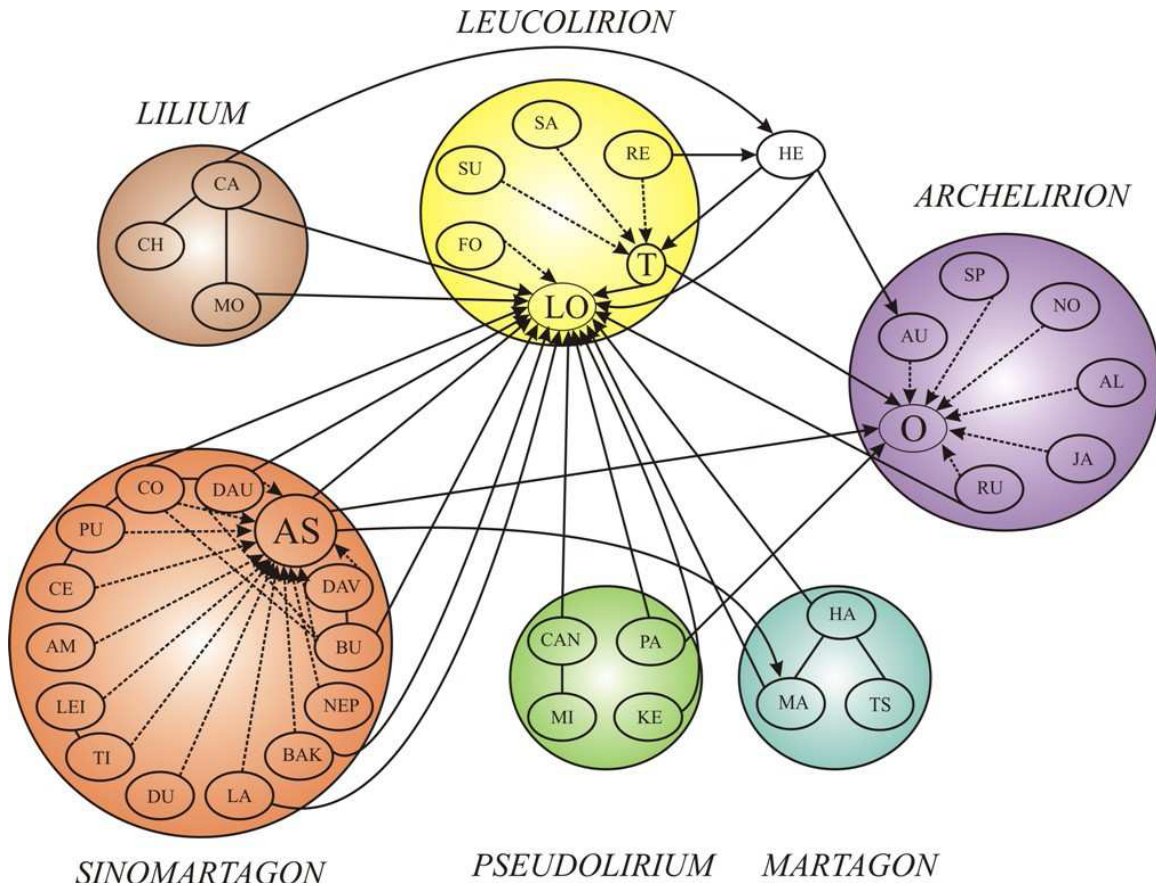


Fig.1. Een kruisingsveelhoek van het geslacht *Lilium*.

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 (Zenkter, 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 (Zenkter, 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 bij lelie, waarin het leliebedrijfsleven al meer dan 10 jaar veel energie en (onderzoeks)geld steekt is die tussen Aziatische en Oriëntal hybriden. Deze beide hybridengroepen bepalen de leliemarkt. Een combinatie van beide groepen zou uitwisseling van belangrijke eigenschappen mogelijk maken. Het betreft hier onder meer resistenties tegen de schimmels *Fusarium* en *Botrytis*, en het virus LMoV. Deze resistenties zullen met name noodzakelijk zijn om het bestrijdingsmiddelenverbruik in de toekomst te kunnen minimaliseren en daarmee te voldoen aan de regelgeving. Andere eigenschappen die tussen de hybriden uitgewisseld kunnen worden zijn de mogelijkheid tot jaarrondforcering, verbeterde houdbaarheid en sortimentsverbreding.

Inmiddels is duidelijk geworden welke technieken nodig zijn om gerichte veredeling met hybriden tussen Oriëntal en Aziatische typen (OA-hybriden) mogelijk te maken. Op chromosoomniveau kan er nu al d.m.v. technieken zoals FISH en GISH gericht geselecteerd worden op de vereiste recombinatie tussen Oriental en Aziaat chromosomen die de gewenste combinatie van Oriental en Aziaat eigenschappen mogelijk maakt. Een groot probleem hierbij is echter dat de selectie van alle eigenschappen in het veredelingsmateriaal al in een zeer vroeg stadium moet worden gedaan als gevolg van de beperkte fertiliteit en het geringe recombinatievermogen van het hybride leliemateriaal. Deze vroege selectie zou mogelijk zijn door gebruik te maken van moleculaire merkers, waarmee de overdracht van chromosoomfragmenten met resistentiegenen uit de verschillende kruisingsouders naar de hybride nakomelingen kan worden gevolgd en aangetoond.

In een voorgaand PT-project (PT-10314) is met AFLP-moleculaire merkers in een Aziatische populatie reeds aangetoond dat dit type moleculaire merkers ook in lelie toepasbaar zijn. Echter, het omzetten van de meest succesvolle AFLP-merkers naar technisch eenvoudig-toepasbare PCR merkers voor de veredeling bleek niet zo simpel. In het huidige project zal gebruik worden gemaakt van

innovatieve merkermethoden waarmee nieuwe type merkers (anders dan AFLPs) voor de drie resistenties zullen worden geproduceerd, n.l NBS-profiling en DArT. De verwachting, gebaseerd op ervaringen in andere gewassen, is dat voor deze merkers de omzetting naar eenvoudig-toepasbare merkers beter mogelijk is. Dit onderzoek maakt het mogelijk dat alle drie de resistenties over de volle breedte van de lelieveredeling (Oriental, Aziaat, LA) kunnen worden ingebracht.

Doelstelling(en) en afbakening:

Het doel van dit project is om effectieve methoden te ontwikkelen om op diverse, polygene resistenties (tegen Botrytis, Fusarium, virus) te kunnen selecteren en deze resistenties in te brengen in lelierassen. Dit gebeurt op basis van de in voorgaande projecten verkregen resultaten in het doorbreken van kruisingsbarrières tussen Oriental- en Aziatische leliehybriden. Dit onderzoek is een samenwerking tussen SLV (12 lelieveredelingsbedrijven), RDA (Rural Development Administration) in Zuid-Korea en PRI te Wageningen. Er zal gewerkt worden met 3 populaties, namelijk:

1. De Aziatische populatie waarmee gewerkt is in het voorgaande merkerproject. Hiermee is een genetische kaart van lelie met ruim 200 AFLP merkers geconstrueerd met een bruikbare merker voor resistentie tegen het virus LMoV.
2. LA (longiflorum x Aziaat), een populatie, die de afgelopen 3 jaar met RDA, Zuid-Korea is gebruikt voor moleculaire merkeronderzoek gericht op Fusarium-resistentie.
3. AOA, een nieuwe populatie die op basis van het voorgaande soortkruisingsproject (PT-11184) is uitgekozen. Deze populatie is afkomstig van een OA-hybride, die 2n-gameten produceert, waardoor relatief veel recombinaties optreden tussen Oriental en Aziatische genomen (Barba-Gonzalez et al 2004, 2005a,b; 2006). Dergelijke recombinaties zijn noodzakelijk voor introgressie van o.a. resistentie eigenschappen.

