

CITOTAKSONOMSKA I CITOGENETSKA
ISTRAŽIVANJA VRSTA RODA *LEUCANTHE-*
MUM ADANS. EM. BRIQU. ET CAV.
NA PODRUČJU JUGOSLAVIJE

II

POREDBENI STUDIJ DIPLOIDNIH VRSTA:
L. ROTUNDIFOLIUM (W. K.) DC. i *L. PRAECOX* H-ić

With Summary in English

DRAŽENA MIRKOVIĆ

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

Prilijeno 1. 10. 1968.

U V O D

Za kompleksno citotaksonomsko i citogenetsko proučavanje svih vrsta roda *Leucanthemum* na području Jugoslavije potrebno je dobro poznavati osnovni kariotip, odnosno kariotipove roda, koje upravo predstavljaju diploidne vrste. U Jugoslaviji su dosad poznate dvije diploidne vrste: *L. rotundifolium* (W. K.) DC. syn. *Chrysanthemum leucanthemum* L. i *L. praecox* H-ić syn. *Chrysanthemum leucanthemum* L. Broj kromosoma im je istražen i iznosi kod jedne i druge vrste $2n = 18$ (Mirković 1966).

Mnogi autori izbrojili su kromosome diploidnih vrsta *Leucanthemum* (Shimotomai 1937, Polya 1950, Martin i Smith 1955, Baksay 1956, Böcher i Larsen 1957, Mulligan 1958, Gacek /Skalinska i sur. 1961/, Guinochet i Logeois 1962, Larsen Löve i Solberg 1965); neki su također objavili crteže i mikrofotografije (Duckert i Favarger 1956, Favarger 1959, Favarger i Villard 1965, Zeleny 1965, Polatschek 1966). Kariogram, međutim, do sada nije potanje obrađen, a također ni morfologija kromosoma. Postoji naime niz poteškoća kod analize kariograma vrsta ovog roda.

2. Materijal i metode

Citološka ispitivanja vršena su na materijalu koji je donešen s prirodnih staništa. Svi primjerci nalaze se dijelom kao eksikati u posebnom herbariju, a osim toga dalje se uzgajaju u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

L. rotundifolium sakupljen je na planini Vranici, koja je ujedno jedino nalazište u Jugoslaviji (tab. 1).

Tablica 1. *L. rotundifolium*, popis nalazišta
Table 1. *L. rotundifolium*, list of localities

Nalazište Locality	Stanište Habitat	Nadmorska visina Altitude	Sakupljeno Collected	Sakupio Collector
Bosna, planina Vranica: iznad Prokoškog jezera	<i>Pinetum mughi croaticum</i> WN — exp.	1900 m	1962 1968	Č. Šilić autor
Travnička vrata	W — exp.	1800 m	1968	Č. Šilić

Primjerci vrste *L. praecox* studirani su s 11 nalazišta (tab. 2).

Tablica 2. *L. praecox*, popis nalazišta
Table 2. *L. praecox*, list of localities

Nalazište Locality	Stanište Habitat	Nadmorska visina Altitude	Sakupljeno Collected	Sakupio Collector
Hrvatska: Zagreb — Gračani	uz rub ceste	250 m	1960	autor
Zagreb — Ponikve	brdska livada	450 m	1968	autor
Samobor	rub šume	200 m	1966	autor
Hrv. Zagorje Novi Dvori	<i>Bromo- Cynosuretum cristati</i>	100 m	1968	autor
Istra: Buzet	napuštena kultura	250 m	1968	autor
Platak	planinska livada	1110 m	1968	autor
Gornje Jelenje	uz cestu	500 m	1968	autor
Osijek: Satnica	livada: <i>Ventena- to- Trifolietum pallidi</i>	90 m	1960	Lj. Ilijanić
Slovenija Pohorje	planinska livada	1065 m	1968	Z. Devidé
Bosna i Hercegovina Livanjско polje	brdska livada	710 m	1966	Č. Šilić

Za studij mitoze korjenčići su fiksirani u različito doba dana (od 7 do 15 sati) pri čemu nije primijećen nikakav poseban maksimum mitotske frekvencije. Korijeni su pretretirani ili s kolhicinom (Levan 1938) ili s 8-oksikinolinom (Tjio i Levan 1950) nakon čega su fiksirani u acetoalkoholu (1:3). Nakon hidrolize u 1N HCl obojeni su Feulgenovim postupkom (Feulgen 1926). Preparati su rađeni »squash« tehnikom (Heitz 1935, Hillary 1939) u aceto-orceinu.

