

UDC 576.312.34:582.572.225 = 862
Izvorni znanstveni rad

DIPLOIDNI KARIOTIPOVI VRSTE *ALLIUM*
SUBHIRSUTUM L. U HRVATSKO-JADRANSKIM
POPULACIJAMA

With Summary in English

MIRA PEJČINOVIĆ

(Zavod za farmaceutsku botaniku, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u
Zagrebu)

Primitljeno 18. 12. 1992

Izvršena je kariotipska analiza populacija vrste *Allium subhirsutum* L. sekcije *Molium* G. Don ex Koch s jadranskog obalnog područja u Hrvatskoj. U svim slučajevima dobiven je diploidni broj kromosoma, $2n = 14$ s kariotipskom formulom $12m + 2sm$ ili $lom + 4sm$ kromosoma koji u regularnoj mejozi formiraju bivalente, $n = 7$.

Uvod

Vrsta *Allium subhirsutum* L. po Stearnu (1978) raširena je u mediteranskoj regiji, i to na stjenovitim i pjeskovitim mjestima južne Europe, sjeverozapadne Afrike i Male Azije. Raširena je i u Mediteranu Hrvatske (Hayek 1933). To je spolno reproduktivna vrsta sekcije *Molium* G. Don ex Koch čije su brojeve kariotipova zabilježili Bolkhovskikh et al. (1969), Stearn (1980) i Miceli et al. (1984), a to su $2n=14$, 21, 28 i 32. $2n=14$ istražili su Martinoli 1955. u Sardiniji, Kurita 1956. vrtne biljke (Italija), Brat 1965. vrtne biljke (Engleska), Dietrich 1967. vrtne biljke (Francuska), Kollmann 1973. u Izraelu, Cela Renzoni & Garbari 1971. na Siciliji. $2n=21$ istražila je Kollmann 1971. u Izraelu. $2n=28$ istražili su Dahlgren et al. 1971. i Bartolo et al. 1981. na Balearskim otocima. $2n=32$ istražili su Jacobsen & Ownebey 1977. na lokalitetu koji je

ovom autoru nepoznat. Nedostajali su podaci kariotipova ove vrste za mediteransko hrvatsko područje tj. za obalno područje Jadrana, gdje je spomenuta vrsta znatno raširena. Neistraženost toga područja i postojanje nekoliko razina ploidije obećavali su studiju hrvatskih populacija te vrste zanimljivom, pa su prvi rezultati o prisutnosti kariotipa s $2n=14$ kromosoma priopćeni 1983 (Pejčinović). Taj se kariotip analizira u ovom radu, i to broj, veličina i oblik somatskih kromosoma te njihove mejotske strukture, i uspoređuje s kariotipovima biljaka stranih populacija, ponajprije izraelskim.

Materijal i metode

Uzorci živih biljaka sabirani su na prirodnim staništima jadranskog obalnog područja u Hrvatskoj, i to desetak biljaka ili manje, ovisno o gustoći populacije na pojedinom lokalitetu. Dio biljaka kultiviran je u Botaničkom vrtu »Fran Kušan« Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu, a dio herbariziran. Kultivirane biljke herbarizirane su nakon kariološke obrade. Sav materijal pohranjen je u herbarij Zavoda za farmaceutsku botaniku spomenutog fakulteta. Lokaliteti istraženih biljaka prikazani su u tablici 1.