Te verwachten resultaten:

1. Eenvoudig toepasbare moleculaire merkers die nauw gekoppeld zijn met genen voor resistentie tegen de belangrijkste ziekten in lelie: Fusarium, Botrytis en LMoV
2. Deze merkers zijn met een eenvoudige PCR-toets bij alle lelies met een longiflorum, Aziaat of Oriental achtergrond toe te passen. De toets detecteert binnen 1 dag welke van de resistentiegenen uit de onderzochte kruisingouders aanwezig zijn in de te onderzoeken lელიgenotypen.
3. Inzicht wordt verkregen in het aantal effectieve resistentiegenen tegen de genoemde ziekten in de gebruikte populaties, en de posities van die genen op de chromosomen van de kruisingouders.
4. Inzicht in de mate van recombinatie tussen chromosomen van Aziatische hybriden enerzijds en Oriental hybriden anderzijds.
5. De genetische kaarten van lelie zal kunnen worden aangevuld met een groot aantal merkers. Deze genetische kaart met een hoge merkerdichtheid zal een belangrijke basis vormen voor moleculaire veredeling in lelie in het algemeen, en in de toekomst voor allerlei andere eigenschappen gebruikt kunnen worden.

Bestaande kennis:

De ziekte-toetsen voor Fusarium, Botrytis en virus zijn op PRI ontwikkeld en kunnen deels door bedrijven en RDA in Korea toegepast worden.

De merkertechnologieën zijn op PRI ontwikkeld en zullen verder worden ontwikkeld voor de 3 specifieke populaties. Er wordt gebruik gemaakt van 3 merkertechnologieën t.w. AFLP, NBS-profiling en DArT. Daarnaast zal gebruik worden gemaakt van de in situ hybridisatie technieken FISH en GISH, waarmee genomen en stukjes DNA op de chromosomen “gekleurd” kunnen worden.

AFLP:

In een voorgaand PT-project (PT-10314) is gebruik gemaakt van de AFLP-techniek. Er is een (niet heel nauw gekoppelde) merker voor LMoV gevonden die echter moeilijk te converteren bleek tot een eenvoudig toepasbare merker.

NBS-profiling:

Het is bekend dat de sequenties van vele resistentiegenen overeenkomsten vertonen en dat resistentiegenen (en pseudo-resistentiegenen) in clusters op de genetische koppingskaarten gevonden worden. Op PRI wordt een methode gebruikt, genaamd NBS (Nucleotide binding Site) profiling, die efficiënt merkers produceert in resistentiegenen (van der Linden et al. 2004). Hierbij worden verschillende primers in combinatie met verschillende restrictie-enzymen gebruikt. In aardappel is aangetoond dat ca 75 % van de NBS-merkers ook werkelijk resistentie genen of resistentiegenanalogen zijn. Met NBS-profiling is het mogelijk eenvoudig en zonder risico de uitsplitsing van meer dan 50 extra merkers in lelie te bepalen. Deze merkers kunnen eenvoudig op de bestaande koppingskaarten worden geplaatst, en zullen naar verwachting gelocaliseerd zijn in of vlakbij resistentie loci. Als deze NBS merkers gezamenlijk uitsplitsen met ziekteresistenties is de kans dat deze merkers zeer sterk gekoppeld zijn groot, en potentieel kunnen het zelfs de werkelijke resistentiegenen zijn. Om ze gemakkelijker te gebruiken zullen ze echter ook omgezet moeten worden in eenvoudige, liefst co-dominante PCR-merkers.

DArT

DArT (Diversity Array Technology) is een moderne techniek, waarbij gebruikt gemaakt wordt van micro-arrays. Met deze techniek kunnen veel (honderden) merkers tegelijkertijd in een enkele hybridisatie-assay worden gedetecteerd. Deze techniek kan met name toegepast worden bij gewassen met grote genomen, waartoe ook lelie behoort. Een belangrijk voordeel van DArT is bovendien dat omzetting naar een eenvoudige, betrouwbare PCR-merker relatief eenvoudig is.

FISH

Met de FISH-techniek kunnen DNA-fragmenten zichtbaar gemaakt worden op foto's van chromosomen. Als gebruik gemaakt kan worden van DNA-sequentie informatie van merkers die nauwgekoppeld zijn aan resistentiegenen, kunnen de posities van die resistentiegenen gevisualiseerd worden. Dit geeft de mogelijkheid om daadwerkelijk te zien **of** een resistentielocus aanwezig is en hoe groot de gerecombineerde chromosoomfragmenten in de hybride genotypen zijn. Ook

kan hiermee bepaald worden wat welk aandeel van het DNA afkomstig is van de Aziaat en van de Oriental ouder in de verschillende hybride genotypen

Plan van aanpak:

Er zijn een aantal parallele activiteiten te onderscheiden:

1. uitvoering van de ziekte-toetsen (Fusarium, Botrytis en virus) bij de 3 populaties (AA, LA en AOA) door de verschillende deelnemers aan het project (AA:bedrijven; LA-populatie: RDA, Korea; AOA: PRI)
2. ontwikkelen van merkers met de nieuwe merkertechnologieën en constructie van een genetische kaart
3. conversie van de merkers naar eenvoudig-toepasbare PCR-merkers en toetsing op algemene bruikbaarheid bij een sortiment lelies

4. Resultaten

4.1 Merker analyse

Uitgangspunt voor de merkeranalyses zijn twee populaties die uitsplitsen voor LMoV, Fusarium en Botrytis resistentie. De twee populaties zijn: de AA populatie; nakomelingen van de kruising Connecticut King (CK) x Orlito (OR) en de LA populatie; nakomelingen van de kruising White Fox (WF) x Connecticut King (CK). De AOA populatie was minder geschikt voor merker onderzoek gezien de uitsplitsing van deze triploïden. Voor de beide populaties zijn zowel NBS als DArT merkers ontwikkeld en hiermee de nakomelingen gegenotypeerd. Voor de DArT merkeranalyse zijn er aanpassingen op bestaande protocollen geïntroduceerd om te compenseren voor het grote genoom van lelie. Voor DArT merkers is de bestaande methode aangepast door PstI restrictie enzym te gebruiken in combinatie met 5 verschillende frequent knip enzymen (Mse I, Taq I, Mva I, or Msp I). Voor PstI werd gekozen omdat het knipt in ongemethyleerde gen rijke stukken van het genoom en minder in repeat regio's. Ook is gekozen om alleen PstI-PstI fragmenten te amplificeren voor merker productie zodat het totaal aantal fragmenten werkbaar blijft. Naar aanleiding van de eerste tests is gekozen voor de combinaties PstI-TaqI en PstI-MseI in de AA populatie. Omdat het aantal polymorfe fragmenten met PstI-TaqI 2x hoger lag voor de LA populatie uitsluitend met deze enzymcombinatie gewerkt. In totaal zijn voor de AA populatie 616 merkers ontwikkeld (278 NBS merkers en 338 DArT merkers naast een bestaande set van 584 AFLP merkers) en zijn voor de LA populatie 720 merkers ontwikkeld (33 NBS merkers en 687 DArT merkers).