Mejotska dioba je studirana u matičnim stanicama polena. U tu svrhu su mladi pupovi fiksirani u acetoalkoholu. Nakon izolacije antere su bojene karmin-octenom ili orcein-octenom kiselinom. Tehnikom razmaza pravljeni su preparati (Darlington i LaCour 1963).

Najbolji stadiji crtani su s pomoću aparata za crtanje i fotografirani.

3. Rezultati

Iz popisa nalazišta (tab. 1 i 2) može se vidjeti razlika između ove dvije vrste. *L. rotundifolium* dolazi u Jugoslaviji samo na planini Vranici (Horvatić i Pawlowski 1939), dok je *L. praecox* široko rasprostranjen po čitavoj Jugoslaviji (Horvatić 1963).

Po vanjskoj morfologiji se potpuno razlikuju (Horvatić 1935 i 1963). Razlike su osobito upadljive u morfologiji listova (sl. 1 i 2). *L. rotundifolium* ima listove razmjerno tanke s jednolično nazubljenim rubovima. Donji su okruglasto-jajasti, a gornji okruglasto-rompski. *L. praecox* ima duboko urezane listove, koji su pri bazi rašireni poput uške, koja je rascijepana.

Po broju kromosoma se vrste *L. rotundifolium* i *L. praecox* ne razlikuju. Njihov diploidni komplet uvijek sadrži 18 kromosoma (Mirkoović 1966). Već kod prvog pogleda na metafazne kromosome (sl. 3 i 4) jasno se vidi da su im kromosomi veoma slični. Položaj centromera, što je zapravo najvažnije obilježje za izradu kariograma, vrlo se malo razlikuje kod pojedinih kromosoma. Zbog ove činjenice, kariogram, odnosno analizu pojedinih kromosoma, nije bilo moguće izraditi na osnovi nekoliko crteža, kao što su to već pokušavali neki autori kod nekih drugih vrsta glavčika (Matsuda 1966 i 1967). Kod vrsta roda *Leucanthemum* morale su se uzeti aritmetičke sredine mjerenja dužine kromosoma iz dvadesetak crteža, odnosno mikrofotografija od kojih se kasnije konstruirao kariogram. Osim dužine kromosoma izražene u μ , obrađena je njihova relativna dužina (tab. 3 i 4); također je računski obrađen i položaj centromera pa oznaka $F\%$ (tab. 3 i 4) predstavlja postotke prosječne dužine kraćeg kraka naprama prosječnoj totalnoj kromosomskoj dužini. U tablicama 3 i 4 i u kariogramima (sl. 5 i 6) od 18 kromosoma utvrđeno je, pomoću uspoređivanja vrijednosti iz svih crteža, 9 parova, koji su privremeno poredani abecednim redom u serije, gdje se po duljini smanjuju. Satelitni kromosomi označeni su indeksom «s», koji je stavljen uz slovo oznake kromosoma.

Analizom kariograma (tab. 3 i sl. 5) ustanovljeno je da kod vrste *L. rotundifolium* dužina kromosoma iznosi od 7.6 — 5.5 μ . Kariotip karakteriziraju tri kromosomska tipa. Prvi tip predstavljaju submetacentrični kromosomi (A, B, D) među kojima postoje vrlo male razlike, drugi tip metacentrični kromosomi (C, E, H, I), a treći tip satelitni (Fs, Gs) koji su submetacentrični.