Analizirani su mitotski kromosomi iz meristema korijenovih vršaka biljaka i prokljalih sjemenki. Korijenovi vršci su predtretirani 1-bromnaftalinom tijekom 21 sata na $+4^{\circ}\text{C}$, fiksirani u aceto-alkoholu u omjeru 1 : 3 i pohranjeni u hladionik. Nakon hidrolize u 1n HCl 2—3 minute na 60°C ispirani su i bojeni Feulgenom, a u kapljici karmin-octene kiseline zgnječeni (Hillary 1939). Fotografirane su metafaze mitotskih kromosoma uz povećanje 500 puta na negativu, a pri izradi fotografija još 4 puta, tako da je konačno povećanje kromosoma iznosilo 2 000 puta (sl. 1). Pri takvu povećanju izmjereni su krakovi svakog kromosoma u kompletu. Brojčani podaci homolognih kromosoma grupirani su i računarski obrađeni a rezultati prikazani u tablicama, i to za jednu biljku, jednu populaciju (tablica 2), te za biljke svih populacija. Izračunate su srednje vrijednosti duljih (D) i kraćih (K) kromosomskih krakova (u mikrometrima) te njihove standardne devijacije (s), ukupna duljina krakova (U), relativna duljina duljih i kraćih kromosomskih krakova i cijelog kromosoma s obzirom na ukupnu duljinu svih kromosoma (%). Iz odnosa duljine dužih i kraćih kromosomskih krakova pri svakom pojedinačnom kromosomu dobiven je kromosomski indeks (D:K). Iz tog odnosa dobiven je tip kromosoma s obzirom na položaj centromere (prema uputama Murina 1970). Na taj način su dobiveni podaci za 2 do 8 mitoza po biljci, ukupno za četrdeset biljaka iz deset populacija. Podaci iz tablice 2 rezultati su 27 mitoza iz šest biljaka jedne populacije.

Analizirani su mejotski kromosomi matičnih stanica polena iz zrelih prašnika. Prethodno su izdvojeni cvjetni pupoljci s kultiviranih i autohtonih biljaka tijekom trećeg i četvrtog mjeseca i fiksirani u aceto-alkoholu (kako je već opisano) te pohranjeni u hladionik, ili su obrađivani svježi prašnici. Odabir prašnika veličine do 1 mm obavljen je u optimalno vrijeme protoka mejoze, a to je 9 do 13 odnosno 15 sati. Izdvojeni prašnici zagrijavani su u kapljici karmin-octene kiseline i gnječanjem su istisnute matične stanice s obojenim mejotskim kromosomima. Kromosomi su analizirani i fotografirani s povećanjem 250 puta na negativu i 4 puta na fotografiji, tako da konačno povećanje slika 2 i 3 iznosi 1000 puta.

Rezultati i rasprava

U mediteranskoj Hrvatskoj vrsta *Allium subhirsutum* raširena je na jadranskom obalnom području s kojeg je kariološki istraženo četrdeset biljaka s jedanaest populacija, odnosno lokaliteta. Dio rezultata prikazan je u tablicama 1 i 2 i slikama 1 do 3.

Za sve istražene populacije utvrđen je kromosomski broj $2n=14$, što potvrđuje da su biljke diploidi (sl. 1). Taj je broj poznat već otprije i za-bilježen je za strane populacije, a nalazom u biljaka s mediteranske Hrvatske je potvrđen. Očekivani kariotip s $2n(3x) = 21$ i kariotip $2n(4x) = 28$ nije pronađen.

Tab. 1.

<i>Allium subhirsutum</i>	Lokaliteti populacija	Broj istraženih biljaka sa	
	Localities of populations	$2n = 14$	$n = 7$
	Javorno (Veli Lošinj)	7	7
	Punta Križa (otok Cres)	1	
	Osejave (Makarska)		2
	Biokovo	6	2
	Staza Sv. Jurja (Podgora)	7	5
	Blato (Živogošće)	8	5
	Baćinska jezera (Ploče)	2	
	Rudine (Ston)	2	1
	Mlini	1	1
	Cavtat	1	
	Čilipi (Konavle)	3	

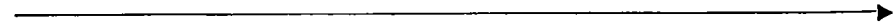
Tab. 2. Rezultati mjerenja kromosoma *Allium subhirsutum* iz populacije BiokovoTab. 2. Results of chromosome measurements of *Allium subhirsutum* from the Biokovo population

Kromosomi Chromosomes	D	s	%	K	s	%	U	%	D:K	Tip Type
1.2	6.55	0.72	4.55	5.98	0.77	4.15	12.53	8.70	1:0.91	m
3.4	6.50	0.70	4.51	5.34	0.62	3.71	11.84	8.23	1:0.82	m
5.6	5.92	0.69	4.11	5.25	0.68	3.64	11.17	7.76	1:0.88	m
7.8	5.55	0.65	3.85	4.85	0.58	3.37	10.40	7.22	1:0.87	m
9.10	4.94	0.58	3.43	4.50	0.55	3.12	9.44	6.56	1:0.91	m
11.12	4.60	0.53	3.19	3.45	0.50	2.39	8.05	5.59	1:0.75	m
13.14	5.37	0.55	3.73	3.13	0.34	2.17	8.50	5.90	1:0.58	sm
Ukupno Total	143.86 μm									