4.2 Mapping

NBS en DArT markers zijn geanalyseerd en gebruikt voor de kartering van genetische kaarten voor de AA en LA populatie met JoinMap 4.0. Voor alle merkers is de uitsplitsing gecontroleerd en getest op een normale uitsplitsing mbv de χ^2 test ($P=0.05$). Verwachte ratio's zijn 3:1 en 1:1. In eerste instantie zijn alleen de 1:1 uitsplitsende merkers vanuit CK gebruikt voor de kartering om een kaart met hoge betrouwbaarheid te kunnen produceren. Uiteindelijk zijn alle betrouwbare merkers, die in de kaart samen met

in ieder geval twee andere merkers in een koppelingsgroep vallen, verzameld en afgebeeld in Figuur 2 en 3.

Voor de AA populatie zijn in totaal 197 markers met een hoge betrouwbaarheid (LOD 4 of 5) gekarteerd in 28 koppelingsgroepen (109 AFLP, 41 NBS and 47 DArT markers). Gemiddelde afstand tussen merkers is 6.7 cM (~6.7% recombinatie tussen markers) met een maximale afstand tussen twee markers van 27 cM (LG 7). In de kaart zijn ook LMoV (LG27), Fusarium (2 QTLs van mogelijk 4 aanwezige: LG1 en LG8), fertiliteit (aanwezigheid helmhokjes; LG3; dominant), spikkels (LG24, recessief) en bloemkleur (LG25) gekarteerd.

Voor de LA populatie zijn in totaal 376 markers met hoge betrouwbaarheid (LOD 6) gekarteerd in 22 koppelingsgroepen (31 NBS en 345 DArT markers). De gemiddelde afstand tussen twee markers is 4.3 cM met een maximale afstand van 26 cM (LG5). In deze populatie zijn de eigenschappen stengelkleur (LG2; groen is dominant), spikkels (LG12; recessief) en bloemstand (LG11; neerhangend dominant) gekarteerd.

Gebruik makend van markers die in beide kaarten aanwezig zijn en die in de ene kruising op dezelfde koppeling groep liggen en in de andere kruising in twee verschillende koppelingsgroepen is het mogelijk om koppelingsgroepen aan te wijzen die op hetzelfde chromosoom liggen in die laatste kruising. In deze kruising is het aantal markers tussen de beide gemeenschappelijk markers dan onvoldoende om de beide koppelingsgroepen aan elkaar te knopen.

Geconcludeerd kan worden dat zowel DArT als NBS markers geschikte marker systemen zijn in lelie maar dat in de AA populatie, wat een terugkruisingspopulatie is, er door de dominante overerving van de markers veel markers afvallen om de kaart met hoge betrouwbaarheid te kunnen maken. Co-dominante markers zijn voor deze AA populatie geschikter.

Ondanks de aanwezigheid van identieke markers (96 markers met paarsgewijze identieke scores) blijkt de DArT technologie in de LA populatie een uitstekende merker methode waarmee veel merkers kunnen worden gegenereerd.

Ziekte toetsing voor botrytis blijkt zeer lastig te zijn en de tot nu toe uitgevoerde toetsen laten zoveel variatie zien dat er nog geen eenduidige resultaten zijn waarmee QTL analyse kan worden uitgevoerd. Voor Fusarium zijn additionele ziekte toetsen nodig in de

LA populatie om QTL analyse te kunnen uitvoeren. Het onderzoek wordt voorgezet in een TTIGG-project “Bridging the genomes in lily: creating an EST mapping framework for introgression breeding” 2009-2012.

4.3 Merker conversie

Van een aantal markers is koppeling (direct of indirect) vastgesteld met resistentie eigenschappen (zie tabel 1). Deze markers zijn verder onderzocht en er is getracht om deze markers om te zetten (conversie) in simpele PCR markers die het mogelijk maken grote aantallen genotypen te screenen.

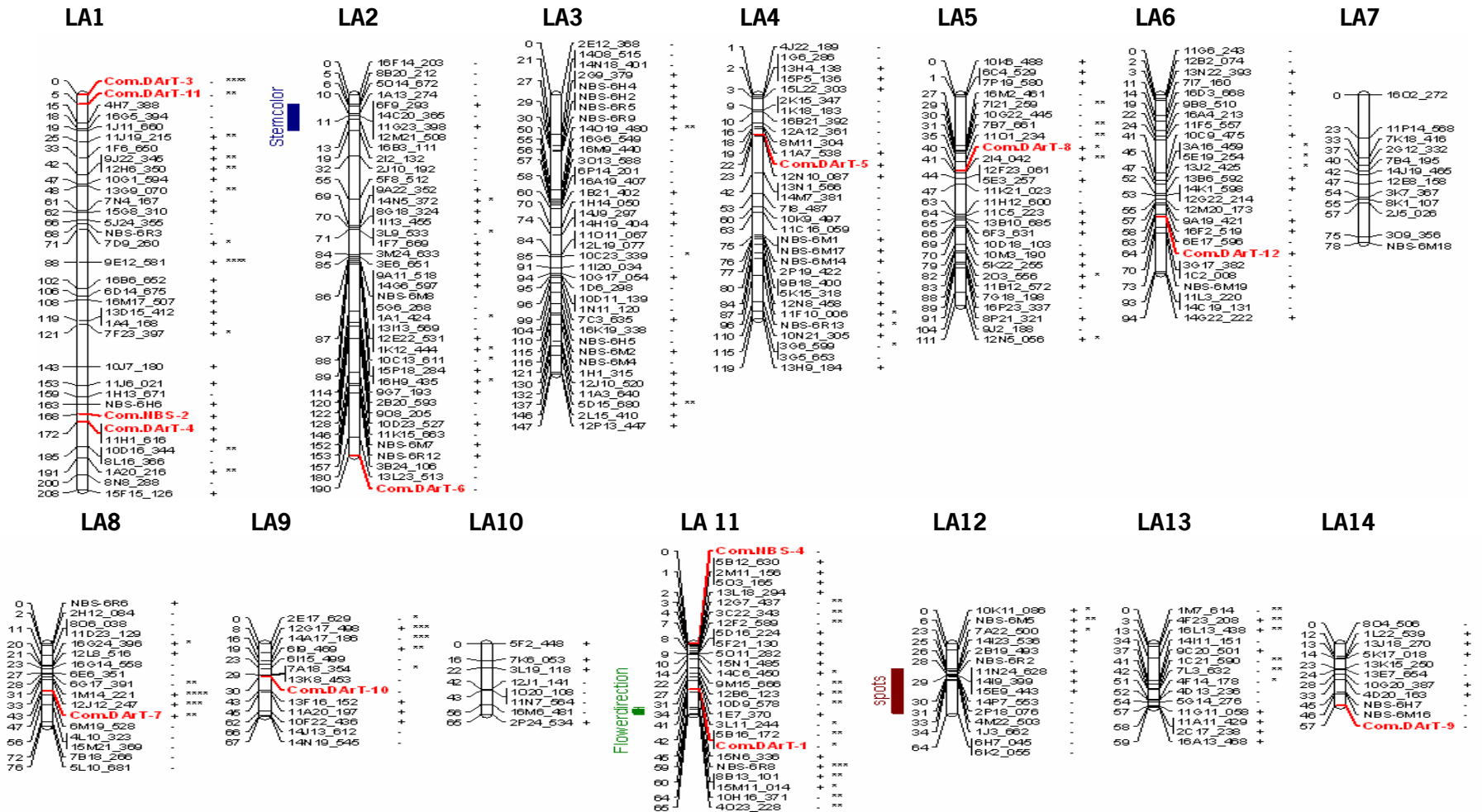
Tabel 1. Zes DArT-markers waarmee koppeling met resistentie (Fusarium en LMoV) eigenschappen gevonden is