Tablica 3. *L. rotundifolium*, mjerenje somatskih kromosoma
 Table 3. *L. rotundifolium*, measurements of somatic chromosomes

Kromosomi Chromosomes	Dužina u μ Length in μ	Relativna dužina Relative length	F ⁰ / ₀ F ⁰ / ₀	Centromeri Centromeres
A	2,6 + 5,0 = 7,6	100	34	sm
B	2,7 + 4,5 = 7,2	95	37	sm
C	3,4 + 3,4 = 6,8	89	50	m
D	2,6 + 4,0 = 6,6	87	39	sm
E	3,25 + 3,25 = 6,5	85	50	m
Fs	2,1 + 4,1 = 6,2	81	29	sm
Gs	2,2 + 3,8 = 6,0	79	37	sm
H	2,9 + 2,9 = 5,8	76	50	m
I	2,75 + 2,75 = 5,5	72	50	m

Kod vrste *L. praecox* (tab. 4 i sl. 6) dužina kromosoma je 6,8 — 4,6 μ . Iz priložene tablice (tab. 4) i kariograma (sl. 5) vidi se da *L. praecox* ima četiri kromosomska tipa: submetacentrični koji obuhvaća kromosomske parove s oznakom A, B, D i H, metacentrični E i I te dva tipa satelitnih od kojih su Fs i Gs submetacentrični, a Cs metacentrični.

Tablica 4. *L. praecox*, mjerenje somatskih kromosoma
 Table 4. *L. praecox*, measurements of somatic chromosomes

Kromosomi Chromosomes	Dužina u μ Length in μ	Relativna dužina Relative length	F ⁰ / ₀ F ⁰ / ₀	Centromeri Centromeres
A	2,9 + 3,9 = 6,8	100	43	sm
B	2,5 + 3,9 = 6,4	94	39	sm
Cs	3,0 + 3,0 = 6,0	88	50	m
D	2,2 + 3,6 = 5,8	87	38	sm
E	2,85 + 2,85 = 5,7	85	50	m
Fs	1,8 + 3,8 = 5,6	82	29	sm
Gs	2,0 + 3,0 = 5,0	73	34	sm
H	2,1 + 2,9 = 5,0	73	42	sm
I	2,4 + 2,4 = 4,8	71	50	m

Mejoza se odvija uglavnom pravilno, osim nekih nepravilnosti u toku mejoze II koje nisu česte (sl. 10). Kod jedne i druge vrste uvijek je prisutno 9 bivalenta (sl. 7, 8 i 9). U dijakinezi i metafazi I studirani su pojedinačno bivalenti, tok terminalizacije i učestalost (frekvencija) hijazmi (tab. 5).

Kao što se vidi iz tabele 5, *L. rotundifolium* karakteriziraju bivalenti s većim brojem hijazmi, uglavnom s 2 ili čak 3 hijazme po bivalentu (sl. 7 i 8). Nukleoli su prisutni sve do metafaze I.

Kod *L. praecox* redovito susrećemo i u dijakinezi i u metafazi I (sl. 9) bivalente s 1 ili s 2 hijazme. Nukleoli nestaju prije metafaze I.

Tablica 5. Zbirni prikaz karakteristika hijazma diploida (*Leucanthemum*)
 Table 5. A summary of the chiasma characteristics of diploids
 (*Leucanthemum*)

Vrsta	Br. jedinki	Br. zbr. st.	Br. hijaz. po st.	Br. term. hijaz. po st.	Broj bivalenata s		
					1 hij.	2 hij.	3 hij.
Species	Indivi- duals	No. of cells scored	No. of Xta per cell	No. of term. Xta per cell	No. of bivalents with		
					1. Xta	2. Xta	3. Xta
<i>L. rotundifolium</i>	1	10	18,4	13,5	0,8	7,3	0,9
	2	10	18,6	13,9	0,6	7,2	1,2
<i>L. praecox</i>	1	10	14,7	14,4	3,3	5,7	—
	2	10	15,0	14,6	2,8	6,2	—

Postojanje satelitnih kromosoma potvrđeno je i studijem nukleola, koji su vrlo dugo vidljivi. Kod *L. rotundifolium* u dijakinezi se 1 bivalent drži za 1 nukleolus, dok se kod *L. praecox* u istoj fazi 2 do 3 bivalenta drže za 1 nukleolus, koji je očito nastao stapanjem više nukleola.

4. Diskusija

Poznato je da se vrste roda *Leucanthemum* odlikuju velikom varijabilnošću i polimorfnošću (Dowrick 1952, Böcher i Larsen 1957, Löve i Löve 1961, Skalinska 1964, Favarger i Villard 1965, Polatschek 1966). Kod ovdje istraživanih dviju diploidnih vrsta, *L. rotundifolium* i *L. praecox*, ni polimorfnost ni varijabilnost nisu uočene. Mitoza i mejoza odvijaju se također pravilno što upućuje na ustaljenost ovih vrsta, tj. ukazuje na njihovo porijeklo (Duckert i Favarger 1956, Mirković 1966).