Veličina 14 metafaznih kromosoma prikazana je brojčanim podacima u tablici 2, a odnose se na kromosome 27 mitoza šest biljaka populacije Biokovo. Duljina kromosoma varira, što se vidi iz ukupne duljine (U), i kreće se od 8,05—12,53 μm od najkraćeg do najduljeg. Njihova standardna devijacija (s) za dulji krak (D) i kraći krak (K) ne prelazi 1 μm . Variranje u duljini kromosoma od najkraćeg do najduljeg ne prelazi 4,5 μm kako je to u opisanoj populaciji. Brojčani podaci devet populacija (čije tablice nisu prezentirane) vrlo su slični opisanima iz tablice 2. Njihovi su kariotipovi kraći ili dulji od opisanog s $\pm 4,5 \mu\text{m}$ razlike od najkraćeg do najduljeg kromosoma.

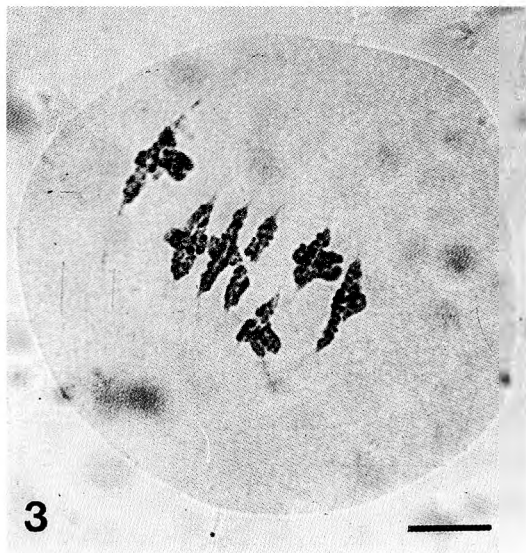
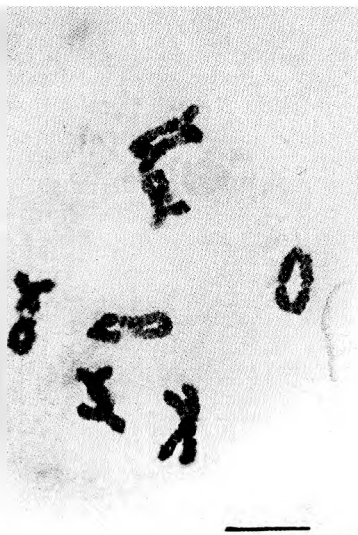
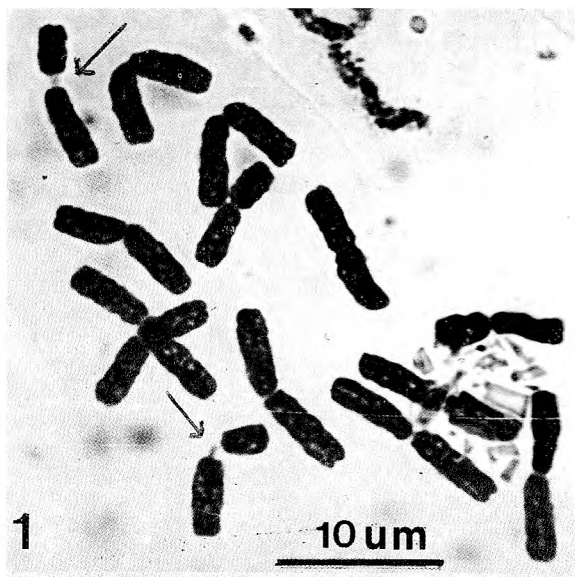
Oblik kromosoma upućuje na slabu ili veoma malu kariološku asimetriju (Stebbins 1971) jer ni u jednog kromosomskog homologa omjer D:K nije ispod 1:0,5. Nađena su dva tipa kromosoma, i to metacentrični (m) i submetacentrični (sm). Prvi prevladavaju nad drugima. Metacentričnih kromosoma je deset ili dvanaest, i poredani su po opadajućim vrijednostima od najduljeg do najkraćeg, tj. od 1—10 ili od 1—12 (tablica 2). Submetacentrična su dva ili četiri, tj. 13—14 (tablica 2) ili 11—14. Kromosomi 13 i 14 nisu uvijek i najkraći, ali su posljednji u nizu jer su nukleolarni (s jezgrićom uz centromer). Nije primijećen heteromorfizam u duljini nukleolarnog regiona tog kromosoma nazvanog, upravo zbog te regije, »neapolitanum« tip. Što se tiče oblika kromosoma, treba istaknuti da razlike u obliku pokazuju samo 11. i 12. kromosom. Oni su u 40% kariotipova metacentrični, a u 60% submetacentrični. Za prve je odnos krakova 1:0,83—0,75 μm , tj. kariotipska formula $12m+2sm$ (tablica 2), a za druge 1:0,74—0,68 μm , tj. kariotipska formula $10m+4sm$. U svih ostalih kromosoma (šest pari) oblik je nepromijenjen, tj. kromosomi su homomorfni. Svi kariotipski parametri upućuju na stabilnost kariotipa, što se odražava i na regularni tijek mejoze.