Marker	Eigenschap
Com.DArT-7	<i>Fusarium A</i>
CKPstTaq_92	<i>Fusarium A</i>
CKPstTaq_205	<i>Fusarium A</i>
Com.DArT-10	<i>Fusarium D</i>
15D8_125	LMoV
9C7-374	LMoV

Voor Fusarium; bij twee QTLs die waren aangetoond bevinden zich DArT markers die konden worden geconverteerd. Bij deze QTLs zit de QTL die in eerdere studies altijd als meest significante QTL werd aangetoond. Voor deze QTL Fu_A is één marker gevonden (CKPstTaq_205) die in zowel de AA als de LA populatie uitsplitsing geeft. Marker Com.DArT-10 is gekoppeld met QTL Fu_D die met wisselende significanties uit de resistentie toetsen is gekomen (Van Heusden et al., 2002) en waarvan de afgeleide PCR marker in beide populaties uitsplitsing geeft.

Voor LMoV is een 3:1 uitsplitsende NBS marker (6MAA7) gevonden die gekoppeld lijkt met LMoV (in afstotingsfase). Deze marker splits ook uit in de LA populatie en in dezelfde koppelingsgroep LA17 zitten twee DArT markers die geconverteerd worden naar simpele PCR markers in koppelingsfase.

Fig.2: De genetische kaart van de populatie, de +,- geeft de koppelings- of afstotingsfase van de markers weer.



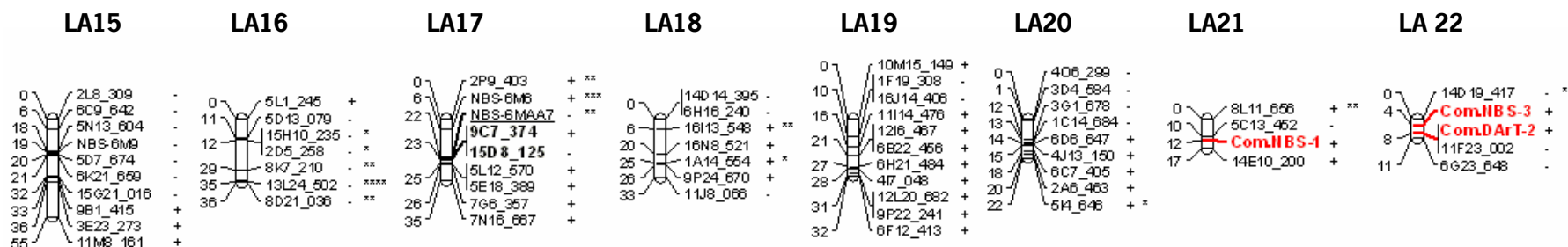
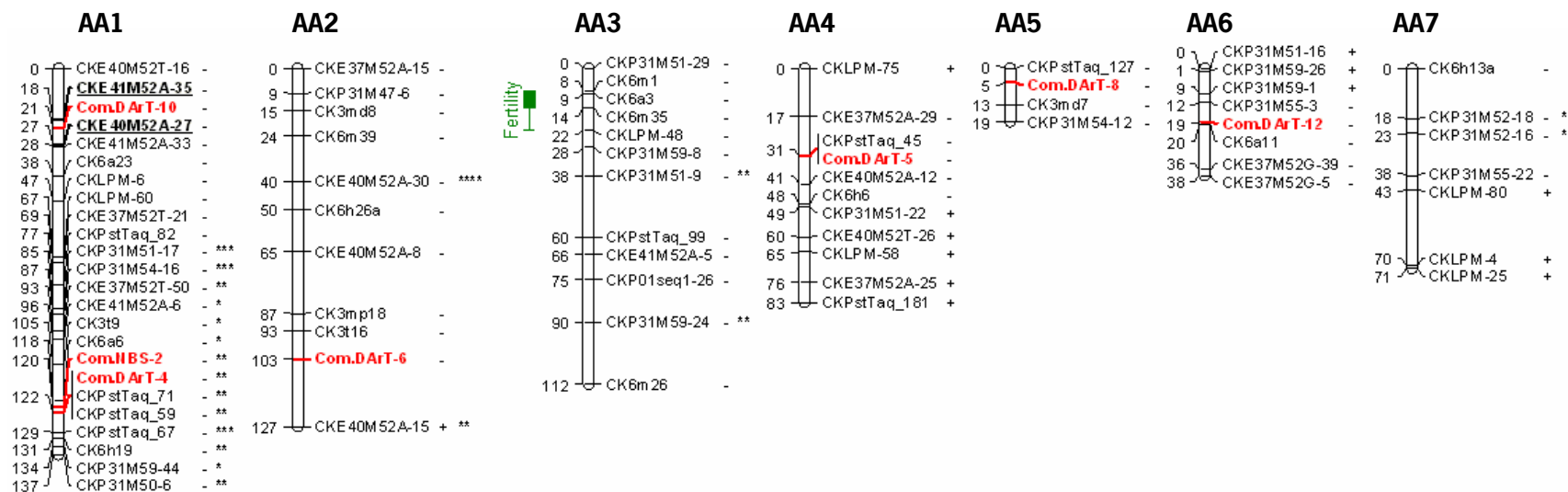
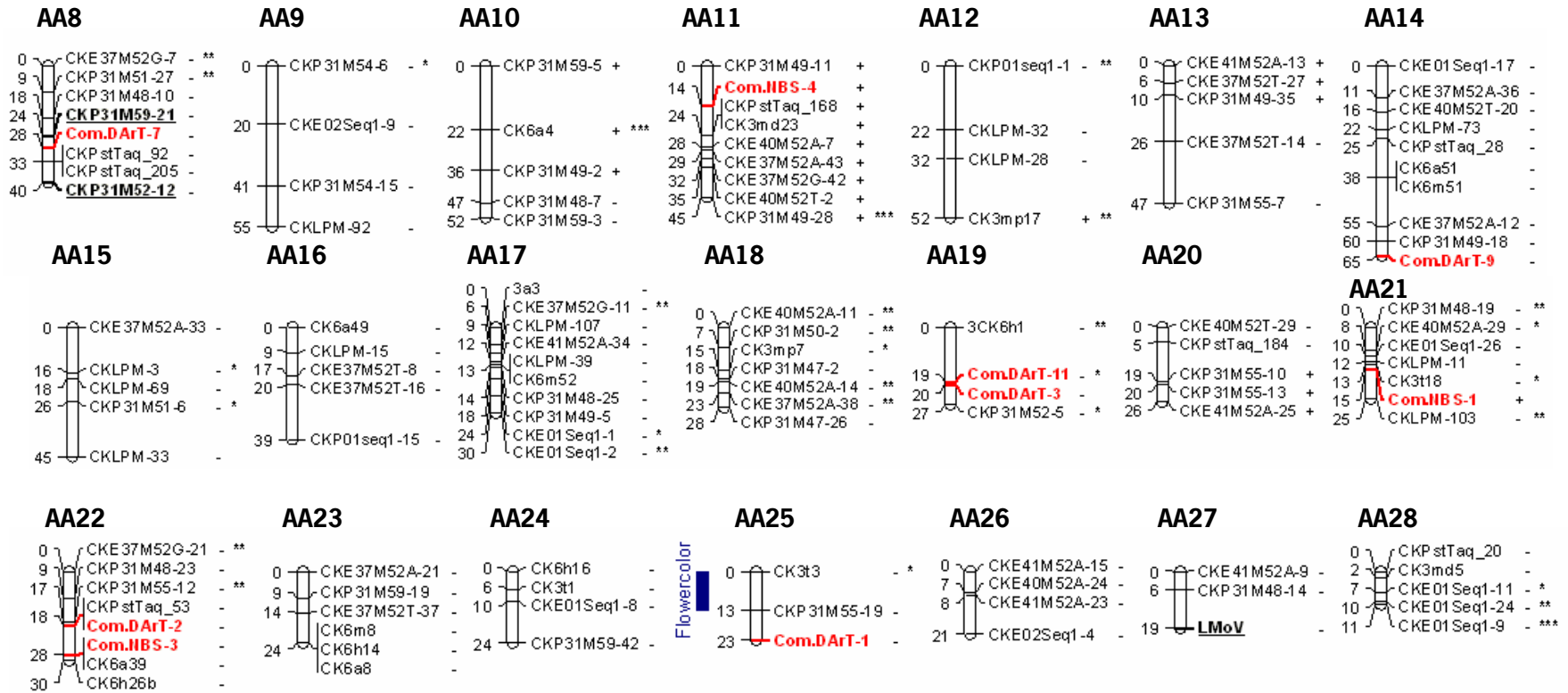