Značajna je činjenica da ove vrste ni u kakvom slučaju ne mogu doći u međusobni kontakt, jer je jedna (*L. rotundifolium*) lokalizirana samo na planini Vranici u Bosni, na visini preko 1800 m, dok je druga (*L. praecox*) rasprostranjena u nizinskom području i nižim planinama. Vjerojatno takorazdvojeno žive već od prije glacijacije. Po morfološkim karakteristikama ove se dvije vrste također jako razlikuju (sl. 1 i 2).

Većih razlika u njihovom kariogramu nema, osim što imaju različiti broj satelitnih kromosoma (sl. 5 i 6). *L. praecox* ima 6, a *L. rotundifolium* samo 4 satelitna kromosoma. Na kraju još treba spomenuti da postoje razlike učestalosti hijazma kod bivalenata, što se može dovesti u vezu s dužinom kromosoma. Tako kod vrste *L. rotundifolium* dolazi do stvaranja većeg broja hijazma po stanici.

Rezultati međusobnog križanja ovih dviju vrsta mogli bi nam približe objasniti njihove srodstvene odnose. To do sada nije bilo moguće izvesti zbog potpuno različite dobi cvatnje. Možda će se, međutim, u eksperimentalnim uvjetima uzgoja moći te poteškoće svladati.

TUMAČ SLIKA — EXPLANATION OF FIGURES

Tabla 1 — Plate 1

Sl. 1. *L. rotundifolium*, listovi rozete i stabljike.

Sl. 2. *L. praecox*, listovi rozete i stabljike.

Fig. 1. *L. rotundifolium*, the leaves of the rosette and stem.

Fig. 2. *L. praecox*, the leaves of the rosette and stem.

Tabla 2 — Plate 2

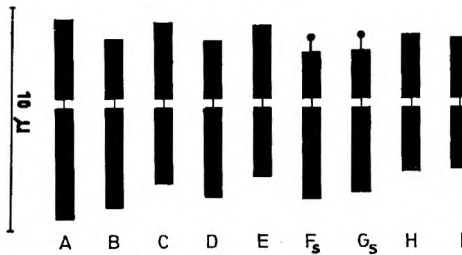
Sl. 3. *L. rotundifolium*. Mitotski kromosomi (8-oksikinolin, Feulgen), a) crtež, b) mikrofotografija.

Fig. 3. *L. rotundifolium*. Mitotic chromosomes (8—oxyquinoline, Feulgen), a) Drawing, b) Microphotograph.

Tabla 3 — Plate 3

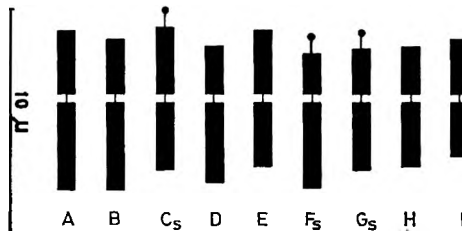
Sl. 4. *L. praecox*. Mitotski kromosomi. (8—oksikinolin, Feulgen). a) crtež, b) mikrofotografija.

Fig. 4. *L. praecox*. Mitotic chromosomes (8—oxyquinoline, Feulgen), a) Drawing, b) Microphotograph.