Mejotski kromosomi matičnih stanica polena praćeni su na kultiviranim i na autohtonim biljkama, i to u 23 biljke sedam populacija (tablica 1). Pokazalo se da je mejoza pravilna, te da se kromosomi pojavljuju u obliku bivalenta, $n=7$. U dijakinezi (sl. 2) s izraženim hijzmatama, metafazi I. (sl. 3) prstenasti su i štapasti, pravilno orijentirani i na kraju mikrosporogeneze formiraju polenske jezgre bez ostataka kromosoma (fragmenata). U malom broju primijećene su nepravilnosti, kao npr. abortivne matične stanice polena, a jedna od devijacija karakterističnog ponašanja kromosoma je sparivanje nehomolognih kromosoma.



Sl. 1—3. Kromosomi vrste *Allium subhirsutum*. 1. $2n=14$. Kariotip somatskih kromosoma vrška korijena od $12m+2sm$ s regijom nukleolarnog organizatora (strelice). 2—3. $n=7$. Kromosomi matičnih stanica polena (2. bivalenti s hijzmatama, 3. prstenasti i štapasti bivalenti metafaze I).

Figs. 1—3. Chromosomes of *Allium subhirsutum*. 1. $2n=14$. Karyotype of somatic chromosomes from the root tips of $12m+2sm$ with nucleolar organizing regions (arrows). 2—3. $n=7$. Chromosomes of pollen mother cells (2. bivalents with chiasmata, 3. ring-shaped and rod-shaped bivalents of metaphase I).



Sl. 1—3.

Iz svega izlazi da je diploidni kariotip *A. subhirsutum* s $2n=14$ kromosoma rasprostranjen u hrvatskim populacijama Mediterana. Sadašnji podaci hrvatskog kariotipa potvrđuju prijašnja istraživanja kariotipova. Tako je hrvatski kariotip sličan izraelskom kariotipu *A. subhirsutum* subsp. *hirsutum* var. *hirsutum* Koll. (a taj onima koje su opisali ovi autori: Kurita 1956, 1960, 1968; Cela Renzoni & Garbari 1971 — u: Kollmann 1973:103). Izraelski kariotip opisan je kao kariotip sa šest pari metacentričnih i jednim parom submetacentričnih nukleolarnih kromosoma i predstavljen s $n=7$ kromosoma polenske mitoze (Kollmann 1973:101). Dakle, razlikuju se samo u 11. i 12. kromosomu koji su u izraelskom kariotipu jednoobrazni i uvijek metacentrični, Nukleolarni se kromosomi ne razlikuju i prisutni su i u izraelskom i u hrvatskom kariotipu u jednakom broju i obliku, tj. kao par submetacentričnih kromosoma koje Kurita (1960. u: Kollmann 1970:652) izdvaja kao kromosom »dugog centromera«, a Brat (1965:493) kao kromosom »neapolitanum« tipa. Kollmann (1973) smatra izraelski diploidni kariotip stabilnim kariotipom s visokim stupnjem simetrije, a to potvrđuju rezultati hrvatskog kariotipa. Dokazuje da taj kariotip s $x=7$ kromosoma predstavlja ishodišni oblik za izraelski nestabilni triploid *A. subhirsutum* subsp. *hirsutum* var. *sterile* Koll., što je moguće kroz križanje heterogameta. Taj je podatak važan stoga što triploid s $2n=21$ kromosom nije nađen u populacijama mediteranske Hrvatske. Nije nađen ni tetraploid s $2n=28$ kromosoma, s Balearskih otoka, kojeg su opisali Dalhgren et al. 1971., Bartolo et al. 1981. (u: Miceli et al. 1984:794). Izvorni podaci za kariotip $2n=32$ autoru nisu bili dostupni.