Fig.3: De genetische kaart van de AA-populatie, de +,- geeft de koppelings- of afstotingsfase van de markers weer.





4.4 GISH en FISH onderzoek

Voor dit onderzoek werden verschillende LA en OA F1 hybriden teruggekruist met verschillende Aziatische cultivars. Zaadknop en embryo reddingstechnieken werden toegepast om terugkruisingspopulaties (BC) te verkrijgen. Veel F1 LA-hybriden bleken steriel te zijn, maar een aantal uitsluitend $2n$ -gameten producerende hybriden kon worden geïdentificeerd waarbij voldoende gameten werden geproduceerd voor vervolgonderzoek. In uitzonderlijke gevallen bleek bij LA hybriden deels een normale meiose plaats te vinden resulterend in de vorming van n -gameten. Om de potentie van n -gameten en de toepassing hiervan ten behoeve van analytische veredeling op diploïd niveau in lelie te onderzoeken werd het ploïdie niveau en de intergenomische recombinatie in nakomelingen van deze LA-hybriden onderzocht. In totaal werden 104 BC1 LA-hybriden bestudeerd; hiervan waren 23 diploïd ($2n=2x=24$), 73 triploïd ($2n=2x=36$) en 4 aneuploid ($2x - 1$, $2x + 2$ of $2x + 3$). Op soortgelijke wijze werden triploïde BC (LAA) planten teruggekruist op diploïde Aziatische ouders. Dit resulteerde o.a. ook in 14 diploïde BC2 nakomelingen. De intergenomische recombinatie en de mate van introgressie van de beide genomen (L en A) in deze diploïde genotypen werd door middel van GISH (Genomische *in situ* Hybridisatie) vastgesteld. Tussen de chromosomen van deze LA-hybriden werd een omvangrijke intergenomische recombinatie waargenomen. Een groot deel van het L-genoom werd doorgegeven van de F1 LA-hybriden naar de BC nakomelingen. Er werden echter slechts enkele segmenten van het L-genoom van de diploïde en triploïde BC1 (LAA) planten overgedragen naar de BC2 nakomelingen.

Met GISH is een groot aantal recombinatie gebeurtenissen geïdentificeerd die in verschillende LA en OA-hybriden werden verkregen met behulp van functionele $2n$ -gameten. Met behulp hiervan zijn recombinatie kaarten van de 3 *Lilium* genomen geconstrueerd. Hiertoe zijn BC nakomelingen van twee diploïde interspecifieke leliehybriden gebruikt, te weten LA en OA-hybriden. De BC nakomelingen van de LA-hybriden bestonden uit triploïde ($2n = 3x = 36$) diploïde ($2n = 2x = 24$) en enkele aneuploïde genotypen en die van de OA-hybriden bestonden hoofdzakelijk uit triploïde ($2n=3x=36$) en enkele aneuploïde genotypen. In de LA-hybriden werden 248 recombinatie plaatsen gelokaliseerd op de 12 verschillende chromosomen van elk genoom (L en A). Evenzo werden bij de OA-hybriden 116 recombinatie plaatsen gelokaliseerd op de 12 chromosomen van het O- en A-genoom.

De afstand (in micrometer) van de recombinatie plaatsen tot de centromeren werd bepaald. Op basis van deze recombinatieplaatsen werden vier cytologische kaarten geconstrueerd. Omdat de Aziatische ouder in beide hybriden (LA en OA) aanwezig is, werden twee kaarten geconstrueerd voor het A-genoom aangeduid als Aziaat (L) en Aziaat (O) en één voor de Longiflorum (A) en Oriental genomen.