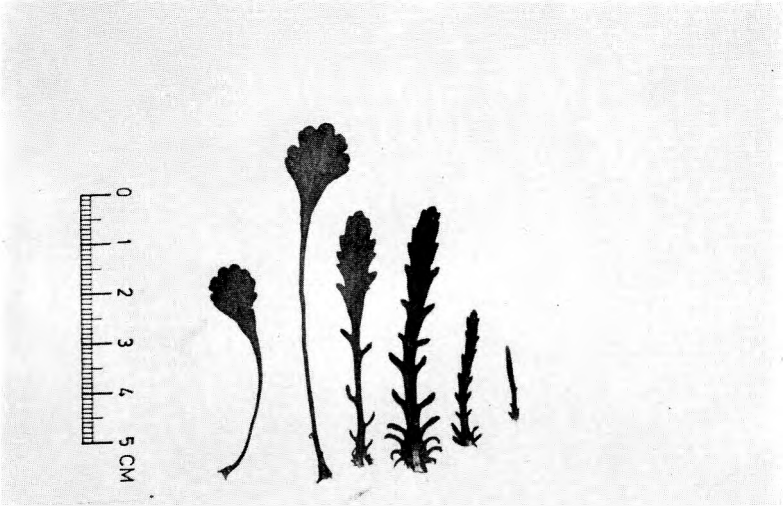
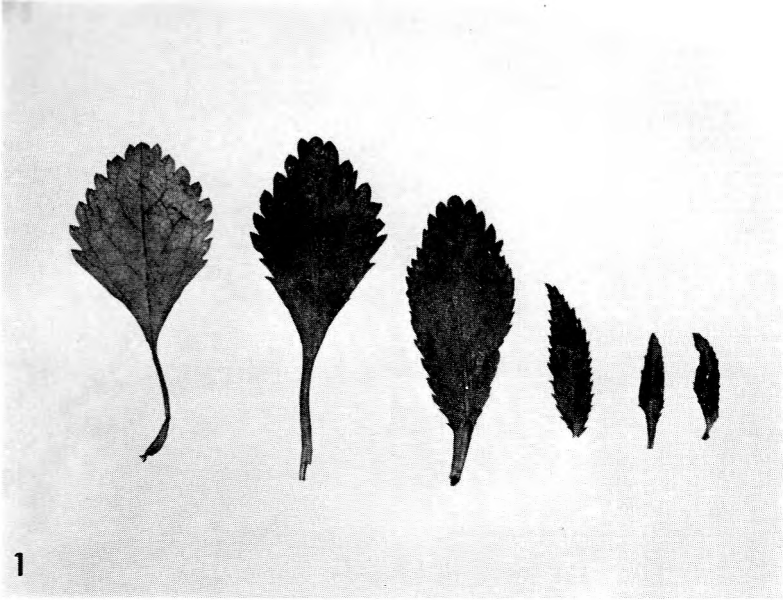
Sl. 5. *L. rotundifolium*. Shematski prikaz haploidnog kariograma.

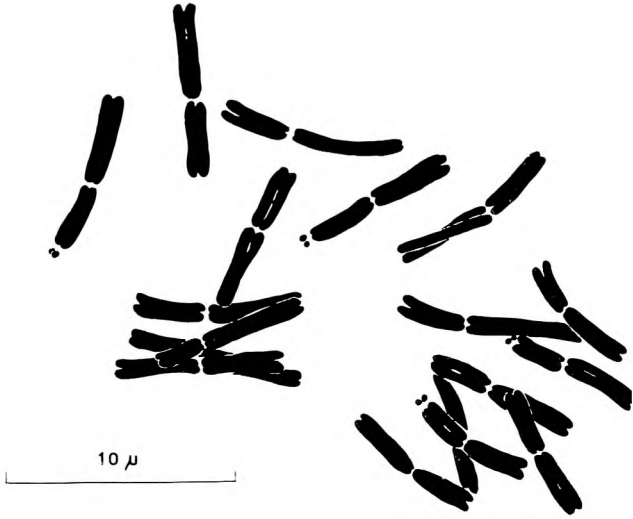
Fig. 5. *L. rotundifolium*. Schematic representation of the haploid karyogram.



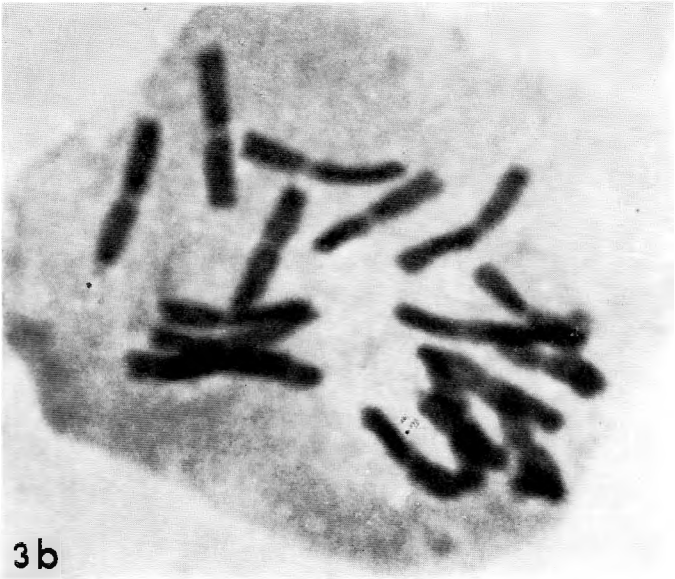
Sl. 6. *L. praecox*. Shematski prikaz haploidnog kariograma.