U novijim citotaksonomskim radovima iz kompleksa *A. subhirsutum* izdvaja se triploidni $2n$ ($3x$)= 21 *A. subhirsutum* subsp. *hirsutum* var. *sterile* i identificira (Kollman & Stearn 1975. u: Miceli et al. 1984:794) kao *A. trifoliatum* ssp. *hirsutum* var. *sterile*. Stoga je *A. subhirsutum* u europskoj flori zabilježen samo sa dva kariotipa, $2n=14$ i 28 (Stearn 1980).

Osim mitotskih i nalazi mejotskih konfiguracija hrvatskih populacija potvrđuju ranije. Jedan od primjera iz strane populacije je slika bivalenata, $n=7$ metafaze I u prilogu Brata (1965a: tabla II-1) prstenastih oblika sličnih onima iz hrvatskih populacija.

Kako je istražena vrsta spolno reproduktivna (Brat 1965a, Radić 1990) potrebno je istaći da je primijećena visoka produkcija sjemena i u prirodnim i u kultiviranim populacijama. To je važna značajka ove vrste u odnosu na mnogobrojne druge *Allium*-vrste koje imaju djelomičnu ili potpunu vegetativnu reprodukciju (Bothmer 1970).

Zaključak

U mediteranskoj Hrvatskoj, i to u obalnom dijelu Jadrana, raširen je samo standardni oblik *Allium subhirsutum* čiji je kariotip prvi put predstavljen. To je diploid s $2n=14$ kromosoma.

Veličina mitotskih kromosoma kreće se od 8,05—12,53 μm od najkraćeg do najduljeg kod biljaka populacije Biokovo. Raspon od najkraćeg do najduljeg kromosoma je $\pm 4,5$ μm . Standardna devijacija u veličini homologa u oba kraka je ispod 1 μm .

Oblik kromosoma je metacentričan i submetacentričan s kariotipskom formulom $12m+2sm$ u 40% kompleta i $10m+4sm$ u 60% kompleta. Prvi

podatak odgovara izraelskom kariotipu. U svakom kompletu prisutna su dva nukleolarna submetacentrična kromosoma poznati kao »neapolitanum« tip. Heteromorfizam pokazuje samo jedan par kromosoma (11—12), šest parova uvijek su homomorfni.

Mejotski kromosomi u obliku bivalenta, $n=7$, s jasnim hijazmama u dijakinezi, prstenasti i štapasti u metafazi I, s pravilnom orijentacijom, i u daljnjem tijeku mejoze ponašaju se regularno i formiraju polenske jezgre bez ostataka kromosoma.

Dakle sve istražene biljke, međusobno udaljenih populacija, odnosno njihovi kariotipovi uglavnom s homomornim kromosomskim parovima, pokazuju regularnu bivalentnu formaciju u mejozi.

*

Zahvala. Rad je izrađen u Citološkom laboratoriju Instituta za biologiju Univerziteta u Ljubljani uz nesebičnu pomoć dr. Blanke Drašković i dr. Milana Lovke, kojima autor mnogo zahvaljuje.