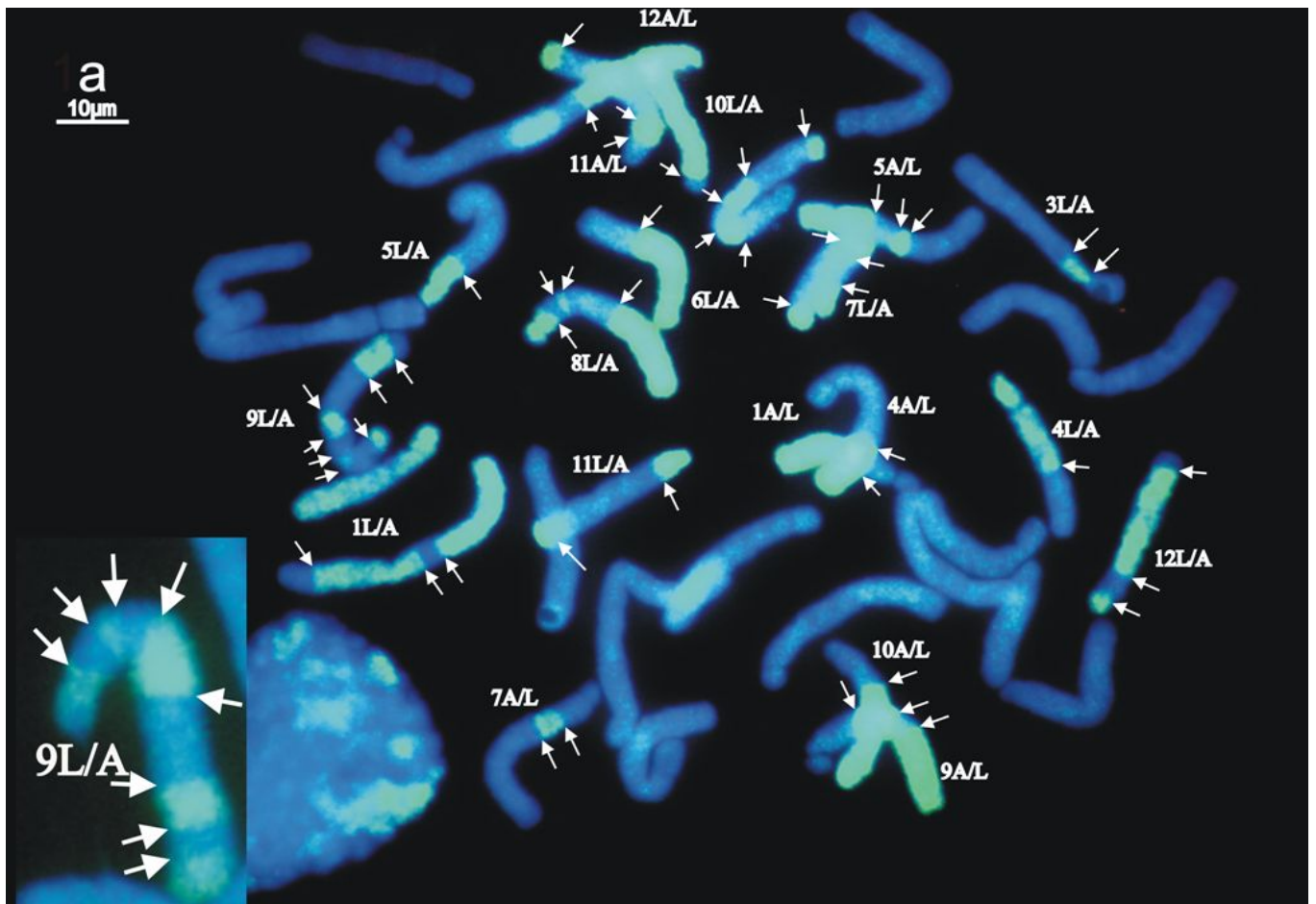


Fig. 4. Somatische metafase chromosomen van BC1 nakomelingen van LA hybriden waarop de recombinatie plaatsen op diverse chromosomen zichtbaar zijn gemaakt met GISH (pijltjes). Een triploïde ($2n=3x=36$) BC1 nakomeling van de LAA hybride 066994-3 met 49 recombinatie punten. Inzet: een recombinant chromosoom met 8 recombinatie sites in de BC1 LA hybride (062071-2).

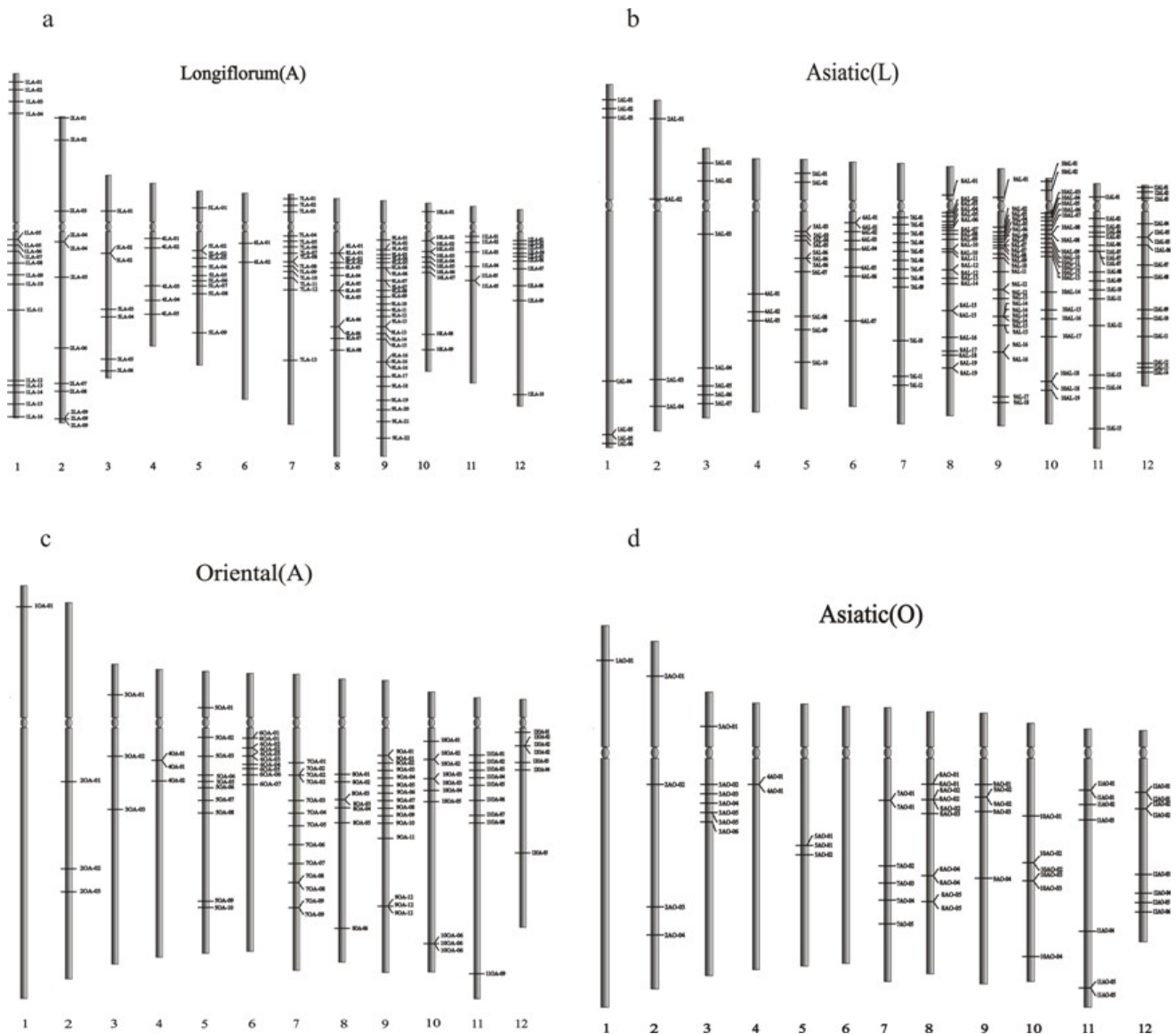


Figure 5. Vier chromosoom recombinatie kaarten verkregen uit GISH-analyse van BC nakomelingen van LA en OA hybriden. De genomen zijn aangegeven als Longiflorum (A), Asiatic (L), Oriental (A) and Asiatic (O)- de recombinatie partner in is aangegeven tussen haakjes.