Fig. 6. *L. praecox*. Schematic representation of the haploid karyogram.

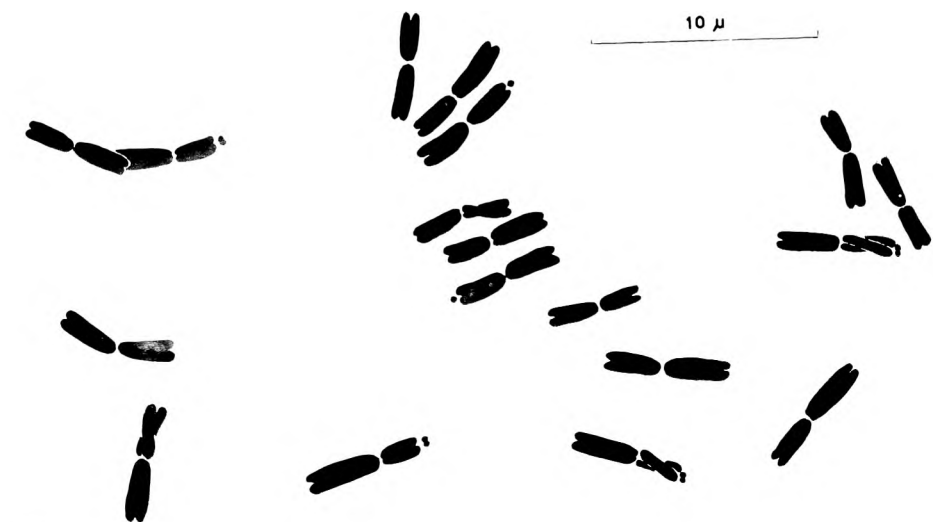




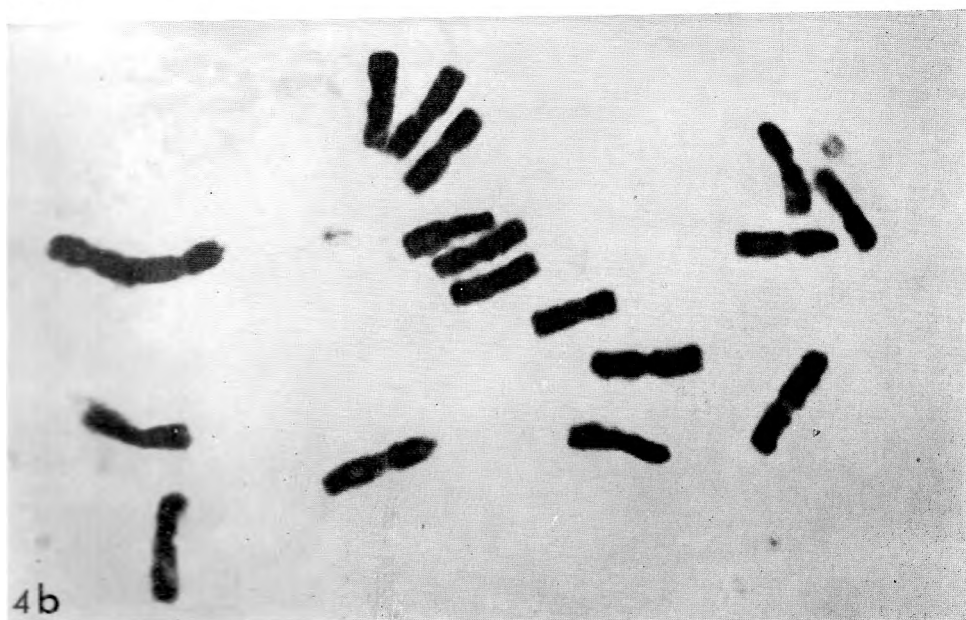
3a



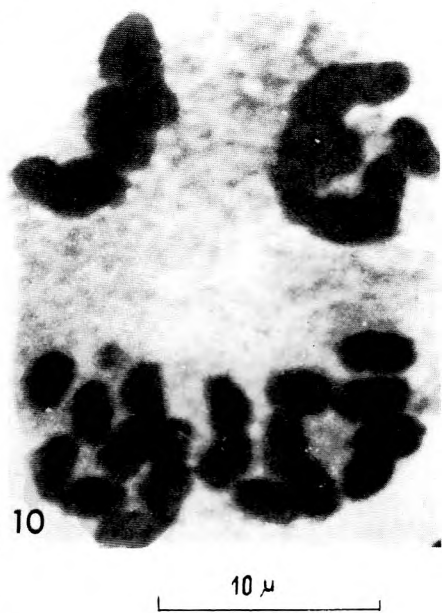
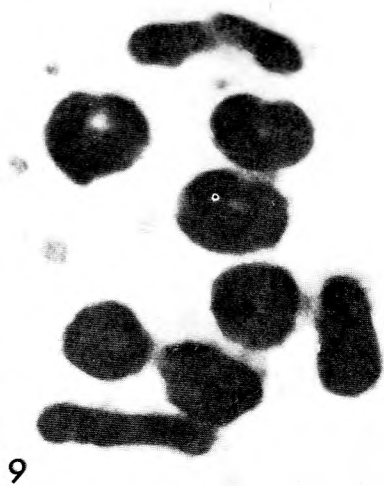
3b



4a



4b



Zaključak

Vrste roda *Leucanthemum*: *L. rotundifolium* i *L. praecox*, koje se po morfološkim osobinama i rasprostranjenju međusobno oštro razlikuju, imaju $2n = 2x = 18$ kromosoma pa su prema tome jedini dosad poznati diploidni predstavnici ovog roda u Jugoslaviji. Kariogrami *L. rotundifolium* i *L. praecox* razlikuju se, međutim, po apsolutnoj dužini i morfologiji kromosoma kao i po broju satelitnih kromosoma. Također postoji razlika u učestalosti hijazma kod bivalenata, koja je odraz razlike u dužini kromosoma.

Najljepše zahvaljujem prof. dru Z. Devidéu na pomoći i savjetima. Također zahvaljujem dru Lj. Ilijaniću i inž. Č. Šiliću na pomoći pri sakupljanju materijala.

6. Literatura

- Baksay, L., 1956: Cytotaxonomical studies on the flora of Hungary. Ann. Hist. Nat. Hung. 7. 227—228.
- Böcher, T. and Larsen, K., 1957: Cytotaxonomical studies in the Chrysanthemum Leucanthemum complex. Watsonia, 4, 11—16.
- Darlington, C. D. and La Cour, L. F., 1963: Methoden der Chromosomenuntersuchung. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- Dowrick, G. J., 1952: The chromosomes of Chrysanthemum. I The species. Hered. 6, 365—375.