Literatura

- Bolkhovskikh, Z., V. Grif, T. Matvejeva, O. Zakharyeva*, 1969: Chromosome Numbers of Flowering Plants. Nauka. Leningrad.
- Bothmer, R.*, 1970: Cytological Studies in *Allium* I. Chromosome Numbers and Morphology in sect. *Allium* from Greece. Bot. Not. 123, 519—551.
- Brat, S. V.*, 1965: Genetic systems in *Allium* I. Chromosome variation. Chromosoma 16, 486—499. Berlin.
- Brat, S. V.*, 1965a: Genetic systems in *Allium* III. Meiosis and breeding systems. Heredity 20, 325—339.
- Hayek, A.*, 1933: Prodromus Florae peninsulae Balcanicae 3. Dahlem, Berlin.
- Hillary, B.*, 1939: Improvements to the permanent root tip squash technic. Stain. Techn. 14, 97—99.
- Kollmann, F.*, 1970: Karyotypes of three *Allium* species of the *Erdelii* group. Caryologia 23 (4), 647—655. Firenze.
- Kollmann, F.*, 1973: Karyology of some species of *Allium* section *Molium* in Israel, Israel Journ. Bot. 22, 92—112.
- Miceli, P., G. Fucini, F. Garbari*, 1984: The genus »*Allium*« L. in Italy. XIII. Morphological, cariological and leaf anatomical study in some C-W Mediterranean triploid populations of »*Allium trifoliatum*« Cyr. Webbia 38, 793—803. Firenze.
- Murin, A.*, 1970: Prispevek ku klasifikaciji tipov chromozomov a ich označovanju. Acta F.R. N. Univ. Comen. Bot. 16, 37—41.
- Pejčinović, M.*, 1983: Kariologija vrste *Allium subhirsutum* L.. Savjetovanje stručnjaka za ljekovito bilje Jugoslavije. Izvodi radova, 57 Ildža/Sarajevo.
- Radić, J.*, 1990: Contribution to the Knowledge of Reproductive Peculiarity of Genus *Allium* L.. Razprave IV. razreda SAZU 31, 247—269.
- Stearn, W. R.*, 1978: European species of *Allium* and allied genera of *Alliaceae*: a synonymic enumeration. Annales Musei Goulandris 4, 83—198. Kifissia.
- Stearn, W. R.*, 1980: *Allium* L. — In: Tutin, T. G., V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb: Flora Europaea 5, 49—69. Univ. Press, Cambridge.
- Stebbins, G. L.*, 1971: Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold (Publ.), London.

SUMMARY

ALLIUM SUBHIRSUTUM DIPLOIDS IN CROATIAN-ADRIATIC POPULATIONS

Mira Pejčinić

(Institute of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,
University of Zagreb)

Allium subhirsutum L. species of the section *Molium* G. Don ex Koch is very common in the Mediterranean region of Croatia on the Adriatic Littoral. Forty plants from eleven populations coming from this area were studied. All these plants are diploids whose karyotype contains $2n=14$ chromosomes. A karyotypic analysis of the number, size and shape of chromosomes has revealed the following:

The chromosome number $2n=14$ of this diploid is stable. The expected triploid $2n=21$ and tetraploid $2n=28$ were not found.

The range of the size of chromosomes, from the shortest to the longest, was 8.05—12.53 μm , and standard deviation, both for the longer and the shorter arm, did not exceed 1 μm . The values, apart from the ones given, can be slightly higher or lower (i.e. the karyotype longer or shorter), however, the difference between the shortest and longest chromosome is $\pm 4.5 \mu\text{m}$.

The shape of the chromosomes is metacentric and submetacentric. The former predominate over the latter and in 40% of mitoses the karyotype formula is $12m+2sm$, while in 60% of them $10m+4sm$ chromosomes. In each karyotype there are two submetacentric nucleolar chromosomes, known as the »neapolitanum« type, which are not the shortest in size in the regressing series of chromosomes. The karyotype is generally very stable, which is also reflected in the normal course of meiosis.

The meiotic chromosomes are bivalent, $n=7$, ring-shaped and rod-shaped in metaphase I., and during the entire course of meiosis they behave regularly forming nuclei (of pollen) without chromosome fragments.

In short, all the studied karyotypes of *Allium subhirsutum* from eleven populations of the Mediterranean region of Croatia are mainly homomorphic (uniform), stable and of a high degree of symmetry, which are preconditions for a regular, bivalent formation in meiosis.

The karyotype studied is similar to the karyotype of foreign populations, and this study provides a supplement to the data for the Mediterranean region of Croatia.

Dr. Mira Pejčinić
Zavod za farmaceutsku botaniku
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Šrotova 39
Zagreb, Hrvatska (Croatia)