De meest logische benadering bij het creëren van genetische variatie via homoeologe recombinatie in BC nakomelingen van LA en OA hybriden is de toepassing van n - en $2n$ -gameten. In totaal, werden 61 BC1 LA (LA x AA en AA x LA) en 52 OA (AA x OA) nakomelingen verkregen via unilaterale polyploidisatie. Daarnaast werden 16 F2 LA

nakomelingen verkregen via bilaterale sexuele polyploidisatie door onderlinge kruising van F1 LA-hybriden. GISH werd toegepast voor identificatie van de ouder genomen, de ontstaanswijze en de bepaling van de mate van introgressie bij de verschillende lelie hybriden. De meeste BC1 nakomelingen (LA en OA) ontstonden uit $2n$ -gameten via het zogenaamde First Division Restitution (FDR) mechanisme. Er werden echter negen LA- en vier OA-genotypen geïdentificeerd waaraan het zogenaamde Indeterminate Meiotic Restitution (IMR) mechanisme van $2n$ gameetvorming aan ten grondslag lag. In de LA-hybriden werd in vergelijking met de OA-hybriden meer recombinatie gevonden. Intergenomische recombinatie werd ook vastgesteld in de F2 LA-populaties. In dit geval hebben beide ouders met $2n$ -gameten bijgedragen waarmee de bilaterale sexuele polyploidisatie gebeurtenis in de LA-hybriden wordt bevestigd. De relevantie van de interspecifieke lelie hybriden verkregen na uni- en bilaterale polyploidisatie resulterend in allotriploïden en allotetraploïden wordt bediscussieerd in relatie tot introgressie en de genetische kartering

4.7 Lijst van publicaties voortgekomen uit dit project

Barba-Gonzalez,R., Ki-Byung Lim, Shujun Zhou, M.S. Ramanna, JM. Van Tuyl 2007. Interspecific hybridization in lily: the use of 2n gametes in interspecific lily hybrids Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition, Volume 5), Teixeira da Silva JA (Ed), Global Science Books, Isleworth, UK,138-145

Khan, M.N., M. S. Ramanna, Richard G. F. Visser And Jaap M Van Tuyl 2007 Towards the construction of chromosome maps in *Lilium* based on recombination points analyzed with GISH, Poster Bulb symposium Lisse 2008, book of abstr p. 108

Khan, Nadeem, Shujun Zhou, M. S. Ramanna, Paul Arens, Jeronimo Herrera, Richard G. F. Visser And Jaap M. Van Tuyl 2008. Potential for analytic breeding in allopolyploids: An illustration from *Longiflorum* × Asiatic hybrid lilies (*Lilium*) *Euphytica* 166:399-409.

Khan, Nadeem, Rodrigo Barba-Gonzalez, M. S. Ramanna, Richard G.F. Visser and Jaap M. Van Tuyl 2009. Construction of chromosomal recombination maps of three genomes of lilies (*Lilium*) based on GISH analysis. *Genome* 52: 238-251

Khan, Nadeem, 2009. A molecular cytogenetic study of intergenomic recombination and introgression of chromosomal segments in lilies (*Lilium*). PhD-thesis, June 2009, 121 pp.

Khan, N., Rodrigo Barba-Gonzalez, M.S. Ramanna, Paul Arens, Richard G.F. Visser and Jaap M. Van Tuyl, 2009. Relevance of unilateral and bilateral sexual polyploidization in relation to intergenomic recombination and introgression in *Lilium* species hybrids. *Euphytica* online DOI 10.1007/s10681-009-9998-0.

Lim, KB, R.Barba-Gonzalez, Shujun Zhou, M. S. Ramanna, JM. Van Tuyl 2007 Interspecific Hybridization In Lily (*Lilium*): Taxonomic And Commercial Aspects Of Using Species Hybrids In Breeding. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition, Volume 5), Teixeira da Silva JA (Ed), Global Science Books, Isleworth, UK, pp 146-151.

Ki-Byung Lim & Jaap M. Van Tuyl 2006. Lily , *Lilium* hybrids. Chapter 19 page 512-532 Flower breeding & genetics: Issues, challenges and opportunities for the 21st century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Ed. N.O. Anderson).

Shahin, A., Paul Arens, Martijn Van Kaauwen, Sjaak Van Heusden, M. S. Ramanna And Jaap M.van Tuyl 2008. Molecular cytogenetic approach for transferring genes of *Fusarium* resistance in lily Plant Breeding research day 2008.

Shahin, Arwa,, Paul Arens , Sjaak van Heusden and Jaap van Tuyl , 2009. Conversion of molecular markers linked to *Fusarium* and virus resistance in *Lilium* . Lecture EUCARPIA symposium, September 1 2009; *Acta Horti* 836: in press.

Van Tuyl, Jaap & Alex Van Silfhout 2007. Hoe ver staat het met de OA-hybriden? *Bloembollenvisie* 1 febr 2007, no 107:24-25

Zhou, S., Rodrigo Barba-Gonzalez, Ki-Byung Lim, M.S. Ramanna, JM. Van Tuyl 2007. Interspecific hybridization in lily (*Lilium*): Interploidy crosses involving interspecific F1

hybrids and their progenies. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition, Volume 5), Teixeira da Silva JA (Ed), Global Science Books, Isleworth, UK, pp 152-156.

6. Conclusions

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

6.1 Merker analyse:

De AOA populatie bleek minder geschikt voor merker onderzoek gezien de uitsplitsing van deze triploïden. Voor de AA en LA-populaties zijn zowel NBS als DArT merkers ontwikkeld en hiermee de nakomelingen gegenotypeerd. Voor de DArT merkeranalyse zijn er aanpassingen op bestaande protocollen geïntroduceerd om te compenseren voor het grote genoom van lelie. In totaal zijn voor de AA populatie 616 merkers ontwikkeld (278 NBS merkers en 338 DArT merkers naast een bestaande set van 584 AFLP merkers) en zijn voor de LA populatie 720 merkers ontwikkeld (33 NBS merkers en 687 DArT merkers).

6.2 Mapping:

NBS en DArT markers zijn geanalyseerd en gebruikt voor de kartering van genetische kaarten voor de AA en LA populatie met JoinMap 4.0. Voor de LA populatie zijn in totaal 376 markers met hoge betrouwbaarheid (LOD 6) gekarteerd in 22 koppelingsgroepen (31 NBS en 345 DArT markers). Een nieuwe genetische kaart van de AA-populatie is gepresenteerd.

6.3. Merkerconversie:

Van 1 NBS-marker en 6 DArT-markers is merkerconversie uitgevoerd. Dit heeft tot nu toe geleid tot 2 geconverteerde markers voor QTL's. Aan 2 markers gekoppeld aan LMoV wordt nog gewerkt.

6.4. GISH en FISH onderzoek:

Met GISH is een groot aantal recombinatie gebeurtenissen geïdentificeerd die in verschillende LA en OA-hybriden werden verkregen met behulp van functionele $2n$ -gameten. Met behulp hiervan zijn 4 recombinatie kaarten van de 3 *Lilium* genomen geconstrueerd. Een koppeling met de moleculaire kaarten heeft nog niet plaats gevonden. Bij

diverse LA-hybriden zijn eveneens functionele n-gameten gevonden die hebben geleid tot een nieuwe strategie voor de LA-veredeling, via de zgn, analytische veredeling.

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. Orienpet 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.

Barba-Gonzalez, Rodrigo, 2005. The use of 2n gametes for introgression breeding in Oriental × Asiatic lilies. PhD-thesis, WUR,111pages.