- Duckert, M. M. et Favarger, C., 1956: Sur l'existence dans la Jura d'une forme diploïde de Chrysanthemum Leucanthemum L., Bull. Soc. bot. suisse. 66, 134—146.
- Favarger, C., 1959: Distribution en Suisse des races Chromosomiques de Chrysanthemum Leucanthemum L. Bull. Soc. bot. suisse. 69, 26—46.
- Favarger, C. et Villard, M., 1965: Nouvelles recherches sur Chrysanthemum Leucanthemum L. sens. lat. Bull. Soc. bot. suisse 75, 57—79.
- Feulgen, R., 1926: Die Nuklearfärbung. Abderhald. Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, V/2, 1055.
- Guinochet, M. et Logeais, A., 1962: Premières prospections caryologiques dans la flore des Alpes maritimes. Rev. Cyt. Biol. Vég. 25, 465—479.
- Heitz, E. — 1935. Die Nucleal-Quetschmethode. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 53, 870—878.
- Hillary, B. B., 1939: Improvements to the permanent root tip squash technique. Stain. Technol. 14, 97—99.
- Horvat, I. i Pawlowski, B., 1939: Istraživanje vegetacije planine Vranice. Ljetopis Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti 51, 149—152.
- Horvatić, S., 1935: Neuer Beitrag zur Kenntnis der Leucanthemum Formen in der Flora Jugoslaviens. Acta botanica Croatica. 10, 62—100.
- Horvatić, S., 1963: Genus Leucanthemum in der Flora Jugoslaviens. Acta botanica Croatica. 22, 203—218.