Barba-Gonzalez, R., Lokker, B.H., Lim, K-B., Ramanna, M.S., and Van Tuyl, J.M. 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 x 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, Van Silfhout A, Visser RGF, Ramanna MS, Van Tuyl JM (2006) Progenies of allotriploids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. *Euphytica* 151: 243-250
- 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. Flow cytometric 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 Wennekes, 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 Creij, 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.
- Heusden, AW Van, Jongerius MC, JM Van Tuyl, TP Straathof & JJ Mes 2002. Molecular assisted breeding for disease resistance in lily. *Eucarpia Gent* July 2001; *Acta Hort* 572: 131-138.
- 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 isoelectric focusing. *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 Creijl, 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.

Eindevaluatie Onderzoek

1. Datum:	14-7-2009
2. Projecttitel:	Innovatieve merkertechnieken t.b.v. resistentieveredeling bij lelie
3. Projectnummer PT:	12402
4. Uitvoerende instelling:	Plant Research International
Projectleider:	Jaap M. van Tuyl
Adres:	Droevendaalse steeg 1 6708 PB Wageningen
Tel:	0317-481085
Fax:	0317-418094
Email:	Jaap.vantuyl@wur.nl

5. Overige uitvoerende instellingen:

6. Gewas(sen): lelie

7. Rendementscategorie: 0. 1. 2. 3. 4.

8. Confrontatie van resultaten en projectverloop met het oorspronkelijke plan

Niet behaalde resultaten:

Afwijkend verloop:

Afwijkende implementatie:

Verklaring:

9. Aanbevelingen:

10. Websamenvatting (maximaal 8 regels óf maximaal 150 woorden)

De nieuwste moleculaire merker technieken (GISH en FISH chromosoomkleurings-technieken; NBS-profyling en DArT moleculaire merkertechnieken) zijn toegepast op lelie met als doel de overdracht van chromosoomfragmenten in kruisingen tussen verschillende leliehybriden (LA OA) te volgen, en in een vroeg stadium te selecteren op resistentie tegen *Fusarium*, *Botrytis* en virus. Hierdoor krijgt men inzicht in de vererving van resistenties in deze hybride-kruisingen, en kan men gericht en efficiënter veredelen. Met GISH is een groot aantal recombinatie gebeurtenissen geïdentificeerd die in verschillende LA en OA-hybriden werden verkregen met behulp van functionele $2n$ -gameten. Op basis van deze recombinatieplaatsen werden vier cytologische kaarten geconstrueerd. De DArT (Diversity Array Technology) is een op microarrays gebaseerde moleculaire merker techniek die variatie in DNA op enkele honderden loci simultaan kan detecteren zonder specifieke informatie van genoomsequenties. In totaal werden 1336 DArT en NBS markers ontwikkeld voor twee populaties samen. Daarvan zijn 197 polymorfe markers geplaatst op 28 koppelingsgroepen in de AA populatie en 376 polymorfe markers geplaatst op 22 koppelingsgroepen in de LA populatie. Er zijn 6 markers voor drie verschillende QTL (voor *Fusarium* en virus resistentie) gevonden die

zijn geconverteerd. Alle merkers waren afkomstig van de DArT aanpak.

11. Publiekssamenvatting (bij voorkeur 1 en maximaal 2 pagina's)

De nieuwste moleculaire merker technieken (GISH en FISH chromosoomkleurings-technieken; NBS-profyling en DArT moleculaire merkertechnieken) zijn toegepast op lelie met als doel de overdracht van chromosoomfragmenten in kruisingen tussen verschillende leliehybriden (LA OA) te volgen, en in een vroeg stadium te selecteren op resistentie tegen *Fusarium*, *Botrytis* en virus. Hierdoor krijgt men inzicht in de vererving van resistenties in deze hybride-kruisingen, en kan men gericht en efficiënter veredelen

Met GISH is een groot aantal recombinatie gebeurtenissen geïdentificeerd die in verschillende LA en OA-hybriden werden verkregen met behulp van functionele $2n$ -gameten. Met behulp hiervan zijn recombinatie kaarten van de 3 *Lilium* genomen geconstrueerd. De BC nakomelingen van de LA-hybriden bestonden uit triploïde ($2n = 3x = 36$), diploïde ($2n = 2x = 24$) en enkele aneuploïde genotypen en die van de OA-hybriden bestonden hoofdzakelijk uit triploïde ($2n=3x=36$) en enkele aneuploïde genotypen. In de LA-hybriden werden 248 recombinatie plaatsen gelokaliseerd op de 12 verschillende chromosomen van elk genoom (L en A). Evenzo werden bij de OA-hybriden 116 recombinatie plaatsen gelokaliseerd op de 12 chromosomen van het O- en A-genoom. De afstand (in micrometer) van de recombinatie plaatsen tot de centromeren werd bepaald. Op basis van deze recombinatieplaatsen werden vier cytologische kaarten geconstrueerd. Omdat de Aziatische ouder in beide hybriden (LA en OA) aanwezig is, werden twee kaarten geconstrueerd voor het A-genoom aangeduid als Aziaat (L) en Aziaat (O) en één voor de Longiflorum (A) en Oriental (A) genomen. Er zijn duidelijke verschillen in de hoeveelheid recombinatie tussen de chromosomen wat consequenties heeft voor de introgressie veredeling van interessante eigenschappen vanuit de ene lelie sectie naar de andere lelie sectie. De moleculair genetische technieken GISH/FISH hebben getoond krachtige instrumenten te zijn voor de constructie van cytogenetische kaarten bij interspecifieke kruisingen in gewassen met grote genomen zoals lelie. Deze technieken zijn ook gebruikt voor de identificatie en integratie van genetische kaarten met chromosoomkaarten. FISH maakt het mogelijk om overgedragen chromosoomsegmenten of merkers te volgen in de nakomelingschappen.

De DArT genotypering is succesvol verlopen. DArT (Diversity Array Technology) is een op microarrays gebaseerde moleculaire merker techniek die variatie in DNA op enkele honderden loci simultaan kan detecteren zonder specifieke informatie van genoomsequenties. De DArT techniek werd aangepast voor LA-hybriden om efficiënt genetische kartering mogelijk te maken. De combinatie van de restrictie enzymen *PstI* + *TaqI* genereerde de hoogste frequentie van polymorfe genomische representaties voor een genotypen array. Genomische representaties van 88 F1 LA planten werden gebruikt om een DArT microarray samen te stellen. In totaal werden 687 DArT merkers ontwikkeld en 345 polymorfe merkers konden worden geplaatst op 22 koppelingsgroepen. De verkregen koppelingskaart is 1641 cM (4.3cM/merker) lang. Vergelijkbare resultaten zijn met een AA populatie behaald. De resultaten onderstrepen de potentie van DArT als genetische techniek voor genoom karakterisering. Toepassing van de DArT techniek is een effectieve methode om genetische koppelingskaarten te construeren, speciaal in gewassen met grote genomen (zoals *Lilium*) waarvoor andere technieken minder bruikbaar zijn gebleken. Er zijn 6 merkers voor drie verschillende QTLs (voor *Fusarium* en virus resistentie) geconverteerd. Alle merkers waren afkomstig van de DArT aanpak.