Tabla 4 — Plate 4

- Sl. 7 i 8. *L. rotundifolium*, kasna dijakineza.
- Sl. 9 i 10. *L. praecox*, metafaza I i telofaza II (donja desna ploča s 10 kromosoma).
- Fig. 7 and 8. *L. rotundifolium*, late diakinesis.
- Fig. 9 and 10. *L. praecox*, metaphase I and telophase II (the lower right telophase with 10 chromosomes).

- Levan, A., 1938: The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24, 471—489.
- Löve, A. and Löve, D., 1961: Chromosome numbers of central and northwest European plant species. *Opera Bot. (Lund)* 5, 1—581.
- Löve, A. and Solberg, T., 1965: IOPB Chromosome number reports IV. *Taxon* 14, 86—92.
- Martin, R. W. and Smith, F. H., 1955: Megagametophyte development in *Chrysanthemum Leucanthemum* L. *Bot. Gaz.* 116, 243—252.
- Matsuda, T., 1966: The accessory chromosomes of *Aster ageratoides* var. *tenuifolia*. *Bot. Mag. Tokyo*, 79, 366—375.
- Matsuda, T., 1967: The accessory chromosomes of *Aster ageratoides* var. *leiophyllus*. *Bot. Mag. Tokyo*, 80, 221—229.
- Mirković, D., 1966: Citotaksonomska istraživanja vrsta roda *Leucanthemum* Adans. em. Briqu. et Cav. na području Jugoslavije. *Acta botanica Croatica* 25, 137—152.
- Mulligan, A., 1958: Chromosome races in the *Chrysanthemum leucanthemum* complex. *Rhodora*, 60, 122—125.
- Polatschek, A., 1966: Cytotaxonomische Beiträge zur Flora der Ostalpenländer, II. *Österr. Bot. Z.* 113, (1) 101—147.
- Polya, J., 1950: Magyarozági növény fajok kromoszómaszámai. *Ann. Biol. Univ. Debrec.*, 1, 46—58.
- Shimotomai, N., 1937: Chromosomenzahlen bei einigen Arten von *Chrysanthemum*. *Z. Vererb.* 74, 30—33.
- Skalinska, M., Piotrowicz, M., Sokolowska-Kulczyńska, A., et al., 1961: Further additions to chromosome numbers of Polish Angiosperms. *Acta Bot. Polon.* 30, 463—489.
- Skalinska, M., 1964: Additions to chromosome number of Polish Angiosperms. *Acta Bot. Polon.* 33, 45—77.
- Tjio, J. H. and Levan A., 1950: — The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *An. Estac. Exp. Aula Dei.* 2, 21—64.
- Zeleny, V., 1965: Prispěvek k cytotaxonomii *Leucanthemum rotundifolium* (W. K.) D. C. *Preslia (Praha)*, 37, 438—440.

SUMMARY

CYTOTAXONOMICAL AND CYTOGENETICAL INVESTIGATION OF SPECIES OF THE GENUS *LEUCANTHEMUM* FROM YUGOSLAVIA

II

COMPARATIVE STUDIES ON DIPLOIDS: *L. ROTUNDIFOLIUM* (W. K.) DC. AND *L. PRAECOX* H-IC

Dražena Mirković

(Botanical Institute of the University Zagreb)

Leucanthemum rotundifolium and *L. praecox* are diploids ($2n = 18$) being thoroughly different in their morphological characteristics and their distribution area. Though having the same chromosome number both species differ in their chromosome size and morphology as well as in chiasma frequency.

In *L. rotundifolium* there are 3 types of chromosomes (length 5,5—7,6 μ) in the haploid set: 4 metacentrics, 3 submetacentrics and 2 submetacentrics with satellites. The number of chiasmata is 2—3 per bivalent.

L. praecox however has 4 types of chromosomes (length 4,6—6,8 μ) in the haploid set: 2 metacentrics, 4 submetacentrics, 1 metacentric with satellite and 2 submetacentrics with satellites. There are usually 1—2 chiasmata per bivalent.